



Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria

Desarrollos tecnológicos en el marco del Programa Nacional de Agroindustria y Agregado de Valor

Proyecto específico 1130043 (2013-2019)

Andrea Biolatto
Silvina Guidi
Mariana Nanni
Liliana Troilo



Ministerio de Agroindustria
Presidencia de la Nación

Autores



Claudia González

Licenciada en Ciencias Químicas y Doctora en Ciencias Químicas por la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Master en Ciencia y Tecnología de Alimentos, The Ohio State University. Coordinadora del Programa Nacional Agroindustria y Agregado de Valor del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; durante el período 2013 a 2018. Actualmente, es Profesora Adjunta de la Universidad Nacional Gral. San Martín, Investigadora Independiente del CONICET y Presidente Plataforma Alérgenos en Alimentos.



Liliana Troilo

Ingeniera Agrónoma egresada de la Universidad Nacional de Cuyo. Inició sus actividades en la EEA La Consulta INTA como Becaria de CONICET, fue Coordinadora del Programa Cambio Rural en la Provincia de San Juan y actualmente se desempeña en la EEA Mendoza como referente en gestión y Normas de Calidad. Es Profesora Titular de la Cátedra Seminario III de la Carrera de Ingeniería Agronómica de la UN San Juan.



Andrea Biolatto

Licenciada en Química con Orientación Analítica por la Universidad Nacional de Litoral, Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos por la Universidad Nacional del Litoral y Doctora en Química por la Universidad Nacional de La Plata. Cuenta con 25 años de trayectoria de investigación y desarrollo en el área de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Actualmente, es investigadora responsable de proyectos extra-INTA en la temática de Calidad de Carne y responsable del Laboratorio de Análisis de Agroalimentos, EEA INTA Concepción del Uruguay



Silvina Guidi

Licenciada en Ciencias Biológicas y Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Área Química Biológica. Sus comienzos en investigación y docencia se desarrollaron en el Dto. Química Biológica –FCEyN –UBA. Desde 1997 se desempeña como Investigadora en el Área Bioquímica y Nutrición, del Instituto Tecnología de Alimentos, INTA – Castelar



Mariana Nanni

Licenciada en Ciencias Biológicas por la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA y doctora de la UBA. Es Especialista en Gestión de la Tecnología y la Innovación por la UNTREF. Actualmente, es responsable del laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnología de Alimentos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y referente en Biotecnología Alimentaria.

PROLOGO

Es bien conocido que la producción de alimentos para el 2050 tendrá que incrementarse en un 70% (FAO) como consecuencia del aumento poblacional a nivel mundial, que, acorde a predicciones de la ONU, superará los 9.000 millones para ese periodo.

En los últimos años numerosos factores han influido en los hábitos alimenticios cotidianos -las exigencias laborales actuales, el stress, la crisis global, la limitación del tiempo disponible, la preocupación por el mantenimiento de la salud, entre otros- provocando una tendencia en los hábitos de consumo y compra de alimentos por parte del consumidor.

El desarrollo de agroindustrias competitivas ha sido crucial mejorar la calidad de los productos agrícolas y la calidad de lo que se demanda. Estas han también contribuido en la generación de empleo para la población rural, no sólo a nivel agrícola, sino también en actividades fuera de la explotación como manipulación, envasado, procesamiento, transporte y comercialización de productos alimentarios y agrícolas. Existen señales claras de que las agroindustrias están teniendo un impacto global significativo en el desarrollo económico y la reducción de la pobreza, tanto en las comunidades urbanas como rurales. Sin embargo, muchos países en desarrollo aún no han aprovechado todas las posibilidades que ofrecen las agroindustrias como motor de desarrollo económico.

La demanda de alimentos y productos agrícolas está sufriendo cambios sin precedentes. El aumento tanto del ingreso per cápita, como de la urbanización, el de hogares uniparenterales, y del número de mujeres trabajadoras ha incrementado la demanda de materias primas de alto valor, de productos procesados y de alimentos preparados. Existe una clara tendencia hacia dietas que incluyen una mayor cantidad de alimentos de origen animal, que aumenta a su vez la demanda de cereales para pienso. También se está dando un uso creciente de productos agrícolas, especialmente granos y cultivos oleaginosos, como materia prima para la producción de bioenergía. El comercio internacional y las comunicaciones están acelerando los cambios en la demanda, lo que conlleva la convergencia de patrones dietéticos y un creciente interés en comidas étnicas de lugares geográficos específicos. La naturaleza y alcance de la estructura cambiante de la demanda agroalimentaria ofrecen oportunidades sin precedentes para la diversificación y agregado de valor en el sector agrícola.

En este contexto, una de las nuevas exigencias de los consumidores es la sensibilización respecto del ambiente y la reticencia a la utilización de productos químicos, lo que demuestra el interés creciente por productos provenientes de la producción orgánica, los cuales generan menos insumos y residuos.

Consecuentemente con lo expuesto, el objetivo es satisfacer la demanda creciente de alimentos de manera ambiental, social y económicamente sostenible. De este modo, la investigación y el desarrollo tecnológico toman un papel importante para llevar a cabo este desafío.

El presente libro muestra avances en la generación de conocimientos y la búsqueda de tecnologías orientadas al desarrollo, diferenciación y valorización de alimentos llevados adelante dentro del proyecto de “Estrategias para la Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios” en el marco del Programa Nacional de Agroindustria y Agregado de Valor.

Dra. Claudia González
Programa PNAyAV

Presentación

Dra. Andrea Biolatto

Coordinadora PNAIyAV1130043

En una economía globalizada, que articula espacios regionales y locales con los mercados mundiales, la innovación tecnológica necesita del aporte de la investigación y desarrollo tecnológico. A partir de la generación de conocimientos en los principales ejes del Sistema Agroalimentario Argentino, se puede dar respuesta, de manera estratégica, a las demandas de los niveles nacional, regional y local.

En este sentido, y enmarcado en el Plan Estratégico Institucional (PEI), se da origen a la cartera de Programas Nacionales a nivel institucional y en él, al Programa Nacional de Agroindustria y Agregado de Valor. Aquí, motorizados por los problemas y las oportunidades emergentes, junto a la prospección, la disminución de las brechas tecnológicas, o a partir de temáticas donde el desarrollo tecnológico es insuficiente, se identificó como eje estratégico el desarrollo de herramientas de diferenciación y nuevos productos alimentarios, dando origen al Proyecto específico-PNAIyAV113043.

La gestión estratégica del PNAIyAV1130043, promovió las agendas de investigación y producción de conocimiento a partir de procesos participativos que permitieron identificar, priorizar y articular esfuerzos nacionales y regionales, y de este modo, sumar capacidades (recursos humanos e inversiones) intra y extra-institucionales, capitalizando fortalezas y ventajas competitivas.

Es aquí, en este libro, donde se muestran 31 trabajos completos con aporte a la innovación en diferentes cadenas agroalimentarias, que han podido lograrse durante el periodo 2013-2019 en el marco del Proyecto Especifico PNAIyAV1130043 “Estrategias de Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios”, con la participación, articulación y el compromiso de agentes de numerosas unidades de INTA, que fomentan y proponen la generación de conocimiento como insumo para la sustentabilidad social, económica y ambiental de nuestro país.

Contenido

1. APLICACIÓN DE FRUTAS FINAS DE LA PATAGONIA EN EL DESARROLLO DE ALIMENTOS FUNCIONALES
C. Paulino, I. Milanessi, F. Namor, A. De Michelis, M. Ochoa
2. BIOACTIVOS NATURALES EN MERMELADAS DE CIRUELAS
G. Reich, M. Murano, J. González, V. Pettinari, G. Barbagallo, M. Cirio, M. Villarreal, E. Kneetemann, G. Valentini, G. Corbino, R. Dománico
3. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS, FUNCIONALES Y TEXTURALES DE ARROZ DE VARIEDADES DIFERENTES PRODUCIDAS EN ARGENTINA
C. Liberman, C.E. Genevois, N. Sosa
4. CARACTERIZACIÓN Y VALORIZACIÓN DE PAPA ANDINA DEL NOROESTE ARGENTINO EN ASPECTOS RELACIONADOS CON LA CALIDAD NUTRICIONAL E INDUSTRIAL
S. Sucar, M. Carboni, G. A. Massa, S.L. Colman, M.F. Rey Burusco, M.N. Monte, C.A. Décima Oneto, S.E. Feingold
5. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE ACEITES DE DISTINTAS VARIEDADES DE NUEZ PECAN [*CARYA ILLINOINENSIS* (*WANGENH.*) K. KOCH] CULTIVADAS EN LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS
M. Panozzo, A. Biolatto, L. Consiglio Diez, V. Urbani, L.M. Zapata
6. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CEPAJE MALBEC INFLUENCIA DEL NIVEL DE CARGA DEL VIÑEDO Y DEL TIEMPO DE MACERACIÓN
M. Fanzone, J. Prieto, S. Sari, G. Aliquo, V. Jofré, M. Assof, J. Pérez Peña, S. Gómez Alonso, I. Hermosín Gutiérrez
7. DESARROLLO DE BARRA DE NUEZ PECAN CON CEREALES.
S. Guidi, A. Gómez, G. Polenta, M.C. López, R. Blasco
8. EFECTO DE LA FORMULACIÓN Y LAS CONDICIONES DE PROCESAMIENTO SOBRE EL DESARROLLO DEL PARDEAMIENTO NO ENZIMÁTICO Y LA ESTABILIDAD DE CAROTENOIDES EN COPOS DE MAÍZ
M.A. Cueto, G. Rolandelli, S. Perez Burillo, J.A. Ruffián-Henares, A.E. Farroni, M.P. Buera
9. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y TOXICIDAD DE EXTRACTOS NATURALES OBTENIDOS A PARTIR DE ESPECIES VEGETALES SILVESTRES
O.B. Micheloni, E. González, B. Leclerq, G. Rollandeli, L. Oackley, A.E. Farroni
10. ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS DE ESTRÉS TÉRMICO (HSPTS) COMO INDICADOR BIOQUÍMICO DE DAÑO POSCOSECHA EN MANDARINAS SATSUMA OKITSU

V. Ambrosi, F. Bello, M. Nanni, D. Vazquez, S. Guidi

11. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SENSORIAL DEL MÚSCULO *SEMITENDINOSUS* COCIDO *SOUS VIDE* DE VACAS ALIMENTADAS A DISTINTAS DIETAS Y TRATADAS CON TANINOS
V. Urbani, A. Biolatto, F. Carduza, C. Maitia, C. Sanow
12. EVALUACIÓN FLUORIMÉTRICA DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A LA LUZ SOBRE COMPUESTOS FUNCIONALES EN ACEITES DE OLIVA EXTRA VIRGEN
G. Díaz, J. Pega, A.M. Sancho, M. Nanni
13. EVALUACIÓN POSCOSECHA DE VARIEDADES DE CIRUELAS PARA USO EN LA INDUSTRIA DE LOS ALIMENTOS
G. Corbino, G. Valentini, M. Murano, R. Dománino
14. HARINAS DE ALGARROBAS DEL NOROESTE CORDOBÉS: PROPIEDADES QUÍMICAS Y FUNCIONALES
D. Labuckas, M. Arzac, M. Ledesma, A. Domina, C. Carranza, L. Rovetto, R. Aguilar, M. Silva y M.J. Martínez
15. IMPACTO DE LA INCORPORACIÓN DE LÍPIDOS VEGETALES Y ANTIOXIDANTES SOBRE EL COMPORTAMIENTO DEL STARTER DURANTE LA PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE UN QUESO FUNCIONAL EVALUADO POR TÉCNICAS INDEPENDIENTES DE CULTIVO
J. Pega, S. Rizzo, L. Rossetti, C.D. Pérez, G. Díaz, S.M. Ruzal, A.M. Descalzo, M. Nanni
16. INCIDENCIA DE DIFERENTES CEPAS DE LEVADURAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SOBRE LOS AROMAS FERMENTATIVOS DE VINOS CV. MALBEC DE MENDOZA, ARGENTINA
M. Assof, M. Fanzone, S. Sari, E. Bolcato, M. Bucolo, V. Jofré
17. INCORPORACIÓN DE VALOR AGREGADO A HONGOS COMESTIBLES PATAGÓNICOS: GIRGOLAS
E.H. Ohaco Domínguez, A. De Michelis
18. INFLUENCIA DE LA PARED CELULAR EN LA EXTRACCIÓN DE TANINOS DE UVAS BONARDA Y MALBEC
K. Garro Lopez, A. Catania, S. Sari, M. Fanzone, S. Gómez Talquenca, F. Casassa
19. INFLUENCIA DEL ALMACENAMIENTO Y PROCESADO DE DOS CULTIVARES DE BATATA 1EN EL CONTENIDO DE B-CAROTENO.
J. Gabilondo, M.V. Feijoo, G. Corbino, M. Héctor, L.S. Malec
20. LA PRESENCIA DE BACTERIAS LÁCTICAS COMO UN AGREGADO DE VALOR EN GRANOS ANDINOS
C.A. Fontana, P.D. Fontana, S.M. Salazar, G.M Vignolo

21. MEJORA EN LA CALIDAD NUTRICIONAL DE PANES A BASE DE HARINA DE TRIGO
V. Astiz, E.R. Molfese y M.L. Seghezzo
22. OBTENCIÓN DE BEBIDA FERMENTADA 100 % ARROZ TIPO CERVEZA
C. Liberman, M. Fernandez Preseiger, I. Villamonte, D. Prietto, P. Carletti
23. OBTENCIÓN DE MICROCÁPSULAS LIPOSOMALES CON HIERRO PARA FORTIFICAR LECHE CAPRINA
J.M. Fili, M.I. Margalef, M. Armada
24. OBTENCIÓN DE SNACKS DULCES Y SALADOS A PARTIR DEL SABORIZADO DE ALMENDRAS Y PISTACHOS
M.F. Mujica, A. Hierrezuelo, S. Montilla
25. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LECHUGA
R.E. González y M. Lanza Volpe
26. PULPA DE FRAMBUESA: VEHÍCULO PARA CEPAS DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS
M. Luján, S. Coria, V. Kleinjan, M. Ochoa, A. De Michelis
27. SELECCIÓN DE LEVADURAS NATIVAS DEL VALLE CALCHAQUÍ SALTEÑO PARA VINO TORRONTÉS
R. Semke, M. Fili, M. Gonzalez, M. Combina, L. Del Castillo
28. UTILIZACIÓN DE PÉTALOS DE ROSA COMO INSUMO EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS
J. Gabilondo, L.I. Schelegueda, C.A. Campos, F. Carduzza, L.E. Langman, T. Soteras, L. Arroyo, G. Corbino
29. VARIACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS EN DOS CULTIVARES DE BATATA DURANTE EL ALMACENAMIENTO
J. Gabilondo, G. Corbino, H. Chludil, L. Malec
30. VARIACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN UN CULTIVAR DE BATATA DE PULPA NARANJA DURANTE EL ALMACENAMIENTO
M.V. Szentivanyi, J. Gabilondo, M.V. Feijoo, C. Budde, L. Malec
31. VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN DOS CULTIVARES DE BATATA (IPOMOEA BATATA L.) DURANTE EL PROCESADO TÉRMICO PARA LA ELABORACIÓN DE DULCE.
J. Gabilondo, G. Corbino, H. Marti, L. Malec

APLICACIÓN DE FRUTAS FINAS DE LA PATAGONIA EN EL DESARROLLO DE ALIMENTOS FUNCIONALES

Paulino, C.¹; Milanessi, I.¹; Namor, F.¹; De Michelis, A.^{1,2}; Ochoa, M.¹

¹Facultad Ciencias y Tecnología de los Alimentos, Universidad Nac. del Comahue. 25 de Mayo 113, Villa Regina, Rio Negro, Argentina. Tel: 54-298-4463200.

²INTA AER El Bolsón- CONICET, Ap. 108 (8430) El Bolsón- Río Negro, FAX (0294-4492422)

Correo electrónico: carolina.paulino@facta.uncoma.edu.ar

RESUMEN

En la Argentina la producción de frutas finas (berries y cherries) se ha convertido en una actividad agroindustrial de suma importancia, debido a los variados productos de alta demanda que ofrece, a la generación de empleos y, asimismo, al fuerte impacto económico que esta clase de cultivos produce en las economías regionales donde tienen lugar.

Existe una creciente tendencia de asociación de la alimentación con el estado de salud de la persona; si bien la función principal de la dieta es aportar nutrientes para satisfacer las necesidades nutricionales del organismo, cada vez hay más pruebas científicas que apoyan la hipótesis de que algunos alimentos tienen el efecto de mejorar las condiciones físicas y mentales, así como de reducir el riesgo de contraer ciertas enfermedades. Las frutas finas de cultivo y las silvestres de la Patagonia argentina forman parte de este selecto grupo, cuya ingesta permite hacer frente a los cambios producidos por la presencia, en exceso, de radicales libres y especies reactivas de oxígeno que desencadenan un cuadro conocido como estrés oxidativo.

El objetivo de este trabajo fue diseñar alimentos de base frutihortícola regional con alto contenido de compuestos bioactivos, poder antirradicalario y ácido ascórbico. Para ello se trabajó con frutas de cultivo y silvestres de la comarca andina del paralelo 42: frambuesa, zarzamora, arándano y guinda, las cuales fueron procesadas y transformadas en pulpas o mermeladas y adicionadas con polvo de cassis y polvo de rosa mosqueta. Se analizaron Fenoles totales, flavonoides, poder antirradicalario, antocianinas totales, color polimérico y ácido ascórbico tanto en las pulpas puras como en sus mezclas, en las diferentes mermeladas adicionadas y en los polvos utilizados.

El agregado de rosa mosqueta o Cassis para mejorar el contenido de compuestos bioactivos en los productos (pulpas mezcla y mermeladas) fue satisfactorio ya que, si bien los procesos aplicados disminuyeron su concentración debido a las condiciones propias del tratamiento, la adición realizada permitió mantener los compuestos bioactivos y el PA en valores altos.

En conjunto, nuestros resultados indican que el empleo de las pulpas mezcla o las mermeladas fortificadas constituyen una estrategia adecuada para el desarrollo de alimentos ricos en antioxidantes. Además, los productos obtenidos podrían considerarse como una fuente no tradicional de ácido ascórbico.

Palabras clave: frutas finas, Patagonia, alimentos funcionales

ABSTRACT

In Argentina, the production of small fruits (berries and cherries) has become an agro-industrial activity of great importance, because of the varied products of high demand offering, to the creation of employments, and also to the strong economic impact that this kind of crops produced in regional economies where take place.

There is a growing trend of association of food with the state of health of people, although the main function of the diet is to provide nutrients to meet the nutritional needs of the organism, there is growing scientific evidence supporting the hypothesis that some foods have the effect of improving the physical conditions and mental, as well as reduce the risk of certain diseases. The small fruits, cultivated and wild, in Patagonia are part of this select group, whose intake allows you to cope with the changes brought about by the presence in excess of free radicals and reactive species of oxygen that trigger a chart known as oxidative stress.

The aim of this project was to develop products with regional raw material that content high bioactive compounds, antiradical activity and ascorbic acid. We used small fruits cultivated in the region of parallel 42: raspberry, blackBerry, blueberry, sourcherry, which were processed and transformed into pulp or jams and added with powder of cassis and rosehip.

In the present study, total phenols, flavonoids, antiradical activity, total anthocyanins, polymeric color and ascorbic acid of all products (pulpes, jams and powders) were investigated.

The addition of rosehip or cassis powders to improve the content of bioactive compounds in the products (mixture pulps and jams) was satisfactory because, although the applied processes decreased their concentration due to the conditions of the treatment, made adding allowed maintaining bioactive compounds and the antiradical activity in high values.

Overall, our results indicate that employment of the pulps mixed or fortified jams constitute a suitable strategy for the development of foods rich in antioxidants, whose bioactive properties remain stable during storage. In addition, the products obtained could be considered as a non-traditional source of ascorbic acid.

Keywords: Patagonia fruits, functional foods

INTRODUCCION

Existe una creciente tendencia de asociación de la alimentación con el estado de salud de la persona (1); si bien la función principal de la dieta es aportar los nutrientes para satisfacer las necesidades nutricionales del organismo, cada vez hay más pruebas científicas que apoyan la hipótesis de que algunos alimentos tienen el efecto de mejorar las condiciones físicas y mentales, así como de reducir el riesgo de contraer ciertas enfermedades (2). Las frutas finas de cultivo y las silvestres de la Patagonia argentina forman parte de este selecto grupo, cuya ingesta permite hacer frente a los cambios producidos por la presencia, en exceso, de radicales libres y especies reactivas de oxígeno que desencadenan un cuadro conocido como estrés oxidativo.

En la Argentina la producción de frutas finas (berries y cherries) se ha convertido en una actividad agroindustrial de suma importancia, debido a los variados productos de alta demanda que ofrece, a la generación de empleos y, asimismo, al fuerte impacto económico que esta clase de cultivos produce en las economías regionales donde tienen lugar. Tanto los productores de frutas finas como la mayor parte de los especialistas de la industria agroalimentaria, suelen brindar una opinión concordante en el sentido de que se trata de una actividad todavía en moderada expansión (3).

El sector de las frutas finas posee la particularidad de englobar dos grupos de cultivos diferentes: berries (frambuesas, moras, grosellas y arándanos) y cherries (guinda y cereza), y además actividades de recolección de frutos silvestres como la rosa mosqueta. Si bien constituyen producciones intensivas en mano de obra y capital, que generan alta rentabilidad en pequeñas superficies, las características de perecibilidad de estas frutas imponen cuidados y requerimientos específicos, tanto en la post-cosecha como en el transporte de las mismas. (4)

La Comarca Andina del paralelo 42° es la región que posee la mayor superficie cultivada (excepto en arándano), dado que son producciones que se adaptan bien en áreas climáticas con veranos frescos como los valles cordilleranos. (5).

Aunque la definición de los alimentos funcionales y su marco normativo vigente admite variantes, según los criterios y los países, estos productos son una realidad comercial creciente. Se sabe que el tamaño del mercado global de este tipo de alimentos ha venido creciendo en forma sostenida, superando actualmente los 862 billones de dólares. Según cifras entregadas por FAO y la ONU, para el 2050, la población mundial alcanzará los 9,1 mil millones de personas, de los cuales el 22% serán mayores de 60 años (1,9 mil millones). En este segmento etario, aumentará la demanda por alimentos que contribuyan a la prevención de enfermedades, es decir, los llamados alimentos funcionales; aquéllos que contienen ingredientes activos, que tienen un efecto fisiológico más allá del tradicional (6)

Diversos estudios han demostrado que las frutas finas son fuente de compuestos bioactivos, como flavonoides, ácidos fenólicos y vitamina C (7, 8, 9). Debido a su carácter estacional es interesante determinar si los productos derivados como pulpas, concentrados, pasteurizados, etc. pueden representar una fuente importante de compuestos bioactivos.

El objetivo de este trabajo fue diseñar alimentos de base frutihortícola regional con alto contenido de compuestos bioactivos, poder antirradicalario y ácido ascórbico.

MATERIALES Y METODOS

Las frutas fueron cosechadas por productores de la zona de la Comarca Andina del Paralelo 42, en su punto de madurez óptimo, y enviadas inmediatamente a Villa Regina, donde se conservaron en heladera a 5 °C hasta su utilización. Las variedades utilizadas fueron: frambuesa var. Tulameen, zarzamora var. Thornfree, guindas var. Montmorency, arándanos var. Elliot, rosa mosqueta silvestre var. Rosa eglanteria y cassis var. Silvergrietten. Los frutos frescos fueron sometidos a las siguientes operaciones y procesos:

Procesos

Las frutas fueron sometidas a diferentes procesos antes de preparar los 12 productos definitivos:

dos pulpas mezcla fortificadas con polvo de rosa mosqueta deshidratada (RMD) y ocho mermeladas: cuatro con agregado de polvo de MD y cuatro con agregado de polvo de cassis.

El agregado del polvo de RMD se realizó con la finalidad de aumentar la funcionalidad del producto resultante por incorporación significativa de ácido ascórbico, lo cual convertiría a estos nuevos alimentos en fuentes no tradicionales de este compuesto bioactivo. Además se potenciaría la concentración de Fenoles totales (FT), Flavonoides (Fv) y Poder antirradicalario (PA).

En el caso de polvo de cassis, si bien este aditivo también presenta una concentración de ascórbico importante y superior a las matrices utilizadas como base para la elaboración de los productos, la incorporación en la formulación persigue un aumento en la concentración y estabilidad de los pigmentos antociánicos, considerando que el color es uno de los atributos más relevantes en estos productos alimenticios, ya que el consumidor juzga los alimentos principalmente por su apariencia y los relaciona directamente con su calidad.

Pulpado

Aplicado a frambuesa y zarzamora. Las frutas se pulparon mediante batidora de inmersión en condiciones de presión y temperatura atmosféricas (en presencia de luz y oxígeno) conservándose a -18° C hasta su utilización.

Escaldado-pulpado

Se aplicó a guinda y arándano y se siguió la metodología reportada por Ochoa (10). Antes de realizar la operación de pulpado, se tomaron 200 gramos de fruta fresca entera y se sumergieron en 600 ml de agua hirviendo (98 °C) por 2 minutos, cumplido el tiempo se enfriaron sumergiéndolas en agua helada y se secaron con papel absorbente. El escaldado no se aplicó en todas las matrices disponibles ya que

las pertenecientes al género *Rubus* (frambuesa y zarzamora) presentan alta sensibilidad en el manejo en fresco, por lo que la aplicación de un proceso de estas características produciría un gran deterioro.

Pasteurizado

Las pulpas resultantes se envasaron en viales de vidrio, sellados con precintos metálicos y se pasteurizaron en baño termostatzado marca Thermo Scientific a 98 °C durante 10 minutos. Se escogió este par temperatura-tiempo ya que, la enzima peroxidasa (la cual puede estar presente en las matrices analizadas) es termorresistente y se la involucra en la degradación de flavonoides (11). Luego del tratamiento térmico, se dejaron enfriar los viales con una suave lluvia de agua fría hasta temperatura ambiente

Deshidratado

Aplicado a frutos frescos de rosa mosqueta y cassis. En el caso de la rosa mosqueta, se realizaron tres punciones ecuatoriales en la superficie de los frutos (12) antes de someterlos al secado. Los frutos de rosa mosqueta y cassis se colocaron en un secadero piloto con circulación de aire caliente a temperatura constante de 70 °C y velocidad de aire de 3 m/s, hasta una humedad final de 9% para rosa mosqueta y 12% para cassis. Una vez deshidratados, los frutos fueron pulverizados mediante un molinillo marca CoolBrand, y se homogeneizó el tamaño del polvo obtenido con un tamiz de 18 mesh.

Preparación de Pulpa mezcla fortificada

Se prepararon mezclas al 50% de pulpa de arándano/frambuesa y guinda/zarzamora y se les agregó un 8 % de polvo de RMD. Las combinaciones se seleccionaron en función de los resultados obtenidos previamente por el grupo de trabajo y la opinión de un panel sensorial interno realizado sobre las pulpas y a los fines de cumplir con el artículo 1363 del CAA para fortificados.

Luego de homogeneizar manualmente la mezcla y de unos minutos de reposo, se procedió al envasado en viales de vidrio sellados con precintos metálicos. Luego se pasteurizó el producto.

Preparación de mermeladas

Las pulpas puras de frambuesa, arándano, guinda y zarzamora se pesaron y se mezclaron con azúcar, en proporción uno a uno. Se calentó hasta ebullición, con fuego directo, en recipientes de acero inoxidable expuestos al ambiente. Se adicionó a la mezcla, antes de la ebullición, 8 % de RMD o 5 % de polvo de cassis según correspondiese. Durante la cocción se agitó la mezcla constantemente y se monitorearon los sólidos solubles. Los productos finales alcanzaron los 66 °Brix. Se envasaron en frascos de vidrio de 50 gramos esterilizados.

La determinación de los porcentajes de polvo se realizó en función de un panel sensorial interno. Un mayor porcentaje de polvo de cassis le confería alta acidez a las pulpas.

Determinaciones

Extracción de compuestos bioactivos: Las pulpas y mermeladas se pesaron entre 2 y 5 g, se añadieron 20 mL de solvente de extracción, solución al 1 % de HCl en etanol, y se colocó en un baño termostatzado con agitación (modelo Dubnoff) a 37 °C durante 30 minutos. Luego se filtró mediante vacío y el residuo se extrajo nuevamente con otros 20 ml de solvente. Esta operación se repitió dos veces más. Finalmente los extractos reunidos se llevaron a 100 mL con agua destilada. Los extractos y todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Fenoles totales: Se utilizó el método descrito por Medina (13) con algunas modificaciones. Se transfirieron 2 ml de extracto a un tubo de ensayo, y en él se adicionaron: una alícuota de 200 µl de solución al 1% de reactivo de Fast Blue BB en metanol, y 200 µl de NaOH al 5%. Luego de 60 minutos de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, se procedió a realizar la lectura de absorbancia a 420 nm con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Para la curva de calibrado se utilizó el mismo estándar externo que en la determinación de fenoles por Folin Ciocalteu (ácido gálico p.a. Biopack). Los resultados finales se expresaron como mg Ácido Gálico equivalente/100g producto.

Flavonoides. Se determinaron los flavonoides totales (Fv) por el método de formación de complejo con AlCl₃, contra un estándar externo de catequina (mg/L). Una alícuota del extracto se mezcló con 300 µL NaNO₂ 5%. Luego de 5 min se añaden 300 µL AlCl₃ 10% y finalmente, luego de 6 min, 2 mL NaOH 1 N. Se lleva a 10 mL con agua destilada. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 a 510 nm. Los resultados finales se expresaron como mg catequina equivalente/100g producto (14).

Poder antirradical. El poder antirradical (PA) fue analizado empleando el radical estable 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) en metanol (15). El grado de decoloración de la solución indicó la eficiencia antioxidante de la sustancia agregada. Se mezcló 3 mL de solución de DPPH en metanol (40 ppm) con diferentes alícuotas de muestra, ajustadas de modo de consumir entre 30 a 70 % del radical, completando el volumen final de 100 µL con agua destilada. Luego de 90 min se midió el cambio de absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. La cantidad de antioxidante (mg de producto) necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50% se denominó EC50 y para mayor simplicidad se definió el poder antirradical como 1/EC50 (1/mg de producto): esto significa que a mayor capacidad antioxidante, más efectivo es el producto como antioxidante.

Antocianinas Monoméricas. Se determinaron las antocianinas monoméricas (ACY) mediante el método de pH diferencial reportado por Wrolstad (16). La antocianina experimenta una transformación reversible en función del pH manifestado por cambio en la absorbancia. La forma oxonium predomina a pH 1 y el hemiacetal a pH 4.5. Una alícuota de 1 ml del extracto se llevó a pH 1,0 con el agregado de 4 ml de una solución buffer cloruro de potasio 0,025 M. Se procedió de la misma forma con otra alícuota del extracto que se llevó a pH 4,5 utilizando un buffer acetato de sodio 0,4 M. Se dejaron en reposo a temperatura ambiente al resguardo de la luz durante 15 minutos y se procedió a medir la absorbancia a 510 nm (máxima longitud de onda donde absorben los pigmentos antocianínicos) y 700

nm (para eliminar absorbancia dada por turbidez). Se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Los resultados finales se expresaron como miligramos de cianidina-3-glucósido por cada 100 gramos de producto (mg cianidina-3-glu/100 g FF).

Porcentaje de Color Polimérico (% CP). Se determinó utilizando el método del bisulfito (17). Las muestras blanqueadas con bisulfito se obtuvieron mediante la adición de 0,2 ml de una solución al 20% de metabisulfito de potasio a 2,8 ml de cada extracto. Las muestras control se obtuvieron mediante la adición de agua en lugar de la solución de metabisulfito de potasio. Las lecturas de absorbancia de ambas muestras (control y blanqueadas) se realizaron a 420 nm (λ de detección de compuestos pardos) y a 510 nm (λ máxima de la antocianina). También se realizaron lecturas de absorbancia a 700 nm para corregir la turbidez por lo que dichos valores fueron sustraídos. Se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. El porcentaje de color polimérico (% CP) es un indicador de la presencia de pigmentos polimerizados; incluye a los complejos taninos-antocianinas y los compuestos pardos.

Ácido Ascórbico Total. Esta determinación fue realizada por HPLC, según el método AOAC Collaborative Protocol, Brause, IFU Analytical Commission (18). Se utilizó una columna tipo C18 en fase reversa. La fase móvil fue KH₂PO₄ (0.5%, m/v), pH 2.5, con ditioneitol (DTT) (0.1%, m/v). Se utilizaron 5 estándares de calibración de ácido ascórbico y se aseguraron tiempos de retención estables. Se midió la respuesta máxima a 254 nm utilizando un detector de arreglo de diodos. Los resultados se informaron como miligramos de ácido ascórbico total por cada kilogramo de producto (mg Ascórbico Total/ Kg producto).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar el efecto del proceso sobre los fenoles totales, flavonoides, ácido ascórbico, poder antirradicalario, antocianinas y porcentaje de color polimérico, se aplicó un diseño completamente aleatorizado.

Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) para un nivel de significancia $\alpha = 0,05$ y se empleó la prueba de DGC (Di Rienzo, Guzmán, Casanoves) para la comparación de medias.

Se utilizó el programa estadístico Infostat v. 2012 (19).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pulpas mezclas fortificadas

En la **tabla 1** se presentan los valores de compuestos bioactivos, poder antirradicalario, ácido ascórbico, antocianinas y Color polimérico en las materias primas y en la pulpa mezcla arándano/frambuesa (AF) fortificada con RMD

Tabla 1. FT, Fv, PA, AA, ACY y %CP en rosa mosqueta deshidratada, pulpas de arándano y frambuesa y su mezcla fortificada.

	FT	Fv	PA	AA	ACY	% CP
Polvo RMD	8063 ± 412 ^A	1227 ± 27 ^a	14,38 ± 0,39 ^{A*}	7000 ± 125 ^{a*}	3 ± 1 ^{C''}	6 ± 1 ^{c''}
P. Arándano	1778 ± 84 ^C	134 ± 9 ^c	0,81 ± 0,05 ^{C*}	260 ± 10 ^{d*}	147 ± 4 ^{A''}	11 ± 1 ^{b''}
P. Frambuesa	317 ± 3 ^D	38 ± 3 ^d	0,48 ± 0,03 ^{D*}	467 ± 3 ^{b*}	40 ± 1 ^{B''}	22 ± 3 ^{a''}
P. mezcla A/F	3253 ± 98 ^B	366 ± 9 ^b	0,96 ± 0,04 ^{B*}	316 ± 0 ^{c*}	40 ± 1 ^{B''}	44 ± 3 ^{a''}

FT: fenoles totales (mg GAE/100 g), Fv: flavonoides (mg CE/100 g), PA: poder antirradical (mg-1), AA: ácido ascórbico (mg/kg), ACY: antocianinas monoméricas (mg cianidina-3-glu/100 g), %CP: porcentaje de color polimérico. RMD: rosa mosqueta deshidratada. A/F: arándano/frambuesa. Los valores representan la media (n = 3) ± SD. Medias con una letra común por columna no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

El contenido de FT cuantificados en la pulpa mezcla fue el doble del obtenido por cálculo matemático en función de las materias primas. Los Fv cuadruplican el valor teórico, mientras que el PA y el contenido de ácido ascórbico alcanzaron sólo el 50 y 35 % respectivamente de la concentración calculada.

Los comportamientos de FT y Fv respondieron a un aumento en la extractabilidad debido al factor temperatura (en la pasteurización) y a la inhibición de las enzimas oxidativas nativas de las matrices (20, 21, 22 y 23).

Como se sabe, el ácido ascórbico es un nutriente muy sensible a la temperatura, oxígeno, pH y luz (24), factores que tienden a disminuir su concentración y cuyo impacto se observa en el valor final cuantificado. Además se registra un efecto negativo resultante de la interacción entre las antocianinas y el ácido ascórbico que produciría la disminución de ambos compuestos, probablemente por la formación de peróxido de hidrógeno durante la oxidación del ácido ascórbico (25, 26, 27, 28 y 29). Las dos variables tienen repercusión directa sobre el poder antirradicalario que si bien no alcanzó el nivel esperado, alcanzó un valor significativamente más alto que las pulpas puras, quizás por la contribución de los otros compuestos bioactivos.

La concentración de ACY obtenida en la pulpa mezcla representó un 46 % del valor esperado, probablemente debido al efecto de la temperatura de pasteurización y a la interacción con el ácido ascórbico presente. Esta interacción también conduciría a un aumento en la formación de polímeros y decoloración de las tonalidades rojizas (25), lo cual se traduce en el valor elevado obtenido en el % CP.

Se puede destacar el alto contenido de fenoles totales, flavonoides, ácido ascórbico y poder antirradicalario que presentó el polvo de rosa mosqueta lo cual lo convierte en un excelente aditivo para aumentar la funcionalidad de diversos alimentos de base frutihortícola.

La **Tabla 2** presenta los datos correspondientes a la pulpa mezcla guinda/zarzamora (G/Z) fortificada y las materias primas utilizadas en su formulación.

Tabla 2. FT, Fv, PA, AA, ACY y %CP en rosa mosqueta deshidratada, pulpas de guinda y zarzamora y su mezcla fortificada

	FT	Fv	PA	AA	ACY	% CP
Polvo RMD	8063 ± 412 ^A	1227 ± 27 ^a	14,38 ± 0,39 ^{A*}	7000 ± 125 ^{a*}	3 ± 1 ^{D''}	6 ± 1 ^{b''}
P. Guinda	1816 ± 6 ^C	350 ± 10 ^c	1,03 ± 0,01 ^{C*}	136 ± 15 ^{d*}	23 ± 2 ^{C''}	40 ± 2 ^{a''}
P. Zarzamora	1118 ± 5 ^D	57 ± 4 ^d	0,63 ± 0,02 ^{D*}	444 ± 12 ^{b*}	160 ± 3 ^{A''}	5 ± 1 ^{b''}
P. mezcla G/Z	4057 ± 51 ^B	483 ± 22 ^b	1,10 ± 0,01 ^{B*}	316 ± 5 ^{c*}	54 ± 1 ^{B''}	44 ± 1 ^{a''}

FT: fenoles totales (mg GAE/100 g), Fv: flavonoides (mg CE/100 g), PA: poder antioxidante (mg-1), AA: ácido ascórbico (mg/kg), ACY: antocianinas monoméricas (mg cianidina-3-glu/100 g), %CP: porcentaje de color polimérico. RMD: rosa mosqueta deshidratada. A/F: arándano/frambuesa. Los valores representan la media (n = 3) ± SD. Medias con una letra común por columna no son significativamente diferentes (p ≤ 0,05)

El comportamiento de esta pulpa mezcla fue similar a la anterior: FT y Fv aumentaron en función de lo esperado (aunque Fv lo hizo en menor medida que en el caso anterior), mientras que PA si bien no alcanzó el nivel esperado mantiene un valor significativamente mayor que las pulpas originales puras. El AA solo alcanzó el 39% del valor teórico calculado. Las ACY alcanzaron el 64 % del valor esperado y el %CP obtenido fue elevado. Estos resultados se fundamentan de igual forma que en la pulpa de arándano/frambuesa. Para todas las variables esta pulpa presentó valores mayores a los de la pulpa arándano/frambuesa.

Las dos pulpas mezcla presentaron altos valores de FT, Fv y PA.

Se calcula que la ingesta diaria de flavonoides provenientes de la dieta es de entre 50 - 800 mg/día (30), aunque algunos autores (31) informan hasta 1 g. Una taza de té negro o un vaso de vino puede proporcionar hasta 200 mg de flavonoides totales, una manzana entre 6 y 10 mg, una naranja 10 mg, una cebolla 40 mg (30). Considerando 50 g de pulpa mezcla que podrían añadirse a un yogurt, un helado o postre individual el aporte aproximado de flavonoides sería de 183 mg para A/F y 241 mg para G/Z.

En cuanto a fenoles totales, aún no hay valores oficiales de ingesta recomendada. En 100 g de pulpa mezcla quedaron 3253 mg (A/F) y 4057 mg (G/Z) de ácido gálico equivalente, lo cual es un valor elevado si se compara con 100 gramos de: guinda (1816 mg), zarzamora (118 mg), pera (95 mg), manzana (213 mg), uva (953 mg), durazno (183 mg), higo (130 mg) y ciruela (436 mg); o con 100 ml de: café (389 mg), té verde (152 mg) y jugo de naranja (20 mg) (13).

El contenido de AA, si bien disminuyó durante la preparación, se mantuvo en un valor cercano al de otras frutas reconocidas como fuente de AA, 31,6 mg/100g, aportando 100 g de pulpa el 70% de la ingesta diaria recomendada según CAA (32).

Mermeladas fortificadas

En la **tabla 3** se presentan los valores de FT, Fv, PA, AA, ACY y %CP en los polvos de RMD y cassis utilizados para fortificar y en las mermeladas obtenidas en cada caso.

Tabla 3. Valores de FT, Fv, PA, AA, ACY y %CP en los polvos de RMD y cassis utilizados para fortificar y en las mermeladas obtenidas

	FT	Fv	PA	AA	ACY	% CP
Polvo RMD	8063 ± 412	1227 ± 27	14,38 ± 0,39	7000 ± 125	3 ± 1	6 ± 1
Polvo C	2934 ± 110	2197 ± 64	9,76 ± 0,29	900 ± 45	392 ± 20	6 ± 1
Zarzamora + RMD	1811 ± 211 ^B	193 ± 20 ^c	0,79 ± 0,06 ^{B*}	380 ± 4 ^{b*}	60 ± 7 ^{D''}	19 ± 2 ^{d''}
Zarzamora + C	911 ± 33 ^C	38 ± 4 ^f	0,74 ± 0,08 ^{B*}	140 ± 9 ^{f*}	87 ± 3 ^{B''}	14 ± 3 ^{e''}
Frambuesa + RMD	1564 ± 22 ^B	165 ± 1 ^d	0,74 ± 0,03 ^{B*}	365 ± 5 ^{c*}	15 ± 1 ^{G''}	33 ± 2 ^{b''}
Frambuesa + C	447 ± 8 ^D	31 ± 1 ^f	0,68 ± 0,05 ^{B*}	163 ± 7 ^{e*}	23 ± 1 ^{F''}	24 ± 1 ^{e''}
Arándano + RMD	2312 ± 50 ^A	237 ± 3 ^b	0,94 ± 0,06 ^{A*}	392 ± 7 ^{a*}	66 ± 2 ^{C''}	12 ± 2 ^{e''}
Arándano + C	1413 ± 23 ^C	130 ± 1 ^e	0,86 ± 0,03 ^{A*}	135 ± 4 ^{f*}	98 ± 3 ^{A''}	10 ± 1 ^{e''}
Guinda + RMD	2557 ± 30 ^A	349 ± 14 ^a	0,89 ± 0,05 ^{A*}	323 ± 4 ^{d*}	12 ± 1 ^{G''}	45 ± 2 ^{a''}
Guinda + C	1561 ± 52 ^B	187 ± 5 ^c	0,82 ± 0,04 ^{B*}	98 ± 2 ^{g*}	52 ± 2 ^{E''}	30 ± 1 ^{b''}

FT: fenoles totales (mg GAE/100 g), Fv: flavonoides (mg CE/100 g), PA: poder antioxidante (mg-1), AA: ácido ascórbico (mg/kg), ACY: antocianinas monoméricas (mg cianidina-3-glu/100 g), %CP: porcentaje de color polimérico. RMD: rosa mosqueta deshidratada. A/F: arándano/frambuesa. Los valores representan la media (n = 3) ± SD. Medias con una letra común por columna no son significativamente diferentes (p ≤ 0,05)

Teniendo en cuenta los valores esperados, en función de la composición de las materias primas, las mermeladas obtenidas recuperaron entre un 78 - 100 % del contenido de FT. Las mermeladas con polvo de RMD fueron las que mayor contenido de FT mostraron.

En las matrices con RMD el valor de Fv se acercó al 100 % del esperado en función de las materias primas originales. En las mermeladas con polvo de cassis los porcentajes obtenidos fueron menores, ubicándose entre el 40 y 80 % del valor esperado.

Comparando con otros alimentos de consumo habitual se puede decir que una porción de 25 g de mermelada (que podrían añadirse a un postre o preparación) podría suministrar los mismos fenoles totales proporcionados por 100 ml de té verde (en el caso de frambuesa + C) y los mismos que los obtenidos por consumo de una taza de café negro (guinda + RMD y arándano + RMD). El consumo de 25 g de mermelada guinda + RMD aportaría además el 45 % de los Fv de un vaso de vino tinto o una taza de té negro.

En cuanto a Poder antioxidante, este también se elevó correlacionándose con el contenido de Fv y FT (coeficientes de correlación de Pearson 0,85 y 0,91 respectivamente). Nuevamente, en la comparación dentro de cada matriz, las mermeladas con polvo de RMD presentaron valores superiores a las fortificadas con polvo de cassis.

El agregado de polvo de RMD y cassis a las mermeladas permitió el aumento significativo del PA: en zarzamora (22 y 14 %), frambuesa (37 y 26 %) y en guinda (19 y 9 %). En arándano se registraron disminuciones del 17% en el primer caso y 25 % con el agregado de polvo de cassis.

Las matrices con mayor contenido de ácido ascórbico fueron aquellas donde se agregó polvo de RMD. El impacto del proceso de elaboración de las mermeladas sobre esta variable fue significativo ($p \leq 0,05$), ya que se obtuvieron concentraciones entre el 61-76 % de los valores esperados.

Estas mermeladas podrían considerarse fuentes no tradicionales de ácido ascórbico. Las que contienen RMD permitirían incorporar en una porción (25 gramos): 95 mg (zarzamora + RMD), 92 mg (frambuesa + RMD), 98 mg (arándano + RMD) y 81 mg (guinda + RMD) de ácido ascórbico; mientras que en aquellas que se añadió polvo de cassis los valores son un poco más bajos pero igualmente interesantes: 35 mg (zarzamora + C), 41 mg (frambuesa + C), 34 mg (arándano + C) y 25 mg (guinda + C).

A los fines de establecer comparaciones, el contenido de ácido ascórbico en matrices reconocidas por ser fuente de este compuesto es por 100g: Naranja 50 mg; pimiento rojo 140 mg; kiwi 49mg y brócoli 89 mg. (33)

El polvo de cassis presentó un elevado contenido de ACY, lo cual impacta elevando las concentraciones en los productos derivados, si se los compara con el aporte del polvo de RMD. Sumado a esto, zarzamora y arándano fueron las matrices con mayor aporte de ACY desde la pulpa pura, haciendo que esas mermeladas (zarzamora + C y arándano + C) fueran las de contenido mayoritario de ACY.

En todos los casos el valor esperado (en función del porcentaje añadido) no se alcanzó, infiriéndose que factores tales como la temperatura de proceso, la concentración de azúcar y la presencia de ácido ascórbico afectaron notablemente la concentración de ACY. Si bien la ingesta diaria no está formalmente establecida, se consideran valores de consumo de antocianinas cercanos a los 200 mg/día (34 y 35), siendo mayores para los consumidores regulares de vino tinto (36). Por tanto, las mermeladas formuladas podrían considerarse una fuente alternativa de estos compuestos, considerando que por ejemplo, una porción (25 g) de mermelada de arándano con cassis aportaría 25 mg de ACY.

En cuanto al porcentaje de color polimérico las fortificaciones con polvo de cassis permitieron obtener productos donde se observó una menor polimerización de pigmentos en comparación con RMD y además no se hallaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con los valores de las mermeladas puras en cada fruta.

CONCLUSIONES

En las pulpas mezclas se puede destacar el elevado contenido de fenoles totales, flavonoides, y poder antioxidante que presentaron los productos finales. La pulpa mezcla de guinda/zarzamora presentó mayores valores para todas las variables estudiadas que la de arándano/frambuesa.

Se registró un efecto negativo resultante de la interacción entre las antocianinas y el ácido ascórbico que produciría la disminución de ambos compuestos en el producto, aun así el aporte de 100 g de pulpa mezcla cubre aproximadamente el 70% de la ingesta

Las mermeladas fortificadas con polvo de Rosa mosqueta o de cassis mantienen altos valores de compuestos bioactivos, siendo mejor la Rosa mosqueta para mantener el nivel de ácido ascórbico y el cassis para mantener el nivel de ACY.

El agregado de RMD o Cassis para mejorar el contenido de ácido ascórbico en los productos (pulpas mezcla y mermeladas) fue satisfactorio ya que, si bien los procesos aplicados disminuyeron su concentración debido a las condiciones propias del tratamiento, la adición realizada permitió mantener una concentración importante del compuesto en los productos finales. A su vez, esta adición fue favorable para mantener los compuestos bioactivos y el PA en valores altos.

En conjunto, nuestros resultados indican que el empleo de las pulpas mezcla o las mermeladas fortificadas constituyen una estrategia adecuada para el desarrollo de alimentos ricos en antioxidantes, cuyas propiedades bioactivas se mantengan estables durante el almacenamiento. Además, los productos obtenidos podrían considerarse como una fuente no tradicional de ácido ascórbico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional del Comahue y al PNAIyAV (INTA) por el financiamiento de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Aguilera García, C.; Barberá Mateos, J.; Díaz, L. (2010). Alimentos Funcionales: aproximación a una nueva alimentación. Instituto de Nutrición y trastornos alimentarios, Madrid, España.
2. Cooperación Transfronteriza España-Portugal (CTEP). (2010). Alimentos funcionales: función cognitiva y comportamiento. Manual Proyecto BIOEMPRENDE. Disponible on-line: <http://www.bioemprende.eu> (fecha de acceso: noviembre 2014).

3. Argentina Innovadora 2020. (2012). Núcleo socio-productivo estratégico. Procesamiento de alimentos. Documento de referencia. Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Presidencia de la Nación Argentina
4. Paulino, Carolina (2017) Pulpas de frutos patagónicos: procesos, conservación y desarrollo de alimentos funcionales. Trabajo de Tesis Doctoral de la Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina
5. Martínez, E. (2007). Frutas finas en la Región Andina Patagónica. Entrevista para el sitio web Fruticultura Sur. Recuperado el 25/09/2010. Disponible en: <http://fruticulturasur.com/fichaNota.php?articuloId=475>.
6. Jordán Fresno, G. (2013). Agrimundo. Las oportunidades para las empresas de Chile en los alimentos funcionales y nutraceuticos. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias; Fundación para la Innovación Agraria, Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile.
7. Häkkinen, S.; Kärenlampi S.; Mykkänen H.; Törrönen A. (2000). Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 48, n° 7, p. 2960-2965.
8. Kahkonen, M., A. Hopia, and M. Heinonen. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:4076-4082.
9. Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne JO, Dommès J (2006) Antioxidant capacity of black currant varies with organ, season, and cultivar. *J. of Agric Food Chem*. 54: 6271-6276.
10. Ochoa, M. 2011. Estudio del deterioro químico de guindas durante la deshidratación. Universidad Nacional de Bahía Blanca, Argentina. Memoria para optar por el título de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Bahía Blanca.
11. Schreier, P. y Miller E. (1985). Studies on flavonol degradation by peroxidase (donor: H₂O₂-oxidoreductase, EC1.11.1.7): Part 2-Quercetin. *Food Chemistry*. Vol. 18, n° 4, p. 301-317.
12. Ohaco Domínguez, E. (2012). Modelos del producto para optimizar equipos de secado convectivo para frutos de rosa mosqueta en términos de los tiempos del proceso y la calidad final del producto. Universidad Nacional del Sur, Argentina. Memoria para optar por el título de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Sur.
13. Medina, M. (2011). Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 59, n° 5, p. 1565–1571.
14. Zhishen, J.; Mengcheng, T. y Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. Vol. 64, no. 4, p. 555-559.
15. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 28, no. 1, p. 25-30.
16. Wrolstad, R. (2001). Color and Pigment Analyses in Fruit Products. Station Bulletin 624. Agricultural Experiment Station. Oregon State University, Corvallis, p. 1-17.
17. Giusti, M. y Wrolstad, R. (2005). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Unit F1.2. In: *Handbook of food analytical chemistry*, vol. 2: pigments, colorants, flavors, texture, and bioactive food components (p. 19–23). New York: John Wiley & Sons Inc.
18. Association of Official Analytical Chemistry (1998). Collaborative Protocol, Brause, IFU Analytical Commission. Edition Washington D.C.
19. Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; González, L.; Tablada, M. y Robledo, C. 2012. Software InfoStat versión 2012. Argentina: Grupo InfoStat, FCA, U.N.C., Arg.
20. Peleg, H.; Naim, M.; Rouseff, R. y Zehavi, U. (1991). Distribution of bound and free polyphenolic acids in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruit (*Citrus paradise*). *Journal of the Science Food and Agriculture*. Vol. 57, p. 417–426.
21. Nicoli, M.; Anese, M. y Parpinel, M. (2004). Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Science Technology*. Vol. 10, n° 94, p. 94-100.
22. Kalt, W.; McDonald, J. y Donner, H. 2000. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products, *Journal of Food Science*. Vol. 65, p. 390.
23. Dewanto, V.; Wu, X.; Adom, K. y Liu, R. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activities. *Journal Agricultural Food Chemistry*. Vol. 50, p. 3010.
24. Peinado Pardo, I. 2011. Influencia de las condiciones de deshidratación en los niveles de compuestos con actividad antioxidante del tomate cherry. Memoria para optar por el título de Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia. España.
25. Poei-Langston, M. y Wrolstad, R. 1981. Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flavonol model system. *Journal of Food Science*. Vol. 46, n° 4, p. 1218–1222.
26. Garzón, G. 1998. The Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins in Natural and Model Systems. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in Food Science and Technology. Submitted to Oregon State University.
27. Garzón, G. y Wrolstad, R. 2002. Comparison of the Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins in Strawberry Juice and Concentrate. *Journal of Food Science*. Vol. 67, n° 4, p. 1288–1299.
28. De Rosso, V. y Mercadante, A. 2007. The high ascorbic acid content is the main cause of the low stability of anthocyanin extracts from acerola. *Food Chemistry*. Vol. 103, n° 3, p. 935-943.
29. Fennema, O. 2010. *Química de los Alimentos* (3ra ed.) Zaragoza (España). Editorial Acirbia, S.A

30. Martino, V. 2000. Los flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. Vol. 19, n° 4, p. 303-308.
31. Middleton, E. y Kandaswami, C. 1994. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. *The flavonoids*. Ed. J.B. Harborne, p. 619-652. London: Chapman and Hall.
32. Código Alimentario Argentino. 2016. Resolución GMC N°46/03, Capítulo 5. http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp. Fecha de acceso: noviembre de 2016.
33. Dergal, S. 2006. Capítulo 7. Química de los alimentos. Cuarta edición. Ed. Pearson Educación, Mexico.
34. Robards, K.; Prenzler, P.; Tucker, G.; Swatsitang, P. y Glover, W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*. Vol. 66, n° 4, p. 401-436.
35. Delgado-Vargas, F.; Jiménez, A. y Paredes-López, O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains-characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical reviews in food science and nutrition*. Vol. 40, n° 3, p. 173-289.
36. Clifford, M. 2000. Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 80, n° 7, p. 1063-1072.

BIOACTIVOS NATURALES EN MERMELADAS DE CIRUELAS

G. Reich¹, M. Murano¹, J. González¹, V. Pettinari¹, G. Barbagallo¹, M. Cirio¹, M. Villarreal¹, E. Kneetemann¹, G. Valentini², G. Corbino² R. Dománico¹

¹Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Área Bioactivos Naturales. Av. Gral. Paz 5445 San Martín Bs As

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria San Pedro. San Pedro. Ruta 9. Km 170

Correo electrónico: corbino.graciela@inta.gob.ar

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo elaborar a escala de laboratorio mermeladas de ciruela con propiedades funcionales. Para tal fin se elaboraron mermeladas ajustando ciertos parámetros de elaboración para lograr un producto con mejor calidad nutricional que las disponibles en el mercado. Por otro lado, se obtuvieron tres concentrados de ciruelas en polvo mediante distintos procesos. Uno de estos concentrados fue utilizado para aditivar una de las mermeladas elaboradas. Por último se midió la actividad antioxidante (AA) y el contenido de antocianinas (AC) en las mermeladas de elaboración propia y se las comparó con las mermeladas comercializadas en CABA y GBA. Los valores de AA y AC de las mermeladas de elaboración propia fueron significativamente superiores a los obtenidos de las mermeladas comerciales. El concentrado de ciruela utilizado para aditivar una de las mermeladas resultó tener una elevada concentración de AC y aumentó notoriamente el contenido de AA y AC en la mermelada aditivada con dicho concentrado.

Palabras clave: bioactivos, mermeladas de ciruela, actividad antioxidante, antocianinas.

ABSTRACT

The objective of this work is to develop plum jams with functional properties at laboratory scale. For this purpose, jams were prepared by adjusting certain processing parameters to achieve a product with better nutritional quality than those available in the market. Three plum powder concentrates were obtained by different processes. One of these concentrates was used to add one of the elaborated jams. Finally, the antioxidant activity (AA) and the content of anthocyanins (AC) were measured in the homemade jams and compared with the jams marketed in CABA and GBA. The AA and AC values of the homemade jams were significantly higher than those obtained from commercial jams. The plum concentrate used to add one of the jams was found to have a high concentration of AC and markedly increased the content of AA and AC in the jam added with the concentrate.

Keywords: bioactives, plum jams, antioxidant activity, anthocyanins.

INTRODUCCIÓN

Las antocianinas son moléculas bioactivas ampliamente distribuidas en la naturaleza, responsables de conferir el color rojo característico de muchas frutas como arándanos, cerezas, frambuesas, ciruelas entre otras. Presentan además propiedades beneficiosas para la salud como su actividad hipocolesterolémica (1), antiplaquetaria (2) y antioxidante (3).

Los ciruelos son un grupo numeroso y diverso de especies frutales (4). Existe una gran variabilidad en el color del fruto, tanto de la piel como de la pulpa. El color de la piel puede variar de negro, púrpura o rojo a verde o amarillo. La pulpa puede ser amarilla o roja. Los cultivares de piel negra/morada y pulpa roja se los denomina comúnmente sanguíneos (5).

Los frutos de ciruelo son fuente de carbohidratos (glucosa, fructosa y sacarosa), fibras, vitaminas, taninos, enzimas y minerales (potasio, fósforo, calcio y magnesio). Contienen pectina, sorbitol y diversos fitoquímicos, tales como flavonoides, compuestos fenólicos y antocianinas. Se informa la presencia de los ácidos neoclorogénico y clorogénico, quercetin 3-rutinosido, quercetin 3-xilosido, quercetin 3-galactósido, quercetin 3-rhamnósido, ácido 3-hidroxycumarol quínico, procianidina B1 y procianidina B2 (3, 6, 7, 8). Las principales antocianinas encontradas en las ciruelas son cianidin 3-glucósico, cianidin 3-rutinosido, cianidin 3-xilosido, peonidin 3-rutinosido y peonidin 3-glucósico (9, 10).

Para llevar adelante una dieta saludable, la Organización Mundial de la Salud recomienda ingerir al menos cinco porciones de frutas y hortalizas al día. El aporte a la dieta de los compuestos antioxidantes de las frutas es muy importante y varía de acuerdo a la forma en que se consume, fresca o procesada.

Uno de los productos de estante más comúnmente obtenido a partir de la fruta es la mermelada, producida tanto en forma casera como a nivel industrial. Durante el procesamiento factores físicos y biológicos como el aumento de la temperatura y la actividad enzimática, pueden destruir los ácidos fenólicos y antocianinas. Numerosos estudios demostraron que en el proceso de elaboración sólo un 10-20% de los compuestos bioactivos presentes en la fruta fresca permanece en el producto final (11), disminuyendo de este modo sus propiedades funcionales.

El agregado a los alimentos de concentrados de frutas enriquecidos en componentes bioactivos, podría mejorar el nivel de estos en el producto final. Para lograr este objetivo es necesario trabajar en todas las etapas involucradas en la elaboración de una mermelada o dulce, debido a que las condiciones del proceso, pueden influir en los resultados.

En el marco del Proyecto Específico “Estrategias para la diferenciación de alimentos y obtención de nuevos productos alimentarios” del PNAIyAV 1130043 de INTA, la Estación Experimental Agropecuaria San Pedro junto al Centro de Agroalimentos del INTI, están llevando adelante diferentes líneas de trabajo de agregado de valor a la producción de ciruelas, entre los que podemos mencionar: concentrados de antocianinas, laminado de frutas y mermeladas con mayor calidad nutricional.

El objetivo de este trabajo fue: 1- Obtener concentrados de ciruela en polvo con la finalidad de utilizarlos para aditivar mermeladas de ciruela elaboradas a escala de laboratorio y 2- Comparar las mermeladas elaboradas con otras comerciales disponibles en CABA y GBA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos

Los reactivos 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Trolox, cloruro de potasio y acetato de sodio fueron adquiridos en la firma Sigma-Aldrich (Argentina).

Material vegetal: Frutos de ciruelas de pulpa y piel morada de la variedad Piamontesa fueron cosechados de plantas cultivadas en lotes experimentales pertenecientes a la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA San Pedro (Buenos Aires, Argentina 33° 44' 34.7" S, 59° 47' 34.4" W), en enero de 2016 (Figura 1). Las variedades de pulpa amarilla fueron adquiridas en el supermercado.

La fruta fue transportada inmediatamente al laboratorio de Poscosecha y Calidad de F y H (EEA INTA San Pedro) donde se realizaron análisis de calidad. A los frutos seleccionados se les determinó los parámetros físico-químicos peso (P), color de la piel, firmeza (F), pH, sólidos soluble totales (SST) y acidez titulable (AT). En el laboratorio Agroalimentos del INTI se procedió a la elaboración de los concentrados y mermeladas y a efectuar los análisis químicos de los productos obtenidos.

Obtención de concentrados de ciruela

Se utilizó la variedad de ciruela tipo sanguínea Piamontesa y se obtuvieron tres tipos de concentrados: ciruela en polvo, extracto de fruta en polvo y concentrado de AC. La ciruela en polvo se obtuvo a partir del homogenato de la fruta, el cual se liofilizó bajo condiciones específicas. El extracto soluble se obtuvo a partir de solución extractante que permitió solubilizar los principios activos, previo a su liofilización. El concentrado AC se obtuvo por separación cromatografía y posterior liofilizado.

Elaboración de las mermeladas

Se elaboraron cuatro mermeladas con las siguientes formulaciones: I: ciruela de pulpa amarilla, cáscara roja (variedad comercial), azúcar regular. II: ciruela tipo remolacha variedad Piamontesa, azúcar regular. III: Ciruela remolacha, reducida en azúcar (light). IV: Ciruela remolacha reducida en azúcar (light) con concentrado de AC (aditivada).

Las formulaciones a escala laboratorio, se elaboraron ajustando parámetros del proceso (temperatura y tiempo de cocción) y orden de agregado de los ingredientes.

Ensayo del radical DPPH •+

La capacidad antioxidante (CA) se determinó mediante el método del DPPH, el cual se basa en la utilización del radical libre 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (12). Se analizaron diez tipos de mermeladas de ciruela comerciales y cuatro muestras de mermelada de elaboración propia. La disminución de la absorbancia fue medida en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Modelo Lambda 25) a 517 nanómetros luego de 30 minutos de reacción. Los resultados se expresaron como micromoles TE (equivalentes Trolox) /100 g mermelada.

Antocianinas

El contenido de antocianinas (AC) se determinó de acuerdo al método del pH diferencial (AOAC) (13), basado en el cambio de absorptividad molar que ocurre al enfrentar una solución de antocianinas a dos tampones diferentes. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de cianidin 3-glucósico (CGE) /100 g de mermelada.

Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de variancia (ANOVA) y al test de Tuckey para identificar diferencias entre medias, utilizando el programa *InfoStat versión 2013*.



Figura 1. Ciruela variedad Piamontesa (E.E.A INTA San Pedro)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizó la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas de las cuatro mermeladas de ciruela de elaboración propia y de las mermeladas de marca comercial adquiridas en el mercado y seleccionadas al azar. Los extractos y concentrados fueron evaluados a través del contenido de antocianinas.

Los resultados se muestran en la tabla 1 y 2. En la figura 2 se observan los distintos colores de las muestras de mermeladas comerciales comparadas con una de elaboración propia y los productos para aditivar.

Las mermeladas elaboradas en el Laboratorio de Agroalimentos (INTI), presentaron un contenido de antocianinas significativamente superior a las mermeladas comerciales. El mayor valor de antocianinas lo presentó el formulado IV, correspondiente a la mermelada aditivada (44.8 mg CGE/100 g de mermelada) valor que supera en alrededor del 50% a la formulación III (19.7 mg CGE /100 g de mermelada) y a la II (17.9 mg CGE /100 g de mermelada). Todas estas mermeladas poseen como materia prima a la ciruela tipo remolacha. La formulación I, preparada con ciruela de piel roja y pulpa amarilla y azúcar regular, presentó AC, superior a la formulación II. Los fitoquímicos, generalmente, se encuentran más concentrados en la piel que en la pulpa (5). El contenido de antocianinas varía considerablemente entre variedades, las cuales se asocian con un amplio rango de intensidad de color. Variedades de piel negro oscuro y pulpas amarillas pueden presentar altos contenido de antocianinas, pudiendo alcanzar el fruto completo valores de hasta 30 mg/100 g (5). Asimismo, no se detectaron AC en cuatro de las mermeladas comerciales, tres de ellas pertenecientes a la línea reducida en azúcar. El concentrado presentó el mayor AC, siendo su valor 100 veces superior a la ciruela y al extracto en polvo.

Las mermeladas de elaboración propia, presentaron mayor AA (660-2.370 μ moles TE/100 g de mermelada) respecto a las comerciales (230-560 μ moles TE/100 g de mermelada). La AA de las mermeladas INTI light superaron ampliamente a las mermeladas con azúcar. Comparando la formulación II y III, mermeladas de ciruela de tipo sanguínea, con azúcar regular y reducida en azúcar respectivamente, se puede observar que esta última posee mayor AA y AC. Howard y colaboradores (16) hallaron que la mermelada de arándano reducida en azúcar retenía mayores niveles de antocianinas que las mermeladas con azúcar.

Los resultados de actividad antioxidante y contenido de antocianinas de ciruela en fresco, los cuales coinciden con estudios anteriores realizados por el grupo de trabajo, mostraron que la variedad de ciruela Piamontesa presentó valores AA de 2.138 μ moles TE/100 g de pesos fresco (PE) y una AC de 33.0 mg CGE/100 de peso fresco (PE). La mermelada INTI-light aditivada, mantiene la AA y supera el AC respecto a la fruta fresca. Las formulaciones I, II y III, presentan AA y CA, muy por debajo de los valores de la fruta fresca. En coincidencia con nuestros resultados, Kim y Padilla-Zakour (11) al analizar los cambios que se producían en la actividad antioxidante y en el contenido de antocianinas de frutos frescos de cereza, ciruelo y frambuesa respecto a sus mermeladas, hallaron una disminución significativa de la actividad antioxidante y del contenido de antocianinas. Resultados similares fueron hallados para frutilla y arándano bajo diferentes tipos de procesamiento (14, 15). La disminución puede ser atribuida a la destrucción de compuestos antioxidantes tales como la vitamina C y a las antocianinas (3). Esto último se evidencia por la rápida pérdida del color y degradación de los pigmentos (14).

Tabla 1. Contenido de antocianinas y capacidad antioxidante de mermeladas de ciruela de elaboración propia e industrial (I-X)

Muestras	Contenido de Antocianinas (mg/100 g mermelada)	Actividad Antioxidante. (μ mol TE/ 100 g mermelada)
INTI – I	21.1	660
INTI – II	17.9	850
I	0.3	230
II	0.5	280
III	0.2	260
IV	0.6	280
V	0.3	400
VI	0.5	300
VII	-	560
INTI Light- III	19.7	1.500
VIII Light	-	320
IX Light	-	130
X Light	-	320

INTI-Light IV (Aditivada)	44.8	2.370
----------------------------------	------	-------

Tabla 2. Contenido de antocianinas de ciruela en polvo, extracto en polvo y concentrado de AC

Muestra	mg de AC/100g polvo
Ciruela en polvo	20.70
Extracto en polvo	28.10
Concentrado de AC	2.55



A



B

Figura 2. A-Mermeladas de ciruela de elaboración propia (centro de la foto) e industrial.
B-Ciruela en polvo.

CONCLUSIONES

Los procesos involucrados en la producción de una mermelada, ruptura del tejido de la fruta, calentamiento, condiciones de alta acidez y azúcar, generan pérdidas de compuestos bioactivos.

Los menores valores hallados, en general, en la actividad antioxidante y en el contenido de antocianinas de los productos comerciales respecto a los elaborados en el laboratorio, nos indicaría que un ajuste de ciertos parámetros involucrados en la elaboración de este producto tradicional, puede contribuir a mejorar la calidad del mismo.

La evaluación de actividad antioxidante y en particular la cuantificación del contenido de antocianina, podría ser un indicador del proceso de elaboración y de la calidad de la mermelada.

Los tres concentrados de ciruela en polvo obtenidos podrían utilizarse para distintas aplicaciones alimentarias con el propósito de incrementar la calidad funcional de los productos obtenidos.

Por último, se propone en posteriores etapas de este proyecto aplicar la metodología a otras frutas.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece los aportes realizados por el Proyecto Específico 1130043 “Estrategias para la Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios (PNAIyAV-INTA), para realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

1. Tinker, L.F, Davis P.A., Schneeman, B.O (1994). Prune fiber or pectin compared with cellulose lowers plasma and liver lipids in rats with diet-induced hyperlipidemia. *The Journal of Nutrition*. 01 124(1):31-40.
2. Santhakumar, A.B., Kundur, A.K., Sabapathy, S., Stanly, R., Singh, I. (2015). The potential of anthocyanin-rich Queen Garnet plum juice supplementation in alleviating thrombotic risk under induced oxidative stress conditions. *Journal of Functional Foods*.14:747–757.
3. Piga, A., Del Caro, A., Corda, G. (2003). From plums to prunes: influence of drying parameters of polyphenols and antioxidants activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 12, 3675–3681.
4. Blazek, J. (2007). A survey of the genetic resources used in plum breeding. *Acta Horticulturae*. 734: 31-45.
5. Fanning, K.J., Topp, B., Russell, D., Stanley, R., Netzel, M. (2014). Japanese plums (*Prunus salicina* Lindl.) and phytochemicals – breeding, horticultural practice, postharvest storage, processing and bioactivity *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94: 2137–2147.

6. Kim, D.O., Jeong, S.W., Lee, C.Y. (2003). Antioxidants capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. 81: 321-326.
7. Stacewicz- Sapuntzakis, M, Bowen, P.E., Hussain, E.A., Damayanti-Wood, B.I., Farnsworth, N.R. (2001). Chemical Composition and Potential Health Effects of Prunes: A Functional Food? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 41: 251-286.
8. Vasantha Rupasinghe, H.P., Jayasankar, S., Lay, W. (2006). Variation in total and antioxidant capacity among European plum genotypes. *Scientia Horticulturae*. 108: 243-246.
9. Basanta, M. F., Marin, A., De Leo, S.A., Gerschenson, L. N., Erlejman, A.G., Rojas, A.M. (2016). Antioxidant Japanese plum (*Prunus salicina*) microparticles with potential for food preservation. *Journal of Functional Foods* 24. 187-196.
10. Usenik, V., Štampar, F., Veberič, R. (2009). Anthocyanins and fruit colour in plums (*Prunus domestica* L.) during ripening. *Food Chemistry*. 114. 529-534.
11. Kim, D.O., Padilla-Zakour, O.I. (2004). Jam processing effect on phenolics and antioxidant capacity in anthocyanin-rich fruits: cherry-plum and raspberry. *Journal Food Science*.69: 9. 395-400.
12. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*.28: 25-30.
13. Lee, J., Durst, R.W., Wrolstad, R.E. (2005). Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study *Journal of AOAC International*. 88: 5, 1269-1278.
14. Levaj, B., Kovacevie, D. B., Bituh, M., Dragovic-Uzelac, V. (2012). Influence of jam processing upon the contents of phenolics and antioxidant capacity in strowbweey fruit (*Fragaria ananassa* x *Duch.*). *Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. 7. 18-22.
15. Brownmiller, C., Howard, L-R., Prior, R. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity off processed blueberry products. *Journal of Food Science*. 73:5. 72-79.
16. Howard, L. R., Castrodale, CH., Brownmiller, C., Mauromoustakos, A. (2010). Jam Processing and Storage Effects on Blueberry Polyphenolics and Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (7). 4022–4029.

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS, FUNCIONALES Y TEXTURALES DE ARROZ DE VARIETADES DIFERENTES PRODUCIDAS EN ARGENTINA

C. Liberman^{1*}, C.E. Genevois^{2,3}, N. Sosa^{2,3}

¹ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina

² Facultad de Bromatología, Universidad Nacional de Entre Ríos. Pte. Perón 64 (2820) Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina.

³ Consejo Nacional de Ciencia y Técnica (CONICET). Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), CABA, Argentina.

Correo electrónico: liberman.claudia@inta.gob.ar

RESUMEN

Entre Ríos es una de las principales provincias productora de arroz (*Oriza sativa* L.) de la región mesopotámica Argentina, siendo su destino fundamentalmente el abastecimiento de mercados externos. Debido a su excelente la calidad surge la necesidad de caracterizar las distintas variedades y evaluar su potencial aplicación en el diseño y desarrollo de nuevos alimentos considerando sus principales propiedades. El objetivo del presente estudio fue evaluar los parámetros fisicoquímicos, funcionales y texturales del grano de arroz de cinco variedades producidas en la región arroceras de Argentina: Nutriar (L.P), Yerúa (L.P), Gurí INTA CL, Puita INTA CL, y Koshihikari INTA. Desarrolladas por la Facultad de Agronomía de la Plata y la Estación Experimental de Concepción del Uruguay, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Para la caracterización se efectuaron las siguientes determinaciones: dimensiones, temperatura de gelatinización, contenido de amilosa y perfil de textura. A partir de los resultados obtenidos sobre la caracterización fisicoquímica, funcional y textural de las diferentes variedades de arroz se detectaron diferencias que nos permiten inferir sus potenciales aplicaciones como ingredientes en la formulación de alimentos y/o el desarrollo de nuevos productos alimenticios.

Palabras clave: arroz, gelatinización, amilosa, perfil de textura

ABSTRACT

Entre Ríos is one of the main rice producing provinces of *Oriza sativa* L. in the Mesopotamian region of Argentina, being its primarily destination the supply of external markets. Due to its excellent quality, is necessary to characterize the different varieties and evaluate their potential application in the design and development of new food considering their main characteristics. The objective of this study was evaluate the physicochemical, functional and textural properties of the rice grain of five varieties produced in the rice region of Argentina: Nutriar (L.P), Yerúa (L.P), Gurí INTA CL, Puita INTA CL, and Koshihikari INTA, developed by the School of Agronomy of La Plata and the Experimental Station of Concepción del Uruguay, National Institute of Agricultural Technology. The characterization was determined by dimensions, gelatinization temperature, amylose content and texture profile analysis. From the results obtained it was detected differences between physicochemical, functional and textural characterization in the different varieties of rice, that allow us to infer their potential application as ingredients in the formulation of food and/or the development of new food products.

Keywords: rice, gelatinization, amylose, texture profile analysis

INTRODUCCIÓN

El arroz, el trigo y el maíz son los cereales más importantes del mundo. El arroz en particular es un alimento básico de consumo humano, especialmente en Asia, Medio Oriente, América Latina e India. En continentes como Asia, densamente poblados, el arroz aporta más del 80% de las calorías diarias consumidas, representando un consumo *per cápita* de 120 kg/año; mientras que, en Estados Unidos, el consumo *per cápita* es de 10 kg/año (FAO, MINAGRO 2017).

En Argentina, el arroz se produce en la región mesopotámica comprendida por las provincias de Entre Ríos, Corrientes, Santa Fe, Chaco y Formosa, y en ese orden de importancia. Debido a que no existe hábito cultural de consumir arroz diariamente, su consumo *per cápita* es de aproximadamente 6 kg/año, siendo este valor muy bajo respecto de otros países. El destino de la producción de arroz en Argentina es fundamentalmente el abastecimiento de mercados externos de alta calidad (1).

La calidad del grano de arroz surge de la acción de varios factores relacionados con las propiedades fisicoquímicas del grano, tales como tamaño, forma, peso, pigmentación, dureza, temperatura de gelatinización, contenido de amilosa del almidón. La calidad del grano de arroz de acuerdo a su aceptabilidad se evalúa de acuerdo a las preferencias y gustos de los consumidores, y ésta puede variar en cada país. Incluso, las preferencias por la longitud y transparencia del grano, grado de molienda y aroma pueden diferir en distintas regiones geográficas de un mismo país. En el mercado internacional se comercializan varios tipos de arroz entre los que se destacan: grano elaborado, grano descascarado (salvado), arroz pre-cocido (parboiled), arroz aromático. Según la relación grano largo/ ancho encontramos: largo, corto, doble, medio. También se los puede clasificar según su contenido de amilosa en arroz glutinoso o céreo, y no glutinosos. Con respecto a la calidad molinera y culinaria del grano de arroz, es de especial importancia emplear varios criterios en

su evaluación, tales como la presencia de centro blanco, longitud del grano, rendimiento en molino, porcentaje de arroz entero, temperatura de gelatinización, y contenido de amilosa (2, 3).

En el mercado la calidad se determina por la apariencia física, como por ejemplo el tamaño, forma, quebrado, y transparencia de los granos. Por lo tanto, la calidad del grano se puede definir considerando tres aspectos relevantes: calidad industrial, comercial y culinaria (4, 5)

Además de las formas tradicionales de consumo, propias de cada país y cultura, este cereal es utilizado como insumo en la elaboración de productos tales como fideos, arroz inflado, sopa instantánea, papillas para bebé, snacks, alfajores, y productos especiales para personas con intolerancia al gluten; también se emplea en la elaboración de cerveza, vino, aceite y vinagre. De esta manera, las características de la calidad del grano dependerán de su utilización como ingrediente en cada alimento (6).

El presente trabajo pretende evaluar los parámetros fisicoquímicos, funcionales y texturales del grano de arroz de cinco variedades producidas en la región arroceras de Argentina, las cuales a su vez, permitirán caracterizar las mismas para ser seleccionadas y utilizadas diferencialmente para la producción de alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Variedades de arroz

Se estudiaron cinco variedades de granos de arroz: Nutriar (L.P), Yeruá (L.P), Gurí INTA CL, Puita INTA CL, y Koshihikari INTA. Las variedades Nutriar y Yeruá provenientes del Plan de Mejoramiento Genético de la Facultad de Agronomía de la Plata, mientras que las variedades Puita, Gurí, Koshihikari INTA fueron provistas por el Grupo de Mejoramiento Genético de la Estación Experimental de Concepción del Uruguay, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Métodos

Dimensiones del grano de arroz

Para identificar el tipo de grano y clasificar las variedades de arroz se tuvieron en cuenta los parámetros que se detallan en la **Tabla 1** tales como: las dimensiones de sus ejes principales: longitudinal, transversal y la relación entre ambos (7).

Tabla 1. Dimensiones del grano de arroz crudo en función de sus ejes principales

Tipo de grano	Largo	Ancho	Relación L/A
Largo Fino	> 6	< 2	> 3
Largo Ancho *	> 6	> 3	
Mediano	5 > 6	2,5 - 3	2 - 3
Corto	< 5	> 2,5	1 - 2

*Solo en Argentina.

Determinación del contenido de amilosa

El contenido de amilosa se determinó utilizando el método colorimétrico descripto por Juliano y Hicks (8) utilizando como indicador solución yodo/yoduro de potasio, midiendo espectrofotométricamente a una longitud de onda de 620 nm.

Temperatura de gelatinización

La temperatura de gelatinización se evaluó mediante la prueba de dispersión alcalina propuesta por Zapatero (9). Brevemente, se seleccionaron de 20 granos pulidos de cada variedad, los cuales fueron colocados en cajas de Petri y cubiertos con 10 mL de una solución alcalina débil (1.7% KOH). Los granos fueron colocados en una incubadora a 30 °C durante 23 h. Los resultados se expresaron en una escala de siete puntos, reportando el valor promedio ± desvío estándar de tres mediciones independientes. En la **Tabla 2** se presenta la escala del grado de dispersión, los rangos de temperaturas de gelatinización y la clasificación empleada.

Tabla 2. Escala de interpretación para evaluar la relación entre el grado de dispersión y la temperatura de gelatinización.

Grado de dispersión	Temperatura gelatinización (°C)	Clasificación
1, 2 y 3	74 - 80	alta
4-5	69 - 73	intermedia
6-7	63 - 68	baja

Fuente: CIAT, 1989

Tiempo de cocción

El tiempo de cocción mínimo en exceso de agua se determinó por el método de Ranghino (11, 12). Para lo cual 100 ml de agua destilada se llevaron a ebullición y luego se agregaron 5 g de arroz crudo que se dejaron durante 10 minutos a ebullición suave agitando constantemente con varilla de vidrio. A intervalos de 1 minuto, se retiraron 10 granos de arroz e inmediatamente se prensaron entre dos

placas de vidrio limpias. El tiempo de cocción se registró tomando como referencia la ausencia de un centro blanco en el 90% de los granos.

Análisis del Perfil de Textura

Se llevó a cabo utilizando una máquina universal de textura (Instron, modelo 3345, USA) provista de una punta de compresión de 45 mm. Las mediciones se efectuaron siguiendo la metodología de Miao (13, 14). Los granos de arroz fueron comprimidos en dos ciclos secuenciales hasta un 90% de deformación a una velocidad de 0,3 mm/seg. Los parámetros de dureza, cohesividad, elasticidad, gomosidad y masticabilidad se calcularon a partir de las curvas de fuerza (N) versus distancia del cabezal (mm). El análisis se realizó en al menos 10 réplicas por cada variedad de arroz cocido, reportando el valor promedio \pm desvío estándar.

- Dureza: es la máxima fuerza requerida para deformar la muestra durante el primer ciclo de compresión (N).
- Cohesividad: se refiere a la relación entre el área positiva del segundo ciclo de compresión (Área 2) y el 1er ciclo de compresión (Área 1).
- Elasticidad: se expresa como el cociente entre la distancia a la máxima fuerza del Área 2 y la distancia a la máxima fuerza del Área 1 (adimensional).
- Gomosidad: se refiere al producto entre la dureza y la cohesividad (N).
- Masticabilidad: se refiere al producto entre la dureza, cohesividad y elasticidad (N).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El empleo de arroz y sus derivados se presenta como una alternativa interesante para el desarrollo de nuevos alimentos con alta calidad sensorial, nutricional y funcional que satisfaga las demandas de los consumidores actuales que buscan una alimentación saludable de fácil y rápida preparación.

La funcionalidad del arroz depende del peso molecular promedio de la amilosa y la amilopectina, así como de la organización molecular de estos glucanos dentro del granulo de almidón de arroz (8, 15, 16). Además, conocer la temperatura de gelatinización junto a las propiedades texturales permitirán establecer el uso adecuado de las distintas variedades de arroz en la elaboración de platos especiales y de alimentos considerando la alta demanda de almidones por parte de la industria alimenticia como espesantes y/o estabilizantes.

A continuación en la **Tabla 3** se detalla el tipo, contenido de amilosa, temperatura de gelatinización y tiempo de cocción de las diferentes variedades de arroz.

Tabla 3. Parámetros de calidad del grano de arroz correspondientes para cada variedad de arroz.

Variedad	Tipo	Amilosa	TG	Tiempo de cocción
Yeruá	Largo Ancho	18,8 ^b \pm 0,7 (B)	4,9 \pm 0,2 (I)	16,6 ^d \pm 0,4
Gurí	Largo fino	27,5 ^c \pm 0,5 (A)	6,9 \pm 0,1 (B)	13,9 ^e \pm 0,5
Puitá	Largo fino	27,6 ^c \pm 0,4 (A)	7,0 \pm 0,1 (B)	14,7 ^e \pm 1,1
Nutriar	Largo Fino	15,0 ^a \pm 0,4 (B)	6,5 \pm 0,5 (B)	16,8 ^f \pm 0,9
Koshihikari	Corto	18 ^b \pm 1 (B)	6,7 \pm 0,4 (B)	13,8 ^e \pm 0,7

Amilosa: valores expresados en porcentaje de grano de arroz, base humedad (valor promedio 13% humedad). TG: temperatura de gelatinización, valores expresados en escalada de 1-7 puntos. Tiempo de cocción: expresado en minutos.

A: alto; B: bajo; I: intermedio.

Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre variedades de arroz para un mismo parámetro de textura.

Del total de cinco variedades analizadas en el presente estudio, tres de ellas corresponden al tipo de grano largo fino (Gurí, Puitá, y Nutriar). Este tipo de arroz ha sido el más difundido en la zona arroceras Argentina desde la década del 70' hasta la actualidad, debido a su excelente calidad industrial y a la elevada demanda por parte del mercado internacional (17). Por otro, lado la variedad Yeruá con el tipo de grano comercial largo ancho han alcanzado muy buenos rendimientos industriales. Mientras que, la variedad Koshihikari se correspondió al tipo corto.

El análisis del contenido de amilosa junto con la temperatura de gelatinización son relevantes para determinar la calidad culinaria, las cuales son propias de cada variedad de arroz.

Con respecto al contenido de amilosa, la misma determina las características de consistencia y pegajosidad del arroz durante y después de la cocción (18), y se clasifica en: glutinosas o cerosas (1-2%), y en no cerosas (8-32%). Esta última clasificación, a su vez se subdivide en bajo (8-20%), intermedio (20-27%) y alto (27-32%) contenido de amilosa (2)

Según los resultados obtenidos, se puede observar en la **Tabla 3** que las variedades de arroz Yeruá, Nutriar y Koshihikari presentaron bajo contenido en amilosa. Dentro de estas variedades la Nutriar fue la variedad que menor ($p < 0,05$) contenido de amilosa presentó

respecto de Yeruá y Koshihikari. Mientras que, las variedades Gurí y Puitá se caracterizaron por presentar alto ($p < 0,05$) contenido en amilosa.

En cuanto a la temperatura de la gelatinización (TG) cabe mencionar que cada variedad tiene su propia TG y refleja la dureza de los gránulos de almidón y endosperma. A partir de los resultados obtenidos, se puede observar que las variedades Gurí, Puitá, Nutriar y Koshihikari presentaron valores entre 6,5-7,0 en una escala de 7 puntos, siendo clasificadas con temperaturas de gelatinización del almidón entre 63 y 68 °C. La variedad Yeruá presentó un valor de 4,9 en la escala de 7 puntos, por lo tanto, el rango de temperaturas de gelatinización se clasificó entre valores de 69 y 73 °C (**Tabla 3**).

La textura de las cinco variedades de grano de arroz cocida se caracterizó mediante un ensayo de Análisis del Perfil de Textura con el objetivo de simular las condiciones de masticación en la boca a través de la compresión de grano en dos ciclos secuenciales. En la **Tabla 4** se detallan los valores promedios de los parámetros del ensayo.

Tabla 4. Parámetros del Perfil de Textura de las diferentes variedades de arroz.

Variedad	Dureza (N)	Cohesividad	Elasticidad	Gomosidad (N)	Masticabilidad (N)
Yeruá	1,7 ^{bc} ±0,1	0,58 ^e ±0,02	0,66 ^e ±0,02	0,98 ^f ±0,08	0,65 ^{jk} ±0,05
Gurí	1,1 ^a ±0,2	0,61 ^e ±0,03	0,67 ^e ±0,04	0,66 ^h ±0,08	0,4 ⁱ ±0,1
Puitá	2,0 ^d ±0,1	0,58 ^e ±0,02	0,67 ^e ±0,01	0,78 ^h ±0,05	0,54 ^k ±0,04
Nutriar	1,9 ^{cd} ±0,3	0,55 ^e ± 0,02	0,62 ^e ±0,02	1,0 ^f ±0,1	0,7 ^{jk} ±0,1
Koshihikari	1,39 ^{ab} ±0,04	0,59 ^e ± 0,02	0,7 ^e ±0,1	1,2 ^g ±0,1	0,8 ^{ij} ±0,1

Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre variedades de arroz para un mismo parámetro de textura.

La dureza es un parámetro mecánico de la textura que representa la fuerza máxima requerida para comprimir entre los molares un alimento sólido (19). La dureza de las muestras analizadas presentó valores entre 1,1-2,0 N. Gurí y Koshihikari fueron las variedades de menor valor ($p < 0,05$), mientras que, Puitá fue la variedad que mayor valor ($p < 0,05$)

Los parámetros de cohesividad y elasticidad que están asociados a la extensión antes de la ruptura y la capacidad de recuperar la forma o longitud original un alimento, no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las variedades de arroz analizadas en el presente estudio.

A continuación se presenta el orden de los valores promedios obtenidos del análisis de gomosidad entre las diferentes variedades: Gurí y Puitá < Yeruá y Nutriar < Koshihikari. Cabe mencionar que este parámetro hace referencia a la fuerza necesaria para desintegrar un alimento semisólido a un estado tal que facilite su deglución (ISO 5492, 2012), por lo tanto las variedades Gurí y Puitá serían las de menor fuerza requieren para deglutir.

La variedad Puitá presentó valores de masticabilidad significativamente ($p < 0,05$) superiores al resto de las variedades, por lo tanto, se podría inferir que esta variedad requiere mayor esfuerzo para masticar el grano de arroz. Mientras que, la variedad Gurí presentó el menor ($p < 0,05$) valor de masticabilidad, y por ende el menor esfuerzo para masticar el arroz. Cabe destacar, que el parámetro de dureza correlacionó de forma significativa y positiva con la masticabilidad (Momento producto de Pearson =1; $p < 0,05$) en todas las variedades de arroz estudiadas en el presente trabajo.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos sobre la caracterización fisicoquímica, funcional y textural de las diferentes variedades de arroz se detectaron diferencias que nos permiten inferir sus potenciales aplicaciones como ingredientes en la formulación de alimentos y/o el desarrollo de nuevos productos alimenticios.

Considerando que, en la actualidad la industria alimentaria ofrece mayor cantidad de productos de fácil preparación, el desarrollo de alimentos de alto valor nutritivo y/o beneficiosos para el organismo es una de las principales tendencias, dado que busca ofrecer productos innovadores que satisfagan las crecientes necesidades del consumidor; cada vez más consciente de la relación entre determinados componentes alimentarios y la salud.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto Específico PNAyAV 1130043: Estrategias para la Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios – Proyecto integrador PNAyAV 1130041.

Proyecto Específico PNCyO 1127042: Bases Ecofisiológicas para Mejoramiento Genético y Calidad Diferenciada de cereales y oleaginosas por la contribución de los aportes para la realización de actividades.

Grupo Técnico de Mejoramiento Genético de Arroz (GTMGA) de la EEA INTA Concepción del Uruguay

Grupo de Mejoramiento Genético de La Universidad Nacional de la Plata –Facultad de Ingeniería Agrónoma.

REFERENCIAS

1. PROARROZ (2016). El mercado arrocero. Revista PROARROZ-CIAER. Disponible en: <http://proarroz.com.ar>
2. Iturriaga, L.B., de Mishima, B.L., Añon, M.C. (2006). Effect of amylose on starch pastes viscoelasticity and cooked grains stickiness in rice from seven argentine genotypes. Food research international, 39: 660-666.
3. Leewatchararongjaroen, J., Anuntagool, J. (2016). Effects of Dry-Milling and Wet-Milling on Chemical, Physical and Gelatinization. Properties of Rice Flour Rice Science, 23: 274-281.
4. Juliano, B.O (1971). A Simplified assay for milled-rice amylose. Cereal Science Today, 16: 334-340.
5. Cagampang, G.B., Perez, C.M., Juliano, O. (1973). A gel consistency test for eating quality of rice. Journal of the Science of Food and Agriculture, 24: 1589-1594.
6. Código Alimentario Argentino (1990). Capítulo IX: Alimentos Farináceos – Cereales, harinas y derivados. Resolución 1547 12/09/90. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp
7. Martínez y Cuevas Evaluación de la Calidad Culinaria y Molinera del Arroz .CIAT 73 p. <Serie 04SR-07.01 (1989)
8. Juliano, B.O., Hicks, P.A. (1996). Rice functional properties and rice food products. Food Reviews International, 12: 71-103.
9. García Zapatero, J. (2015). Efecto del tratamiento con altas presiones sobre la pre-gelatinización de arroz en grano y harina de arroz. Universidad Pública de Navarra .Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Disponible en: <https://academica-e.unavarra.es/xmlui/handle/2454/18047>
10. CIAT-Centro Internacional de Agricultura Tropical (1989)
11. Ranghino, F. (1966). Evaluation of the resistance of rice to cooking as a function of the time of gelatinization of the grains. Riso, 15: 117-127.
12. Juliano, B.O., Bechtel, D.B. (1985). The rice grain and its gross composition. In B.O. Juliano. Rice: chemistry and technology. 2nd edition (pp 17-57). St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemistry.
13. Miao, W., Wang, L., Xu, X., Pan, S. (2016). Evaluation of cooked rice texture using a novel sampling technique. Measurement, 89: 21-27.
14. Mohapatra, D., Bal, S. (2006). Cooking quality and instrumental textural attributes of cooked rice for different milling fractions. Journal of Food Engineering, 73: 253-259.
15. Badui Dergal S. (2006). Química de los Alimentos. 4^{ta} edición. Mexico: Editorial Pearson.
16. Fennema, O. (2008). Química de los Alimentos. 3ra edición. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
17. Livore, A. (2006). La genética del arroz. El arroz: su cultivo y sustentabilidad en Entre Ríos. Entre Ríos, Argentina: Editorial EDUNER.
18. Scholz, M.B.S., Magri, T.B. (2003). Tempo de cocimiento de cultivares e linhagens de arroz irrigado. In. Proceedings Congreso Da Cadeia Produtiva de arroz, I Reuniao de Pesquisa de arroz pp.51-53, 2002, Florianópolis, Brazil.
19. ISO 5492:2012. Sensory Analysis – Vocabulary.

CARACTERIZACIÓN Y VALORIZACIÓN DE PAPA ANDINA DEL NOROESTE ARGENTINO EN ASPECTOS RELACIONADOS CON LA CALIDAD NUTRICIONAL E INDUSTRIAL

S. Sucar¹, M. Carboni^{1,3}, G.A Massa^{1,2,3}, S.L Colman^{1,3}, M.F. Rey Burusco^{1,3}, M.N. Monte^{1,3}, C.A. Décima Oneto¹, S.E. Feingold¹

¹ Laboratorio de Agrobiotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), EEA, Balcarce CC 276 (7620), Balcarce, Argentina.

² Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina.

³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

Correo electrónico: sucar.sofia@inta.gob.ar

RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el tercer cultivo alimentario más importantes a nivel mundial. En el Noroeste de nuestro país se cultivan tradicionalmente papas andinas, que además de constituir un insumo básico para la alimentación, poseen potencial para el desarrollo territorial a través del agregado de valor.

Desde hace más de 7 años y con el fin de revalorizar su diversidad, nuestro grupo de investigación trabaja en la caracterización de más de 100 genotipos de papa nativa en aspectos relacionados a la calidad nutricional e industrial. Los resultados obtenidos han confirmado que esta colección presenta una amplia variabilidad fenotípica para las características estudiadas.

Se ha podido identificar un conjunto de genotipos de papa andina nativa cuyos tubérculos poseen alta calidad nutricional e industrial. Al momento, contamos con 4 de ellos que han sido evaluados durante al menos 3 campañas en ensayos en campo y que presentan contenido de azúcares reductores aceptables para la industria tanto antes como luego del almacenamiento en frío (4°C). Asimismo, hemos identificado 5 genotipos, evaluados hasta el momento durante una campaña en campo, que presentan un alto contenido de ácido clorogénico. Por último, hemos encontrado, luego de 3 años de análisis, genotipos andinos promisorios, que son tolerantes al pardeamiento enzimático frente al corte o a los golpes.

Actualmente nos encontramos trabajando en la tercera campaña de multiplicación de estos más de 100 genotipos de papa andina en la EEA-Abra Pampa, situada en la región de la Puna Jujeña, lo que nos permitirá contar con información concluyente acerca de estos caracteres.

Este proyecto de investigación constituye el inicio de la identificación de variedades andinas con valor agregado que puedan despertar el interés y la participación de productores locales y contribuir así al desarrollo territorial a través del aprovechamiento de la riqueza ancestral de la papa andina nativa.

Palabras clave: papas nativas, ácido clorogénico, pardeamiento enzimático, endulzamiento inducido por frío

ABSTRACT

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is among the most important food crop worldwide. In Northwestern Argentina Andean potatoes are traditionally grown, constituting not only a main supply for human diet but also a key element for the potential development of added-value products in the territory.

With the aim of unveiling its diversity, our research group has been working in the characterization of more than 100 Andean potato genotypes in aspects related to nutritional and industrial quality for the past 7 years. Results obtained confirm that the collection analyzed presents a wide phenotypic diversity for the characters studied.

A group of tubers with high nutritional and industrial quality has been identified. At the moment, there are 4 Andean potato genotypes, which have been evaluated over 3 field trials, which show acceptable reducing sugar content not only before but also after being cold stored. Also, we have identified 5 genotypes, evaluated over 1 field trial, presenting a high chlorogenic acid content. Moreover, there are a group of andean genotypes that proved to be tolerant to enzymatic browning over 3 field trials.

At the present, we are working in the third field trial for analysis of this collection of Andean genotypes in EEA-Abra Pampa, in the dry "Puna" area of Jujuy, which will provide conclusive data on these aspects.

This research constitutes the beginning of the identification of Andean varieties with added value that could stimulate interest among local producers and contribute to the development of small stake holders through the utilization of the ancestral wealth of native Andean potato.

Keywords: Andean potato, chlorogenic acid, browning, cold sweetening.

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos más antiguos que se conocen. Es el tercer cultivo alimentario del mundo y la dicotiledónea más importante en la alimentación humana (1). La papa cultivada abarca dos grandes grupos i) *Tuberosum* y ii) *Andigena*, que han sido clasificados como grupos de la misma especie (2) o como subespecies (3). Cualquiera sea la clasificación taxonómica pertinente, estos grupos constituyen lo que se denomina "papas modernas" (mejoradas en Europa en los últimos 400 años) y "papas nativas" (domesticadas en el altiplano de América del Sur en los últimos 7.000 años), respectivamente. En el Noroeste de nuestro país crece naturalmente, y desde hace más de 7000 años se cultivan papas andinas, insumo básico tanto para la alimentación como así también para el desarrollo de mercados locales que permitan su comercialización.

Estas papas presentan mayor diversidad que las papas modernas, las que habitualmente consumimos, ya que son producto de la domesticación y selección generación tras generación por parte de los agricultores. Además de ello, presentan características nutricionales superiores que las hacen interesantes como alimento funcional y como base de una industria con agregado de valor e impacto potencial en el territorio.

En la última década comenzaron a aplicarse políticas activas orientadas a generar valor agregado y competitividad al sector de la producción de alimentos en nuestro país. Asimismo, la producción de papa para uso industrial en Argentina ha ido aumentando en los últimos años asociada a la instalación de plantas elaboradoras de papa prefrita destinadas a abastecer el mercado interno y externo. Para acompañar este proceso se hace indispensable la investigación y desarrollo de tecnologías que generen productos de papa con alta calidad industrial, que pueda ser almacenada a baja temperatura para su conservación, que resista el pardeamiento enzimático, así como también, que presente propiedades nutraceuticas, como alto contenido de compuestos antioxidantes.

Uno de los principales problemas durante la producción de papa industrial es la acumulación de azúcares reductores en los tubérculos por el efecto de la baja temperatura. El almacenamiento de los tubérculos a bajas temperaturas es necesario para disminuir la pérdida de agua, el envejecimiento, el brotado y la actividad de patógenos. Esto representa un problema para las papas destinadas al procesamiento, debido a que la mayoría de los cultivares acumulan azúcares reductores a temperaturas inferiores a 10 °C y esto provoca que las papas chips derivadas de estos tubérculos adquieran un color oscuro y sean más amargas (4). Este fenómeno es conocido como endulzamiento inducido por frío. Otro efecto no deseable es el color café que se forma al cortar y/o maltratar los tubérculos. Este proceso es denominado pardeamiento enzimático ya que las reacciones iniciales que intervienen en este fenómeno están catalizadas por enzimas polifenol oxidasas. Se ha reportado que los genotipos nativos presentan bajo pardeamiento con respecto a las variedades comerciales (5), sin embargo, esta característica no ha sido estudiada en profundidad en las papas nativas argentinas. Otro de los aspectos nutricionales de interés es el contenido de ácido clorogénico, un antioxidante natural. Los antioxidantes exhiben un amplio rango de actividades biológicas, incluidos efectos antibióticos, antivirales, antiinflamatorios, antialérgicos, antitrombóticos y vasodilatadores. El ácido clorogénico ha sido asociado a la prevención del cáncer o enfermedades cerebrovasculares (6, 7).

La gran diversidad genética presente en las papas nativas hace que estas sean un material de estudio interesante para la búsqueda de variedades con características deseables, que generen agregado de valor y puedan potencialmente así, promover el desarrollo del territorio.

El objetivo del presente trabajo es caracterizar una colección de papa nativa del noroeste de nuestro país en cuanto a aspectos relacionados a la calidad nutricional e industrial, particularmente pardeamiento enzimático, contenido de ácido clorogénico, y comportamiento frente al endulzamiento inducido por frío.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las introducciones de *Solanum tuberosum* Grupo *Andigena* utilizadas fueron provistas por el Banco de Germoplasma de Papa y Forrajeras de la EEA INTA Balcarce (BAL), el cual ha realizado numerosas colectas en las provincias de Jujuy y Salta desde la década del '70 (8-12) y desde entonces mantiene y resguarda más de 400 introducciones de papa andina. Cada introducción está representada por un único genotipo identificado por el código de acceso al Banco. Por otro lado, el nombre de la variedad corresponde a la designación establecida por los productores locales, la cual se relaciona con las características fenotípicas del tubérculo (Anexo Tabla 1).

Desde hace más de 7 años, nuestro grupo de investigación trabaja en la caracterización de este germoplasma andino con el fin de revalorizar su diversidad genética. Se han seleccionado 48 introducciones almacenadas, representando variabilidad en aspectos morfológicos del tubérculo, tales como forma, color de piel y color de pulpa y distribución de ojos¹³. Este material vegetal, mantenido in vitro, fue multiplicado en invernadero a contraestación. Se realizaron tres ensayos en campo con dos repeticiones en bloques aleatorizados desde noviembre hasta Abril durante 3 años consecutivos (2010-2011, 2011-2012 y 2012-2013). Los dos primeros en un campo experimental de 500 m² ubicado en la Escuela Agrotécnica N° 3 de Humahuaca (23° 12' 5" S, 65° 21' 0" O, 2939 msnm) y el tercero en un campo experimental de 600 m² ubicado en el departamento de Yavi (22° 6' 4" S, 65° 35' 44" O, 3377 msnm), todos ellos en la provincia de Jujuy.

A partir del año 2014 se incorporaron 66 genotipos nuevos a la línea de trabajo, con el objetivo de abarcar una mayor diversidad genética y fenotípica. El total de estos 114 genotipos fueron multiplicados durante dos ensayos consecutivos en campo en la Estación Experimental de INTA Abra Pampa, Jujuy (23°45'S 65°30'O, 3600 msnm) (2015-2016 y 2016-2017). Actualmente se inició la tercera campaña en la EEA-Abra Pampa de INTA, con el fin de contar con 3 años consecutivos de ensayos utilizando los 114 genotipos.

Este panel quedó conformado entonces por 99 introducciones de papa nativa provistas por el BAL, 3 genotipos provistos por la Universidad nacional de Jujuy, 7 genotipos de Imilla Negra donados por la Cooperativa CAUQUEVA, 4 variedades de papa moderna (*S. tuberosum* group *Tuberosum*) y el genotipo de referencia secuenciado DM1-3 516 R44, los cuales están siendo evaluados en aspectos que hacen a la calidad nutricional e industrial, particularmente:

Contenido de Ácido Clorogénico: Cinco gramos de papa fresca se homogeniza en 15 ml de metanol durante 60 segundos en ultraturrax, luego se filtran en papel, se pasan por cartuchos C18 y por filtro de acetato de celulosa de 0,22 μm . Luego se colecta en vial y se cuantifica el ácido clorogénico en Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) marca SHIMADZU modelo Prominence, software Lc solution.

Determinación de Pardeamiento enzimático: por colorimetría (Colorímetro Minolta Chroma Meter CR310).

Evaluación del color de chips: mediante Carta de colores desarrollada por el Instituto de Almacenamiento y Procesamiento de Productos Agrícolas de Wageningen (Holanda), de nueve puntos: desde amarillo muy claro (9) a marrón muy oscuro (1) y por colorimetría (Espectrofotómetro Konica Minolta CM-600), tanto antes del almacenamiento en frío como luego del almacenamiento a 4 °C durante 2 meses.

Contenido de Azúcares reductores (AR): Extracción y cuantificación por HPLC, tanto antes del almacenamiento en frío como luego del almacenamiento a 4 °C durante 2 meses

Para los análisis de endulzamiento inducido por frío se seleccionaron 10 tubérculos sanos de cada introducción y se almacenaron en una cámara a 4 °C en oscuridad y condiciones de humedad constantes. Las determinaciones se realizaron antes del almacenamiento y luego de dos meses de almacenamiento en frío.

Para la producción de papas fritas en hojuelas (chips) se utilizaron 12 rodajas frescas de 1.5-2 mm de espesor (cuatro de cada tubérculo) y se fritaron a 180 °C durante 3 min o hasta la finalización del burbujeo del aceite. Las papas chips obtenidas se escurrieron y se colocaron sobre una superficie blanca para la evaluación del color.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Endulzamiento inducido por frío

Para analizar la respuesta al endulzamiento inducido por frío se analizó el contenido de azúcares reductores y el color de las papas chips antes del almacenamiento y luego de dos meses de almacenamiento en frío de los tubérculos provenientes de 3 ensayos en campo. Las 48 variedades nativas de papa mostraron una gran variabilidad en cuanto al contenido de azúcares reductores tanto antes como luego del almacenamiento en frío (Fig. 1). Los tubérculos analizados antes del almacenamiento presentaron en conjunto un contenido de azúcares reductores promedio de 2.08 ± 1.23 mg/g de peso fresco, mientras que luego del almacenamiento a 4 °C este valor se incrementó significativamente a 6.64 ± 3.49 mg/g de peso fresco en promedio. En este panel se registraron concentraciones de azúcares reductores desde 1.09 hasta 16.65 mg/g de peso fresco luego del almacenamiento según la introducción analizada.

Si bien los valores críticos de contenido de azúcares reductores en el producto frito aceptados por la industria varían según los estándares de cada compañía, se establece que valores mayores a 2.5 mg/g de peso fresco no son industrialmente aceptables (15, 16, 17). Teniendo en cuenta este valor pudimos clasificar la respuesta al endulzamiento inducido por frío en 3 categorías. Las introducciones CL 641, CCS 1350, CL 650, CCS 1384 y CCS 1199 mostraron una respuesta de tipo I, en la que el contenido de azúcares reductores tanto antes como luego del almacenamiento en frío fue menor al límite de 2.5 mg/g de peso fresco. Es por esto que pueden considerarse como resistentes al endulzamiento inducido por frío. La mayor parte del panel estudiado, 26 introducciones, mostraron una respuesta de tipo II, con un contenido de azúcares reductores aceptable antes del almacenamiento en frío pero inaceptable luego del mismo. Finalmente, 17 introducciones tuvieron una respuesta de tipo III, con un contenido de azúcares reductores mayor a 2.5 mg/g de peso fresco tanto antes como luego del almacenamiento en frío.

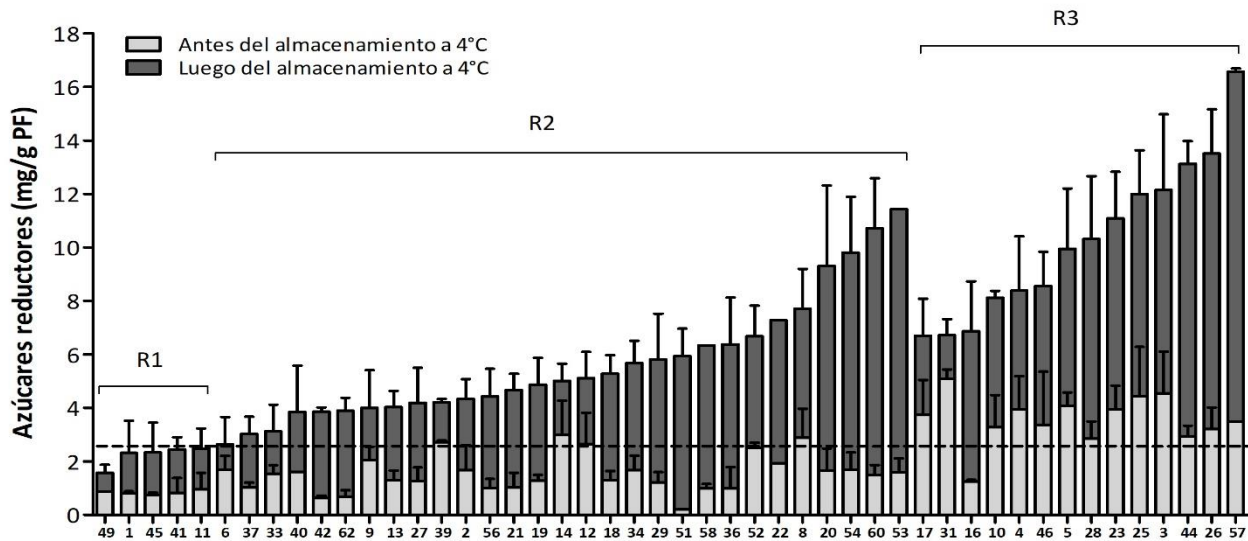


Figura 1. Contenido de azúcares reductores (mg/g de peso fresco) y respuesta al endulzamiento inducido por frío (R1, R2 y R3) de tubérculos antes del almacenamiento (barras claras) y tubérculos luego del almacenamiento en frío (barras oscuras). Las barras corresponden a valores promedio y las líneas a desviaciones estándar. La línea punteada en 2.5 mg/g de peso fresco indica el valor máximo de contenido de azúcares reductores aceptado por la industria¹⁸.

Otra de las características útiles para evaluar la calidad de chips de papa es el color. Este panel de 48 introducciones fue evaluado utilizando una Carta de Colores (Fig. 2.) Los tubérculos antes del almacenamiento mostraron colores claros, con un promedio de puntaje de 7. Al ser almacenados en frío, la calidad de las papas chips disminuyó y este puntaje bajó a un valor promedio de 3.8 (Fig. 2). En este caso también se observó una gran diversidad de puntajes según la introducción analizada. CCS 1330, CCS 1199, CCS 1384 y LC 348 producen chips de buena calidad con puntajes de hasta 8 incluso luego del almacenamiento a 4 °C (Fig. 3). La evaluación de color en introducciones con pulpa coloreada, como CL 658 y CCS 1385, es dificultosa mediante la carta de colores ya que la misma está desarrollada para variedades con pulpa blanca/amarilla. En estos casos, se efectuó por colorimetría en los ensayos posteriores a campo (campanas Abra Pampa 2015-2016, 2016-2017 y 2017-2018 (en curso) (datos no mostrados). Debido a esto es que dichas introducciones no se muestran en la Figura 2.

Siete introducciones presentaron puntajes de 7-8 luego del almacenamiento en frío (Fig. 2). Cuatro de las cinco introducciones que presentaron una respuesta de tipo I, están entre ellas. Las 4 introducciones con mejor color de chip, resultaron ser CCS 1330, CCS 1199, CCS 1384 y LC 348 con puntajes de 8 luego del almacenamiento. Es interesante observar que dos de ellas, CCS 1330 y LC348 mostraron respuestas de tipo II con un contenido promedio de azúcares reductores de 2.63 y 3.48 mg/g de peso fresco luego del almacenamiento (Fig. 1). Estos resultados evidencian que la asignación de color mediante técnicas visuales como la carta de colores, es subjetiva. Es por esto, que es recomendable contar con otros métodos más precisos, como el colorimétrico.

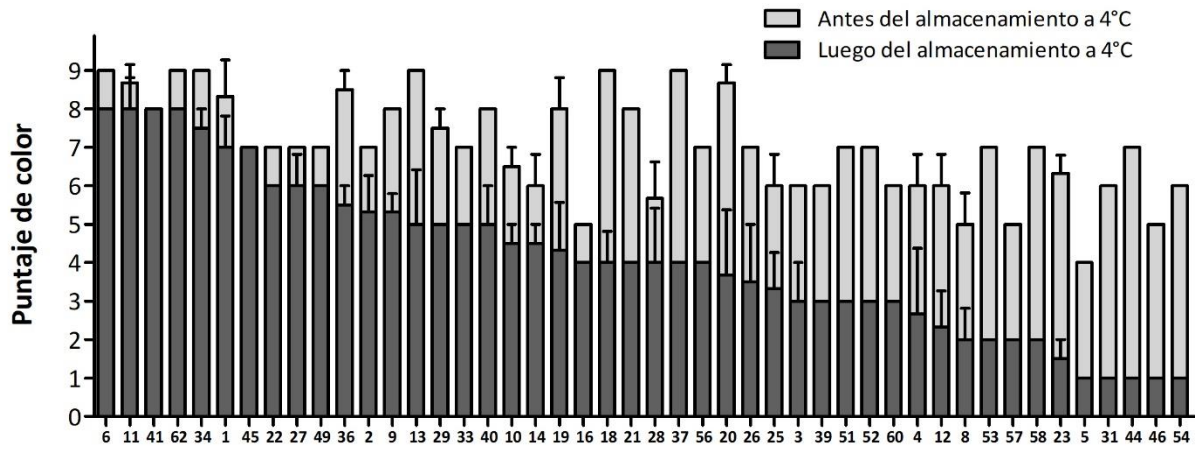


Figura 2. Color de chip (promedio) de tubérculos antes del almacenamiento (barras claras) y luego del almacenamiento en frío (barras oscuras). Los tubérculos fueron almacenados a 4 °C durante dos meses. El color fue determinado visualmente con la Carta de Colores desarrollada por el Instituto de Almacenamiento y Procesamiento de Producción Agrícola (Wageningen- Países Bajos), siendo 9 el puntaje para los colores más claros y 1 para los más oscuros¹⁸.

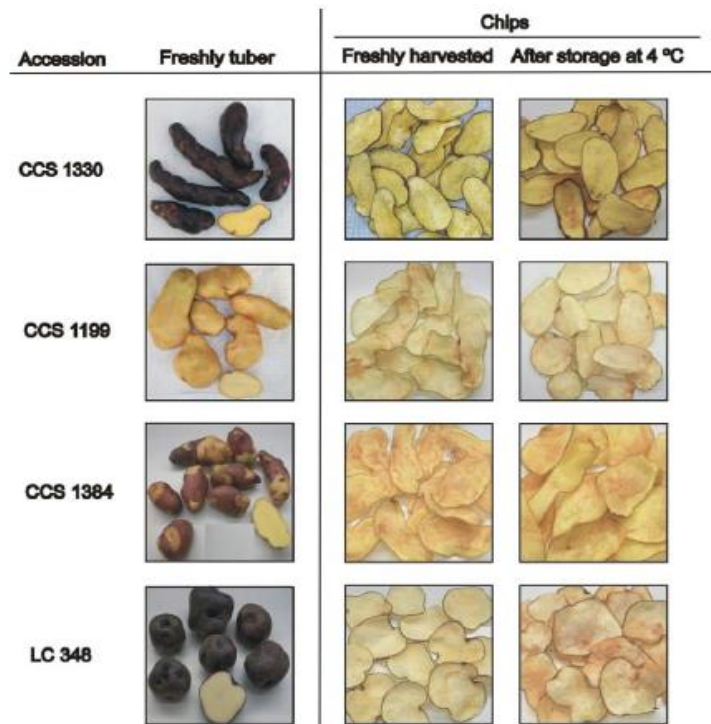


Figura 3. Chips de tubérculos antes del almacenamiento y luego del almacenamiento a 4 °C, resistentes al endulzamiento inducido por frío, evaluados por carta de colores¹⁸

Incorporación de nuevos genotipos

A partir de la campaña 2015-2016, se incorporaron 64 genotipos nuevos a la línea de trabajo, con el objetivo de abarcar una mayor diversidad genética y fenotípica.

Hoy contamos con la caracterización de tubérculos de 114 genotipos en cuanto a su comportamiento frente al endulzamiento inducido por frío. Al presente, tenemos resultados de color de chips (contrastando la respuesta antes del almacenamiento a 4 °C como luego del mismo) correspondientes a dos ensayos consecutivos en campo (Abra Pampa 2015-2016 y Abra Pampa 2016-2017) (Fig. 4). Los resultados mostrados en el gráfico corresponden a la evaluación de color por Carta de colores. Es pertinente mencionar que contamos con la evaluación por colorimetría para los 114 genotipos en las dos campañas mencionadas (resultados no mostrados).

Asimismo, analizamos el contenido de azúcares reductores por cuantificación por HPLC de la campaña Abra Pampa 2015-2016 y nos encontramos cuantificando los azúcares de la campaña siguiente (Fig. 5).

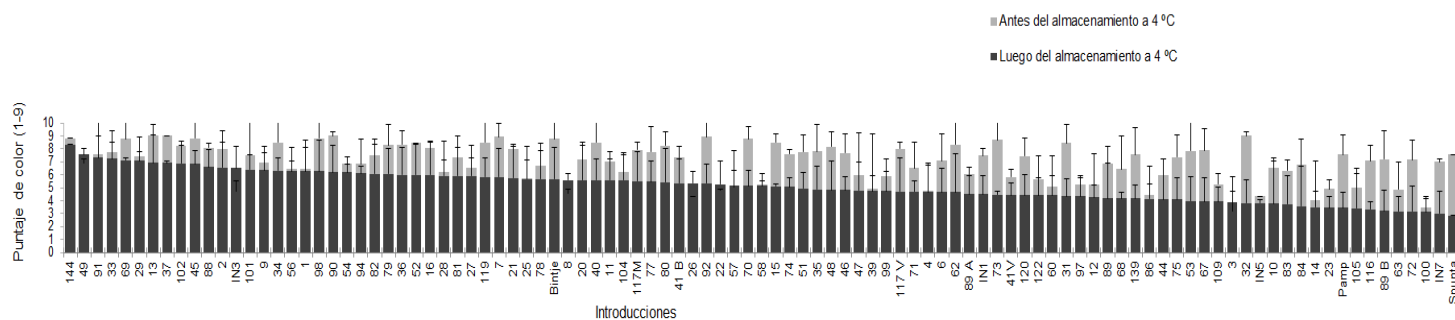


Figura 4. Color de chips (contrastando la respuesta antes del almacenamiento a 4 °C como luego del mismo) correspondientes a dos Ensayos consecutivos en campo (Abra Pampa 2015-2016 y Abra Pampa 2016-2017). Las barras claras corresponden al color de tubérculos antes del almacenamiento y las oscuras al color de tubérculos almacenados en frío. Las líneas negras indican el desvío estándar.

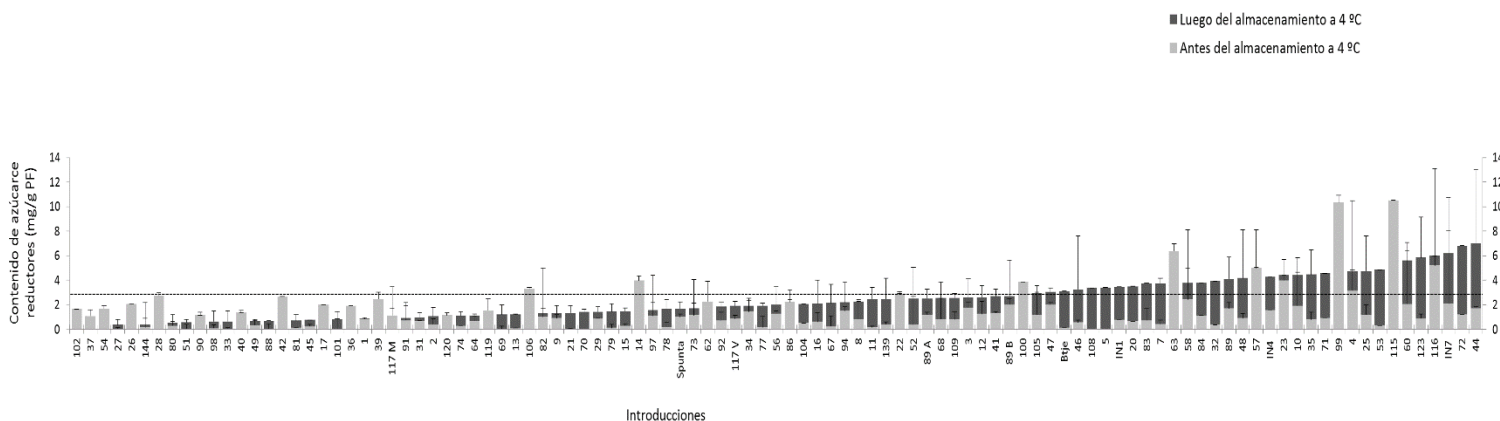


Figura 5. Contenido de azúcares reductores cuantificados por HPLC correspondientes a la Campaña Abra Pampa 2015-2016. Las barras claras corresponden al contenido de azúcares reductores en tubérculos antes del almacenamiento y las oscuras al contenido de azúcares reductores en tubérculos luego del almacenamiento en frío. Las líneas negras indican el desvío estándar. La línea negra en 2.5 mg/g de peso fresco indica el valor máximo de contenido de azúcares reductores aceptado por la industria.

Los resultados obtenidos en la evaluación del panel de 144 introducciones evaluadas durante estas dos campañas en campo, permitieron la identificación de 6 genotipos de papa nativa que presentaron colores de chips en el rango 7-9 tanto antes del almacenamiento en frío como luego del mismo y un contenido de azúcares reductores luego del almacenamiento que varió entre 0.29 y 0.68 mg/g de peso fresco (Fig. 6).

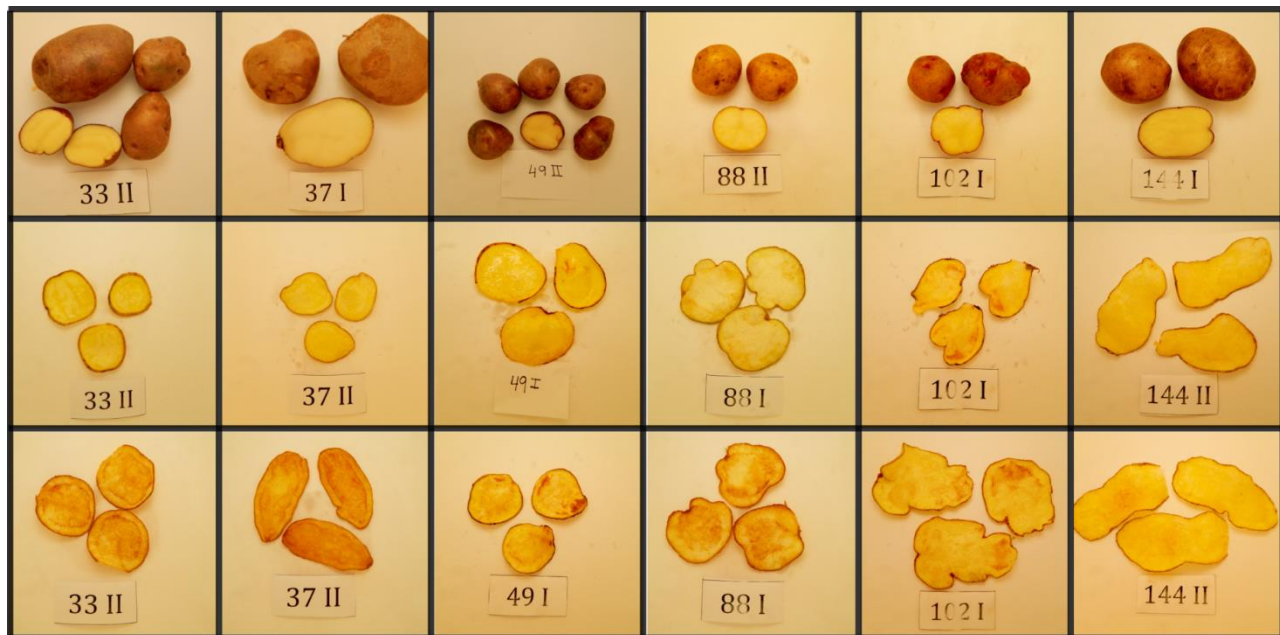


Figura 6. Introducciones de papa nativa que presentaron colores de chips en el rango 7-9 tanto antes del almacenamiento en frío como luego del mismo y un contenido de azúcares reductores luego del almacenamiento que varió entre 0.29 y 0.68 mg/g de peso fresco. La fila superior corresponde a tubérculos frescos, la del medio a chips de papa antes del almacenamiento y la inferior a chips producidos con tubérculos almacenados durante 2 meses a 4°C.

Pardeamiento enzimático

Luego de cosechados los tubérculos se realizó la medición del color utilizando un colorímetro, con el cual determinamos el parámetro DW, que es un indicativo del pardeamiento oxidativo. Esta medición se realizó a tiempo 0 y a los 15, 30 y 60 minutos luego de cortados los tubérculos. En la figura 7 se graficó la variación de DW entre el tiempo 60 y el tiempo 0. Se observó un comportamiento amplio en la colección estudiada respecto a éste fenómeno. Cabe aclarar que como se fueron incorporando introducciones a lo largo de las diferentes campañas, algunas presentan 1 o 2 valores de delta DW. Es destacable resaltar que las papas que poseen pulpa coloreada (por ejemplo 17, 42, 106 entre otras) poseen valores de delta DW negativos, ya que este valor representa la distancia al blanco. La diversidad observada en el panel estudiado en cuanto al grado de pardeamiento enzimático se corresponde con la amplia variabilidad genética presente en las papas nativas y resalta la importancia de la conservación del germoplasma andino. Los resultados obtenidos podrían sentar las bases para la selección de variedades candidatas de interés industrial.

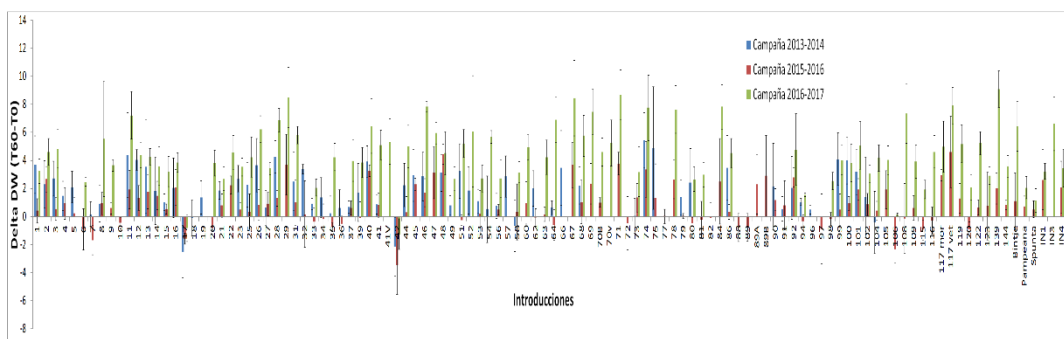


Figura 7. Grado de pardeamiento enzimático en papas nativas calculado según DW (distancia al blanco) = $[(100 - L^*)^2 + a^*2 + b^*2]^{0.5}$. Se calculó DW a tiempo 60 y a tiempo 0 y se graficó la diferencia.

Contenido de Ácido clorogénico

Se observó una gran variabilidad en el contenido de ácido clorogénico entre los 109 genotipos analizados. El promedio entre las dos campañas fue de 12,57 ppm y el rango entre 0,81 y 107,51 ppm. Los primeros 99 genotipos poseen un contenido de ACG cercano al promedio (hasta el doble), luego 5 genotipos intermedios que llegan hasta el triple de ACG y en el extremo derecho de la tabla se destacan las variedades 42, 17, 106, 64 y 123 que poseen valores promedio entre 107 y 51 ppm. La particularidad de estos genotipos es que poseen la pulpa altamente pigmentada: el genotipo 42 de color violeta fuerte, la 17 y 106 púrpura y la 106 y la 64 amarilla con una mancha rosa en el centro (Figura 8).

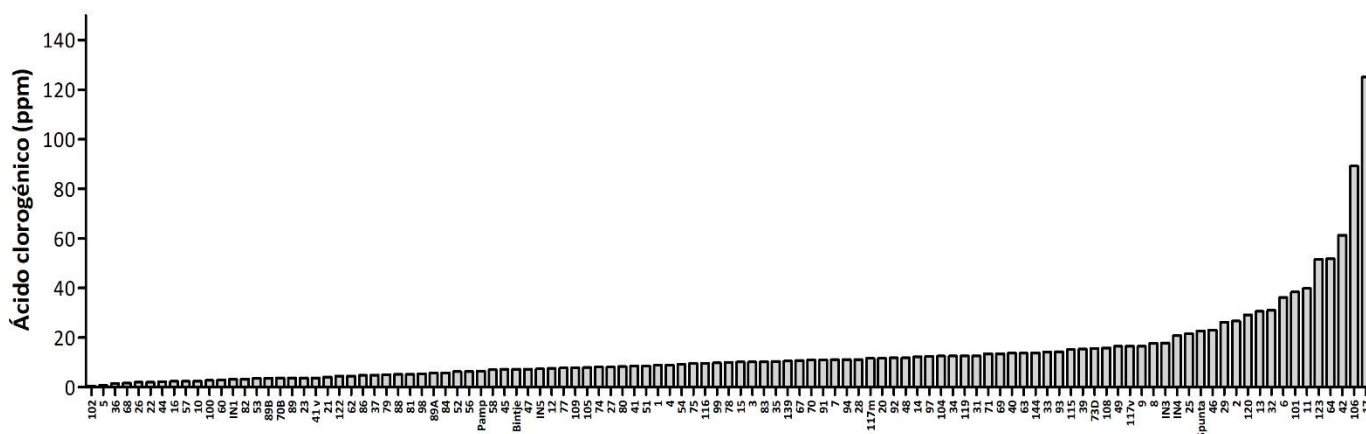


Figura 8. Contenido de Ácido clorogénico en ppm en variedades andinas. Los datos corresponden al ensayo realizado en Abra Pampa durante la campaña 2016-2017. Las líneas indican el desvío estándar para los genotipos que tuvieron repetición en los dos ensayos.

CONCLUSIONES

El uso de germoplasma nativo ha sido propuesto como exploratorio para la búsqueda de introducciones con buena calidad nutricional e industrial. El panel evaluado en la presente investigación mostró una amplia diversidad en cuanto al contenido de ácido clorogénico, al pardeamiento enzimático y a la respuesta frente al endulzamiento inducido por frío. Se encontraron 5 introducciones andinas con un contenido de ácido clorogénico alto, 4 con colores de chip y contenido de azúcares reductores aceptables para la industria tanto antes como luego del almacenamiento en frío y un grupo de variedades andinas tolerantes al pardeamiento enzimático. Actualmente continuamos con la caracterización de un grupo adicional de genotipos del panel que son promisorios a ser resistentes al endulzamiento inducido por frío. Contamos con datos de color de chips, evaluados por carta de colores y colorimetría correspondientes a dos campanas, y estamos analizando el contenido de azúcares reductores que corresponde a la segunda campaña. La tercera campana en curso permitirá completar estos resultados.

Todas estas características generan un agregado de valor en este material ancestral que lo vuelve susceptible de ser explotado por productores locales y potencialmente insertado en los mercados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Banco de Germoplasma de la EEA INTA Balcarce, a Berta Andrade (Universidad Nacional de Jujuy), al Instituto de Investigación y desarrollo tecnológico para la Agricultura Familiar (IPAF NOA), Posta de Hornillos y a la Cooperativa CAUQUEVA por proveer el material vegetal de estudio para este trabajo.

Asimismo, agradecen a la Estación Experimental Agropecuaria INTA Abra Pampa por el manejo y conducción de los ensayos realizados en los respectivos predios y por su apoyo y activa participación en esta investigación, particularmente a Darío Castro, Irma Cusi, Daniel Martínez, Pablo García y Marcelo Echenique. A Silvina Divito y Cristina Cinalli por el mantenimiento de las plantas. A compañeros que colaboraron en las campañas de plantación y cosecha: Mónica Colavita, Natalia Norero, Silvina Divito, Juan Toledo, Celeste Molina Favero, Matías Gonzales, María Paula Laserna y Cecilia Décima Oneto.

También agradecemos a Clara Cantero, Franco Joaquín Quinteros y Guido Cabarrou, estudiantes de Agronomía que participaron en esta investigación como parte de sus pasantías y becas de extensión.

Se agradece al PNAIyAV1130043 de INTA, por el financiamiento para de los ensayos aquí realizados.

REFERENCIAS

1. FAO Crops statistics database; 2015: <http://faostat.fao.org/>
2. Dodds, K.S. (1962). Classification of cultivated potatoes. pp. 517-539. In: Correll, D.S. (ed.). The potato and its wild relatives. Series of Botanical Studies 4. Texas Research Foundation, Renner, TX.
3. Hawkes, J.G. Origins of cultivated potatoes and species relationships (1994). In: Milbourne, D., Pande, B. and Bryan, G.J. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants Pulses, Sugar and Tuber Crops. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 12(3): 205-236 (2007)
4. Dale MFB and Bradshaw JE. (2003). Progress in improving processing attributes in potato. Trends in Plant Science 8:310-312.
5. Álvarez-Mayorca, M. (2001). Oportunidades para el Desarrollo de Productos de Papas Nativas en el Perú. Revista Latinoamericana de la Papa. Vol. especial 2001: 58-79.
6. Ames, B.M.; Shigena, M.K.; Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci USA 90:7915-7922.
7. Liu, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. J Nutr 134: 3479S-3485S (2004).
8. Okada, K.A. (1976). Exploration, conservation and evaluation of potato germplasm in Argentina. Potato Res 19:263-269. doi: 10.1007/bf02365718
9. Okada, K.A. (1979). Collection and taxonomy of Argentine wild species (tuber-bearing Solanums). Report of the planning conference on the exploration, taxonomy and maintenance of potato germplasm III. CIP, Lima, Perú, 15-19. 553 October, pp 98-113
10. Okada, K.A.; Clausen, A.M. (1984). Collecting potatoes in northwest Argentina, 1983. Am Potato J 61:301-305. doi: 10.1007/bf02854142
11. Clausen, A.M. (1989). Collecting indigenous potato varieties in Northwest Argentina. Plant Genet Resour Newsl 80:38-39.
12. Clausen, A.M.; Colavita, M.; Butzonitch, I.; Carranza, A.V. (2005). A Potato Collecting Expedition in the Province of Jujuy, Argentina and Disease Indexing of Virus and Fungus Pathogens in Andean Cultivars. Genet Resour Crop Evol. 52:1099-1109. doi: 10.1007/s10722-004-6131-z
13. Atencio, M. (2011). Diversidad en variedades andinas de papa (*Solanum tuberosum* ssp. *Andigena*) evaluada con microsatélites. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata.
14. Matsuura-Endo, C.; Kobayashi, A.; Noda, T.; Takigawa, T.; Yamauchi, H.; Mori, M. (2004). Changes in sugar content and activity of vacuolar acid invertase during low-temperature storage of potato tubers from six Japanese cultivars. J. Plant Res. 117:131-137.
15. Burton, W.G. (1969). The sugar balance in some British potato varieties during storage. II. The effects of tuber age, previous storage temperature, and intermittent refrigeration upon low-temperature sweetening. Potato Research 12:81-95.
16. Moreira, R.G.; Castell Perez, M.E.; Barrufet, M.A. (1999). Deep-fat Frying: Fundamentals and Applications. Aspen, Gathiersburg.
17. Kumar, D.; Paul, V.; Ezekiel, R. (2005). Chipping quality of potatoes stored in heaps and pits in subtropical plains of India. Hort Sci (Prague) 32:23-30.
18. Colman, S.L.; Massa, G.A.; Carboni, M.F.; Feingold, S.E. (2017). Cold sweetening diversity in Andean potato germplasm from Argentina. J. Sci. Food Agric. 2017.

COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE ACEITES DE DISTINTAS VARIETADES DE NUEZ PECÁN [*CARYA ILLINOINENSIS* (WANGENH.) K. KOCH] CULTIVADAS EN LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS.

M. Panozzo¹; A. Biolatto²; L. Consiglio Diez; V. Urbani²; L. M. Zapata³

¹Estación Experimental Agropecuaria Concordia, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Yuquerí, Ruta Provincial 22 y vías del Ferrocarril (3200) Concordia Entre Ríos, Argentina.

²Estación Experimental Agropecuaria Concepción del Uruguay, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Ruta 39 km 143.5, (3260) Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina.

³Facultad de Ciencias de la Alimentación de la Universidad Nacional de Entre Ríos

Correo electrónico: mpanozzo@inta.gob.ar

RESUMEN

En Argentina, el cultivo comercial de nuez pecán [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] crece exponencialmente. Dado su alto contenido de lípidos, la obtención de aceite es una alternativa de industrialización. El aceite de nuez pecán es rico en compuestos bioactivos, ya que constituyen una fuente importante de ácidos grasos insaturados (UFA) beneficiosos para la salud, además de un bajo contenido en ácidos grasos saturados (SFA). El objetivo de esta investigación fue obtener el perfil de ácidos grasos de aceites de nuez pecán cultivadas en la provincia de Entre Ríos (Argentina). Para ello se elaboró aceite de las variedades Shoshoni, Success, INTA Delta I, Starking, Stuart, Desirable, Kernodle, Mahan y Cheyenne. Los resultados obtenidos revelaron una baja proporción de SFA, alcanzando un rango de 8 - 10% respecto del total de ácidos grasos y una alta proporción, 90 - 92%, de UFA. De los UFA, el ácido oleico fue el que se encontró en mayor proporción, siendo su variación entre 49,44 y 67,71%. El ácido linoleico presente en los aceites estuvo comprendido entre 22,56 y 38,94 % del total de ácidos grasos, mientras que el ácido linolénico varió entre 0,91 y 1,73 %. Esta alta proporción de ácidos grasos insaturados, entre los que se encuentran ácidos grasos omega 3 y omega 6, confiere a los aceites de nuez pecán cultivadas en Argentina propiedades funcionales.

Palabras clave: aceite, nuez pecán, perfil lipídico, Argentina.

ABSTRACT

In Argentina the cultivation of pecan tree [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] is increasing exponentially. Given its high lipid content, the pecan oil production is an industrialization alternative. Pecan oil is rich in bioactive compounds that are an important source of unsaturated fatty acids (UFA) and beneficial to health. In addition pecan oil has a low content of saturated fatty acids (SFA). The objective of this research was to obtain the fatty acid profile of pecan nut oils cultivated in the province of Entre Ríos (Argentina). Pecan oil produced from the Shoshoni, Success, INTA Delta I, Starking, Stuart, Desirable, Kernodle, Mahan and Cheyenne cultivars was investigated. The results obtained revealed a low SFA proportion, reaching a range of 8 - 10% of total fatty acids and a high UFA proportion, 90 - 92%. Of the UFA, the oleic acid was the one that was found in greater proportion, being its variation between 49.44 and 67.71%. The linoleic acid present in the oils was between 22.56 and 38.94% of the total fatty acids, while the linolenic acid varied between 0.91 and 1.73%. This high proportion of unsaturated fatty acids, among which are omega 3 and omega 6 fatty acids, gives the pecan oils grown in Argentina functional properties.

Keywords: oil, pecan nut, lipid profiles, Argentina.

INTRODUCCIÓN

La nuez pecán [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] pertenece a la familia de las Juglandaceae y es un cultivo originario de Estados Unidos y el norte de México (1). Actualmente el cultivo se puede encontrar en otros países de América como Argentina, Chile y Brasil y en Australia, Israel y en el sur de África (2, 3).

El contenido de lípidos de la nuez pecán varía de 65 a 75%. (4, 5, 6, 7). Su composición depende de la variedad, del grado de madurez, de la localización del cultivo, del año de producción y de la composición del suelo (8, 9, 10). En los últimos años se ha valorado el desarrollo de aceites comestibles ricos en compuestos bioactivos, entre los que se encuentran los aceites obtenidos a partir de nueces de pacán (4), que constituyen una fuente importante de ácidos grasos insaturados (UFA) beneficiosos para la salud, además de un bajo contenido en ácidos grasos saturados (SFA) (11).

Entre los UFA presentes en el aceite de nuez de pacán se encuentran principalmente ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y una buena cantidad de grasas poliinsaturadas (PUFA). Estudios recientes han demostrado que el consumo de MUFA puede disminuir el colesterol LDL, proteger contra enfermedades coronarias, regular la presión arterial y tener efectos beneficiosos sobre los factores de la

coagulación, inflamación y activación endotelial (12, 13). Asimismo, se ha demostrado que el consumo de PUFA ha reducido el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares, inflamatorias (14) hipertensión arterial y resistencia a insulina (15, 16), como así también propiedades antitrombóticas, antiateroscleróticas (17); y efectos protectores contra la diabetes renal (18).

El análisis de ácidos grasos es cada vez más importante, ya que más personas lo demandan por sus atributos nutricionales vinculados en la salud (19). Fernandes y col. (2017) (7) cuantificaron el perfil de ácidos grasos de nuez pacán de Brasil, encontrando que el ácido graso predominante fue el ácido oleico (49,6-62,1 g/100 g aceite), seguido de ácido linoleico (27,2-37,71 g/100 g aceite), ácido palmítico (6,4-7,6 g/100 g aceite), ácido esteárico (2,2-2,81 g/100 g aceite), ácido linolénico (1,4-1,91 g/100 g aceite) y en menor proporción los ácidos mirístico y palmitoleico. Wakeling et al. (2001) (20) determinaron la composición de ácidos grasos en variedades de pecán cultivadas en Australia, encontrando también que el ácido graso predominante fue el ácido oleico (53,38-57,28g/100 g aceite), seguido de ácido linoleico (31,50-34,24 g/100 g aceite), ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linolénico. Villarreal-Lozoya y col. (2007) (21) encontraron igual ordenamiento en la composición de ácidos grasos de variedades cultivadas en Estados Unidos. Sin embargo, Rivera-Ranger y col. (2018) (4) obtuvieron que el ácido predominante fue linolénico (60,36-66,81%) para diferentes variedades de nuez pacán cultivadas en México, seguido de los ácidos oleico, palmítico, linolénico, mirístico y trazas de láurico, palmitoleico, esteárico y eicosanoico.

Referido a la obtención de aceite de nuez pacán, éste es un aceite comestible obtenido por prensado de la nuez pacán, pudiendo emplearse prensas hidráulicas o de tornillo. Su sabor es neutro y está considerado como un producto gourmet (22).

Actualmente en Argentina la producción de aceite de nuez pacán es en baja escala. Sin embargo, en los últimos años, el cultivo comercial del pecán ha crecido exponencialmente, lo que permitirá a mediano plazo ubicar a la Argentina como uno de los tres principales productores mundiales de este fruto seco y como el principal exportador mundial de productos en base a pecán con alto valor agregado (23).

A la fecha no se han encontrado publicaciones que hagan referencia al perfil de ácidos grasos de aceites obtenidos a partir de variedades de nuez pacán cultivadas en Argentina, por lo que resulta de interés su estudio con el fin de evaluar sus propiedades funcionales; lo que proporcionaría nuevas oportunidades de comercialización e ingresos para las industrias elaboradoras.

El objetivo de este estudio fue obtener el perfil de ácidos grasos de aceites de distintas variedades de nuez pacán cultivadas en la Provincia de Entre Ríos, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de nuez pecán

Se trabajó con nueces de pecán de las variedades INTA Delta I, Shoshoni, Success, Starking, Stuart, Desirable, Kernodle, Mahan y Cheyenne. La variedad INTA Delta I se recolectó de campo de la Estación Experimental Agropecuaria de INTA Concordia (Entre Ríos) y las restantes variedades fueron adquiridas en comercio de la localidad de San José (Entre Ríos) en la campaña 2016 durante la estación de otoño (de abril a junio).

Una vez adquiridas las nueces estas se limpiaron, clasificaron y secaron hasta un contenido de humedad de 4% y se conservaron a 5°C por un período inferior a 2 meses.

A continuación, las nueces fueron craqueadas mecánicamente con una cascadora marca Lamaza y peladas en forma manual. Después de la eliminación de los granos podridos y necróticos, las mitades sanas de nuez pecán se almacenaron a -30 °C en freezer marca Gafa hasta el momento de elaborar el aceite.

Extracción de aceite

Para la elaboración del aceite, las nueces congeladas se molieron en trituradora industrial Marca Freire, modelo 32, a continuación se envolvió en tela filtrante en lotes de 2kg, se ajustó la temperatura a 40°C en estufa (Instrumentalia modelo DHG-9240) y se extrajo el aceite en prensa hidráulica abierta marca Morano a la que se le adaptó un sistema de platos en la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Concordia, a una presión de 200kgf/m². El aceite obtenido se dejó decantar 20 días a 5 °C para separar las impurezas. Los aceites se transvasaron y se guardaron a -30 °C en freezer marca Gafa hasta el momento en que se realizaron los ensayos en laboratorio.

Preparación de metil éster de ácidos grasos

La determinación del perfil de ácidos grasos del aceite de pecán se realizó mediante la síntesis directa de metil éster de ácidos grasos (FAME) acorde a lo publicado por O Fallon y col. (2007) (19). A continuación se describe la metodología: se colocó 40 µL de aceite en un tubo apto para centrifugar, 1 mL de estándar interno ácido undecanoico (C11:0) de 0,5 mg/mL; 0,7 mL de KOH 10N y 5,3 mL de CH₃OH. Una vez mezclado el tubo se incubó a 55±0,1 °C en baño de agua durante 90 minutos con vigorosa agitación durante 5 segundos cada 20 minutos con la ayuda de un agitador vórtex (VELP Científica modelo ZX3) para permear, disolver e hidrolizar la muestra. A continuación se enfrió en un baño de agua fría hasta aproximadamente 20 °C y se agregaron 0,6 mL de solución de H₂SO₄ 24N, formándose un precipitado de K₂SO₄. Seguidamente el tubo se incubó y enfrió nuevamente en las condiciones antes señaladas. Posteriormente, se añadieron al tubo 3 mL de hexano, y se mezcló en equipo vórtex durante 5 minutos. Por último, se centrifugó en centrífuga MRC, modelo CENHBN-600ML-2 a 2000 rpm durante 5 minutos. La capa de hexano se colocó en un vial de cromatografía gaseosa (CG) para su posterior inyección en cromatógrafo gaseoso. Por cada aceite de cada variedad de nuez pecan se realizaron 3 repeticiones del procedimiento.

Perfil de ácidos grasos

Se determinó mediante CG con un equipo, marca Perkin Elmer, modelo CLARUS 680, equipado con automuestreador Combi PAL. Se utilizó columna capilar HP-88 de 100 m de largo × 0,25 mm de diámetro interno × 0,25 µm de espesor de película. El programa de temperatura de la columna fue el siguiente: temperatura inicial de 70°C, la que se mantuvo durante 2,5 minutos, posteriormente se aumentó a 165°C a una velocidad de 10 °C/ minuto y, finalmente a una velocidad de 3 °C/ minuto se elevó a 240 °C, permaneciendo 10 minutos. Se utilizó nitrógeno como gas portador a una velocidad de flujo de 1,0 mL/minuto. Tanto el inyector como el detector se mantuvieron a una temperatura de 250 °C. La identificación de los componentes se realizó comparando los tiempos de retención de los componentes en las muestras con la de aquellos de estándar puro (FAME 37, Supelco Inc. Bellefonte, PA, Estados Unidos). La cuantificación de los componentes se realizó mediante el método de estándar interno, empleando ácido undecanoico. El contenido de cada uno de los ácidos grasos identificados se expresó como valor porcentual en relación al contenido total de los mismos (24).

Análisis estadístico

Las medias del valor porcentual de cada ácido graso de las diferentes variedades de aceites fueron comparadas mediante Análisis de Varianza y Test de Rango Múltiple según Tukey (p<0,05) con software MiniTab versión 16.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición de ácidos grasos en los aceites de nuez pecan dependió de la variedad estudiada. La Tabla 1 muestra que la composición de ácidos grasos insaturados (UFA) varió entre 90 y 92% del total de ácidos grasos presentes en los aceites, siendo los aceites de Kernodle, Desirable y Shoshoni los que presentaron mayor proporción de estos ácidos.

De los UFA el ácido oleico fue el que se encontró en mayor proporción, siendo su variación entre 49,44 y 67,71%; para las variedades Starking y Desirable, respectivamente. Estos resultados coinciden con la literatura que señala que el ácido oleico es el ácido graso más comúnmente encontrado en la naturaleza y el ácido omega 9 más abundante en los alimentos; por lo que resulta de interés desde el punto de vista de las industrias nutricionales y alimenticias, además de sus propiedades beneficiosas en la reducción de la oxidación del colesterol LDL y de ser un precursor de la producción de la mayoría de los otros ácidos grasos poliinsaturados y hormonas (7, 25).

Dependiendo de la variedad de nuez pecan, el ácido linoleico presente en los aceites estuvo comprendido entre 22,56 y 38,94 % del total de ácidos grasos, mientras que el ácido linoléico varió entre 0,91 y 1,73 %. Estos ácidos grasos omega 6 y omega 3, respectivamente, son catalogados como esenciales ya que no pueden ser sintetizados por el organismo [26], por lo que deben ser aportados por la dieta (27). Los aceites de Starking, Cheyenne e INTA Delta I fueron los que tuvieron mayor proporción de estos ácidos grasos esenciales. De acuerdo con la FAO (2010) (28) el requerimiento mínimo diario es del 1% del total de ácidos grasos de la dieta para omega 6 y 0,2% para omega 3, por lo que todos los aceites de nuez pecan caracterizados cumplen con el requerimiento señalado por la FAO.

Al agrupar datos de todas las variedades, se encontró una correlación inversa entre ácido oleico y linoleico ($R^2 = 0,956$ ácido linoleico = $-2,1563$ ácido oleico + $70,197$), indicando una posible interconversión entre estos ácidos grasos en una determinada variedad de nuez pecan (9, 21).

Tabla 1: Composición de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) correspondiente a aceites de distintas variedades de nuez pecan cultivadas en la provincia de Entre Ríos, Argentina. Los resultados se encuentran expresados en porcentaje (%) referido al total de ácidos grasos presentes en el aceite.

Variedad	Ác. Palmitoleico (C16:1)	Ác. Heptadecanoico (C17:1)	Ácido Oleico (C18:1 T)	Ácido Oleico (C18:1 C)	Ác. Linoleico (C18:2 n-6)	Ác. Linoléico (C18:3 n-3)	Ác. Erú dico (C20:1)
Shoshoni	0,07±0,01 cd	0,05±0,00 abc	0,03±0,00 a	62,64±0,10 c	27,27±0,07 f	1,20±0,00 e	0,27±0,01 a
Desirable	0,08±0,01 bc	0,06±0,00 ab	0,01±0,01 a	67,71±0,04 a	22,56±0,02 h	0,99±0,01 g	0,26±0,01 a
Kernodle	0,07±0,00 d	0,06±0,01 ab	0,02±0,01 a	62,26±0,41 c	28,40±0,32 e	1,12±0,01 f	0,27±0,01 a
Success	0,10±0,01 a	0,06±0,00 a	0,02±0,00 a	65,01±0,11 b	25,07±0,06 g	0,91±0,00 h	0,26±0,00 a
Mahan	0,07±0,00 cd	0,05±0,01 bc	0,03±0,01 a	59,63±0,02 e	29,37±0,05 d	1,29±0,02 d	0,20±0,00 bc
Starking	0,08±0,00 bc	0,04±0,00 c	0,02±0,01 a	49,44±0,01 h	38,94±0,02 a	1,73±0,01 a	0,18±0,01 c
Stuart	0,08±0,00 bcd	0,05±0,00 abc	0,02±0,01 a	60,99±0,06 d	28,61±0,03 e	1,22±0,01 e	0,27±0,01 a
Cheyenne	0,08±0,00 bc	0,05±0,00 bc	0,02±0,01 a	52,52±0,04 g	36,77±0,01 b	1,33±0,00 c	0,28±0,01 a
INTA Delta I	0,09±0,00 b	0,06±0,01 abc	0,02±0,01 a	54,54±0,09 f	33,90±0,08 c	1,47±0,00 b	0,21±0,00 b

Valores medios ± desviación estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de diferentes variedades para un mismo ácido graso (p ≤ 0,05).

La proporción de SFA en los diferentes aceites de nuez pecan fue baja, alcanzando un rango de 8 y 10% respecto del total de ácidos grasos. Los ácidos grasos saturados predominantes fueron palmítico y esteárico; los aceites de Starking e INTA Delta I tuvieron mayor cantidad de estos ácidos.

Tabla 2: Composición de ácidos grasos saturados (SFA) correspondiente a aceites de distintas variedades de nuez pécan cultivadas en la provincia de Entre Ríos, Argentina. Los resultados se encuentran expresados en porcentaje (%) referido al total de ácidos grasos presentes en el aceite.

Variedad	Ác. Palmítico (C16:0)	Ác. Margárico (C17:0)	Ác. Esteárico (C18:0)	Ác. Araquidónico (C20:0)	Ác. Behénico (C22:0)
Shoshoni	5,79±0,07 d	0,05±0,00 a	2,47±0,02 e	0,13±0,01 c	0,03±0,00 ab
Desirable	5,40±0,02 f	0,06±0,00 a	2,72±0,02 cd	0,14±0,01 abc	0,02±0,00 b
Kernodle	5,65±0,10 de	0,06±0,01 a	1,96±0,03 h	0,10±0,00 d	0,03±0,00 ab
Success	5,52±0,12 ef	0,06±0,00 a	2,82±0,04 b	0,15±0,00 a	0,02±0,00 b
Mahan	6,11±0,10 c	0,06±0,00 a	3,02±0,02 a	0,14±0,00 a	0,03±0,01 ab
Starking	6,68±0,01 a	0,06±0,01 a	2,65±0,01 d	0,14±0,00 abc	0,03±0,00 a
Stuart	6,33±0,04 bc	0,06±0,00 a	2,22±0,04 g	0,12±0,01 c	0,03±0,00 ab
Cheyenne	6,42±0,03 b	0,06±0,00 a	2,34±0,02 f	0,13±0,00 bc	0,03±0,00 ab
INTA Delta I	6,69±0,13 a	0,07±0,01 a	2,78±0,01 bc	0,14±0,00 ab	0,03±0,00 ab

Valores medios ± desviación estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de diferentes variedades para un mismo ácido graso (p ≤ 0,05).

A los aceites de perfil lipídico como los caracterizados en la presente investigación, que poseen con alto contenido de UFA y el bajo contenido en SFA se les atribuye propiedades saludables, tales como menor riesgo y prevención de contraer enfermedades coronarias, mejora del perfil lipídico sanguíneo asociado a la reducción de los niveles de lipoproteína de baja densidad (LDL) e incremento de los niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL), mejora de la presión arterial y papel protector en las enfermedades neurodegenerativas (27).

CONCLUSIONES

Los resultados de la investigación posibilitaron la obtención del perfil de ácidos grasos de aceites de nuez pecán de las variedades Shoshoni, Success, Cheyenne, Stuart, Desirable, Kernodle, Mahan, Starking e INTA Delta I; cultivadas en Entre Ríos, Argentina. Los aceites mostraron diferente perfil de ácidos grasos, dependiendo de la variedad de la materia prima empleada; lo que podría ser utilizado para la fabricación de aceites orientados a mercados específicos, como una herramienta de marketing.

En todos los aceites se observó una alta proporción de ácidos grasos monoinsaturados, particularmente de ácido oleico (omega 9), cuyo rango de variación fue entre 49,44 y 67,71 %; además, el ácido linoleico (omega 6) estuvo comprendido entre 22,56 y 38,94 %, y el ácido linolénico (omega 3) varió entre 0,91 y 1,73 %. El contenido de ácidos grasos cumple con los requerimientos señalados por la FAO, por lo que podría atribuirse a estos aceites de nuez pecan propiedades beneficiosas para la salud.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por la financiación de la presente investigación en el marco del Proyecto PNAIyAV 1130043.

Los autores agradecen al Lic. Leonardo Consiglio Diez, pasante de la EEA INTA Concepción del Uruguay, por la colaboración en el análisis del perfil de lípidos presentado en el trabajo. .

REFERENCIAS

- Hal, G. D. (2000) Pacán food potential in prehistoric North America. *Economic Botany* 54:103–112
- Ortiz, E.R.N. (2000). Propiedades nutritivas e nutracéuticas das nozes. Monografía (Especialização em Ciência de Alimentos). Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC, Santa Cruz do Sul, Brasil.
- Call, R.E.; Gibson, R., Kilby, M. (2006). Pacán production guidelines for small orchards and home yards. Tucson-AZ: College of Agriculture and Life Sciences. College of Agriculture and Life Sciences, University of Arizona (Tucson, AZ).
- Rivera-Rangel, L.R., Aguilera-Campos, K.I., García-Triana, A., Ayala-Soto, J.G., Chavez-Flores, D., Hernández-Ochoa, L. (2018). Comparison of Oil Content and Fatty Acids Profile of Western Schley, Wichita, and Native Pacán Nuts Cultured in Chihuahua, Mexico. *Journal of Lipids* 2018:1-6
- Santerre, C.R. (2012). Pacán Technology. Chapman & Hall.

6. Toro-Vazquez, J.F., Charo-Alonso, M.A., Perez-Briceno, F. (1999). Fatty acid composition and its relationship with physicochemical properties of pacán (*Carya illinoensis*) oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76: 957–965.
7. Fernandes, G.D., Gómez-Coca, R.B., Pérez-Camino, M.C., Moreda, W., Barrera-Arellano, D. (2017). Chemical characterization of major and minor compounds of nut oils: almond, hazelnut, and pacán nut. *Jornal of Chemistry*. Article in press. <https://doi.org/10.1155/2017/2609549>.
8. Heaton, E.K., Shewfelt, A.L., Badenhope, A.E, Beuchat, L.R. (1977). Pacáns: Handling, Storage, Processing and Utilization, University of Georgia AES Research Bulletin 197.
9. Rudolph, C.J., Odell, G.V., Hinrichs, H.A., Hopfer, D.A., Kays, S.J. (1992). Genetic, environmental, and maturity effects on pacán kernel lipid, fatty-acid, tocopherol, and protein-composition. *Journal of Food Quality*, 15 (4): 263–278.
10. Grauke, L.J., Thompson, T.E., Storey, J.B., Sistrunk, L. (2001). In Abstracts of the 98th annual international conference of the American society for horticultural science (p. 498). ASHS.
11. Ros, E., Mataix, J. (2006). Fatty acid composition of nuts – Implications for cardiovascular health. *British Journal of Nutrition*, vol. 96 (2): 29–35.
12. Rajaram, S., Burke, K., Connell, B., Myint, T., Sabat'e, J. (2001). Amonounsaturated fatty acid-rich pacán-enriched diet favorably alters the serum lipid profile of healthy men and women. *Journal of Nutrition* 131: 2275–2279
13. Alonso, A., Ruiz-Gutierrez, V., Martínez-González, M.A. (2006). Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure: Epidemiological, clinical and experimental evidence, *Public Health Nutrition* 9: 251–257
14. Finley, J.W., Shahidi, F. (2001). Omega-3 fatty acids, chemistry, nutrition and health effects, W. J. John and F. Shahidi, Eds., American Chemical Society, Washington, DC, USA, 1st edition
15. Manco, M., Calvani, M., Mingrone, G. (2004). Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 6:402–413
16. Hermansen, K. (2000). Diet, blood pressure and hypertension. *British Journal of Nutrition* 83:113–119.
17. Simopoulos, A. P. (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *American Journal of Clinical Nutrition* 54:438–500
18. Garman, J.H., Mulroney, S., Manigrasso, M., Flynn, E., Marie, C. (2009). Omega-3 fatty acid rich diet prevents diabetic renal disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 296:306–316
19. O'Fallon, J.V., Busboom, J.R., Nelson, M.L., Gaskins, C.T. (2007). A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *Journal of Animal Science* 85:1511–1521
20. Wakeling, L. T., Mason, R. L., D'Arcy, B. R., Caffin, N. A. (2001). Composition of pacán cultivars Wichita and Western Schley [*Carya illinoensis* (Wangenh.)K. Koch] grown in Australia. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*; 49(3):1277-1281.
21. Villarreal-Lozoya, J., Lombardini, L., Cisneros-Zevallos, L. (2006). Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pacán [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. *Food Chemistry* 102: 1241–1249
22. Cockerham, S., Gorman, W., Maness, N., Lillywhite, J. (2012). Feasibility assessment of investing in a pacán oil and flour processing facility using new extraction technology. Research Report 778 of Agricultural Experiment Station. College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences.
23. Frusso, E. A. (2014). Influencia del nitrógeno, fósforo y cinc sobre la composición química y rendimiento de la nuez pecán y su relación con la variabilidad de nutrientes en hoja. Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires, área Producción Vegetal.
24. Maestri, D.M., Labuckas, D.O., Meriles, J.M., Lamarque, A.L., Zygadlo, J.A., Guzman, C.A. (1998). Seed composition of soybean cultivars evaluated in different environmental regions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77: 494-498
25. Freitas, T.B., Felix, T.L., Pedreira, M.S., Silva, R.R., Silva, F.F., Silva, H.G.O, Moreira, B.S. (2017). Effects of increasing palm kernel cake inclusion in supplements fed to grazing lambs on growth performance, carcass characteristics, and fatty acid profile. *Animal Feed Science and Technology* 226: 71-80.
26. Atehortúa Osorno, A. C., Velásquez Rodríguez, C. M., López Marín, B. E. (2017) Caracterización de diversas especies de peces como fuente de PUFAs y omega 3 según su perfil de ácidos grasos. *Perspect Nutr Humana*. 19:93-108.
27. Borges, T.H., Pereira, J.A., Cabrera-Vique, C., Lara, L., F., Oliveira, A.F., Seiquer, I. (2017). Characterization of Arbequina virgin olive oils produced in different regions of Brazil and Spain: Physicochemical properties, oxidative stability and fatty acid profile. *Food Chemistry* 215: 454–462
28. FAO (2010). Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. Geneva, November 10-14, 2008.

DESARROLLO DE BARRA DE NUEZ PECAN CON CEREALES

S. Guidi^{1,4}; A. Gómez¹; G. Polenta¹; M.C. López², R. Blasco³

¹Instituto Tecnología de Alimentos, CIA, INTA. CC77B1708WAB, Morón, Bs. As., Argentina.

²Coordinación de Oleaginosas y Subproductos, Centro de Agroalimentos, INTI

³Coordinación de Cereales, Harinas y Productos Derivados, Centro de Agroalimentos, INTI

⁴Facultad de Agronomía y Cs. Agroalimentarias. Universidad de Morón. Cabildo 134, Morón, Bs. As., Argentina.

Correo electrónico: guidi.silvina@inta.gob.ar

RESUMEN

La nuez pecan (*Carya illinoensis*) se comercializa entera (con cáscara) o pelada, en forma de mariposa. Dado que, durante la obtención de nuez sin cáscara, se produce generalmente la ruptura de la mariposa, se origina en consecuencia un subproducto con menor valor de comercialización. Sin embargo, la mariposa rota podría ser aprovechada como insumo para la formulación de alimentos de buena calidad nutricional. El objetivo del presente trabajo fue encontrar una alternativa comercial para este subproducto, mediante el desarrollo de una barra de cereal que contenga nueces partidas de pecan. Las mismas, provistas por la estación experimental INTA-Delta, fueron utilizadas como componente mayoritario de los ingredientes sólidos en la formulación. Para tal fin, se diseñó un equipo para producir barras de cereal para pequeños emprendedores. Se desarrolló una formulación básica de barra (símil barra de cereal) utilizando como componentes mayoritarios nuez pecan, trigo inflado azucarado y arroz inflado azucarado. El proceso para la elaboración de la barra de nuez pecan consistió en la preparación del aglutinante (a partir de azúcar blanca, acetite de girasol, jarabe de maltosa y agua) en una paila de acero inoxidable de fondo esferoide, con quemador a gas, hasta alcanzar los 115 °C. A continuación de la incorporación de los ingredientes sólidos, la mezcla se trasvaso a una bandeja rectangular y, luego de la solidificación de la mezcla, se cortaron las barras de cereal (aproximadamente con un peso de 15g c/u). Para la caracterización química de las mismas se midieron los siguientes parámetros: contenido de humedad, cenizas, proteínas, lípidos totales, perfil de ácidos grasos por GC-FID. Se determinó además el contenido de tocoferoles por HPLC-RF en fase reversa con detección de fluorescencia. Se analizó el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, taninos condensados por el método de la Vainillina y capacidad antioxidante por el método del DPPH. A partir de las determinaciones nutricionales, se calculó el valor energético de la barra de cereal. De acuerdo con las determinaciones, el producto obtenido representa unos 71,85 kcal por unidad, con un aporte de proteínas de 6,1%, 32,9% de grasas totales y 57,1% de hidratos de carbono. El perfil de ácidos grasos se caracterizó por un bajo contenido de ácidos grasos saturados (10%), mientras que el contenido de ácidos grasos insaturados fue elevado (90%), predominando el ácido oleico (66%). Respecto de las vitaminas y compuestos antioxidantes, las barras presentaron un contenido de 0,26 mg de tocoferoles, aportado principalmente por γ -tocoferol; 20,4 mg de catequina equivalente por g muestra en la cuantificación de polifenoles totales y una actividad antioxidante total de 18,8 mg de trolox equivalente por gramo. Los resultados obtenidos indican que este producto constituye una fuente importante de ácidos grasos saludables, así como de vitaminas antioxidantes, destacando sus cualidades nutricionales, además de ofrecer una alternativa de comercialización a la producción de un cultivo regional de creciente importancia, agregando valor al producto base.

Palabras clave: nuez pecan, barra, cereales, *Carya illinoensis*, vida útil.

ABSTRACT

The pecan nut (*Carya illinoensis*) is sold whole (with shell) or peeled, in the form of a butterfly. During the production of shelled walnuts, and because of the ruptures underwent by the butterflies, a by-product with a lower commercialization value is usually obtained. However, the broken butterfly can be used for the formulation of foods with good nutritional quality. The objective of the present work was to find a commercial alternative for this by-product, through the development of a cereal bar containing split pecan nuts. The nuts were provided by the INTA-Delta Experimental Station, were used as a major component of the solid ingredients in the formulation.. For this purpose, pilot equipment was designed to produce cereal bars for small entrepreneurs. A basic bar formulation (cereal bar simile) was developed using as a major component pecan nut, sweetened puffed wheat and sweetened puffed rice. The process for the

preparation of the pecan nut bar consisted in the preparation of the binder (from white sugar, sunflower oil, maltose syrup and water) in a stainless steel pan with spherical bottom with gas burner until reaching the 115 °C. After the solid ingredients were incorporated, the mixture was transferred into a rectangular tray, and after the solidification, the cereal bars were cut (approximately weighing 15 g each). For the chemical characterization, different parameters were determined: moisture content, ash and proteins, total lipids, fatty acid profile by GC-FID. The content of tocopherols was also determined by reverse phase HPLC-RF with fluorescence detection. The content of total phenols was analyzed by the Folin-Ciocalteu method, tannins condensed by the Vanillin method and antioxidant capacity by the DPPH method. From the nutritional determinations, the energy value of the cereal bar was calculated. The product obtained represents 71.85 kcal per unit, with a protein content of 6.1%, 32.9% of total fats and 57.1% of carbohydrates. The fatty acid profile was characterized by a low content of saturated fatty acids (10%), while the content of unsaturated fatty acids was high (90%), with oleic acid predominating (66%). Regarding the vitamins and antioxidant compounds, the bars contains 0.26 mg of tocopherols, mainly in the form of γ -tocopherol; 20.4 mg of equivalent catechin per g sample in the quantification of total polyphenols and a total antioxidant activity of 18.8 mg of equivalent trolox per gram. The results indicate that this product represents an important source of healthy fatty acids, as well as of antioxidant vitamins, highlighting their nutritional qualities, but also offering an alternative for the successful marketing of the production of a growing regional crop, adding value to the base product.

Keywords: pecan nut, bar, cereals, *Carya illinoensis*, shelf life.

INTRODUCCIÓN

La nuez pecan es el fruto de un árbol de gran porte, también denominado Pecan (*Carya illinoensis*). Es el único nogal de origen americano y su historia se remonta al siglo XVII en la cuenca de los ríos Mississippi-Missouri en la zona centro-sur de los Estados Unidos. Su nombre “pecan” o “pecana” deriva del vocablo indígena algonquin “Pakan”, que alude al fruto como “nuez que requiere una piedra para romperse”. A nivel mundial, la Argentina ocupa el tercer lugar en superficie con 6.000 hectáreas implantadas con pecán, de las cuales sólo el 25% son plantaciones en plena producción, en tanto el 75% restante está formado por árboles que recién comienzan a producir o aún se encuentran en una etapa juvenil. Por su parte, Estados Unidos y México representan más del 90% de la superficie y producción global (1). El Pecan llegó a nuestro país en el siglo XIX, a través de semillas introducidas por Domingo Faustino Sarmiento. Si bien el Pecan se halla distribuido en distintas provincias del país, su hábitat ideal corresponde a la zona del Delta del Paraná, en la región Pampeana donde a mediados del siglo XX se experimentó con este cultivo con el apoyo del INTA. Las principales áreas de plantación se localizan en Entre Ríos, Buenos Aires, Delta del Paraná, y Misiones, existiendo también plantaciones menores en otras provincias. El cultivo de nuez pecan ha tenido un sostenido crecimiento en nuestro país en los últimos años, lo que nos ha llevado a ser el tercer país con mayor número de has implantadas, si bien alrededor del 70-80% tienen árboles con pocos años de edad. Los volúmenes que se exportan son de nuez sin pelar, mientras que los volúmenes para consumo local, tienen en el país un nivel de industrialización poco desarrollado, con escasas excepciones (2). Entre los productos ofrecidos localmente, el de mayor volumen es la nuez pelada o mariposa (aprox. 50% sobre la nuez entera), en cuyo procesamiento se obtiene también una gran cantidad de mariposas partidas. La nuez partida o rota, constituye un producto de menor valor, representando la mayoría de las veces, como mínimo, un 40% del total del peso de la mariposa o fruto descascarado. Sin embargo, dado que la nuez pecan posee cualidades nutricionales destacables, por ser una importante fuente de grasas poliinsaturadas, fibras y proteínas, las mariposas rotas pueden ser destinadas a la elaboración de un alimento de alto valor nutricional, lo que implicaría un importante aporte a la cultura alimenticia nacional, agregando valor al producto base. Es así que en el marco del PNAIyAV 1130043 se desarrolló un producto de consumo masivo, como es la barra de cereal, que permitiera un aprovechamiento más integral.

Los objetivos del presente trabajo fueron 1) desarrollar un producto de consumo masivo, como es la barra de cereal, a partir de nuez pecan partida, que permitiera su aprovechamiento, con la intención de agregar valor a la nuez pecan y 2) realizar la caracterización química de la barra de cereal con nuez pecan.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos fueron realizados en los años 2015-2016. Las muestras de nuez pecan (enteras) fueron provistas por el INTA Delta.

Diseño y Fabricación del Equipo

Los participantes de INTI, junto con una empresa privada, rediseñaron y adaptaron un equipo (similar a uno comercial utilizado en Taiwan, República de China), para producir barras de cereal para pequeños emprendedores. El equipo consistió de una paila a gas de poder calorífico regulable, en acero inoxidable (AISI 316) la cual permite alternativamente utilizarla con energía eléctrica (220 V) o gas natural. Accesorios: bandejas de acero inoxidable (AISI 316) con muescas de dos tamaños para producir barras chicas o tipo industrial y/o barras grandes o tipo artesanales; dos guías para corte (AISI 316); rodillo de acero inoxidable (AISI 316), con relleno de viruta de acero para facilitar el calibrado de la mezcla de ingredientes sobre las bandejas.

Formulación

Para el desarrollo de la barra de nuez pecan, la formulación cualitativa consistió en: nuez pecan partida comprendidas entre 13 y 4,75 mm (barra industrial); arroz inflado azucarado; trigo inflado azucarado; azúcar; jarabe de alta maltosa; aceite de girasol alto oleico y

agua. En la formulación se incluyó también trigo y arroz, por ser cereales de bajo contenido graso, para no incrementar valor calórico del producto.

Proceso de elaboración de las barras

El proceso de elaboración de la barra de nuez pecan consistió en la preparación del aglutinante (a partir de jarabe de alta maltosa, azúcar blanca, aceite de girasol de alto oleico y agua) en la paila, con monitoreo de la temperatura, hasta alcanzar los 115 °C. Posteriormente, se incorporaron los ingredientes secos (nuez pecan partida, arroz inflado y trigo inflado). Se realizó la mezcla en forma manual durante algunos segundos y luego, la mezcla se colocó en la bandeja rectangular de acero inoxidable y se procedió con el calibrado final con el rodillo de acero inoxidable. Los cortes se realizaron con cuchillo utilizando la guía encastrada en las muescas longitudinales y transversales de la bandeja de acero inoxidable, hasta obtener las barras de cereal. En promedio, las mismas, pesaban 15 g c/u.

Análisis realizados

Una vez obtenidas las barras de cereal con nuez pecan, se realizaron los análisis químicos: humedad, proteínas, grasa total, cenizas (3). Perfil de ácidos grasos: extracción de los lípidos modificado, metilación ácida de los ácidos grasos y cuantificación por cromatografía gaseosa con detector FID (4). Tocoferoles (5). Capacidad antioxidante (6). Polifenoles totales (7) y taninos condensados (8).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Fig.1 muestra la paila, las bandejas de acero y el rodillo utilizados para la elaboración de las barras de cereal con nuez pecan.



Figura 1: Paila, bandejas y guías para corte (acero inoxidable), y rodillo

La Fig. 2, muestra los pasos seguidos hasta la obtención de las barras individuales.



Figura 2. Pasos para la obtención de las barras de nuez pecan. a) Preparación del jarabe. b) Incorporación de los ingredientes sólidos y mezclado. c) Calibrado manual. d) Calibrado con rodillo. e) Producto fraccionado (barras)

La línea de producción desarrollada permitió obtener 75 barras cada 45 minutos, aproximadamente, requiriendo ocupar a tres operarios, aunque el proceso puede ser ajustado a dos operarios.

La formulación básica desarrollada, permitió obtener una barra de tamaño tradicional con la siguiente composición (Tabla 1):

Tabla 1. Composición química de la barra de nuez pecan

Muestra	Por 100 g	Por unidad (15 g)
Humedad	3,00 g	0,44 g
Cenizas	1,21 g	0,18 g
Proteínas	6,1 g	0,91 g
Grasa total	32,9 g	4,94 g
γ- tocoferol	1,43 mg	0,21 mg
α-tocoferol	0,27 mg	0,04 mg
Tocoferoles totales	1,70 mg	0,26 mg

Asimismo, también se determinó el perfil de ácidos grasos (Fig. 3). Como puede observarse en la figura, la cantidad de ácidos grasos saturados de cadena larga (C16:0 ácido palmítico, C18:0 ácido esteárico) fue muy baja (7,28% y 2,93%, respectivamente). En cambio, fue significativo el aporte de ácidos grasos monoinsaturados, en la forma de ácido oleico (65,70%; C18:1 n9) y de ácido linoleico (23,18%, 18:2 n6).

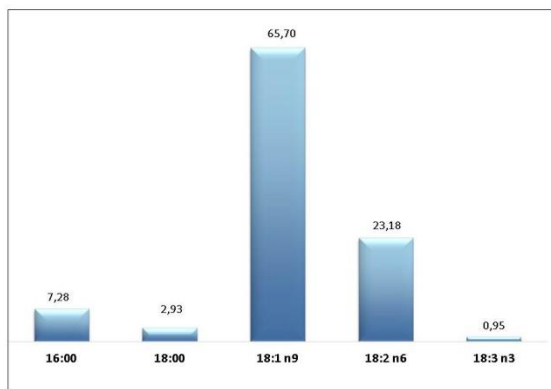


Figura 3. Perfil de ácidos grasos de la barra de nuez pecan, expresado en % de grasa total

Tabla 2. Contenido de polifenoles totales, taninos condensados y actividad antioxidante total de la barra de nuez pecan con cereal tradicional

	Barra de Nuez Pecan con Cereal Tradicional
Polifenoles totales (mg ácido gálico/100g)	2037 ± 72
Taninos condensados (mg catequina equivalente/g)	5 ± 1
Actividad antioxidante total	749 ± 56

(mg Trolox equivalente/g)	
---------------------------	--

En la Tabla 2, se presentan los valores obtenidos, en cuanto a las cantidades de polifenoles totales, taninos condensados y actividad antioxidante total, según los análisis realizados sobre las muestras. Esto representa una cantidad muy importante de este tipo de compuestos, que para fines comparativos, sería equivalente al que aportarían 2 manzanas rojas, 70 uvas rojas, 3,5 kiwis, 7 duraznos, o 5 ciruelas (9).

Como es sabido, los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes, desactivando los radicales libres, minimizando el daño y protegiendo el organismo en la incidencia de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, algunos tipos de cáncer y otras enfermedades degenerativas (10). Además, los frutos secos son una importante fuente de taninos condensados, responsables de las cualidades sensoriales, incluyendo el color y el sabor astringente (11). Por su parte, los taninos tienen actividad antioxidante mutagénica y antimicrobiana. Disminuyen los lípidos en sangre, la tensión arterial y modulan la respuesta inmunológica dependiendo de la cantidad y tipo de taninos consumidos.

En relación a la formulación básica, los datos obtenidos de la composición centesimal fueron evaluados desde el punto de vista nutricional. Si bien la barra representa un aporte interesante en muchos aspectos, sería deseable poder aumentar el nivel de fibra y disminuir el valor calórico y la cantidad de azúcar utilizada. En función de esto, se propone a futuro continuar con un diseño mejorado, realizando pruebas que permitan reemplazar, en la formulación básica, parte del jarabe de maltosa y el azúcar por polidextrosa, al igual que reemplazar parte del cereal inflado por avena, de modo de elevar el nivel de fibra dietaria.

Un análisis preliminar, evaluando la vida útil las barras de nuez pecan envasada en un film trilaminar (exterior poliéster, 12 micrones; aluminio, 7-9 micrones; barrera gases y de polietileno de alta densidad: PEAD, 60 micrones), a través de indicadores de calidad higiénico sanitaria, de calidad sensorial y de calidad nutricional, sugiere que las barras permanecen estables por al menos dos meses. Este resultado puede considerarse como altamente promisorio, considerando que este tiempo es adecuado, desde el punto de vista comercial, y que el paquete tecnológico representado por la identificación de los ingredientes, el diseño del proceso, y el film de envasado, resultaron exitosos, considerando la tendencia al enranciamiento que presenta esta fruta, de alto valor nutricional.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que este producto representa no solamente una importante fuente de ácidos grasos saludables, sino también de vitaminas antioxidantes, por lo cual sus cualidades nutricionales son destacables, además de ofrecer una alternativa de comercialización a la producción de un cultivo regional de creciente importancia, agregando valor al producto base.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el aporte financiero del Proyecto PNAIyAV1130043: Estrategias para la Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios (INTA). Se agradece, además a las coordinaciones del Centro de Agroalimentos del INTI participaron en el estudio de vida útil: Coordinación de Cereales, Harinas y Productos Derivados.; Coordinación de Oleaginosas y Subproductos; Coordinación de Toxicología y Nutrición; Coordinación de Microbiología y Biología Molecular; El Centro de Envases y Embalajes del INTI asesoró en el material a utilizar para el envasado y en la confección del packaging.

REFERENCIAS

1. <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=26417>
2. <http://www.todoagro.com.ar/noticias/nota.asp?nid=11650>
3. AOAC; 1990. (Methods: 922.06; 984.13; 925.09; 923.03), Eds 15 th. Association of Official Analytical Chemists, INC. Arlington, Virginia, USA. pp., 777-782.
4. Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
5. Descalzo, A.; Biolatto, A.; Grigioni, G.; Rossetti, L.; Carduza, F.; Sancho, A (2007). Producción de Pecán en Argentina. Ediciones INTA.
6. Brands-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Techn.*, v. 28, n. 1, pp. 25-30.
7. Sadasivam, S.; Manickam, A. (1992). In: *Biochem. Methods Agric. Sci.*, Wiley Eastern. Ltd, New Delhi, India. pp. 187-188.
8. Price, M.L.; Van Scoyoc, S.; Butler, L.G.J. (1978). *Agric. Food Chem.* 26,121.

9. Fu, L.; Xu, B.T.; Xu, X.R.; Gan, R.Y.; Zhang, Y.; Xia, E. Q.; Li, H.B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129(2), 345-350.
10. Lombardi, L.; Villareal-Lozoya, J.E.; Cisneros-Zevallos, L. (2009). Antioxidant properties of pecan kernels. *Acta Horticulturae*, 841, 91-96.
11. Prasad, R.N.B. (1993). Walnuts and pecans. In *Encyclopedia of food science and technology*, vol. seven, Macrae R., Robinson R. K., and Sadler M. J. (eds.), Academic Press, London, p. 4828-4834.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CEPAJE MALBEC INFLUENCIA DEL NIVEL DE CARGA DEL VIÑEDO Y DEL TIEMPO DE MACERACIÓN

M. Fanzone¹, J. Prieto², S. Sari², G. Aliquo², V. Jofré¹, M. Assof¹, J. Pérez Peña², S. Gómez Alonso³, I. Herмосín Gutiérrez³

¹ Laboratorio de Aromas y Sustancias Naturales, Estación Experimental Agropecuaria Mendoza, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), San Martín 3853, 5507 Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina.

² Estación Experimental Agropecuaria Mendoza, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Luján de Cuyo, Mendoza 5507, Argentina.

³ Universidad de Castilla-La Mancha, Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Avda. Camilo José Cela s/n, Campus Universitario, 13071 Ciudad Real, España.

Correo electrónico: fanzone.martin@inta.gob.ar

RESUMEN

Actualmente, la tendencia de consumo de vinos tintos se orienta preferentemente hacia productos con gran estructura, intensidad colorante y volumen en boca. Por esta razón, resulta esencial para la industria comprender exhaustivamente el proceso de maceración/fermentación que conduzca a la obtención de este tipo de productos. Paralelamente, la calidad del vino dependerá, entre otros factores, del rendimiento del viñedo y del balance vegetativo/reproductivo. Teniendo en cuenta esta problemática, el objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de un tratamiento vitícola (número de brotes por planta) sobre los componentes vegetativos y de rendimiento, y la composición química de bayas Malbec; y el efecto de su combinación con un tratamiento enológico (tiempos de maceración) sobre la composición química de los vinos de esta variedad, en dos temporadas (2013 y 2015). Para ello, se instaló el ensayo en un viñedo comercial ubicado en la localidad de Ugarteche (Mendoza). Se aplicaron 3 tratamientos de campo consistentes en diferente número de brotes por planta (R1, 38; R2, 22; y R3, 16 brotes/planta, respectivamente), mediante un diseño de bloques al azar con 4 réplicas. Las uvas de cada réplica fueron cosechadas con 23-24°Brix y vinificadas con diferente tiempo de contacto con los hollejos (M1, 7; M2, 14; y M3, 21 días, respectivamente), siguiendo un protocolo estándar. Se evaluó la composición fenólica global de los vinos por espectrofotometría UV-Visible y el perfil de compuestos individuales por HPLC-DAD/ESI-MS. Los resultados obtenidos mostraron un mayor impacto del número de brotes sobre la composición fenólica en comparación con el tiempo de maceración, sin apreciarse interacciones entre los mismos. Se observó un incremento significativo del potencial fenólico en vinos provenientes de R3, independientemente del tiempo de contacto con hollejos, presentando la mayor intensidad colorante y niveles superiores de piranoantocianinas, aductos antocianinas-flavonoles, ácidos fenólicos y flavonoles. Por su parte, el tiempo de maceración afectó el contenido de piranoantocianinas y compuestos no-antociánicos (flavonoides y no-flavonoides), observándose una disminución de los mismos entre M1 y M3. Complementariamente, los vinos de M2 mostraron una mayor concentración de antocianinas monoméricas, pigmentos poliméricos y fenoles totales. En conclusión, si bien la incidencia del tratamiento de campo sobre la composición química de los vinos fue notablemente superior al tratamiento enológico, la combinación de los tratamientos R3 y M2 podría permitir la obtención de vinos con gran potencial de añejamiento, por sus atributos visuales (estabilidad del color) y en boca.

Palabras clave: carga del viñedo, tiempo de maceración, compuestos fenólicos, Malbec, vinos

ABSTRACT

Currently, the trend of red wine consumption is preferentially oriented toward products with great structure, color intensity and mouthfeel. For this reason, it is essential the understanding of the maceration/fermentation process which leads to the obtaining this type of products. Similarly, the wine quality will depend, among other factors, of the vineyard yield and vegetative/reproductive balance. Considering this problem, the aim of this study was to evaluate the impact of a viticultural practice (number of shoots per plant) on

vegetative and yield components, and chemical composition of Malbec berries; and the effect of its combination with oenological management (maceration length) on chemical composition of the wines, in two seasons (2013 and 2015). The experiment was performed in a commercial vineyard located in Ugarteche (Mendoza, Argentina). Field treatments corresponded to three different shoot numbers per plant (R1, 38; R2, 22; and R3, 16 shoots/plant, respectively), by a complete randomized block with four replicates. The grapes of each replicate were harvested at 23 to 24°Brix and elaborated with different maceration lengths (M1, 7; M2, 14; and M3, 21-day skin contact, respectively). Global phenolic composition of wines was studied by spectrophotometric techniques, and individual phenolics were evaluated by HPLC-DAD/ESI-MS. Our results showed that shoot number imparted a greater effect on most chemical compounds compared with maceration length. No interaction was observed between field and maceration treatments. A significant increase of the phenolic potential was observed in wines from R3 plants regardless of the skin contact treatment. R3 wines had the highest color intensity, and the highest levels of pyranoanthocyanins, anthocyanins-flavanols adducts, phenolics acids and flavonols. Conversely, maceration length affected pyranoanthocyanins and non-anthocyanin content (flavonoids and non-flavonoids), with a decrease of them between M1 and M3. M2 wines showed a higher concentration of monomeric anthocyanins, polymeric pigments and total phenols. In conclusion, the effect of field treatment on wine phenolic composition overrides that of skin contact time. Thus, extended skin contact may not overcome the effects of differences in berry composition caused by variations in shoot number/vine. The combination of R3 with M2 treatments allowed obtaining wines with aging potential, due to their visual attributes and mouthfeel.

Keywords: crop load, maceration time, phenolic compounds, Malbec, wines

INTRODUCCIÓN

En vista de las necesidades y demandas del mercado actual, resulta cada vez más necesaria la producción de vinos de la mayor calidad posible. La calidad del vino puede ser definida por criterios diferentes, estando sujeta a los parámetros de evaluación empleados, y siempre diseñados para cumplir con los requisitos de los consumidores. Entre los parámetros objetivos, se encuentran los compuestos químicos provenientes de las uvas que inciden en las características sensoriales y en el valor nutricional de los vinos correspondientes. Estos compuestos son biosintetizados en la planta de vid a través del metabolismo primario (azúcares, proteínas, lípidos) y secundario (compuestos fenólicos y sustancias odorantes), y su concentración en las uvas está condicionada por factores genéticos relacionados a la variedad, factores edafoclimáticos y manejos culturales aplicados sobre el viñedo (1, 2, 3 y 4).

En las últimas décadas, el reconocimiento del importante papel de la viticultura en la producción de vinos de alta calidad ha conducido a un interés considerable en las prácticas culturales tendientes a optimizar la calidad de la materia prima. Tradicionalmente, muchas prácticas de manejo de cultivo tendían a regular el rendimiento para aumentar la calidad. Sin embargo, algunas evidencias han demostrado que el rendimiento *per se* no es un determinante de la calidad, sino que son las prácticas aplicadas para controlar el equilibrio de las plantas quienes influyen sobre la composición química de las uvas (5). Es por ello que actualmente se busca aplicar estrategias de manejo que permitan aumentar la productividad manteniendo o aumentando la calidad de producto final (6). En consecuencia, gran parte de las prácticas de manejo vitícola tienen como función controlar el equilibrio entre el crecimiento vegetativo y productivo de la vid. La obtención de cultivos balanceados es un objetivo primordial para la sostenibilidad de los mismos (6), el microclima de la canopia y la composición de las uvas y vinos (7). Numerosos estudios han propuesto rangos de valores para los índices de equilibrio (relación hoja/fruta, carga del viñedo), que se utilizan con mucha frecuencia independientemente de las condiciones ambientales, las prácticas de manejo o la variedad de uva (7). Algunas evidencias sugieren que los valores óptimos de estos índices pueden variar dependiendo del estado hídrico de la planta y del nivel de riego (8).

Entre los factores de manejo que influyen en el crecimiento vegetativo, en la producción y en la composición química de las bayas, se encuentran el sistema de conducción (9, 10, 11), el tipo de poda (12), el raleo de racimos (13, 14), las operaciones en verde (15, 16), la fertilización (17) y el manejo del riego (18, 19). La combinación de estos factores afecta el grado de madurez de las uvas (hollejo, semilla y pulpa), el momento oportuno de cosecha y el potencial de calidad enológica para producir vinos con las características buscadas. La madurez química, desde el punto de vista de la composición fenólica, odorante y polisacáridica, entre otros, considera la abundancia, diversidad y complejidad de los distintos compuestos, y su factibilidad de extracción desde las distintas partes de la baya, durante el proceso de vinificación.

Actualmente, la tendencia de consumo de vinos tintos se orienta preferentemente hacia productos con gran estructura, intensidad colorante y volumen en boca. Estas características estrictamente sensoriales y, por lo tanto, subjetivas están fuertemente relacionadas con los compuestos fenólicos encontrados en la uva y en el vino. Por esta razón, los enólogos evalúan constantemente diversas variantes tecnológicas tendientes a satisfacer las exigencias de los consumidores.

Adicionalmente a los factores mencionados, la extracción de los compuestos volátiles y no-volátiles de las partes sólidas de la baya y su transferencia al vino depende de las condiciones de contacto con el líquido (maceración). Existen numerosas técnicas enológicas reportadas para mejorar la extracción de compuestos fenólicos, como la aplicación de enzimas pectolíticas (20, 21), la maceración prefermentativa en frío (22), la termovinificación (23), la flash-expansión (24), el pigeage, y el délestage (25), entre otras. Sin embargo, el principal factor es probablemente el tiempo de contacto del jugo con los hollejos y semillas (26, 27). El tiempo de maceración adecuado depende de la abundancia, diversidad y complejidad de los distintos compuestos fenólicos presentes en la uva, y de su factibilidad de extracción desde las distintas partes de la baya. Diversos autores han reportado la incidencia de esta variable sobre la composición fenólica y odorante, y las características sensoriales de los vinos. Gil et al. (28) concluyeron que un aumento del tiempo de contacto para vinos Tempranillo y Cabernet Sauvignon produjeron un incremento de pH, proantocianidinas y polisacáridos,

acompañado de una disminución del color y del nivel de antocianos totales. A través del análisis sensorial, los vinos provenientes de maceraciones extendidas se percibieron como más astringentes y amargos, y con un mayor volumen en boca. González-Neves et al. (29) confirmaron una disminución de los antocianos totales en vinos Tannat, provenientes de un tratamiento de 15 días de maceración en comparación con 7 días. Callejón et al. (30) demostró que la duración del tiempo del contacto sólido/líquido tuvo un efecto significativo sobre la composición volátil de vinos Cabernet Sauvignon. La presencia de los orujos aumentó la concentración de compuestos volátiles en los vinos (alcoholes y ésteres fermentativos), pero generó un retraso en la extracción y/o formación de otros. Por su parte, los resultados obtenidos por Casassa et al. (27), para vinos Merlot macerados durante 30 días, fueron concordantes con el efecto observado por otros autores, obteniéndose un aumento del contenido de taninos y de la percepción de astringencia, y una disminución del nivel de antocianos totales durante las maceraciones extendidas. Asimismo, estos autores observaron que el contenido de taninos de estos vinos fue aportado principalmente por las semillas, mientras que, en las maceraciones cortas, existió un equilibrio entre compuestos extraídos de semillas y hollejos. Adicionalmente, el aumento del período de extracción permitió la formación de una cantidad mayor de pigmentos poliméricos, esenciales para la estabilidad del color del vino en el tiempo. En estudios posteriores, Casassa et al. (31) encontraron que las maceraciones extendidas para vinos Cabernet Sauvignon condujeron a una disminución de los aromas frutales.

En el marco de la vitivinicultura argentina, la variedad Malbec (*Vitis vinifera* L.) es el cepaje tinto más cultivado, con más de 40000 ha, e indudablemente el cultivar emblemático del país. El mismo se encuentra ampliamente distribuido en diferentes ecosistemas, destacándose la Provincia de Mendoza con más de 85% del total (32). Existen antecedentes respecto a la evolución de compuestos fenólicos durante la maduración de bayas en plantas sometidas a raleo de racimos (33), la influencia del origen geográfico sobre la composición de los vinos (34), el efecto de la técnica de sangrado (35), y el impacto del valor comercial de los vinos en su composición química y características sensoriales (36), entre otros. Sin embargo, existe muy poca información sobre el impacto de diferentes niveles de carga del viñedo en el microclima de la canopia, el crecimiento vegetativo, el rendimiento y la composición de las bayas; así como de la influencia combinada de factores vitícolas y enológicos sobre la composición química de uvas y vinos de esta variedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y diseño experimental

El ensayo fue realizado durante las temporadas 2013 y 2015 en un viñedo comercial del cv. Malbec ubicado en la localidad de Ugarteche (Mendoza, Argentina). Cabe destacar que durante las temporadas 2014 y 2016 las inclemencias climáticas impactaron sensiblemente en el viñedo, invalidando la evaluación del ensayo. Las plantas estaban conducidas en espaldero alto, podadas en cordón bilateral y con orientación norte-sur. En el momento de la brotación se instalaron tres tratamientos con diferente número de brotes por planta: 38 brotes/pl (R1), 22 brotes/pl (R2) y 16 brotes/pl (R3). Se aplicó un diseño de bloques completos al azar con 4 repeticiones. El bloqueo se realizó de acuerdo al peso de madera de poda obtenido durante el invierno anterior. Cada repetición o unidad experimental consistió en un claro con 5 plantas homogéneas. Los tratamientos se instalaron durante el mes de octubre, cuando los brotes tenían aproximadamente 10 cm de longitud. Al momento de la cosecha, la uva proveniente de cada unidad experimental se dividió en 3 lotes iguales a los cuales se les aplicó distintos tiempos de maceración en bodega: 7 días (M1), 14 días (M2) y 21 días (M3). Los tratamientos finales resultaron de la combinación de los dos factores (número de brotes x tiempo de maceración), obteniéndose un total de 36 vinos diferentes en la temporada 2013. Luego a partir de los resultados obtenidos, durante la temporada 2015 se eliminó el tratamiento M1, obteniéndose un total de 24 vinos.

Cosecha y vinificación

Las uvas de cada unidad experimental fueron cosechadas en madurez tecnológica (23-24 °Brix). Al momento de cosecha, se determinaron los componentes del rendimiento (número de racimos por planta, el peso de racimo y producción por planta). Luego, la uva cosechada en cada unidad experimental se dividió en tres partes iguales, las cuales fueron vinificadas con diferente tiempo de contacto con los hollejos, aplicando un protocolo estándar. Se procedió al descobajado, molienda y encubado de las uvas en recipientes plásticos de 8 L. Se realizó el sulfitado de las uvas (100 mg $K_2S_2O_5$ /kg) y se adicionó lisozima (25 mg/hL) para inhibir levaduras y bacterias lácticas nativas. Se inocularon levaduras seleccionadas (200 mg/kg), y la fermentación alcohólica/maceración se condujo a 25 ± 1 °C. Se efectuaron dos bazuqueos diarios hasta una densidad de 1,020. Completado el tiempo de maceración en cada caso, los vinos fueron descubados y al finalizar la fermentación alcohólica se sulfitaron (100 mg $K_2S_2O_5$ /L) y mantuvieron a 3-4 °C durante 2-3 semanas para su estabilización tartárica. Finalmente, los vinos terminados se embotellaron y almacenaron en posición horizontal (13-15 °C, 40-50% de humedad relativa, oscuridad) hasta el momento de análisis.

Determinaciones analíticas generales

Al momento de cosecha, se seleccionaron aleatoriamente 100 bayas de cada unidad experimental a partir de las cuales se obtuvo un mosto que fue utilizado en la determinación de sólidos solubles, pH y acidez titulable, siguiendo los procedimientos descritos por Zoecklein et al. (37). Por su parte, en los vinos terminados se determinó acidez titulable, acidez volátil, pH, alcohol, y anhídrido sulfuroso libre y total (37). Posteriormente, durante el invierno siguiente a cada temporada se realizó la medición del peso de poda, que permitió la determinación del índice de Ravaz en cada unidad experimental. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

Determinación de parámetros fenólicos generales

La determinación de los parámetros fenólicos generales en uvas y vinos fue realizada por espectrofotometría UV-Visible. Para ello, las muestras se centrifugaron previamente (15 min, 2038g) y se sometieron al análisis de fenoles totales (mg/L), taninos totales (mg/L), antocianos totales (mg/L), pigmentos poliméricos pequeños (SPP) y pigmentos poliméricos grandes (LPP), siguiendo la metodología propuesta por Harbertson et al. (38). Complementariamente, se determinaron las coordenadas CIELAB en los vinos [claridad (L^*),

saturación (C*) y tonalidad/Hue (h*]), empleando el software MSCV® (39) y las recomendaciones de la Commission Internationale de L'Eclairage (40). Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

Determinación de compuestos fenólicos individuales

La caracterización y cuantificación de antocianinas individuales en los vinos se realizó por HPLC-DAD/ESI-MS siguiendo la metodología descrita por Lago-Vanzela et al. (41). La detección fue realizada en todo el espectro UV-Visible comprendido entre 210 y 600 nm, y la cuantificación mediante la determinación del área de los picos a 520 nm, empleando una curva de calibración realizada con malvidina-3-glucósido como estándar externo. La identificación y confirmación de los pigmentos antocianínicos se realizó por ESI-MS/MS en modo de ionización positivo (41).

La fracción de compuestos libres de antocianos (ácidos fenólicos, flavonoles y dihidroflavonoles) fue aislada a partir de las muestras de vino siguiendo el procedimiento descrito por Castillo-Muñoz et al. (42), empleando cartuchos de SPE (Oasis MCX, Waters Corp., Mildford, MA, USA; 6 mL de capacidad rellenos con 500 mg de absorbente). La caracterización y cuantificación se realizó por HPLC-DAD/ESI-MS siguiendo la metodología descrita por Lago-Vanzela et al. (41). La detección fue realizada en todo el espectro UV-Visible comprendido entre 210 y 600 nm, y la cuantificación mediante la determinación del área de los picos a 360 nm (flavonoles) y 320 nm (ácidos fenólicos), empleando curvas de calibración realizadas con estándares externos. La identificación y confirmación se realizó por ESI-MS/MS en modo de ionización negativo (41).

Finalmente, la caracterización de flavonoles (monómeros, dímeros tipo-B, proantocianidinas poliméricas) y estilbenos fue realizada mediante su aislamiento a partir de las muestras de vino, empleando SPE con cartuchos C18 (Sep-Pak Plus C18, Waters Corp., Mildford, MA, USA; 820 mg de absorbente) (43). La determinación estructural de las proantocianidinas y del grado medio de polimerización (mDP) se realizó siguiendo el método de despolimerización en medio ácido con pirogalol. La identificación de flavonoles y estilbenos se realizó por modo scan EMS y la cuantificación por modo MRM, con el empleo adicional de estándares comerciales (43). Todos los análisis fueron realizados por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Componentes del rendimiento

En ambas temporadas evaluadas, los componentes del rendimiento fueron afectados significativamente por el número de brotes por planta (Figura 1). Las plantas con menor número de brotes (R3) presentaron el menor número de racimos, lo cual se tradujo en un rendimiento significativamente menor con respecto a los tratamientos restantes. El mayor tamaño de racimos observado en R3 no alcanzó a compensar la pérdida asociada al menor número de racimos por planta. En 2013, las plantas de R1 y R2 mostraron rendimientos similares a pesar de la diferencia significativa observada en el número y peso de racimos. En este caso, el tratamiento R2 presentó un incremento en el peso de los racimos de más del 60%, lo cual fue suficiente para compensar el menor número de racimos por planta observado. Con respecto al índice de Ravaz, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. A excepción de R3, el resto de los tratamientos podrían considerarse dentro del rango óptimo (5-10) para este parámetro (7). En ambas temporadas, R3 presentó valores mayores a 11, superando el límite considerado adecuado para una buena madurez, lo que podría indicar un exceso de crecimiento vegetativo.

Parámetros analíticos generales de uvas y vinos

El análisis de las uvas al momento de cosecha (2013 y 2015) mostró diferencias significativas en el nivel de sólidos solubles (°Brix) entre los distintos tratamientos de campo, sin apreciarse cambios en la acidez total y el pH (Figura 2). En todos los casos, los tratamientos con menor número de brotes por planta (R2 y R3) presentaron la mayor concentración de sólidos solubles, debido probablemente a un incremento en la relación hoja/fruto (datos no mostrados), generando un avance en la maduración de las bayas (14, 33, 44). Estas diferencias se trasladaron a los vinos, observándose mayores niveles de alcohol en aquellos provenientes de R2 y R3 (Figura 3). Por el contrario, el tiempo de maceración no modificó estos parámetros, presentándose valores similares de alcohol, pH y acidez total. Asimismo, no se encontró ninguna interacción entre ambos factores para estos parámetros evaluados.

Composición fenólica de uvas y vinos

El análisis de los parámetros fenólicos globales en las uvas (2013 y 2015) mostró un efecto significativo del tratamiento vitícola, observándose niveles superiores de taninos y antocianos en R3 con respecto a los tratamientos restantes (Figura 2). Al no observarse diferencias significativas en la relación hoja/fruta entre los tratamientos evaluados, los resultados obtenidos sugieren que la distribución del área foliar dentro de la canopia (o distribución de la luz) y el tipo de área foliar (área foliar de brotes principales y brotes laterales) debería tenerse en cuenta al interpretar estos índices de equilibrio. Esta tendencia se trasladó a los vinos correspondientes (Figura 4), observándose incluso un mayor impacto del número de brotes (tratamiento vitícola) sobre su composición fenólica en comparación con el tiempo de maceración (tratamiento enológico). El tiempo de maceración sólo aumentó levemente el contenido de taninos en los vinos 2013, sin afectar el resto de los parámetros evaluados, coincidiendo con lo reportado por otros autores (26, 27). Esto podría deberse a un mecanismo de desorción de estos compuestos mediado por el etanol en etapas post-fermentativas (M2 y M3), que conduciría a la disrupción de las interacciones no-covalentes de las proantocianidinas con material de la pared celular de los hollejos (45).

Al estudiar la composición de pigmentos en los vinos se pudieron corroborar algunos datos presentados anteriormente. Sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre vinos provenientes de diferentes tratamientos de campo. A menor número de brotes por planta aumentó la proporción de pigmentos poliméricos grandes (LPP) y pequeños (SPP), coincidentes con una mayor concentración de antocianinas en estos vinos (Figura 5). Según diversos autores (46), los LPP están constituidos principalmente por uniones antociano-tanino, mientras que los SPP se forman por reacción entre las antocianinas y ciertos compuestos de bajo peso

molecular como flavanoles monómeros o dímeros, ácido pirúvico o acetaldehído. Por lo tanto, el aumento en el nivel de flavanoles observado a menor número de brotes por planta podría contribuir a la formación de estos pigmentos en los vinos de R2 y R3. Con respecto al tiempo de maceración, no se observaron cambios estadísticamente significativos en los vinos al momento de análisis, situación que podría modificarse durante el añejamiento en botella.

Una tendencia semejante se observó en los parámetros de color (Figura 5). Los vinos de R2 y R3 (2013 y 2015) mostraron la mayor intensidad colorante, un incremento de los valores h^* y C^* , y una disminución de L^* , en comparación con los tratamientos restantes. Por el contrario, la extensión en el tiempo de maceración (M3) generó un incremento de L^* y una disminución de C^* y h^* , resultando en una diferencia de color total en comparación con los vinos M1 (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores (28).

Para todos los parámetros evaluados se observó un efecto significativo del factor “año”, caracterizando a la temporada 2015 con un potencial fenólico menor respecto al 2013.

De modo complementario, se realizó la determinación de compuestos fenólicos individuales en los vinos temporada 2013. Las antocianinas analizadas por HPLC-DAD/ESI-MS mostraron un patrón similar al obtenido por espectrofotometría. En general, se observó un incremento de antocianinas (principalmente acetiladas y cumariladas) en los vinos al disminuir el número de brotes por planta (Figura 6). El tratamiento R3 generó niveles superiores de piranoantocianinas y aductos antocianinas-flavanoles, lo cual coincide con la mayor intensidad colorante y valores de SPP en estos vinos. Complementariamente, el tiempo de maceración también afectó el contenido de estos compuestos. A los 14 días de contacto del jugo con los hollejos (M2) se obtuvo la mayor concentración de antocianinas, para luego disminuir hacia M3 (28), lo cual podría atribuirse a fenómenos de oxidación, precipitación, y/o adsorción sobre las paredes celulares de las levaduras y sólidos presentes en la maceración, inclusión en cristales de bitartrato de potasio y/o modificaciones estructurales.

Con respecto a los compuestos fenólicos no-antocianínicos, el tratamiento vitícola generó diferencias estadísticamente significativas en los vinos, confirmando los resultados mostrados anteriormente. Los vinos provenientes de R3, independientemente del tiempo de contacto con los hollejos, presentaron niveles superiores de no-flavonoides (22%) y flavonoides (flavonoles, 211%; dihidroflavonoles, 17%), respecto a R1 (Figura 7). Estudios anteriores han demostrado que un incremento en la concentración de azúcares en la baya y en el hollejo está relacionado con una mayor síntesis de compuestos fenólicos (47, 48). En el presente trabajo se observó que las plantas de los tratamientos R2 y R3 alcanzaron una mayor concentración de sólidos solubles (una semana antes que R3) lo cual podría explicar el mayor contenido en fenoles observado. Por otro lado, la menor densidad foliar observada en estos tratamientos (R2 y R3) pudo haber generado un microclima en la zona de racimos más favorable a la madurez y a la síntesis de compuestos fenólicos. Al analizar la incidencia del tiempo de maceración, se observó una mayor extracción y contenido de todos los compuestos analizados a los 7 días (M1), seguido por una disminución progresiva hasta finalizar el ensayo (Figura 7). Estos resultados coinciden con estudios realizados por otros autores en vinos de diferentes variedades sometidos a maceraciones prolongadas (49); donde la pérdida de algunos compuestos como los flavonoles podría explicarse por reacciones de hidrólisis de sus formas glicosidadas con la correspondiente liberación de la fracción aglicona, susceptible de oxidación y precipitación en un medio rico en etanol.

Finalmente, al evaluar algunos aspectos estructurales de las proantocianidinas, no se observaron diferencias respecto al mDP entre los vinos analizados (Figura 8). Sin embargo, al aumentar el tiempo de maceración (M3) se observó una disminución significativa del porcentaje de prodelfinidinas (20%) y un incremento del porcentaje de galoilación (40%) en comparación con M1. Esto indica diferencias claras en la cinética de extracción de las proantocianidinas de hollejos y semillas durante la vinificación. En los primeros días de maceración se liberan principalmente las proantocianidinas de hollejos, incluyendo prodelfinidinas, y al avanzar este proceso aumenta su extracción desde las semillas, favorecida por el contenido etanólico del medio. Es bien conocido que las proantocianidinas de semillas poseen un alto contenido de galato de (-)-epicatequina en comparación con los hollejos, y por lo tanto un mayor porcentaje de galoilación de estos compuestos (50).

CONCLUSIONES

Si bien la incidencia del tratamiento vitícola sobre la composición química de los vinos fue notablemente superior al tratamiento enológico, la combinación de los tratamientos R3 y M2 podría permitir la obtención de vinos con gran potencial de añejamiento, al favorecer la estabilización del color mediante reacciones de copigmentación, condensación y polimerización. Sin embargo, a pesar de las diferencias de rendimiento entre R2 y R3 (30% más en R2), las diferencias observadas en la composición química de uvas y vinos son pequeñas. Esto sugiere que el nivel de rendimiento y combinación de factores adecuado depende en gran medida de los objetivos de producción y del estilo de vino buscado. Este estudio se complementa con la determinación de polisacáridos (GC-MS) y la evaluación sensorial de los vinos a través de un panel entrenado de jueces, cuyos resultados serán publicados en breve. A partir de todos los resultados, se explorarán las relaciones entre la composición química de los vinos, los parámetros físicos y químicos de las bayas, y los parámetros vitícolas de rendimiento, mediante técnicas de análisis multivariado.

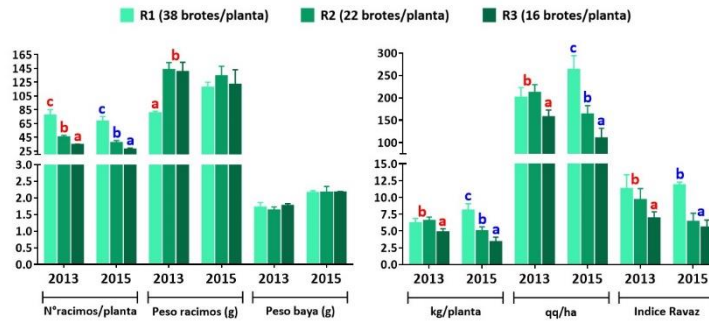


Figura 1. Componentes de rendimiento de viñedo Malbec con distintos N° brotes/planta (temporadas 2013 y 2015). Letras diferentes para cada variable y año indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey HSD, $p < 0,05$).

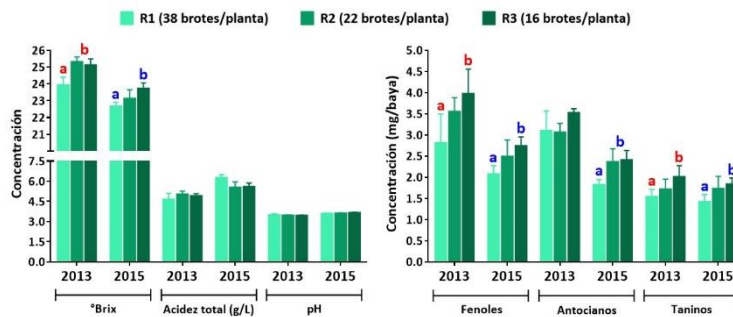


Figura 2. Parámetros analíticos generales de uvas Malbec, provenientes de plantas con distinto equilibrio vegetativo/productivo (2013 y 2015).

Letras diferentes para cada variable y año indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey HSD, $p < 0,05$).

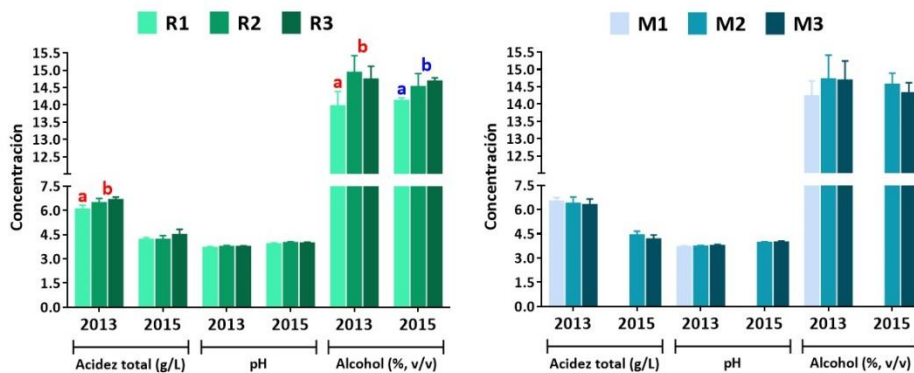


Figura 3. Parámetros analíticos generales de vinos Malbec, provenientes de ensayos vitícolas y enológicas (2013 y 2015). Letras diferentes para cada variable y año indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey HSD, $p < 0,05$).

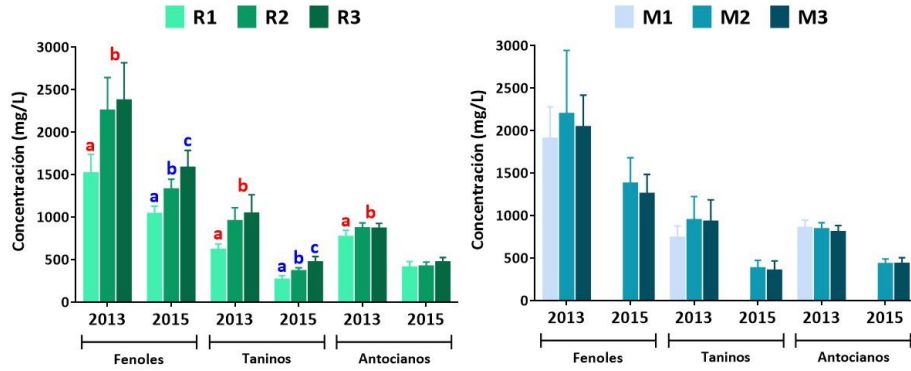


Figura 4. Parámetros fenólicos globales de vinos Malbec, provenientes de ensayos vitícolas y enológicos (2013 y 2015). Letras diferentes para cada variable y año indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey HSD, $p < 0,05$).

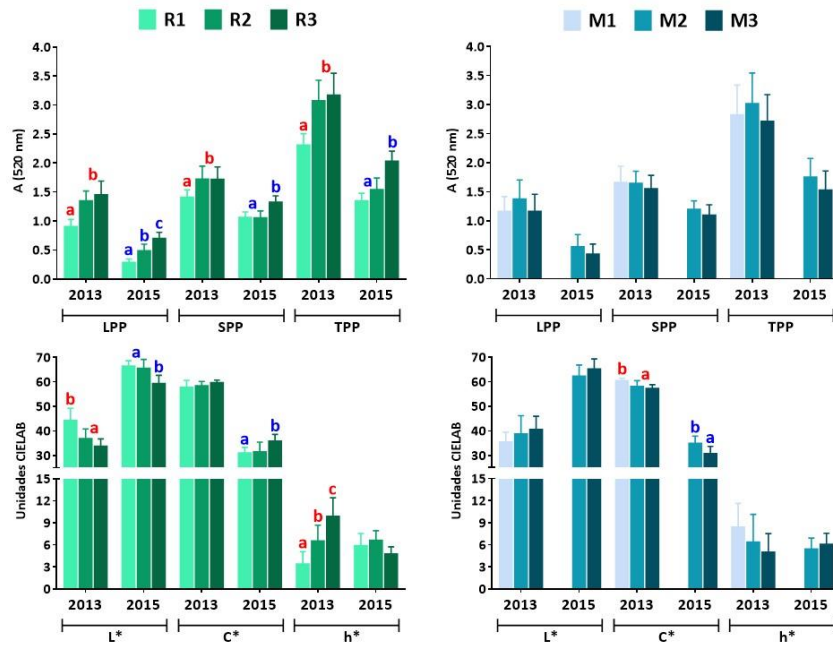


Figura 5. Parámetros de color de vinos Malbec, provenientes de ensayos vitícolas y enológicos (2013 y 2015). Letras diferentes para cada variable y año indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey HSD, $p < 0,05$).

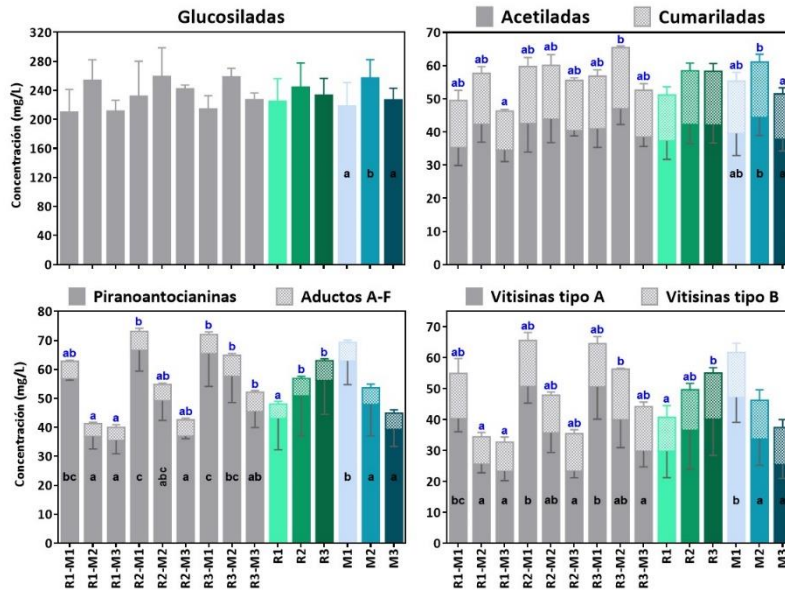


Figura 6. Derivados antocianínicos de vinos Malbec, provenientes de ensayos vitícolas y enológicos (2013). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey HSD, $p < 0,05$).

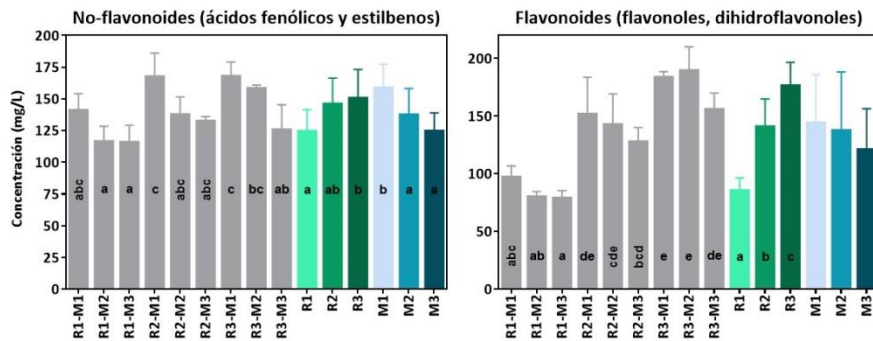


Figura 7. Compuestos no-antocianínicos (flavonoides y no-flavonoides) de vinos Malbec, provenientes de ensayos vitícolas y enológicos (2013). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey HSD, $p < 0,05$).

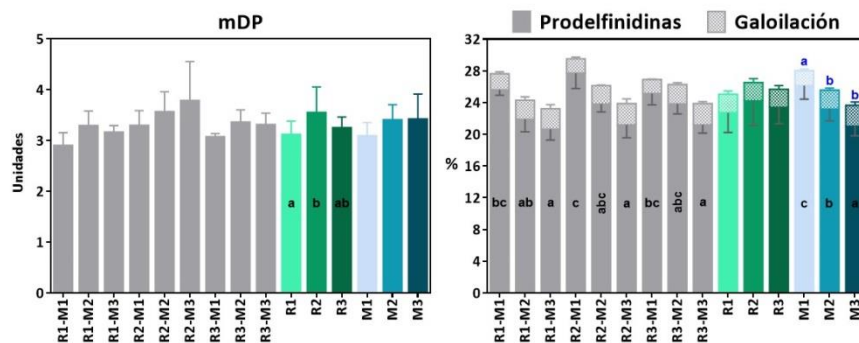


Figura 8. Aspectos estructurales de las proantocianidinas de vinos Malbec, provenientes de ensayos vitícolas y enológicos (2013). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey HSD, $p < 0,05$).

REFERENCIAS

1. Jackson, D.I., Lombard, P.B. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality: A review. Am. J. Enol. Vitic. 44: 409-430.

2. Haselgrove, L., Botting, D., van Heeswijck, R., Hoj, P.B., Dry, P.R., Ford, C., Iland, P.G. (2000). Canopy microclimate and berry composition: The effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6: 141-149.
3. Düring, H., Davtyan, A. (2002). Development changes of primary processes of photosynthesis in sun- and shade-adapted berries of two grapevine cultivars. *Vitis* 41: 63-67.
4. Downey, M.O., Dokoozlian, N.K., Krstic, M.P. (2006). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.* 57: 257-268.
5. Matthews, M.A., Nuzzo, V. (2007). Berry size and yield paradigms on grapes and wines quality. *Acta Hort.* 754: 423-436.
6. Clingeffer, P. (2010). Plant management research: status and what it can offer to address challenges and limitations. *Aust. J. Grape Wine Res.* 16: 25-32.
7. Kliewer, W., Dokoozlian, N. (2005). Leaf area/ crop weight ratios of grapevines: influence on fruit composition and wine quality. *Am. J. Enol. Vitic.* 56: 170-181.
8. Dayer, S., Prieto, J.A., Galat, E., Pérez Peña, J. (2013). Carbohydrate reserve status of Malbec grapevines after several years of regulated deficit irrigation and crop load regulation. *Aust. J. Grape Wine Res.* 19: 422-430.
9. Wolf, T.K., Dry, P.R., Iland, P.G., Botting, D., Dick, J., Kennedy, U., Ristic, R. (2003). Response of Shiraz grapevines to five different training systems in the Barossa Valley, Australia. *Aust. J. Grape Wine Res.* 9: 82-95.
10. Bernizzoni, F., Gatti, M., Civardi, S., Poni, S. (2009). Long-term performance of Barbera grown under different training systems and within-row vine spacings. *Am. J. Enol. Vitic.* 60: 339-348.
11. Coletta, A., Berto, S., Crupi, P., Cravero, M.C., Tamborra, P., Antonacci, D., Daniele, P.G., Prenesti, E. (2014). Effect of viticulture practices on concentration of polyphenolic compounds and total antioxidant capacity of Southern Italy red wines. *Food Chem.* 152: 467-474.
12. Bates, T. (2008). Pruning level affects growth and yield of New York Concord on two training systems. *Am. J. Enol. Vitic.* 59: 276-286.
13. Guidoni, S., Ferrandino, A., Novello, V. (2008). Effects of seasonal and agronomical practices on skin anthocyanin profile of Nebbiolo grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 59: 22-29.
14. Valdés, M.E., Moreno, D., Gamero, E., Uriarte, D., Prieto, M.H., Manzano, R., Picon, J., Intrigliolo, D. S. (2009). Effects of cluster thinning and irrigation amount on water relations, growth, yield and fruit and wine composition of Tempranillo grapes in Extremadura (Spain). *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 43: 67-76.
15. Keller, M., Mills, L.J., Wample, R.W., Spayd, S.E. (2005). Cluster thinning effects on three deficit-irrigated *Vitis vinifera* cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 56: 91-103.
16. Poni, S., Bernizzoni, F., Civardi, S., Libelli, N. (2009). Effects of pre-bloom leaf removal on growth of berry tissues and must composition in two red *Vitis vinifera* L. cultivars. *Aust. J. Grape Wine Res.* 15: 185-193.
17. Delgado, R., Martín, P., del Álamo, M., González, M.R. (2004). Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilization rates. *J. Sci. Food Agric.* 84: 623-630.
18. Ojeda, H., Andary, C., Kraeva, E., Carbonneau, A., Deloire, A. (2002). Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 261-267.
19. Keller, M., Smithyman, R.P., Mills, L.J. (2008). Interactive effects of deficit irrigation and crop load on Cabernet Sauvignon in an arid climate. *Am. J. Enol. Vitic.* 59: 221-234.
20. Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., González-Sanjosé, M.L. (2012). Comparative study of the use of maceration enzymes and cold pre-fermentative maceration on phenolic and anthocyanic composition and colour of a Mencía red wine. *LWT-Food Sci. Technol.* 48: 1-8.
21. Favre, G., Peña-Neira, A., Baldi, C., Hernández, N., Traverso, S., Gil, G., González-Neves, G. (2014). Low molecular-weight phenols in Tannat wines made by alternative winemaking procedures. *Food Chem.* 158: 504-512.
22. Cejudo-Bastante, M.J., Gordillo, B., Hernanz, D., Escudero-Gilete, M.L., González-Miret, M.L., Heredia, F.J. (2014). Effect of the time of cold maceration on the evolution of phenolic compounds and colour of Syrah wines elaborated in warm climate. *Int. J. Food Sci. Tech.* 49: 1886-1892.
23. Atanackovic, M., Petrovic, A., Jovic, S., Gojkovic-Bukarica, L., Bursac, M., Cvejic, J. (2012). Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. *Food Chem.* 131: 513-518.
24. Morel-Salmi, C., Souquet, J., Bes, M., Cheynier, V. (2006). Effect of flash release treatment on phenolic extraction and wine composition. *J. Agric. Food Chem.* 54: 4270-4276.
25. Sacchi, K.L., Bisson, L.F., Adams, D.O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 56: 197-206.
26. Llaudy, M.C., Canals, R., Canals, J.M., Zamora, F. (2008). Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in wine simulated macerations. *Eur. Food Res. Technol.* 226: 337-344.
27. Casassa, L.F., Beaver, C.W., Mireles, M.S., Harbertson, J.F. (2013). Effect of extended maceration and ethanol concentration on the extraction and evolution of phenolics, colour components and sensory attributes of Merlot wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 19: 25-39.

28. Gil, M., Kontoudakis, N., González, E., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M., Zamora, F. (2012). Influence of grape maturity and maceration length on color, polyphenolic composition, and polysaccharide content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo wines. *J. Agric. Food Chem.* 60: 7988–8001.
29. González-Neves, G., Gil, G., Favre, G., Ferrer, M. (2012). Influence of grape composition and winemaking on the anthocyanin composition of red wines of Tannat. *Int. J. Food Sci. Tech.* 47: 900–909.
30. Callejón, R.M., Margulies, B., Hirson, G.D., Ebeler, S.E. (2012). Dynamic changes in volatile compounds during fermentation of Cabernet Sauvignon grapes with and without skins. *Am. J. Enol. Vitic.* 63: 301–312.
31. Casassa, L.F., Larsen, R.C., Beaver, C.W., Mireles, M.S., Keller, M., Riley, W.R., Harbertson, J.F. (2013). Sensory impact of extended maceration and regulated deficit irrigation on Washington state Cabernet Sauvignon wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 64: 505–514.
32. INV (2017). Instituto Nacional de Vitivinicultura, Argentina. http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/estadisticas/tespeciales/2017/Malbec_2017.pdf.
33. Fanzone, M., Zamora, F., Jofré, V., Assof, M., Peña-Neira, A. (2011). Phenolic composition of Malbec grape skins and seeds from Valle de Uco (Mendoza, Argentina) during ripening. Effect of cluster thinning. *J. Agric. Food Chem.* 59: 6120-6136.
34. Fanzone, M., Peña-Neira, A., Jofré, V., Assof, M., Zamora, F. (2010). Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza province (Argentina). *J. Agric. Food Chem.* 58: 2388-2397.
35. Fanzone, M., Peña-Neira, A., Jofré, V., Assof, M., Zamora, F. (2013). Effect of saignée on phenolic composition of Malbec wines. *Rev. FCA UNCuyo* 45: 199-209.
36. Fanzone, M., Peña-Neira, A., Gil, M., Jofré, V., Assof, M., Zamora, F. (2012). Impact of phenolic and polysaccharidic composition on commercial value of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines. *Food Res. Int.* 45: 402–414.
37. Zoecklein, B., Fugelsang, K., Gump, B., Nury, F. (2001). En *Análisis y Producción de Vino*; Acribia (Ed.): Zaragoza, Spain, 634 p.
38. Harbertson, J.F., Picciotto, E.A., Adams, D.O. (2003). Measurement of polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfite bleaching. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 301-306.
39. Ayala, F., Echávarri, J.F., Negueruela, A.I. (2001). Universidad de Zaragoza. http://www.unizar.es/negueruela/html/grupo_color.htm . Acceso mayo de 2013.
40. CIE (1986). *Colorimetric*, 2nd. Viena. Central Bureau of the Commission Internationale de L’Eclairage. Publication C.I.E., 15, 2.
41. Lago-Vanzela, E.S., Gomes Rebello, L.P., Mota Ramos, A., Stringheta, P.C., Da-Silva, R., García-Romero, E., Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I. (2013). Chromatic characteristics and color-related phenolic composition of Brazilian young red wines made from the hybrid grape cultivar BRS Violeta (“BRS Rúbea” × “IAC 1398-21”). *Food Res. Int.* 54: 33–43.
42. Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *J. Agric. Food Chem.* 55: 992–1002.
43. Gomes Rebello, L.P., Lago-Vanzela, E.S., Teixeira Barcia, M., Mota Ramos, A., Stringheta, P.C., Da-Silva, r., Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I. (2013). Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS Violeta (BRS Rubea × IAC 1398-21) using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. *Food Res. Int.* 54: 354-366.
44. Petrie, P.R., Clingeleffer, P.R. (2006). Crop thinning (hand versus mechanical), grape maturity and anthocyanin concentration: outcomes from irrigated Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) in a warm climate. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12: 21-29.
45. Hanlin, R.L., Hrmova, M., Harbertson, J.F., Downey, M.O. (2010). Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 16: 173-188.
46. Adams, D.O., Harbertson, J.F., Picciotto, E.A. (2004). *Red wine color: revealing the mysteries*. ACS Eds., Washington, DC, USA. 331 p.
47. Pirie, A.J.G., Mullins, M.G. (1980). Concentration of phenolics in the skin of grape berries during fruit development and ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* 31: 34-36.
48. Roby, G., Harbertson, J.F., Adams, D.O., Matthews, M.A. (2004). Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: anthocyanins and tannins. *Aust. J. Grape Wine Res.* 10: 100-107.
49. Casassa, L.F., Harbertson, J.F. (2014). Extraction, evolution, and sensory impact of phenolic compounds during red wine maceration. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 5: 83-109.
50. González-Manzano, S., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C. (2004). Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Anal. Chim. Acta* 513: 283-289.

EFECTO DE LA FORMULACIÓN Y LAS CONDICIONES DE PROCESAMIENTO SOBRE EL DESARROLLO DEL PARDEAMIENTO NO ENZIMÁTICO Y LA ESTABILIDAD DE CAROTENOIDES EN COPOS DE MAÍZ

M.A. Cueto^{1,2}, G. Rolandelli^{1,2}, S. Perez Burillo³, J.A. Rufián-Henares³, A.E. Farroni⁴, M.P. Buera^{1,2}

¹ Departamentos de Industrias y Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160, Ciudad Universitaria, C1428EGA, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Godoy Cruz 2290, C1425FQB, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

³ Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja, 18071, Granada, España.

⁴ Laboratorio de Calidad de Alimentos, Suelos y Aguas, Estación Experimental Agropecuaria Pergamino (EEA Pergamino), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Avenida Frondizi (ruta 32) km 4,5, 2700, Pergamino, Buenos Aires, Argentina.

Correo electrónico: farroni.abel@inta.gob.ar

RESUMEN

El proceso de producción de copos de maíz por laminación comprende las etapas de cocción al vapor, atemperado, laminado y tostado. Durante la cocción y además en el tostado, ocurre la reacción de Maillard, favorecida por las elevadas temperaturas y el bajo contenido de agua en este último paso. Además, se produce la pérdida de compuestos de interés, como los carotenoides. Los diferentes ingredientes que constituyen la formulación de los copos de maíz influyen sobre el color y el *flavor* del producto final y, por lo tanto, sobre la aceptación por parte de los consumidores. Sin embargo, en el proceso también se forman ciertos compuestos indeseables. Por lo tanto, es importante evaluar el papel de la formulación y del tiempo de tostado en el desarrollo de color y la formación de marcadores químicos. Los copos de maíz se equilibraron a a_w 0,8 y tostaron a 230°C. Luego de la extracción de pigmentos fluorescentes con pronasa, se realizaron análisis de fluorescencia, absorbancia a 420 nm, coordenadas de color y contenido de furfural. Por otro lado, se evaluó la estabilidad de los carotenoides en las distintas etapas del proceso de elaboración. Respecto a la formulación, la sacarosa mostró un efecto sinérgico con la sal y la malta para acelerar la reacción de Maillard. La formulación afectó significativamente la cantidad de HMF y furfural formados. Los parámetros cromáticos L^* y a^* fueron variables adecuadas para evaluar reacción de pardeamiento. Durante el proceso de cocción se perdió un 60% de luteína y un 40% de zeaxantina. Luego del tostado, la etapa final, el porcentaje de pérdida de ambos compuestos fue del 80%. Estos resultados permiten profundizar en el conocimiento de las reacciones que ocurren durante el

procesamiento de los cereales, para poder definir las condiciones que disminuyan la generación de compuestos indeseables y la mayor retención de las sustancias de interés.

Palabras clave: maíz, furfuralas, fluorescencia, color, carotenoides

ABSTRACT

Corn flakes production includes four stages: steam cooking, drying, lamination and toasting. During steam cooking and toasting stages, Maillard reaction takes place, enhanced by the high temperature and the low water content. Moreover, some components of interest are lost, such as carotenoids. The different ingredients that constitute the corn flake formulation influence color and flavor of the final product and, therefore, on consumer acceptance. However, during processing, certain undesirable compounds are also formed. Thus, it is important to evaluate the importance of the ingredients and toasting time on the color development and the formation of chemical markers. Corn flakes were equilibrated at a_w 0.8 and toasted at 230°C. After fluorescent pigments extraction with pronase, fluorescence, absorbance at 420 nm, color coordinates and furfurals content analysis were performed. On the other hand, the stability of carotenoids during the different stages of elaboration was analyzed. Regarding the formulation, sucrose showed a synergistic effect with salt and malt, enhancing the Maillard reaction. Formulation significantly affected the amount of HMF and furfurals formed. Chromatic parameters L^* and a^* were proper variables evaluated in relation with the browning reaction. During cooking, 60% of lutein and 40% of zeaxanthin were lost. After toasting, the final stage, the percentage of loss was 80% for both compounds. These results allow further understanding of the reactions that take place during cereal processing, in order to define the best conditions to decrease the formation of undesirable compounds and the highest retention of substances of interest.

Keywords: corn, furfurals, fluorescence, color, carotenoids

INTRODUCCIÓN

Los cereales se encuentran entre los principales alimentos elegidos para el desayuno en todas partes del mundo. Existen diferentes presentaciones, incluyendo productos cocidos, extrudados, barras de cereales, mezcla de cereales, copos de maíz, entre otros (1, 2). Los copos de maíz disponibles en el mercado se producen a través de dos métodos diferentes: extrusión y laminación. En este trabajo nos enfocaremos en el proceso tradicional que involucra laminación. Este comienza con el mezclado de los *grits* de maíz con agua, azúcar, sal y extracto de malta para luego cocinarlos utilizando vapor saturado. Al finalizar la cocción se enfrían y laminan y luego se tuestan en un flujo de aire a elevada temperatura (~230 °C) durante unos pocos segundos para obtener el producto final. Durante este proceso, el almidón es gelatinizado y ocurre el pardeamiento no enzimático (3). Además, pueden ocurrir modificaciones en el perfil de carotenoides del maíz, que son componentes que cumplen un papel importante en la salud humana. Los principales carotenoides del maíz son luteína, zeaxantina, β -criptoxantina y β -caroteno, cuyas proporciones dependen de la variedad de maíz (4). La descomposición térmica es la causa más importante de pérdida de nutrientes y compuestos bioactivos. A elevadas temperaturas los azúcares se descomponen a furfuralas (5). Los pasos intermedios de la reacción de Maillard incluyen la formación de compuestos fluorescentes y luego la aparición de pigmentos pardos. Algunos de estos pigmentos pueden actuar como agentes de entrecruzamiento entre cadenas de proteínas, disminuyendo el valor nutricional o afectando las propiedades organolépticas del alimento (6). Más aún, algunos posibles compuestos resultantes, tales como la acrilamida, son considerados potencialmente mutagénicos (2). Los productos fluorescentes de Maillard han sido estudiados en sistemas modelo como potenciales indicadores del daño de aminoácidos esenciales (3). Los furfuralas se consideran indicadores del tratamiento térmico y marcadores de cocción (7, 5). El 5-hidroximetilfurfural (HMF) es un producto de la descomposición de hexosas, principalmente cuando el pH es bajo (8), mientras el furfural (F) y el 5-metilfurfural (5MF) derivan principalmente de pentosas (9).

El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de la incorporación de ingredientes y del tiempo de tostado sobre el desarrollo de la reacción de Maillard y evaluar la estabilidad de los carotenoides en las distintas etapas del proceso de producción de copos de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Se trabajó con *grits* de maíz obtenidos de una empresa local. Se utilizó el mismo lote de material durante todo el estudio. Se determinó la composición centesimal de los *grits*, en base seca, mediante métodos estandarizados (AOAC), cuyos resultados fueron: carbohidratos $87\% \pm 1$, proteínas $8\% \pm 0,3$, lípidos $0,9\% \pm 0,05$, humedad $13\% \pm 0,1$ y cenizas $0,2\% \pm 0,02$.

El material se trató simulando las condiciones de procesamiento a nivel industrial. La primera etapa fue la cocción con vapor a presión durante 2,5 horas empleando seis formulaciones diferentes con sal, extracto de malta y sacarosa (Tabla 1) que se seleccionaron para analizar el efecto de los ingredientes por separado y en conjunto. La formulación A representó una típica formulación comercial (10) y la formulación B es la que utiliza una industria local. Con el objetivo de evaluar los ingredientes individualmente, en las formulaciones con un único ingrediente se mantuvieron las proporciones utilizadas en la fórmula A. En todos los casos se utilizaron 15 gramos de *grits*

crudos a los cuales se les incorporaron las proporciones mostradas en la Tabla 1. Luego de la cocción los *grits* se enfriaron durante 1 hora a temperatura ambiente y se hicieron pasar por una laminadora de mano giratoria semi-industrial (RD, modelo S-300-M, Argentina). Previo a la etapa de tostado, los *grits* laminados se equilibraron en una atmósfera de a_w 0,8, que corresponde a un contenido de agua cercano a 20% (en base seca). Este valor es cercano al que contienen estos productos a nivel industrial previo al tostado (11) y el valor de a_w coincide con la región donde el pardeamiento no enzimático ocurre a mayor velocidad (12). Las muestras se tostaron en un horno convectivo a 230 °C, con circulación forzada de aire. Se evaluaron 3 tiempos de tostado: 1,5, 2 y 2,5 minutos.

Tabla 1. Composición de las formulaciones: masa de cada ingrediente mezclada con 15 g de *grits* para la cocción a vapor

Nombre del sistema	Control (C)	Sal (S)	Malta (M)	Sacarosa (Sac)	Formulación comercial A	Formulación comercial B
Agua (g)	9	9	9	9	9	6
NaCl (g)		0,33			0,33	0,1
Malta (g)			0,33		0,33	0,001
Sacarosa (g)				1,23	1,23	1,23

Medición de fluorescencia y pigmentos pardos

El total de compuestos fluorescentes y pigmentos pardos que se extrajeron en medio acuoso se cuantificaron tras una hidrólisis con pronasa E (4 UE/mg muestra), de acuerdo con Delgado-Andrade y col. (13). Se midió la intensidad de emisión a 504 nm, con excitación a 340 nm. Se utilizó un espectrofluorómetro Ocean Optics modelo USB 2000 (Ocean Optics Inc., Florida, Estados Unidos). Se cuantificaron los compuestos fluorescentes en base a una curva de calibración con cuatro concentraciones de sulfato de quinina entre 0,05-1 µg/mL, y el resultado se expresó en equivalentes de quinina en base seca (µgQ/mg) (14). La formación de pigmentos pardos se evaluó midiendo la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Jasco modelo V630 (Jasco Corporation, Japón). Los valores de absorbancia fueron corregidos por dilución y normalizados a 125 mg de muestra seca (Abs₄₂₀). Se utilizó una expresión logarítmica para linealizar la relación con el tiempo.

Contenido de furfurales y furosina

Los distintos furfurales (HMF, furfural y 5-MF) fueron cuantificados mediante RP-HPLC en muestras hidrolizadas. Se utilizó un equipo Alliance HPLC equipado con detector de arreglo de diodos Waters 2995 (Waters, Milford, Estados Unidos). Las muestras fueron separadas en una columna C₁₈ Waters X-Bridge utilizando acetonitrilo al 5% a 0,1 mL/min y la absorbancia se monitoreó a 284 nm (5). Los tiempos de retención fueron 7,4 min para HMF, 8,8 min para furfural y 15,3 min para 5-MF. Se construyeron curvas de calibración para cada analito en el rango 0,1-2,5 ppm. El límite de cuantificación fue de 0,05 ppm para todos los componentes.

La determinación de furosina realizó mediante HPLC siguiendo el método descrito por Delgado-Andrade y col. (15). Brevemente, las muestras fueron hidrolizadas en HCL 7,95 M a 110°C en atmósfera de nitrógeno y luego tratadas con un cartucho Sep-pak C₁₈ (Millipore) para eliminar interferencias. Se utilizó una columna Extrasyl-ODS2 y se construyó curva de calibración en el rango entre 2,6 y 39 mg/L.

Medición de color

Se utilizó un sistema de visión computarizada, que consiste en una caja gris de luminancia 50 en escala Munsell. Con iluminación superior D65 (16). Las imágenes se tomaron con una cámara digital EOS 40D (Canon, Inc., Estados Unidos) localizada a un ángulo de 45° en relación al plano de la muestra y a una distancia de 60 cm. Las imágenes se obtuvieron con una resolución 3888 x 2592 píxeles que se analizaron utilizando el software Adobe PhotoShop CS4 y los parámetros de color se expresaron en espacio CIELAB (L^* , a^* y b^*) (CIE, 1976), según el procedimiento descrito por Yam y Papadakis (17). Las muestras se colocaron en cápsulas de plástico con 1,5 cm de altura, a la cual el sistema se comporta como opaco. Se tomaron 3 fotos de cada muestra, rotando 90° entre cada una y se informaron los resultados promedio.

Extracción, identificación y cuantificación de carotenoides

El análisis de los carotenoides se realizó con el objetivo de evaluar la estabilidad de los mismos durante las diferentes etapas del proceso de obtención de los copos de maíz. Por lo tanto, se trabajó con una única formulación (formulación B) y un tiempo de tostado de 1,5 minutos. Se analizaron muestras provenientes de las 5 etapas del proceso de producción: *grits* crudos, *grits* cocidos, *grits* secos, *grits* laminados y, finalmente, copos de maíz tostados. Para la extracción se siguió el método propuesto por Rodríguez-Amaya y Kimura (18). Brevemente, 3 mg de muestra rehidratada se extrajeron con acetona hasta remoción total color y se filtró por 0,45 µm. Se realizó un lavado con agua y secado con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el solvente. Se redisolvió en 2 mL de acetona:metanol (50:50) y los viales se sellaron bajo nitrógeno. Los resultados se expresaron en base seca. Los pigmentos se separaron en un HPLC Waters Alliance modelo 2576 con una columna de fase reversa C18 y un detector de arreglo de diodos monitoreando los espectros entre 420 a 460 nm. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min y la temperatura de la columna fue 25°C. Se eluyó utilizando un gradiente convexo desde 93% de metanol y 7% de agua que, tras 30 minutos, alcanzó el 100% de metanol hasta los 60 min. Se realizaron curvas de calibración para luteína, zeaxantina, β-criptoxantina y β-caroteno (Extrasynthese, Lyon Nord, Francia) en los siguientes rangos de concentraciones: entre 0,03 y 5 µg/mL ($R^2 = 0,989$), 0,06 y 3 µg/mL ($R^2 = 0,999$), 0,2 y 2 µg/mL ($R^2 = 0,984$) y 0,4 y 4 µg/mL ($R^2 = 0,987$), respectivamente. Los límites de detección y cuantificación fueron 0,05 y 0,15 ppm, respectivamente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para establecer las diferencias significativas se utilizó un ANOVA con test de Tukey post hoc. El software utilizado para tal fin fue el Infostat, versión 2012 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Para el análisis gráfico se utilizó el software GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (San Diego, California, Estados Unidos). Todas las extracciones y los ensayos se realizaron por duplicado y se informaron los resultados promedio de ambos valores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fluorescencia y pigmentos pardos

Los resultados obtenidos del desarrollo de pigmentos pardos $\ln(Abs_{420})$ y fluorescencia ($\mu\text{gQ}/\text{mg}$) para las muestras tratadas con pronasa a los diferentes tiempos de tostado se muestran en la Figura 1a y b, respectivamente. El análisis estadístico mostró interacción significativa entre el tiempo de tostado y la formulación. Si bien a 1,5 minutos los valores de $\ln(Abs_{420})$ no mostraron diferencias estadísticas entre las muestras, a 2 y 2,5 minutos los valores para las formulaciones A y B fueron significativamente mayores comparados con el resto de las muestras, con excepción de la formulación con malta a 2,5 minutos.

Previo al tostado las seis muestras laminadas no presentaron fluorescencia cuantificable. Con el tiempo de tostado a 1,5 minutos se observó un incremento inicial que se magnificó a mayores tiempos para las formulaciones control (C) y con sal (S). Las formulaciones con malta, sacarosa y las comerciales mostraron un rápido incremento inicial que luego tendieron a alcanzar un *plateau*. Este comportamiento es esperado por la función que cumplen como intermediarios de reacción (19) y ha sido descrito por Patton y Chism (20) quienes establecieron que la fluorescencia tiene un período de inducción seguido por un incremento en la concentración hasta alcanzar un máximo. En este estudio no se encontraron períodos *lag* para los diferentes sistemas, en concordancia con Morales y col. (19). Esto puede deberse a la elevada temperatura del proceso. La interacción entre el tiempo y la formulación no fue significativa. En particular para el caso del tiempo, se hallaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras tratadas a 1,5 minutos y a 2,5 minutos, donde los valores fueron mayores. Además, se encontraron diferencias significativas entre las formulaciones: las muestras control (C) y con sal (S) tuvieron los valores más bajos y estadísticamente diferentes respecto a los valores promedio para el resto de los sistemas evaluados con un $p < 0,05$.

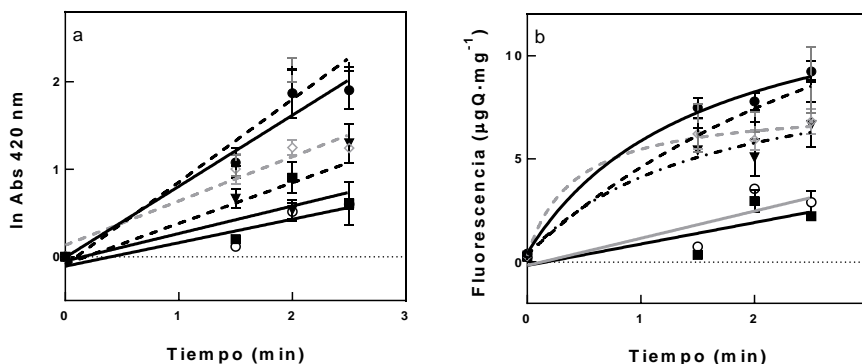


Figura 1. (a) $\ln(Abs_{420})$ y (b) fluorescencia ($\mu\text{gQ}/\text{mg}$) para los diferentes tiempos de tostado (1,5, 2 y 2,5 min). Los símbolos son los valores promedio para cada formulación: (—■—) control, (—○—) sal, (—●—) malta, (—◇—) sacarosa, (—●—) A y (—+—) B. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar. Las líneas representan el mejor ajuste matemático

Desarrollo de furfurales y producción de furosina

La Tabla 2 muestra los valores de las concentraciones de HMF obtenidas para todas las muestras a los diferentes tiempos de tostado. El contenido de HMF previo al tostado fue de 10 ppm para todas las formulaciones. El proceso de tostado produjo un incremento significativo en el contenido de HMF para las formulaciones A y B a 1,5 y 2 minutos. A 2,5 minutos sólo la formulación A mostró un aumento significativo de HMF. Se encontró que la interacción entre el tiempo de tostado y la formulación fue significativa. En cereales para desayuno extrudados a base de maíz, los valores de HMF oscilaron alrededor de 45 ppm en base seca, según Rufián-Henares y col. (2). Estos valores son comparables con los hallados en este estudio, para las formulaciones que sólo contenían sal, malta o sacarosa y hasta 1,5 minutos de tostado. Con el agregado de sacarosa a la formulación se observó una tendencia al incremento en los valores de HMF en comparación con los sistemas C, S y M que no pudo confirmarse estadísticamente. Es importante destacar que una diferencia

de 30 segundos en el primer intervalo de tostado produce un gran aumento en los niveles de HMF, indicando que este período es crítico y debe ser particularmente controlado. Las concentraciones de HMF aumentaron hasta 2500 ppm en las formulaciones A y B luego de 2,5 minutos de tostado. Estos valores son similares a los hallados por Ait-Ameur y col. (5), durante el horneado de modelos de galletitas. Se sabe que el contenido de a_w es un parámetro fundamental en la producción de HMF (21). Al ser un producto de deshidratación, el agua actúa como un inhibidor (5). Si bien el valor inicial de a_w de los laminados fue bastante alto (0,8), éste decrece rápidamente hasta 0,4-0,5 durante el tostado fundamentalmente durante los primeros 1,5 minutos (Tabla 2). Se han propuesto dos mecanismos para la formación de HMF a partir de sacarosa, uno por la vía de la reacción de Maillard a partir de glucosa o fructosa y aminoácidos luego de varios pasos (22) y el otro por degradación de sacarosa a glucosa y un catión fructofuranosil reactivo, que puede convertirse directamente a HMF (23). Con respecto a furfural, sólo las muestras con azúcar agregada presentaron valores por encima del límite de cuantificación a los 1,5 minutos. Para los 2 y 2,5 minutos no se encontraron diferencias significativas entre las formulaciones C, S, M y Sac (valores entre 0,65-27 ppm). Al igual que con HMF, las formulaciones A y B presentaron concentraciones de furfural significativamente mayores que el resto de los sistemas, en un rango comprendido entre 99 y 131 ppm, confirmando de esta manera el efecto sinérgico entre los ingredientes en la formación de furfurales. Las concentraciones de 5MF fueron muy pequeñas (entre 1,5 y 3 ppm) para todos los sistemas, sin correlación ni diferencias significativas con el tiempo de tostado ni la formulación. La furosina, no mostró cambios significativos con el tiempo de tostado ni se hallaron diferencias con respecto a las formulaciones. El sistema control presentó una concentración de 8,5 µg/100 g y el agregado de otros ingredientes no promovió la formación ulterior de este compuesto. Sorprendentemente las formulaciones comerciales mostraron los valores más bajos de furosina (6,1 y 2,3 µg/100 g, respectivamente) y valores de HMF por encima de 150 ppm. Estos resultados demuestran que la furosina es un buen marcador inicial de la reacción de Maillard pero no sufre grandes cambios durante el tostado, por lo tanto no es buen índice para esta etapa.

Tabla 2. Concentraciones de furfurales y furosina para las seis formulaciones evaluadas a los tres tiempos de tostado

Tiempo de tostado (min)	Sistema	Humedad (%)	HMF (ppm)	Furfural (ppm)	5-MF (ppm)	Furosina (µg/100g)
1,5	control	9,6 ^g ± 0,4	14 ^a ± 3	<0,02 ^a	2,0 ± 0,3	8,5 ^{ab} ± 4,95
	sal	8,4 ^{defg} ± 0,4	8,7 ^a ± 0,3	<0,02 ^a	1,8 ± 0,1	7,55 ^{ab} ± 1,63
	malta	7,7 ^{cde} ± 0,2	20 ^a ± 2	<0,02 ^a	2,6 ± 0,2	6,9 ^{ab} ± 0,42
	sacarosa	6,6 ^{abc} ± 0,5	53,9 ^a ± 0,9	7,1 ^a ± 0,1	2,47 ± 0,01	11 ^b ± 1,98
	A	8,0 ^{cdef} ± 0,1	396 ^a ± 13	27 ^a ± 1	1,8 ± 0,3	6,05 ^{ab} ± 3,61
	B	7,3 ^{bcde} ± 0,6	154 ^a ± 16	10 ^a ± 8	1,98 ± 0,09	2,25 ^a ± 0,49
2	control	8,6 ^{efg} ± 0,4	11 ^a ± 4	0,7 ^a ± 0,6	3,2 ± 0,2	4,5 ^{ab} ± 1,13
	sal	9,4 ^{fg} ± 0,6	22 ^a ± 3	1,7 ^a ± 0,3	2,8 ± 0,5	3,55 ^{ab} ± 0,92
	malta	8,3 ^{defg} ± 0,2	26 ^a ± 7	2,83 ^a ± 1,17	2,5 ± 0,1	1,55 ^a ± 0,35
	sacarosa	6,9 ^{abcd} ± 0,6	137 ^a ± 22	16 ^a ± 5	2,1 ± 0,4	3,85 ^{ab} ± 0,21
	A	6,5 ^{abc} ± 0,2	1797 ^b ± 71	99 ^b ± 7	1,5 ± 0,4	3,2 ^a ± 0,28
	B	7,0 ^{bcd} ± 0,4	2336 ^c ± 72	131 ^b ± 21	2,4 ± 0,2	2,1 ^a ± 0,42
2,5	control	8,4 ^{defg} ± 0,3	15 ^a ± 1	1,2 ^a ± 0,3	2,55 ± 0,04	2,6 ^a ± 0,28
	sal	7,8 ^{cde} ± 0,1	42 ^a ± 23	4 ^a ± 2	2,4 ± 0,4	3,2 ^a ± 0,57
	malta	7,5 ^{cde} ± 0,3	72 ^a ± 5	10 ^a ± 7	2,0 ± 0,3	2,35 ^a ± 0,07
	sacarosa	5,9 ^{ab} ± 0,6	114 ^a ± 9	14 ^a ± 1	2,3 ± 0,2	2,8 ^a ± 0,28
	A	5,5 ^a ± 0,6	2639 ^c ± 186	125 ^b ± 58	1,7 ± 0,6	6,05 ^{ab} ± 0,64
	B	7,4 ^{bcde} ± 0,2	2398 ^c ± 460	131 ^b ± 5	1,9 ± 0,7	4,35 ^{ab} ± 2,05

Las diferentes letras hacen referencia a las diferencias estadísticamente significativas entre la misma variable, para un $\alpha = 0,05$. Los valores de 5MF no mostraron diferencias significativas entre ellos

Modificaciones del contenido de carotenoides

Se identificaron 4 picos correspondientes a luteína, zeaxantina, β -criptoxantina y β -caroteno, Se obtuvo una buena resolución para todos los casos, con tiempos de retención de 17,5, 19, 28,9 y 38,8 minutos, respectivamente, La Figura 2a muestra el contenido de estos carotenoides en las muestras provenientes de las diferentes etapas del proceso de producción de copos de maíz, En los *grits* crudos se identificaron los 4 compuestos, donde la luteína y zeaxantina mostraron los valores más altos (0,96 y 0,78 ppm, respectivamente) en comparación al resto de las etapas, La cocción al vapor produjo un gran descenso de los carotenoides, con pérdida total de β -criptoxantina y β -caroteno, Por lo tanto, los únicos compuestos que pudieron cuantificarse en las etapas siguientes a la cocción fueron luteína y zeaxantina, Durante las etapas de secado y laminado, las concentraciones de luteína y zeaxantina se mantuvieron constantes, en niveles de 0,33 y 0,45 ppm, respectivamente, Es interesante destacar que, en la etapa de secado, a pesar de emplear temperaturas elevadas (120°C), no se hallaron grandes pérdidas, Esto puede deberse a la geometría esférica de los *grits* y a la elevada humedad resultante del proceso de cocción, que pudieron ayudar a proteger a los carotenoides que están por debajo de la superficie del *grit*, Además, algunos compuestos antioxidantes que se forman como resultado de la reacción de Maillard durante la cocción y el secado (3) pudieron haber protegido a estos compuestos de la degradación oxidativa durante el secado y laminado, y de allí la obtención de concentraciones constantes, Se ha demostrado que estos productos de la reacción de Maillard con capacidades antioxidantes están relacionados al desarrollo de fluorescencia (24), que fue discutida previamente, Finalmente, durante la etapa de tostado, que ocurre a 230°C se produce una degradación adicional de carotenoides, Al final de este proceso de producción, los copos de maíz mostraron concentraciones de 0,17 ppm de luteína y 0,2 ppm de zeaxantina,

Individualmente, durante la etapa de cocción la luteína fue más susceptible a isomerización y descomposición que la zeaxantina, tal como se muestra en los porcentajes de pérdida (Figura 2b): 60% para luteína y 40% para zeaxantina, Luego de etapa de tostado el total de pérdida fue de 80% para ambos compuestos, Las mayores pérdidas correspondieron a las etapas de cocción y tostado, de acuerdo a lo esperado, debido a la combinación de elevadas temperaturas y tiempo de proceso, En la última etapa, el porcentaje de pérdida de ambos compuestos es el mismo, mostrando que en el producto final ambos pigmentos sufren pérdidas similares.

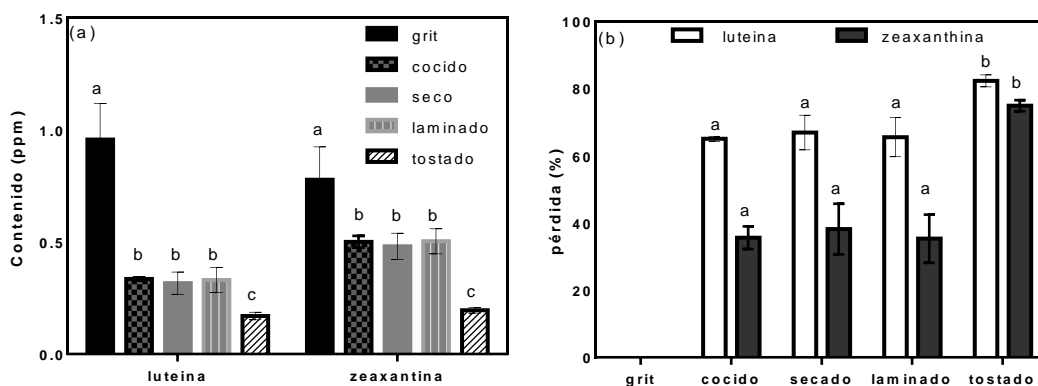


Figura 2. (a) Contenido individual de carotenoides y (b) porcentaje individual de pérdida de luteína y zeaxantina a través de los 5 pasos de producción de copos de maíz, Las concentraciones de β -criptoxantina y β -caroteno fueron menores a los límites de cuantificación, Las barras de error representan las desviaciones estándar, Las letras muestran diferencias estadísticamente significativas

Cambios de color

Las variables cromáticas L^* (luminosidad) y a^* (rojo) presentaron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre las diferentes formulaciones y tiempos de tostado, Los cambios en la coordenada cromática b^* (amarillo) fueron menos pronunciados y no mostraron correlación con el contenido de carotenoides, Esto se debe a que el desarrollo de pardeamiento modificó las variables de color drásticamente, enmascarando los cambios debidos a pérdida de pigmentos propios, En la Figura 3a el oscurecimiento de las muestras se representó a través de las diferencias en la luminosidad antes y después del proceso de tostado ($L_0^* - L^*$) vs, el tiempo de tostado, Las formulaciones Sac, A y B mostraron oscurecimiento significativo luego de 1,5 minutos mientras que los sistemas S y M lo hicieron tras 2,5 minutos, Las muestras comerciales, que contenían todos los ingredientes, mostraron el mayor oscurecimiento a 2,5 minutos, La Figura 3b muestra que los valores de a^* aumentaron significativamente con el tiempo de tostado y dependieron fuertemente de la formulación, mostrando una tendencia muy similar a la hallada para ($L_0^* - L^*$), Las coordenadas de color CIELAB ($L_0^* - L^*$ y a^*) aumentaron linealmente con el tiempo de tostado, indicando una cinética de reacción de orden cero, En general, fue posible observar visualmente que, para las

formulaciones conteniendo todos los ingredientes, los tiempos de tostado mayores a 1,5 minutos promovieron el pardeamiento, generando un color muy oscuro que puede ser inaceptable para el consumidor, Esto, además, puede relacionarse con el mayor contenido de HMF detectado en estos sistemas, Una correlación significativa (negativa) entre L^* y HMF fue previamente reportada por Kowalski y col. (25).

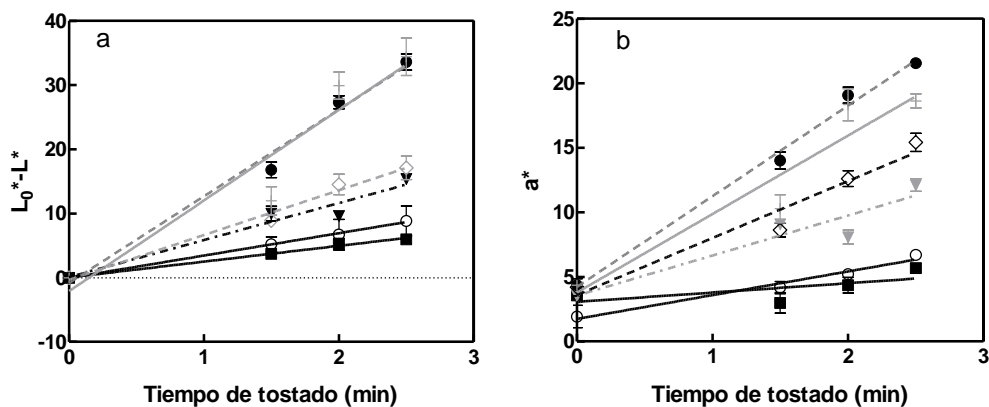


Figura 3. (a) $(L_0^*-L^*)$ y (b) a^* , en función del tiempo a los diferentes tiempos de tostado: 1,5, 2 y 2,5 minutos, Los símbolos para cada formulación son: (—■—) control, (---○---) sal, (---▼---) malta, (---◇---) sacarosa, (—●—) A y (---+---) B, Las líneas representan las curvas del modelo de mejor ajuste y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar

CONCLUSIONES

Los ingredientes combinados (sacarosa+sal+malta) tuvieron un efecto sinérgico, generando un aumento de los índices de reacción estudiados, La adición de pequeñas cantidades de sal, malta o sacarosa por separado no aceleraron el proceso de pardeamiento, siendo el efecto sinérgico de su combinación más importante que las diferencias en las cantidades incorporadas, La furosina fue un índice adecuado para el seguimiento de la reacción de Maillard durante la cocción, pero no así durante el tostado. El 80% del total de luteína y zeaxantina, dos de los carotenoides más importantes del maíz que se encuentran involucrados en la protección del tejido ocular, se perdió durante el proceso de producción de copos de maíz por laminación, principalmente en las etapas de cocción y tostado. La pérdida de pigmentos carotenoides fue muy importante indicando que no basta con utilizar materia prima con alto contenido inicial sino que el tipo y diseño del proceso y la protección de estos compuestos es determinante para su conservación. Las coordenadas de color L^* y a^* , que representan la luminosidad y el rojo, aumentaron linealmente durante el tostado, en concordancia con los índices de fluorescencia y absorbancia a 420 nm y con el oscurecimiento visual de las muestras, Sin embargo, la coordenada b^* , que es un índice de amarillo no correlacionó con la pérdida de carotenoides. Los resultados obtenidos permiten profundizar en el conocimiento de la influencia de la formulación utilizada durante la cocción y el efecto del tiempo de tostado sobre la formación de intermediarios de la reacción de Maillard como así también a seleccionar los mejores índices para el seguimiento de las reacciones, A su vez, esto puede ayudar a seleccionar las condiciones que mitiguen la pérdida de nutrientes y la generación de compuestos indeseables,

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer el apoyo financiero de Universidad de Buenos Aires (UBACYT X024, UBACYT 20020130100443BA), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP 100846), INTA PNAyAV 1130043, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 0928, PICT 2013-1331) y Red CYTED 415RT0495,

REFERENCIAS

1. Rada-Mendoza, M.; Sanz, M. L.; Olano, A.; Villamiel, M. (2004). Study on nonenzymatic browning in cookies, crackers and breakfast cereals by maltulose and furosine determination. *Food Chemistry* 85: 605–609.
2. Rufian-Henares, J.A.; Delgado-Andrade, C.; Morales, F.J. (2006). Analysis of heat-damage indices in breakfast cereals: Influence of composition. *Journal of Cereal Science* 43: 63-69.
3. Farroni, A.; Buera, M.P. (2012). Colour and surface fluorescence development and their relationship with Maillard reaction markers as influenced by structural changes during cornflakes production, *Food Chemistry* 135(3): 1685–1691.
4. Kimura, M.; Kobori, C.N.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Nestel, P. (2007). Screening and HPLC methods for carotenoids in sweet potato, cassava and maize for plant breeding trials. *Food Chemistry* 100(4): 1734–1746.

5. Ait-Ameur, L.; Trystram, G.; Birlouez-Aragon, I. (2006) Accumulation of 5-hydroxymethyl-2-furfural in cookies during the baking process: Validation of an extraction method. *Food Chemistry* 98(4): 790–796.
6. Agudelo Laverde, L.M.; Acevedo, N.C.; Schebor, C.; Buera, M.P. (2011). Integrated approach for interpreting browning rate dependence with relative humidity in dehydrated fruits. *LWT - Food Science and Technology* 44(4): 963–968.
7. Ramírez-Jiménez, A.; Garcia-Villanova, B.; Guerra-Hernandez, E. (2000). Hydroxymethylfurfural and methylfurfural content of selected bakery products. *Food Research International* 33: 833–838.
8. Xu, H.; Templeton, A.C.; Reed, R.A. (2003). Quantification of 5-HMF and dextrose in commercial aqueous dextrose solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2: 451–459.
9. Lendl, F.; Sevrin, T. (1978). Browning reactions on pentoses with amines, Studies on Maillard reaction XIII. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 176: 410–413.
10. Fast, R.B. (2000). Manufacturing technology of ready-to-eat cereals, In R. B. Fast & E. F. Caldwell, *Breakfast cereals and how they are made* (pp 17–54). St. Paul: AACC International, Inc.
11. Farroni, A.E.; Buera, M.P. (2014). Cornflake production process: state diagram and water mobility characteristics. *Food and Bioprocess Technology*, 7(10), 2902–2911.
12. Acevedo, N.C.; Briones, V.; Buera, M.P.; Aguilera, J.M. (2008). Microstructure affects the rate of chemical, physical and color changes during storage of dried apple discs. *Journal of Food Engineering* 85(2): 222–231.
13. Delgado-Andrade, C.; Rufian-Henares, J.A.; Morales, F.J. (2008). Optimized procedure to analyze Maillard reaction-associated fluorescence in cereal-based products. *Czech Journal of Food Science* 26(5): 339–346.
14. Matiacevich, S.B.; Buera, M.P. (2006). A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction. *Food Chemistry* 95(3): 423–430.
15. Delgado-Andrade, C.; Rufian-Henares, J.A.; Morales, F.J. (2007). Lysine availability is diminished in commercial fibre-enriched breakfast cereals. *Food Chemistry* 100(2): 725–731.
16. Lawless, H.T.; Heymann, H. (1998). *Sensory evaluation of food: principles and practices*. New York: Chapman & Hall.
17. Yam, K.L.; Papadakis, S.E. (2004). A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering* 61(1): 137–142.
18. Rodriguez-Amaya, D.; Kimura, M. (2004). *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*. HarvestPlus Tech. Monographs, 59.
19. Morales, F.J.; Romero, C.; Jiménez-Pérez, S. (1996). Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk-resembling systems. *Food Chemistry* 57(3), 423–428.
20. Patton, A.P.; Chism, P. (1952). Paper chromatography of browning reactions of fluorogens. *Nature* 167: 406–406.
21. Kroh, L.W. (1994). Caramelization in food and beverages. *Food Chemistry*. 4: 373–379.
22. Van Der Fels-Klerx, H. J.; Capuano, E.; Nguyen, H.T.; Atac Mogol, B.; Kocadağlı, T.; Goncuoğlu Tas, N.; Gokmen, V. (2014). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits: NaCl and temperature-time profile effects and kinetics. *Food Research International* 57: 210–217.
23. Locas, C.P.; Yaylayan, V.A. (2008). Isotope labeling studies on the 408 formation of 5-(Hydroxymethyl) -2-furaldehyde (HMF) from sucrose by pyrolysis-GCMS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6717–6723.
24. Morales, F.J.; Jiménez-Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry* 72: 119–125.
25. Kowalski, S.; Lukaszewicz, M.; Juszcak, L.; Kutyla-Kupidura, E.M. (2013). Dynamics of 5-hydroxymethyl-furfural formation in shortbreads during thermal processing. *Czech Journal of Food Sciences* 31(1): 33–42.

PROYECTO ESPECÍFICO

Estrategias para la diferenciación de alimentos y el desarrollo de nuevos productos alimentarios.

PROYECTO INTEGRADOR Optimización de calidad integral y otras estrategias de agregado de valor.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y TOXICIDAD DE EXTRACTOS NATURALES OBTENIDOS A PARTIR DE ESPECIES VEGETALES SILVESTRES

O.B. Micheloni¹, E. González¹, B. Leclercq¹, G. Rollandeli¹, L. Oackley¹, A.E. Farroni²

¹Departamento de Ciencias Básicas. Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires, Pergamino, Buenos Aires, Argentina.

²Laboratorio de Calidad de Alimentos, Suelos y Aguas, Estación Experimental Agropecuaria Pergamino (EEA Pergamino), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Avenida Frondizi (ruta 32) km 4,5, 2700, Pergamino, Buenos Aires, Argentina.

Correo electrónico: farroni.abel@inta.gob.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue caracterizar extractos acuosos de especies vegetales silvestres en base a su capacidad antioxidante, inhibición del pardeamiento enzimático y citotoxicidad para evaluar su utilización como aditivos en matrices alimentarias. Además se comparó el calentamiento convencional con el asistido por microondas para realizar los extractos. Se eligieron 16 especies vegetales que tienen o tuvieron alguna utilización como alimento. El material recolectado se clasificó botánicamente, se secó y se molió. Se realizaron extractos acuosos que luego se filtraron y se midieron polifenoles totales por Folin-Ciocalteu, capacidad captadora de radicales libres por DPPH, capacidad de inhibición de la polifenoloxidasas de manzana y toxicidad utilizando el test de *Artemia Salina*. El proceso de extracción asistido por microondas fue más eficiente en la extracción de polifenoles y sencillo de aplicar usando equipo estándar y de bajo costo. El estudio preliminar de toxicidad mostró valores muy bajos para la mayoría de las especies. *Solidago chilensis*, *Lantana camara* y *Eryngium horridum* mostraron alto contenido de polifenoles y alta actividad captadora de radicales libres. *Urtica urens* mostró efecto inhibitorio sobre la PPO de manzana junto a una LC50 muy alta. Las especies estudiadas resultaron prometedoras para la búsqueda de compuestos antioxidantes como aditivos alimentarios, el uso de especies comestibles es un buen punto de partida para la selección. Se requieren estudios más profundos sobre la composición de estos extractos para identificar los metabolitos responsables de las características observadas.

Palabras clave: Extractos, pardeamiento, polifenoloxidasas, citotoxicidad, antioxidantes

ABSTRACT

The objective of this work was to characterize aqueous extracts obtained from wild vegetable species evaluating polyphenol content, antioxidant capacity, inhibition of polyphenol oxidase and cytotoxicity. Normal heating versus microwave assisted heating was also compared. The intended use of the extracts is as food additives. Sixteen wild species were selected taking into account its former use as food by some populations. All plants were dried, classified systematically and milled. Aqueous extracts were filtered; total polyphenols were measured using Folin-Ciocalteu method, free radical scavenging capacity was measured using DPPH, inhibition of apple polyphenol oxidase was measured and cytotoxicity was assessed by brine shrimp assay. Microwave assisted extractions was more efficient in polyphenol recovery besides it is simple and uses a standard home device. Most of the species studied showed low cytotoxic levels. *Solidago chilensis*, *Lantana camara* y *Eryngium horridum* showed high polyphenol content and free radical scavenging activity. *Urtica urens* inhibited apple PPO and had very low toxicity. The species used in this work are interesting as source of antioxidant compounds to use in food additives, the fact they were used as food was a good starting point due to its low toxicity. Future work is required to get deeper insights in the compounds responsible of the biological activity observed.

Keywords: extracts, browning, polyphenoloxidase, cytotoxicity, antioxidants

INTRODUCCIÓN

Actualmente, muchas especies vegetales silvestres son utilizadas como alimentos (ensaladas, aderezos, sopas, cocciones, salsas y pickles) debido a su valor cultural y nutricional (1,2). Estas características las hacen interesantes como material de partida para la búsqueda de aditivos alimentarios. Estos tienen un nicho de aplicación importante en los alimentos mínimamente procesados debido a que los consumidores prefieren los aditivos naturales (3). En comparación con las especies cultivadas, las silvestres poseen la capacidad de generar mayor cantidad de metabolitos secundarios, lo cual las hace muy interesantes como fuente de nuevos compuestos (4). Los compuestos fenólicos naturales (fenoles, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y lignanos) tienen una amplia gama de propiedades fisiológicas y representan los metabolitos secundarios con mayor capacidad antioxidante en alimentos. Estos actúan a través de diferentes

maneras, pueden depurar radicales libres y también son capaces de inhibir la peroxidación lipídica (5,6). Además, podrían actuar como quelantes de iones metálicos que inducen la oxidación (7). Estos iones se encuentran presentes en el sitio activo de la polifenoloxidasas de ocurrencia natural, la cual interviene en las reacciones de oxidación como el pardeamiento enzimático (8).

Las especies vegetales seleccionadas en este trabajo han sido utilizadas desde antaño en medicina popular o como alimentos por diferentes culturas. Esta apreciación podría utilizarse para definir un criterio de atoxicidad. Sin embargo, dada la complejidad química de los extractos se hace necesario ampliar el estudio de sus posibles efectos tóxicos. En este contexto el ensayo de toxicidad en *Artemia salina* ha sido ampliamente utilizado por diferentes grupos de investigación para detectar actividad citotóxica de extractos naturales con potencial interés como aditivo alimentario (9).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar extractos acuosos de especies vegetales silvestres en base a su capacidad antioxidante, inhibición del pardeamiento enzimático y citotoxicidad para evaluar su utilización como aditivos en matrices alimentarias y comparar dos métodos de extracción, calentamiento tradicional a ebullición y asistido por microondas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los reactivos 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, catecol y butilhidroxitolueno (BHT) fueron adquiridos en Sigma- Bs. As. -Argentina, el ácido ascórbico, etanol y el carbonato de sodio fueron adquiridos en Cicarrelli-Rosario-Argentina, el reactivo de Folin-Ciocalteu y el ácido gálico fueron adquiridos en Biopack- Bs. As. – Argentina. La sal de mar (red Sea), los huevos de *Artemia salina* y levadura fueron adquiridas en Pergamino, Pcia. de Bs. As. Todas las drogas utilizadas fueron de calidad analítica.

Material vegetal

Se recolectaron 16 especies vegetales en Pergamino, provincia de Buenos Aires, Argentina. Para cada especie vegetal se recolectaron dos ejemplares. Además se confeccionó un voucher specimen, el cual fue depositado en el herbario de la Facultad de Ciencias Agrarias perteneciente a la Universidad Nacional de Rosario, ubicado en la localidad de Zavalla provincia de Santa Fe. Las especies recolectadas fueron: *Solanum sisymbriifolium* Lam. Var. *Sisymbriifolium* (SS), *Sida rhombifolia* L. (SR), *Oxalis articulata* (OA), *Lantana camara* L. (LC), *Commelina erecta* L. var. *erecta* (CE), *Matricaria recutita* L. (MR), *Xanthium spinosum* L. (XS), *Dipsacus fullonum* L. (DF), *Carduus acanthoides* L. (CA), *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguelen var. *parviflora* (SP), *Solidago chilensis* (SC), *Nicotiana longiflora* (NL), *Urtica urens* (UU), *Lolium multiflorum* (LM), *Eryngium horridum* (EH) y *Sphaeralcea bonariensis* (Cav.) Griseb (SB).

Preparación de extractos

El total del material vegetal recolectado (planta entera) se secó en estufa a 60 °C con circulación forzada y luego se molió en un molino tipo Wiley con malla de 2 mm y se mezcló de manera homogénea. Se utilizaron 1,5 g de material vegetal seco y pulverizado y 30 mL de H₂O destilada. Los extractos se obtuvieron por calentamiento directo (EE) (10 minutos a 100 °C) y utilizando microondas (EM) (10 minutos 90W). Los extractos fueron filtrados y liofilizados. Para cada extracto se realizó una extracción con metanol, las soluciones resultantes fueron filtradas y concentradas a presión reducida. El rendimiento de los extractos se calculó como porcentaje en peso del extracto seco obtenido respecto de la masa del material vegetal de partida.

Determinación de polifenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó utilizando la técnica de Folin-Ciocalteu y ácido gálico como estándar. A 2,4 mL de solución acuosa de extracto (0,83 mg/mL) se agregó 0,20 mL de reactivo de Folin. Luego de 5 minutos se agregó 2,4 mL de carbonato de sodio al 10%. La mezcla se mantuvo en la oscuridad durante 30 minutos y se registró la absorbancia a 760 nm usando un espectrofotómetro Lambda 25 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) (10). Para cada muestra se realizó un blanco sin el agregado de reactivo de Folin. El contenido de fenoles totales fue calculado realizando una curva de calibración con ácido gálico como estándar. Los resultados se expresaron como ppm de ácido gálico por g de extracto.

Determinación de actividad captadora de radicales libres

La capacidad captadora de radicales libres fue determinada de acuerdo al método reportado por Ghasemzadeh y col. (11) con algunas modificaciones. Brevemente, se utilizó una solución formada por 985 µL de solución de DPPH (3%) en etanol y 15 µL de extracto a una concentración de 70 µg/mL para todas las especies. Se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se registró la absorbancia a 518 nm. La actividad antirradicalaria (AA%) fue determinada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$AA\% = 100 - ((\text{Abs. Muestra} - \text{Abs. Blanco}) / \text{Abs Control} * 100)$$

Donde Abs. Muestra contenía 985 µL de DPPH 3% y 15 µL de extracto, Abs. Blanco contenía 15 µL de extracto y 985 µL de etanol y Abs Control contenía 15 µL de etanol y 985 µL de DPPH (3%). Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado y los resultados promediados.

Inhibición de polifenoloxidasas

La enzima PPO se extrajo a partir de manzanas de variedad *red delicious*. Partes iguales en peso de manzana y buffer fosfato 50 mM (pH 6,8) se homogeneizaron con una procesadora de alimentos durante 3 minutos en presencia de poli-PVP. El homogenizado se filtró

repetitivamente utilizando un paño de tela hasta obtener un líquido límpido. El líquido obtenido se centrifugó 20 minutos a 4 °C a una velocidad de 12000 x g. El sobrenadante se utilizó para el ensayo.

Para cuantificar el efecto inhibitorio de los extractos analizados se utilizó el índice de actividad enzimática relativa residual (REA) el cual representa la actividad residual de la enzima, luego de adicionar los distintos inhibidores, con respecto a la enzima sin inhibir (12). La mezcla de reacción conteniendo 100 uL de sobrenadante y 1900 uL de buffer, se incubó en presencia del posible inhibidor a 25 °C durante 5 minutos. Luego se disparó la reacción agregando 1 mL de catecol 0,2 M y se registró la absorbancia a 420 nm de forma continua durante 2 minutos a la misma temperatura. Se restó el color del extracto utilizando una mezcla de reacción en las mismas concentraciones pero sin el agregado de PPO.

Ensayo de letalidad de *Artemia salina*.

Para obtener las larvas de *Artemia salina* se agregaron 100 mg de huevos por cada litro de solución de sal de marina (3,8%) en agua bidestilada previamente oxigenada, los huevos se incubaron 48 h bajo luz artificial.

En tubos de ensayo se adicionaron 10 larvas y se completó a 5 mL con solución salina y a cada tubo de agregaron 40 uL de cada extracto redisoluto en agua de tal manera que la concentración final fue 600, 300, 150, 75, 33,5 y 12,25 ug/mL. Posteriormente se agregó a cada tubo una gota de levadura a 0,6 mg/mL. Como blanco se utilizó una solución de sal de marina sin el agregado de extracto y como control positivo una solución de dicromato. Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado. Los resultados obtenidos se procesaron en un ordenador transformando los porcentajes de mortalidad en PROBIT, los cuales se utilizaron para efectuar una regresión lineal que permitió calcular la LC50 de los extractos que se define como la concentración que mató el 50% de las larvas (13).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizó la prueba de t de Student para muestras apareadas para determinar las diferencias entre los métodos de extracción. Se utilizó el software InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de extracción

Se analizaron los rendimientos de extracción de los EE y EM. En términos generales las EE mostraron porcentajes de extracción mayores que los EM. Los EE de las especies *Carduus acanthoides*, *Dipsacus fullonum*, *Matricaria recutita*, *Xanthium spinosum*, *Lantana camara* y *Solidago chilensis* mostraron los mayores rendimientos con valores de 12,04%, 10,22%, 10,12%, 13,82%, 14,07% y 17,07 respectivamente, mientras que los EM de las especies *Matricaria recutita*, *Xanthium spinosum*, *Dipsacus fullonum* y *Solidago chilensis* mostraron valores de 10,58%, 10,59%, 9,13% y 14,87 respectivamente. Las especies *Matricaria recutita* y *Solidago chilensis* mostraron importantes rendimientos en ambos procesos extractivos. Los extractos de *Sida rhombifolia* y *Sphaeralcea bonariensis* tanto a ebullición como en microondas gelificaron luego del proceso de calentamiento, ambas especies pertenecen a la familia MALVACEAE. Por lo tanto, estas especies fueron desestimadas en las posteriores determinaciones.

Contenido de polifenoles y actividad antirradicalaria

En la Tabla 1 se muestra el contenido de polifenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico y la actividad antirradicalaria medida por captación de DPPH de los extractos acuosos realizados utilizando los dos tipos de calentamiento. El proceso utilizando microondas presentó un promedio mayor de polifenoles para las especies estudiadas ($p < 0.05$). Los compuestos fenólicos son considerados como los compuestos fitoquímicos de mayor actividad biológica (14). Giovanelli, G., & Buratti, S. (15), reportaron que las especies silvestres contiene entre dos y tres veces más polifenoles que las especies cultivadas. *Lantana camara*, *Solidago chilensis* y *Eryngium horridum* presentaron el mayor contenido de polifenoles para ambos tipos de extracciones. *Lantana camara* es utilizada como hierba medicinal en la medicina folklórica (16) y como alimento en otras regiones del planeta (17, 2). Se han reportado diferentes polifenoles de esta especie los cuales contienen en su estructura base una flavona y antraquinona (16). La infusión de *Solidago chilensis* posee usos medicinales (18) y se ha reportado actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (19). Además sus principales metabolitos secundarios son los aceites esenciales, diterpenoides y flavonoides, siendo la quercetrina el principal constituyente (20). Se ha reportado que las especies del género *Eryngium* contienen saponinas, flavonoides, aceite esencial, glucósidos monoterpénicos y ácidos fenólicos (21). Marčetić y col. (22) ha reportado el principal flavonoide es apigenina. Además, los extractos clorofórmicos de estas especies mostraron actividad antimicrobiana (23).

Tabla 1. Contenido de polifenoles totales para los extractos obtenidos por ebullición (EE) y microondas (EM) expresada como equivalente de ácido gálico en mg/g de extracto seco (media±DE).

Especie	polifenoles totales (EM)	polifenoles totales (EE)
<i>Oxalis articulata</i>	22,3±0,7	18,3±0,6
<i>Carduus acanthoides</i>	40±1	36±1
<i>Solanum sisimbriflorum</i>	39±1	33,9±0,9
<i>Setaria parviflora</i>	22,6±0,6	16,9±0,5
<i>Commelina erecta</i>	34±1	27±0,8
<i>Dispsacus fullonum</i>	37±1	27±0,9
<i>Matricaria recutita</i>	33±1	14,4±0,5
<i>Xantium spinosum</i>	53±2	30,1±0,9
<i>Lantiana camara</i>	120±4	70±2
<i>Solidago chilensis</i>	150±4	155±2
<i>Nicotiana longuiflora</i>	96±3	98±1
<i>Urtica urens</i>	27,1±0,7	52±1
<i>Lolium multiflorum</i>	42±1	39±2
<i>Eryngium horridum</i>	133±4	122±2
<i>Sida rhombifolia</i>	s/d	s/d
<i>Sphaeralcea bonariensis</i>	s/d	s/d

En la Tabla 2 se detallan los resultados de actividad antirradicalaria medida como porcentaje utilizando el ensayo de DPPH. Para esta propiedad no se encontró diferencia significativa entre los dos métodos de extracción. Las especies *Lantana camara*, *Carduus acanthoides*, *Solidago chilensis*, *Eryngium horridum* y *Commelina erecta* se destacaron de las demás por su alto valor de actividad antirradicalaria. Sin embargo los EE de la *Lantana camara*, *Eryngium horridum* y *Solidago chilensis* mostraron valores elevados de AA% (78.04, 67,00 y 49.00 %) respectivamente y los EM de *Solidago chilensis*, *Lantana camara*, *Eryngium horridum* y mostraron valores de AA% (98.00, 85,00 y 64.00 %) respectivamente. Por lo tanto no se puede mencionar cual proceso extractivo favoreció la actividad antirradicalaria.

Tabla 2. Actividad antirradicalaria para los extractos obtenidos por ebullición (EE) y microondas (EM) expresada como % de desaparición de DPPH para una concentración de extracto de 70 µg/mL (media±DE).

Especie	AA% (EM)	AA% (EE)
<i>Oxalis Articulata</i>	7,8±0,4	28±1
<i>Carduus acanthoides</i>	55±3	39±2
<i>Solanum sisimbriflorum</i>	4,6±0,2	19,8±0,9
<i>Setaria parviflora</i>	14,2±0,7	17,4±0,8
<i>Commelina erecta</i>	54±3	26±1
<i>Dispsacus fullonum</i>	27±1	33±2
<i>Matricaria recutita</i>	16,0±0,8	18,2±0,9
<i>Xantium spinosum</i>	21±1	37±2
<i>Lantiana camara</i>	85±4	78±4
<i>Solidago chilensis</i>	98±5	49±2
<i>Nicotiana longuiflora</i>	29±1	28±2
<i>Urtica urens</i>	1,40±0,07	4±0,3
<i>Lolium multiflorum</i>	8,6±0,4	7±1
<i>Eryngium horridum</i>	64±3	67±2
<i>Sida rhombifolia</i>	s/d	s/d
<i>Sphaeralcea bonariensis</i>	s/d	s/d

Además, para las especie más activas en cada proceso extractivo, se determinaron la concentración necesaria para producir la captación del 50% del radical DPPH a la concentración de trabajo (AA50%) (Tabla 3). *Solidago chilensis* (EM) y *Lantiana camara* (EE) mostraron una AA50% de 0,031y 0,030 mg/ml respectivamente. Como control positivo se utilizó BHT y ácido ascórbico siendo los valores de AA50% 1,53 mg/ml y 0,053 mg/ml respectivamente. Se ha reportado alto contenido de actividad antioxidante en infusiones y extractos hidroalcohólicos de *Solidago chilensis* y este efecto ha sido atribuido a la su alto contenido de flavonoides principalmente quercetina (24).

Tabla 3. Actividad antirradicalaria medida como la concentración necesaria para captar el 50% del DPPH para los extractos de *Lantiana cámara* y *Solidago chilensis* comparado con antioxidantes conocidos.

muestras	AA50% (mg/ml)
<i>Lantana camara</i> (EE)	0,030±0,003
<i>Solidago chilensis</i> (EM)	0.031±0.002
ácido ascórbico	0,053±0,004
BHT	1,53±0,06

El análisis de la relación entre el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante para todos los extractos se muestra en la Figura 1. Se observó una relación positiva a para EE ($R^2=0,6161$) fundamentalmente promovido por el extracto de *Lantana camara*, el cual presentó altos valores para polifenoles y para AA. Para EM el R^2 fue de 0,6778. Estas correlaciones pueden alejarse de la linealidad porque el método de Folin-Ciocalteu es específico para compuestos fenólicos, y la actividad antioxidante también puede ser exhibida por compuestos no fenólicos (25-26). La relación entre el contenido de fenoles y la capacidad captadora de radicales en ambos procesos de extracción sugiere que entre el 61,61% y 67,78 % de la actividad evaluada para las especies vegetales estudiadas resulta de la contribución de los compuestos fenólicos de ocurrencia natural.

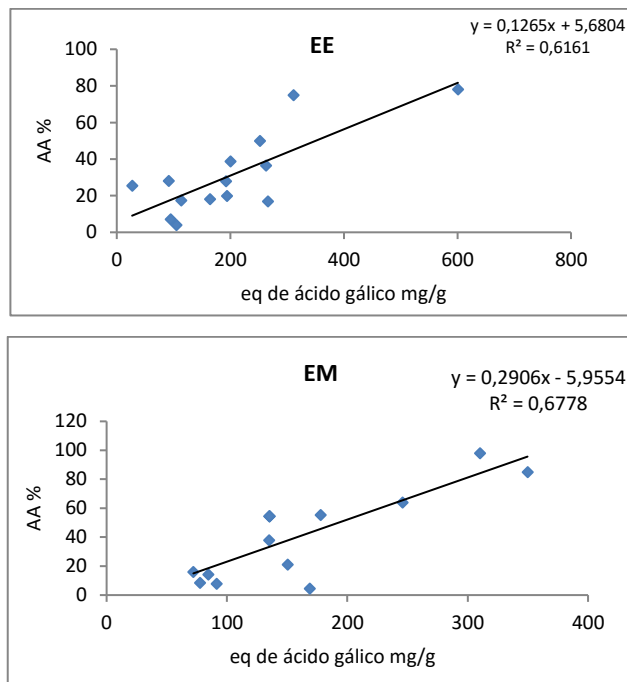


Figura 1. Relación entre la actividad antirradicalaria y el contenido de polifenoles para los extractos a ebullición (EE) obtenidos por calentamiento en microondas (EM)

Ensayo de inhibición de PPO

Solo *Urtica urens* y *Solidago chilensis* mostraron un efecto inhibitorio de la PPO de manzana con valores de REA de 31% y 85% respectivamente, a una concentración de 3,1 mg/ml. El extracto acuoso de *Urtica urens* mostró una menor cantidad de polifenoles y AA% comparado con *Solidago chilensis*. Desde este punto de vista podría pensarse que la capacidad inhibitoria de la PPO del extracto de *Urtica urens* está mediada por compuestos solubles en agua diferentes de los polifenoles, más aun teniendo en cuenta que para esta especie las extracciones con metanol o etanol rinden mayores cantidades de polifenoles que las acuosas (27). Para ahondar en este tema se necesitaría ampliar el estudio utilizando diferentes solventes de extracción.

Ensayo de letalidad de *Artemia salina*.

El ensayo de letalidad de *Artemia salina* es considerado como una herramienta útil para la evaluación preliminar de la toxicidad de extractos vegetales dado que se correlaciona razonablemente bien con la propiedad citotóxica (28) y con los test en animales de laboratorio como ratas o ratones (29). Se utilizó como control positivo una solución de dicromato el cual mostró una LC50 de 16,6 ug/mL, resultado similar al reportado por Molinas-Salinas y Said-Fernández (30) (12,6 µg/mL). A partir de los resultados obtenidos se realizó una clasificación según el criterio establecido por Sanabria-Galindo (31) el cual utiliza categorías de toxicidad que van de nula a alta Tabla 3.

Tabla 3. Valores de de LC50 en *Artemia salina* para los extractos acuosos estudiados

Especie	LC50 (µg/ml)	Toxicidad
<i>Carduus acantoides</i>	87	moderada
<i>Allium cepa</i>	120	moderada
<i>Allium sativum</i>	128	moderada
<i>Nicotiana longiflora</i>	209	moderada
<i>Solidago chilensis</i>	524	baja
<i>Lolium multiflorum</i>	758	baja
<i>Urtica urens</i>	3236	nula
<i>Oxalis articulata</i>	1011	nula
<i>Erygium horridum</i>	ND	nula

Debido a la dificultad de establecer un criterio de toxicidad con validez amplia se decidió realizar el mismo estudio con extractos de especies comestibles de manera de comparar los valores de LC50 con extractos que se consideran seguros. Los valores de LC50 obtenidos para ajo (*Allium cepa*) y cebolla (*Allium sativum*) fueron de 120,2 y 128,8 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Gyawali R., (32) reportó resultados en el mismo orden de magnitud para *Allium sativum* (172.48 $\mu\text{g/mL}$). En esta comparación solo *Carduus acanthoides* presentó una toxicidad mayor que un extracto acuoso de ajo o cebolla.

Solidago chilensis y *Eryngium horridum* mostraron la mayor cantidad de fenoles y presentaron baja y nula toxicidad. Otros estudios también han encontrado que las plantas con altos contenidos de polifenoles presentan baja toxicidad en comparación con otros metabolitos secundarios (33).

CONCLUSIONES

El estudio de especies silvestres locales se presenta como una alternativa interesante para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antioxidante.

El proceso de extracción asistido por microondas demostró ser más eficiente en la extracción de polifenoles y no se observó diferencia respecto de la actividad. La extracción utilizando calentamiento por microondas es muy sencilla de aplicar. El equipo de extracción utilizado fue de tipo estándar y de bajo costo y los extractos obtenidos fueron más fáciles de filtrar lo que lo hace una técnica interesante para obtener extractos naturales.

El estudio preliminar de toxicidad utilizando *Artemia salina* mostró valores muy bajos para la mayoría de las especies indicando que el uso de especies comestibles es un buen punto de partida para la selección.

Tres especies presentaron simultáneamente alto contenido de polifenoles y alta actividad captadora de radicales libres (*Solidago chilensis*, *Lantana camara* y *Eryngium horridum*). *Urtica urens* mostró efecto inhibitorio sobre la PPO de manzana junto a una LC₅₀ muy alta lo que lo hace prometedor como aditivo antipardecimiento y alienta futuras investigaciones.

Si bien se encontró que las especies que presentaron mayor contenido de polifenoles y mayor actividad antirradicalaria fueron las que mostraron menores LC50, la alta inhibición de la PPO de manzana por *Urtica urens* (clasificada como toxicidad nula) por un lado y la muy baja citotoxicidad de *Eryngium horridum* (alta AA% y contenido de polifenoles), por otro indican que no siempre la toxicidad y la bioactividad están acopladas. Se requieren estudios más profundos sobre la composición de estos extractos para identificar los metabolitos responsables de las características observadas.

REFERENCIAS

1. Mac Artain, P., Gill, C. I., Brooks M., Campbell R., Rowland I. R. (2007). Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition reviews* 65 (12): 535-543.
2. Rapoport, E., Marzocca, A., Drausal, B.S. (2009). Malezas comestibles del Cono Sur y otras partes del planeta. Editorial: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina
3. Jang, M.S., Sanada, A., Ushio, H., Tanaka, M., Ohshima, T. (2002). Inhibitory effects of 'enokitake' mushroom extracts on polyphenol oxidase and prevention of apple browning. *LWT-Food Science and Technology* 35: 697-702.
4. Schmeda-Hirschmann, G., Feresin, G., Tapia, A., Hilgert, N., Theoduloz, C. (2005). Proximate composition and free radical scavenging activity of edible fruits from the Argentinian Yungas. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85 (8): 1357-1364
5. Parr, A.J., Bolwell, G.P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(7): 985-1012.
6. Taviano, M.F., Marino, A., Trovato, A., Bellinghieri, V., Melchini, A., Dugo, P., De Pasquale, R. (2013). *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. "berries" from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food and chemical toxicology* 58: 22-29.
7. Han, H., Baik, B.K. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative changes during processing. *International journal of food science & technology* 43 (11): 1971-1978.
8. Mayer, A.M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry* 67 (21): 2318-2331.
9. Altunkaya, A., Hedegaard, R., Harholt, J., Brimer, L., Gökmen, V., Skibsted, L.H. (2013). Palatability and chemical safety of apple juice fortified with pomegranate peel extract. *Food and function* 4 (10): 1468-1473.
10. Blainski, A., Lopes, G.C., De Mello, J.C.P. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* 18(6): 6852-6865.
11. Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z., Rahmat, A. (2010). Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules* 15(6): 4324-4333.
12. Roldan, E., Sanchez-Moreno, C., de Ancos, B., Cano, M.P. Characterisation of onion *Allium cepa* (L.) by-products as food ingredients with antioxidant and antibrowning properties. (2008). *Food Chemistry*, 108: 907-916.
13. Finney, D. J. (1971). Probit analysis. Cambridge: Cambridge University Press.

14. Yang, J., Meyers, K.J., Vander Heide, J., Liu, R.H. (2004). Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6787–6793.
15. Giovanelli, G., Buratti, S. (2009). Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chemistry* 112(4): 903-908.
16. Ghisalberti, E.L. (2000). *Lantana camara* L. (verbenaceae). *Fitoterapia* 71(5): 467-486.
17. Bucciarelli, A., Minetti, A., Milczakowsky, C., Skliar, M. (2010). Evaluation of gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). *Pharmaceutical biology* 48 (9): 1025-1030.
18. Carpinella, M.C., Androne, D.G., Ruiz, G., Palacios, S.M. (2010). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts from Argentina. *Phytotherapy Research* 24 (2): 259-263.
19. Valverde-Soares, S.S., Azevedo-Silva, R.C., Tomassini, T.C.B. (2009). Utilização de CLAE, como paradigma na obtenção e controle do diterpenosolidagenona a partir de inflorescências de *Solidago chilensis* Meyen (arnica brasileira). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 90(3): 196.
20. Dalar, A., Türker, M., Zabarar, D., Konczak, I. (2014). Phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Eryngium bornmuelleri* leaf. *Plant foods for human nutrition* 69 (1): 30-36.
21. Marčetić, M.D., Petrović, S.D., Milenković, M.T., Niketić, M.S. (2014). Composition, antimicrobial and antioxidant activity of the extracts of *Eryngium palmatum* Pančić and Vis. (Apiaceae). *Central European Journal of Biology* 9(2): 149-155.
22. Erdem, S.A., Nabavi, S.F., Orhan, I.E., Daglia, M., Izadi, M., Nabavi, S.M. (2015). Blessings in disguise: a review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus *Eryngium*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23 (1): 53.
23. Roman Junior, W. A., Piato, A. L., Conterato, G. M., Wildner, S. M., Marcon, M., Mocelin, R & Santos, C. A. (2015). Hypolipidemic effects of *Solidago chilensis* hydroalcoholic extract and its major isolated constituent quercetin in cholesterol-fed rats. *Pharmaceutical biology* 53 (10): 1488-1495.
24. Mac Donald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(13): 2046-2056.
25. Asami, D.K., Hong, Y.J., Barrett, D.M., Mitchell, A.E. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(5): 1237-1241.
26. Maaroufi, L., Hossain, M.S., Tahri, W., Landoulsi, A. (2017). New insights of Nettle (*Urtica urens*): Antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Medicinal Plants Research* 11(4): 73-86.
27. dos Santos Júnior, H.M., Oliveira, D.F., de Carvalho, D.A., Pinto, J.M.A., Campos, V.A.C., Mourão, A.R.B., Costa-Lotufo, L.V. (2010). Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. *Journal of Natural Medicines* 64 (2): 231-238.
28. Naidu, J.R., Ismail, R., Sasidharan, S. (2014). Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of methanol extract of *Mentha Spicata* L (Lamiaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 13 (1): 101-107.
29. Molina-Salinas, G.M., Said-Fernández, S. (2006). A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacology on line* 3: 633-638.
30. Sanabria-Galindo, A., López S.I., Gualdrón, R. (1997). Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 26 (1): 15-19.
31. Gyawali, R. (2011). Comparative Study of Antibacterial and Cytotoxic Activity of Two Nepalese Medicinal Plants-*Allium wallichii* Kunth and *Allium sativum* L. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*, 2(5): 1539-1543.
32. James, O., Nnacheta, O.P., Ameh, O. (2008). Polyphenol contents, cytotoxicity and antioxidant activities of some selected Nigerian vegetable foods. *International Journal of Chemical Sciences*, 6: 1714-1725.

ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS DE ESTRÉS TÉRMICO (HSPS) COMO INDICADOR BIOQUÍMICO DE DAÑO POSCOSECHA EN MANDARINAS SATSUMA OKITSU

V. Ambrosi¹, F. Bello², M. Nanni^{1,3}, D. Vazquez², S. Guidi^{1,3}

¹Instituto de Tecnología de Alimentos. CIA. INTA. CC77B1708WAB, Morón, Bs. As., Argentina.

²Estación experimental Concordia. INTA. Estación Yuquerí Casilla de Correo 34, Concordia, Entre Ríos, Argentina.

³Facultad de Agronomía y Cs Agroalimentarias. Universidad de Morón. Cabildo 134, Morón, Bs. As., Argentina.

Correo electrónico: guidi.silvina@inta.gob.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión de las HSPs en mandarinas Satsuma Okitsu con diferentes índices de color (IC) a cosecha sometidos a tratamiento de desverdizado y posterior conservación frigorífica, como posible indicador bioquímico de alteraciones fisiológicas. Se cosecharon dos lotes de frutos (Entre Ríos) con índices de color de -12,8 y -9,6, ambos con grado de madurez adecuados para su consumo en fresco. Estos lotes fueron sometidos a tratamiento de desverdizado (1-3 ppm etileno, 72h a 21°C), seguido de descanso (21°C 72 hs, 95% HR) y posterior conservación (30 días a 5°C) y 7 días a 20°C simulando la etapa de comercialización. El análisis se realizó a través de la expresión dos familias de HSPs: 1) la familia de HSP de bajo peso molecular (sHSPs), y 2) la familia de HSP de 70 kDa (HSP70). Se extrajeron las proteínas del flavedo de los frutos utilizando fenol buffereado. Ochenta microgramos (80 µg) de proteínas totales fueron separadas mediante SDS-PAGE y posteriormente analizadas inmunológicamente mediante la técnica de Western blot. A nivel de Western blot, el anti-HSPC1 (sHSPs) inmunoreaccionó con tres bandas proteicas con peso molecular de aprox. 22- 23, 18 y 16 kDa, en ambos lotes de frutas analizados (IC: -12,8 y -9,6). Para el lote con IC -9,6, se observaron diferencias de nivel de expresión de las proteínas de 18 y 16 kDa entre el control y los 30 días de conservación frigorífica. Respecto al lote con IC -12,8, no hubo cambios en la expresión de estas dos proteínas. Por otra parte, el anticuerpo anti-HSP70 sólo inmunoreaccionó en las muestras pertenecientes al lote con menor índice de color (-12,8), dando una única banda de 70 kDa, tanto para la muestra control como para la de 30 días de conservación frigorífica. A partir de estos resultados preliminares podríamos inferir que la expresión diferencial de las HSPs podría ser herramienta para predecir posibles alteraciones fisiológicas que minimicen las pérdidas comerciales provocadas por manchas que pudieran ocasionar el desverdizado y su posterior conservación en frío.

Palabras clave: mandarina, HSPs, desverdizado, calidad

ABSTRACT

The aim of the present work was evaluate the expression of HSPs in Satsuma Okitsu mandarins in two batches of fruits with different color indexes (CI) at harvest, and subjected to degreening treatment and subsequent refrigeration conservation, as a possible biochemical indicator of physiological alterations. Two batches of fruits (Entre Ríos) were harvested with color indexes of -12.8 and -9.6, both with adequate degree of maturity for the external market. These batches were subjected to degreening treatment (1-3 ppm ethylene, 72h at 21 °C), followed by rest (72hs at 21 °C, 95% RH) and subsequent storage (30 days at 5 °C) and 7 days at 21 °C simulating the marketing stage. The analysis was carried out through the expression of two families of HSPs: 1) the family of HSPs of low molecular weight (sHSPs) and 2) the family of HSP of 70 kDa (HSP70). Proteins (flavedo) were extracted from fruits using buffered phenol. Eighty micrograms (80 µg) of total proteins were separated by SDS-PAGE and subsequently analyzed immunologically by the Western blot technique. At the Western blot level, the anti-HSPC1 (sHSPs) immunoreacted with three protein bands with molecular weight of approx. 22-23, 18 and 16 kDa, in both batches of fruits analyzed (CI: -12.8 and -9.6). For the batch with IC -9.6, differences in the expression level of the 18 and 16 kDa proteins were observed between the control and the 30 days of refrigerated storage. Regarding the batch with IC -12.8, there were no changes in the expression of these two proteins. On the other hand, the anti-HSP70 antibody only immunoreacted in the samples belonging to the batch with the lowest color index (-12.8), giving a single band of 70 kDa, both control and for the 30-day refrigerated conservation samples. From the results obtained we can conclude that the differential expression of the HSPs could be used as a tool to define the management of the fruit, minimizing the commercial losses caused by degreening and cold storage.

Keywords: mandarin, HSPs, degreening, quality.

INTRODUCCIÓN

A nivel nacional, los frutos cítricos representan el grupo de mayor importancia en volumen de producción. Se producen 2,8 millones de toneladas de frutas cítricas, ocupando el décimo lugar en la producción mundial (1). La citricultura en el NEA es una de las principales actividades económicas de la región. En Entre Ríos la superficie plantada es de casi 42.000 ha, estimándose que la superficie manejada

por un productor es de 15–16 ha. Las especies más plantadas son naranjas y mandarinas destinadas fundamentalmente al consumo en fresco tanto en el mercado interno como de exportación.

El manipuleo de cítricos en el empaque y posterior almacenamiento puede llevar a alteraciones fisiológicas, no siempre de clara identificación, que afecten su calidad como fruta fresca. La calidad de los cítricos es relevante para el consumidor al momento de decidir la compra, donde aspectos como el color, la textura y el sabor, son los que influyen a la hora de su elección.

Luego de la cosecha y durante el acondicionamiento y almacenamiento, los frutos frescos son susceptibles de sufrir alteraciones patológicas y fisiológicas, con las consiguientes pérdidas en cantidad y calidad. A modo de ejemplo se mencionan los daños asociados al desverdizado de variedades cítricas de maduración temprana. Esta técnica permite comercializar fruta en momentos óptimos de mercado, una fruta que si bien ha alcanzado su madurez interna pero cuya cáscara presenta colores pálidos, poco atractivos al consumidor (2). El desverdizado es una técnica poscosecha mediante la cual se acelera la degradación de los pigmentos de color verde (clorofila) de la cáscara de los frutos manifestándose la coloración proporcionada por los pigmentos carotenoides (naranja) cuya síntesis puede ser, a su vez, acelerada en el proceso (3, 4). En el proceso de desverdizado, se aplica etileno exógeno, sometiendo a los cítricos a condiciones de estrés que pueden llevar alteraciones fisiológicas. Concentraciones de etileno tan bajas como 1 ppm tienen un efecto constatable en el desverdizado, no aconsejándose sobrepasar las 10 ppm dado que mayores concentraciones no producen una mayor velocidad de desverdizado. Por el contrario ocasionan una aceleración de otros procesos metabólicos tales como la respiración, la desecación y caída de cálices, y los que conducen al ablandamiento de la piel (5).

La conservación frigorífica es considerada el método más efectivo para preservar la calidad en poscosecha de frutas, debido a que retarda el envejecimiento, disminuye la respiración, las podredumbres y los cambios metabólicos indeseables. Es por ello que esta técnica es cada vez más utilizada para alargar el período de comercialización de cada variedad y mantener la calidad durante el transporte a mercados distantes (6). En el NEA, la temperatura utilizada para la conservación de naranjas y mandarinas es de alrededor de 5°C (7). Si bien existen recomendaciones prácticas para reducir los daños asociados a los procesos de desverdizado y conservación frigorífica (momento de cosecha, temperatura, humedad relativa, concentración de gases, etc.), no se conocen los mecanismos moleculares y bioquímicos asociados a estas alteraciones que presentan los frutos.

Existen numerosos datos experimentales que sugieren que las proteínas de estrés térmico (HSPs) juegan un papel crucial en la protección de las plantas frente a diferentes situaciones de estrés. En los últimos años se han llevado a cabo investigaciones donde se las utiliza con fines prácticos. Dado que los cambios producidos a nivel bioquímico constituyen las primeras respuestas detectables frente a las fluctuaciones ambientales, la detección y/o cuantificación de las HSPs podrían ser utilizadas con fines de biomonitorio de las diferentes situaciones a la que las frutas están expuestas (8).

El objetivo del presente trabajo es generar conocimientos sobre los procesos bioquímicos asociados a la aplicación de los tratamientos poscosecha en frutos cítricos, lo cual permitirá tomar decisiones en cuanto a alternativas de manejo poscosecha de la fruta, y acceder a los mercados con productos finales de calidad óptima.

MATERIALES Y MÉTODOS

Frutos

Se utilizaron frutos de mandarinas Satsuma (*Citrus unshiu*, cv. 'Okitsu') provenientes de quintas de productores del departamento de Federación, Entre Ríos (2013). Las mandarinas fueron transportadas al laboratorio de poscosecha de la Estación Experimental Concordia del INTA, donde se seleccionaron y clasificaron frutos homogéneos y libres de daños superficiales. Se definieron dos lotes (1 y 2) que se diferenciaron en el índice de color inicial: -12,8 y -9,6 (Minolta, Sistema Hunter-Lab). Ambos lotes presentaban grado de madurez adecuados para su consumo en fresco (medido por el índice de madurez y porcentaje de jugo). Cada tratamiento consistió en cuatro réplicas de 30 frutos cada uno, de los cuales en tres réplicas se utilizaron para el recuento de alteraciones, pérdida de peso y color, mientras que la restante se destinó para determinar calidad interna. Al iniciar el ensayo se tomaron al azar 15 frutos por lote a los cuales se les determinó el índice de color y el peso. Cada lote de mandarinas fue sometido a tratamiento de desverdizado: fueron colocados en un ambiente con 1-3 ppm de etileno, $21 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y $90 \pm 1\%$ HR por un periodo de 72 horas. Seguidamente, se dejó descansar por un período similar sin la aplicación de etileno y manteniendo las demás condiciones constantes. Luego, las mandarinas fueron procesadas en una línea de empaque semicomercial. Las mandarinas fueron almacenadas 30 días en cámara de conservación con una temperatura de $5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y $90 \pm 1\%$ HR, y luego expuestas por 7 días a $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$, simulando las condiciones de comercialización (Figura 1).

Análisis de calidad

Se determinó el color por medio del Índice de Color $\text{IC} = 1000a/\text{Lb}$ (9), con colorímetro triestímulo Minolta modelo CR-300. Para cada fruto se realizaron dos determinaciones en su parte ecuatorial y en puntos equidistantes. La pérdida de peso fue determinada como porcentaje con respecto al peso inicial, se utilizó para ello una balanza Sartorius, modelo LC 1200S. La calidad interna de los frutos se evaluó sobre tres muestras de cinco frutos por tratamiento. El porcentaje de jugo se determinó mediante extracción manual del jugo de tres repeticiones de cinco frutos por cada réplica, como el cociente del volumen (ml) y el peso (g) expresándolo en forma porcentual. Los sólidos solubles se determinaron en el jugo obtenido de cada réplica, se utilizó un refractómetro digital Atago modelo PocketPAL-1, y se expresó como porcentaje de sólidos disueltos. La acidez se midió por titulación volumétrica del jugo obtenido de tres réplicas de cinco frutos. Se utilizó hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador y expresando el resultado como mg de ácido cítrico en 100ml de jugo. El índice de madurez se calculó como el cociente entre los sólidos solubles y la acidez.

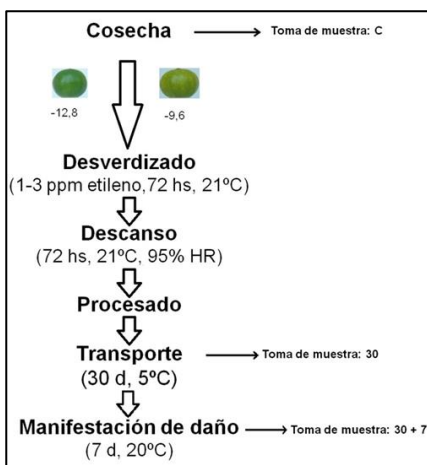


Figura 1. Esquema del tratamiento de desverdizado aplicado a ambos lotes de frutos de mandarina (IC de -12,8 y -9,6)

Extracción de proteínas

Las proteínas fueron extraídas a partir del pericarpio (cáscara coloreada) de los frutos, según el método de Hurkman y Tanaka (10), con algunas modificaciones. Previamente, el tejido vegetal fue pulverizado con nitrógeno líquido. Se tomó 1g de material vegetal al cual se le adicionó 2 ml de buffer de extracción para proteínas (BPE) y 5 ml de fenol saturado en 100mM de buffer Tris-HCl pH 8.0 conteniendo EDTA 1mM. El preparado se homogeneizó con equipo Ultraturax. El homogenato así obtenido, se dejó reposar en heladera durante 15 min, y posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 2314 x g durante 30 min a 4°C, en una centrifuga Sorvall RC3C. Se extrajo la fase fenólica, a la cual se le adicionó un volumen equivalente de buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 conteniendo EDTA 1mM. Se agitó y posteriormente la muestra se centrifugó durante 30 min a 2314 x g y 4°C. Se separó la fase fenólica y se le adicionó acetato de amonio 0.1 M en metanol, en relación 1:5. Las muestras se mantuvieron en freezer a -20°C durante toda la noche. Posteriormente, las proteínas fueron centrifugadas durante 30 min a 10000 x g en la centrifuga Sigma 3K30. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con acetato de amonio 0.1M en metanol, y posteriormente con acetona al 80%, centrifugándose cada vez (2 veces) a 12000 x g durante 1 min. El precipitado una vez seco, se resuspendió en 100 µl en buffer de corrida para electroforesis (BCE).

BPE: Tris-HCl 100mM pH 8,0, EDTA 1mM pH 8,0, PMSF (fluoruro de fenimetanosulfonilo) 1mM; **BCE:** Tris- HCl 0.625 M pH=6.8; 10 % (v/v) glicerol; 2% (p/v) SDS: 2 % (v/v) 2-mercaptoetanol y 0.02 (p/v) de azul de bromofenol.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de las proteínas fue determinada por el método de Lowry (11) utilizando como patrón una solución de seroalbúmina bovina (BSA) 0.2 mg/ml. La absorbancia de las muestras fue medida a una longitud de onda de 660 nm en un espectrofotómetro METROLAB 330.

Separación e identificación de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Las corridas electroforéticas fueron realizadas según la técnica de Laemmli (12) en geles de 0,75 mm de espesor. Se sembró 80 µg de proteínas en cada una de las calles de los geles. Las proteínas fueron separadas utilizando geles discontinuos; la concentración de poliacrilamida del gel separador fue del 12,5 %. Las corridas electroforéticas fueron realizadas con un equipo Mini Protean II (BIO-RAD®) a voltaje constante (130V) durante aproximadamente 1 h 30 min. Como estándar de peso molecular se utilizó para el SDS-PAGE el estándar de bajo peso molecular (PM) de BIO-RAD®, en el cual las proteínas estuvieron comprendidos en el rango de 14.4 - 97.4 kDa, mientras que para el western blot, se utilizó el estándar Prestained Protein Ladder (Thermo) con proteínas comprendidas entre 10 a 170kDa. Posteriormente, las bandas proteicas fueron teñidas con una solución al 0,2% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue R-250 en solución de acético/metanol/agua (v/v) (10/45/45).

Identificación de proteínas por métodos inmunológicos

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas durante 50 min a 100 V y 350 mA, a una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro: 45µm) utilizando el buffer de transferencia (BT) y el módulo de transferencia del Mini Protean II (BIO-RAD®). Una vez finalizada la transferencia, la membrana fue lavada durante 15 min con una solución Tris buffer salino (TBS) conteniendo Tween 20 (TBST), y posteriormente bloqueada durante 30 min a 20 °C con solución de bloqueo (SB). A continuación, la membrana fue incubada durante 90 min a TA con el anticuerpo primario: antisuero policlonal anti-HSP21, diluido 1:750 en TBST + leche en polvo descremada 2%; o con el anticuerpo monoclonal comercial anti-HSP70 (SIGMA®, catálogo # H5147, monoclonal anti-heat shock protein 70 clone BRM-22) diluido 1:1500 en TBST + 2% leche en polvo descremada. Luego del lavado durante 15 min con solución TBST, la membrana fue incubada durante otros 90 min a TA con el anticuerpo secundario [anti- IgG ratón para el caso de anti-HSP70, o anti- IgG conejo para el caso de anti-HSP21, obtenidos ambos en cabra y conjugados con fosfatasa alcalina (KPL) en una dilución 1:10000]. Luego de

tres lavados de 5 min cada uno con TBST, la membrana fue revelada con solución reveladora (SR) hasta visualización de las bandas (13). Las bandas obtenidas en los geles de poliacrilamida y en las membranas de nitrocelulosa fueron escaneadas con un Densitómetro GS-800 ImagingCalibratedDensitometer (BIO RAD®), y las imágenes así obtenidas fueron digitalizadas y procesadas posteriormente mediante el programa de análisis QuantityOne 1-D (BIO-RAD®), para determinar los PM y las cantidades relativas de las proteínas presentes en las bandas de interés.

BT: 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina, 20% metanol y 0.4% SDS; **TBS:** 25 mM Tris-HCl pH 7.4, NaCl 0,8%, KCl 0.02%; **TBST:** 0.05% (v/v) Tween 20 en TBS; **SB:** TBST conteniendo 2 % de leche en polvo descremada; **SR:** 0.4 mM Nitrobluetetrazoliumchloride (NBT) + 0.4 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfato (BCIP) en buffer de desarrollo (BD); **BD:** 100 mM Tris pH 9.5; 0.5 mM MgCl2

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1, se observan las variables de calidad iniciales, obtenidos para ambos lotes de frutas analizadas con diferente índice de color.

Tabla 1. Calidad interna de mandarinas en la cosecha

Parámetro analizado	Lote con fruta más verde	Lote con fruta menos verde
IC	-12.80	-9.60
Peso (g)	100.3	140.9
% Jugo	41.5	42.0
°Brix	9.80	9.10
Acidez	0.98	0.73
IM	10.0	12.4

En cuanto a las variables fisiológicas analizadas, en general no se vieron grandes diferencias. Lo más destacable fue que la fruta proveniente del lote más verde presentó mayores valores de acidez, y por ende un menor IM. Al cabo de 30 días de conservación, se observó que la fruta con menor índice de color (-12.8), presentaba frutas con manchas (Tabla 2), mientras que esta alteración no fue observada en la fruta más coloreada.

Tabla 2. Porcentaje de frutos con manchas

% de Fruta manchada	30 días de conservación	
	Lote con fruta más verde (-12.8)	Lote con fruta menos verde (-9.6)
	2.2	0

La figura 2 muestra el análisis electroforético de las muestras de mandarinas sometidos al tratamiento de desverdizado, para ambos lotes con diferente IC. En la fruta más verde (-12.8; izquierda de la imagen), se observa una banda proteica de alta densidad de 26-27 kDa y otras cuatro bandas de menor intensidad de PM aproximados de 52 kDa, 40 kDa, 31 kDa y 27.5 kDa, tanto en la cosecha (c), como durante la conservación frigorífica (30 y 30+7). Para cada banda proteica, no se observó diferencia de intensidad durante todo el período analizado. En la zona de bajo PM en esta figura también se observa una banda tenue de 21.7kDa solamente en las muestras proteicas correspondiente al tratamiento de desverdizado (30 y 30+7), no siendo detectable en la cosecha (c). Respecto de las proteínas de alto PM (70 kDa) no fue posible visualizar estas proteínas.

En el gel donde se sembró las muestras correspondientes a la fruta llamada menos verdes (-9.6, derecha de la imagen) se observa solamente en forma notoria la banda proteica de 26-27kDa de PM, en todos los períodos analizados (c, 30 y 30+7). En forma tenue se observa una banda proteica de 40 kDa, también en todos los períodos analizados (c, 30 y 30+7). Por su parte, no fue posible detectar las bandas de 52 kDa, 31 kDa y 27.5 kDa vistas en la fruta con menor índice de color. Tampoco se detectaron proteínas de alto PM (70 kDa).

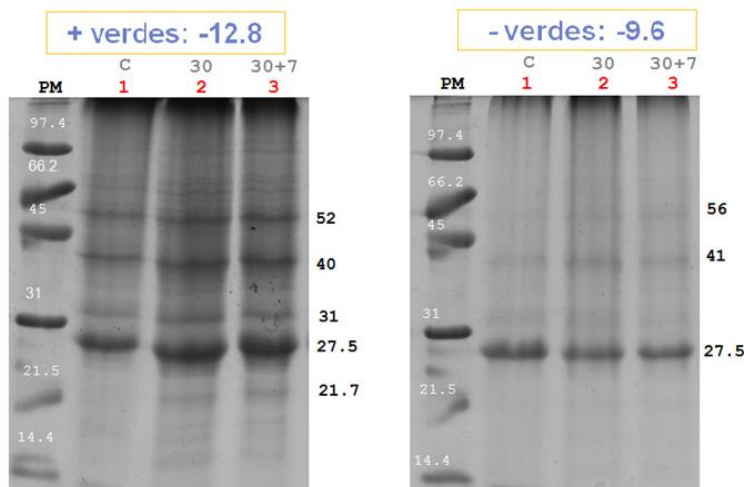


Figura 2. Análisis por SDS- PAGE de los extractos proteicos de mandarinas, sometidos al tratamiento de desverdizado. Los frutos fueron analizados en la cosecha (c), a los 30 días de conservación frigorífica (30) y luego de la simulación del período de comercialización (30+7), para ambos lotes con diferente IC

Con el propósito de corroborar los resultados obtenidos en cuanto a si las bandas proteicas corresponde o no a algún miembro de las HSPs, los extractos proteicos fueron posteriormente analizados por la técnica de Western blot (figura 3).

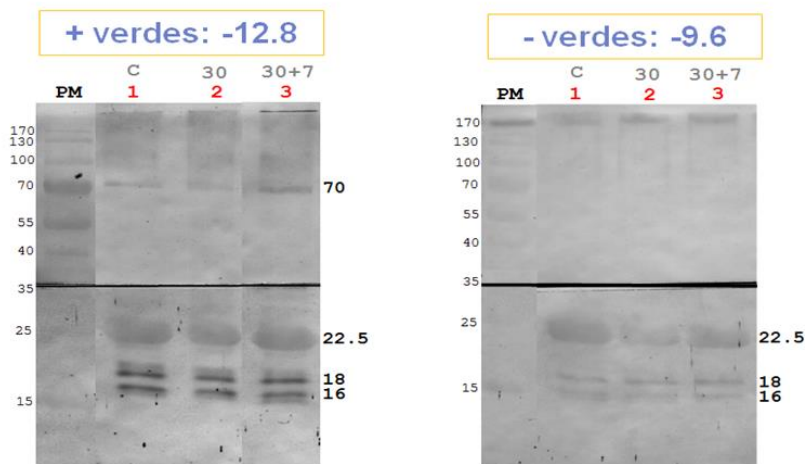


Figura 3. Análisis por *Western Blot* de los extractos proteicos de mandarinas, sometidos al tratamiento de desverdizado. Los frutos fueron analizados en la cosecha (c), a los 30 días de conservación frigorífica (30) y luego de la simulación del período de comercialización (30+7), para ambos lotes con diferente IC

La figura 3 muestra el análisis inmunológico de las muestras de mandarinas sometidos al tratamiento de desverdizado, para ambos lotes con diferente IC. Cada membrana fue dividida a la mitad. La parte superior muestra los resultados correspondientes al incubarla con el anticuerpo anti HSP70, mientras la mitad inferior corresponde al antisuero anti-HSPC1 (21 kDa).

En la fruta más verde (-12.8; izquierda de la imagen), puede observarse que el anticuerpo anti-HSP70 sólo inmunoreaccionó con una única banda proteica, estimada en 70 kDa por comparación con el patrón de referencia, tanto para la muestra control (c) como para las muestras conservadas durante 30 días, y su posterior exposición de 7 días a 20 °C (30 y 30+7). Estos resultados permiten deducir que la banda proteica corresponde a un miembro de la familia de las HSP70 (estimado por el PM y reacción con el anti-HSP70 monoclonal). Por su parte, el anti-HSPC1 inmunoreaccionó con tres bandas proteicas de PM 22-23kDa, 18 kDa y 16 kDa. La evaluación

semicuantitativa por densitometría óptica de la intensidad de las bandas permitió establecer que las intensidades de dichas bandas fueron similares durante todo el período analizado (dato no mostrado).

Respecto de la fruta menos verde (-9.6; imagen de la derecha), el anticuerpo anti-HSP70 no pudo detectar la banda correspondiente; y respecto del anticuerpo de bajo PM, éste inmunoreaccionó también con las mismas proteínas que en la fruta más verde (22-23, 18 y 16 kDa, respectivamente) tanto en el control como durante la conservación frigorífica (30 y 30+7).

El estudio del perfil proteico de los extractos de los frutos sometidos a diferentes tratamientos es considerado de gran importancia, ya que suministra información acerca de los posibles cambios bioquímicos inducidos por la aplicación de los mismos y permite de esta manera, establecer el mecanismo asociado al efecto ejercido por el tratamiento.

El análisis por SDS PAGE y Western blot permitió detectar proteínas cuyos PM estuvieron comprendidas en el rango de los 21-30 kDa. Es importante destacar que en ambos lotes de frutas, ya sea en la cosecha como durante la conservación, se detectó una banda de intensidad significativa de 23-27 kDa, sugiriendo esta situación que podría corresponder a una proteína que se está expresando en forma conservativa. Asimismo, las bandas de 16 y 18 kDa también corresponderían a miembros de la familia de las sHSPs. Según Vierling (14) en vegetales las proteínas de bajo PM (sHSPs) serían las más importantes desde el punto de vista funcional, actuando como chaperonas moleculares. Estas proteínas tendrían precisamente la función de proteger a los frutos preservando, por un lado, estructuras específicas como las membranas y por otro lado, la función de proteínas específicas (15). Es sabido que estas proteínas son sintetizadas en respuesta a un amplio rango de situaciones, como el frío, UV, baja concentración de oxígeno, contaminantes químicos, salinidad, daño mecánico etc. (16, 17).

En cuanto a las HSP70, se detectó una única banda proteica en la fruta con el menor índice de color, tanto en la cosecha como durante la conservación frigorífica. Estos resultados estarían sugiriendo que se trataría de proteínas que se están expresando en forma constitutiva. Se sabe que los miembros de esta familia pueden expresarse tanto en forma constitutiva (llamadas HSC70) como en forma inducible (HSP70) (18). Las Hsp70, en casi todos los organismos, funcionan también como chaperonas, previniendo la agregación, y asistiendo en el plegamiento y desplegamiento de proteínas para prevenir su acumulación como agregados, y pliegues de forma adecuada durante su transferencia a su ubicación final (19).

CONCLUSIONES

Los ensayos realizados en este trabajo indican que las condiciones a las cuales se someten la fruta durante el proceso de desverdizado y almacenamiento, puede alterar significativamente la calidad de los frutos. También debe tenerse en cuenta el grado de coloración de la fruta al momento de la cosecha, cuando se la somete a un tratamiento de desverdizado. En este trabajo pudo observarse que los frutos, si bien presentaban condiciones de madurez adecuadas al momento de la cosecha salvo un IC más verde, luego de ser desverdizados manifestaron daño superficial más o menos extenso de color pardo oscuro. Este daño pudo detectarse a los 30 días de conservación con un recuento del 2%. Coincidentemente, en este lote (IC = -12.8) pudo identificarse la expresión de una banda proteica de 70kDa, tanto en la cosecha como luego de 30 días de conservación frigorífica, y aún en mayor medida, en las muestras que representaban el período de comercialización (30 + 7días). A partir de los resultados obtenidos del estudio y caracterización de ambas familias de HSPs en muestras de frutos de mandarinas evaluados en poscosecha, se podría inferir que la expresión diferencial de estas proteínas podría ser utilizada como una herramienta para definir el manejo posterior de la fruta, minimizando las pérdidas comerciales provocadas por manchas que pudieran ocasionar el desverdizado y la conservación en frío, con menor pérdida comercial por parte de los productores de frutas de la zona.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece los aportes realizados por el Proyecto Específico No. 1130043 “Estrategias para la Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios” PNAIyAV-INTA, para realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

1. FEDERCITRUS: La actividad cítrica argentina. (2014). p17. www.federcitrus.org [14/08/14].
2. Meier, G.; Cocco, M.; Vázquez, D. (2008). Desverdizado de frutos cítricos. Experiencias en naranjas y mandarinas. Serie de Extensión N°3. Ediciones INTA, p. 26.
3. Jiménez Cuesta, M.; Cuquerella, J.; Martínez Jávega, J.M. (1983). Teoría y práctica de la desverdización de cítricos. Hoja Técnica INIA N° 46, p. 22.
4. Agustí, M. (2000). Citricultura. Ediciones Mundi Prensa, p. 416.
5. Cuquerella, J.; Navarro, P.; Salvador, A. (1999). Respuesta a la desverdización de nuevas variedades de cítricos. Levante Agrícola Especial Postcosecha N° 348, 263-271.
6. Manual Poscosecha de cítricos (2015). Coordinadores: D. Vázquez, G. Torres Leal, A. Yommi, R. Murray. ISBN N° 978-987-521-620-4. Ediciones INTA., 72 p
7. Vázquez, D.; Meier, G.; Cocco, M. (2005). Evaluación de la combinación de alternativas a fungicidas tradicionales en postcosecha de cítricos. En: Libro de Resúmenes XXII Congreso Latinoamericano y XXVIII Congreso Argentino de Horticultura. Gral. Roca, Río Negro. p. 128.
8. Bierkens, J.G.E.A. (2000). Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. Toxicology, 135: 61-72.

9. Jiménez Cuesta, M.; Cuquerella, J.; Martínez Jávega, J.M. (1981). Determination of a color index for citrus fruit degreening. En: Proc. Int. Soc. Citriculture, Tokio, Japón. 2:750-752.
10. Hurkman, W.; Tanaka, C. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.*, 81: 802-806.
11. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
12. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-684.
13. Stott, D.I. (1989). Immunoblotting and dot blotting. *J. Immunol. Methods*, 119 (2): 153-187.
14. Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. and Plant Mol. Biol.*, 42: 579-620.
15. Brodl, M.R. (1989). Regulation of the synthesis of the normal cellular proteins during heat shock. *PhysiologiaPlantarum*, 75: 439-443. 1989
16. Hamilton III, E.W., Coleman, J.S. (2001). Heat-shock proteins are induced in unstressed leaves of *Nicotiana attenuata* (Solanaceae) when distant leaves are stressed. *Am. J. Bot.*, 88(5): 950-955.
17. Polenta, G.A. (2005). Tesis Doctoral. Aspectos fisiológicos y bioquímicos del uso de tratamientos de estrés para mejorar la conservación de frutas. FFyB, UBA.
18. Ritenour, M.; Kochhar, S.; Schrade, L.; Tsui-Ping, H., Ku, M. (2001). Characterization of heat shock expression in apple peel under field and laboratory condition. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 126(5): 564-570.
19. Sung, D.Y.; Vierling, E.; Guy, C.L. (2001). Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* HSP70 gene family. *Plant Physiology*, 126: 789-800.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SENSORIAL DEL MÚSCULO *SEMITENDINOSUS* COCIDO *SOUS VIDE* DE VACAS ALIMENTADAS A DISTINTAS DIETAS Y TRATADAS CON TANINOS

V. Urbani¹, A. Biolatto¹, F. Carduza², C. Maitia², C. Sanow²

¹Estación Experimental Agropecuaria Concepción del Uruguay, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Ruta 39 km 143.5, (3260) Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina.

²Instituto Tecnología de Alimentos, Centro de Investigación de Agroindustria, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA, CC 77 (B1708WAB), Morón, Buenos Aires, Argentina.

Correo electrónico: urbani.valeria@inta.gob.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación con taninos en diferentes dietas bases sobre los atributos sensoriales del músculo *Semitendinosus*, de vacas de refugio, procesado mediante tecnología de cocción *sous vide* y conservado durante 21 días a $2 \pm 0,5$ °C. Se analizaron un total de 48 muestras del músculo *Semitendinosus*, provenientes de vacas de refugio de raza Hereford. Se realizaron dos ensayos: 24 animales fueron alimentados a campo natural y los 24 restantes fueron alimentados a silo sorgo. En cada uno, los animales se asignaron aleatoriamente a dos tratamientos: T1, dieta base con suplementación energética/proteica con agregado de taninos de quebracho colorado (*Schinopsis balansae*) y T2, dieta base con suplementación energética/proteica sin agregado de taninos. Luego que los animales alcanzaron una condición corporal igual o mayor a 6 puntos y un espesor de grasa dorsal igual o mayor a 6 mm, se faenaron y se obtuvieron las muestras de carne del músculo *Semitendinosus* las cuales se envasaron al vacío y se almacenaron a -18°C hasta su procesamiento. Los músculos se sometieron al proceso de cocción-pasteurización *sous vide* en autoclave con cesto estático. La cocción se finalizó cuando se alcanzó los 70 °C - 2 min en el centro geométrico del músculo. Posteriormente, los mismos se conservaron a $2 \pm 0,5$ °C durante 21 días y a intervalos de 7 días se tomaron piezas y se almacenaron a -18°C para su posterior análisis sensorial. El ensayo sensorial se realizó mediante un panel de 8 jueces entrenados utilizando una escala no estructurada de 10 cm para evaluar los atributos flavor, sabores extraños, olor, olores extraños, terneza inicial y sostenida, jugosidad y cantidad de tejido conectivo. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA. En los casos en lo que se hallaron diferencias significativas se aplicó el test de comparación de medias de Duncan. En el ensayo a campo natural los resultados obtenidos mostraron que la suplementación y el tiempo de almacenamiento no provocaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los atributos evaluados. En el ensayo a feedlot los resultados indican que la terneza es afectada por los distintos tratamientos (exceptuando las muestras del tiempo 14). En ambos ensayos no se encontraron diferencias en el resto de los atributos evaluados y la aparición de sabores y olores extraños puede enmascarar alguna variación en los atributos evaluados. Acorde a los resultados obtenidos se puede concluir que la adición de taninos no provocó cambios apreciables en los atributos sensoriales de las muestras estudiadas a campo natural no así en el ensayo a base de granos que se encontraron algunas influencias anteriormente mencionadas.

Palabras Clave: vaca de refugio, taninos, *sous vide*.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of feeding system and of supplementation of tannins on the sensory attributes in the *Semitendinosus* muscle of cull cow processed by *sous vide* cooking technology and preserved for 21 days at 2 ± 0.5 °C. A total of 48 samples of semitendinosus muscle, from Hereford breed cows, were analyzed. Twenty four animals were fed to herbage diet and the remaining 24 came from animals fed concentrate. They were randomly assigned to two treatments, T1: base diet with energy / protein supplementation without addition of tannin and T2: base diet with energy / protein supplementation with addition of tannins from quebracho (*Schinopsis balansae*). The meat samples obtained from *semitendinosus* muscle were subjected to the process of cooking-pasteurization *sous vide* in an autoclave with a static basket. The cooking was completed when it reached 70 °C - 2 min in the geometric center of the muscle. Subsequently, they were kept at 2 ± 0.5 °C for 21 days and at intervals of 7 days pieces were taken and stored at -18 °C for their subsequent sensory analysis. The evaluation sensory it was done through 8 trained judges. and it was used an unstructured scale of 10 cm to evaluate the flavor attributes, strange flavors, odor, strange smells, initial and sustained tenderness, juiciness and amount of connective tissue. The results were analyzed statistically by ANOVA. In the cases in which significant differences were found, Duncan's means comparison test was applied. In the herbage diet test, the results obtained showed that supplementation and storage time did not cause significant differences ($p > 0.05$) in any of the evaluated attributes. In the test to concentrate the results showed that the tenderness is affected by the different treatments. However, in both trials, no differences were found in the rest of the attributes evaluated and the appearance of foreign tastes and smells may mask some variation in the evaluated attributes.

Keywords: cull cow, tannins, *sous vide*.

INTRODUCCIÓN

La calidad de un alimento se define a través del conjunto de caracteres que el mismo debe reunir. Tales caracteres consideran, por un lado, las necesidades de los consumidores: inocuos, nutritivos, agradables, de precio adecuado. Por otro, aspectos vinculados a la presentación y a la preparación que requiere su consumo, cuidado del medio ambiente y ética de la producción (protección animal). Los cambios sociales que se producen en forma continua en el mundo también tienen injerencia sobre las características de los alimentos. Por ejemplo, han influenciado sobre la concepción que se tiene de los mismos, incrementándose la preferencia de los consumidores hacia comidas preparadas. En este punto, y en el caso particular de la carne, el procesamiento térmico es una de las herramientas prioritarias. Sin embargo, se debe considerar que el mismo debe ser tal que a la vez de lograr la inocuidad y los caracteres sensoriales deseados, permita mantener el nivel nutricional que aportan las materias primas (1). Asimismo, el desafío de la industria cárnica es relevar cuál es la calidad esperada por el consumidor y contar con la tecnología adecuada para plasmarla en un producto alimenticio. Es importante destacar que, disponer de una tecnología, no solo implica contar con los medios técnicos, sino también de las condiciones sanitarias, regulatorias, financieras, etc. que hagan viable su aplicación comercial. Con diferentes grados de avance, existen tecnologías emergentes de proceso que han sido desarrolladas con el fin de lograr productos inocuos preservando atributos de calidad de relevancia para el consumidor (2).

En las dos últimas décadas, las tecnologías de cocción-refrigeración (*cook chill*) tuvieron importantes modificaciones y mejoras, particularmente a través de la cocción -pasteurización bajo vacío en bolsas o bandejas plásticas (3). Este sistema es conocido como proceso o tecnología *sous vide*, de acuerdo a su origen francés (4). También se lo conoce con otros nombres, como cocción en bolsa, pero estos términos son poco precisos ya que han sido usados para otros procesos como cocción de un producto y luego envasado al vacío, o para alimentos que sólo se envasaron al vacío. Con el objetivo de aclarar este punto, el *Sous Vide Advisory Committee (SVAC)* del Reino Unido ha definido al proceso como sigue: “*sous vide* es un sistema en el que los alimentos crudos o parcialmente cocidos son envasados al vacío dentro de una bolsa o recipiente de laminado plástico, cocidos-pasteurizados en un sistema de cocción controlado, enfriados en forma rápida y finalmente almacenados a temperaturas de refrigeración, particularmente entre 0 -3°C” (SVAC, 1991).

Las investigaciones de Vaudagna y col. (5) indican que la tecnología *sous vide* constituye uno de los esfuerzos en el desarrollo de sistemas de cocción, el cual fue utilizado por las empresas de *foodservices* (cadenas de hoteles, restaurantes, hospitales, medios de transporte, etc.) para industrializar la producción de comidas. Permite racionalizar el trabajo evitando fluctuaciones típicas del oficio, separar en tiempo y espacio las etapas de preparación-cocción de comidas y consumo, a través del denominado *time buffer*, período en el cual el alimento es preservado en forma segura luego de la cocción -pasteurización, usualmente por refrigeración, para posteriormente ser calentado y servido para su consumo. En el sistema *sous vide*, el envase plástico retiene físicamente los componentes del flavor del alimento, los nutrientes y la humedad del mismo, permitiendo obtener productos de mayor calidad organoléptica y nutricional que las formas convencionales de cocción. Asimismo, ofrece también la posibilidad de extender la vida útil del producto y preservar sus propiedades nutricionales debido a que inhibe o minimiza el crecimiento de microorganismos alteradores y retarda los procesos bioquímicos de deterioro que requieren oxígeno, particularmente la oxidación de lípidos y proteínas. Este último aspecto es de gran importancia en la vida útil de carnes cocidas, debido a que normalmente, esta es limitada por el desarrollo de sabores indeseables (denominado sabor a recalentado o *warmed-over-flavour*, WOF) vinculados con el desarrollo de la oxidación de lípidos. La tecnología *sous vide* consiste en la aplicación de un tratamiento de cocción-pasteurización controlada a alimentos crudos o parcialmente cocidos envasados al vacío en envases herméticamente sellados, enfriados en forma rápida y finalmente almacenados a temperaturas de refrigeración, entre 0-3°C. En este proceso, la pérdida de agua y los componentes se reducen, preservando así la calidad sensorial de los alimentos. Por lo tanto resulta una alternativa para elaborar productos listos para consumir de carne bovina. Vaudagna (5) y Da Silva (6), indican que debido a las ventajas obtenidas en las pérdidas por cocción, textura, oxidación lipídica, estabilidad sensorial y microbiológica, el proceso *sous vide* podría resultar adecuado para agregar valor a las carnes consideradas de segunda. Botinestean y col. (7), muestran que los productos cárnicos cocidos *sous vide* tienen más beneficios, ya que necesitan menores cantidades de conservantes y la retención de los jugos naturales podría mejorar la textura y el valor nutricional del producto.

El consumo alimenticio en base a la cantidad y tipo de grasa está relacionado con las enfermedades cardiovasculares en los individuos, especialmente el alto contenido en ácidos grasos saturados (AGS) produce un aumento del nivel de colesterol-LDL. Por el contrario, algunos ácidos grasos monoinsaturados y los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) tienen efectos beneficiosos sobre la salud humana (8). En los animales rumiantes, el contenido de ácidos grasos en el músculo se ve afectado por el proceso de bioidrogenación ruminal. Por lo tanto, el aumento de la biosíntesis de ácidos grasos beneficios para la salud y la reducción de los AGS resultaría alentador para mejorar la calidad nutricional de la carne vacuna (8). Barragán y col. (9) indican que el resultado de adicionar vitamina E y selenio como antioxidantes en la carne bovina es efectivo en cuanto al retardo de la oxidación. Sin embargo, estos componentes resultan de elevado costo y es por ello que el uso de taninos podría resultar una fuente alternativa de antioxidantes. Los taninos presentes en plantas forrajeras ejercen un efecto antioxidante en la carne, cuando son utilizados como suplemento en la dieta suministrada a bovinos (9). Se conoce que los mismos ejercen su acción sobre la bioidrogenación del rumen (8). Priolo y Vasta (10), mostraron que los taninos afectan el color y la composición de ácidos grasos de la carne de pequeños rumiantes. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de

la suplementación con taninos en diferentes dietas bases sobre los atributos sensoriales del músculo *semitendinosus*, de vacas de refugio, procesado mediante tecnología de cocción *sous vide* y conservado durante 21 días a $2 \pm 0,5$ °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y diseño experimental

Se llevaron a cabo dos ensayos con diferentes dietas bases dadas a ganado bovino categoría vacas de refugio, de raza Hereford y todas destetadas hiperprecozmente. Las dietas bases fueron campo natural (24 animales) y silo de sorgo (24 animales), respectivamente. En ambas dietas, los animales fueron asignados aleatoriamente a dos tratamientos:

T1 = Dieta base en suplementación energética/proteica a base de maíz molido y urea de liberación lenta, (12 animales).

T2 = Dieta base con incorporación de taninos de Quebracho colorado (80g/cab. por día) en suplementación energética/proteica a base de maíz molido y urea de liberación lenta, (12 animales).

Luego que los animales alcanzaron las condiciones finales de condición corporal igual o mayor a 6 puntos y el espesor de grasa dorsal igual o mayor a 6 mm, se faenaron en una empresa frigorífica local. Se obtuvieron muestras de carne, del músculo *Semitendinosus*, diseccionado de la media res izquierda de cada animal. Finalmente, los mismos se envasaron al vacío y se almacenaron a -18°C hasta su procesamiento. Para cada tratamiento de alimentación (campo natural y silo sorgo) se aplicó un diseño completamente aleatorizado.

Muestras y procedimientos analíticos

Las muestras de carne se sometieron al proceso de cocción-pasteurización *sous vide* en autoclave con ducha de agua (Microflow Barriquand, Roanne, France) operado en forma estática y siguiendo lo descrito por Szerman y col. (11). La evolución de la temperatura y el tiempo se siguió en el centro geométrico de tres músculos distribuidos en diferentes ubicaciones en el cesto interior de la cámara de la autoclave mediante el uso de termocuplas tipo T. Los datos fueron almacenados con un multímetro digital Hydra 2625A data logger (John Fluke Mfg. Co., Inc., Everett, USA). Las lecturas de las temperaturas fueron tomadas a intervalos de 30 s y la precisión de la medición fue de 0,1 °C. La cocción se finalizó cuando se alcanzó los 70 °C - 2 min en el centro geométrico del músculo. Por último, las piezas se conservaron a $2 \pm 0,5$ °C durante 21 días y a intervalos de 7 días se tomaron piezas que se almacenaron a -18 °C para la evaluación sensorial.

Análisis sensorial

Para el perfil sensorial se llevó a cabo una prueba QDA (Análisis sensorial descriptivo cuantitativo). Las muestras se descongelaron en heladera a $4 \pm 0,5$ °C y se cortaron en cubos de 2 cm. Posteriormente, se calentaron en horno microondas durante 20 s e inmediatamente se sirvieron a un panel de 8 jueces entrenados siguiendo los lineamientos generales de AMSA (12) y la normativa general de IRAM (13) para análisis sensorial. Para ello, se utilizó una escala no estructurada de 10 cm para evaluar: flavor, sabores extraños, olor, olores extraños, terneza inicial y sostenida, jugosidad y cantidad de tejido conectivo (1= extremadamente suave, duro, seco y nada a 10= extremadamente intenso, tierno, jugoso y mucho, respectivamente).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el ensayo de alimentación a base de campo natural los resultados obtenidos (Tabla 1 y 2) muestran que la suplementación y el tiempo de almacenamiento no provocaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los atributos evaluados. Sin embargo, se hallaron olores y sabores extraños de intensidad media en todas las muestras que podrían haber enmascarado cambios más sutiles debidos a la suplementación con taninos.

Tabla 1. Valores de los atributos evaluados en las muestras del músculo *Semitendinosus* cocido *sous vide* correspondientes al ensayo campo natural y tratamiento T1.

Tiempo	Olor	Flavor	Terneza Inicial	Terneza Sostenida	Jugosidad	Tejido Conectivo
0	4,97	4,99	4,65	5,61	5,26	3,36
7	4,75	4,86	4,34	5,27	4,71	4,31
14	3,92	4,77	4,89	4,96	5,61	3,18
21	4,68	4,45	5,11	5,86	5,49	3,21

Tabla 2. Valores de los atributos evaluados en las muestras del músculo *Semitendinosus* cocido *sous vide* correspondientes al ensayo de campo natural y tratamiento T2.

Tiempo	Olor	Flavor	Terneza Inicial	Terneza Sostenida	Jugosidad	Tejido Conectivo
0	4,31	5,06	5,02	6,06	5,08	3
7	4,6	4,33	4,46	5,61	5,14	3,59

14	4,13	4,85	4,34	5,31	5,03	4,29
21	3,84	5	4,83	5,97	5	3,42

En cuanto al ensayo de alimentación a base de granos, los resultados obtenidos por tiempo de almacenamiento se muestran en las Tablas 3, 4, 5 y 6 para cada uno de los atributos bajo estudio y los distintos tratamientos aplicados.

Tabla 3. Valores de los atributos evaluados en las muestras del músculo *Semitendinosus* cocido sous vide correspondientes al tiempo 0 días de almacenamiento y los tratamientos aplicados.

Tiempo	Tratamiento	Olor	Flavor	T. Inicial	T. Sostenida	Jugosidad	Tejido Conectivo
0 Días	Con tanino	4,42	4,32	4,33	5,02 ^b	5,73	4,86
	Sin tanino	4,41	4,34	4,82	5,94 ^a	5,54	3,98

Letras distintas en la misma columna indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabla 4. Valores de los atributos evaluados en las muestras del músculo *Semitendinosus* cocido sous vide correspondientes al tiempo 7 días de almacenamiento y los tratamientos aplicados.

Tiempo	Tratamiento	Olor	Flavor	T. Inicial	T. Sostenida	Jugosidad	Tejido Conectivo
7 Días	Con tanino	4,47	4,31	4,64 ^a	5,58 ^a	5,21	4,42 ^b
	Sin tanino	4,39	4,61	3,58 ^b	4,21 ^b	4,63	5,21 ^a

Letras distintas en la misma columna indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabla 5. Valores de los atributos evaluados en las muestras del músculo *Semitendinosus* cocido sous vide correspondientes al tiempo 14 días de almacenamiento y los tratamientos aplicados.

Tiempo	Tratamiento	Olor	Flavor	T. Inicial	T. Sostenida	Jugosidad	Tejido Conectivo
14 Días	Con tanino	4,42	4,81	4,09	4,91	5,44	4,72
	Sin tanino	4,36	4,41	4,72	5,36	5,07	4,29

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 6. Valores de los atributos evaluados en las muestras del músculo *Semitendinosus* cocido sous vide correspondientes al tiempo 21 días de almacenamiento y los tratamientos aplicados.

Tiempo	Tratamiento	Olor	Flavor	T. Inicial	T. Sostenida	Jugosidad	Tejido Conectivo
21 Días	Con tanino	4,52	4,51	4,16 ^b	4,76 ^b	5,25	5,11
	Sin tanino	4,14	4,52	5,31 ^a	5,94 ^a	5,2	4,26

Letras distintas en la misma columna indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

En el ensayo de alimentación a base de granos, se observa que se hallaron diferencias estadísticamente significativas en terneza sostenida para el tiempo 0 días y en terneza inicial y sostenida para los tiempos 7 y 21 días ($p < 0,05$) (Tabla 6). Asimismo, en el tiempo 7 días se hallaron diferencias significativas en tejido conectivo (Tabla 4). No se hallaron diferencias significativas en los demás atributos evaluados. En cuanto a los atributos terneza inicial y sostenida, las muestras se caracterizaron como “Algo duro” y “Duro” existiendo diferencias significativas entre ellas y respecto a tejido conectivo se caracterizaron como “Trazas” para Tiempo 0 y 14 días (Tablas 3 y 5), “Trazas” y “Algo de Tejido Conectivo” para los tiempos 7 y 21 días (Tablas 4 y 6). Por último, y respecto a los demás atributos, las muestras se caracterizaron como: olor “Débil”, flavor “Débil” y jugosidad para tiempos 0, 14 y 21 “algo secas” y tiempo 7 “secas” a “algo secas” sin diferencias estadísticamente significativas.

CONCLUSIÓN

En el caso del ensayo de alimentación a base de granos, los tratamientos evaluados modifican la terneza del músculo *Semitendinosus* (exceptuando las muestras del tiempo 14 días). Asimismo, en el tiempo 7 días se encontraron diferencias significativas en Tejido Conectivo sin verse afectados los demás atributos para el ensayo a base de granos.

La aparición de olores y sabores extraños es importante tanto en la frecuencia de aparición como en la intensidad de los mismos. Estos olores y sabores extraños pueden haber enmascarado cambios más sutiles en las muestras debidos a la suplementación con taninos, en ambos ensayos de alimentación.

Por último se señala que a partir del análisis QDA se puede inferir que la adición de taninos no influye en las características sensoriales de las muestras bajo estudio en ninguno de los ensayos de alimentación.

AGRADECIMIENTOS

Al financiamiento otorgado por el Programa Nacional de Agroindustria y Agregado de valor del INTA PNAIyAV – 1130043: “Estrategias para la Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios”.

Al asesoramiento y acompañamiento en diversas actividades desarrolladas del Med. Vet. Martin Palladino del Instituto Tecnología de Alimentos del INTA Castelar.

Al asesoramiento en la temática de estadística de la Lic. Ana María Sancho del Instituto Tecnología de Alimentos del INTA Castelar.

Al asesoramiento en la temática calidad en carnes de la Dra. Gabriela Griogioni del Instituto Tecnología de Alimentos del INTA Castelar.

REFERENCIAS

- Vaudagna, S., Sánchez, G., Masana, M., B. Picallo, A., Neira, S. Lasta, J. (2001). Cocción Sous Vide con tratamientos térmicos baja temperatura Nuevas Herramientas para el Procesamiento de Cortes de Carne Bovina. IDIAXXI 163-168.
- Vaudagna, S., Szerman, N., Lasta, J., Sanchez G. (2005). Ciencia y tecnología de carnes. Parte v: procesamiento. Capítulo 19: Nuevas tecnologías. Editorial Limusa
- Church, I.J, Parsons, A.L. 1993. Review: sous vide cook-chill technology. International Journal of Food Science and Technology 28: 575-586.
- Baird, B. 1990. Sous vide: what's all the excitement about? Food Technology 44 (11): 92,94,96. SVAC (Sous Vide Advisory Committee). 1991. Code of Practice for Sous Vide Catering Systems. Tetbury, Gloucestershire, UK: SVAC.
- Vaudagna, S., Sanchez, G., Neira, M., Insani, E., Picallo, A., Gallinger, M., Lasta, J. (2002). Sous vide cooked beef muscles: effects of low temperature–long time (lt–lt) treatments on their quality characteristics and storage stability. International journal of food science and technology 37, 425 - 441.
- Da Silva, I. (2012). Estudo da qualidade de bife bovino submetido à tecnologia sous vide em escala de produção industrial. url: http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/17601/1/2012_dis_ilsilva.pdf. acceso en febrero 2017.
- Botinestean, C., Keenan, D.F, Kerry, J.P, Hamill, R.M. (2016). The effect of thermal treatments including sous-vide, blast freezing and their combinations on beef tenderness ofm. Semitendinosus steaks targeted at elderly consumers. Food science and technology 74: 154-159.
- Vasta, V., Priolo, A., Scerra, M., Hallett, K., Wood, J., Doran, O. (2009). Desaturase protein expression and fatty acid composition of longissimus dorsi muscle in lambs fed green herbage or concentrate with or without added tannins. Meat Science 82 357–364.
- Barragán González, H., Hernández Mendo, O., Hernández Sánchez, D., Saturnino Mora, J., Aranda Osorio, G., Ponce Alquicira, E. (2014). Estabilidad oxidativa de la carne de bovino en respuesta a suplementación con taninos en la dieta. URL:http://chapingo.mx/produccionanimal/administrador/components/com_jresearch/files/publication_s/6.pdf. Acceso en Noviembre 2016
- Priolo, A., Vasta, V. (2007). Effects of tannin-containing diets on small ruminant meat quality. Italian Journal Animal Science 6: 527-530.
- Szerman, N., Gonzales, C.B, Sancho, A.M, Grigioni, G., Carduza, F., Vaugdagna, S. (2012). Effect of the addition of conventional additives and whey proteins concentrates on technological parameters, physicochemical properties, microstructure and sensory attributes of sous vide cooked beef muscles. Meat Science 90: 701-710.
- American Meat Science Association (2015). Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness measurements of meat. 2nd Edition. Champaign, Illinois, USA.
- IRAM (2012). Instituto Argentino de Normalización, Norma 20002: Análisis Sensorial. Directivas Generales para la Metodología.

EVALUACIÓN FLUORIMÉTRICA DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A LA LUZ SOBRE COMPUESTOS FUNCIONALES EN ACEITES DE OLIVA EXTRA VIRGEN.

G. Díaz¹, J. Pega^{1,2}, A.M. Sancho¹, M. Nanni^{1*}

¹Instituto Tecnología de Alimentos, Centro de Investigación de Agroindustria, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Aristizábal y De La Tradición s/n, Hurlingham (1686), Buenos Aires, Argentina.

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Av. Rivadavia 1917, CABA, Argentina

*Autor correspondiente en: Instituto Tecnología de Alimentos, CIA, INTA. Aristizábal y De la Tradición s / n, Hurlingham (1686), Buenos Aires, Argentina.

Correo electrónico: nanni.mariana@inta.gob.ar

RESUMEN

El aceite de oliva extra virgen (AOEV), obtenido a partir del fruto del olivo (*Olea europaea* L.); es reconocido por sus propiedades funcionales, dado su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados y en antioxidantes naturales, tales como vitamina E y pigmentos. Debido a su importancia nutricional y económica, es fundamental contar con tecnología que permita identificar posibles adulteraciones para determinar la autenticidad del AOEV y su composición funcional. En este contexto, la evaluación fluorimétrica es una técnica simple, rápida y no destructiva, útil para detectar la presencia de compuestos funcionales fluorescentes, tales como vitaminas y/o pigmentos naturales. El presente trabajo demuestra el uso de la fluorescencia para el seguimiento de los cambios en el AOEV después de 7 días de exposición a la luz, y en mezclas con aceite de girasol (70:30 v/v), fundamentándose en la estabilidad y contenido de los compuestos funcionales presentes, tales como tocoferoles, clorofila y sus derivados, como indicadores de adulteración y calidad en AOEV.

Palabras clave: aceite de oliva extra virgen; fluorescencia; exposición a la luz, antioxidantes.

ABSTRACT

The extra virgin olive oil (EVOO) obtained from the fruit of the olive tree (*Olea europaea* L.); is recognized by its functional properties, given its high content in monounsaturated fatty acids and natural antioxidants such as vitamins E and pigments. Due to its nutritional and economic importance, is essential to have a technology that allows identifying possible adulteration to determine the authenticity of the EVOO and its functional composition. In this context, fluorimetric evaluation is a simple, rapid and non-destructive technique, useful to detect the presence of fluorescent functional compounds, such as vitamins and/or natural pigments. The present work demonstrates the use of the fluorescence to monitor changes in the EVOO and mixtures with sunflower oil, during 7 days of light exposition, based on the stability and content of the functional compounds present, such as tocopherols, chlorophyll and its derivatives, as indicators of adulteration and quality in EVOO.

Keywords: Extra Virgin Olive Oil, fluorescence, light exposition, antioxidants

INTRODUCCIÓN

El aceite de oliva extra virgen (AOEV) es un producto económicamente importante no solo en los países mediterráneos; sino también en Argentina, Chile y Australia que se encuentran dentro de los veinte productores a nivel mundial. El AOEV se obtiene del fruto del olivo (*Olea europaea* L.) mediante prensas mecánicas y sin aplicación de procesos de refinación (1, 2).

Sin embargo, la calidad del AOEV disminuye con el paso del tiempo como consecuencia de degradaciones oxidativas e hidrolíticas; que influirían en la pérdida parcial de constituyentes menores. Estos constituyentes pueden dividirse en dos grupos: el primero consta de derivados de ácidos grasos, tales como mono y diglicéridos, fosfátidos, ceras y ésteres de esteroides y el segundo incluye compuestos que no están químicamente relacionados con los ácidos grasos como: hidrocarburos, alcoholes alifáticos, esteroides libres, tocoferoles, pigmentos, carotenoides y compuestos fenólicos polares (3, 4). Por lo tanto, estas pérdidas de calidad provocan la disminución de las cualidades sensoriales y promotoras de la salud, así como el valor de comercialización y la aceptabilidad del consumidor de AOEV, ya que acarrearán a la generación de sustancias de sabor desagradable de bajo peso molecular, pérdida de antioxidantes y acumulación de compuestos tóxicos tales como radicales libres (5, 6, 7). La propensión de un AOEV a estos fenómenos negativos depende de su

exposición a factores prooxidantes tales como oxígeno, temperatura, luz (6, 8, 9) que pueden afectar su estabilidad oxidativa desde la producción hasta el consumo. Sin embargo, la respuesta de un AOEV a la oxidación depende de su composición química, particularmente, de aquellas sustancias que pueden influir directa o indirectamente en estos fenómenos, como los antioxidantes naturales (Vitamina E, pigmentos) y el ácido oleico (5, 6, 7, 8). Los niveles de estos químicos están muy influenciados por factores genéticos, agronómicos y tecnológicos.

Es por ello que una de las preocupaciones de la industria aceitera es la preservación de los atributos positivos del AOEV desde la producción hasta el embotellado, y la comercialización (10). De hecho, condiciones de almacenamiento no óptimas, tales como los que podrían ocurrir en el estante de una tienda, podrían alterar las características del producto y eventualmente diferir de los índices indicados en la etiqueta, o de los que establece la ley.

Además, el alto precio del AOEV en el mercado, frente a otros aceites vegetales, provoca la existencia de adulteraciones o fraudes (4). Existen reportes sobre etiquetado falso sobre el origen geográfico o la variedad de aceite de oliva (11, 12). La adulteración implica la adición de aceites de menor valor comercial, como por ejemplo aceites de semillas refinados (girasol, soja, maíz) (13).

Actualmente, la identificación o detección de adulteraciones en AOEV constituye un de los desafíos de la ciencia actual, que permita contar con un método rápido y preciso, para un buen control de calidad y el etiquetado (14).

Las técnicas más empleadas para detectar alteraciones del AOEV hacen uso de métodos cromatográficos (15, 16). Otras técnicas incluyen reacciones colorimétricas, determinación del valor de yodo, valor de saponificación, densidad, viscosidad, índice de refracción y absorbancia ultravioleta (17).

En el estudio de nuevos métodos emergentes surge la fluorescencia, como método para discriminar aceites comestibles, detectar la adulteración o el estado de calidad del AOEV (18, 19). Esta técnica posee ventajas tales como su velocidad de análisis, el ser una técnica no destructiva, y utilizar pequeñas cantidades de muestra.

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue estudiar el uso de la fluorescencia para el seguimiento de los cambios en el AOEV después de 7 días de exposición a la luz. Para ello, se trabajó con 2 variedades de AOEV (Picual (AOEVP) y Farga (AOEVF) y mezclas con aceite de girasol (AG) (70:30 v/v), fundamentándose en la estabilidad y contenido de los compuestos funcionales presentes, tales como Vitamina E (tocoferoles), pigmentos (clorofila y derivados), como indicadores de adulteración y calidad en AOEV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de aceite

Las variedades de fruta de olivo (*Olea europaea* L.) Farga y Picual se cosecharon en 2015 en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Junín, Mendoza, Argentina (Latitud 33 ° 16 S, Longitud 68 ° 5 W). Tres muestras de cada monovarietal fueron cosechadas a mano en la etapa de madurez óptima. Se obtuvieron AOEV monovariedades por extracción usando un sistema de centrifugación (decantador de dos fases). Las muestras de aceite se almacenaron a 4 ° C en botellas de vidrio oscuro antes del análisis. El aceite de girasol comercial (fecha de fabricación: 16 de agosto de 2015 - fecha de vencimiento: 2 de diciembre de 2017, Cañuelas, Buenos Aires, Argentina) se compró en un supermercado local y se almacenó en un lugar fresco, seco y oscuro hasta su evaluación.

Ensayo de Foto oxidación

Las muestras de AOEVP y AOEVF y sus respectivas mezclas con AG comercial (70:30 v/v), se colocaron en botellas de vidrio de 5 ml con un espacio de cabeza del 3%. Las muestras se colocaron bajo un tubo D65 (Osram, Buenos Aires, Argentina) a una distancia de 40 cm. La temperatura de iluminación del tubo era 5500 ° K - 5227 ° C y la luminancia de 1400 lux. La exposición a la luz se realizó durante 8 h al día durante siete días consecutivos, a temperatura ambiente. Los tratamientos se realizaron en muestras por triplicado. El ensayo se repitió dos veces en 2 meses.

Mediciones de fluorescencia

Los experimentos de espectros de fluorescencia se realizaron con un espectrofotómetro de fluorescencia LS55 (PerkinElmer GmbH, Rodgau-Jügesheim, Alemania). El espectro de emisión se estableció en el rango de λ_{em} : 300-805 nm, con longitudes de onda de λ_{ex} : 290 nm y λ_{ex} : 405 nm para la excitación, respectivamente. Tanto la excitación como la emisión fueron de un slit de 10-15 nm. Las muestras se analizaron para espectros de fluorescencia total usando el método de geometría frontal. La fluorescencia se midió directamente a partir de las muestras, sin ningún tratamiento previo. Todas las muestras se llevaron a cabo por triplicado y los valores medios se usaron para los análisis.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó Software SPSS versión 12.0 (SPSS Inc., Illinois, E.U.A) para todo los análisis, realizándose la prueba T-Student que permitió plasmar la comparación de las medias de dos aceites. Además de se ejecutó un análisis ANOVA de una vía (Tipo de Aceite) con tres niveles (Picual-Farga y Girasol).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El AOEV comparado con otros aceites vegetales, es más estable contra la oxidación. Esto se debe a múltiples factores, tales como su bajo contenido de ácidos grasos poliinsaturados, el alto nivel de ácidos grasos monoinsaturados (principalmente ácido oleico) y la presencia de antioxidantes naturales como por ejemplo la Vitamina E (tocoferol) y pigmentos. La estabilidad del aceite de oliva virgen también depende de la presencia de sustancias pro-oxidantes, así como de factores relacionados con las condiciones de almacenamiento, a saber, la presencia de oxígeno, la temperatura y, sobre todo, la exposición a la luz (20).

El bajo contenido en ácidos grasos poliinsaturados y los antioxidantes naturales (Vitamina E) presentes en el AOEV lo protegen contra la oxidación. Mientras que los pigmentos (clorofilas) contenidos en el mismo, actuarían como antioxidantes en la oscuridad, pero tendrían un efecto oxidante en presencia de la luz (fotooxidación) (21).

La presencia de las diferentes sustancias antioxidantes, Vitamina E y Pigmentos, presentes en los AOEV fueron examinadas durante 7 días de almacenamiento con exposición a la luz.

En el primer rango estudiado ($\lambda_{em} = 300-550 \text{ nm}$; $\lambda_{ex} = 290 \text{ nm}$) (Figura 1), el principal compuesto fluorescente presente en los AOEV es la vitamina E (22); donde se observó que los espectros de emisión de fluorescencia (EEM) de los diferentes monovarietales poseen diferencias en comparación con el espectro del AG, estas diferencias se ven acentuadas al observar los espectros de las respectivas mezclas.

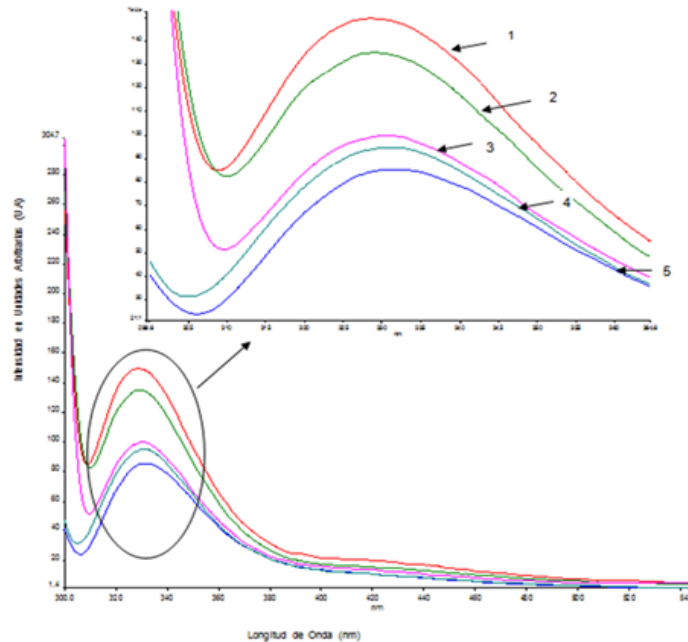


Figura 1. Espectros de emisión 300-500 nm y excitación en 290 nm correspondiente a Vitamina E, en el día de inicio de almacenamiento; (1) Picual, (2) Farga, (3) Picual: Girasol (70:30), (4) Farga: Girasol (70:30), (5) Girasol

Puesto que la Vitamina E contribuye a la estabilidad del AOEV, debido a su efecto antioxidante, este efecto se vio reflejado en los EEM. Este resultado está de acuerdo con el hecho de que los aceites AOEV poseen mayor proporción de Vitamina E que los aceites refinados (AG). Esto conllevaría a una menor estabilidad de las mezclas de AOEV o el propio AG refinado, a lo largo del tiempo. La estabilidad se vería afectada aún más por la exposición a la luz que implicaría la disminución de este compuesto funcional a lo largo del tiempo. Esta hipótesis se ve reflejada en el la Figura 2, donde se observa diferencias significativas en los espectros de fluorescencia de los AOEVP, AOEVF y sus respectivas mezclas, con respecto al del AG. El comportamiento a través del tiempo muestra una disminución del contenido de Vitamina E, en las muestras de AOEV con respecto a las mezclas con AG.

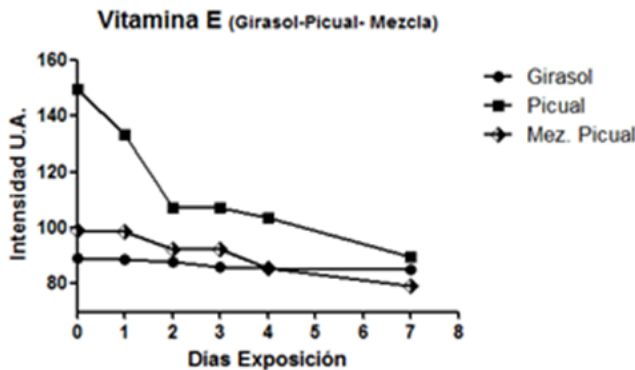


Figura 2. Cambios en la intensidad de la fluorescencia

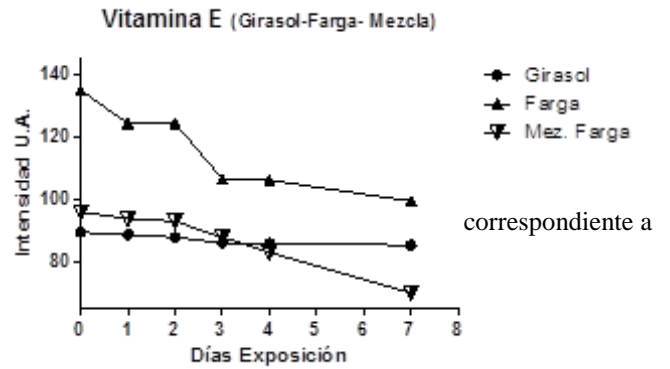


Figura 2. Cambios en la intensidad de la fluorescencia correspondiente a Vitamina E, en los espectros de los monovarietales (Picual y Farga), aceite de Girasol y sus respectivas mezclas (70:30 v/v)

Para verificar si las diferencias entre los EEM medios de los diferentes AOEV y sus mezclas se realizó un análisis estadístico, donde se aplicó la prueba T-Student que permitió realizar la comparación de las medias de dos aceites siendo ésta estadísticamente significativa ($p < 0,0001$). (Tabla 1) y un análisis ANOVA de una vía (Tipo de Aceite) con tres niveles (Picual-Farga y Girasol) siendo la diferencia entre ellos estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) (Tabla 2).

Tabla 1. Vitaminas, análisis de T-Student comparación de las medias de dos aceites. ($p < 0,0001$)

Vitaminas		
Tipo aceite	Media	Desvíos
Picual	148,015 a	1,277
Farga	135,278 b	0,476

Tipo aceite	Media	Desvíos
Picual	148,015 a	1,277
Picual + Girasol	98,280 b	3,564

Tipo aceite	Media	Desvíos
Farga	135,278 a	0,476
Farga + Girasol	94,110 b	0,576

Tabla 2.: Análisis ANOVA de una vía (Tipo de Aceite) con tres niveles (Picual-Farga y Girasol) ($p < 0,0001$)

Vitaminas

Tipo aceite	Media	Desvíos
Picual	148,015 a	1,277
Farga	135,278 b	0,476
Girasol	84,057 c	0,287

El comportamiento observado mediante EEM, para la Vitamina E, pueden atribuirse a sus mecanismos de acción específicos, como donantes de electrones, ralentizando la reacción oxidativa y como aceptores de electrones, determinando la disminución o la eliminación del singlete de oxígeno, con la consecuente inhibición de la fotooxidación de lípidos (23).

No obstante, el singlete de oxígeno formado en la reacción fotooxidativa es 1.000-1.500 veces más reactivo que el triplete de oxígeno que toma parte en la reacción de autooxidación (24). Esto significa que la fotooxidación tiene lugar más rápido que la autooxidación e implica una mayor disminución de los tocoferoles en las muestras expuestas a la luz, lo que es coincidente con los resultados aquí observados.

Al realizar el estudio de los pigmentos se analizó el rango comprendido entre $\lambda_{em} = 410-805 \text{ nm}$; $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ (Figura 3), el principal compuesto fluorescente observado en este rango fue el perteneciente a las clorofilas y sus derivados (22) (25); aquí se comprobó que los EEM de los diferentes monovarietales de AOEV, poseen diferencias en comparación con los espectros de las mezclas y el AG.

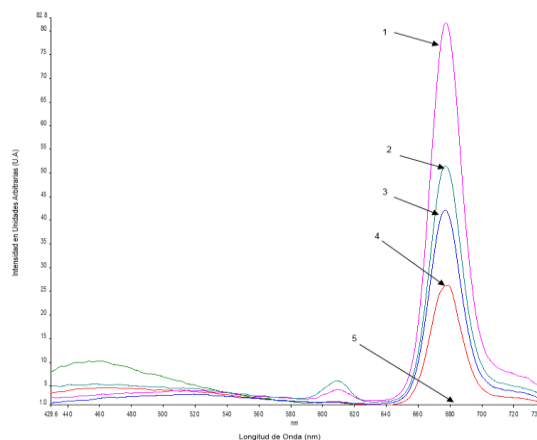


Figura 3. Espectros de emisión 405-805 nm y excitación en 405 nm correspondiente a pigmentos; (1) Picual, (2) Farga, (3) Picual: Girasol (70:30), (4) Farga: Girasol (70:30), (5) Girasol

Ha sido previamente reportado que, cuando los pigmentos se exponen a la luz, estos provocan la autooxidación en el aceite y contribuyen a la degradación de los compuestos funcionales (26). Se ha observado que los pigmentos actúan como fotosensibilizadores, ya que pueden transferir energía de la radiación electromagnética al triplete de oxígeno, produciendo así singlete oxígeno, que es una especie altamente oxidativa (27) (28). Estos radicales libres eventualmente reaccionarían con los ácidos grasos insaturados de AOEV, degradando el aceite y disminuyendo su calidad. (27) (29)

Los cambios en el contenido de clorofila y derivados, representados en la Figura 4, demostraron una disminución a lo largo de los 7 días de exposición en los espectros de fluorescencia de los AOEV monovarietales, y sus respectivas mezclas, con respecto al de aceite de girasol.

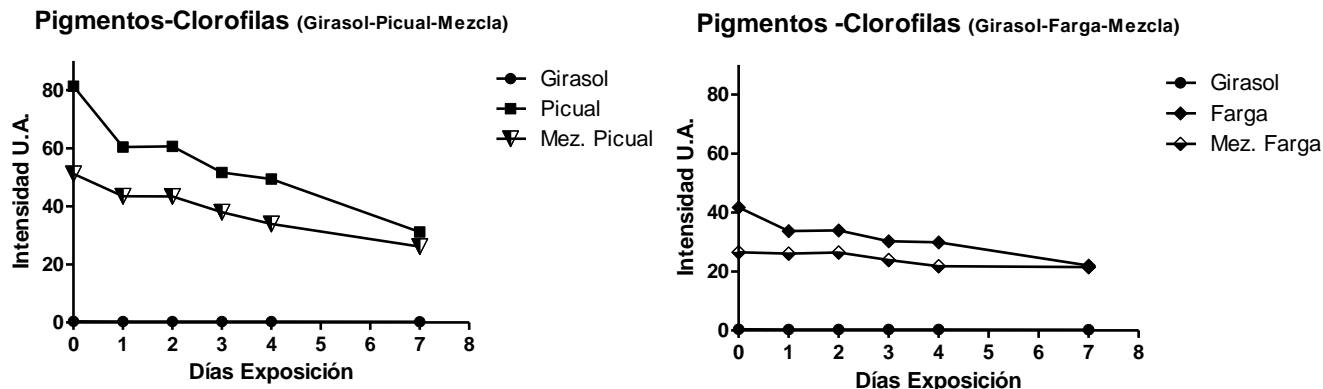


Figura 4. Cambios en la intensidad de la fluorescencia correspondiente a Pigmentos, en los espectros de los monovarietales (Picual y Farga), aceite de Girasol y sus respectivas mezclas (70:30 v/v)

A partir de los EEM medios se realizó un análisis estadístico, donde se aplicó la prueba T-Student que permitió plasmar la comparación de las medias de cada uno de los AOEV con su mezcla, siendo estas estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) (Tabla 3). Asimismo, un análisis ANOVA de una vía (Tipo de Aceite) con tres niveles (Picual-Farga y Girasol), fue realizado, observándose diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) en el contenido de clorofilas y derivados entre las muestras monovarietales de AOEV (Tabla 4).

Tabla 3. Pigmentos, análisis de T-Student comparación de las medias de dos aceites. ($p < 0,0001$)

Pigmentos		
Tipo aceite	Media	Desvíos
Picual	83,125 a	1,781
Farga	45,468 b	1,792

Tipo aceite	Media	Desvíos
Picual	83,125 a	1,781
Picual + Girasol	51,565 b	0,497

Tipo aceite	Media	Desvíos
Farga	45,468 a	1,792

Farga Girasol	+	28,233 b	1,474
------------------	---	----------	-------

Tabla 4. Análisis ANOVA de una vía (Tipo de Aceite) con tres niveles (Picual-Farga y Girasol) ($p < 0,0001$)

Pigmentos		
Tipo aceite	Media	Desvíos
Picual	83,125 a	1,781
Farga	45,468 b	1,792
Girasol	0,402 c	0,271

CONCLUSIONES

Este estudio evaluó la aptitud de la EMM para determinar cambios en el contenido de Vitamina E y clorofilas en muestras monovarietales de AOEV y el efecto de la exposición a la luz de estas muestras y aquellas adulteradas con AG.

- A partir de los EEM (Figuras 1 y 3) de los AOEV monovarietales, se observaron diferencias significativas ($p < 0,0001$), en la composición de vitaminas y pigmentos.
- Los espectros de emisión del AG muestran la ausencia de pigmentos (clorofila y derivados).
- Del análisis fluorimétrico de las muestras de AOEV y mezclas, se observó un contenido diferente entre ambos monovarietales, tanto para Vitamina E como para clorofila y derivados. Asimismo, se observó una mayor incidencia, sobre la disminución de los compuestos funcionales, por la presencia de AG en el AOEV monovarietal Farga, que cuando la misma mezcla fue llevada a cabo con el monovarietal Picual ($p < 0,001$).
- El estudio mediante EEM de la presencia de Vitamina E y clorofilas durante la exposición a la luz, monstro la disminución asociada a la fotoxidación de estos compuestos.

De este modo, la espectroscopia de fluorescencia podría ser utilizada como herramienta en el seguimiento de los cambios en el AOEV, y mezclas con AG, fundamentándose en el contenido de los compuestos funcionales-fluorescentes presentes, tales como vitaminas y pigmentos, como indicadores de adulteración en AOEV. Asimismo, la fluorimetría permite determinar parámetros con una medida simple a una longitud de onda de excitación única, y en un corto periodo de tiempo. Estos resultados proporcionarían información útil que se puede utilizar para el control de la calidad del AOEV de forma rápida y fácil.

REFERENCIAS

1. Estruch, R., Martínez-González, M.A., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Ruiz-Gutiérrez, V., Covas, M.I., Fiol, M., Gómez-Gracia, E., López-Sabater, M.C., Vinyoles, E., Arós, F., Conde, M., Lahoz, C., Lapetra, J., Sáez, G., Ros, E. (2006). Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Annual Internal Medicine*, 145, págs. 1-11.
2. Konstantinidou, V., Covas, M. I., Muñoz-Aguayo, D., Khymenets, O., de la Torre, R., Saez, G., del Carmen Tormos, M., Toledo, E., Marti, A., Ruiz-Gutiérrez V., Ruiz Mendez M. V., Fito, M. (2010). In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. *The FASEB Journal* 10, págs. 2546–2557.
3. Manna C, Galletti P, Cucciola V, Moltedo O, Leone A, Zappia V. (1997). The Protective Effect of the Olive Oil Polyphenol (3,4-Dihydroxyphenyl)- ethanol Counteracts Reactive Oxygen Metabolite-Induced Cytotoxicity in Caco-2 Cells.. *JN The Journal of Nutrition*, 127, págs. 286–292.
4. Visioli, F., Galli, C. (1998). Olive oil phenols and their potential effects on human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), págs. 4292-4296.
5. Choe, E., Min, D.B. (2005). Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Journal of Food Science*, 70, págs. 142–159.
6. Choe, E., Min, D.B. (2006). Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Reviews in Food Science and Food Safety*, 5, págs. 169–186.
7. Choe, E., Min, D.B. (2009). Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods *Comprehensive. Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, págs. 345–358.
8. Bendini, A., Cerretani, L., Salvador, M.D., Fregapane, G., Lercker, G. (2010). Stability of the sensory quality of virgin olive oil during storage. An overview. *Italian Food & Beverage Technology*, 60., págs. 5-18.

9. Khan. (1995). Infrared studies on initiation of the autoxidation of some fatty acid esters with and without light-sensitized chlorophyll, ultraviolet light and lipoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 16, págs. 159-160.
10. Browne, CA. (1899). A contribution to the chemistry of butter-fat. *Journal of the American Chemical Society*, pág. ACS Publications.
11. R. Aparicio, M.T. Morales, V. Alonso. (1997). Authentication of European Virgin Olive Oils by Their Chemical Compounds, Sensory Attributes, and Consumers' Attitudes. *J. Agric. Food Chem* 45, págs. 1076-1083.
12. Lorenzo, I.M., Pavon, J.L.P., Laespada, M.E.F., Pinto, C.G., Cordero, B.M.S. (2002). Detection of adulterants in olive oil by headspace-mass spectrometry. I. *Journal of Chromatography A*, Vols. 945(1-2), 221-230.
13. Wesley, I.J., Pacheco, F., McGill, A.E.J. (1996). Identification of adulterants in olive oils. 4 (515-518), s.l.: *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Vol. 73.
14. Sikorska, E., Górecki, T., Khmelinskii, I.V., Sikorski, M., Koziół, J. (2005). Classification of edible oils using synchronous scanning fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*, 89(2), págs. 217-225.
15. P.J. Marriott, R. Shellie, C. Cornwell. (2001). Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, págs. 1-22.
16. M. Hajimahmoodi, Y. Vander Heyden, N. Sadeghi, B. Jannat, M.R. Oveisi, S. Shahbazian. (2005). Gas-chromatographic fatty acids fingerprints and partial least square modeling as a basis for the simultaneous determination of edible oil mixtures. *Talanta*, 66, págs. 1108-1116.
17. G. Downey, P. McIntyre, A.N. Davies. (2002). Detecting and Quantifying Sunflower Oil Adulteration in Extra Virgin Olive Oils from the Eastern Mediterranean by Visible and Near-Infrared Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (20), págs. 5520-5525.
18. Sayago Gómez, A. (2007). Vitamina y aceites vegetales. no 1 (74-86), s.l.: *Grasas y aceites*, Vol. vol. 58.
19. Poulli, Konstantina I., Mousdis, George A., Georgiou, Constantinos. (2007). A Rapid synchronous fluorescence method for virgin olive oil adulteration assessment. *Food chemistry*, Vol. 105, no. 1 (369-375)
20. J Di Giovacchino L., Mucciarella M.R., Costantini N., Ferrante, M.L., Surricchio G. (2002). Use of nitrogen to improve stability of virgin olive oil during storage. *Am Oil Chem Soc*, 79, págs. 339-344.
21. Kiritsakis, A.K., Osman, M. (1995). Efectos del β -caroteno y del alfa-tocoferol en la estabilidad fotooxidativa del aceite de oliva. *Olivae: revista oficial del Consejo Oleícola Internacional*, (56), págs. 25-28.
22. Kyriakidis, N.B., Skarkalis, P. (2000). Fluorescence spectra measurement of olive oil and other vegetable oils. *Journal of AOAC International*, 83(6), págs. 1435-1439.
23. Morelló, J.R., Motilva, M.J., Tovar, M.J., Romero, M.P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85(3), págs. 357-364.
24. Franco, M.N., Galeano-Díaz, T., López, Ó., Fernández-Bolaños, J.G., Sánchez, J., De Miguel, C., Martín-Vertedor, D. (2014). Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. *Food chemistry*, 163, págs. 289-298.
25. Sikorska, E., Khmelinskii, I.V., Sikorski, M., Caponio, F., Bilancia, M.T., Pasqualone, A., Gomes, T. (2008). Fluorescence spectroscopy in monitoring of extra virgin olive oil during storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(1), págs. 52-61.
26. Aparicio, R., Harwood, J. (2013). *Handbook of olive oil. Analysis and properties*, 2nd. ed Springer, New York.
27. Psomiadou, E., Tsimidou, M. (2002). Stability of virgin olive oil. 2. Photo-oxidation studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (4), págs. 722-727.
28. Koski, A., Psomiadou, E., Tsimidou, M. (2002). Oxidative stability and minor constituents of virgin olive oil and cold-pressed rapeseed oil. *Eur Food Res Technol.*, págs. 2014-294.
29. Psomiadou, E., Tsimidou, M. (2002). Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), págs. 716-721.

PROYECTO ESPECÍFICO

Estrategias para la diferenciación de alimentos y el desarrollo de nuevos productos alimentarios.

PROYECTO INTEGRADOR Optimización de calidad integral y otras estrategias de agregado de valor.

EVALUACIÓN POSCOSECHA DE VARIEDADES DE CIRUELAS PARA USO EN LA INDUSTRIA DE LOS ALIMENTOS

G. Corbino¹, G. Valentini¹, M. Murano², R. Dománino²

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - San Pedro. Ruta 9. Km 170

²Instituto Nacional de Tecnología Industrial - Agroalimentos. Av. Gral. Paz 5445 San Martín Bs As.

Correo electrónico: corbino.graciela@inta.gob.ar

RESUMEN

Los ciruelos son un grupo numeroso y diverso de especies frutales. Ellos poseen el potencial para contribuir a la nutrición humana debido a su riqueza en fibras y antioxidantes. El objetivo del presente trabajo fue determinar los parámetros físico-químicos de calidad y analizar la actividad antioxidante, el contenido de compuestos fenólicos y antocianinas de cultivares de ciruelos producidos en San Pedro, con el fin de revalorizar la producción local y evaluar su posible utilización en la industria de los alimentos. La capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales fue superior en los ciruelos sanguíneos, de piel y pulpa roja, Ruby Sweet (RS) y Casita de Chocolate (CC) respecto aquellos de piel y pulpa amarilla Blanco Pavón Arriba (BPA) y Byron Gold (BG). Hubo diferencias significativas en el contenido de antocianinas entre los cultivares rojos, obteniéndose mayores valores para CC. Los resultados sugieren que los ciruelos rojos podrían ser considerados una materia prima interesante para obtener compuestos bioactivos de aplicación en la industria de los alimentos.

Palabras clave: ciruelas, fenoles, antioxidantes, bioactivos, antocianinas

ABSTRACT

Plums are the most numerous and diverse group of fruit tree species. They have the potential to contribute to human nutrition because of their richness in fibre and antioxidants. The aims of this study were to determine quality attributes and to analyze the antioxidant activity, the content of phenolic compounds and anthocyanins plum cultivars produced in San Pedro, in order to revalue local production and assess their possible use in the food industry. The antioxidant capacity and the content of phenolic compounds of the blood plum, red skin and red flesh, Ruby Sweet (RS) and Casita de Chocolate (CC) are greater than yellow cultivars Blanco Pavón Arriba (BPA) and Byron Gold (BG). There were significant differences among red cultivars in anthocyanin content, obtaining greater values for CC. The results suggest that the red plums could be interesting raw material to obtain chemicals to apply in the food industry.

Keywords: prunes, phenols, antioxidants, bioactive anthocyanins

INTRODUCCIÓN

San Pedro (Provincia de Buenos Aires) es una zona tradicionalmente frutícola. La superficie dedicada al cultivo de ciruelo ha ido disminuyendo paulatinamente en los últimos años. Esto se debe a la rápida expansión de los cultivos extensivos como la soja, a la baja rentabilidad de la especie y a la falta de destinos comerciales alternativos. Actualmente, una parte de la producción (30%) de ciruela fuera del estándar comercial, no se cosecha, constituyéndose en un remante.

Los ciruelos son un grupo numeroso y diverso de especies frutales (1). Su fruto es una fuente de azúcares simples, fibras, taninos y minerales. Es rico en pectina, sorbitol y contiene diversos fitoquímicos, tales como flavonoides, compuestos fenólicos y antocianinas (2, 3, 4). Se informa la presencia de los ácidos neoclorogénico y clorogénico, rutina, quercetin 3-rutosido, quercetin 3-xilosido, ácido 3-hidroxycumaroil quínico, procianidina B1 y procianidina B2 (5, 6, 7, 8). Las principales antocianinas encontradas en las ciruelas son cianidin 3-glucósido, cianidin 3-rutinosido, cianidin 3-xilosido, peonidin 3-rutinosido y peonidin 3-glucósido (7).

Entre los diversos cultivares pueden encontrarse variaciones de estos parámetros (9). Las variedades tipo japonesas (*Prunus salicina*) poseen frutos de piel o pulpa amarilla o rojiza. Las variedades de piel y pulpa roja, llamadas sanguíneas, poseen colores rojos, morados y azules muy atractivos, debido a la presencia de pigmentos antocianínicos (5).

Las variedades tipo japonesas, en general, se utilizan para consumo en fresco. Para este uso, la concentración de sólidos solubles y la acidez son parámetros determinantes para la aceptación, por parte del consumidor, del producto en fresco (10). Los compuestos fenólicos presentes en estas variedades podrían ser utilizados como antioxidantes naturales en alimentos funcionales (11). El intenso color rojo de los extractos de las variedades sanguíneas posee un potencial uso como colorante rojo natural en alimentos (5). Presentan mayor firmeza que los ciruelos europeos (*Prunus doméstica*), utilizados habitualmente para la industria del deshidratado y la elaboración de mermeladas y dulces (12). La consistencia, el estado de madurez, el color y el contenido de pectinas naturales, son características de la materia prima a tener en cuenta para la elaboración de una mermelada.

El objetivo del presente trabajo fue determinar los parámetros físico-químicos de calidad y analizar la actividad antioxidante, el contenido de compuestos fenólicos y antocianinas de cultivares de ciruelo tipo japonés producidos en San Pedro, con el fin de revalorizar la producción local y evaluar su posible utilización en la industria de los alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos

Los reactivos 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Trolox y Folin-Ciocalteu, fueron adquiridos en la firma Sigma-Aldrich (Argentina). El ácido gálico se compró en Fluka (Argentina). Cloruro de potasio, acetato de sodio, carbonato de sodio anhidro, ácido cítrico, metanol y el etanol pertenecen a la marca Cicarelli.

Material vegetal

Frutos de ciruelas de pulpa y piel morada *Casita de Chocolate* (CC) y *Ruby Sweet* (RS) y de pulpa y piel amarilla *Blanco Pavón Arriba* (BPA) y *Byron Gold* (BG) fueron cosechados de plantas cultivadas en lotes experimentales pertenecientes a la Estación Experimental Agropecuaria de INTA San Pedro (Buenos Aires, Argentina 330 44' 34.7" S, 590 47' 34.4" W), en enero de 2016. Quince (15) ciruelas de cada variedad fueron seleccionadas al azar entre las cosechadas, las cuales fueron transportadas inmediatamente al laboratorio para su análisis.

Parámetros de calidad

A los frutos seleccionados se les determinó los parámetros físico-químicos peso (P), color de la piel, firmeza (F), pH, sólidos soluble totales (SST) y acidez titulable (AT). Las medidas de color fueron realizadas con un colorímetro Minolta Chroma Meter CR-400 (Osaka, Japan), en la zona ecuatorial del fruto, sobre el sitio opuesto a la sutura. Se utilizó el sistema de color CIELAB (Commission Internationale de l'Éclairage) y se obtuvieron los valores L^* (luminosidad), a^* , b^* y el C^* (chroma). La firmeza se midió en dos lados opuestos, sobre la zona ecuatorial del fruto, con un durómetro digital Bareiss HPE (Alemania) y se expresó en kg/cm^2 . El pH del homogenato se midió con pH-chímetro (Altronix). Los sólidos soluble totales se determinaron en el jugo con un refractómetro de mano N1 Atago (Osaka, Japan) y los valores se expresaron en grados en grados Brix. La acidez titulable se determinó por titulación de una muestra, de 10 g de homogenato en 100 ml de agua destilada, con NaOH 0.2 N utilizando como indicador fenoftaleína (pH 8.2). A partir de los parámetros SST y AT se calculó el ratio.

Preparación de los extractos

Se extrajo 100 g de un homogenato obtenido a partir de 10 frutos enteros (pulpa y piel, sin carozo), con 200 ml of etanol (96°) conteniendo ácido cítrico 0.20 % p/p. Este procedimiento se realizó por duplicado obteniéndose dos extractos por variedad de ciruela. Los extractos se filtraron al vacío y almacenaron a -20 °C.

Ensayo del radical DPPH •+

La capacidad antioxidante (CA) se determinó mediante el método del DPPH, el cual se basa en la utilización del radical libre 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (13). Un total de 25 μl de extracto de ciruelas rojas y 50 μl de extracto de ciruelas amarillas se llevaron a 1 ml con etanol (96°). Las muestras diluidas reaccionaron con 2 ml of DPPH•+ (150 μM en metanol). La disminución de la absorbancia fue medida en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Modelo Lambda 25) a 517 nm luego de 30 minutos de reacción. Los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox/ 100g de peso fresco ($\mu\text{mol ET}/100 \text{ g PF}$).

Contenido de Fenoles

Los fenoles (CF) se determinaron por el método de Folin-Ciocalteu (14), utilizando una curva patron de ácido gálico. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico/100 g de peso fresco ($\text{mg EAG}/100 \text{ g PF}$). Las muestras (50 μl de extracto) o el estándar (100, 200, 300, 400, 500, 800, 900 μl de 0.074 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ácido gálico) se diluyeron con agua y se le adicionaron 50 μl de reactivo de Folin-Ciocalteu (2 N). Se dejó reaccionar 3 minutos y se adicionaron 500 μl de carbonato de sodio 0.1N. Los resultados fueron leídos a 725 nm luego de 1 hora.

Antocianinas

El contenido de antocianinas se determinó de acuerdo al método del pH diferencial (AOAC) (15), basado en el cambio de absorptividad molar que ocurre al enfrentar a una solución de antocianinas a dos tampones diferentes. A 1 ml de extracto etanólico filtrado, se le adicionó 4 ml de agua desionizada (solución A). Se diluye 1 ml de la solución A con 4 ml de la solución del buffer pH 1.0 (cloruro de potasio 0.025 M). Por otro lado, se diluye 1 ml de la solución A con 4 ml de la solución buffer pH 4.5 (acetato de sodio 0.4 M). Se leen las absorbancias de ambas soluciones en espectrofotómetro a 520 y 700 nm, luego de un período de 20-50 minutos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se sometieron a un análisis de variancia (ANOVA) y al test de Tuckey para identificar diferencias entre medias, utilizando el programa *InfoStat versión 2013*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El peso promedio del fruto para los cuatro cultivares de ciruelo analizados se muestra en la Tabla 1. Los mayores pesos fueron para las variedades Ruby Sweet y Byron Gold. La firmeza de este último difirió significativamente del resto. Los frutos de piel amarilla presentaron mayor luminosidad (L^*) y valores de b^* , mientras que los frutos de piel roja mayores valores de a^* (Tabla 1). El color es el indicador más importante de calidad y madurez en muchas especies frutales (16). El mismo se encuentra influido por la concentración y distribución de las antocianinas en la piel (17). El color de la piel y la firmeza se utilizan para determinar el momento de cosecha ya

que ambos parámetros son índices del estado de madurez. No hubo diferencias significativas en los SST entre las 4 variedades analizadas, obteniéndose un promedio de 15.6 °Brix. La variedad más ácida fue Casita de chocolate (pH de 3.08).

Tabla 1. Parámetros de calidad a cosecha, peso del fruto (P), firmeza (F), color de la piel (L*, a*, b* y C*), pH, sólidos solubles totales (SST) y ratio, de las variedades de ciruelo utilizadas en el ensayo. Los valores representan la media de 15 repeticiones

Cultivar	P (g)	F (kg/cm ²)	L*	a*	b*	C*	pH	SST (° Brix)	Ratio SST/AT
CC	33.73 b	53.90 b	29.55 d	12.00 a	3.81 c	12.60 c	3.08 c	15.14 a	6.75 c
RS	78.46 a	46.95 c	35.85 c	14.09 a	10.52 b	17.67 b	3.41 a	15.54 a	12.48 a
BPA	43.30 b	57.10 b	50.57 b	0.33 b	33.51 a	33.57 a	3.31 ab	15.52 a	10.79 b
BG	84.73 a	74.03 a	58.09 a	1.57 b	35.38 a	36.14 a	3.24 b	16.24 a	13.13 a

Letras diferentes dentro de una misma columna indican que existen diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre las variedades

El contenido de fenoles totales de los extractos metanólicos acidificados de las cuatro variedades analizadas, medido por el método de Folin-Ciocalteu, estuvo en el rango de 85.6-245.96 mg EAG/ 100 g PF. Los mayores valores se hallaron en los frutos de piel y pulpa roja. Estos resultados concuerdan con los hallados por Valero et al. (12). Vasantha Rupasinghe et al. (9) informan un valor de 198 mg EAG/ 100 g PF para una selección de ciruelo japonés, mientras que Kim et al. (3) hallaron un rango de valores, para seis cultivares, de 174-375 mg EAG/100 g PF.

La capacidad antioxidante, medida por el método del radical DPPH, expresado como µmol ET/100 g PF se muestra en la Tabla 2. Las ciruelas rojas poseen una CA entre 2-3 veces superior a las variedades de piel amarilla. La mayor capacidad antioxidante la presentó Ruby Sweet, 1269.78 µmol ET/100 g de PF. Los compuestos fenólicos predominantes en ciruelos son los derivados del ácido hidroxicinámico, como el ácido clorogénico y neoclorogénico. Estos podrían ser responsables de la mayor capacidad antioxidante de Ruby Sweet. Casita de chocolate superó a Ruby Sweet en el contenido de antocianinas. La mayoría de los compuestos fenólicos, particularmente las antocianinas, están concentradas en la piel de los frutos (18), pero en las variedades sanguíneas, la pulpa también podría contribuir a los valores hallados. El color de la piel podría estar correlacionado con el contenido de compuestos fenólicos (9), sin embargo el valor de a* (piel) para Casita de chocolate y Ruby Sweet no difirió significativamente.

Tabla 2. Capacidad antioxidante (CA), contenido de fenoles totales (CF) y antocianinas (A) de fruto entero de las variedades de ciruelo utilizadas en el ensayo. Los resultados son promedio de 10 frutos y se encuentran expresados en base fresca

Cultivar	CA (µmol ET/100g)	CF (mg EAG/100 g)	A (mg eq.Cianidin 3-glucósido/g)
CC	869.70 b	144.22 b	9.30 a
RS	1269.78 a	245.96 a	4.17 b
BPA	531.64 c	117.58 c	-
BG	401.81 d	85.60 d	-

Letras diferentes dentro de una misma columna indican que existen diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre las variedades

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron una significativa influencia del cultivar sobre el peso del fruto, la firmeza, el color, el ratio, la capacidad antioxidante, el contenido de fenoles y de antocianinas., observándose una diversidad en los tres últimos parámetros mencionados. Debido a que los cuatro cultivares analizados pertenecen a lotes implantados dentro de una misma superficie, conducida en forma similar, la variabilidad encontrada podría atribuirse al genotipo. Las variedades de ciruelas sanguíneas se destacaron por su elevada actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos (antocianinas), los cual las posiciona como materia prima interesante para ser utilizadas como colorantes naturales o fuente de sustancias bioactivas, para aditivar diferentes matrices alimenticias. El contenido de fenólicos, relacionado con la astringencia es un factor a considerar según el destino de la fruta.

Los resultados ameritan el desarrollo de tecnologías simples de aislamiento y purificación, y futuras evaluaciones de performance de esas sustancias en diferentes matrices alimenticias.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece los aportes realizados por el Proyecto Específico No. 1130043 “Estrategias para la Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios” PNAIyAV-INTA, para realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

- 1- Blazek, J. (2007). A survey of the genetic resources used in plum breeding. *Acta Horticulturae*. 734: 31-45.
1. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science Technology*. 28:25-30.
- 2- Fu, L.; Xu, B.T.; Xu, X.R.; Gan, R.Y.; Zhang, Y.; Xia, E.Q.; Li, H.B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*. 129: 345-350.
- 3- Kim, D.O.; Jeong, S.W.; Lee, C.Y. (2003). Antioxidants capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. 81: 321-326.
- 4- Stacewicz-Sapuntzakis, M.; Bowen, P.E.; Hussain, E.A.; Damayanti-Wood, B.I.; Farnsworth, N.R. (2001). Chemical composition and potential health effects of prunes: A Functional Food? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 41: 251-286.
- 5- Fanning, K.J.; Topp, B.; Russell, D.; Stanleyd, R.; Netzel, M. (2014). Japanese plums (*Prunus salicina* Lindl.) and phytochemicals – breeding, horticultural practice, postharvest storage, processing and bioactivity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94: 2137–2147.
- 6- Bobrich, A.; Kent, J.; Fanning, K.J.; Rychlik, M.; Russell, D.; Top, B.; Netzel, M. (2014). Phytochemicals in Japanese plums: impact of maturity and bioaccessibility. *Food Research International* 65:20–26.
- 7- Usenik, V.; Štampar, F.; Veberič, R. (2009). Anthocyanins and fruit colour in plums (*Prunus domestica* L.) during ripening. *Food Chemistry*. 114. 529-534.
- 8- Piga, A.; Del Caro, A.; Corda, G. (2003). From plums to prunes: influence of drying parameters of polyphenols and antioxidants activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 12, 3675–3681.
- 9- Vasantha Rupasinghe, H.P.; Jayasankar, S.; Lay, W. (2006). Variation in total and antioxidant capacity among European plum genotypes. *Scientia Horticulturae*. 108: 243-246.
- 10- Crisosto, C.H.; Garner, D.; Crisosto, G.M.; Bowerman, E. (2004). Increasing ‘Blackamber’ plum (*Prunus salicina* Lindell) consumer acceptance. *Postharvest Biology and Technology*. 34: 237-244.
- 11- Li, Y.; Lai, P.; Chen, J.; Shen, H.; Tang, B.; Wu, L.; Weng, M. (2016). Extraction optimization of polyphenols, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities from *Prunus salicina* Lindl, *Food Science and Technology*. 36. On-line versión ISSN 1678-457x
- 12- Valero, Y.; Colina, J.; Ineichen, E. (2012). Efecto del procesamiento sobre la capacidad antioxidante de la ciruela criolla (*Prunus domestica*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 62: 363-369.
- 13- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 28, 25-30.
- 14- Swain, T.; Hillis, W.E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 10:63-68.
- 15- Lee, J. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*. 88: 1269-1278.
- 16- Drake, S.R.; Proebsting, E.I.; Jr Spayd, S.E. (1982). Maturity index for the color grade of canned dark sweet cherries. *Journal of the American Society of Horticultural Science*. 107: 180-183.
- 17- Gao, L.; Mazza, G. (1995). Characterization, quantitation and distribution of anthocyanins and colourless phenolics in sweet cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 343-345.
- 18- Tomás-Barberán, F.A.; Gil, M.I.; Cremin, P.; Waterhouse, A.L.; Hess-Pierce, B.; Kader, A.A. (2001). HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4748-4760.

HARINAS DE ALGARROBAS DEL NOROESTE CORDOBÉS: PROPIEDADES QUÍMICAS Y FUNCIONALES

D. Labuckas^{1,3}, M. Arzac¹, M. Ledesma², A. Domina¹, C. Carranza², L. Rovetto¹, R. Aguilar², M. Silva² y M.J. Martínez²

¹Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos- Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales- Universidad Nacional de Córdoba (ICTA--FCEFYN-UNC).

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-Estación Experimental Manfredi y Estación Forestal villa Dolores (INTA-EEA-Manfredi y EF Villa Dolores).

³Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-Universidad Nacional de Córdoba (IMBIV-CONICET-UNC).

Correo electrónico: martinez.mariajose@inta.gob.ar ; dilabuckas@unc.edu.ar

RESUMEN

Prosopis chilensis (C) y *P. flexuosa* (F) son especies de algarrobos emblemáticas de los bosques de Traslasierra, Córdoba, y sus algarrobos son los frutos nativos de mayor importancia histórica en la alimentación humana del territorio. Las harinas de estas especies están codificadas y representan un alimento energético gracias a su alto contenido de carbohidratos solubles (sacarosa), gran aporte de fibras, aminoácidos esenciales y propiedades funcionales. El objetivo del trabajo fue caracterizar harinas obtenidas a partir de la molienda de frutos de estas dos especies procedentes de Villa Dolores, Córdoba. En las muestras rotuladas como Harina (HC y HF) y Afrecho (AC y AF), mediante procedimientos estandarizados y por duplicado, se determinaron los contenidos de macronutrientes, fenoles totales; la solubilidad en función del medio; capacidad de absorción de agua y de aceite (CAW y CAO, respectivamente); los valores obtenidos se analizaron estadísticamente y se encontró que algunos parámetros presentaron diferencias entre especies y entre productos molidos (Harina y Afrecho). Los resultados indican que, en general, los valores son acordes a los del género *Prosopis*; las propiedades dependieron de la muestra y de la especie; los productos obtenidos a partir de ambas especies de algarrobos de Traslasierra, Córdoba, aportan proteínas y poseen propiedades que los torna aptos para incorporarlos como ingredientes en la elaboración de alimentos.

Palabras clave: frutos de algarrobo, composición química, propiedades funcionales

ABSTRACT

Prosopis chilensis (C) and *P. flexuosa* (F) are emblematic tree species from the Traslasierra forests, Córdoba, their fruits being of greater historical importance in the human diet of the territory. The flours of these species are encoded and represent an energy food thanks to their high content of soluble carbohydrates (sucrose), great fiber supply, essential amino acids and functional properties. The objective of the work was to characterize flours obtained from the grinding of fruits of these two species from Villa Dolores, Córdoba. In the samples labeled as Flour (HC and HF) and Afrecho (AC and AF), by means of standardized procedures and in duplicate, the contents of macronutrients, total phenols were determined; the solubility as a function of the medium; water and oil absorption capacity (CAW and CAO, respectively); the values obtained were analyzed statistically and it was found that some parameters showed differences between species and between milled products (Flour and Bran). The results indicate that, in general, the values are in accordance with those of the genus *Prosopis*; the properties depended on the sample and the species; The products obtained from both species of carob from Traslasierra, Córdoba, provide proteins and possess properties that make them suitable for incorporating them as ingredients in food processing.

Keywords: Carob fruit, chemical composition, functional properties.

INTRODUCCIÓN

Prosopis chilensis (C) y *P. flexuosa* (F) son especies de algarrobos emblemáticas de los bosques de Traslasierra, Córdoba, y sus algarrobos son los frutos nativos de mayor importancia histórica en la alimentación humana del territorio. Las harinas de estas especies están incorporadas al Código Alimentario Argentino, en su Artículo 681 (1), y representan un alimento energético que también aporta nutrientes beneficiosos para la salud humana. Los frutos de las especies del género *Prosopis* son considerados como importante recurso alimentario, rico en carbohidratos (entre 45–51%) y proteínas (entre 7-17%) que aportan fibra, aminoácidos esenciales y minerales esenciales; aunque presentan como aminoácidos limitantes a tirosina y metionina/cisteína (2, 3), por otra parte presentan propiedades funcionales interesantes para incorporarlos en la formulación de alimentos. Las propiedades funcionales se pueden definir como las

propiedades físicas y químicas que afectan el comportamiento de los componentes de un alimento durante su procesamiento, almacenamiento y consumo (4). Dado que un sistema alimentario está constituido principalmente por componentes tales como lípidos, proteínas y carbohidratos, en diferentes proporciones, es que puede presentar una amplia gama de estas propiedades; en particular, las de proteínas pueden clasificarse según el predominio de las interacciones, en tres grupos, las dependientes de interacciones proteína-

agua; las dependientes de interacciones proteína-proteína y las de superficie. Entre las del primer grupo se encuentran las propiedades de adsorción, de absorción, solubilidad, viscosidad; el segundo grupo incluye las propiedades de coagulación, gelificación y formación de estructuras; en el de superficie es donde interviene la capacidad de la proteína para difundir hasta la interfase (agua-aire o agua-aceite) y formar una película estable. Determinar estas propiedades funcionales adquiere importancia al momento de utilizar una dada matriz para la elaboración de alimentos; por ejemplo, los ingredientes con elevada capacidad de absorción y retención de agua suelen ser empleados para formular embutidos, masas y geles; mientras que productos altamente solubles se utilizan para bebidas y alimentos espumados o emulsionados; los que presentan mayor capacidad de interacción proteína-proteína influyen en la elaboración y calidad de productos tales como quesos, yogures, salchichas y masas; los que poseen propiedades espumantes y emulsificantes son deseables para el desarrollo de diversos alimentos, entre ellos, los merengues, *souffles*, *mousses*, salsas, cremas, aderezos, helados. El **objetivo** del trabajo fue caracterizar harinas obtenidas a partir de la molienda de frutos de dos especies de algarrobo, *P. chilensis* (C) y *P. flexuosa* (F), que crecen en Villa Dolores, al noroeste de Córdoba, Argentina (INTA-EEA Manfredi y EF Villa Dolores).

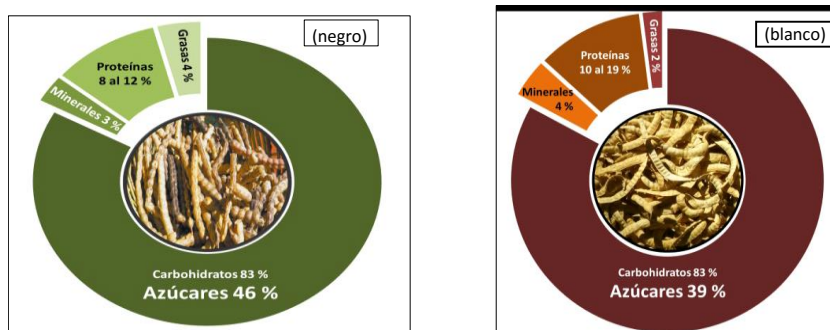


Figura N° 1: Diagrama de tortas indicando la composición proximal de los frutos algarrobo negro y blanco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: harina (HC y HF) y afrecho molido (AC y AF) procedentes de Traslasierra, Córdoba (INTA- EEA Manfredi; EF Villa Dolores). Análisis realizados: se determinaron según Labuckas (5), los contenidos de humedad, de cenizas, proteínas (mediante Kjeldhal, Nx6,25), otros (carbohidratos y aceite, por diferencia), los resultados se expresan como g/100g, sobre base seca (sbs); compuestos polifenólicos totales (Fenoles Totales, por reacción con Folin-Ciocalteu, resultados expresados como ácido gálico equivalente, AGE, mg/g). Paralelamente, se evaluaron las propiedades de solubilidad proteica en función del pH (NaOH y HCl para ajustar el pH en el rango entre 2 y 10); en agua destilada y en cloruro de sodio (NaCl 0,6M), capacidad de absorción de agua y de aceite (CAW y CAO, respectivamente). Con los valores obtenidos, por duplicado, se realizó el análisis estadístico (promedio, desvíos estándar y LSD Fisher <0,05) mediante el programa InfoStat (6).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los análisis realizados en las muestras de algarrobo de *P. chilensis* y de *P. flexuosa* - HC, HF, AC y AF- se presentan en los gráficos numerados del 2 al 6. En cuanto al contenido de Humedad (g/100g), los mayores valores ($p < 0,05$) se encontraron en las muestras HF y AC, resultado que se atribuye a la capacidad de unir agua por parte de los compuestos insolubles e hidrofóbicos remanentes, tales como sales y carbohidratos (7); sin embargo, se encuentran dentro del rango (4% a 10%) informado para algarrobo de diferentes especies (3). En Proteínas (g/100g, sbs) el producto HC presenta el mayor contenido ($p < 0,05$), resultado que se atribuye a la especie de algarrobo, *P. chilensis*, procedente de Córdoba, aunque los valores se encuentran dentro del rango (6,86% - 13,2%) informado para algarrobo de distintas especies (8, 3). El contenido en Cenizas (g/100g, sbs) se encuentra dentro del rango (3,4 - 4,8 g/100g, sbs) informado para diversas especies de algarrobo (8, 9, 3); aunque las harinas (HC y HF) presentan valores superiores ($p < 0,05$) a los de las de afrecho (AC y AF), es decir, los resultados dependen del tipo de muestra utilizada y se atribuyen a la matriz de origen. En cuanto a los Fenoles totales (FT, mg/g, sbs), las muestras AC y AF presentan valores superiores ($p < 0,05$) a los de HC y HF, resultado que se atribuye al tipo de muestra (afrecho vs harina); por otra parte, no se encontró información relacionada al contenido de compuestos polifenólicos en especies de algarrobo.

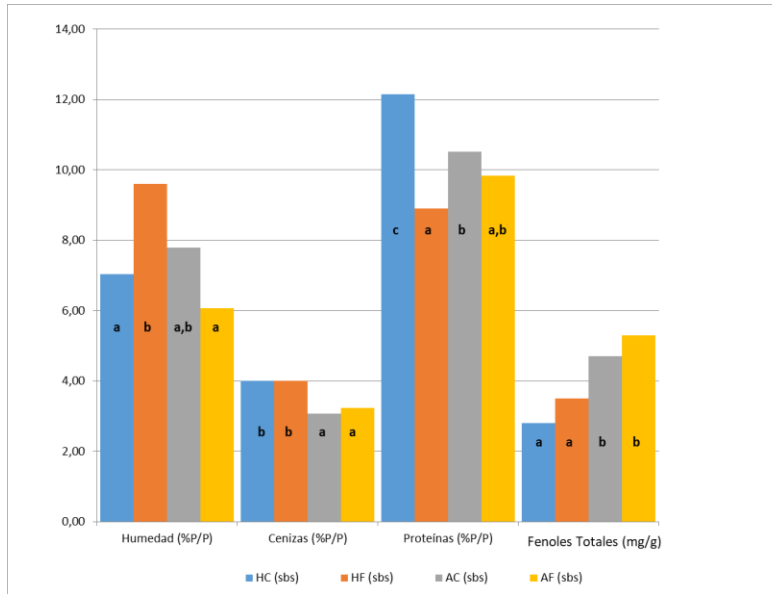


Figura N° 2: Composición química: contenido de Humedad [expresada como porcentaje (%P/P)]; Cenizas; Proteínas [expresados como %P/P, sobre base seca (sbs)] y de compuestos polifenólicos totales (Fenoles Totales, expresados como mgAGE/g, sbs). Letras distintas en el mismo componente indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Valores medios \pm desvío estándar.

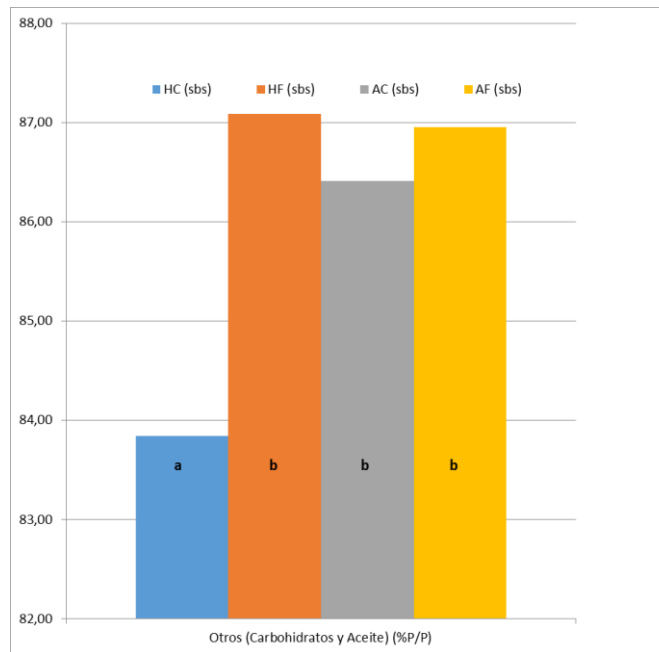


Figura N° 3: Contenido de Otros (Carbohidratos y Aceite) [expresados como %P/P, sobre base seca (sbs)]. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Valores medios \pm desvío estándar.

Propiedades Funcionales (gráficos N° 4, N° 5 y N° 6): la **CAW** implica la interacción de los componentes de la matriz con el agua; el menor valor ($p < 0,05$) se encontró en la muestra HF y se atribuye a un inferior contenido de constituyentes hidrofílicos (acorde con el menor contenido proteico) y también a la especie de algarrobo, ya que la CAW de *P. flexuosa* (HF y AF) resultó inferior ($p < 0,05$) a la de *P. chilensis*. Respecto a la **CAO**, se la considera un índice hidrofóbico de las harinas (3); se relaciona con las características organolépticas como la textura y la retención de sabores, especialmente en productos de panadería donde la absorción de aceite es deseada; de interés para el mejoramiento de la vida útil; o como vehículo de sustancias liposolubles, vitaminas y antioxidantes (10, 11, 5); la menor CAO se encontró en la muestra AC, además, se observa que los resultados dependen de la especie de algarrobo puesto que la CAO de *P. flexuosa* (HF y AF) es superior a la de *P. chilensis* (HC y AC). En cuanto a la solubilidad proteica (SP) en función del medio (Tabla N° 3): al analizar la **SP en relación al pH** se observan perfiles en “U” típicos para las proteínas en este medio, con valores máximos a pH extremos y mínimos a pH ácido. El algarrobo posee proteínas, entre las que predominan las globulinas (50% a 90%) seguidas por las albúminas, ambas proteínas de reserva de las leguminosas (3), solubles en soluciones salinas diluidas y en agua destilada, respectivamente (12); por otra parte, también contiene compuestos polifenólicos que afectan la solubilidad proteica (13, 14, 5). Se observa que a pH 6 todas las muestras presentaron un mínimo de solubilidad proteica; un perfil similar ($p < 0,05$) para las muestras HC y HF, excepto a pH 8 donde la muestra HC presentó menor solubilidad que se atribuye a la cantidad (si bien HC posee mayor contenido proteico afectará la disponibilidad); al tipo (en ambas muestras las albúminas y globulinas, consideradas hidrofílicas) y a la disponibilidad de las proteínas [la que se considera menor en HC debido a una mayor interacción agua- proteínas (albúminas)]; por otra parte, los resultados indican que la solubilidad proteica no se vería afectada por la presencia de compuestos polifenólicos de las harinas (HC y HF). Entre AC y AF las diferencias no fueron significativas ($p < 0,05$) en todo el rango de pH analizado. Al comparar entre todas las muestras, se observa que las proteínas de las muestras AC y AF resultaron más solubles que las de HC y HF, lo que se atribuye a la presencia de compuestos polifenólicos que favorecería la interacción proteína-agua. En cuanto a la **SP en agua y en solución salina** los resultados indican una solubilización selectiva, se encontró que *P. chilensis* presenta menor ($p < 0,05$) solubilidad en agua destilada (menor contenido de albúminas) respecto a *P. flexuosa*; que en la muestra HF predominan las globulinas y que la muestra HC es la de menor capacidad de establecer enlaces iónicos. Por otra parte, la presencia de compuestos polifenólicos totales afecta, de manera favorable, la capacidad de interacción proteína-sistema disolvente mediante interacciones iónicas que estarían disponibles en las proteínas presentes en las muestras AC y AF.

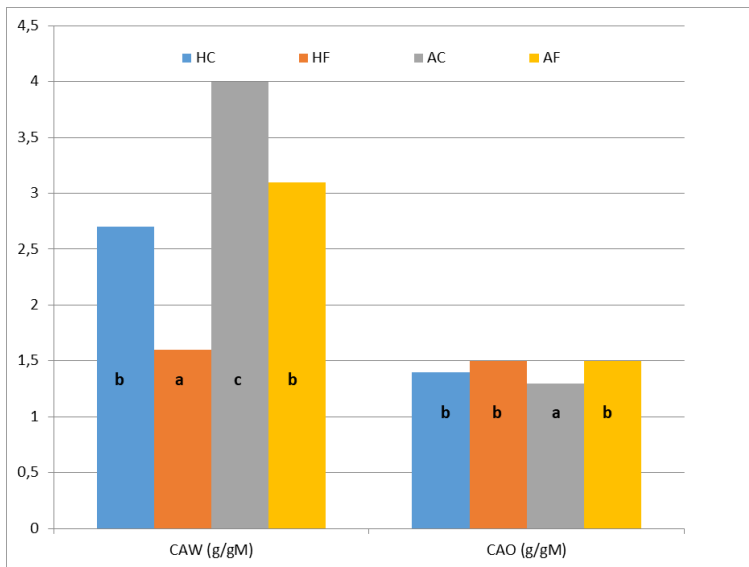


Figura N° 4: Capacidad de absorción de agua y de aceite (CAW y CAO, expresadas como g/g, respectivamente). Letras distintas en una misma propiedad funcional indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Valores expresados como promedio y desvío estándar.

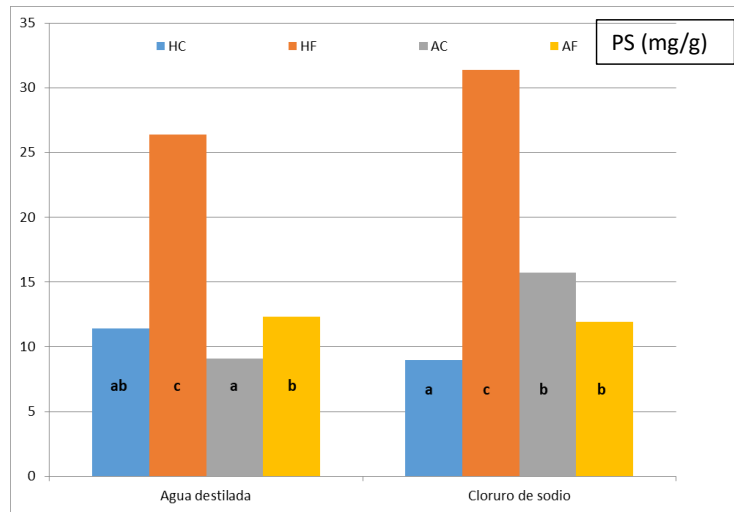


Figura N° 5: Solubilidad proteica en función del disolvente, agua; cloruro de sodio (PS expresada como mg/g muestra). Letras distintas en el mismo disolvente indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores se expresan como promedio y desvío estándar.

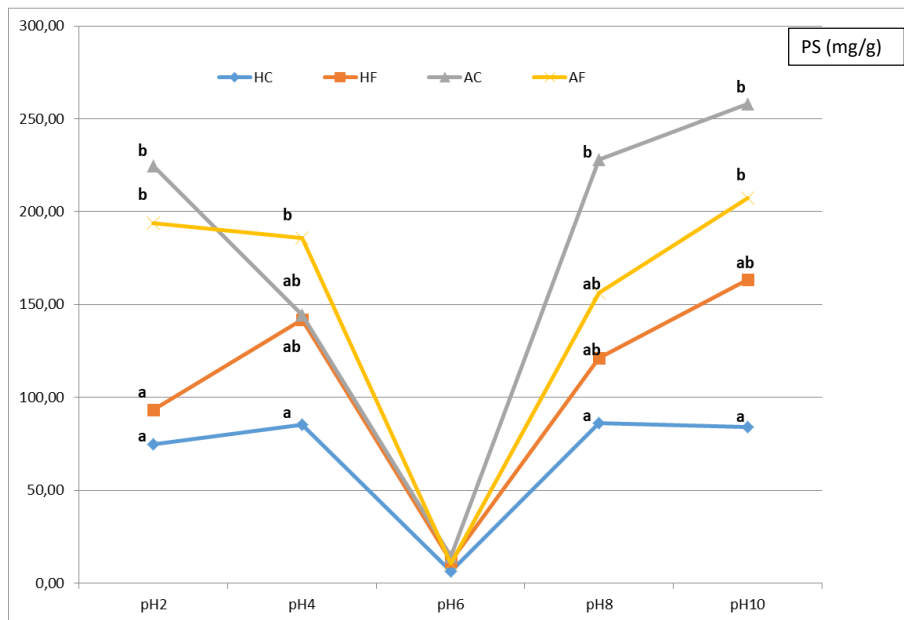


Figura N° 6: Solubilidad proteica en función del pH (PS expresada como mg/g muestra). Letras distintas en el mismo valor de pH indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores se expresan como promedio y desvío estándar.

CONCLUSIONES

Los resultados indican que, en general, los valores son acordes a los informados para el género *Prosopis*; las propiedades dependieron de la muestra y de la especie; los productos obtenidos a partir de ambos algarrobos de Traslasierra, Córdoba, aportan proteínas y poseen CAW y CAO que los torna aptos para incorporarlos como ingredientes en la elaboración de alimentos, a saber:

Las harinas de algarrobos analizadas contienen proteínas (en mayor cantidad las de la especie *P. chilensis*) que podrían ser utilizadas como ingrediente en la elaboración de alimentos a fin de enriquecer, suplementar, complementar o incrementar el aporte proteico de productos elaborados con harinas tradicionales. Por otra parte, teniendo en cuenta la solubilidad proteica y los compuestos polifenólicos (mayores valores de ambos componentes en las muestras de Afrecho), las harinas también serían aptas para la formulación de productos proteicos líquidos, o de bebidas con mayor aporte de proteínas.

Atento a que la CAW tiene efecto en la textura, el aroma, la apariencia y el comportamiento de los alimentos y es considerada una propiedad funcional fundamental en alimentos viscosos se puede decir que las harinas de estas algarrobos (mejor las provenientes de *P. chilensis*) serían aptas para incluirlas en la elaboración de productos tales como sopas, salsas, masas y productos para hornear

Según los resultados obtenidos al evaluar la CAO - propiedad funcional que brinda información de interés, las harinas de estas algarrobos analizadas se podrían utilizar para mejorar la vida útil; aportar textura, retener sabores, para vehiculizar sustancias liposolubles, vitaminas y antioxidantes y, especialmente, para elaborar productos de panadería donde la absorción de aceite es deseada; es decir que las harinas analizadas (mejor las provenientes de *P. flexuosa*) serían aptas para incorporarlas en la formulación de productos destinados a frituras, productos cárnicos, de panadería y para sopas.

Es decir que las harinas de algarrobos provenientes de *P. chilensis* o de *P. flexuosa*, se podrán utilizar ambas en conjunto, una combinación adecuada de ellas, o en forma individual (una u otra), dependiendo del destino final o del producto deseado.

AGRADECIMIENTOS

La actividad forma parte de los proyectos PROFEDER PROFAM 776207, PRET CORDO NO-1262204 y PNAIyAV1130043-41; también se encuentra financiada por SECYT - UNC. PID. : Res. N°313/16.

REFERENCIAS

1. Código Alimentario Argentino: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XIX.pdf
2. González Galán, A., Diarte Correa, A., Patto de Abreu, C.M., Piccolo Barcelos, M.F. (2008). Caracterización química de la harina del fruto de *Prosopis spp.* procedente de Bolivia y Brasil. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 58 (3): 309-314.
3. Mom, M.P. (2012). Caracterización estructural y propiedades funcionales de las harinas de los frutos de *Prosopis alba* Griseb., *P. chilensis* (Molina) Stuntz emend. Burkart y *P. flexuosa* DC. Desarrollo de un proceso de secado, molienda y mezcla para optimizar la calidad del producto. Tesis Doctoral. www.digital.bl.fcen.uba.ar: 1-117.
4. Kinsella, J.E. (1976). Functional properties of food: a review. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition 7: 219-280.
5. Labuckas, D.O. (2013). Obtención de harina de nuez: aspectos químico-nutricionales y funcionales. Tesis Doctoral. FCEfyN-UNC 1-145.
6. Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
7. Salgado, P.R., Molina Ortíz, S.E., Petruccelli, S., Mauri, A.N. (2011). Sunflower protein concentrates and isolates prepared from oil cakes have high water solubility and antioxidant capacity. Journal American Oil Chemistry 88: 351-360.
8. Silva, M.P., Martínez, M.J., Coirini, R., Brunetti, M.A., Balzarini, M., Karlin, U. (2000). Valoración nutritiva del fruto del algarrobo blanco (*Prosopis chilensis*) bajo distintos tipos de almacenamiento. Multequina 9:65-74.
9. Chagra Dib, E.P., Valdivia, C.L., Vera, T.A., Leguiza, H.D. (2000). Efecto de la suplementación invernal con frutos de algarrobo y heno de alfalfa sobre la producción de leche de cabras criollas y el crecimiento de los cabritos lechales. INTA. Centro Regional Cuyo. Estación Experimental Agropecuaria. Junín.
10. Sathe, S.K. (2002). Dry bean protein functionality. CRC Critical Reviews in Biotechnology 22: 175-223.
11. Granito, A., Guerra, M., Torres, A., Guinard, J. (2004). Efecto del procesamiento sobre las propiedades funcionales de *Vicia sinensis*. Interciencia 29: 521-526.
12. Osborne, T. (1924). The vegetable proteins. 2° edición. Longmans-Green (Ed.).
13. Sze-Tao, K.W.C., Sathe, S.K. (2000). Walnut (*Juglans regia* L.): proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein in vitro digestibility. Journal of the Science of Food and Agriculture 80: 1393-1401.
14. Labuckas, D.O., Maestri, D.M., Perelló M., Martínez, L.M., Lamarque, A.L. (2008). Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: antioxidant activity and interactions with proteins. Food Chemistry 107(2): 607-612.

PROYECTO ESPECÍFICO

Estrategias para la diferenciación de alimentos y el desarrollo de nuevos productos alimentarios.

PROYECTO INTEGRADOR Optimización de calidad integral y otras estrategias de agregado de valor.

INCIDENCIA DE DIFERENTES CEPAS DE LEVADURAS (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*) SOBRE LOS AROMAS FERMENTATIVOS DE VINOS CV. MALBEC DE MENDOZA, ARGENTINA

M. Assof¹, M. Fanzone¹, S. Sari², E. Bolcato², M. Bucolo¹, V. Jofré¹

¹Laboratorio de Aromas y Sustancias Naturales. Estación Experimental Agropecuaria Mendoza-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA Mendoza INTA). San Martín 3853, 5507 Mayor Drummond, Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina.

²Centro de Estudios Enológicos. Estación Experimental Agropecuaria Mendoza-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA Mendoza INTA). San Martín 3853, 5507 Mayor Drummond, Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina.

Correo electrónico: assof.mariela@inta.gob.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la incidencia de diferentes cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* sobre los aromas fermentativos de vinos cv. Malbec de Mendoza, Argentina. Por otro lado, se pretende estudiar el metabolismo de hexosas, iones amonio y aminoácidos y su relación con la producción de los aromas fermentativos. Se elaboraron tres vinos utilizando una cepa de levadura comercial (D) y dos cepas de levadura aisladas (I: aisladas de Malbec, B: aisladas de Bonarda). El ensayo fue realizado por triplicado. Las levaduras nativas y las bacterias lácticas se inhibieron usando metabisulfito de sodio y lisozima, respectivamente. El peso, la densidad y la temperatura del tanque se controlaron durante la fermentación alcohólica. Los parámetros generales, compuestos volátiles y aminoácidos se analizaron en mostos, mostos fermentativos y vinos. Los aromas fermentativos se determinaron mediante Microextracción en Fase Sólida en Espacio de Cabeza y Cromatografía de Gases con Detector de Masas. Los aminoácidos se analizaron por derivatización precolumna con cloroformiato de 9-fluorenilo y Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector Arreglo de Diodos. Glucosa, fructosa e ión amonio se determinaron por ensayo enzimático y espectrofotometría UV-V. Los vinos producidos por las levaduras D finalizaron la fermentación alcohólica a los 7 días, mientras que los producidos por las levaduras I y B finalizaron a los 9 días. El amonio residual en los vinos fue del 8%, 17% y 28% para D, I y B, respectivamente. Por lo tanto, las cepas de levadura D fueron más eficientes para metabolizar estos compuestos nitrogenados. La glucosa residual y la fructosa no mostraron diferencias significativas en los vinos. Sin embargo, la levadura D fue menos eficiente para metabolizar la fructosa que las otras levaduras, durante la fermentación alcohólica. La levadura D produjo 0,14% de etanol más que yo y 0,24% más que B. El nivel más alto de acidez volátil fue producido por las levaduras I. Los vinos obtenidos con levaduras D biosintetizaron más aminoácidos que las levaduras aisladas, lo cual podría producir alteraciones microbianas en los vinos terminados. La prolina, un aminoácido no metabolizado por las levaduras en anaerobiosis, fue el principal aminoácido en todos los vinos. Los vinos D presentaron una mayor diversidad de aromas fermentativos con respecto a los vinos I y B, pero los vinos B presentaron mayor concentración de los mismos. Es decir, que los vinos con alta concentración de alcoholes superiores provienen de levaduras con bajas tasas de metabolismo nitrogenado. El pentanol fue el alcohol superior más abundante en vinos I y D cuyas notas negativas (disolvente, alcohol fusel) no son deseadas, mientras que en B fue el 2-feniletanol, que aporta descriptores positivos en vinos jóvenes (rosas). Este trabajo proporciona información relevante sobre la dinámica de fermentaciones alcohólicas de levaduras nativas, aisladas de viñedos regionales y el impacto sensorial que generaría su uso en la producción de vinos cv. Malbec. Por otro lado, sienta las bases para seguir evaluando las causas de las fermentaciones lentas y detenidas, ya que la disponibilidad y efectividad para metabolizar recursos nitrogenados es uno de los principales problemas.

Palabras clave: levaduras, aromas fermentativos, aminoácidos, glúcidos, Malbec

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the incidence of different *Saccharomyces cerevisiae* yeasts strains on the fermentative aromas of Malbec wines from Mendoza, Argentina. On the other hand, we pretend to study the metabolism of hexoses, ammonium and amino acids and their relationship with the production of the fermentative aromas. Three wines were made using a commercial yeast strain (D) and two isolated yeast strains (I: isolated from Malbec, B: isolated from Bonarda). The assay was made by triplicate. Native yeasts and lactic bacteria were inhibited using sodium metabisulfite and lysozyme respectively. Tank weight, density and temperature were controlled during alcoholic fermentation. General parameters, volatile compounds and amino acids were analyzed in musts, fermentative musts and wines. Fermentative aromas were determined by Headspace Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography accopled by Mass Spectrometer. Amino acids were analyzed using derivatization pre column with 9-fluorenyl chloroformate and High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector. Glucose, fructose and ammonia were studied by enzymatic assay and Spectrophotometry UV-V. The end of fermentation was reached in 7 days to wines produced by D yeast strains and 9 days with I and B. Residual ammonium in wines was 8%, 17% and 28% to D, I and B respectively. Hence, D yeast strains were more efficient to metabolize nitrogen compounds. Residual glucose and fructose not showed significant differences in wines. Nevertheless D yeast was less efficient to metabolize fructose than the others yeasts during alcoholic fermentation. D yeast produced 0,14% of ethanol more than

I and 0,24% more than B. The highest level of volatile acidity was produced by I yeast strains. Wines obtained with D yeasts biosynthesized more amino acids than isolated yeasts. This could produce microbial alterations in finished wines. Proline, a non metabolized amino acid by yeast in anaerobiosis, was the major amino acid in all wines. D wines presented more diversity of fermentative aroma respect to I and B wines but B wines had the highest concentration. That is the wines with high concentration of higher alcohols come from of the yeasts with low rate of nitrogenated metabolism. Pentanol was the highest higher alcohol in I and D wines and had a negative notes (solvent, fusel alcohol), meanwhile in B was the 2-feniletanol with positive descriptors to young wines (roses). This work provides relevant information regarding the dynamics of alcoholic fermentations of native yeasts, isolated from regional vineyards and the sensory impact that would generate their use in the production of Malbec wines. On the other hand, it lays the foundations to continue evaluating the causes of the stuck and sluggish fermentations, since among the principal causes is in the availability and effectivity to metabolize nitrogen resources.

Keywords: volatile organic compounds, Malbec, wines, yeasts, amino acids

INTRODUCCIÓN

El aroma del vino es uno de los caracteres sensoriales más complejos que existe en la naturaleza. Esto se debe a la variedad de compuestos orgánicos volátiles presentes, y a que éstos cambian durante todo el proceso de vinificación. Se generan a partir de mecanismos biológicos, bioquímicos y tecnológicos que darán como resultado una diversidad química que no se observa en otras bebidas producidas en el mundo (1). Está conformado por compuestos orgánicos volátiles que pueden clasificarse de acuerdo a su procedencia en aromas primarios (varietales y prefermentativos), son los que provienen de la uva; aromas secundarios (aromas fermentativos), producidos a partir del metabolismo de levaduras y bacterias y aromas terciarios, que se generan durante la conservación y añejamiento de los vinos (1, 2).

Los aromas fermentativos surgen a partir del metabolismo nitrogenado (ciertos aminoácidos) y glucídico (glucosa, fructosa) de las levaduras durante la fermentación alcohólica de los mostos (3). El perfil de estos compuestos en los vinos se ve afectado por el tipo de levaduras que lleven a cabo las fermentaciones (4), el contenido compuestos nitrogenados y glúcidos del mosto y las condiciones en las que se desarrollan los procesos, tales como temperatura, pH y nutrientes (5, 6, 7, 8).

Representan los compuestos orgánicos volátiles más abundantes respecto del total cuantificado en vinos tintos y pueden encontrarse entre ellos alcoholes superiores, ésteres, aldehídos, cetonas, compuestos volátiles azufrados y ciertos terpenos (CITAS). Aportan a los vinos jóvenes las notas frescas y frutales, sin embargo, algunos de ellos (principalmente ciertos alcoholes superiores y ésteres) tienen impacto negativo en el perfil sensorial, con notas a solvente, cetona y frutas sobremaduras (CITAS). Dado su impacto directo sobre el aroma del vino, los aromas fermentativos y los factores que influyen sobre ellos, son ampliamente estudiados.

Los compuestos nitrogenados no solamente están relacionados con la producción de aromas fermentativos, sino que además, son un factor limitante para el normal desarrollo de las fermentaciones alcohólicas. Cumplen importantes funciones metabólicas ya que a partir de ellos las levaduras biosintetizan proteínas funcionales (enzimas) y estructurales (manoproteínas). Los principales compuestos nitrogenados afectados al metabolismo de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* son los aminoácidos (como fuente nitrogenada orgánica) y el ión amonio (como fuente nitrogenada inorgánica).

Palma et al. (9) observaron que en medios limitados de compuestos nitrogenados la velocidad de captación de glucosa es menor, por tanto la fermentación se ve ampliamente afectada, aunque esto no implica que el proceso se detenga. Magasanik y Kaiser (10) demostraron que en medios donde la glucosa es la principal fuente de carbono y energía y el amonio es la única fuente de nitrógeno disponible, la tasa de crecimiento de las levaduras depende de la capacidad de las levaduras para asimilar el ión amonio. Treu et al. (11) demostraron que diferentes cepas de levaduras *S. cerevisiae* presentan diferentes aptitudes metabólicas para la asimilación de fuentes nitrogenadas.

Debido al impacto sensorial de los aromas fermentativos y a que estos están directamente relacionados con el metabolismo de aminoácidos por parte de las levaduras y a que no existen referencias de esta temática con levaduras aisladas de viñedos de la región, es que se propone el siguiente este trabajo de investigación. Cabe destacar, que este trabajo sentará las bases para poder evaluar a futuro posibles causas de las fermentaciones detenidas, así como la aparición de aminos biógenos y carbamato de etilo, compuestos derivados de aminoácidos que tienen impacto sobre la salud.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cosecha de la uva

Las uvas cv. Malbec se cosecharon en grado de madurez industrial (25°Brix) en cajas plásticas de 20 kg y fueron inmediatamente trasladadas a la bodega y colocadas en un playón al abrigo del sol para homogeneizar la temperatura.

Elaboración de vino

El vino fue elaborado en la Planta Piloto de la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza (EEA Mendoza INTA). Para ello se procedió a la molienda y descobajado de la uva y el mosto fue colocado en en tanques plásticos de grado alimentario de 25 L de capacidad, hasta alcanzar los 20 kg. El estudio se realizó por triplicado. Se adicionó metabisulfito de sodio y lisozima para inhibir la flora nativa de levaduras y bacterias, respectivamente. Los tanques se trasladaron a una sala de fermentación acondicionada para luego inocular con las cepas de levaduras seleccionadas (30 g.hL⁻¹). Se utilizó una cepa de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* comercial y

dos cepas de levaduras *S.cerevisiae* aisladas de viñedos de Malbec y Bonarda por el área de Microbiología de la EEA Mendoza. No se adicionaron activadores de fermentación durante el proceso de forma tal que las levaduras únicamente tuvieron como fuente nitrogenada el ión amonio y aminoácidos de la uva. Durante la fermentación alcohólica se realizaron dos pisoneos manuales para oxigenar el sombrero y favorecer la extracción de compuestos de interés de los hollejos. Se realizaron controles de pH, grados Brix, temperatura, peso de tanque y densidad durante el desarrollo de las fermentaciones alcohólicas. Una vez obtenidos los vinos, se realizó el ajuste de la acidez total con ácido tartárico de uso enológico (7 g.L^{-1}) y el descube de los mismos. Se extrajeron muestras del mosto, mosto en fermentación y vino terminado y se conservaron hasta el momento de su análisis a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los tratamientos propuestos son:

D: uso de cepa de levaduras comerciales D254 de la firma Lallemand (Francia)

I: uso de cepa de levaduras aislada de uvas cv. Malbec

B: uso de cepa de levaduras aislada de uvas cv. Bonarda

Análisis químicos

Parámetros de rutina

Se determinaron parámetros analíticos generales en bayas ($^\circ\text{Brix}$, acidez titulable, pH), mostos en fermentación (densidad y temperatura) y vinos (alcohol, pH, acidez titulable, acidez volátil, anhídrido sulfuroso libre y total), siguiendo los protocolos establecidos por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2017).

Determinación de ión amonio

Se realizó la determinación de ión amonio en mostos, mostos en fermentación y vinos por método diferencial birreactivo con enzima glutamato deshidrogenasa y posterior medición absorciométrica con Espectrofotómetro UV-Visible de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Roche, Alemania).

Determinación de glucosa y fructosa

Se realizó la determinación de glucosa y fructosa en mostos, mostos en fermentación y vinos por método diferencial birreactivo con enzima hexokinasa y posterior medición absorciométrica con Espectrofotómetro UV-Visible de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Roche, Alemania).

Determinación de α -aminoácidos libres

El análisis de α -aminoácidos libres se realizó por derivatización precolumna con Cloruro de fluorenilmetiloxycarbonilo (FMOC) y posterior separación, identificación y cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos. El método analítico es una adaptación del propuesto por Fabiani et al. (12) y validación realizada por el Laboratorio de Aromas y Sustancias Naturales.

Determinación de compuestos orgánicos volátiles

Los compuestos orgánicos volátiles se extrajeron de las muestras por Microextracción en Fase Sólida en Espacio de Cabeza utilizando una fibra con recubrimiento de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB). La separación, identificación y cuantificación se obtuvo mediante Cromatografía Gaseosa con Detector de Masas. El método analítico fue optimizado y validado por el Laboratorio de Aromas y Sustancias Naturales (13).

Análisis estadístico

La evaluación estadística de los datos se realizó mediante el empleo del programa Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.11. Se emplearon técnicas quimiométricas mediante el empleo del análisis de la varianza (ANOVA), análisis de componentes principales (ACD) y análisis discriminante lineal (ADL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dinámica de las fermentaciones alcohólicas

Durante el proceso fermentativo, el recuento de levaduras se reduce fuertemente debido al incremento del etanol y a cambios en la composición de los mostos, principalmente dado por el nitrógeno fácilmente asimilable (14). Sumado a ello, las diferentes cepas de levaduras presentan diferentes aptitudes metabólicas para la asimilación de fuentes nitrogenadas y éstas a su vez, condicionan la captación de glucosa. Bajo este marco, es de esperar que diferentes cepas de *S.cerevisiae* tengan una dinámica de fermentación alcohólica diferente, tal como se observa en el gráfico 1. La fermentación alcohólica finalizó a los 7 días utilizando las cepas D, mientras que con las cepas aisladas finalizaron a los 9 días.

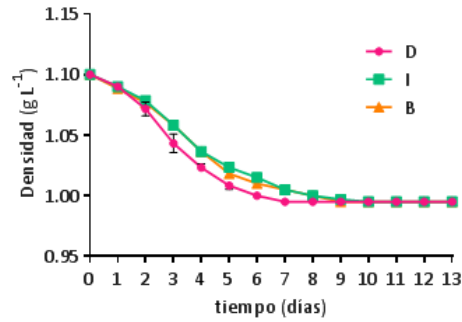


Figura 1: Evolución de la densidad durante las fermentaciones alcohólicas llevadas a cabo por una cepa de levaduras comercial (D), cepa de levaduras aislada de uvas cv. Malbec (I) y de cepas de levaduras aisladas de uvas cv. Bonarda (B).

En la Figura 2 se observa la evolución del contenido porcentual residual de glucosa, fructosa e ión amonio durante las fermentaciones alcohólicas. El ión amonio fue rápidamente metabolizado por las levaduras los tres primeros días. Sin embargo, a partir del día 1 se observa que ese consumo es diferente para las tres levaduras estudiadas, alcanzando contenidos residuales con diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Esto significa que no sólo la forma sino también la cantidad de ión amonio metabolizado fueron diferentes. El metabolismo de la glucosa mostró patrones de evolución similares para las levaduras aisladas (I y B). El consumo de glucosa se dio rápidamente durante el primer día de fermentación, alcanzando para este punto un 55% de consumo las levaduras D, mientras que I y B consumieron menos del 20%. Así, tanto amonio como glucosa fueron rápidamente metabolizadas por las levaduras D, respecto de las restantes.

Se esperaría encontrar que las levaduras D también metabolicen más rápidamente la fructosa, sin embargo dicho comportamiento fue observado para las levaduras I y B, tal como se muestra en la Figura 2.

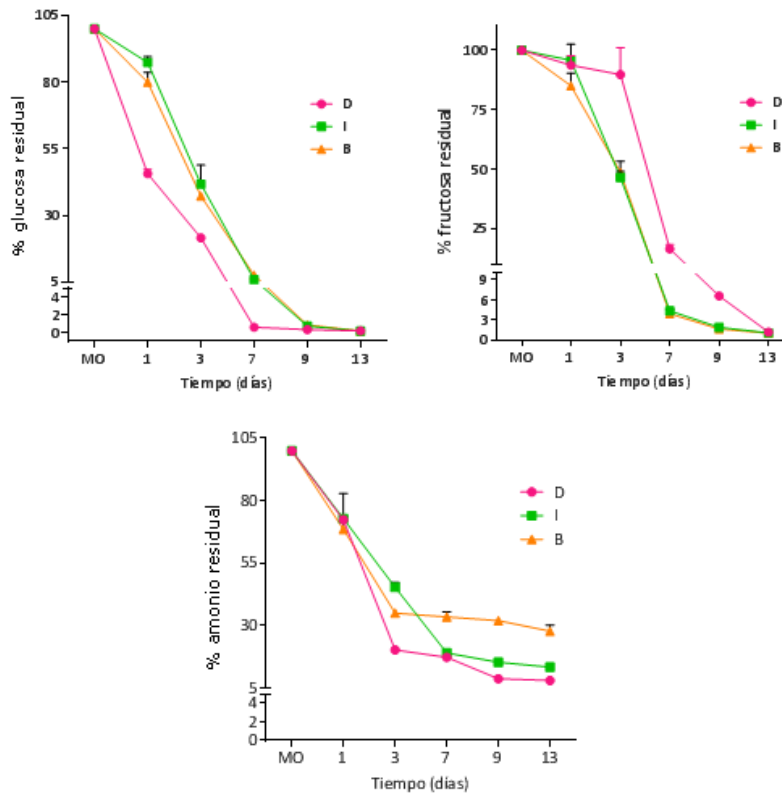


Figura 2: Evolución del contenido residual de glucosa, fructosa e ión amonio durante las fermentaciones alcohólicas de mostos cv. Malbec utilizando una cepa de levaduras comercial (D), una cepa de levaduras aislada de uvas cv. Malbec (I) y una cepa de levaduras aisladas de uvas cv. Bonarda (B).

El nitrógeno fácilmente asimilable es un parámetro ampliamente utilizado en la industria del vino, ya que da una idea de la capacidad fermentativa de los mostos en relación a la disponibilidad de compuestos nitrogenados. Los dos principales recursos de nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) para las levaduras son el ión amonio y los α -aminoácidos libres excepto la prolina, que no puede ser metabolizada en las condiciones de anaerobiosis en las que se desarrollan las fermentaciones (15). Para los mostos evaluados, el contenido de ión amonio fue de 18,23 mg.L⁻¹ y los aminoácidos totales sin prolina de 21,74 mg.L⁻¹, por lo tanto el contenido de NFA fue de 40 mg.L⁻¹.

Ese NFA se ve modificado durante las fermentaciones alcohólicas en vinos tintos, ya que, por un lado, las maceraciones de hollejos permitirían la liberación de aminoácidos en los mostos, y por otro lado, las levaduras son capaces de biosintetizar aminoácidos de acuerdo a sus requerimientos metabólicos. Estos aminoácidos pueden liberarse al medio, por lo tanto, el contenido de NFA puede incrementarse debido a estos aumentos en el contenido de aminoácidos (16, 17).

Parámetros generales en vinos

La Tabla 1 muestra el análisis de parámetros generales en vinos cv. Malbec elaborados con las diferentes cepas de levaduras *S. cerevisiae*. Los vinos obtenidos a partir de levaduras aisladas presentaron menor contenido de etanol que los obtenidos con las levaduras comerciales. Para los vinos I fue un 0,14% menos, mientras que para los vinos B fue un 0,24% menos respecto de los vinos D. Sumado a ello observamos que las levaduras aisladas de Bonarda (B) produjeron menor acidez volátil que las levaduras restantes. La acidez volátil está dada principalmente por el ácido acético, por lo tanto, no es una condición buscada en las levaduras para obtención de vinos, que generen elevados contenidos de estos ácidos (18, 19). La acidez total, expresada como ácido tartárico, y el pH, que está directamente relacionado con éste parámetro de acidez, no mostraron diferencias significativas. Los vinos finalizaron adecuadamente la fermentación alcohólica, presentando un contenido de azúcares residuales menores a 1,8 g.L⁻¹, tal como lo establece la OIV.

Tabla 1. Análisis de parámetros generales en vinos cv. Malbec elaborados con las diferentes cepas de levaduras *S. cerevisiae*

Tratamiento	Acidez Total (g.L ⁻¹)	Acidez Volátil (g L ⁻¹)	pH	Etanol (% V/V)	Azúcar residual (g L ⁻¹)
D	4,15a±0,12	0,65b±0,03	4,12a±0,02	14,87b±0,06	<1,8
I	4,10a±0,11	0,72c±0,02	4,10a±0,04	14,73a±0,06	<1,8
B	3,98a±0,08	0,55a±0,01	4,07a±0,04	14,63a±0,06	<1,8

D:levadura comercial; I: levadura aislada de uvas cv. Malbec; B: levadura aislada de uvas cv. Bonarda
Los valores presentados corresponden a la media de 3 réplicas. Número entre paréntesis corresponde a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Tukey HSD, nivel de significancia 95%).

Relación entre la composición nitrogenada en mostos y el contenido de aromas fermentativos en vinos.

Los vinos obtenidos con las levaduras D presentaron mayor diversidad de aromas fermentativos que las levaduras aisladas I y B. Sin embargo, las levaduras D produjeron mayor cantidad de estos compuestos que las levaduras restantes. Si tenemos en cuenta cómo fue el metabolismo del ión amonio durante las fermentaciones alcohólicas (Figura 2) observamos que las levaduras B consumieron menos ión amonio durante este proceso. Como se observa en la Figura 3, las levaduras B fueron capaces de biosintetizar una mayor cantidad de alcoholes superiores, teniendo una baja tasa de metabolismo nitrogenado. Este fenómeno es coincidente con lo observado por otros autores, quienes demostraron que una baja tasa metabólica de compuestos nitrogenados (amonio, aminoácidos), generaría elevados contenidos de alcoholes superiores en vinos (3, 20).

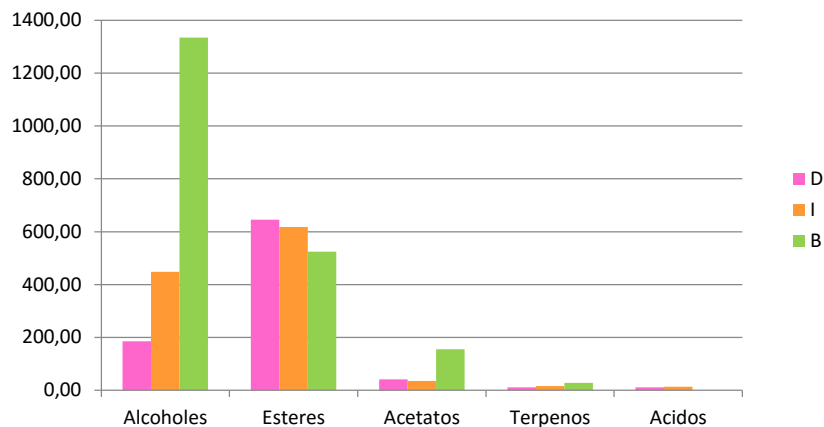


Figura 3: Contenido total de los diferentes grupos químicos que conforman los aromas fermentativos en vinos cv. Malbec elaborados con 3 cepas de levaduras *S. cerevisiae*.

En la Figura 4 se observa el análisis de componentes principales realizado a partir de los aromas fermentativos individuales identificados y cuantificados en los vinos obtenidos. Las levaduras B presentaron mayor contenido de 2-feniletanol, que aporta notas a rosa, rosa marchita, mientras que para las levaduras I y D fue el pentanol, cuyos descriptores no son deseados en los vinos (solvente, alcohol fusel). β-citronelol (cítricos) y acetato de 3-metilbutanol (acetato de isoamilo, con descriptores banana, fueron también los aromas fermentativos más abundantes encontrados estos vinos.

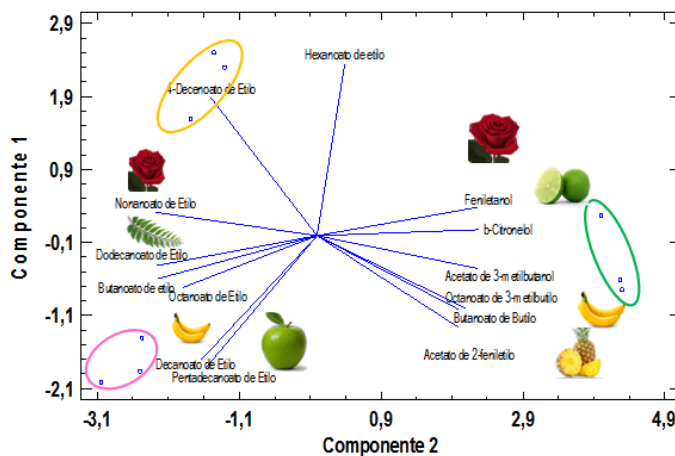


Figura 4: Análisis de componentes principales de los aromas fermentativos individuales presentes en vinos cv. Malbec obtenidos a partir de tres cepas de levaduras diferentes.

CONCLUSIONES

Las levaduras comerciales fueron más eficientes en finalizar las fermentaciones alcohólicas que las levaduras aisladas de uvas cv. Malbec y cv. Bonarda. Sin embargo, ello no significó que fueran capaces de generar mejor contenido de aromas fermentativos. Entre las cepas de levaduras *S.cerevisiae* aisladas, las que fueron obtenidas a partir del cv. Bonarda resultaron biosintetizar mayor cantidad de estos aromas que las aisladas de cv. Malbec. Sumado a ello, estas últimas levaduras generaron mayor acidez volátil, condición que no es buscada en una levadura para vinificación por su aporte de aromas a vinagre. A pesar de que el contenido de alcoholes superiores fue mayor en los vinos elaborados con levaduras aisladas de Bonarda, entre ellos no fueron detectados compuestos orgánicos volátiles que tengan impacto negativo en el perfil sensorial de vinos jóvenes y sí un compuesto volátil buscado en vinos jóvenes como lo es el aroma a rosas aportado por el 2-feniletanol.

Este trabajo aporta información de relevancia respecto de la dinámica de las fermentaciones alcohólicas de levaduras autóctonas, aisladas de viñedos de la región y del impacto sensorial que generaría su uso en la elaboración de vinos tintos como el cultivar emblemático de Argentina, el Malbec. Por otro lado, sienta las bases para continuar estudiando las causas que producen fermentaciones lentas y detenidas

que generan importantes pérdidas económicas al sector, como así también la aparición de aminos biógenos y carbamato de etilo, compuestos con impacto negativo en la salud humana.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el proyecto PNAIyAV 1130043 “Estrategias para la Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios” y PRET MZASJ-1251101 Oasis Norte, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

REFERENCIAS

1. Fischer, U. (2007). Wine Aroma. In *Flavours and Fragrances* (pp. 241–267). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-540-49339-6_11.
2. Pisarnitskii, F. (2001). Formation of wine aroma: tones and imperfections caused by minor components (a review). *Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiia*, 37(6), 651–659. <http://doi.org/10.1023/A:1012390731145>
3. Fugelsang, K., Edwards, C.G. (2007). *Wine microbiology* (Springer). New York, NY.
4. Romano, P. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 169–180. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00290-3](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00290-3)
5. Berthels, N.J., Cordero Otero, R.R., Bauer, F.F., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, 4(7), 683–689. <http://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.02.005>.
6. Hernandez-Orte, P., Bely, M., Cacho, J., Ferreira, V. (2006). Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2), 150–160. <http://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00055.x>
7. Medina, K., Carrau, F.M., Gioia, O., Bracesco, N. (1997). Nitrogen availability of grape juice limits killer yeast growth and fermentation activity during mixed-culture fermentation with sensitive commercial yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2821–2825.
8. Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139–173. <http://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>.
9. Palma, M., Madeira, S.C., Mendes-Ferreira, A., Sá-Correia, I. (2012). Impact of assimilable nitrogen availability in glucose uptake kinetics in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 99. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-11-99>
10. Magasanik, B., Kaiser, C.A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 290 (1–2), 1–18. [http://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00558-9](http://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00558-9)
11. Treu L., Toniolo C., Nadai C., Sardu A., Giacomini A., Corich V., Campanaro S. (2014). The impact of genomic variability on gene expression in environmental *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Environ Microbiol.* 16: 1378–1397.
12. Fabiani, A., Versari, A., Parpinello, G.P., Castellari, M., Galassi, S. High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Free Amino Acids in Fruit Juices Using Derivatization with 9-Fluorenylmethyl-Chloroformate. (2002). *J. Chromatogr. Sci. Jan*; 40(1):14-8.
13. Massera, A., Assof, M., Sturm, M.E., Sari, S., Jofré, V., Cordero-Otero, R., Combina, M. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains to ferment red musts at low temperature. (2011). *Annals of Microbiology*, 62(1), 367–380. <http://doi.org/10.1007/s13213-011-0271-0>
14. Vendramini, C., Beltran, G., Nadai, C., Giacomini, A., Mas, A., Corich, V. (2017). The role of nitrogen uptake on the competition ability of three vineyard *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 258(June), 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.006>
15. Nevoigt, E. (2008). Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(3), 379–412. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00025-07>
16. Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (2009). Amino Acids and Biogenic Amines. In *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 163–192). Springer-Verlag New York. <http://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>
17. Smit, A.Y., du Toit, W.J., Stander, M., du Toit, M. (2013). Evaluating the influence of maceration practices on biogenic amine formation in wine. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 297–307. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.006>
18. Clarke, R., Bakker, J. (2004). *Wine flavour chemistry*. Blackwell Publishing Ltd. <http://doi.org/10.1002/9781444346022>.
19. Jackson, R.S. (2008). *Wine Science. Principles and Applications*. Oxford: Elsevier Inc.
20. Hazelwood, L.A., Daran, J.-M., van Maris, A.J.a, Pronk, J.T., Dickinson, J.R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2259–66. <http://doi.org/10.1128/AEM.02625-07>.

IMPACTO DE LA INCORPORACIÓN DE LÍPIDOS VEGETALES Y ANTIOXIDANTES SOBRE EL COMPORTAMIENTO DEL STARTER DURANTE LA PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE UN QUESO FUNCIONAL EVALUADO POR TÉCNICAS INDEPENDIENTES DE CULTIVO

J. Pega^{1,2}, S. Rizzo¹, L. Rossetti¹, C.D. Pérez^{1,2}, G. Díaz^{1,2}, S.M. Ruzal³, A.M. Descalzo¹, M. Nanni¹

¹ Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA), Centro de Investigación de Agroindustria (CIA), INTA-CNIA.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

³ IQUIBICEN-CONICET, FCEyN, UBA.

Correo electrónico: pega.juan@inta.gob.ar

RESUMEN

Los fitoesteres son un conjunto de lípidos vegetales que han sido utilizados para el diseño de productos lácteos funcionales debido a su capacidad para reducir el colesterol sérico. No obstante, su efecto sobre el comportamiento del cultivo starter en la elaboración de quesos no ha sido estudiado. En este trabajo se monitoreó la cinética del DNA y RNA de la bacteria *Streptococcus thermophilus*, un starter lácteo ampliamente utilizado y con potencial probiótico, durante la producción industrial de un queso funcional conteniendo esteres de fitoesteres y alfa-tocoferol como compuestos bioactivos. Para este propósito, se optimizaron técnicas de PCR cuantitativa (qPCR) y qPCR con transcriptasa reversa (RT-qPCR). Asimismo, se utilizó un diseño experimental *ad hoc* para evaluar el umbral de detección de ácidos nucleicos libres. En nuestro conocimiento, este abordaje provee la primera evidencia experimental indicando que el DNA no es un indicador confiable de integridad celular cuando se detecta por qPCR, mientras que el RNA permitiría estimar de modo más preciso integridad bacteriana. El starter *S. thermophilus* se detectó por qPCR y RT-qPCR durante la producción del queso hasta los 81 días de madurado. Asimismo, se observó por primera vez que la adición de alfa-tocoferol y concentraciones funcionales de fitoesteres correlacionó con un aumento significativo en los niveles de DNA y cDNA específicos.

Palabras clave: queso funcional, starter, fitoesteres, alfa-tocoferol, métodos moleculares.

ABSTRACT

Phytosterols are plant lipophilic triterpenes that have been used for the design of functional dairy products because of their ability to lower serum cholesterol levels. However, their effect on the starter culture behavior during cheesemaking has not yet been studied. Here, we followed DNA and RNA kinetics of the bacterium *Streptococcus thermophilus*, an extensively used dairy starter with probiotic potential, during industrial production of a functional cheese containing phytosterol esters and alpha-tocopherol as bioactive compounds. For this purpose, real-time quantitative PCR (qPCR) and reverse transcription-qPCR (RT-qPCR) assays were optimized. An experimental set-up was used to evaluate the detection threshold of free nucleic acids. To our knowledge, this approach provides the first experimental evidence indicating that DNA is not a reliable marker of cell integrity, whereas RNA may constitute a more accurate molecular signature to estimate bacterial integrity. The starter *S. thermophilus* was detected by qPCR and RT-qPCR during cheese production until 81 days of ripening. We also showed for the first time that the addition of alpha-tocopherol and phytosterols at functional concentrations correlated with a significant increase in target DNA and cDNA levels.

Keywords: Functional cheese, starter, phytosterols, alpha-tocopherol, molecular methods.

INTRODUCCIÓN

Un alimento funcional contiene compuestos biológicamente activos conocidos que, al cumplir con aspectos cualitativos y cuantitativos definidos, provee un beneficio clínico comprobado, y puede por lo tanto ser utilizado para la prevención o tratamiento de enfermedades crónicas modernas (1). Los fitoesteres son una familia de triterpenos lipofílicos utilizados como agentes para disminuir el colesterol sanguíneo (2). Por lo tanto, al diseñar un alimento funcional es necesario garantizar que las moléculas bioactivas que se adicionen no deben afectar las características de calidad propia del mismo, tales como parámetros reológicos o sensoriales.

Asimismo, en el caso del diseño de alimentos funcionales fermentados tales como quesos o yogur, es crítico verificar que la incorporación de las moléculas bioactivas en cuestión no afecta el crecimiento de los microorganismos, como así su presencia en el producto final. Esto se debe a que la obtención de una cantidad adecuada de ciertos microorganismos en alimentos fermentados es necesario, no sólo para fines tecnológicos sino también para fines probióticos (3).

Pese a que algunos productos lácteos adicionados con fitoesteroles se encuentran en el mercado en algunos países, no existen a la fecha datos experimentales sobre el efecto de la incorporación de estos lípidos vegetales sobre la microbiota presente en estos productos.

El presente trabajo se efectuó en el marco del primer queso funcional del país que ya se encuentra en el mercado (Patente INPI 2015 010 1287). Este desarrollo fue parte de un proyecto FONARSEC (FSAGRO-AlimFun 0004/2010 “Desarrollo de Productos Lácteos Funcionales”) que involucró al MINCyT, al consorcio de PyMES asociadas (La Raíz S.A., Gacef S.A., Lácteos Capilla del Señor S.A.) y al Instituto Tecnología de Alimentos del INTA-CNIA (Castelar). El queso funcional aporta 2 g de fitoesteroles/60 g de queso, dosis que fueron reportadas como capaces de disminuir los niveles de colesterol sérico en humanos (2), y alfa-tocoferol en dosis que proveen el ~40% de los requerimientos diarios recomendados (RDA) para esta vitamina/60 g de queso (4).

El objetivo del presente trabajo consistió en analizar si la adición de dosis funcionales de fitoesteroles y alfa-tocoferol afectó el comportamiento del microorganismo starter ácido-láctico *S. thermophilus* durante la elaboración y madurado de un queso funcional Port Salut light. Esto se efectuó mediante la optimización de métodos moleculares, PCR cuantitativa (qPCR) y qPCR con transcriptasa reversa (RT-qPCR). Asimismo, se desarrolló un ensayo *ad hoc* para evaluar por primera vez la utilidad de estas metodologías moleculares (independientes de cultivo) como indicadores de integridad celular en bacterias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de quesos funcionales y toma de muestras

Los quesos Port Salut light funcionales y controles se elaboraron a nivel industrial en la empresa Capilla del Señor, ubicada en la ciudad de Villa María, Córdoba, Argentina. Luego de la pasteurización de la leche, se incorporaron los fitoesteroles en el batch destinado a queso funcional a fin de lograr 2 g de fitoesteroles/60 g de queso, y alfa-tocoferol para proveer el ~40% de los requerimientos diarios recomendados (RDA) para esta vitamina/60 g de queso. Asimismo, previamente se utilizó otro batch de leche para los quesos control (sin compuestos bioactivos adicionados). Se agregó el cultivo iniciador (starter) de *S. thermophilus* y luego de la coagulación, el cuajo se cortó para realizar el salado. Los bloques se dividieron en porciones de 400 g y se almacenaron a 4°C. Se tomaron muestras de leche cruda (RM), leche pasteurizada (PM), PM 30 min luego de incorporar el starter (PMS) y cuajo (Cu). Los quesos envasados se maduraron a 4°C y se tomaron muestras a los 7, 20, 40, 57 y 81 días post-elaboración.

Optimización de protocolo de qPCR y RT-qPCR

Se utilizó el software Primer Express (Applied Biosystems, California, USA) para el diseño de primers específicos contra *S. thermophilus*, basado en la secuencia de su gen *tuf* y en la de otras especies de bacterias ácido lácticas (LAB), las cuales se obtuvieron de GenBank. Estas secuencias fueron alineadas utilizando Clustal W2 y BLAST para verificar la especificidad *in silico*. Asimismo, la especificidad de nuestro par de primers (Stherm) fue comparada con primers previamente reportados para hacer blanco en el mismo gen de *S. thermophilus* (5), observándose niveles comparables de especificidad. Los ensayos de qPCR y RT-qPCR se realizaron en un equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y los datos se analizaron con el StepOne software v2.2. Se evaluaron diferentes concentraciones de los primers Stherm, desde 40 a 600 nM y en base a ello se eligió una concentración de 400 nM. Se evaluaron asimismo diferentes condiciones de ciclado y así se estableció el siguiente protocolo: un ciclo a 95°C 15 min, 40 ciclos a 94°C 15 seg, 60°C 30 seg y 72°C 1 min. El cDNA se obtuvo de 1 µg de RNA purificado de cada muestra incubado con Dnase I (1 U/µL) (Invitrogen) durante 15 min. La transcripción reversa (RT) se efectuó con el M-MLV Reverse Transcriptase Kit (Promega, Wisconsin, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Evaluación del umbral de detección de DNA y RNA libres

Muestras de PM (45 mL c/u) se adicionaron con cuatro diluciones seriadas en base diez (6 ng - 6 µg) de DNA o RNA obtenidos del starter comercial liofilizado *S. thermophilus* o con 22 mg de este mismo starter. Las muestras fueron centrifugadas a 9700 xg por 15 min a 4°C y los sobrenadantes se descartaron. Los pellets resultantes, así como las muestras de PM, fueron sometidas a extracción de DNA o RNA seguidas de qPCR o RT-qPCR, respectivamente. Todas las condiciones se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las curvas standard generadas mediante la adición de muestras de queso negativo (sin DNA ni RNA del starter) con distintas cantidades (0.01 µg - 10 mg) de starter liofilizado se muestran en la Fig. 1.

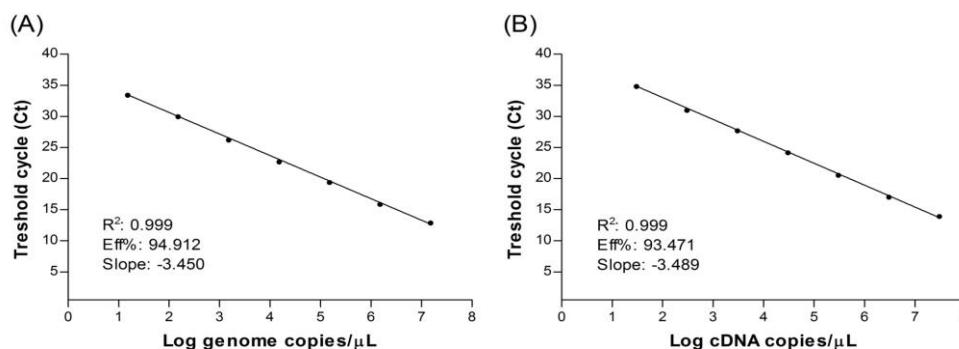


Figura 1. Curvas standard obtenidas por qPCR (panel A) y RT-qPCR (panel B) para *Streptococcus thermophilus*

En nuestro conocimiento, los resultados del presente trabajo constituyen la primera evidencia experimental indicando que el DNA específico detectado por qPCR no puede ser utilizado como indicador de integridad/viabilidad celular, mientras que la incapacidad para detectar RNA libre indica que estas moléculas serían más apropiadas para tal fin (Fig. 2).

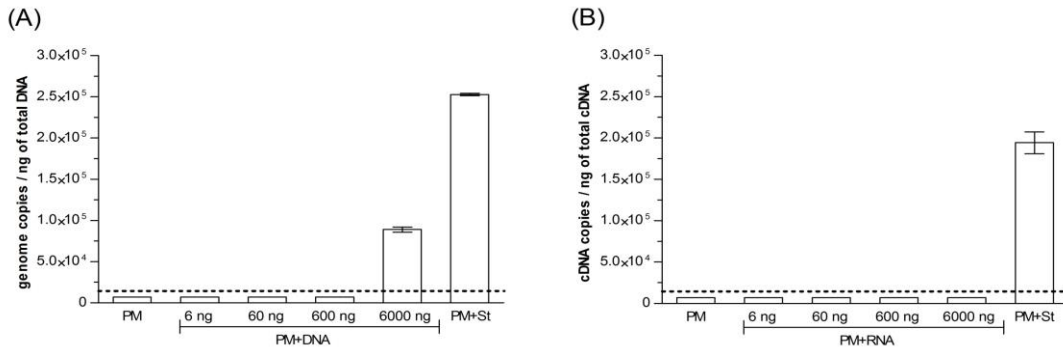


Figura 2. Umbral de detección de DNA y RNA libre determinado por qPCR (panel A) y RT-qPCR (panel B).

El DNA y cDNA del microorganismo *S. thermophilus* pudo ser cuantificado al menos desde 30 min luego de su inoculación y hasta los 81 días de madurado, confirmando así reportes previos (6) donde se postula la posible contribución de esta especie en los perfiles organolépticos (Figs. 3 y 4).

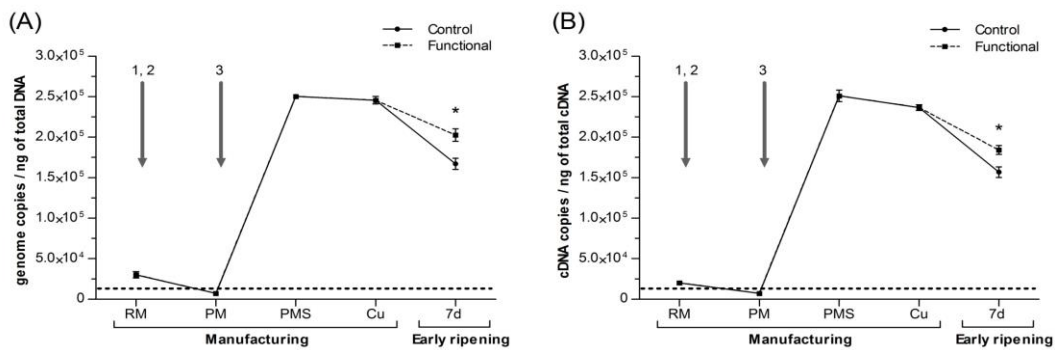


Figura 3. Curso temporal de ácidos nucleicos específicos del cultivo starter *S. thermophilus* durante la producción industrial de quesos funcionales y controles. Leche cruda (RM), leche pasteurizada (PM), PM 30 min luego de incorporar el starter (PMS), cuajo (Cu) y quesos con 7 días de madurado (7d). Flechas: (1) pasteurización, (2) incorporación de fitoesteroles y tocoferoles, (3) adición del starter liofilizado. (*) Diferencias estadísticamente significativas.

El presente trabajo mostró por primera vez que la adición de fitoesteroles en concentraciones funcionales y de tocoferoles, no sólo que no afectó la performance del starter sino que correlacionó con un incremento significativo en sus niveles de DNA y cDNA durante la producción del queso (Fig. 4).

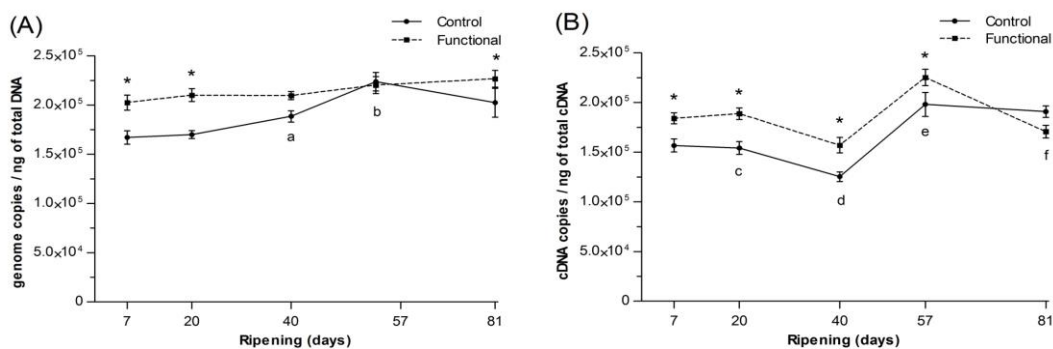


Figura 4. Curso temporal de ácidos nucleicos específicos del cultivo starter *S. thermophilus* durante el madurado de quesos funcionales y controles. Días de madurado (7, 20, 40, 57, 81). (* a-f) diferencias estadísticamente significativas.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se obtuvieron resultados de interés para aquellos abordajes que involucren el estudio de la integridad, viabilidad o actividad metabólica de microorganismos basados en extracción de ácidos nucleicos y cuantificación por qPCR/RT-qPCR.

Asimismo, la información aquí provista es relevante para el diseño industrial de productos lácteos innovadores que impliquen la incorporación de compuestos vegetales u otras moléculas bioactivas relacionadas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado mediante el proyecto PNAIyAV-1130043 de INTA y mediante el proyecto FONARSEC 0004 involucrando a INTA, al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT) y a Lácteos Capilla del Señor.

REFERENCIAS:

1. Martirosyan, D.M. (2011). Introduction to Functional Food Science. 2nd edition. Food Science Publisher.
2. Rondanelli, M.; Monteferrario, F.; Faliva, M.A.; Perna, S.; Antonello, N. (2013). Key points for maximum effectiveness and safety for cholesterol-lowering properties of plant sterols and use in the treatment of metabolic syndrome. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93:2605–2610.
3. Sohier, D.; Pavan, S.; Riou, A.; Combrisson, J.; Postollec, F. (2014). Evolution of microbial analytical methods for dairy industry needs. *Frontiers in Microbiology* 5:16.
4. Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. (2000). Institute of Medicine. Food and Nutrition Board Washington DC: National Academy Press.
5. Falentin, H.; Henaff, N.; Le Bivic, P.; Deutsch, S.M.; Parayre, S.; Richoux, R.; Sohier, D.; Thierry, A.; Lortal, S.; Postollec, F. (2012). Reverse transcription quantitative PCR revealed persistency of thermophilic lactic acid bacteria until the end of the ripening of Emmental cheese. *Food Microbiology* 29:132-140.
6. Ruggirello, M.; Dolci, P.; Cocolin, L. (2014). Detection and viability of *Lactococcus lactis* throughout cheese ripening. *PLoS one*, 9(12), e114280.

INCORPORACIÓN DE VALOR AGREGADO A HONGOS COMESTIBLES PATAGÓNICOS: GIRGOLAS

E.H. Ohaco Domínguez¹, A. De Michelis²

¹Universidad Nacional del Comahue - Argentina.

²INTA AER El Bolsón.

Correo electrónico: ohacoelizabeth@hotmail.com

RESUMEN

En la última década comenzaron a aplicarse políticas activas orientadas a generar valor agregado y competitividad al sector de la producción de alimentos en Argentina. Para esto es fundamental generar y/o aplicar diferentes estrategias para transformar la producción, diferenciando y valorizando los productos agroalimentarios; y generar empleo, promoviendo el desarrollo local y sustentable¹. En la zona del Alto Valle de Río Negro y Neuquén se cultivan gírgolas (*Pleurotus ostreatus*) mayoritariamente sobre tronco de álamo, por lo que su producción es estacional (marzo a abril). La producción de hongos a escala comercial es una tarea difícil en vista de su elevado contenido de humedad (90- 94%) y corta vida útil (7 días a temperatura de heladera)^{2,3}. En la actualidad este hongo comestible se comercializa: deshidratado, fresco, en conserva o congelado⁴. El objetivo de este trabajo es desarrollar un paté a base de gírgolas, con el fin de incorporar valor agregado y ampliar la variedad de productos disponibles para el consumidor. Se elaboró el paté de gírgolas variando el tratamiento de escaldado ácido: solución de vinagre al 50% (V) y solución de ácido cítrico al 0,5 % (C); y el sabor: ajo y albahaca (VA y CA) y ahumado (VH y CH). Se determinó el pH del paté recién elaborado y luego de 2 y 24 meses de almacenamiento en oscuridad. Se utilizó como modelo de evaluación sensorial, la prueba de Ranking por Preferencia. Para analizar los resultados se utilizó el Test de Friedman y el ensayo de múltiple comparación. Se midió color superficial con un colorímetro Minolta CR 400, se trabajó con el sistema CIELab, y se determinaron los parámetros hue (h) y croma (C*). El análisis de preferencia global indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos, es decir que todas las formulaciones fueron sensorialmente aceptadas por los evaluadores. Con la aplicación del escaldado ácido se logró disminuir el pH de las gírgolas a valores permitidos por el Código Alimentario Argentino (CAA), siendo entonces un producto seguro para el consumo humano.

Palabras clave: hongos comestibles, paté, nuevos productos, análisis sensorial

ABSTRACT

In the last decade, active policies aimed at generating added value and competitiveness to the food production sector in Argentina began to be applied. For this, it is essential to generate and/or apply different strategies to transform production, differentiating agricultural food products; and generate employment, promoting local and sustainable development¹. In the area of the Upper Valley of Río Negro and Neuquén, *Pleurotus ostreatus* are grown mostly on poplar trees, so their production is seasonal (March to April). The production of mushrooms on a commercial scale is a difficult task in view of its high moisture content (90-94%) and short shelf life (7 days at refrigerator temperature)^{2,3}. At present, this edible fungus is commercialized: dehydrated, fresh, preserved or frozen⁴. The objective of this work is to develop a pâté based on mushrooms, in order to incorporate added value and expand the variety of products available to the consumer. The mushroom pate was elaborated by varying the acid scalding treatment: 50% vinegar solution (V) and 0.5% citric acid solution (C); and the flavor: garlic and basil (VA and CA) and smoked (VH and CH). The pH of the freshly made pate was determined and after 2 and 24 months of storage in the dark. The Preference Ranking test was used as a sensory evaluation model. To analyze the results, the Friedman Test and the multiple comparison test were used. Surface color was measured with a Minolta CR 400 colorimeter, the CIELab* system was worked on, and parameters hue (h) and chroma (C*) were determined. The global preference analysis indicates that there are no significant differences between the treatments that is to say that all the formulations were sensory accepted by the evaluators. With the application of the acid blanching, the pH of the mushrooms was reduced to values allowed by the Argentine Food Code (CAA), being then a safe product for human consumption.

Keywords: edible fungi, pate, new products, sensory analysis

INTRODUCCIÓN

En la Argentina, la región patagónica ya produce y posee muy alto potencial para producir materias primas de alto valor, principalmente debido a sus condiciones agro-climáticas. Sumado a esto, es una región con una cultura ya desarrollada en la producción de alimentos diferenciados, de alto valor agregado, normalmente obtenidos en pequeños emprendimientos económicos con alta generación de puestos de trabajo (5). El conocimiento de lo que se tiene, permitirá a quienes deseen incursionar o profundizar, afianzar sus técnicas de elaboración de alimentos. Siendo la demanda actual del mercado el desarrollo de nuevos productos alimenticios atractivos, con valor agregado y que aporten beneficios a la salud, la industria se encuentra en continua búsqueda y experimentación para satisfacer las

necesidades que demanda la sociedad (2, 3, 6). Hoy se sabe que los hongos son algo más que una producción con fuerte valor agregado. Desde lo nutritivo y lo medicinal son considerados como alimentos funcionales, es decir, que no sólo pueden convertir la gran biomasa de desechos lignocelulósicos provenientes de la industria agrícola en alimentos saludables, sino que también pueden producir derivados conocidos como mico-medicinas/nutracéuticos con numerosos beneficios para la salud^{2,6}. Así, la producción de hongos y los productos derivados de éstos, son los dos pilares de la industria moderna de hongos y representan una auténtica oportunidad de inversión y generación de empleos por tratarse de producciones intensivas donde se requiere de la mano de obra como un recurso clave (4, 5, 6). El objetivo de este trabajo es desarrollar una pasta tipo paté a base de gírgolas (*Pleurotus ostreatus*) con el fin de incorporar valor agregado y ampliar la variedad de productos disponibles para el consumidor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

Se trabajó con fructificaciones de *Pleurotus ostreatus* congeladas a -20°C, provenientes del Alto Valle de Río Negro y Neuquén.

Procedimiento de elaboración del Paté de Gírgolas (Fig. 1)

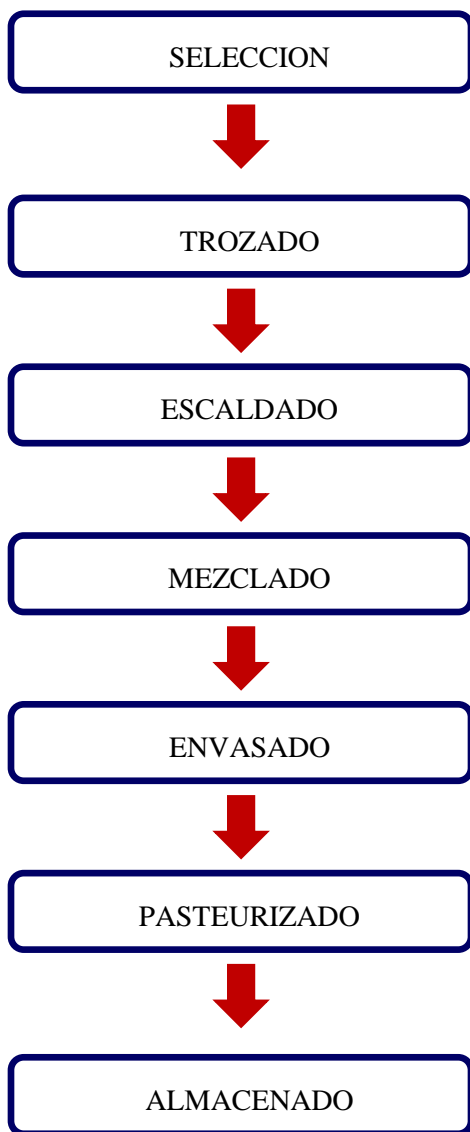


Figura 1: Diagrama de flujo del proceso de elaboración del paté de gírgolas.

- **Selección:** Se escogieron las fructificaciones sanas de *Pleurotus ostreatus*.
- **Trozado:** Se cortaron tiras de 3 cm por 2 cm, con cuchillo de acero inoxidable.
- **Escaldado:** Se emplearon dos soluciones: solución de vinagre al 50% (V) y solución de ácido cítrico al 0,5 % (C). La relación utilizada fue 1 kg. de sólidos por cada 3 l. de solución de escaldado. En cada caso se mantuvo la muestra en ebullición durante 3 minutos. Se enfrió rápidamente con agua potable.
- **Mezclado:** El producto escaldado se mezcló y micronizó con aceite de oliva (10% en peso) y condimentos según tratamiento: ajo y albahaca (VA y CA) y ahumado (VH y CH).
- **Envasado:** Se realizó en caliente, cuidando que no queden burbujas de aire.
- **Pasteurizado:** El producto se pasteurizó a 95°C durante 20 minutos.
- **Almacenado:** Se almacenó durante veinticuatro meses en oscuridad.

Determinación de pH

Según el método de la AOAC 981-12 (7). Se trabajó por triplicado.

Análisis sensorial

Se utilizó como modelo de evaluación sensorial, la prueba de “Ranking por Preferencia”, que consiste en comparar varias muestras en función de un atributo sensorial. Para analizar los resultados se utilizó el Test de Friedman y el ensayo de múltiple comparación. Se trabajó con un panel de 15 jueces no entrenados.

Color superficial

El color superficial de las muestras se determinó con un fotocolorímetro Minolta CR400, con los parámetros Cielab: L* (luminosidad), a* (grado de componente rojo o verde) y b* (grado de componente amarillo o azul). Se calcularon los parámetros Croma: $(a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$ y hue: $\arctg(b^*/a^*)$. Las mediciones se realizaron antes y después de almacenar durante 2 meses, una parte en la oscuridad y otra parte expuesta a la luz.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA simple (Statistica 7.0), con un $\alpha=0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se presentan los resultados obtenidos en la determinación del pH de los distintos patés antes y después de dos y veinticuatro meses de almacenamiento en oscuridad. Se observa un aumento de pH en las muestras escaldadas con vinagre al 50% y una disminución en las escaldadas con ácido cítrico 0,5%, luego de los dos meses de almacenamiento, este comportamiento se mantiene luego de 24 meses de almacenamiento. En todos los casos el valor de pH final está por debajo del límite establecido por el CAA en su Art. 173, por lo cual son aptos para la comercialización y consumo humano.

Tabla 1: Resultados obtenidos de la determinación de pH de las muestras de paté de acuerdo al tratamiento (VA, CA, VH y CH).

Tratamiento	pH inicial	pH 2 MESES	pH 24 MESES
VA	3.87	4.05	4.03
VH	3.36	3.58	3.56
CA	4.05	3.96	3.84
CH	3.51	3.43	3.44

En la **Tabla 2** se presentan los resultados obtenidos de la evaluación sensorial de los patés de gírgolas. Con respecto al color y sabor destacan los patés condimentados con albahaca y ajo, sin importar el ácido utilizado durante el escaldado. En cuanto al aroma y a la textura no se observan diferencias significativas entre las distintas muestras. El análisis de preferencia global indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos, es decir que todas las formulaciones fueron sensorialmente aceptadas por los evaluadores.

Tabla 2: Resultados obtenidos del análisis sensorial de las muestras de paté de acuerdo al tratamiento (VA, CA, VH y CH).

Tratamiento	Color	Aroma	Sabor	Textura	Preferencia Global
VA	25 a	37 a	27 a	37 a	37 a
CA	32 a	26 a	31 a	41 a	33 a
VH	42 ab	39 a	44 ab	35 a	38 a
CH	51 b	38 a	48 b	36 a	45 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En la **Figura 2** se presentan los valores del parámetro *hue* de las muestras de paté según tratamiento y condiciones de almacenamiento. Se observa que las muestras con ajo y albahaca dieron valores más altos de *hue* que los patés tratados con humo líquido, pudiéndose ver la influencia en el uso de condimentos, siendo más homogéneo y estable el color en los tratados con humo líquido. Al evaluar la influencia del almacenamiento, se distinguen variaciones, y con respecto al tipo de almacenado, la exposición a la luz es la que genera mayor variación, disminuyendo el valor de *hue* con respecto al valor inicial. Fuera de las diferencias todos los patés mantienen una tendencia hacia los tonos amarillo anaranjados.

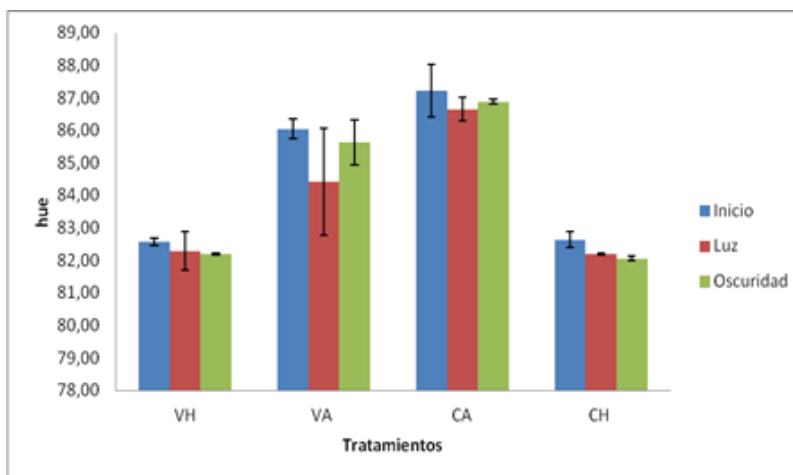


Figura 2: Valores del parámetro *hue* antes (**Inicio**) y después de almacenar las muestras en la oscuridad (**Oscuridad**) y en exposición a la luz (**Luz**), según el tipo de **tratamiento** (CA, VA, VH y CH)

En la **Figura 3** se graficaron los valores del parámetro *Croma* (saturación) de las muestras de paté según tratamiento y condiciones de almacenamiento. Se observan diferencias significativas en la saturación del color (más vivaces) en las muestras de paté medidas al final del almacenado con respecto al inicio, y al comparar los tipos de almacenado, el mejor es en oscuridad. Se observa un efecto almacenado en todas las muestras de paté, ya que el color se intensifica en las muestras almacenadas comparando con las muestras recién elaboradas. Las muestras escaldadas con vinagre y almacenadas en oscuridad presentaron mayor intensidad de color que las expuestas a la luz.

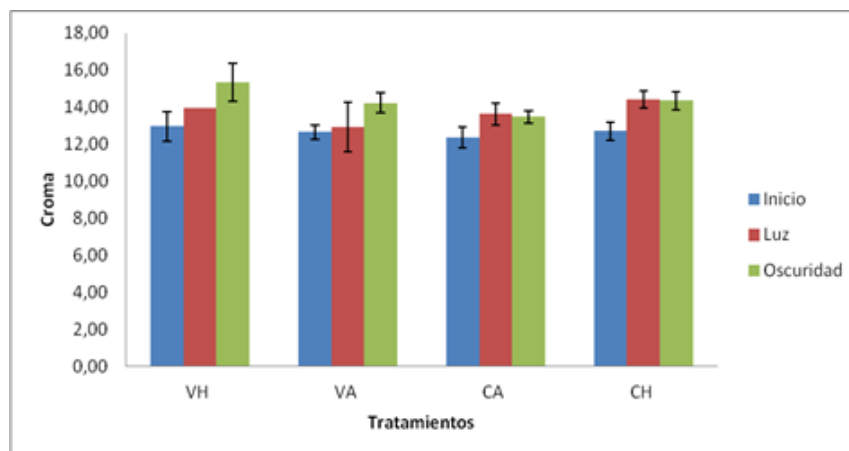


Figura 3: Valores del parámetro *Croma* antes (**Inicio**) y después de almacenarlas en la oscuridad (**Oscuridad**) y en exposición a la luz (**Luz**), según el tipo de **tratamiento** (CA, VA, VH y CH)

CONCLUSIONES

Con la aplicación del escaldado ácido se logró disminuir el pH de las gírgolas a valores permitidos por el Código Alimentario Argentino (CAA), siendo entonces un producto seguro para el consumo humano.

Desde el punto de vista sensorial se destacaron los patés condimentados con ajo y albahaca. Con respecto al color se recomienda almacenar en oscuridad o protegido de la luz directa.

Se obtuvo un producto apto para celíacos y veganos, de gran aceptación por parte del consumidor y estable en el almacenamiento, independientemente del ácido utilizado durante el escaldado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional del Comahue (FATA 04/L004), al CONICET y al INTA (PNAyAV 1130043) por el financiamiento.

REFERENCIAS

1. Albertó, E., Gasoni, L. (2003). Perspectivas producción de hongos comestibles en la Argentina. IDIA XXI: 70-76.
2. Carrión, M.E., Valiente L.E., Ohaco E.H., De Michelis A. (2015). Efecto del congelado sobre el secado con aire caliente de *Pleurotus ostreatus*. XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL 2015). UCA, Buenos Aires, Argentina.
3. Carrión, M.E., Ohaco Domínguez, E.H., De Michelis, A. (2016) Elaboración de paté de Gírgolas (*Pleurotus ostreatus*). Caracterización Físicoquímica y Evaluación Sensorial. INTA Ediciones, Colección Divulgación, Argentina. ISSN N° 1667-4014. Pág. 29.
4. De Michelis, A., Vullioud, M., Rusalen R. (2009). Experiencias en el manejo de *Pleurotus ostreatus* (hongo de cultivo) para conservas. Presencia 54: 28-31.
5. Albertó, E. (2014). Present and future: Searching for natural occurring strains for mushroom production. WSMBMP World Society for Mushroom Biology and Mushroom Products. Bulletin 10: 7-12.
6. Melo, C.S., Sales-Campos, C., Nogueira M.C. (2010). Mushrooms of the *Pleurotus* genus: a review of cultivation techniques. Interciencia 35:177-182.
7. AOAC (Association Of Official Analytical Chemists). 1990. Edic. 15^{va}.

PROYECTO ESPECÍFICO

Estrategias para la diferenciación de alimentos y el desarrollo de nuevos productos alimentarios.

PROYECTO INTEGRADOR Optimización de calidad integral y otras estrategias de agregado de valor.

INFLUENCIA DE LA PARED CELULAR EN LA EXTRACCIÓN DE TANINOS DE UVAS BONARDA Y MALBEC

K. Garro Lopez¹, A. Catania¹, S. Sari¹, M. Fanzone¹, S. Gómez Talquenca¹, F. Casassa².

¹ Centro de Estudios de Enología, Estación Experimental Agropecuaria Mendoza, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), San Martín 3853, 5507 Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina.

² Wine & Viticulture Department, California Polytechnic State University, San Luis Obispo, CA 93407, USA.

Correo electrónico: garro.karina@inta.gob.ar

RESUMEN

La concentración final de taninos en el vino está relacionado al contenido de taninos en las uvas y también a la cantidad que efectivamente se extrae, la cual puede ser regulada por interacciones taninos-pared celular durante la vinificación. Evidencia anecdótica muestra que los vinos de la variedad Bonarda Argentina son inherentemente bajos en taninos, sugiriendo un bajo grado de extractabilidad, en relación a Malbec, una variedad en la cual la retención de taninos no es problemática. En este trabajo se hipotetiza que la aplicación de la sangría (remoción de parte del mosto previo a la fermentación) puede resultar en una remoción parcial de la pared celular, aumentando de este modo la retención de taninos. Los resultados mostraron que solo la sangría tradicional aplicada a la variedad Malbec condujo a un aumento significativo de la concentración de taninos (40%) y antocianos (12%) respecto a los vinos control. El porcentaje de aumento de la concentración de taninos en el vino tratado con sangría tradicional en Malbec sugiere la influencia de la pared celular en la extracción y retención de taninos en el vino. Para Bonarda los tratamientos no mostraron efectos positivos en la concentración de taninos frente a los vinos control. Desde un punto de vista sensorial, los vinos tratados con sangría tradicional de ambas variedades mostraron una tendencia a ser más astringentes y de mayor intensidad de color, sin embargo no se lograron diferenciar significativamente los vinos tratados del control.

Palabras clave: uva, proantocianidina, técnicas de vinificación, sangría, matriz.

ABSTRACT

The final wine tannin concentration is contingent upon not only the original tannin content on the grapes but also the amount of effectively extracted tannins, which may be regulated by tannin-cell wall interactions during winemaking. Anecdotal evidence shows Bonarda (aka Charbono) wines are inherently low in tannins, suggesting lower tannin retention rates, relative to Malbec, a variety in which tannin retention is not problematic. Here we hypothesized that application of saignée (removing a portion of the must prior to alcoholic fermentation) may result in partial removal of cell wall material, thereby furthering tannin retention. Results showed that only traditional saignée applied to Malbec led to an enhancement of tannin concentration (40%) and anthocyanin concentration (12%) relative to control wines. The degree of increase of tannin concentration of traditional saignée Malbec wines suggest the influence of cell wall material on tannin extraction and retention into wine. For Bonarda, the treatments showed no positive effect on tannin concentration relative to control wines. From a sensorial standpoint, traditional saignée Bonarda and Malbec wines were perceived as more astringent and with a higher of colour intensity, although there were no significant differences among treatments.

Keywords: grape, pro anthocyanidins, vinification techniques, bleeding

INTRODUCCIÓN

Químicamente, los taninos son compuestos fenólicos, específicamente polímeros de la familia de los flavan-3-oles. Los monómeros o subunidades que constituyen los taninos de la uva y el vino son (+) catequina, (-) epicatequina, (-) epicatequina galato y (-) epigallocatequina (1). Existe una gran diversidad de taninos en función de las subunidades que componen la molécula, la posición del enlace entre monómeros y las ramificaciones que presentan. En las uvas, los taninos se encuentran principalmente en las semillas y la piel (2, 3).

Los taninos de la uva se liberan al medio desde la molienda, pero se transfieren principalmente durante la maceración. En esta etapa el mosto en fermentación se pone en contacto con los sólidos de la uva. Después de ser extraídos de la uva, los taninos se modifican estructuralmente por acción de las levaduras, enzimas y otros sub-productos de la fermentación y continúan experimentando cambios químicos post fermentación (4).

Sensorialmente, los taninos contribuyen a la astringencia, amargor, estabilidad de color y potencial de envejecimiento de un vino tinto (5, 6), afectando de esta manera a la calidad y el precio del vino (7, 8). La extractabilidad de taninos es variable entre diferentes tipos de uva vinificadas en las mismas condiciones (9). Además, que existe una baja correlación entre los taninos medidos en la uva y los que

efectivamente se transfieren al vino (10, 11, 12, 13). Algunas posibles explicaciones de este problema se basan en la interacción de los taninos con la pared celular (14, 15)

Una de las técnicas con potencial influencia en la extracción de taninos se encuentra la sangría, que según algunos estudios proporciona un aumento en la concentración de taninos (16, 17). Si bien estos estudios reportan los efectos de la sangría, en ellos no se ha considerado la relación de estos efectos con la reducción de material de pared celular que conlleva la aplicación de esta técnica.

El objetivo de este trabajo es examinar la influencia de la pared celular en la concentración de taninos del vino, mediante la aplicación de la técnica de sangría tradicional y adaptaciones de la misma que tienden a modificar la concentración y composición de la pared celular en la matriz del mosto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

El ensayo fue realizado durante la vendimia 2017 con uvas cv. Bonarda, provenientes de un viñedo ubicado en Nueva California, San Martín, y uvas cv. Malbec, provenientes de una viña de INTA localizada en Lujan de Cuyo, Mendoza, Argentina. Para el tratamiento de sangría compensada con mosto de otra variedad (sangría con Red Globe) se procesaron uvas Red Globe, obtenidas de viñedo perteneciente a INTA Junín, Mendoza. Las características de las uvas al momento de la cosecha se muestran en la tabla 1.

Se recolectaron dos kilos de las variedades bajo estudio, de los cuales se tomaron 50 bayas aleatoriamente y se prensaron para el análisis del mosto. La acidez total fue medida por titulación, los sólidos solubles fueron determinados con un refractómetro digital Atago (Japón) y el pH fue analizado usando un peachímetro digital autocompensado Altronic TPX I. Para la obtención de otros parámetros de interés de las uvas, las pieles y semillas de tres muestras de 10 bayas se separaron de la pulpa con un bisturí y se pesaron en una balanza shimadzu auy220, para el volumen de la baya se utilizó el método del probeta.

Tabla 1 Características físico químicas de uvas Bonarda y Malbec utilizadas en los tratamientos (\pm desviación estándar).

Variedad	Bonarda	Malbec
Sólidos solubles totales ($^{\circ}$ Brix)	20,67 \pm 0,58	23,73 \pm 1,55
pH	3,59 \pm 0,03	3,59 \pm 0,03
Acidez titulable (g/l ac. tartárico)	3,65 \pm 0,16	4,58 \pm 0,13
Peso medio baya (g)	2,32 \pm 0,09	1,59 \pm 0,23
Peso medio semilla (g)	0,12 \pm 0,01	0,08 \pm 0,02
Cantidad de semillas/baya	2,70 \pm 0,17	1,83 \pm 0,25
Vol/baya (ml)	2,07 \pm 0,12	1,50 \pm 0,35

Vinificación

Los vinos se elaboraron en la planta piloto del Centro de Estudios Enológicos de INTA Mendoza, siguiendo un protocolo de elaboración previamente establecido (18,19) que se describe brevemente a continuación: las uvas se transportaron a la bodega donde se despallaron, molieron y bombearon a tanques fermentadores de acero inoxidable de 100 L. En los tanques se adicionó dióxido de azufre en una dosis de 50 mg/L. La acidez titulable se ajustó a 6 g/L con ácido tartárico. Tras el encubado, se llevó a cabo los distintos tratamientos: sangría tradicional, sangría con agua, sangría con red globe, transfusión y control descriptos en el apartado siguiente. Posteriormente a la aplicación de los tratamientos se inocularon levaduras comerciales (EC 1118; Lallemand Inc., Copenhagen, Dinamarca) en una dosis de 0,3 g/L. Dos días después se co-inocularon bacterias lácticas (*Oenococcus oeni*) en una concentración de 0,015 g/L. El tiempo de maceración para todos los tratamientos fue de 10 días, concluida la fermentación alcohólica, se descubieron los tanques y se trasvasó el vino a damajuanas de 20 L para continuar la fermentación maloláctica. Tras la fermentación maloláctica los vinos se ajustaron a 35 mg/L de SO₂ libre y se realizó la estabilización tartárica por 50 días a 5°C. Posteriormente, el vino se embotelló previo ajuste de SO₂ molecular a 0,5 mg/L. Las botellas se conservaron en cava a 15°C hasta su análisis.

Tratamientos enológicos

Los siguientes tratamientos se aplicaron por triplicado, por separado para la variedad Bonarda y Malbec. Todos los tratamientos de sangría realizados consistieron en el drenaje del 16% en volumen de mosto de los tanques, dentro de las 2 horas después de la molienda, previo a la fermentación.

i) *Control*. No incluyó sangría.

ii) *Sangría tradicional*: Se drenó 16% en volumen del mosto de la unidad experimental previo a la fermentación, con el objeto de concentrar los sólidos y reducir la cantidad potencia de "matriz" (mesocarpo, o pulpa), de modo de, potencialmente, aumentar la retención de taninos en el vino.

iii) *Transfusión*: Se drenó 16% en volumen del mosto de la unidad experimental previo a la fermentación y a continuación se llevó a cabo la fermentación del mosto sangrado en otro fermentador auxiliar en paralelo. Posteriormente, el vino terminado en el fermentador auxiliar se añadió al vino original en la misma proporción que se extrajo del mosto. En este tratamiento se espera que parte de los componentes de la pared celular precipiten antes de interactuar con los taninos por efecto del alcohol en el fermentador auxiliar, no estando presentes en el vino terminado. Si esta hipótesis es correcta, este tratamiento debería presentar una mayor extracción general de taninos que el vino control, aun cuando el volumen de vino final de los tratamientos i y iii será exactamente el mismo.

iv) *Sangría compensada con agua*. Se drenó 16% en volumen del mosto de la unidad experimental previo a la fermentación y a continuación se compensó el volumen de mosto drenado con igual volumen de agua destilada, acidificada. También se agregó azúcar al agua de compensación a fin de no modificar los grados brix del mosto original y por lo tanto tampoco el grado alcohólico del vino respecto a los otros tratamientos. El propósito de este tratamiento es mantener el volumen de mosto estrictamente comparable con los tratamientos i y iii, en tanto que favorecer una reducción de la cantidad de pared celular de pulpa presente. Esto se logrará, como se explicó más arriba, mediante la sustitución de 16% en volumen del mosto por un volumen equivalente de agua bi-destilada. Una extracción de taninos superior debería registrarse en este tratamiento, en relación con los tratamientos i y iii.

v) *Sangría compensada con mosto de uva Red Globe*: Se drenó 16% en volumen del mosto de la unidad experimental previo a la fermentación y a continuación el volumen sangrado se compensó con igual volumen de mosto sin fermentar de la variedad Red Globe. Esta variedad se reconoce por producir vinos de muy baja concentración de taninos a pesar de contar con niveles de taninos normales en la materia prima, esto se asocia a una supuesta alta capacidad de interacción con taninos de su pared celular, de ahí deriva su introducción en el tratamiento, el cual debería dar menor retención de taninos en el vino.

Determinaciones analíticas

En los vinos se determinaron parámetros analíticos generales (acidez titulable, pH y alcohol) mediante equipo analizador de vinos marca FOSS.

Determinación de taninos en vinos Bonarda y Malbec. Análisis por técnica de precipitación de la proteína de Harbertson

La concentración de taninos, antocianos y fenoles reactivos al hierro en vinos se determinaron por medio del método de la precipitación de la proteína (20,21)

Análisis sensorial

Se llevó a cabo en el Centro de Estudios de Enología de INTA Mendoza. Consistió en el análisis cuantitativo descriptivo de los vinos experimentales después de 4 meses de almacenamiento en botella. A tal fin, se conformó un panel sensorial con dos sesiones semanales. El análisis se dividió en dos etapas. La primera, dedicada al análisis de la variedad Bonarda, para la cual se entrenaron 14 panelistas durante 7 sesiones. La segunda, destinada a Malbec, en la cual 12 panelistas se entrenaron durante 5 sesiones. La evaluación se concretó en 6 sesiones para cada variedad, los panelistas utilizaron una escala lineal no estructurada de 0 a 10. Los resultados se recolectaron y analizaron mediante el software Libresense.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis de la varianza de una vía para la composición química de los vinos sobre la base de la variedad y el tratamiento. En todos los casos se utilizó el test de Fisher LSD para la comparación múltiple de medias con un nivel de significancia de 5% para el rechazo de la hipótesis nula. Además, los datos sensoriales fueron evaluados por medio del análisis de componentes principales usando la matriz de correlación sin rotación. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el software INFOSTAT (versión 2012, Córdoba, Argentina) y el software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis básicos en vinos experimentales

Los análisis básicos de los vinos experimentales no presentaron diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada variedad, lo cual indica que fue correctamente ajustada la acidez y la concentración de azúcar (chaptalización) del mosto en la etapa inicial. De este modo, se facilita el análisis comparativo de resultados entre tratamientos, ya que quedan excluidos los efectos del alcohol o la acidez sobre la extracción de taninos. Por otro lado, los vinos Bonarda y Malbec mostraron en promedio diferencias significativas entre sí, atribuida a la diferencia de sólidos solubles totales entre las uvas correspondientes. En la tabla 2 se puede observar las medias de los cinco tratamientos para cada variedad para las características alcohol, pH y acidez total titulable.

Tabla 2. Medias de alcohol, pH y acidez titulable de vinos Bonarda y Malbec producidos con cinco tratamientos enológicos (\pm desviación estándar).

Media	Alcohol (%)	pH	Acidez Total Titulable (g/l ac. Tartárico)
Bonarda	11,33 \pm 0,33 a	3,72 \pm 0,05 a	4,39 \pm 0,50 a
Malbec	13,63 \pm 0,25 b	3,44 \pm 0,08 b	3,62 \pm 0,30 b
p-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Influencia de los tratamientos sobre la composición de los vinos de cada variedad

La tabla 3 muestra los resultados correspondientes a la concentración de compuestos fenólicos generales. Se observó que solo en la variedad Malbec el tratamiento de sangría tradicional modificó significativamente el contenido de antocianos y taninos del vino, dando un aumento del 12% y 40% respectivamente en relación al control. Una tendencia similar, a favor del tratamiento sangría tradicional, se evidenció en la variedad Bonarda, pero sin apreciarse una diferencia estadísticamente significativa entre los vinos tratados. Estos resultados coinciden con los de Zamora et al. (16) que al aplicar en el procesamiento de uvas Malbec de Francia la técnica de sangría al 20% v/v alcanzó aumentos de antocianos de 6 a 13% y de taninos de 20 a 50% y también con los observados por Fanzone et al. (7) en Malbec argentinos, quien apreció un aumento significativo de fenoles totales y taninos totales al aplicar una sangría del 30 % v/v. Estos resultados sugieren que la transferencia de los taninos al vino no está limitada por su solubilidad ya que al retirar jugo se disuelven igual o más taninos que en el tratamiento control. Algunos autores atribuyen el efecto incremental de taninos de la sangría al efecto de la concentración dada por el aumento de la relación sólido: líquido (23). Sin embargo, en este trabajo el porcentaje de incremento de taninos en la sangría tradicional supera al solo efecto de concentración por reducción de volumen en aproximadamente 20%. Esta última observación podría explicarse considerando que se extrajo la misma cantidad de taninos que en el tratamiento control y que durante la maceración se produjo menor precipitación de estos compuestos al interactuar con menor cantidad de pared celular. Otra alternativa sería considerar que se produjo mayor extracción de taninos como consecuencia de la precipitación de taninos capturados por la pared celular de la pulpa, el incremento en la diferencia de concentración entre el mosto y la piel/semilla daría lugar a mayor difusión de taninos por ley de Fick (24). Existen varios estudios que avalan la hipótesis de que los taninos precipitan enlazados a la pared celular de la pulpa y se eliminan en el proceso junto con el orujo y las borras (13, 25, 26).

De acuerdo a los resultados de concentración de taninos y antocianos de la sangría tradicional frente al control, observados en este estudio, se considera que los antocianos en el vino no fueron afectados por la pared celular, ya que su aumento (en Malbec) se dio conforme al efecto de la concentración. Por otro lado, en el tratamiento sangría con agua se eliminó el factor de concentración ya que se mantuvo el volumen igual al del control y se observó un leve incremento en el nivel de taninos en el vino respecto al control, sin embargo éste no fue estadísticamente significativo. En el tratamiento de transfusión el efecto de remoción de pared celular es similar al caso anterior, debiendo conducir a mayor retención de taninos y mayor concentración en el vino (27), sin embargo los resultados de este tratamiento no arrojaron diferencias significativas, ni tendencias uniformes entre variedades, respecto al control. Estos resultados podrían deberse a que la cantidad de pared celular que se extrae con la sangría del 16% no es suficiente, por sí sola, para producir un efecto significativo en el nivel de taninos en el vino.

Por otro lado, el tratamiento sangría con Red Globe no mostró una disminución de la concentración de taninos en el vino como se esperaba. Es posible que la pared celular de Red Globe utilizada en este estudio tenga una capacidad de adsorción de taninos similar a la de Bonarda o Malbec. La composición de las paredes celulares de las variedades utilizadas es importante en este punto ya que las proteínas y polisacáridos que contienen se correlacionan positivamente con su capacidad de interacción y precipitación de taninos (9). Ambas variedades han demostrado comportamientos semejantes ante los tratamientos, excepto para la transfusión. El motivo por el cual presentan diferente comportamiento las variedades Bonarda y Malbec para el tratamiento transfusión no se ha dilucidado aún. La baja concentración de taninos en los vinos Bonarda, muy próximas al umbral de detección del método de Harbertson, podría ser la razón por la cual no se han encontrado diferencias significativas fenólicas entre los tratamientos para esta variedad.

Tabla 3. ANOVA de una vía que muestra la separación de medias de antocianos, taninos, fenoles reactivos al hierro, pigmentos poliméricos pequeños (SPP) y largos (LPP) de vinos Bonarda y Malbec producidos con cinco tratamientos enológicos (\pm desviación estándar).

Variedad/Tratamiento	Antocianos (mg/L M-3-equivalentes de glucosido)	Taninos (mg/L CE)	Fenoles reactivos al hierro (mg/L CE)	SPP (AU)	LPP (AU)	TPP (AU)
Bonarda						
Control	260.29 ± 19.51 a ^a	50.73 ± 3.81 ab	375.43 ± 68.29 a	1.20 ± 0.07 a	0.20 ± 0.07 a	1.40 ± 0.13 a
Sangría tradicional	289.09 ± 66.9 a	99.89 ± 37.41 c	447.36 ± 108.24 a	1.21 ± 0.13 a	0.33 ± 0.06 a	1.54 ± 0.14 a
Sangría con agua	256.32 ± 52.08 a	42.23 ± 13.04 a	383.5 ± 30.16 a	1.15 ± 0.09 a	0.19 ± 0.03 a	1.34 ± 0.09 a
Sangría con Red Globe	258.87 ± 71.88 a	46.21 ± 28.81 ab	424.93 ± 79.21 a	1.13 ± 0.14 a	0.20 ± 0.15 a	1.33 ± 0.22 a
Transfusión	287.29 ± 37.57 a	84.9 ± 10.07 bc	464.57 ± 40.78 a	1.26 ± 0.11 a	0.36 ± 0.05 a	1.62 ± 0.15 a
p-valor	0.8824	0.0341	0.4979	0.6409	0.0834	0.1463
Malbec						
Control	480.59 ± 4.61 bc	156.49 ± 3.39 b	505.57 ± 47.24 a	1.40 ± 0.13 a	0.43 ± 0.05 a	1.83 ± 0.18 a
Sangría tradicional	527.06 ± 37.91 c	167.28 ± 23.13 b	672.53 ± 82.41 a	1.39 ± 0.10 a	0.47 ± 0.02 a	1.85 ± 0.12 a
Sangría con agua	424.94 ± 5.77 a	118.33 ± 13.26 a	612.39 ± 54.61 a	1.25 ± 0.01 a	0.39 ± 0.05 a	1.64 ± 0.04 a
Sangría con Red Globe	481.53 ± 22.83 bc	151.22 ± 12.76 b	561.25 ± 143.78 a	1.28 ± 0.11 a	0.45 ± 0.04 a	1.72 ± 0.12 a
Transfusión	473.17 ± 48.54 ab	115.9 ± 7.23 a	478.66 ± 71.25 a	1.28 ± 0.10 a	0.36 ± 0.08 a	1.64 ± 0.04 a
p-valor	0.0242^b	0.0027	0.1128	0.2668	0.1514	0.1249

^a Análisis de la varianza para comparar datos: diferentes letras en una columna (dentro de una variedad) indica diferencias significativas para el test de Fisher LSD a p < 0,05.

^b p-valores significativos (p<0,05) se muestran en negrita.

Evaluación sensorial de los vinos

Los tratamientos examinados resultaron en vinos con características sensoriales significativamente diferentes. En la variedad Bonarda, los tratamientos no arrojaron diferencias significativas para la astringencia, sin embargo los vinos tratados se diferenciaron significativamente del control, dando menores niveles de aroma a reducido, hongo, herbáceo y espárrago cocido. El tratamiento sangría con Red Globe se caracterizó por presentar aroma a ácido acético, producto de variables microbiológicas incontrolables de la uva y el proceso. Los tratamientos sangría tradicional y sangría con agua se diferenciaron significativamente del control por su mayor intensidad de color, matiz violeta y aroma a vainilla (figura 1).

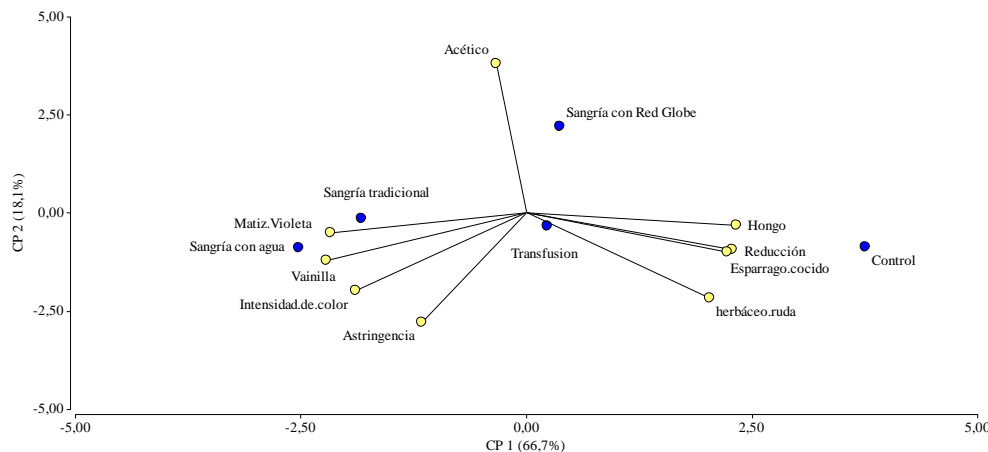


Figura 1. Análisis de componentes principales de los datos sensoriales descriptivos de los vinos Bonarda procesados con cinco tratamientos enológicos

Como resultado de la evaluación de los vinos Malbec (figura 2), los vinos tratados con sangría tradicional fueron significativamente más astringentes frente a otros tratamientos, sin embargo la diferencia en astringencia no resultó estadísticamente significativa frente al control. El tratamiento sangría tradicional dio significativamente mayor aroma a madera y una tendencia no significativa a tener mayor intensidad de color que el resto de los tratamientos. En el análisis de componentes principales (ACP) se puede ver que el tratamiento transfusión se diferenció por su aroma floral, posiblemente contribuyó a este atributo que en este tratamiento parte del mosto se fermentó por separado a la temperatura de 16°C, como un vino blanco. Cabe aclarar que la sangría con Red Globe en Malbec no presentó semejanzas en el perfil sensorial con el de la variedad Bonarda tratado idénticamente.

En el ACP de ambas variedades se observa una tendencia de mayor astringencia en los vinos con sangría tradicional. Sin embargo, la imposibilidad de diferenciar significativamente los vinos respecto al control por su astringencia podría explicarse por la baja

concentración de taninos que contenían todos los vinos experimentales y estar también relacionada con las pequeñas diferencias en concentración de taninos que se observaron entre los vinos experimentales de cada variedad.

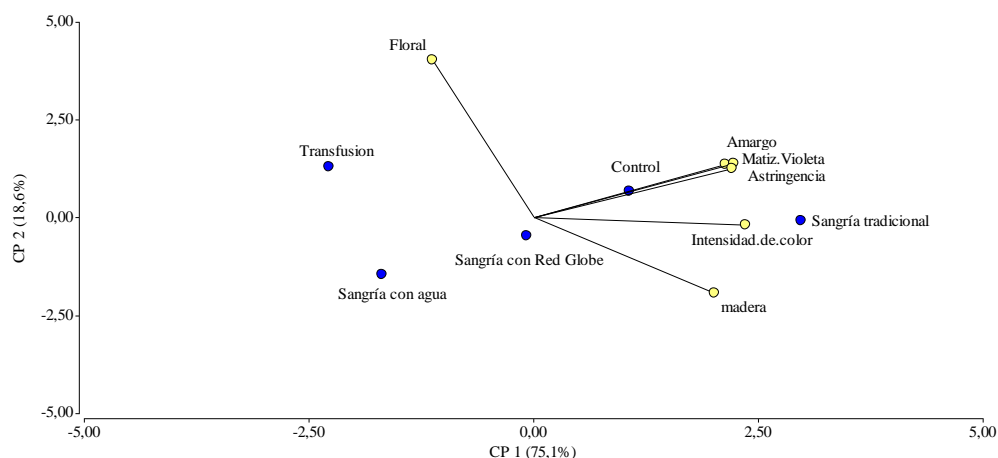


Figura 2. Análisis de componentes principales de los datos sensoriales descriptivos de los vinos Malbec procesados con cinco tratamientos enológicos.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo pueden tener importantes implicancias para la vinificación. El tratamiento sangría tradicional puede ser una técnica útil cuando se requiere aumentar la concentración de antocianos y taninos de vinos de la variedad Malbec argentinos. Sin embargo, se requiere mayor investigación en el tema para poder extrapolar estos resultados a Malbec de otras zonas geográfica o a otras variedades de uva. De acuerdo a los resultados sensoriales en Bonarda y Malbec esta técnica influye positivamente en la calidad del vino, sin embargo sus efectos están sujetos a características propias de la uva a vinificar. Los resultados de este estudio en el tratamiento sangría tradicional sugieren la influencia de la pared celular en la definición de la concentración de taninos en el vino. En estudios futuros se sugiere profundizar en el rol de la pared celular en la extracción de taninos que subyace a cada tratamiento, en este sentido posiblemente niveles de sangría más altos sean necesarios para acusar mayores diferencias en los resultados. Otra área a explorar en próximos estudios es la influencia de la composición de la uva y de la matriz de partida de cada tratamiento enológico aplicado en la capacidad de interacción de la pared celular con los taninos.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), que financió el estudio a través de los proyectos PNAIyAV 1130043 y PRET ON 511001. Al personal del Centro de Estudios Enológicos del INTA estación experimental Mendoza por su contribución en asesoramiento, equipamiento e infraestructura para los ensayos y análisis.

REFERENCIAS

- Downey, M.O., Harvey, J.S., Robinson, S.P. (2003). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. Grape Wine Res.*;9(1):15–27.
- Fournand D., Vicens A., Sidhoum L., Souquet J.M., Moutounet, M., Cheynier, V. (2006). Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *J. Agric. Food Chem.*, 54(19):7331–8.
- Thorngate J.H., Singleton V.L. (1994). Localization of procyanidins in grape seeds. *Am J Enol Vitic.*;45(2).
- Smith, P.A., Mcrae, J.M., Bindon, K.A. (2015). Impact of winemaking practices on the concentration and composition of tannins in red wine. *Aust. J. Grape Wine Res.*;21:601–14.
- Gawel, R. (1998). Red wine astringency: a review. *Aust. J. Grape Wine Res.* 4(2):74–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0238.1998.tb00137.x>
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agric.*; 83(6):564–73.
- Fanzone, M., Peña-Neira, A., Gil, M., Jofré, V., Assof, M., Zamora, F. (2012). Impact of phenolic and polysaccharidic composition on commercial value of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines. *Food Res. Int.*; 45(1):402–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.010>
- Gómez-Plaza, E., Olmos, O., Bautista-Ortín, A.B. (2016). Tannin profile of different Monastrell wines and its relation to projected market prices. *Food. Chem.*; 204:506–12.

9. Springer, L.F., Sacks, G.L. (2014). Protein-precipitable tannin in wines from *Vitis vinifera* and interspecific hybrid grapes (*Vitis* spp.): Differences in concentration, extractability, and cell wall binding. *J. Agric. Food Chem.* 62(30):7515–23.
10. Kennedy, J.A. (2008). Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Cienc e Investig Agrar.*; 35(2):77–90.
11. Bindon, K.A., Smith, P.A., Holt, H.E., Kennedy, J.A. (2010). Interaction between grape-derived proanthocyanidins and cell wall material. 2. implications for vinification. *J. Agric. Food Chem.* 58 (19):10736–46.
12. Casassa, F., Beaver, C.W., Mireles, M., Larsen, R.C., Hopfer, H., Heymann, H. (2013). Influence of fruit maturity, maceration length, and ethanol amount on chemical and sensory properties of Merlot wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 64(4):437–49.
13. Harbertson, J., Mireles, M.S., Harwood, E.D., Weller, K.M., Ross, C.F. (2009). Chemical and sensory effects of saignée, water addition, and extended maceration on high brix must. *Am. J. Enol. Vitic.*; 60(4):450–60.
14. Hanlin, R.L., Hrmova, M., Harbertson, J., Downey, M.O. (2010). Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research.*
15. Casassa, F., Harbertson (2014). Extraction, evolution, and sensory impact of phenolic compounds during red Wine maceration. *J. Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 5(1):83–109. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-030713-092438>
16. Zamora, F., Magriña, M., Luengo Hurtado, G., Margalef, P., Arola, L. (1995). Efecto del sangrado sobre el color y la composición en compuestos fenólicos del vino tinto. *La Sem. vitivinícola*, ISSN 0037-184X, No 2543, págs 1353-1357.
17. Gerbaux V. (1993). Etude de quelques conditions de cuvaision suseptibles d'augmenter la composition phénoliques des vins de Pinot noir. *Rev des Oenologue*; 69:86. Available from: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10027513596/>
18. Casassa F, Sari SE. (2015). Sensory and chemical effects of two alternatives of prefermentative cold soak in Malbec wines during winemaking and bottle ageing. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50 (4):1044–55.
19. Casassa, F., Bolcato, E.A., Sari, S.E. (2015). Chemical, chromatic, and sensory attributes of 6 red wines produced with prefermentative cold soak. *Food Chem.* 174:110–8.
20. Harbertson, J., Kennedy, J., Adams, D.O. (2002). Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *Am. J. Enol. Vitic.*; 53(1):54–9.
21. Harbertson, J., Picciotto, E.A., Adams, D.O. (2003) Measurement of Polymeric Pigments in Grape Berry Extracts and Wines Using a Protein Precipitation Assay Combined with Bisulfite Bleaching. *Am. J. Enol. Vitic.* 54(4):301–6.
22. Fanzone, M., Peña-Neira, Á., Jofré, V., Assof, M., Zamora, F. (2013). Efecto de la técnica de sangrado sobre la composición fenólica de vinos cv. Malbec. *Rev. la Fac. Ciencias Agrar.* 45(1):199–209.
23. Sacchi, K.L., Bisson, L.F., Adams, D.O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*; 56(3):197–206.
24. Bindon, K.A., Kassara, S., Smith, P.A. (2017). Towards a model of grape tannin extraction under wine-like conditions: the role of suspended mesocarp material and anthocyanin concentration. *Aust J Grape Wine Res.*;23(1):22–32.
25. Cerpa-Calderón, F.K., Kennedy, J.A. (2008). Berry integrity and extraction of skin and seed proanthocyanidins during red wine fermentation. *J. Agric. Food Chem.*; 56(19):9006–14.
26. Bindon, K.A., Smith, P.A., Kennedy, J.A. (2010). Interaction between grape-derived proanthocyanidins and cell wall material. 1. Effect on Proanthocyanidin Composition and Molecular Mass. *J. Agric. Food Chem.*;58(4):2520–8.
27. Dambergs, B. (2009). Manipulating Pinot Noir expression in the winery through novel wine making practices. [cited 2018 Feb 23].

INFLUENCIA DEL ALMACENAMIENTO Y PROCESADO DE DOS CULTIVARES DE BATATA EN EL CONTENIDO DE β -CAROTENO

J. Gabilondo¹; M.V. Feijoo²; G. Corbino¹; M. Héctor¹; L.S. Malec²

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) - Estación Experimental Agropecuaria San Pedro – Argentina - Buenos Aires.

²Universidad de Buenos Aires - Dpto. Química Orgánica. Fac. Ciencias Exactas y Naturales - Argentina Buenos Aires.

Correo electrónico: gabilondo.julieta@inta.gob.ar

RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron estudiar el contenido de β -caroteno en dos cultivares de batata de pulpa naranja, *Beauregard* y *Colorado INTA*; evaluar su variación durante la conservación y determinar el porcentaje retenido luego de procesado como dulce. Se analizó además, si existía correlación entre el contenido de β -14 caroteno y el color de la pulpa. El contenido de β -caroteno se determinó espectrofotométricamente y la evaluación del color se realizó por colorimetría según el sistema CIELab. Al momento de la cosecha, las batatas del cultivar *Colorado INTA* contenían un 27% más de β -caroteno que las del *Beauregard*. Luego de la conservación, la variación en ambos fue leve aunque significativa ($p < 0,05$). Al analizar la correlación entre las variables de color L^* , a^* , b^* y C^* con el contenido de β -caroteno se observó que la mejor correlación se logró con la coordenada a^* pudiéndose atribuir esto a la mayor incidencia del β -caroteno en el componente rojo del color de la pulpa. La pérdida de β -caroteno en la elaboración de los dulces fue muy elevada y similar en ambos cultivares.

Palabras clave: *Ipomea L.* batata, *Beauregard*; *Colorado INTA*, provitamina A

ABSTRACT

The objectives of this study were to study the content of β -carotene in two sweet potato cultivars with orange pulp, *Beauregard* and *Colorado INTA*; evaluate its variation during storage and determine the percentage retained after processing as creamed sweetpotato. The correlation between β -carotene and the color of the pulp was also analyzed. The β -carotene content was determined spectrophotometrically and the evaluation of color was performed by colorimetry according to the CIELab system. After harvest, β -carotene content in the *Colorado INTA* cultivar was 27% higher than in *Beauregard*. After 90 days storage, variation in both of them

was slight but significant ($p < 0.05$). When the correlation between variables L^* , a^* , b^* and C^* and β -carotene content was analyzed the best correlation was observed with the coordinate a^* , which was attributed to the influence of β -carotene in the red component of the pulp color. The 41 loss of β -carotene during the processing of creamed sweetpotato was very high and similar for both cultivars.

Keywords: *Ipomea L.* sweetpotato; *Beauregard*; *Colorado INTA*; provitamin A

INTRODUCCIÓN

La raíz de batata es rica en fibra dietaria, minerales, vitaminas y compuestos con actividad antioxidante, como ácidos fenólicos, antocianinas, tocoferoles y β -caroteno (1). Además de actuar como antioxidantes, los carotenoides y compuestos fenólicos, proveen a las batatas de colores distintivos a la pulpa (crema, amarillo profundo, naranja y púrpura). Los cultivares (cvs) de pulpa amarilla y naranja son ricos en carotenoides, de los cuales el β -caroteno es el más abundante (2, 3). Este último es considerado un precursor de la vitamina A (retinol) debido a que luego de ser absorbido en el organismo humano se convierte en esta vitamina. El consumo de este tipo de vegetales puede jugar un papel clave como paliativo de la deficiencia de vitamina A. Su biodisponibilidad en las batatas de pulpa color naranja es superior a la de zanahoria y vegetales de hojas verdes (4). Debido a que la batata es un cultivo sensible al frío se cultiva durante la estación templada. Para disponer de batatas durante todo el año, una vez cosechadas, éstas pueden ser almacenadas bajo condiciones controladas ($13\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ – 90% Humedad relativa) por 6-10 meses. Durante la conservación, las raíces sufren cambios en el metabolismo que afectan su composición (5, 6). Además, el contenido de β -caroteno en las batatas varía con el cultivar, la edad de la raíz, el clima y las prácticas agronómicas (7, 8). La dulzura natural de muchas variedades de batata posibilita la preservación de las raíces por la adición de azúcar para obtener una variedad de productos confitados, como caramelos, mermeladas y dulces, que son especialmente populares en América Latina y particularmente en Argentina. Sin embargo, durante el tratamiento térmico el contenido de provitamina A puede disminuir debido a su degradación (9, 10). Actualmente, se busca desarrollar cultivares de pulpa naranja debido a que en algunos países los consumidores prefieren estos colores de pulpa y, como se mencionó anteriormente, suelen tener mayores niveles de carotenos. La obtención de estos cultivares puede constituir una herramienta que le permita al productor diferenciar el producto, captar el creciente segmento de consumidores interesados en alimentos saludables, y así aumentar el consumo. En los últimos años, la Estación experimental Agropecuaria (EEA) del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) de San Pedro (Buenos Aires, Argentina) ha realizado trabajos de investigación con dos cultivares poco difundidos en la Argentina para su incorporación al mercado: *Colorado INTA*: desarrollada por la EEA San Pedro y *Beauregard*, por ser el cultivar más utilizado en EE.UU. En la zona, se ha destacado por su precocidad y rendimiento.

Los objetivos del presente trabajo fueron estudiar el contenido de β -caroteno en los cultivares de batata de pulpa naranja, *Beauregard* y *Colorado INTA*; evaluar su variación durante la conservación y determinar el porcentaje retenido luego de procesado como dulce. Se analizó además, si existía correlación entre el contenido de β -caroteno y el color de la pulpa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Se utilizaron muestras de los cvs *Beauregard* y *Colorado INTA*, de pulpa naranja cultivados en idénticas condiciones. Se tomaron, al azar, 10 batatas por cultivar al momento de la cosecha y luego de 90 días de almacenamiento en cámara a $13 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$. Cada muestra se formó utilizando un cuarto de cada una de ellas. A fin de comparar los valores obtenidos en los cv mencionados recién cosechados con los de otros cv de pulpa amarilla, se analizaron, *Morada INTA* y *Arapey* al momento de la cosecha.

Preparación del dulce

La pulpa de las batatas se cocinó al vapor durante 28 minutos a $94,5\text{ }^\circ\text{C}$ en cacerola doméstica. Al finalizar la cocción se la trituro hasta obtener un puré 95 cremoso. Para elaborar el dulce se procedió a pesar 100g de puré con 70g azúcar blanca, se mezcló hasta homogenizar y se calentó 2 minutos en microondas. Luego se adicionaron 2g de agar-agar disueltos en 50 ml de agua, se homogenizó y calentó nuevamente 1 minuto en microondas. Se refrigeró hasta gelificación y se almacenó a $-99\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

Determinación de humedad

Se determinó según el método AOAC: 920.151 (11) por secado en estufa de vacío (100 mmHg) a $70\text{ }^\circ\text{C}$ hasta peso constante.

Color: El color se determinó por triplicado con un colorímetro marca Minolta modelo CR-400 (Minolta Co. Ltd., Osaka, Japón). A partir de las coordenadas L^* (luminosidad), a^* (componente rojo-verde) y b^* (componente amarillo-azul) se calculó el parámetro C^* (Chroma, saturación). $C^* = [(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$.

Determinación de β -caroteno:

Se pesaron aprox. 0,3g para el tejido liofilizado y 5g para dulce y se analizaron según el método Rodríguez-Amaya y Kimura (12) con algunas modificaciones. Las absorbancias se midieron a 450 nm en un espectrofotómetro UV/Vis HP 8453 (Hewlett Packard, Estados Unidos). La curva estándar se realizó 110 utilizando concentraciones de β -caroteno, de 93% de pureza (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Los resultados se expresaron como mg β -caroteno por g base seca (bs) de batata y su equivalente en μg retinol/g bs. Los extractos se realizaron por triplicado.

Análisis estadísticos

Los datos experimentales se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics Plus (5.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 figuran los contenidos de β -caroteno, al momento de la cosecha, para los cultivares *Beauregard*, *Colorado INTA*, *Arapey* y *Morada INTA* expresados en $\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g bs}$ y su equivalente en retinol. Las batatas del cv *Colorado INTA* presentaron un 27% más de β -caroteno que las del cv *Beauregard*. Ambos cultivares de pulpa naranja presentaron contenidos un orden superior a los de pulpa amarilla, *Arapey* y *Morada INTA*. Teow y col. (13) analizaron cultivares de batata de distinto color de pulpa y encontraron valores similares a los del presente trabajo tanto para los cultivares de pulpa naranja como para los de pulpa amarilla. De acuerdo a la Junta de Alimentación y Nutrición del Instituto de Medicina del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, la dosis diaria recomendada de vitamina A ($\mu\text{g/día}$) para niños en edad pre-escolar es de 400 $\mu\text{g RAE/día}$; por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, 10g bs de batata/día (equivalentes a 50g batata fresca/día) tanto del cv *Beauregard* como de *Colorado INTA*, cubrirían la dosis diaria recomendada. Esta cifra corresponde a un peso menor al de una unidad de batata, lo que señala la riqueza de este producto como fuente de provitamina A. Cabe destacar que este valor calculado es considerablemente menor que la cantidad necesaria para cubrir la dosis diaria de 125g de batata fresca/día reportada por el Centro Internacional de la Papa (14) para los cultivares de pulpa naranja. Este cálculo probablemente considere un cierto margen de seguridad, teniendo en cuenta que el contenido de β -caroteno puede variar ampliamente de acuerdo a diversos factores, como se ha señalado anteriormente.

Tabla 1. Contenido de β -caroteno de 4 cultivares de batata expresados en $\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g bs}$ y su equivalente en $\mu\text{g retinol/g bs}$.

Cultivar	$\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g bs}$	Vitamina A $\mu\text{g RAE}^* / \text{g bs}$
<i>Beauregard</i>	560 \pm 8	46,7 \pm 0,7
<i>Colorado INTA</i>	712 \pm 18	59,3 \pm 1,5
<i>Arapey</i>	46,6 \pm 0,2	3,88 \pm 0,18
<i>Morada INTA</i>	46,9 \pm 0,3	3,91 \pm 0,02

Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm la Desviación Estándar de los resultados obtenidos.

*RAE (equivalentes de actividad de retinol): 12 $\mu\text{g } \beta\text{-caroteno}$: 1 $\mu\text{g retinol}$: 1 $\mu\text{g RAE}$ (15).

En la Fig. 1 se observan las variaciones en el contenido de β -caroteno para los cultivares *Beauregard* y *Colorado INTA* luego de 90 días de almacenamiento en cámara a 13 °C. Los contenidos de β -caroteno variaron significativamente ($p < 0,05$) para ambos cultivares aunque los cambios fueron leves. En el cultivar *Beauregard* se incrementó un 15%, y en el cultivar *Colorado INTA* disminuyó un 14%. Esto coincide con lo expuesto por Stathers y col. (16), quienes manifestaron que el almacenamiento de las batatas frescas afecta levemente el contenido de β -caroteno.

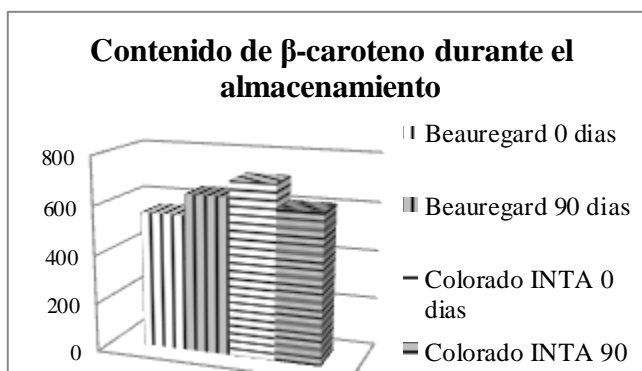


Figura 1. Variación de β -caroteno durante el almacenamiento en dos cultivares de batata, *Beauregard* y *Colorado INTA* expresados en $\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g bs}$.

En la Tabla 2 figuran las variables de color L^* , a^* , b^* y C^* de los cuatro cultivares evaluados al momento de cosecha y luego de 90 días de almacenamiento, para *Beauregard* y *Colorado INTA*. Al analizar la correlación entre las variables de color arriba mencionadas y el contenido de β -caroteno se observó que a^* , b^* y C^* correlacionaron positivamente (Fig. 2). L^* presentó una correlación baja por lo tanto no se muestra en la figura. De acuerdo a los valores de los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos, se evidencia que la mejor correlación se logró con la coordenada a^* (rojo-verde) pudiéndose atribuir esto a la mayor incidencia del β -caroteno en el componente rojo del color de la pulpa. Estos resultados coinciden con estudios previos (17, 18) en los que se reportaron altos (R^2) para las correlaciones de las variables a^* y b^* con el contenido de β -caroteno en cvs de pulpa naranja y amarilla. Los dulces elaborados con pulpa del cv *Colorado INTA* presentaron mayor contenido de β -caroteno ($110 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g batata bs}$) que los del cv *Beauregard* ($93 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g batata bs}$), con diferencias significativas entre ellos. Al comparar el contenido de β -caroteno retenido en los dulces con los valores de este compuesto en las batatas frescas, se observó que su disminución fue similar y considerablemente elevada para ambos cultivares (17% para los dulces elaborados con el cv *Beauregard* y 15% para los del cv *Colorado INTA*), conservándose las diferencias observadas en las batatas frescas. Una porción de 100g de este producto sólo cubriría el 3% de la dosis diaria recomendada de vitamina A para niños en edad preescolar.

Tabla 2. Variables de color, L^* , a^* , b^* y C^* de la pulpa de 4 cultivares de batata al momento de la cosecha.

Cultivar	Tiempo (días)	L^*	a^*	b^*	C^*
<i>Colorado INTA</i>	0	$72,9 \pm 2,3$	$22,4 \pm 1,3$	$44,0 \pm 1,3$	$49,5 \pm 2,9$
<i>Beauregard</i>	0	$72,3 \pm 1,4$	$22,9 \pm 1,1$	$48,2 \pm 1,1$	$53,3 \pm 2,2$
<i>Arapey</i>	0	$83,8 \pm 0,7$	$6,8 \pm 1,4$	$34,4 \pm 1,1$	$35,1 \pm 1,3$
<i>Morada INTA</i>	0	$85,5 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,7$	$33,7 \pm 0,6$	$33,9 \pm 2,3$
<i>Colorado INTA</i>	90	$71,4 \pm 2,6$	$22,2 \pm 1,5$	$46,2 \pm 1,5$	$51,3 \pm 5,1$
<i>Beauregard</i>	90	$72,6 \pm 1,6$	$21,8 \pm 1,3$	$47,6 \pm 1,3$	$52,4 \pm 2,3$

Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm la Desviación Estándar de los resultados obtenidos

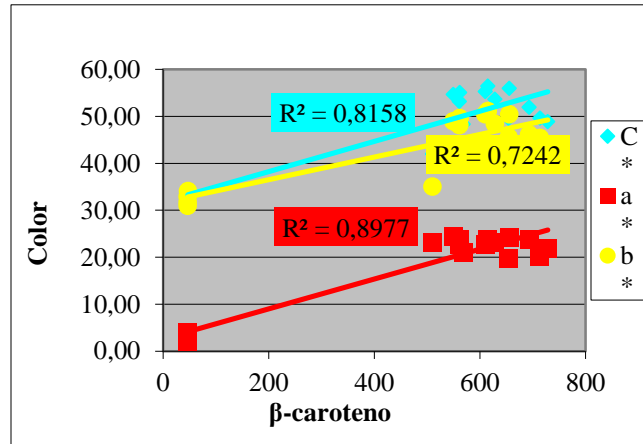


Figura 2. Correlación entre las variables de color a*, b* y C* y el contenido de β-caroteno en las muestras de batata frescas.

CONCLUSIONES

Las batatas de pulpa naranja analizadas pueden considerarse una excelente fuente de provitamina A, tanto en los cvs recién cosechados como luego de su almacenamiento en cámara. Sin embargo, los dulces pierden la mayor parte de este nutriente durante su procesamiento.

REFERENCIAS

1. Woolfe, J. (1993). Sweet potato: An untapped food resource. Cambridge: Cambridge University Press.
2. Rodriguez-Amaya, D.B. (1997). Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored food. USAID, OMNI Project. Arlington, VA: John Snow, Inc. p. 1–88.
3. Wu, X., Sun, C., Yang, L., Zeng, G., Liu, Z., Li, Y. (2008). β-carotene content in sweet potato varieties from China and the effect of preparation on β-carotene retention in the Yanshu No. 5. Innovative Food Science and Emerging Technologies 9, p. 581–586.
4. Van Jaarsveld, P.J., Faber, M., Tanumihardjo, S.A., Nestel, P., Lombard, C.J., Benade, A.J. (2005). Carotene-rich orange-fleshed sweet potato improves the vitamin A status of primary school children assessed with the modified-relative-dose-response test. Am J Clin Nutr 81, p. 1080-1087.
5. Takenaka, M.; Nanayana, K.; Isobe, S.; Murata, M. (2006). Changes in caffeic acid derivatives in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) during cooking and processing. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 70. 1: 172-177.
6. Huang, Y.H.; Picha, D.H.; Johnson, C.E. (1998). An alternative method for enzymatic assay of plant invertases. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 3158-3161.
7. Mozafar, A. (1994). Plant vitamins. Agronomic, physiological and nutritional aspects. Florida, USA: CRC Press, Inc. p. 19–87.
8. K'osambo, L.M., Carey, E.E., Mirsa, A.K., Wilkes, J., Hagenimana, V. (1998). Influence of age, farming site, and boiling on pro-vitamin A content in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) storage roots. Journal of Food Composition and Analysis, 11, p.305–321.
9. Gross, J. (1991). Pigments in vegetable. In Chlorophylls and carotenoids. New York: Van Nostrand Reinhold. p. 75–334.
10. Kidmose, U.; Christensen, L.P. Agili, S.M., Thilsted, S.H. (2007). Effect of home preparation practices on the content of provitamin A carotenoids in coloured sweet potato varieties (*Ipomoea batatas* Lam.) from Kenya. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 8, p. 399–406.
11. A.O.A.C., Association of the Official Analytical Chemists, 920.151. (1990). Official Methods of the Association of the Official Analytical Chemists, Ed. Horwitz, W., 14th ed., Washington, DC.
12. Rodriguez-Amaya, D.B., Kimura, M. (2004). HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. HarvestPlus Technical monograph series 2. Washington DC, USA: HarvestPlus International Food Policy Research Institute. p. 1–58.
13. Teow, C.C., Truong, V.D., McFeeters, R.F., Thompson, R.L., Pecota, K.V., Yencho, G.C. (2007). Antioxidant activities, phenolic and b-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. Food Chemistry v. 103, p. 829–838.
14. CIP (Centro Internacional de la Papa). <http://cipotato.org/sweetpotato/nutrition>. Acceso en Mayo 2012.
15. Trumbo, P., Yates, A.A., Schlicker, S., Poos, M. (2001). Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Journal of the American Dietetic Association v. 101, p. 294–301.

16. Stathers, T., Bechoff, A., Sindi, K., Low, J., Ndyetabula, D.V. (2013). Everything You Ever Wanted to Know about Sweetpotato: Reaching Agents of Change ToT Training Manual. International Potato Center, 5, p. 188, Dec 20.
17. Ameny, M.A., Wilson, P.W. (1997). Relationship between Hunter color values and b- carotene contents in white-fleshed African sweetpotatoes (*Ipomoea batatas* Lam). J. Sci. Food Agr. 73, p.301–306.
18. Hagenimana, V., Carey, E.E. Gichiki, S.T., Oyunga, M.A., Imungi, J.K. (1998). Carotenoid 215 content in fresh, dried and processed sweet potato products. Ecol. Food Nutr. 37, p. 455-473.

LA PRESENCIA DE BACTERIAS LÁCTICAS COMO UN AGREGADO DE VALOR EN GRANOS ANDINOS

C.A. Fontana¹; P.D. Fontana¹; S.M. Salazar^{1,2}; G.M Vignolo³

¹INTA EEA Famaillá, Tucumán, Argentina;

²Facultad de Agricultura e Zootenia, UNT, Tucumán Argentina

³CERELA, CONICET, Tucumán, Argentina

Correo electrónico: fontana.cecilia@inta.gob.ar

RESUMEN

Los Granos Andinos (GA) son plantas dicotiledóneas, que constituyern el componente principal de la dieta de las civilizaciones Andinas. Recientemente, el grano gluten-free (GF) de quinoa (*Chenopodium quinoa*) ha atraído la atención como alimento en todo el mundo debido a su alto valor nutricional. La FAO declaró que "la quinoa tiene el equilibrio de las proteínas y nutrientes mas cercanos al alimento ideal para el ser humano". En este estudio, se investigó la presencia de bacterias lácticas (BL) en ocho variedades diferentes de semillas

de quinoa del noroeste de Argentina (región Quebrada de Humahuaca, Jujuy). Los recuentos de BL después de un pre-enriquecimiento en caldo MRS estuvieron en el rango de 10^6 - 10^7 ufc/g. Un total de 233 colonias bacterianas fueron aisladas y analizadas por RAPD para evaluar la diversidad microbiana entre los aislados de BL. Se observó un polimorfismo considerable entre las cepas aisladas detectándose más de 50 perfiles de RAPD diferentes. La identificación taxonómica se logró mediante el uso de PCR especie-específica y secuenciamiento del gen ARN ribosomal 16S. Las principales especies de BL identificadas fueron *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus hirae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus reuteri*. Este estudio proporcionó información sobre un reservorio microbiano hasta ahora poco explorado que pueden convertirse en una potencial fuente de nuevos cultivos iniciales funcionales para mejorar la calidad nutricional y funcional de los alimentos derivados de granos Andinos.

Palabras clave: Bacterias Lácticas, RAPD, Quinoa, 16S

ABSTRACT

The Andean crops are dicotyledonous plants, constituting centerpieces of Andean civilizations 'diet. Recently, quinoa (*Chenopodium quinoa*) gluten-free grain have attracted attention as food worldwide due to their high nutritional value. The FAO declared that "the quinoa has the balance of protein and nutrient closes to the ideal food for human". In this study the presence of lactic acid bacteria (LAB) species was investigated in eight different varieties of quinoa seeds from Northwestern Argentina (Quebrada de Humahuaca, Jujuy). LAB counts after pre-enrichment in MRS were in the range of 10^6 - 10^7 cfu/g. A total of 233 isolated from quinoa seeds were analyzed by RAPD to assess the microbial diversity among LAB isolates. A considerable polymorphism among the strains isolated was observed being detected more than 50 different RAPD profile. The taxonomic identities were achieved by means of species-specific PCR and 16S RNA ribosomal sequences. The main LAB species identified were *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus hirae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus reuteri*. The results of this study provide valuable information of an unknown microbial reservoir still not exploited which can be a potential source of new functional starter cultures to improve nutritional and functional quality of Andean grains derived foods.

Keywords: Lactic Bacteria, RAPD, Quinoa, 16S.

INTRODUCCIÓN

En las regiones Andinas se originaron y domesticaron un gran número de especies vegetales; entre ellas la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) que constituyó el grano principal en la alimentación de los Incas. Debido a su gran variabilidad genética, se adapta a diversos hábitats agroclimáticos y condiciones edáficas desde Colombia hasta el sur de Chile, desde el nivel del mar (costa chilena) hasta más de 4000 m. Este ancestral grano Andino ha atraído la atención debido a la calidad y el valor nutricional de sus proteínas (15-17%), como una importante fuente de aminoácidos que están limitados en harinas de cereales tradicionales y el equilibrio excepcional entre aceite, proteína y grasa (1, 2). Además, la quinoa posee la característica de ser libre de gluten (GF) siendo una alternativa valiosa en la actualidad debido al creciente aumento de personas que padecen intolerancia al gluten (3). Por lo tanto, hay un mercado emergente para nuevos productos alimenticios fabricados con granos GF. Sin embargo, el uso de harina de quinoa por ejemplo en panificación, todavía es limitado debido a la baja calidad de leudado y sensorial de los productos finales, siendo necesario aplicar estrategias como la fermentación para mejorar ambas características (4). La fermentación de la masa en productos de panificación ha demostrado ser estrategia valiosa para mejorar la textura, palatabilidad, aroma, vida útil y valor nutritivo del pan tradicional. Por lo tanto, el uso de masa fermentada en inglés "Sourdough" en la panificación GF puede ser la nueva frontera para mejorar la calidad, la seguridad y la aceptabilidad de productos de panificación GF (5). La masa fermentada representa un ecosistema natural en el que las actividades de fermentación de las bacterias lácticas (BL) y las levaduras determinan en gran medida las características típicas de los productos de panificación resultantes (6). La composición microbiana de las masas fermentadas maduras de varios países europeos, que usan harinas de cereal convencional, han sido ampliamente investigado durante los últimos años, revelando una gran diversidad de BL (7), mientras que la fermentación de harinas GF ha sido menos explorado (8, 9, 10). A pesar del creciente interés en los granos Andinos y harinas GF, existe poca información disponible con respecto a la microbiología del grano Andino. El establecimiento y la estabilidad de un consorcio de microorganismos en masas fermentadas dependen de las comunidades microbianas y composición química de las materias primas, así como las interacciones entre microorganismos y parámetros de fermentación tales como temperatura, inóculo, rendimiento de la masa y tiempo de fermentación (11, 12, 13).

El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar taxonómicamente las LB presentes en semillas de quinoa provenientes del Norte Argentino, con el propósito de seleccionar futuros cultivos iniciadores provenientes de la microbiota autóctona, con potencial aplicación para la elaboración de masas fermentadas con harinas de Granos Andinos.

MATERIALES Y METODOS

Muestras

Se analizaron diferentes variedades de semillas de quinoa: Inca Pirce (Q1), Chilena (Q2), Real Hornillo (Q3), Puno (Q4), Roja Pandela (Q5), Nariño Pesto (Q6), Cica Hornillos (Q7), A26 (Q8), que fueron gentilmente cedidas por INTA de Hornillos, Jujuy Argentina.

Aislamiento de Bacterias Lácticas

Se realizó un enriquecimiento a partir de 25 g de semillas de las diferentes variedades de quinoa en 175 ml de MRS (14) caldo con cycloheximida durante durante 24 h, a 30 °C y luego se plaquearon diluciones seriales sobre MRS agar pH 5.5 y se incubaron en condición de anaerobiosis. Se procedió primero al recuento para estimar la carga bacterica y luego se aislaron de 10 a 20 colonias de diferentes placas correspondientes a las diluciones más altas. Todos los plaques de relizaron por triplicado.

Análisis Molecular

A los efectos de evaluar la biodiversidad entre los aislamientos, se recurrió al método de RAPD-PCR empleando ADN obtenido directamente a partir de colonias mediante un técnica rápida de extracción de ácidos nucleícos llamada microlisis (kit de microLysis™, de Labogen, Reino Unido). Las diferentes cepas se hicieron crecer en se medio MRS agar y se incubaron a 37 °C C durante 24-48hs. Las reacciones de RADP-PCR se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por Fontana y col., (15). Los perfiles de RAPD obtenidos de los aislamientos fueron digitalizados mediante un programa informatico “Gel Compare” a los efectos de obtener un “cluster” análisis.

Identificación Taxonómica de los aislamientos

Los aislamientos fueron preliminarmente caracterizados mediante observación microscopica, reacción de Gram y catalasa. Posteriormente se procedio a la identificación a nivel taxonómico mediante técnicas moleculares tales como reacciones de PCR especie-especifica y amplificación y secuenciamiento de gen de ARN ribosomal 16S. Los cebadores especificos usados en reacciones de PCR se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores usados en reacciones de PCR en este estudio.

Blanco	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Producto amplificado (pb)	Referencia Bibliografica
16S rRNA	P1	GCGGCGTCGCTA ATACATGC	650	Klijn y col., (1991)(16)
	P4	ATCTACGCATTTACCCGCTAC		
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Y2	CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	290	Ward y Timmins (1999) (17)
	Para	CACCGAGATTCAACATGG		
<i>Lactobacillus sakei</i>	16s	GCTGGATCACCTCCTTTC	235	Berthier y Ehrlich (1998) (18)
	Ls	ATGAAACTATTAATGGTAC		
<i>Lactobacillus curvatus</i>	16s	GCTGGATCACCTCCTTTC	235	Berthier y Ehrlich (1998) (18)
	Lc	TTGGTACTATTTAATTCTTAG		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	PI1	AATTGAGGCAGCTGGCCA	250	Quere, Deschamps y Urdaci (1997) (19)
	PI2	GATTACGGAGTCCAAGC		
<i>Leuconostoc lactis</i>	Llac-f	AGGCGGTTACTGGACAAC	742	Lee y col., (2000) (20)
	Llac-r	CTTAGACGGCTCCTTCCAT		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Lmes-f	AACTTAGTGTCGCATGAC	1150	Lee y col., (2000) (20)
	Lmes-r	AGTCGAGTTACAGACTACAA		
<i>Enterococcus sp.</i>	ENT1	TACTGACAAACCATTTCATGATG	120	Danbing y col., (1999) (21)
	ENT2	AACTTCGTCACCAACGCGAA		

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El alto valor nutricional de las semillas de quinoa se debe principalmente al alto contenido de proteínas y a la amplia gama de minerales y vitaminas (22). Las proteínas de la semilla son ricas en aminoácidos como lisina, treonina y metionina que son deficientes en cereales. La semilla se usa para elaborar diferentes productos alimenticios, como panes, galletas, galletas, crepes, magdalenas, panqueques y tortillas. Más recientemente, se ha prestado atención a la quinoa para las personas con enfermedad celíaca (alergia al gluten), como alternativa a los cereales trigo, centeno y cebada, que contienen gluten (23). Las BL constituyen una excelente alternativa para “biotransformar” agregando funcionalidad a diversas materias primas; por ejemplo la hidrólisis de proteínas en cereales libres de gluten por acción de las BL promueve su crecimiento y actividad metabólica conduciendo a la liberación de ácidos orgánicos, pequeños péptidos y aminoácidos (24, 25), influyendo en la calidad sensorial y funcional del producto fermentado. Estudios recientes señalan la acumulación de metabolitos como ácido γ -aminobutírico y péptidos con actividad biológica (antihipertensiva, antioxidante, fijadores de minerales y otros) por acción de peptidasas intracelulares de BL sobre estas harinas proteicas (26, 24). Estos compuestos bioactivos en concentraciones activas fueron exitosamente incorporados a productos panificados mediante el bio-enriquecimiento producido por las BL durante la fermentación (27, 28).

En este estudio se aislaron un total de 233 colonias presuntas BL provenientes de las diferentes semillas de Quinoa: 38 de semilla Inca Pirce (Q1), 24 de la Chilena (Q2), 29 de la Real Hornillo (Q3), 17 de la Puno (Q4), 30 de la Roja Pandela (Q5), 21 de la Nariño Pesto

(Q6), 22 de la Cica Hornillo (Q7), 30 de la A26 (Q8). La identificación fenotípica reveló la presencia de 60 cepas con forma bacilar y 173 cocos, Gram positivos y catalasas negativas entre las bacterias aisladas.

El análisis mediante reacciones de RAPD-PCR permitió evaluar la biodiversidad entre los aislamientos de BL presentes en cada variedad de semillas. Los perfiles de RAPD se normalizaron y se realizó un análisis comparativo de los mismos con el software GelCompare. El coeficiente Dice se usó para calcular las similitudes en los patrones RAPD, y los dendrogramas se obtuvieron por el método del grupo de pares no ponderados con promedios aritméticos.

Las figuras 1 A y B muestra los perfiles de RAPD obtenidos y el dendrograma obtenido a partir de los mismos, respectivamente, realizados sobre los aislamientos provenientes de Quinoa Chilena (Q2), Roja Pandela (Q5), Real Hornillo (Q3).

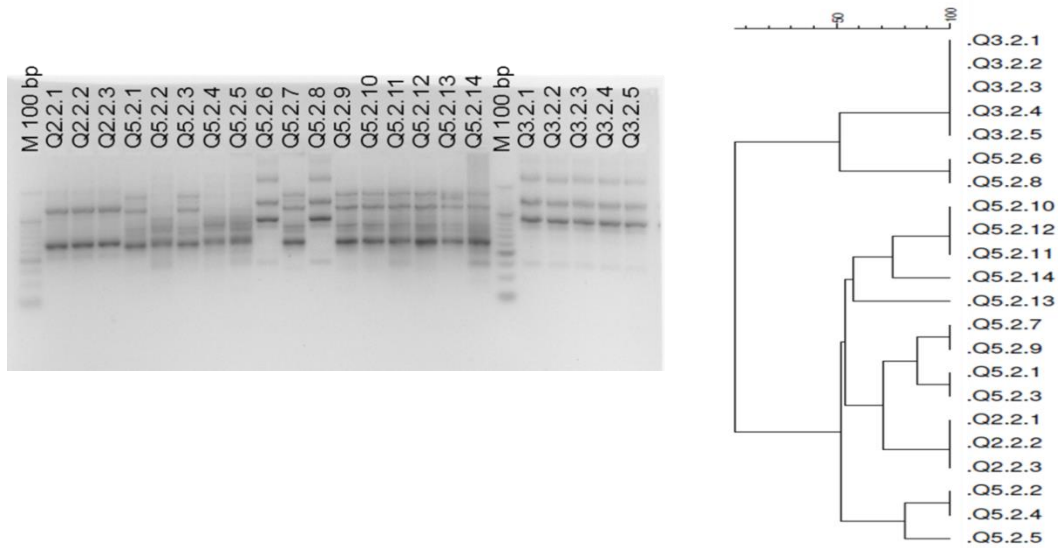


Figura 1. Perfiles de RAPD obtenidos (A) y análisis comparativo (B) entre cepas de Bacterias Lácticas aisladas de semillas de Quinoa Chilena (Q2), Roja Pandela (Q5), Real Hornillo (Q3).

Las figuras 2 A y B muestran la diversidad genética entre las cepas de BL de semillas de Quinoa Puno (Q4) y Cica Hornillo (Q7). Del análisis comparativo se pudo determinar la formación de clusters que agrupan las cepas por su origen indicando la presencia de biotipos específicos de BL para cada variedad de semilla.

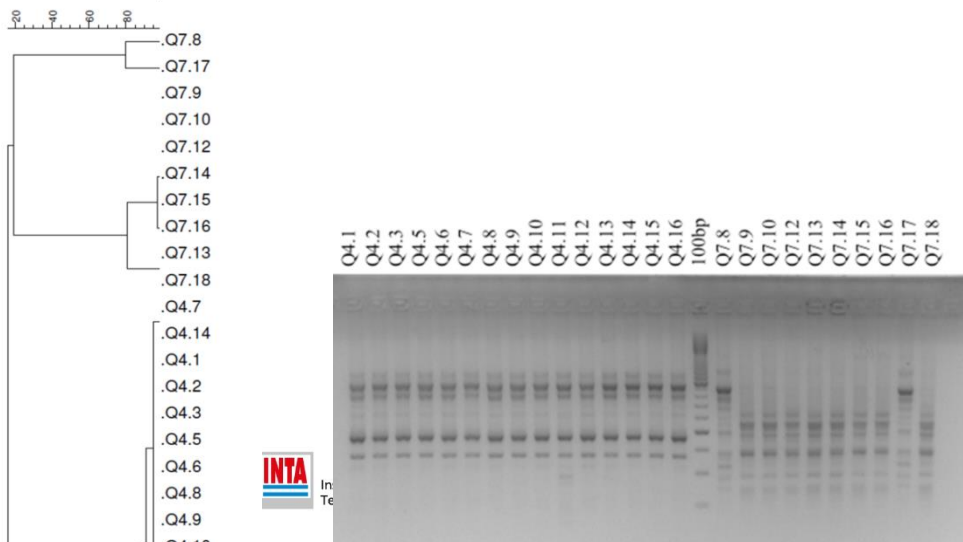


Figura 2. Perfiles de RAPD obtenidos (A) y análisis comparativo (B) entre cepas de Bacterias Lácticas aisladas de semillas de Quinoa Puno (Q4) y Cica Hornillo (Q7).

La identificación taxonómica reveló como principales especies BL presentes en las semillas: *Enterococcus faecium*, *E. mundtii* y *E. hirae*; *Leuconostoc mesenteroides* y *Lc. Lactis*; *Lactobacillus curvatus*, *L. casei / paracasei* y *L. reuteri*. La Tabla 2 muestra como estas especies están distribuidas y su abundancia en relación a la variedad de semilla analizada. Las mismas especies de BL fueron aisladas y caracterizadas a partir de “sourdoughs” fermentado espontáneamente a partir de harinas de quinoa de 2 diferentes variedades comerciales (9) indicando la materia prima como el origen de las mismas.

Tabla 2. Distribución de las principales especies de Bacterias Lácticas identificadas en las semillas de Quinoa

BL identificadas	Inca Pirce Q1	Chilena Q2	Real Hornillo Q3	Puno Q4	Roja Pandela Q5	Nariño Pesto Q6	Cica Hornillo Q7	A26 Q8
<i>L. plantarum</i>								9
<i>L. casei/paracasei</i>	10							
<i>L. reuteri</i>		3					8	
<i>L. sakei</i>				15		9		
<i>L. curvatus</i>								14
<i>Lc. mesenteroides</i>		5	23					
<i>Lc. lactis</i>	7					11	2	
<i>E. durans</i>								
<i>E. faecalis</i>	8							
<i>E. faecium</i>	4						12	
<i>E. mundtii</i>		16		3	14			
<i>E. hirae</i>					16			
Others	9		6			1		7
Total	38	24	29	18	30	21	22	30

CONCLUSIÓN

La variabilidad genética de la quinoa es enorme, y los cultivares se adaptan al crecimiento desde climas fríos y montañosos a condiciones subtropicales, lo que hace posible imaginar el gran reservorio de microorganismos de interés tecnológico presente en estas materias primas. Sin embargo para profundizar en una caracterización funcional/metabólica de las BL resulta imprescindible una correcta identificación de las mismas a nivel taxonómico.

Los resultados de este trabajo apuntan a crear una colección de cepas de BL a fin de seleccionar aquellas con las mejores propiedades para ser aplicadas como “Biotransformadoras” en productos novedosos a partir de Granos Andinos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vega-Gálvez, A., Mirya, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., Martínez, E.A. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* wild.), an ancient Yean grain: a review. *Journal of the Science y Food Agriculture*, 90:2541–2547.

2. Nascimento, A.C., Mota, C., Coelho, I., Gueifao, S., Santos, M., Matos, A.S., Gimenez, A., Lobo, M. (2014). Characterization of nutrient profile of quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus caudatus*), and purple corn (*Zea mays* L.) consumed in the North of Argentina: Proximates, minerals y trace elements. *Food Chemistry* 148, 420–426.
3. Alvarez-Jubete, L., Arendt, E.K., Gallagher, E. (2009). Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *International Journal of Food Science and Nutrition* 60, 240–257.
4. Gallagher, E., Gormley, T.R., Arendt, E.K. (2003). Crust and crumb characteristics of gluten-free breads. *Journal of Food Engineering* 56, 153–161.
5. Coda, R., Cagno, R.D., Gobbetti, M., Rizzello, C.G. (2014). Sourdough lactic acid bacteria: exploration of non-wheat cereal-based fermentation. *Food Microbiology* 37, 51–58.
6. Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., Van Schoor, A., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Vyamme, P., Huys, G. (2007). Influence of geographical origin and flour type on diversity of lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs. *Applied Environmental of Microbiology* 73, 6262–6269.
7. De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.-M., Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? *Food Microbiology* 37, 11–29.
8. Sterr, Y., Weiss, A., Schmidt, H. (2009). Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. *International Journal of Food Microbiology* 136, 75–82.
9. Ruiz Rodriguez, L., Vera Pingitore, E., Rollan, G., Martos, G., Saavedra, L., Fontana, C., Hebert, E., Vignolo, G. (2016). Biodiversity and technological potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented amaranth sourdough. *Letters in Applied Microbiology* 63, 147–154.
10. Ruiz Rodriguez, L., Vera Pingitore, E., Rollan, G., Cocconcelli, P.S., Fontana, C., Saavedra, L., Vignolo, G., Hebert, E. (2016). Biodiversity and technological-functional potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented quinoa sourdoughs. *Journal of Applied Microbiology* 120, 1289-1301.
11. Meroth, C.B., Walter, J., Hertel, C., Bryt, M.J., Hammes, W.P. (2003). Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied Environmental of Microbiology* 69, 475–482
12. Vogelmann, S.A. Hertel, C. (2011). Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. *Food Microbiology* 28, 583–589.
13. Ercolini, D., Pontonio, E., De Filippis, F., Minervini, F., La Storia, A., Gobbetti, M., Di Cagno, R. (2013). Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation. *Applied Environmental of Microbiology* 79, 7827–7836.
14. de Man, J, Rogosa, M., Sharpe, M. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23:130-135. Leeuwenhoek.
15. Fontana, C., Cocconcelli, P.S., Vignolo, G. (2005). Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *International Journal of Food Microbiology* 103, 131.
16. Klijn, N., Weerkamp, H., de Vos, W. (1991). Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology* 57:390–3393.
17. Ward, L.J.H., Timmins, M.J. (1999). Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 90–92.
18. Berthier, F., Ehrlich, S. (1999). Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:997-1007.
19. Quere, F., Deschamps, A., Urdaci, M.C. (1997). DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 82: 783–790.
20. Lee, H., Sae-Young Park, Kim, J. (2000). Multiplex PCR-based detection and identification of *Leuconostoc* species. *FEMS Microbiology Letters* 193:243-247.
21. Danbing, K., Picard, F. J., Martineau, F., Ménard, C., Roy, P. H., Ouellette, M., Bergeron, M.G. (1999). Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (11) 3497–3503
22. Fleming J.E., N.W. Galwey. (1995). Quinoa (*Chenopodium quinoa*). Williams J.T. (Ed.), *Cereals and Pseudocereals*, Chapman y Hall, London, pp. 3-83.
23. Jacobsen, S.E; Jorgensen, I. Stolen, O. (1994). Cultivation of quinoa (*Chenopodium quinoa*) under temperature climatic conditions in Denmark. *Agricultural Science*, 122, 47–52.
24. Ganzle, M.G. (2014). Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiol* 37, 2-10.
25. Dallagnol A., Pescuma, M., Font De Valdez, G., Rollán, G. (2013). Fermentation of quinoa and wheat slurries by *Lactobacillus plantarum* CRL 778: proteolytic activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 3129-3140.
26. Korhonen, H., Pihlanto, A. (2007). Bioactive peptides from food proteins. Hui Y.H. (Ed.), *Handbook of food products manufacturing*, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, New Jersey (2007), pp. 5–37.
27. Coda, R., Rizzello, C.G., Pinto, D., Gobbetti, M. (2012). Selected Lactic Acid Bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Appl Environ Microbiol* 78, 1087-1096.

28. Zhao, C.J., Hu, Y., Schieber, A., Gänzle, M.G. (2013). Fate of ACE-inhibitory peptides during the bread-making process: quantification of peptides in sourdough, bread crumb, steamed bread and soda crackers. *J Cereal Sci* 57, 514-519.

MEJORA EN LA CALIDAD NUTRICIONAL DE PANES A BASE DE HARINA DE TRIGO

V. Astiz, E. R. Molfese y M. L. Seghezzeo

Laboratorio de Calidad Industrial de Granos. Chacra Experimental Integrada Barrow (Convenio INTA-MAI), Ruta Nac. N° 3 km 487. CC 50. Pcia de Buenos Aires, Argentina.

Correo electrónico: astiz.valentina@inta.gob.ar

RESUMEN

El pan es un alimento de consumo masivo que puede mejorarse nutricionalmente mediante el agregado de distintos ingredientes. Los objetivos planteados fueron: evaluar la capacidad de algunos materiales de trigo pan (*Triticum aestivum* L.) para la elaboración de panes de buena calidad con el agregado de distintas proporciones (10 y 20%) de harina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), de amaranto (*Amaranthus caudatus* L.) y salvado de trigo; caracterizar químicamente las harinas puras y sus mezclas; determinar cuál es el tipo y grado de sustitución que produce los panes con mejores características industriales y; determinar su grado de aceptación. Panes con 100% harina de trigo fueron los testigos. Todas las harinas sustituidas fueron panificadas. Las harinas puras y sus mezclas se caracterizaron químicamente, y los panes industrial y sensorialmente. La calidad industrial de la harina base determinó la capacidad de tolerar sustituciones. Todas las mezclas al 20% produjeron aumentos en: proteína, grasa, ceniza y fibra dietaria total. Las sustituciones con harina de quinua y salvado produjeron una mejora en la relación ω -6/ ω -3. Las harinas con quinua, mostraron aumento en todos los aminoácidos esenciales, excepto Metionina y Triptófano. El análisis sensorial mostró una mayor aceptación de los panes con 10% de harina de amaranto.

Palabras clave: amaranto, quinua, salvado de trigo, trigo, panes

ABSTRACT

Bread is a worldwide food that can nutritionally be improved by adding different ingredients. The aims of this study were to assess the ability of some wheat's genotypes (*Triticum aestivum* L.) to obtain good quality breads with the addition of different rate percentages (10 and 20%) of quinoa flour (*Chenopodium quinoa* Willd.), amaranth flour (*Amaranthus caudatus* L.) and wheat bran; distinguish chemically pure flour and its blends; establish types and degrees of substitution that produce breads with better industrial characteristics and; determine consumers degree of acceptance. Breads with 100% wheat flour were use as control sample. All flours substituted were bread making. The pure flours, their mixtures and breads were characterized chemically, sensorially and industrially. Industrial base quality flour determined the ability to tolerate substitutions. All twenty percent's blends increased: protein, fat, ash and total dietary fiber. Substitutions with quinoa flour and wheat bran improved ω -6/ ω -3 ratio. Quinoa flour increased all essential amino acids, except Methionine and Tryptophan. Sensory analysis showed greatest acceptance of the loaves with 10% of amaranth flour.

Keywords: amaranth, quinoa, wheat bran, wheat, breads

INTRODUCCIÓN

En Argentina, el consumo de harina asciende a 94,8 kg/hab/año y el 73% de la molienda total de trigo se destina a la elaboración de pan y otros productos levados (1). Tanto la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) como la Organización Mundial de la Salud (OMS), califican a la quinua y al amaranto como alimentos únicos por su altísimo valor nutricional ya que pueden sustituir las proteínas de origen animal, debido a que contienen un balance de proteínas y nutrientes más cercano al ideal para el ser humano que cualquier otro alimento (2). Las actuales guías de nutrición enfatizan la incorporación de granos enteros a la dieta para mejorar la calidad de vida, mantener la salud y prevenir la mala alimentación, obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares y coronarias, algunos tipos de cáncer, entre otros. (3). Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) evaluar la capacidad de algunos materiales (variedades y líneas experimentales) de trigo pan para la elaboración de panes de buena calidad con el agregado de distintas proporciones (10 y 20%) de harina de quinua, harina de amaranto y salvado de trigo; 2) caracterizar químicamente harinas de trigo, quinua, amaranto, salvado de trigo y sus mezclas; 3) determinar cuál es la proporción de harina de quinua, harina de amaranto y salvado de trigo que produce el pan con mejores características industriales; 4) estimar la mejora de la calidad nutricional producida por la incorporación de la harina de quinua, harina de amaranto y salvado de trigo a una harina de trigo pan y; 5) determinar el grado de aceptación por parte de los consumidores, de los panes suplementados con harina de quinua y amaranto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron en los años 2013 y 2014. Se eligieron materiales de trigo pan, cultivados bajo las mismas condiciones ambientales, que cubrieran un rango amplio de calidad panadera. Los granos de quinua y amaranto fueron obtenidos en ensayos implantados en la Estación Experimental Agropecuaria Hilario Ascasubi (Sur de la Pcia. de Buenos Aires). Las muestras de trigo se

caracterizaron usando los métodos de rutina del Laboratorio de Calidad Industrial de Granos de Chacra Experimental Integrada Barrow. Parámetros del grano: Peso hectolítrico (Resolución SAGPyA 557/97); Peso de mil granos (Norma IRAM 15.853: 2012); Proteína (Método NIRT. Aparato Infrac (Tecator, Suecia)); Cenizas en grano entero y harina (Norma IRAM 15.851: 2009). Los granos se molieron en Molino Bühler 202 D (Bulher, Suiza) (Norma IRAM 15.854-2: 2014). Para la harina se determinaron: % Gluten húmedo e Índice de gluten (IRAM 15864-2: 2013); Color con el equipo Minolta Chromameter CR-310 (Minolta, Tokio), usando el Método triestímulo, notación CIE- Lab, L (luminosidad), a (rojo) y b (amarillo), iluminante D 65; Número de caída (Norma IRAM 15.862: 2003); Alveograma (Norma IRAM 15.857: 2012) y Farinograma (Norma IRAM 15.855: 2000). Los panes se elaboraron según la Norma IRAM 15.858- 1 y 2 (1996), que describe un ensayo de panificación experimental para ser usado en programas de mejoramiento de trigo. Este método propone una fórmula basada exclusivamente en harina, agua, levadura, sal y azúcar, sin el agregado de otros ingredientes ni mejoradores. Se evaluó el volumen de los panes, el peso de las piezas y su volumen específico (4). En el año 2013 se utilizaron cuatro cultivares de trigo pan, el criterio de selección de los mismos se basó en la presencia de características de calidad industrial contrastantes, se eligieron tres variedades (Buck Meteoro, ACA 303, Baguette 31) y una línea experimental (Línea 3). En el 2014, con el mismo criterio, se eligieron dos variedades: ACA 304 de buena calidad industrial y SY 200, de calidad inferior a esta. En ambos años de ensayo la quinua utilizada fue de la variedad Faro, de origen chileno. Para estimar su contenido de saponinas se usó el Método de la espuma, que consiste en disolver las saponinas en agua y agitar para tener una espuma estable cuya altura está correlacionada con el contenido de saponinas de los granos (5). Luego se desaponificó mediante el método húmedo descrito por Repo-Carrasco (6). Las semillas de amaranto correspondían a una población sin identificación varietal. El salvado se obtuvo como subproducto de la molienda de las muestras de trigo. Los granos de quinua y amaranto se molieron en molino de martillo (Perten 120, Suiza), con malla de 0,5 mm para lograr una granulometría similar a la de la harina de trigo. Se confeccionaron mezclas de harina de trigo con 10 y 20 % de harina de quinua, de amaranto y de salvado de trigo. Luego se realizaron los análisis químicos de las muestras puras y las mezclas: humedad y cenizas (7), proteínas totales (8), lípidos totales (Método Soxhlet. AOAC: 1990), fibra (kit fibra dietaria total Megazyme, Irlanda), carbohidratos y valor energético. También se determinó la composición de ácidos grasos (Método de Folch y cromatografía gaseosa en Cromatógrafo Varian CP3800, EEUU) en harinas puras y mezclas; y se cuantificaron los aminoácidos esenciales en harina de trigo, harina de quinua y sus mezclas al 10 y 20% por HPLC (High-performance liquid chromatography).

Análisis Sensorial

El análisis sensorial se realizó sobre los panes elaborados con el agregado de 10 y 20% de harina de Quinua y Amaranto, a una harina de trigo pan. También se evaluó el pan 100% harina de trigo que fue utilizado como testigo. Para dicho análisis se elaboró una Planilla de Evaluación Sensorial, en la cual la pregunta de inicio fue: “¿Qué tipo de alimentos consume mayoritariamente en su dieta?”; esto nos permitió saber, de manera aproximada, cómo era la dieta de cada uno de los evaluadores. Los atributos descriptos para los panes fueron: aroma, color y textura de corteza y miga, amargor y retrogusto; por último, se pidió una evaluación general de los panes. Los evaluadores fueron 25; 13 mujeres y 12 hombres, con una franja etaria de entre 27 a 60 años. Todos consumidores de este tipo de alimento. En total se evaluaron 6 tipos de panes. Para realizar la degustación de los mismos, se cortó una porción de 1 cm de espesor de cada uno y se los ordenó al azar, se taparon y numeraron del 1 al 6, cada participante debía ir completando la planilla a medida que descubría cada rodaja, esto evitó la comparación visual entre muestras. Se realizó el Análisis de la Varianza (ANOVA Simple) y el Análisis de Componentes Principales (ACP) con los resultados obtenidos de dicha evaluación. Se utilizó para ello, el paquete estadístico InfoStat (9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo año 2013

En las harinas puras los mejores panes correspondieron a la línea experimental (Línea 3), que mostró mayor tiempo de fermentación, volumen, volumen específico y valor panadero (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de Absorción de Agua (%AA); Tiempo de Fermentación, min (TF); Volumen de Pan, ml (Vol), Volumen Específico (Ve) y Valor Panadero (VP) de las panificaciones realizadas con harinas puras, en 2013.

	PANIFICACION				
	%AA	T.FER.	Vol	Ve.	VP
B. METEORO	60,0	120	615	4,5	91
BAGUETTE 31	60,0	120	610	4,4	93
ACA 303	60,0	120	615	4,5	91
LINEA 3	60,0	130	675	4,9	96

Cuando se panificaron las mezclas, las adicionadas con quinua presentaron los mejores volúmenes de pan, aún con la sustitución del 20%; los panes elaborados con amaranto resultaron los de menor volumen. La variedad de trigo de mejor respuesta al agregado de salvado y harinas de quinua y amaranto fue Buck Meteoro (Tabla 2).

Tabla 2. Volumen de pan (ml) de cada una de las variedades o líneas puras (testigo) y de sus mezclas con salvado de trigo, harina de quinua y harina de amaranto

	B. METEORO	BAGUETTE 31	ACA 303	LINEA 3
TESTIGO	670	610	615	675
SALVADO	625	460	525	605
10% QUINUA	655	580	545	600
AMARANTO	645	515	460	575
SALVADO	525	425	440	475
20% QUINUA	615	490	480	500
AMARANTO	505	460	410	425

En el cuadro 3, se presentan los resultados de los análisis químicos realizados a las harinas puras de trigo, quinua y amaranto y a las mezclas de harina de trigo con 20% de salvado, harina de quinua y harina de amaranto.

Tabla 3. Contenido de Humedad (Hum); Proteínas totales (Prot); Grasa total (Gra); Cenizas (Cen); Carbohidratos (Carb) y Valor Energético en las harinas estudiadas en 2013: Harina de Trigo pura (harina de trigo pan tipo); mezcla con Salvado de Trigo al 20%; Harina de Quinua pura y su mezcla al 20%; Harina de Amaranto y su mezcla al 20%.

		Hum g/100g	Prot g/100g	Gra g/100g	Cen g/100g	Carb g/100g	VE Kcal/100g
Har. Trigo	Pura	10,9	11,4	1,11	0,46	76,4	388,0
Salvado	20%	12,1	12,6	1,61	1,21	72,5	383,8
Har. Quinua	Pura	8,5	15,4	5,15	3,44	67,4	412,3
	20%	10,7	11,9	1,85	0,92	74,6	390,5
Har. Amaranto	Pura	9,2	16,3	6,97	2,38	65,1	424,9
	20%	10,9	11,7	2,32	0,67	74,3	393,0

Los granos andinos mostraron los valores de proteínas más altos (15,4% para quinua y 16,3% para amaranto), por lo que las mezclas con 20% de estas harinas presentaron un aumento en el contenido de proteínas respecto a la harina de trigo pura (4 y 3%, respectivamente). El mayor porcentaje correspondió a la mezcla con 20% de salvado de trigo (12,6%), y que representó un incremento del 11%.

El amaranto presentó el mayor contenido de grasas (6,97%), en consecuencia, la adición de ésta harina a la de trigo pura elevó el contenido de 1,11 a 2,32% (109% de incremento); la harina de quinua también produjo un aumento en la mezcla con 20%, aunque no tan marcado (67% de incremento), llegó a 1,85% de grasa. En el caso del salvado de trigo, el aumento fue aún menor (45%).

Las diferencias en el contenido de cenizas se debieron a que en el caso del trigo se retiró completamente el pericarpio a través del proceso de molienda para tener una harina blanca, en cambio, de las semillas de quinua y amaranto se obtuvo una harina integral, sin eliminar ninguna fracción. Como los dos granos andinos poseen naturalmente porcentajes de cenizas mayores que el trigo, esto se vio reflejado en las cenizas de las mezclas. Sin embargo, la mezcla que dio el mayor valor de cenizas (1,21%) fue la que incorporó 20% de pericarpio de trigo, este incremento fue de 125%, respecto a la harina de trigo pura.

El contenido de carbohidratos resultó inferior en las harinas de quinua y amaranto puras con respecto a la de trigo. Las mezclas tuvieron valores intermedios. El valor energético, si bien fue superior en las harinas de quinua y amaranto con respecto al trigo (0,6 y 1% de incremento, respectivamente), esas diferencias no provocaron aumentos importantes en las mezclas. En el caso de la mezcla con salvado de trigo, el valor energético disminuyó respecto a la harina de trigo pura (decreció un 1%).

Como se observa en la Tabla 4, los AGS (Ácidos Grasos Saturados) resultaron más altos en la harina de amaranto que en la de trigo, lo que generó un pequeño aumento en la mezcla con 20% amaranto; en cuanto a la sustitución con 20% de salvado, la concentración de AGS fue levemente mayor, debido posiblemente a la presencia del aceite proveniente del germen en el salvado. La harina de quinua presentó las concentraciones más bajas de AGS, esto coincide con lo descrito por Abugoch (11) y Koziol (12).

Los AGM (Ácidos Grasos Monoinsaturados) aumentaron en todas las sustituciones con harina pero especialmente en la mezcla con amaranto. Los AGP (Ácidos Grasos Poliinsaturados) del trigo, la quinua y sus mezclas no mostraron grandes diferencias pero sí el amaranto, cuya concentración fue muy inferior.

En el caso del ω -3 (ácido linolénico), los aumentos importantes se dieron en las mezclas con salvado de trigo (4,59%) y con harina de quinua (4,55%). La concentración de ω -6 (ácido linoleico) fue elevada en todas las muestras analizadas, siendo la más baja la de harina de amaranto y, por consiguiente la mezcla con ese grano.

Tabla 4. Composición de ácidos grasos: Ácidos Grasos 20-22 carbonos, g/100g de lípidos totales (C 20-22); Ácidos Grasos Saturados (AGS); Ácidos Grasos Monoinsaturados (AGM); Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGP); sumatoria de ácidos grasos ω -3 (ω -3); sumatoria de ácidos grasos ω -6 (ω -6), en las harinas estudiadas en 2013: Harina de Trigo pura (harina de trigo pan tipo); mezcla con Salvado de Trigo al 20%; Harina de Quinua pura y su mezcla al 20%; Harina de Amaranto y su mezcla al 20%.

		AGS (g/100g)	AGM (g/100g)	AGP (g/100g)	Linolénico (ω -3) (g/100g)	Linoleico (ω -6) (g/100g)	ω -6/ ω -3
Har. Trigo	Pura	19,34	10,11	64,63	3,35	61,29	18,32
	20%	19,86	13,00	62,28	4,59	57,69	12,58
Har. Quinua	Pura	11,33	13,85	66,87	6,80	60,07	8,83
	20%	14,33	12,59	65,35	4,55	60,80	13,49
Har. Amaranto	Pura	21,95	24,87	48,47	1,40	47,07	33,72
	20%	20,35	15,99	37,19	1,73	35,46	20,46

Según la OMS, la relación ω -6/ ω -3 recomendada en la dieta para humanos debería estar entre 5:1 y 10:1 (10); la harina de trigo pura presentó una relación alta, de 18,32; mientras que las mezclas con harina de quinua y con salvado de trigo dieron valores de 13,49 y 12,58, respectivamente; lo cual mostró que estas sustituciones al 20% mejoraron dicha relación.

Ensayo año 2014

En esta campaña se usaron como testigos la harina de dos variedades de trigo pan: ACA 304 de buena calidad industrial y SY 200 de calidad inferior, esto se evidenció en el Tabla 5, donde el volumen de pan, el volumen específico y el valor panadero resultaron más altos para ACA 304. Las diferencias en las panificaciones de las mezclas no fueron tan claras como en 2013, aunque el comportamiento de ACA 304 fue superior al de SY 200 particularmente para la sustitución 20% (Tabla 6).

Tabla 5. Porcentaje de Absorción de Agua (%AA); Tiempo de Fermentación, min (TF); Volumen de Pan, ml (Vol), Volumen Específico (Ve) y Valor Panadero (VP) de las panificaciones realizadas con harinas puras, en 2014.

	PANIFICACION				
	AA	T.FER.	VOL	Ve.	VP
ACA 304	62,5	130	655	4,8	97
SY 200	60,1	115	610	4,3	90

Tabla 6. Volumen de pan (ml) de cada una de las variedades o líneas puras (testigo) y de sus mezclas con salvado de trigo, harina de quinua y harina de amaranto.

		ACA 304	SY 200
10%	TESTIGO	655	610
	SALVADO	565	515
	QUINUA	545	450
	AMARANTO	560	485
20%	SALVADO	470	410
	QUINUA	545	405
	AMARANTO	470	<400

En el Tabla 7 se observan resultados similares a los del año 2013 (Tabla 3), en los cuales el contenido de proteínas, de grasas y de cenizas fue mayor en las harinas puras de granos andinos y en el salvado de trigo, provocando aumentos en las mezclas, respecto a la harina de trigo pan pura. Los valores obtenidos en ambos años para el análisis químico de la quinua y del amaranto coincidieron con los mencionados por diferentes autores (12-17).

Tabla 7. Contenido de Humedad (Hum); Proteínas totales (Prot), Grasa total (Gra), Cenizas (Cen), Carbohidratos (Carb), Valor Energético (VE), Fibra Dietaria Insoluble (FDI), Fibra Dietaria Soluble (FDS), y Fibra Dietaria Total (FDT), en las harinas estudiadas en 2014: Harina de Trigo pura (harina de trigo pan tipo); mezcla con Salvado de Trigo 10 y 20%; Harina de Quinua pura y su mezcla 10 y 20%; Harina de Amaranto y su mezcla 10 y 20%.

		Hum g/100	Prot g/100g	Gra g/100g	Cen g/100g	Carb g/100g	VE Kcal/100g	FDI g/100g	FDS g/100g	FDT g/100g
Har. Trigo	Pura	11,7	12,2	0,94	0,56	74,9	434,5	2,44	0,24	2,68
	Pura	10,4	16,1	6,34	2,23	64,9	416,9	36,86	1,70	37,67
Salvado	10%	11,9	12,5	1,36	0,99	73,2	383,7	4,38	0,81	5,19
	20%	12,3	12,9	1,76	1,26	71,7	384,1	7,43	0,48	7,91
Har. Quinua	Pura	12,4	16,4	4,64	2,43	64,1	456,0	8,64	0,79	9,43
	10%	11,6	12,7	1,45	0,69	73,5	437,9	1,89	0,64	2,53
	20%	10,8	13,1	1,95	0,86	73,3	440,1	3,58	0,26	3,84
Har. Amaranto	Pura	6,0	17,6	5,61	2,62	68,1	432,0	4,74	0,16	4,90
	10%	11,7	12,8	1,52	0,31	73,7	388,8	2,38	0,16	2,54
	20%	11,7	12,9	2,03	0,69	72,7	390,2	3,68	0,29	3,97

Los contenidos de fibra dietaria total (FDT) del salvado de trigo (37,67%), de la quinua y del amaranto fueron altos, por lo que se produjeron incrementos importantes en los distintos tipos y grados de sustitución respecto a la harina de trigo pura. Los incrementos registrados en las mezclas de 20% fueron: 195% con salvado, 43% con quinua y 48% con amaranto. Los valores de fibra dietaria total obtenidos para la quinua coincidieron con los presentados por diversos autores (15-16, 18-19). En la tabla 8 se presenta el contenido de ácidos grasos en las muestras ensayadas durante el año 2014. Los AGS se encontraron en mayor cantidad en el salvado que en la harina de trigo (20,58% vs 17,02%), aunque no provocó cambios importantes en sus mezclas. La quinua mostró valores intermedios y produjo disminuciones en los contenidos de AGS de las mezclas, respecto a la harina de trigo pura.

En el caso de los AGM, se confirmó lo obtenido en 2013 (Tabla 4), donde las sustituciones con quinua, amaranto y salvado de trigo presentaron contenidos más altos (15,83%, 19,90% y 17,35%, respectivamente) que la harina de trigo pura (12,76%). Los AGP también se comportaron de manera similar al 2013, las sustituciones con quinua dieron valores más altos que la harina de trigo pura y las mezclas con amaranto dieron valores más bajos.

El ácido graso linoléico (ω -6) se encontró en mayores concentraciones en las mezclas con harina de quinua (4,07%) y con salvado de trigo (4,54%) al 20%. En la harina de quinua y en las mezclas con quinua se encontraron los porcentajes más altos del ácido graso linoleico (ω -6) 59,13 y 60,31%, respectivamente. Las relaciones ω -6/ ω -3 más saludables, según lo recomendado por la OMS, se obtuvieron para las mezclas al 20% con salvado de trigo y con harina de quinua; resultados similares fueron obtenidos en los ensayos del 2013 (Tabla 4).

Tabla 8. Composición de ácidos grasos: Ácidos Grasos 20-22 carbonos, g/100g de lípidos totales (C 20-22); Ácidos Grasos Saturados (AGS); Ácidos Grasos Monoinsaturados (AGM); Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGP); sumatoria de ácidos grasos ω -3, (ω -3); sumatoria de ácidos grasos ω -6 (ω -6), en las harinas estudiadas en 2014: Harina de Trigo pura (harina de trigo pan tipo); mezcla con Salvado de Trigo 10 y 20%; Harina de Quinua pura y su mezcla 10 y 20%; Harina de Amaranto y su mezcla 10 y 20%.

		AGS g/100	AGM g/100	AGP g/100	Linoléico (ω -3) g/100	Linoleico (ω -6) g/100	ω -6/ ω -3
Har. Trigo	Pura	17,02	12,76	60,30	3,55	56,75	16,01
	Pura	20,58	23,61	45,27	1,41	43,86	31,06
Salvado	10%	16,81	14,53	59,25	3,80	55,44	14,58
	20%	17,22	17,35	62,57	4,54	58,03	12,78
Har. Quinua	Pura	16,17	19,12	60,22	4,95	59,13	11,16
	10%	15,89	15,01	65,56	3,70	61,86	16,73
	20%	15,07	15,83	64,38	4,07	60,31	14,80
Har. Amaranto	Pura	-	16,79	63,97	4,84	55,27	12,22
	10%	16,56	15,77	50,22	2,47	47,75	19,34
	20%	19,19	19,90	51,82	2,31	49,51	21,48

En la Tabla 9 se observa el contenido de aminoácidos esenciales en harina de trigo pura, en harina de quinua y en las sustituciones al 10 y 20%. Todos los aminoácidos esenciales se encontraron en mayor concentración en la harina de quinua que en la harina de trigo pan, coincidente con los datos publicados por Repo-Carrasco *et al.* (13), por esta razón, en las mezclas se produjo un aumento para todos los aminoácidos, excepto la Met y el Trp que se mantuvieron en valores similares a los hallados para la harina de trigo pan pura. Comparando la harina de trigo pura con la sustitución al 20% de harina de quinua, se observó que la Lis fue el aminoácido que presentó mayor incremento, pasando de 1,45 a 2,11 g/100 g proteína (equivale a un 45% de aumento); algo similar ocurrió con los aminoácidos Val y Leu, que mostraron valores 30% más altos y con Isoleucina e Histidina donde el aumento fue de casi un 25%.

Tabla 9. Contenido de aminoácidos esenciales, g/100 g de proteína en algunas harinas estudiadas en 2014: Harina de Trigo pura (harina de trigo pan tipo); Harina de Quinua pura y su mezclas 10 y 20%.
ND: No Detectado

		Thr	Val	Met	Ile	Leu	Phe	His	Trp	Lys	Arg
Har. Trigo	Pura	1,74	1,95	0,87	1,81	3,33	2,82	1,38	ND	1,45	2,24
	Pura	2,46	2,56	1,33	2,46	3,79	2,96	2,14	0,05	3,9	6,19
Har. Quinua	10%	1,94	2,64	1,04	2,36	4,44	3,37	1,73	ND	2,01	2,98
	20%	1,97	2,58	0,88	2,24	4,35	3,08	1,70	ND	2,11	2,78

Análisis Sensorial

Como se muestra en la Figura 1, se pudo determinar la distribución de los distintos tipos de alimentos consumidos mayoritariamente por los evaluadores. La carne representó el 37%, siendo el tipo de alimento más elegido, las frutas y verduras y los hidratos de carbono mostraron porcentajes de 27 y 20%, respectivamente. Mientras que los cereales resultaron ser los menos consumidos (16%).

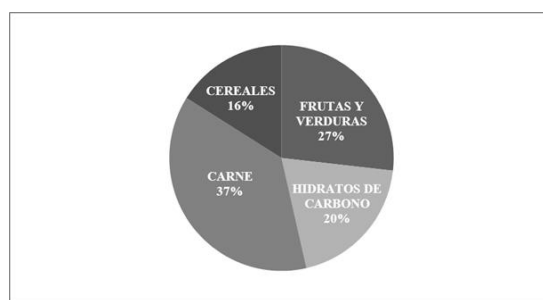


Figura 1. Distribución del tipo de alimento consumido habitualmente por los participantes de la evaluación sensorial

La tabla 10 muestra los puntajes promedio obtenidos para cada atributo sensorial en cada tipo de pan. El pan elaborado con 100% harina de trigo pan (Testigo), tal lo esperado, fue el que mayor aceptación general obtuvo, con aroma y textura de corteza y miga más agradable, y con el menor retrogusto y amargor. En el otro extremo, el pan elaborado con 20% con harina de quinua estuvo asociado con los atributos más negativos de la evaluación sensorial, se caracterizó por tener aroma y textura más desagradable, mayor amargor y retrogusto y una aceptación general más baja. Los panes con 10 y 20% de harina de amaranto y con 10% de quinua tuvieron una aceptación relativamente buena, sin diferencias estadísticas significativas con el testigo.

El atributo de color de miga y corteza evidenció que los panes elaborados con 20% harina de quinua resultaron los más oscuros, mientras que el más claro fue el testigo, mostrando diferencias significativas con el resto de los panificados estudiados.

Tabla 10. Puntajes promedio de los atributos sensoriales evaluados por los consumidores en los panes: Pan harina de trigo al 100% (testigo); Pan mezcla de harina de trigo y 10% de harina de quinua (10% quinua); Pan mezcla de harina de trigo y 20% de harina de quinua (20% quinua); Pan mezcla de harina de trigo y 10% de harina de amaranto (10% amaranto) y; Pan mezcla de harina de trigo y 20% de harina de amaranto (20% amaranto)

Pan	ATRIBUTOS							
	Aroma	Color corteza	Color miga	Textura corteza	Textura miga	Amargor	Retrogusto	Aceptación general
TESTIGO	7,2 b	6,2 a	2,8 a	7,7 b	7,9 b	2,4 a	2,6 a	7,7 b
10% QUINUA	6,3 ab	6,9 ab	4,7 b	6,8 b	6,8 ab	3,0 ab	3,7 ab	6,7 ab
20% QUINUA	5,5 a	8,0 b	6,5 c	5,2 a	5,7 a	4,6 b	4,4 b	5,6 a
10% AMARANTO	7,5 b	6,6 a	4,2 b	6,6 ab	7,2 b	2,6 a	3,2 ab	7,3 b
20% AMARANTO	6,5 ab	6,4 a	5,0 b	6,8 b	6,9 ab	3,4 ab	3,4 ab	6,6 ab

Valores con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Con los datos obtenidos del análisis sensorial se realizó un ACP (Figura 2), en el cual la primer componente principal (CP 1) explicó el 93,8% de la variación de los datos y la segunda componente principal (CP 2) el 3,7%; esto resultó en una explicación total de los datos del 97,5%. A su vez, el porcentaje de reconstrucción de cada uno de los atributos sensoriales evaluados resultaron ser elevados, con valores mayores al 93,0% (Tabla 11). La CP 1 separó los panificados evaluados en 2 grandes grupos: los que tuvieron mayor aceptación general, con aroma y texturas más agradables, donde se ubicaron el testigo y los panes realizados con la sustitución 10% de harina de amaranto y; los que estaban asociados a los atributos de menor aceptación, tales como mayor retrogusto, amargor y color más oscuro de corteza y miga, ahí se ubicaron los panes sustituidos con 20% de harina de quinua. Los panes elaborados con 10% de harina de quinua y con 20% de harina de amaranto se ubicaron en una zona intermedia a estos dos grupos descriptos anteriormente. Si evaluamos el grado de relación entre los atributos estudiados para estos panificados, podemos destacar que el retrogusto estuvo asociado positivamente con el color de la miga y corteza; mientras que el amargor estuvo relacionado de manera negativa con el aroma y con la aceptación general de los panes.

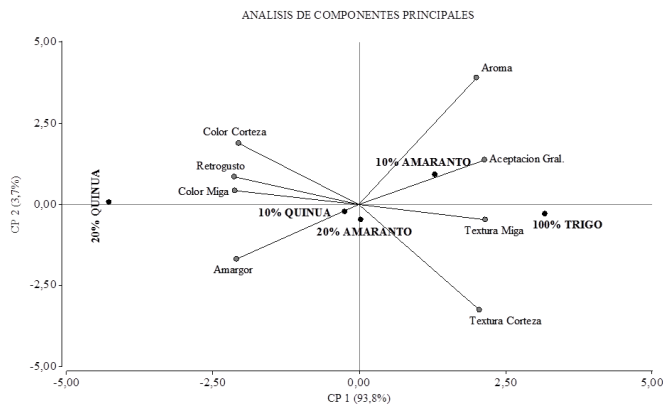


Figura 2. Análisis de Componentes Principales sobre la evaluación sensorial de los panes por parte de los consumidores

Tabla 11. Correlaciones de las Componentes Principales (CP 1 y 2) y porcentaje de reconstrucción de cada uno de los atributos sensoriales evaluados

Atributos	CP 1	CP 2	% Reconstrucción Total
Aroma	0,92	0,36	98,0
Color Corteza	-0,95	0,17	93,0
Color Miga	-0,98	0,04	96,0
Textura Corteza	0,95	-0,30	99,0
Textura Miga	1,00	-0,04	100,0
Amargor	-0,97	-0,16	97,0
Retrogusto	-0,98	0,08	97,0

Aceptación General	0,99	0,13	100,0
--------------------	------	------	-------

CONCLUSIONES

Todas las mezclas con harina de quinua, amaranto o salvado de trigo evaluadas mostraron una disminución del volumen de pan respecto del testigo (100% harina de trigo), para ambos niveles de sustitución (10 y 20%) y, la calidad panadera de la harina base influye en ese comportamiento.

Para todas las variedades analizadas en el 2013, los mejores panes se obtuvieron con quinua (ambas sustituciones); en el año 2014, para las sustituciones al 10% fue el salvado el que mostró mejor comportamiento, mientras que en las sustituciones al 20% el salvado y la quinua produjeron las menores reducciones de volumen de pan.

Se registró una ganancia en el contenido de proteínas, grasas y cenizas y una disminución en el contenido de hidratos de carbono para los dos años de experimentación cuando 20% de harina de trigo fue sustituida por salvado o harina de quinua o amaranto. En el año 2014, se observó un cambio sustantivo a nivel nutricional asociado con el importante aporte de fibra de los panes suplementados.

Se detectó un aumento en las concentraciones de AGM y AGP, lo que resultaría altamente beneficioso para la salud debido a que algunos de ellos son esenciales para el hombre; dentro de este grupo se encuentran los ácidos grasos ω -6 y ω -3. El ω -3 aumentó en todas las mezclas, lo que también trajo una mejora en la relación ω -6/ ω -3, haciendo que se acercara a los valores recomendados por la Organización Mundial de la Salud.

La incorporación de harina de quinua en un 20% generó incrementos muy importantes para la mayoría de los aminoácidos esenciales y en particular para el caso de Lisina, Valina, Leucina, Isoleucina e Histidina.

El agregado de harina de quinua o amaranto o de salvado de trigo en los panificados de harina de trigo que se usaron como base produjo una mejora en el valor nutricional, fundamentada en el aumento de los contenidos de proteína, grasa, ceniza, fibra, ácidos grasos poliinsaturados ω -3 y todos los aminoácidos esenciales, manteniendo el valor energético del alimento.

Del análisis sensorial de las muestras surge que los panes sustituidos en un 10% con harina de amaranto resultaron ser los de mayor aceptación general por parte de los consumidores, sin presentar diferencias significativas con el testigo. Los panes elaborados con 20% de harina de quinua, en principio, no tendrían una buena aceptación, lo cual estaría asociado principalmente al amargor y retrogusto de los mismos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el aporte financiero del " PNAIyAV 1130043- PE Estrategias para la Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios". "Se agradece al Ing. Agr. Julio Rivas de INTA- Ascasubi por el aporte de semillas de quinua y amaranto; al Laboratorio de Cereales, Harinas y Productos Derivados del Centro de Agroalimentos del INTI por la determinación de fibra dietaria soluble e insoluble; a Sebastián Cunuzolo, Silvina Guidi y Adriana Pazos del Instituto de Tecnología de Alimentos- INTA Castelar por las determinaciones de composición química de las harinas y al personal de INTA- Barrow que participo del análisis sensorial de los panes".

REFERENCIAS

- Informe sectorial N° 10. Dirección de promoción de la calidad. Área cadenas agroalimentarias. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Lezcano, E. (2011). <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/HomeAlimentos/Farinaceos/farinaceos/Informes/Farinaceos_anuario_2011.pdf> Consultada Junio 2013.
- FAO (2013). Producción de Quinoa. <<http://www.fao.org/quinoa-2013/>> Consultada Junio 2013.
- Miller Jones, J.; Engleson, J. (2010). Whole grains: Benefits and challenges. Annu. Ver. Food. Sci. Technol.1: 19-40.
- Seghezzo, M.L.; Molfese, E.R. (2006). Calidad en trigo pan. Boletín Técnico N° 41. Ediciones INTA. Centro Regional Buenos Aires Sur. Chacra Experimental Integrada Barrow.
- Koziol M.J. (1990b). Afrosimetric estimation of threshold saponin concentration for bitterness in quinoa (Chenopodium quinoa Willd.). J. Agr. Food Sci. 54: 211-219.
- Repo-Carrasco, R.; Cortez, G.; Montes, R.; Quispe-Villalpando, L.; Ramos, I. (2007). Cultivos Andinos. En: León A. y C. Rosell (Eds.): De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. Argentina. pp. 245-294.
- Kolar, K. (1992). Gravimetric determination of moisture and ash in meat and meat products. J.AOAC 75. 6: 1016-1022.
- Price, C.G.; Webb, N.B.; Smith, W.J.; Marks, H.M.; Yoffe, A.M. J. (1994). Comparison of Hg and Cu based catalysts in the Kjeldahl determination of nitrogen in meat and meat products. AOAC 77. 6: 1542-1556.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, I.; Tablada, M.; Robledo, C.W. (2014). InfoStat, versión 2014, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Ortega, R.M. En Ortega R.M; F. Pérez Jiménez, L. (2008). Importancia de las grasas en la alimentación. Bultó Sagnier y E. Martín Quesada (Eds): Perjuicios y Verdades sobre las Grasas y Otros Alimentos. España, pp. 2-17.
- Abugoch, L.E. (2009). Quinoa (Chenopodium quinoa Willd): composition, chemistry, nutritional and functional properties. Adv. Food. Nutr. Res. 58:1-31.
- Koziol, M.J. (1992). Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa. J. Food Comp. Anal. 5: 35-68.

13. Repo-Carrasco, R.; Espinoza, C.; Jacobsen, E. (2003). Nutritional Value and Use of the Andean Crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food Reviews International*. 19. 1-2: 179–189.
14. Alvarez-Jubete, L.; Arendt, E.K.; Gallagher, E. (2009). Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 60: 240-257.
15. Repo-Carrasco, R. & Serna L.A. (2011). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) como una fuente de fibra dietética y otros componentes funcionales. *Ciencia é Tecnología de Alimentos* 31. 1: 225-230.
16. Vidueiros, S.M.; Bertero, H.D.; Pallaro, A.N. (2013). Estudio de las propiedades nutricionales de 21 accesiones de quinua del Noroeste Argentino. *Ciencia y tecnología de los Cultivos Industriales*. 5: 39.
17. Nascimento, A.C.; Mota, C.; Coelho, I.; Gueifão, S.; Santos, M.; Matos, A.S.; Gimenez, A.; Lobo, M.; Samman, N.; Castanheira, I. (2014). Characterisation of nutrient profile of quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus caudatus*), and purplecorn (*Zea mays* L.) consumed in the North of Argentina: Proximates, minerals and trace elements. *Food Chemistry*. 148: 420-426.
18. Cervillia, N.; Mufari, J.; Calandri, E.; Guzmán, C. (2013). Composición nutricional y estabilidad oxidativa de harinas y sopas de quinua. En: Rago, A.M. (Eds.): *Ciencia y tecnología de los Cultivos Industriales*. Ediciones INTA, pp. 61-66.
19. Miranda, M.; Veja-Galvéz, A.; Martínez, E.A.; López, J.; Marín, R.; Aranda, M.; Fuentes, F. (2013). Influence of contrasting environments on seed composition of two quinoa genotypes: nutritional and functional properties. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 73. 2: 108-116.

OBTENCIÓN DE BEBIDAS FERMENTADAS Y FORMULACIÓN DE ALIMENTOS FUNCIONALES LIBRES DE GLUTEN

C. Liberman¹, M. Fernández Preisegger^{2,3}, I. Villa Monte⁴, D. Prieto³, P. Carletti³

¹ Estación Experimental Agropecuaria INTA, Concepción del Uruguay, Entre Ríos

² CITER, CONICET-UNER, Gualeguaychú, Entre Ríos.

³ FCyT, UADER, Concepción del Uruguay, Entre Ríos.

⁴ INTI, Concepción del Uruguay, Entre Ríos.

Correo electrónico: liberman.claudia@inta.gob.ar

RESUMEN

En la preparación de bebidas fermentadas a partir de cereales, se han utilizado una gama de materias primas que dependen de la región del mundo donde se ha desarrollado la civilización: principalmente cebada malteada, maíz, sorgo, trigo y arroz. El malteado es un proceso que aumenta el costo final del cereal unas 4 veces debido a la demanda energética que requiere el proceso. Por lo tanto, las nuevas alternativas de elaboración implican la adición de enzimas desarrolladas a través de la biotecnología y proceder a la maceración a partir del grano virgen, reduciendo drásticamente la huella de CO₂ del proceso de elaboración de las bebidas fermentadas, otorgando sostenibilidad al proceso y la compañía que lo hace. La provincia de Entre Ríos, es un importante productor de arroz en el país, la disponibilidad de esta materia prima ofrece las características ideales para el procesamiento de alimentos sin TACC adecuado para celíacos.¹ El objetivo de este estudio fue aplicar la biotecnología a través de un proceso innovador para una bebida tipo cerveza sin TACC a partir de un subproducto de la molinería, el arroz partido. Las variedades Puitá INTA CL, Camba INTA CL, Guri INTA CL y Koshihikari INTA, con porcentajes de amilosa diferentes y la misma temperatura de gelatinización se probaron para contrastar. El proceso de fabricación difiere en algunos detalles en lo que respecta a una cerveza comercial. La maceración se induce mediante la adición de proteínas amilasas exógenas. El sólido es separado del líquido mediante filtraciones sucesivas. El mosto se hierve durante 90 minutos con la adición de lúpulos al inicio y final del hervor. De acuerdo con el producto de fermentación obtenido, se concluyó que las variedades largo fino cumplen con los parámetros para la producción de cerveza fermentada con un contenido final promedio de 5% de ABV. Las levaduras aromáticas dan un mejor producto final y con características organolépticas aceptadas por el panel de degustación. Conocer el proceso de fermentación biotecnológica hace que pueda ser adaptado a cualquier tipo de cereal siempre que se reproduzcan las condiciones óptimas para cada biotransformación. Hay un énfasis considerable en la recuperación, el reciclaje y la mejora de la industria de procesamiento de residuos y la producción de alimentos, haciéndolos sostenibles y ecológicos. Los residuos de levaduras pueden ser reutilizados para la formulación de alimentos funcionales. La aplicación y desarrollo de nuevas alternativas con respecto a la oferta de una bebida sin TACC tipo cerveza para las personas que necesitan o quieren, la reutilización del arroz partido en los procesos de fermentación y el desarrollo de un producto secundario saludable contribuye a la cadena de valor territorial impulsando el crecimiento de las provincias arroceras del país.

Palabras clave: salud, innovación, bio-economía, arroz, valor agregado.

ABSTRACT

In the preparation of fermented beverages from cereals they have used a range of raw materials dependent region in the world were made: mainly malted barley, corn, sorghum, wheat and rice. Malting is a process which increases the final cost of cereal about 4 times due to energy demand required by the process. Therefore the new alternatives brewing directly involve adding enzymes developed through biotechnology, and proceed to macerate from virgin grain, drastically reducing the CO₂ footprint of the brewing process. Giving sustainability to the process and the company that makes it. The province of Entre Ríos is a major producer of rice in the country, the availability of this raw material offers the ideal characteristics for food processing without TACC suitable for celiacs. The aim of this study was to apply biotechnology through an innovative process for a type drink beer without TACC from a byproduct of the rice industry, broken rice. Puitá INTA CL, Camba INTA, Guri INTA CL and Koshihikari INTA varieties, with different amylose percentage and the same gelatinization temperatures were tested for contrast. The manufacturing process differs in some details to process a commercial beer. The maceration is induced by the addition of exogenous amylases protein. The solid is separated from the liquid by filtration. The liquid (wort) is boiled for 90 minutes with addition of Cascade and Nugget hops at a rate of 1.5g / l, at the beginning and end of the boil. According to the fermentation product obtained it was concluded that the fine long variety is one that meets the parameters for the production of fermented drink rice beer with a final content average of 5% ABV. Aromatic yeasts give best final product and better organoleptic characteristics as tasting panel. Knowing the biotechnological fermentation process can adapt it to any type of cereal provided the optimal conditions for each biotransformation reproduce. There is considerable emphasis on recovery, recycling and upgrading of waste processing industry and food production, making them sustainable and environmentally friendly. Yeast

residues can be reused for the formulation of functional foods. Application and development of new alternatives with respect to the offer of a drink without TACC type beer for both people who need or want and use of broken rice in fermentation processes and the development of a snack healthy byproduct contributes to territorial contribution value chain in the rice-growing provinces.

Keywords: health, innovation, bio economy, rice, added value.

INTRODUCCIÓN

El arroz es el segundo cereal más producido en el mundo, le antecede el maíz se puede decir que el arroz es el cereal más importante en la alimentación humana, y contribuye de forma muy efectiva al aporte calórico de la dieta en la mayoría de los países. Según FAO, Organización de las Naciones Unidas de Alimentación y Agricultura, el **consumo mundial de arroz per cápita** es de 53,8 kg, sin embargo en Argentina solo se consume de 7 a 8 kg per cápita. Entre Ríos es la segunda provincia con mayor superficie sembrada de arroz en el país, con 71.400 Hectáreas en la campaña 2016-2017, luego de Corrientes.

Los principales destinos de la producción son para semilla y consumo humano. La disponibilidad de esta materia prima ofrece las características ideales para el desarrollo de nuevas alternativas de alimentos funcionales aptos para toda la población, principalmente destinadas a grupos vulnerables que presentan intolerancias o alergias alimentarias, así como adultos mayores. El agregado de valor de subproductos o residuos de las industrias agroalimentarias regionales, contribuyen al aporte territorial de las cadenas productivas en las diferentes provincias del país.

Mediante la aplicación de nuevas tecnologías y procedimientos innovadores, pueden utilizarse los subproductos de la industria arrocería como lo es el arroz quebrado, y sumarle valor agregado e introducir en el mercado alimentos como bebidas sin trigo, avena, cebada y centeno (TACC) y otros de diferentes formulaciones como por ejemplo barras de cereales y snacks saludables, suplementados con semillas, generando nuevos alimentos funcionales (9).

La celiaquía (EC) se considera una anomalía hereditaria y autoinmune, que consiste en una intolerancia al gluten, que se encuentra en los cereales trigo, avena, cebada y centeno. (TACC) La incorporación de esta proteína produce una lesión intestinal impidiendo la absorción de los nutrientes presentes en los alimentos, lo cual trae como consecuencia la presencia de signos muy variados que van desde vómitos hasta corta estatura.

Según valores mundiales, una de cada cien personas padece algún tipo de intolerancia a estos cereales. Para las personas con EC no existe medicina para su cura, los alimentos ingeridos contribuyen a “su tratamiento” durante toda la vida, para mejorar su salud, prevenir y revertir muchas de sus complicaciones. Por todo esto, *la alimentación del individuo celíaco, adquiere una importancia poco comparable a la de otras patologías.*

Aproximadamente el 70% de los productos manufacturados contienen gluten incorporado para vehiculizar aromas, colorantes, aditivos y espesantes. Alimentos y bebidas que hacen la cotidianeidad son prohibidos para personas que padecen algún grado de intolerancia a los cereales TACC (2).

Este sector de la población puede sentirse bajo una sensación de exclusión a la hora de compartir eventos sociales, además de la baja disponibilidad de variedad en alimentos sin TACC, seguros e inoocuos y con valores nutritivos no adecuados, sumado al costo elevado que llega al consumidor por ser un producto diferenciado (3, 4, 5).

El siguiente trabajo tiene como objetivo la obtención de una bebida fermentada 100% arroz libre de gluten, seleccionando la variedad de arroz apropiada según sus propiedades fisicoquímicas para la elaboración de la misma.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el esquema 1 se presenta el proceso de elaboración de la bebida fermentada.

Dos de los parámetros más importantes para evaluar la propiedad físico química del arroz son el contenido de amilosa y la temperatura de gelatinización (6) Se ensayaron las variedades, Puitá INTA CL, Cambá INTA CL, Gurí INTA CL y Koshihikari INTA (Tabla 1) para contrastar sus características fisicoquímicas (7,8) y seleccionar aquella que se adapte mejor a estos requerimientos industriales. Se utilizaron levaduras Safbrew WB06, Safale US-05 y Saflager 34/70 (Fermentis®), extractos enzimáticos comerciales nacionales e importados y lúpulos de origen nacional Cascade y Nugget. El lúpulo fue ensayado y adicionado durante el hervor en cantidades de 1g/l, 1,5g/l y 2g/l al inicio y final del hervor según amargor y aroma deseado.

Tabla 1. Características de los cultivares ensayados

CULTIVAR	TIPO	% AMILOSA	pH	TEMPERATURA DE GELATINIZACION	% PROTEINAS
Puita – INTA CL	Largo fino	29.5	6.5	63 a 68 °C	6.61
Camba – INTA CL		28.9	6.4		6.04
Guri – INTA CL		27.6	6.0		6.76
Koshihikari INTA	Corto Japonés	15.6	6.0		6.50

PROYECTO ESPECÍFICO

Estrategias para la diferenciación de alimentos y el desarrollo de nuevos productos alimentarios.

PROYECTO INTEGRADOR Optimización de calidad integral y otras estrategias de agregado de valor.



Esquema 1: Proceso de elaboración de bebida fermentada y aprovechamiento del residuo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Los análisis realizados en los cultivares se muestran en la Tabla 1.

Estos ensayos fueron realizados con el fin de contrastar los caracteres en función de aquellas que presentan las mejores características cerveceras como % amilosa, temperatura de gelatinización del grano y % proteínas. Los productos de fermentación obtenidos fueron catados por paneles no entrenados de personas con celiaquía y tolerantes al gluten.

-Discriminación: Diferenciación de productos por comparación de pares.

-Cualitativa: Análisis descriptivo del producto. Buena apariencia, Transparencia aceptable, Color blanco opaco.

-Formación de burbujas, efervescente en boca, Espuma con estabilidad media baja

-Flavor cítrico, Gusto amargo/jengibre, Aroma afrutado, Sensación en boca, refrescante, ligera.

-Pruebas afectivas: Alta aceptación.

CONCLUSIONES:

-Según el producto de fermentación obtenido, las variedades Puitá INTA CL, Cambá INTA y Gurí INTA CL, fueron aquellas que cumplen los parámetros para la elaboración de la bebida fermentada tipo cerveza de arroz con un contenido final entre 4.5 - 5% Volumen de alcohol, frente a Koshihikari 3%. Logrando mejores características organolépticas según panel de cata, con la adición de 1,5 g/l de lúpulo.

-La elaboración de bebidas de baja graduación alcohólica no descartan la utilización de la variedad Koshihikari, aunque durante el procedimiento de elaboración se encontraron problemas de aglutinación.

-La estabilidad media de la espuma está siendo mejorada evaluando a adición de proteínas de guisante y otros cereales para estas variedades, así como el ensayo con otras variedades de arroz con % de proteínas por encima de 10% y diferentes mezclas de cereales como Quínoa y Trigo sarraceno donde se observa una mejora.

-La evaluación de la composición del residuo sugiere que puede ser un potencial ingrediente en la formulación de alimentos y diferentes alternativas desde snacks saludables como barras de cereales suplementadas con otros cereales sin TACC y semillas a fin de que sean alimentos funcionales y un posible sustituto de pan rallado.

-El desarrollo biotecnológico y la aplicación de nuevas alternativas de oferta de bebidas sin TACC tipo cerveza tanto para poblaciones que lo requieran o lo deseen y el aprovechamiento del arroz quebrado en procesos de fermentación para la elaboración de alimentos saludables como subproducto contribuye al aporte territorial de cadena de valor en las provincias arroceras del país.

-Esta propuesta ofrece la oportunidad de creación de microempresas artesanales en el territorio atendiendo la salud de los individuos y contribuyendo al atractivo para el turismo loco, impulsando la bioeconomía regional.

AGRADECIMIENTOS

PNAYAV 1130043 por el soporte económico para poder llevar a cabo la línea de trabajo, y por la difusión de los resultados obtenidos. Grupo de mejoramiento Genético de Arroz, por el apoyo brindado y facilitar el material evaluado.

A la Fundación PROARROZ por la difusión de los resultados.

Universidad Autónoma de Entre Ríos, Facultad de Ciencia y Tecnología, Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina.

Universidad Nacional de Entre Ríos, Facultad de Bromatología, Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina

REFERENCIAS

1. Benavidez, R.A. (2006). El Arroz, Su cultivo y sustentabilidad en Entre Ríos. Universidad Nacional del Litoral - Universidad Nacional de Entre Ríos. Volumen 1.
2. <http://www.celiaco.org.ar/>
3. Cúneo, F., Ortega, J.G. (2012). Disponibilidad, costo y valor nutricional de los alimentos libres de gluten en comercios de la ciudad de Santa Fe. Revista FABICIB 16: 167 – 178.
4. <https://alimentoslibresdeglutenmasseguros.wordpress.com/>
5. Decara M. (2015). Canasta básica alimentaria / Canasta básica alimentaria para celíacos. Instituto de Estadísticas de la Defensoría del Pueblo. Córdoba.
6. Juliano, B.O. (1971). Cereal Science Today. Vol 16, Chapter 11.
7. Sheldrake P., MacKenna, B.M. (2003). Texture in food. Vol 1.
8. Rolando, J., González, A., Livore, B.P. (2004). Physico-Chemical and Cooking Characteristics of Some Rice Varieties.
9. Ortega Guerrero, K.; Hernández Duque, D.C., Harold Acosta, Z. (2013). Desarrollo y caracterización de un producto libre de gluten a base de harina de maíz, arroz y quinua. Universidad del Valle, Escuela de Ingeniería de Alimentos, Cali, Colombia.

OBTENCIÓN DE MICROCÁPSULAS LIPOSOMALES CON HIERRO PARA FORTIFICAR LECHE CAPRINA

J.M. Fili¹, M.I. Margalef², M. Armada²

¹ INTA EEA Salta, Cerrillos, Pcia. de Salta, Argentina,

²Universidad Nacional de Salta, Pcia de Salta, Argentina.

Correo electrónico: fili.marcela@inta.gob.ar,

RESUMEN

La anemia ferropénica es la deficiencia nutricional de mayor prevalencia en el mundo (20%). En Argentina, la incidencia y vulnerabilidad es superior en el grupo materno-infantil (38% en el NOA). La formulación de alimentos fortificados, es la estrategia más sustentable para la prevención y el tratamiento de dicha carencia. Los productos lácteos caprinos crecieron en volumen y calidad en el NOA en los últimos años, destacándose por su aporte nutricional, funcional y características hipoalergénicas. El objetivo fue desarrollar microcápsulas con hierro para fortificar leche caprina. Se formularon microcápsulas liposomales utilizando agua bi-distilada y lecitinas de uso alimentario, líquida y granulada; sulfato ferroso heptahidratado y ácido L-ascórbico, en proporción de 15/1 g en 100 ml, empleando un homogeneizador de alta velocidad. Se ensayaron dos formas (A y C) para la obtención de liposomas y luego se planteó un diseño experimental de tres factores: tipo de lecitina (líquida y granulada); tiempo de tratamiento (7, 10 y 13 minutos) y concentración de lecitina (3,5; 4,7 y 5,9 g), con un total de 18 ensayos. En cada punto del diseño se determinó el contenido de hierro por colorimetría con Tirón (1) y fósforo con la técnica de Barlett (2); estimándose eficiencia de encapsulación de hierro y relación Fe/P. Los resultados se evaluaron por análisis de varianza con interacciones dobles y triples. Los liposomas obtenidos se observaron en cámara de Neubauer adosada a un microscopio óptico y se tomaron imágenes de los liposomas obtenidos. Se estudió la estabilidad de dichas partículas a temperaturas de pasteurización, por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se seleccionó el proceso C, para la obtención de liposomas a partir de lecitina líquida, a una concentración de 3,5g, a 11000 rpm, durante 10 minutos alcanzó una eficiencia de encapsulado de hierro de 98,91% y una retención de micronutriente de 2,95g Fe/100ml lo que cubrió más del 30% de la dosis diaria recomendada para el mineral. El tamaño de los liposomas fue inferior a 250 µm, presentando estabilidad térmica superior a la temperatura de pasteurización. Las lecitinas granuladas no fueron viables para la obtención de liposomas en las condiciones de tratamiento estudiadas.

Palabras Clave: leche de cabra, fortificación, hierro, liposomas

ABSTRACT

Iron deficiency anemia is the most common type of anemia in the world (20%). Mother and child group is the most vulnerable in Argentina (38% in the North West). The fortified food formulation is the best strategy to prevent and treat such condition. Goat milk products increased and improved in the North West over the last few years being distinguishable for their nutritional, functional and hypoallergenic benefits. The aim was to develop iron microcapsules to fortify pasteurized goat milk. Liposomal microcapsules were made using bi-distilled water and liquid and granulated lecithin for human consumption; ferrous sulphate heptahydrate and 15 gr/1 gr per 100 ml of l-ascorbic acid, using a high speed homogeniser A and C processes were tested, a three-factor-experimental design: liquid and granulated lecithin in two levels; time of treatment, in three levels: 7, 10 and 13 minutes and 3,5gr; 4,7gr and 5,9gr lecithin concentration for each type of lecithin. The iron and phosphorus content was determined for each item of the design by colourimeter with tiron according to (1) and with the Barlett's technique (2) respectively. The iron encapsulation efficiency and the Fe/P relationship were estimated. The obtained liposomes were viewed with a Neubauer to an optical microscope with a camera to capture the images. Proces C was selected to obtain liposomes from liquid lecithins at concentration 3.5g, 11000rpm, during 10 min, iron encapsulation efficiency was 98.91%, and a micronutrients retention of 2.95g fe/100ml were reached and give more than 30 % of Iron recommended. Their size was smaller than 250 µm and thermally stable under temperatures over pasteurization level. Granulated lecithin was not viable to obtain liposomes under the mentioned treatment conditions.

Key words: goat Milk, fortification, iron, liposomes.

INTRODUCCIÓN

La anemia ferropénica es según la OMS la enfermedad carencial más prevalente en la población mundial (20%) y en el grupo materno infantil, la más frecuente (3-4). De la última encuesta de Salud en Argentina, en niños de 6 a 23 meses fue de 34,1% y en las provincias del NOA fue de 38% y la deficiencia de hierro en la zona para el mismo grupo etario fue de 45% (5). Dicha carencia se presenta a temprana edad y si logra sobrellevarse, además de los efectos deletéreos, en la adultez, acarrea déficit laboral y productivo importante

(4, 5). Todas las acciones que contribuyan a prevenir, atenuar y mejorar la anemia son priorizadas y estudiadas, la fortificación de alimentos con hierro es una de las estrategias más efectivas (6).

El sulfato ferroso, es la forma de mayor biodisponibilidad del nutriente y podría interactuar con la matriz alimentaria, disminuyendo sus características sensoriales o alterando el aporte nutricional del alimento vehículo (7) Dicho compuesto, es reactivo en la matriz leche, puede provocar rancidez oxidativa al interactuar con la grasa láctea. Es recomendable que se encuentre “protegido o ligado”, en medios acuosos o leche fluida, ya que puede alterar las características sensoriales (8, 9). La metodología de microencapsulación ha sido reportada en la bibliografía como una de las más viables. Algunos autores la desarrollaron para atrapar el sulfato ferroso para aislado para evitar la reactividad del mineral en de la matriz alimentaria fortificada, para que se libere en el tracto digestivo. Las microcápsulas se elaboran con diferentes materiales de pared, tales como alginatos en productos de panificados (10) y emulsiones liposomales con lecitinas en productos acuosos (11, 8, 12, 13). Las leches fortificadas con hierro disponibles en el mercado, reportan una adición de hierro equivalente de 15 mg/litro esto es del 20 al 23 % de la dosis diaria recomendada para el adulto (14 mg/día) por porción de 200ml (14-2).

Los liposomas son vesículas esféricas cerradas sobre sí, formadas a partir de una doble capa lipídica que se flexibiliza y se curva atrapando parte de solventes y soluciones libres englobándolas en su interior; pueden tener una o más membranas concéntricas, su tamaño puede variar desde dos decenas de nanómetros a decenas de micrómetros (15-2). Las estructuras liposomales logradas pueden ser grandes o pequeñas y en relación al número de lamelas o al tamaño pueden ser multilamelares (MLV's), unilamelares pequeñas o grandes (SUV's LUV's respectivamente). La utilización de homogeneizadores de alta velocidad ha permitido incorporar las sustancias de interés dentro de las partículas liposomales dispersas en emulsiones simples o dobles, en las que el tamaño de las partículas tiene estrecha relación con la velocidad de agitación (2). La homogeneidad de las emulsiones facilita maniobras posteriores de reducción o aumento del tamaño de partículas, con resultados más favorables también para alimentos (16). Una forma efectiva para lograr encapsular más material de interés, es la aplicación de procesos de congelado y descongelado, (Freeze Thawing -FT-) este proceso se utiliza en la ruptura y refusión de liposomas tipo SUV's, los solutos del interior y el exterior se reorganizan y puede encapsularse más material, hasta un 30% en el material encapsulado, a riesgo de incrementar los tamaños de las partículas (15, 2).

La leche de cabra (*Capra hircus*) ha sido usada por el hombre como alimento, desde los inicios del período sedentario hasta nuestros días (17). En Argentina la especie se encuentra presente en casi todas las provincias del territorio nacional, se concentran en tres provincias: Santiago del Estero, Neuquén y Mendoza (18). En la última década, en el NOA, se advirtió una creciente demanda de los productos de origen caprino (19) tanto productores como actores privados, interesados por la actividad, sitúan los establecimientos en tierras con aptitud agrícola. Además, incorporan diferentes tecnologías en cada etapa del sistema. Sin embargo, la producción de quesos es el destino ancestral y actual (20). La leche caprina es valorada por su aporte nutricional y funcional las leches en general y la de cabra en particular no aportan cantidades significativas de hierro a la alimentación, algunos autores documentan presencia de hierro en leches de cabra manifestando que, respecto a leche de vaca, logran una recuperación mayor de las anemias. (21, 22, 23). La densidad calórica mayor y sus polimorfismos proteicos dan cuenta de una mejor tolerancia gástrica y una mayor proporción de ácidos graso de cadena larga, vinculados con el tipo de alimentación del rodeo caprino, lo que redundará en calidad y funcionalidad de nutrientes aportados (24, 25, 26, 27).

Los objetivos del presente trabajo fue desarrollar microcápsulas con hierro, diseñar una tecnología para obtenerlas, caracterizar y evaluar los liposomas obtenidos considerados adecuados para fortificar leche caprina para cubrir al menos un 30% de la dosis diaria recomendada a fin de obtener un alimento de interés a un producto de la región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con lecitina de uso alimentario marca Melar; de dos tipos líquida y granulada provista por la firma Melar S.A. de Argentina. Para la obtención de liposomas con hierro, se probaron dos formas diferentes, identificadas como Proceso A y Proceso C, tomando como referencia el método descrito por De Paoli, et al., (28) y aplicado en lecitinas líquidas. El Proceso A, consistió en desarrollar liposomas, con lecitina y agua destilada en un agitador de alta velocidad, luego se aplicaron dos ciclos de congelado y descongelado (Freeze Thaw: FT) luego, a temperatura de 20°C, con agitación baja, se adicionó sulfato ferroso heptahidratado y ácido L ascórbico en una proporción de 15g:1g/100ml de emulsión, seguido de otros dos ciclos de FT. En el Proceso C, se formaron liposomas con lecitina de igual modo que lo mencionado en el proceso A, una vez logrados, se les adicionó sulfato ferroso y ácido ascórbico en la concentración referida, en idénticas condiciones de temperatura y velocidad planteadas para el proceso A, con una posterior aplicación de dos ciclos de FT.

Contenido de Hierro en Liposomas: En cada etapa del proceso (1° y 2° FT) se obtuvo un concentrado de liposomas utilizando una centrifuga Presvac modelo DCS 16RV, a 3200 rpm durante 20 minutos, a los que se midió el contenido de hierro por colorimetría con Tirón (1) y fósforo inorgánico por la técnica de Barlett (2). Se calculó la eficiencia de encapsulado (EE), definida como la relación de hierro retenido en liposomas sobre la cantidad de hierro adicionado para realizar la emulsión por 100, expresándose como porcentaje de hierro retenido en liposomas (9), se calculó además la relación hierro/fósforo. Los valores obtenidos se procesaron estadísticamente a través del análisis de la varianza y se aplicó prueba de Tukey utilizando un programa Infostat, Versión 2011 licencia INTA, actualizada. A fin de optimizar el contenido de hierro en los liposomas, se planteó un diseño experimental en el que se estudiaron otros parámetros de procesos con tres factores: tipo de lecitina de uso alimentario una líquida y otra granulada; concentración de lecitina y tiempo de tratamiento en tres niveles 3,5; 4,7; 5,9g de lecitina/100ml y 7; 10 y 13 minutos alto medio y bajo respectivamente a cada factor, resultando 18 ensayos para los dos tipos de lecitinas, de nueve puntos en cada una. Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente mediante análisis de varianza y observando las interacciones dobles y triples de cada factor estudiado. Los liposomas optimizados así obtenidos se añadieron luego a la leche de cabra.

Con la finalidad de determinar el tamaño aproximado de los liposomas obtenidos, se empleó una cámara de Neubauer para la observación, en un microscopio óptico Nikon Eclipse E200, se capturaron imágenes con la cámara adosada a este equipo y se procesaron con el programa Micrometrics Premium SE. La estabilidad térmica de los liposomas producidos, se evaluó por calorimetría diferencial de barrido (DSC), en un equipo DSC Q200V24 Build 116, con un intervalo de barrido de 20 °C a 130 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, bajo flujo de nitrógeno (10ml/min) a fin de referir dicho comportamiento con la temperatura de pasteurización de la leche de cabra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Liposomas: Luego de aplicar las dos formas de obtención de liposomas se tuvieron los datos que se observan en la Tabla 1; la concentración de lecitina en ambos procesos fue la misma e la cantidad de Fósforo en las distintas etapas y fracciones no se modificó. Estadísticamente no hubo diferencias significativas para la concentración de dicho mineral entre las muestras, tratamientos, ni entre la interacción muestras/ tratamiento. El contenido de hierro en liposomas obtenidos con proceso A, resultó ser mayor apenas elaborado, sin embargo, luego de dos ciclos de FT sólo retiene un 66,45% de la cantidad inicial de hierro. Estadísticamente se halló diferencia significativa entre las muestras y los tratamientos.

En el Proceso C el contenido de hierro inicial fue sólo un 0.59g/100 pero aplicados dos FT se incrementa la eficiencia en 80%, sin diferencias estadísticas entre el 1° y 2° FT; se encontraron diferencias significativas entre las muestras y procesos, también en la interacción entre ambos.

El menor contenido de hierro dentro de los liposomas en el proceso A, puede deberse a la mayor manipulación y deterioro de la partícula liposomal por los 4 ciclos de FT, aumentando la probabilidad de flocular, agregarse, flexibilizarse e inclusive, liberar parte del material encapsulado (15-29). Sin embargo, en ambos procedimientos se verifica que FT mejora el encapsulado (2). El procedimiento C se ajusta mejor a lo requerido desde el punto de la eficiencia de encapsulado y brevedad en la obtención.

Tabla 1. Contenido de hierro, fósforo, relación Fe/P y eficiencia de encapsulado (EE) en liposomas según procesos de obtención A y C

Proceso A	Hierro g/100ml		Fósforo g/100ml		Relación Fe/P		E. E.	
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
vacíos	0,00 a	0,001	0,10 a	0,001	0,05 a	0,04	0,07 a	0,02
Lip hierro*	1,26 e	0,03	0,09 a	0,001	13,73 b	0,09	39,76 e	1,00
1° FT	0,23 b	0	0,09 a	0,002	2,66 a	0,06	7,29 b	0
2° FT	0,84 d	0,04	0,05 a	0,055	8,75 ab	0,17	26,42 d	1,27
Proceso C	Hierro g/100ml		Fósforo g/100ml		Relación Fe/P		E. E.	
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
vacíos	0,00 a	0,001	0,09 a	0,004	0,045 a	0,018	0,085 a	0,17
Lip hierro*	0,59 c	0,016	0,09 a	0,021	6,26 ab	1,56	18,55 c	0,52
1° FT	2,56 f	0,002	0,09 a	0,022	27,07 b	6,07	80,82 f	0,06
2° FT	2,57 f	0,013	0,09 a	0,002	28,22 b	0,22	81,00 f	0,4

Referencias: * liposomas con hierro sin FT. Letras diferentes en la misma columna significan diferencias significativas (p< 0,05)

En relación al diseño experimental aplicado, la emulsión de liposomas fue físicamente más estable en las lecitinas líquidas que en las granuladas, ya que estas presentaron una evidente separación de fases al ser descongeladas (Figuras 1 y 2).



Figura 1. Emulsión con lecitinas líquidas



Figura 2. Emulsión con lecitinas granuladas

Los datos obtenidos se observan en la Tabla 2, el contenido de hierro en liposomas mostró diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) entre los tipos de lecitinas empleados, los elaborados con la lecitina líquida retuvieron más mineral ($2,51 \text{ g Fe}/100 \text{ ml}$) que los con granulada ($2,26 \text{ g Fe}/100 \text{ ml}$). Entre los tiempos de tratamiento se encontraron diferencias altamente significativas, un tratamiento de 10 minutos fue el de mayor contenido de hierro ($2,55 \text{ g Fe}/100 \text{ ml}$) y no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las tres concentraciones de lecitina.

En el análisis de las interacciones, se observó que para el contenido de hierro según la concentración de lecitina/tiempo (Figura 3) y tipo de lecitina/tiempo (Figura 4) hubo diferencias estadísticas ($p < 0,0001$); los mayores valores, se observaron en los liposomas elaborados con 10 minutos de tratamiento y $3,5 \text{ g}$ de lecitina; como así también, en los producidos con lecitinas líquidas y tratados a igual tiempo.

Tabla 2. Contenido promedio de hierro y fósforo ($\text{g}/100 \text{ ml}$); eficiencia de encapsulado y relación hierro/ fósforo según tipo de lecitina.

Ensayo	Fe $\text{g}/100 \text{ ml} \pm \text{D.E}$		P $\text{g}/100 \text{ ml} \pm \text{D.E}$		E.E. (%)		Rel Fe/P	
	Líquida	Gran.	Líquida	Gran.	Líquida	Gran.	Líquida	Gran.
1	$1,80 \pm 0,01$	$2,41 \pm 0,02$	$0,34 + 0,66$	$0,13 + 0,01$	60,24	82,14	5,31	18,00
2	$2,67 \pm 0,05$	$2,05 \pm 0,08$	$0,35 + 0,12$	$0,31 + 0,02$	89,45	69,64	7,65	6,64
3	$2,02 \pm 0,02$	$2,47 \pm 0,11$	$0,17 + 0,01$	$0,44 + 0,00$	67,87	84,05	12,09	5,57
4	$2,95 \pm 0,08$	$2,51 \pm 0,00$	$0,36 + 0,09$	$0,31 + 0,01$	98,91	85,37	8,39	8,12
5	$2,56 \pm 0,10$	$1,96 \pm 0,13$	$0,40 + 0,16$	$0,38 + 0,18$	86,04	66,63	7,37	7,07
6	$2,90 \pm 0,07$	$2,42 \pm 0,02$	$0,64 + 0,01$	$0,36 + 0,04$	97,24	82,42	4,50	6,72
7	$2,34 \pm 0,02$	$2,37 \pm 0,10$	$0,28 + 0,02$	$0,27 + 0,03$	78,50	80,47	8,38	8,94
8	$2,92 \pm 0,04$	$2,46 \pm 0,09$	$0,41 + 0,04$	$0,30 + 0,03$	97,96	83,59	7,06	8,33
9	$2,28 \pm 0,08$	$2,33 \pm 0,03$	$0,25 + 0,12$	$0,31 + 0,07$	76,63	79,29	10,16	7,67

Referencias: \pm Desvío estándar (D.E.)

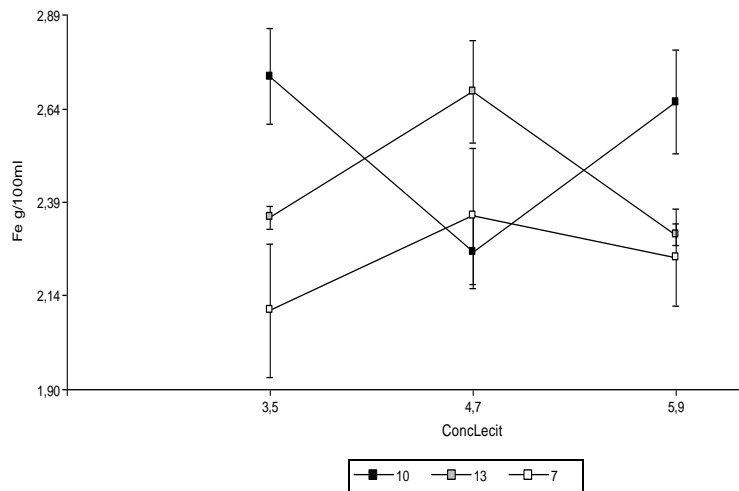


Figura 3. Interacción concentración de lecitina y tiempo para elaboración de liposomas en relación a su contenido de hierro

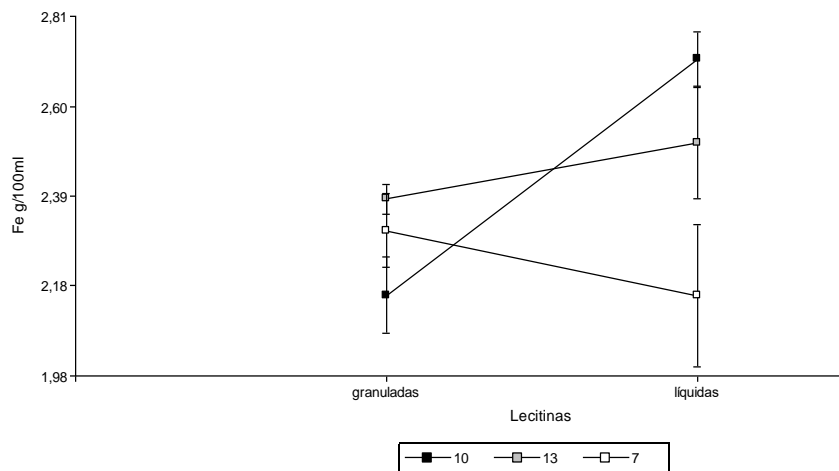


Figura 4. Interacción tiempo y tipo de lecitina empleada para la elaboración de liposomas en relación a su contenido de hierro

En la Figura 5 se muestran los resultados de las interacciones tiempo/lecitina/concentración, se encontraron diferencias altamente significativas entre las mismas. Cabe señalar que se registró el mayor contenido de hierro de 2,95 g/100 ml en liposomas producidos con lecitina líquida a una concentración de 3,5g con tratamiento de 10 minutos.

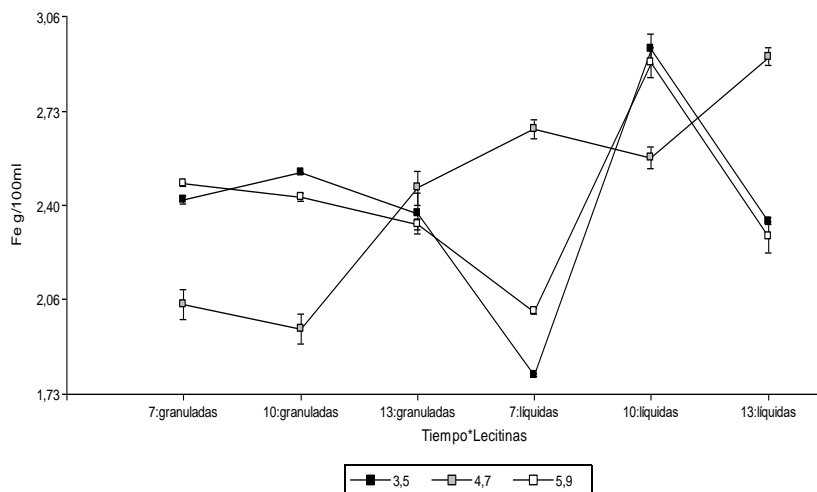


Figura 5. Interacción concentración de lecitina, tiempo y tipo de lecitina empleada para la elaboración de liposomas en relación a su contenido de hierro

Con respecto al contenido de fósforo en liposomas, solo se encontraron diferencias significativas ($p=0,041$) entre los tiempos de tratamiento; con 10 minutos, se obtuvo el mayor contenido del mineral 0,403 g de P/100ml. Con el análisis de la varianza para la eficiencia de encapsulado, se hallaron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) entre los tipos de lecitinas y los tiempos de tratamiento. La lecitina líquida fue más eficiente, alcanzando un valor promedio de 83,65% en relación a 79,3% en la granulada; con un tiempo de tratamiento de 10 minutos (Figuras 6 y 7). En cuanto a la concentración de lecitina no se encontraron diferencias estadísticas.

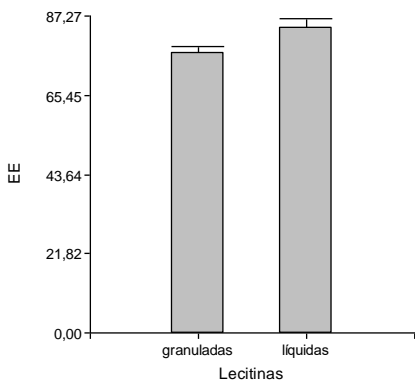


Figura 6. Valores medios y desvíos estándar de eficiencia de encapsulado (EE) según tipo de lecitina

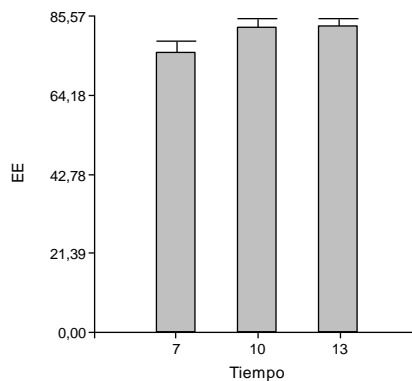


Figura 7. Valores medios y desvíos estándar de eficiencia encapsulado (EE) según tiempo de proceso

Con la interacción lecitina/tiempo la EE resultó altamente significativa ($p<0,0001$). El mayor valor 90,85% se registró para la lecitina líquida, con un tiempo de agitación de 10 minutos. La interacción lecitina/concentración/tiempo mostró que los liposomas producidos con 3,5 g lecitinas líquida, con un tratamiento de 10 minutos, presentó una eficiencia de encapsulado de 98,91%

Respecto a la variable relación hierro/fósforo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de lecitinas/concentración, ni entre los tiempos de tratamiento empleados. De las interacciones dobles analizadas, la única que resultó significativa ($p=0,0263$) fue la de tipo de lecitina/concentración; para de 4,7g la relación hierro/fósforo registró valores semejantes en ambos tipos de lecitina. La triple interacción planteada para el análisis de la relación hierro/fósforo resultó altamente significativa, observándose que en la lecitina granulada, tratada con el menor tiempo de los tiempos ensayados (7 min.) y con una concentración de 3,5g mostró la mejor relación hierro/fósforo la que resultó igual a 18. Sin embargo, debido a la inestabilidad física demostrada por este tipo de lecitina, no se consideró viable para la obtención de los liposomas.

Tamaño de los liposomas: La observación microscópica de los liposomas en cámara de Neubauer permitió aproximar el tamaño de las partículas, si bien se observa una gran diversidad de tamaños se pudo determinar que la población en su mayor proporción fueron menores a 250 μm . los fotografiados (Figura 8) corresponden a los de mayor eficiencia de encapsulado que cumplieron el propósito de fortificar con el 30% de la dosis diaria recomendada.

Estabilidad térmica: En el termograma de las Figura 9 correspondientes a los liposomas obtenidos en el ensayo 4; que retuvo mayor contenido de hierro, se puede establecer que no se produce transición de fase en los liposomas, aún a temperaturas superiores a la de pasteurización, lo que aseguró la estabilidad térmica de los mismos al ser adicionados a la leche de cabra a temperatura de pasteurización.

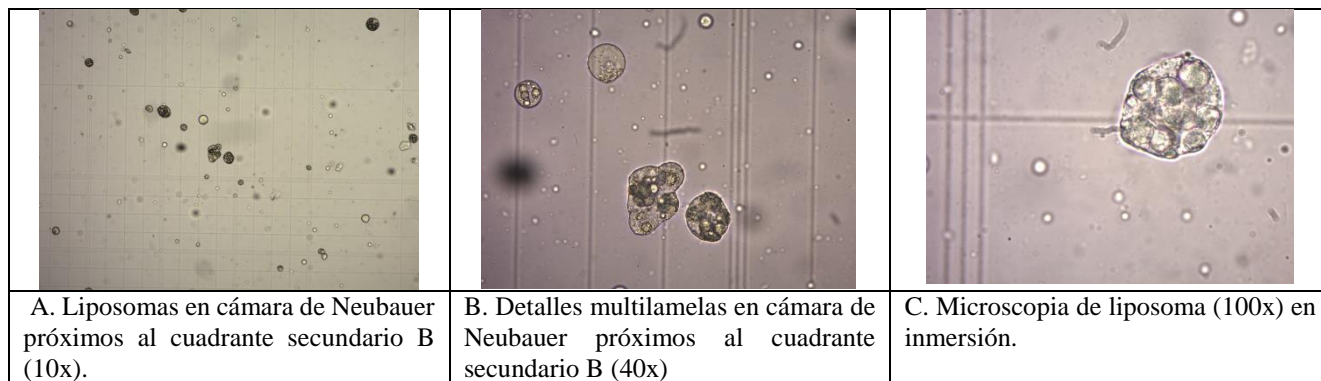


Figura 8. Liposomas en cámara de Neubauer con distintos aumentos (10x; 40x; 100x)

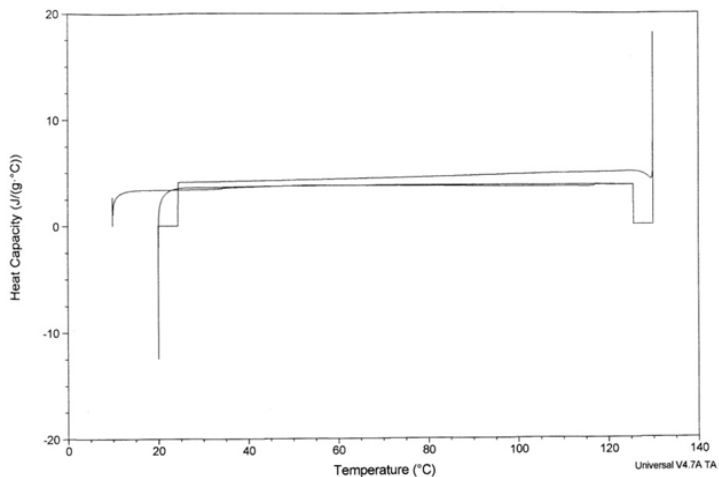


Figura 9. Termograma de Liposomas con hierro

CONCLUSIONES

- Fue posible elaborar liposomas a partir de lecitinas de uso alimentario adicionados con hierro utilizando un homogeneizador de alta velocidad, mediante un proceso de obtención definido como “C”.
- La aplicación de congelado y descongelado, al menos 2 ciclos, favorecen el encapsulado de hierro.
- Para la mayoría de las variables estudiadas se estableció que los liposomas más eficientes y con mayor cantidad de hierro, fueron los elaborados con lecitina líquida a una concentración de 3,5 g/100ml y tratados durante 10 minutos los que retuvieron 2,95 g de Fe/100ml y una eficiencia de encapsulado de 98,91%.
- Los resultados obtenidos en las variables de proceso realizadas con lecitina granulada, además, de su comprobada inestabilidad física, no cumplieron con características apropiadas para la obtención de liposomas viables para fortificar leche caprina.

- Los tamaños de los liposomas obtenidos en el ensayo escogido, se mantuvieron dentro del rango micrométrico planteado, la mayoría fueron menores a 250 μm .
- Los liposomas obtenidos fueron estables a las temperaturas fijadas para la pasteurización en leche de cabra.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible al aporte presupuestario del INTA, mediante sus proyectos PNAyAV 11300043, AETA 282811.

REFERENCIAS

1. De Cuyper y Joniau (1992) y Yoe Jones 1944. Originales no consultados compendiados en Martins, F: Preparação e caracterização de magentoliposomas para aplicações em procesos de adsorção por afinidade. Tesse Maestando FEQ UNICAMP Campinas, Outubro 1998.
2. Barlett, G.R.J. (1959). J.Biol.Chem. 234-466, original no consultado compendiado en: New (1990) Liposomes a practical approach IRL Press at Oxford University Press.
3. FAO/OMS (1998). Expert Consultation on Human Vitamin and Mineral requirements (Bankok Tailandia) September ISBN 924154612 3 WHO Library Consultation Data. Chapter 13 IRON pp247-272 PDF Disponible en: www.fao.org/docrep/014s/am401s/am401s03.pdf
4. Duran, P.; Mangialavori, G.; Biglieri, A.; Kogan, L.; Abeya Gilardon, E. (2009). Estudio descriptivo de la situación nutricional en niños de 6-72 meses en la República Argentina. Resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS). Archivos Argentinos de Pediatría. 107(5), 397-404.
5. Drake, I.; Bernztein, R. (2009). Costo beneficio de un programa preventivo y terapéutico para reducir la deficiencia de hierro en Argentina. Revista Panamericana de Salud Pública 25 (1), 39-46.
6. Boccio, J.; Monteiro, J.B. (2004). Fortificación De Alimentos Con Hierro Y Zinc: pros y contras desde el punto de vista alimenticio y nutricional. REVISÃO. Revista Nutrición de Campinas. 17(1), 71-78. Print versión. ISSN 1415-5273. Recuperado de: WWW.scielo.br/pdf/rn/vh/n1/a08v17n1.pdf
7. Lysionek, A.E.; Zubilaga, M.; Salgueiro, M.; Piñeiro, A.; Caro, R.; Boccio, J. (2002). Bioavailability of microencapsulated Ferrous Sulfate in Powdered milk produced from fortified fluid milk: A prophylactic study in Rats. Nutrition. 18(3), 279-281.
8. Boccio, J. (2003). Fortificación de alimentos como estrategia para prevenir la deficiencia de Hierro y Zinc. Ventajas y desventajas desde un punto de vista nutricional y tecnológico. Laboratorio de Isótopos Estables Aplicados a Biología y Medicina. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Argentina. Recuperado de: <http://www.nutrition-plus-usa.com/html/absorcion/main.html>
9. Xia, S.; Xu, S. (2005). Ferrus sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. Food Research International 38, 289-296. Recuperado en: www.elsevier.com/located/foodres.
10. Negreira Navarro Barbosa, T.; De Aguilar Carrazedo Taddei, J.A.; Ancona-López, F. (2012). Double-blind randomized controlled trial of rolls fortified with microencapsulated iron. Rev. Assoc. Med. Bras. 58(1), 119-124. Recuperado en: www.elsevier.com.
11. De Paoli., T. Hager, A.; Ferroni, J. Lipotech S.A. (1996). Liposomes containing bioavailable iron (II) and process for obtaining them. July 9 1996. US Patent 5534268.
12. Zubillaga, M.B.; Caro, R.A.; Boccio, J.R.; Gotelli, C.A. (1996). New procedure to fortify fluid milk with iron: Metabolic and biochemical study in rats. Nutrition Research. 16(1), 131-137 recuperado de: <http://www.sciencedirect>.
13. Hermida, L. (2006). Preparación y caracterización de formulaciones liposomales para administración por vía oral. Tesis Doctoral. Buenos Aires Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.
14. ANMAT-Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología CAA - Código Alimentario Argentino Capitulo VIII Productos Lácteos. Disponible en: www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp
15. Lasic, D.D. (1993). Liposomes: from physics to Applications. Pp 574 Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. Nethewrlands.
16. Trevisan, J.E.; Cavalcanti, L.P.; Oliveira, L.P.; De la Torre, L., Santana, M.H. (2011). Technological aspects of scalable Processes for the production of functional liposomes for gene therapy, non viral gene therapy Prof. Xubo Yuan (Ed.) ISBN: 978-953-307-538-9 In Tech. Available from: [Http://www.intehopen.com/books/non_viral_gene_therapy/techonological-aspects-of-sclalable-precesses-for-the-production-of-functional-for-gene-ther](http://www.intehopen.com/books/non_viral_gene_therapy/techonological-aspects-of-sclalable-precesses-for-the-production-of-functional-for-gene-ther)
17. Haenlein, G.F.W. (2004). Goat milk in human nutrition. Small Ruminant Research. 51, 155-163. www.elsevier/locate/smallrumres.
18. Gutman, G.; Iturregui, M.E.; Filadoro, A. (2004). Informe CEPAL: Propuestas para la formulación de políticas para el desarrollo de tramas productivas regionales: El caso de la lechería caprina en Argentina. (p. 94).
19. Programa Caprino Provincial Saltaño. 2007. Recuperado en: http://www.minagri.gob.ar/site/ganaderia/caprin05informacion_caprina/archivos/000004Situaci%C3%B3n%20Caprina/000100_Salta.pdf?PHPSESSID=0aefe7a11f4a5275a6c75e0d360354d7 . [Consulta 17 de Julio de 2014].

20. Martínez, M.; Candotti, J.J. (2012). Leche materna vs sustituto lácteo en la crianza de cabritos. En: Programa de Ámbito Nacional Leche. Producción técnica-científica de Proyecto Cartera 2006-2009 / 2010-2012. (Eds, Taverna M., Comeron, E.A., Suarez, V.H.) Producciones INTA, Argentina ISBN 878987679180 9. Pag: 742.
21. Haenlein, G.F.W. (2007). About the evolution of goat and sheep milk production. *Small Ruminant Research*. 68, 3-6. www.elsevier/locate/smallrumres.
22. Park, Y.W.; Juárez, M.; Ramos, M.; Haenlein, G.F.W. (2007). Physical-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 68, 88-113.
23. Alférez, M.J.M.; López-Aliaga, I.; Nestares, T.; Diaz Castro, J.; Barrionuevo, M.; Ros, P.; Campos, M. (2006). Dietary goat milk improved iron bioavailability in rats with induced ferropenic anemia in comparison with cow milk. *International Dairy Journal* 16, 813-821. Recuperado de www.elsevier.com/locate/idaairyj
24. Martínez, M. (2012). Intensificación de los Sistemas Caprinos: Crianza Artificial de cabritos InforTambo. 273, 96-99.
25. Martínez, G.M. (2013). Ensayo exploratorio: obtención de leche caprina funcional a partir de la suplementación con Salvia hispánica (Chia). RIA Argentina/Trabajos en prensa Publicado online 11 de diciembre 2013.
26. Salva, S.; Villena, J.; Alvarez, S.; Font, G.; Nuñez, M. (2013). Leche de cabra y sus potencialidades como alimento funcional. En I° Congreso Argentino de Producción Caprina. Memorias. (pp.60-67).
27. Chávez, M., Fili, M. (2009). Leche de cabra: aporte nutricional y beneficios para la salud. *Panorama Agropecuario de Salta y Jujuy*. 52, 42-44.
28. McClements, D.J. (2005). *Food emulsions: principles practices and techniques* 2nd ed. Boca Ratón, CRC Press.

OBTENCIÓN DE SNACKS DULCES Y SALADOS A PARTIR DEL SABORIZADO DE ALMENDRAS Y PISTACHOS.

M.F. Mujica¹, A. Hierrezuelo, S. Montilla.

¹INTA E.E.A. San Juan. Calle 11 y Vidart. Pocito. San Juan. Argentina

Correo Electrónico: mujica.maria@inta.gob.ar

RESUMEN

Se propuso investigar la posibilidad de desarrollar nuevos productos, almendras y pistachos saborizados con incrustaciones de especias y aromáticas deshidratadas. Los ensayos fueron programados en dos etapas. Una a escala artesanal en laboratorio y otra a escala industrial. Los materiales de frutos secos elegidos fueron almendra variedad Guara y Non Pareil, y pistacho variedad Kerman. Se plantearon distintos tratamientos utilizando diferentes fases líquidas proteicas, azucaradas y aceitosas como soporte para la incorporación de las sustancias aromáticas sobre la superficie de los frutos. Se usaron diferentes especias en polvo y aromáticas deshidratadas y molidas buscando diferentes opciones de sabor. A escala artesanal, los mejores tratamientos fueron aquellos en los que se utilizó jarabe de sacarosa y aceite de canola para mojar los frutos, debido a que presentaron mejor apariencia visual, ausencia de aromas rancios y menor capacidad de desgrane de las capas externas formadas durante el saborizado. El trabajo realizado a escala industrial en pailas grageadoras, todos los tratamientos obtuvieron productos de buena calidad organoléptica y apariencia visual, destacándose aquellos en los que se utilizó aceite de canola que confirió a los productos terminados mayor brillo y untuosidad, mostrando buena estabilidad para la manipulación durante el almacenamiento.

Palabras clave: almendra, pistacho, saborizado, snacks

ABSTRACT

It was proposed to investigate the possibility of developing new products, almonds and flavored pistachios with spices and dehydrated aromatic herbs. The trials were scheduled in two stages. One, on an artisan scale in laboratory and another, on an industrial scale. The selected nut materials were almond variety Guara and Non Pareil, and pistachio variety Kerman. Different treatments were proposed using different protein, sugary and oily liquid phases as a support for the incorporation of the aromatic substances on the surface of the fruits. Different dehydrated and ground aromatic herbs and powdery spices were used looking for different flavor options. At the artisanal scale, the best treatments were those in which sucrose syrup and canola oil were used to get wet the fruits, because they presented better visual appearance, absence of rancid aromas and less shelling capacity of the external layers formed during the flavoring. The work carried out on an industrial scale in confi bowl, all treatments obtained products of good organoleptic quality and visual appearance, standing out those in which canola oil was used because finished products showed greater brightness and flavor, gaining good stability of coatings for handling during storage.

Keywords: almonds, pistachio, flavoring, snacks

INTRODUCCIÓN

En el mercado Argentino, actualmente se encuentran frutos secos procesados en forma de peladillas dulces o bañados en chocolate blanco o negro pero no se elaboran en el mercado frutos secos saborizados dulces y salados y se planteó desde esta línea de investigación la posibilidad de desarrollar un nuevo producto, almendras y pistachos saborizados con incrustaciones de especias y aromáticas deshidratadas, que puedan enriquecerlos ofreciendo una nueva alternativa de snack para los consumidores.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la primera etapa del trabajo, se evaluaron diferentes combinaciones de ingredientes procesados en forma artesanal, utilizando un horno convencional.

Se utilizó almendras de variedad Guara y pistacho variedad Kerman cultivados en San Juan.

La fruta, solo fue lavada con agua fría, sin remover la piel, y secada a temperatura ambiente, conservando la rugosidad superficial original

Toda la fruta, fue secada primero a temperatura ambiente y posteriormente tostada en horno a 65°C durante 30 minutos.

En forma separada, almendras y pistachos, sufrieron un tostado, y posteriormente fueron fraccionados en 24 lotes de 2 kilogramo cada uno, que fueron sometidos a los siguientes tratamientos (T):

- T1- Inmersión en clara de huevo batida a nivel medio, escurrido y rebozado en mezcla seca de 25 g canela en polvo, 25 g nuez moscada en polvo, 200 g azúcar molida fina blanca.
- T2- Inmersión en clara de huevo batida a nivel medio, escurrido y rebozado en mezcla seca de 150 g cacao amargo en polvo, 200 g azúcar molida fina blanca.
- T3- Inmersión en clara de huevo batida a nivel medio, escurrido y rebozado en mezcla seca de 150 g café instantáneo molido fino, 200 g azúcar molida fina blanca.
- T4- Inmersión en jarabe de sacarosa de 57 ° Brix (Bx) escurrido y rebozado en mezcla seca de 25 g canela en polvo, 25 g nuez moscada en polvo, 200 g azúcar molida fina blanca
- T5- Inmersión en jarabe de sacarosa de 57 ° (Bx), escurrido y rebozado en mezcla seca de 150 g cacao amargo en polvo y 200 g azúcar molida fina blanca.
- T6- Inmersión en jarabe de sacarosa de 57 ° (Bx), escurrido y rebozado en mezcla seca de 150 g café instantáneo molido fino, 200 g azúcar molida fina blanca.
- T7- Inmersión en aceite de canola a temperatura ambiente, y rebozado en un preparado de 30 g sal fina y 100 gr mezcla comercial pre-elaborada para saborizar pizza.
- T8- Inmersión en aceite de canola a temperatura ambiente, y rebozado en un preparado de 30 g sal fina y 100 g mezcla comercial pre-elaborada para saborizar pesto
- T9- Inmersión en aceite de canola a temperatura ambiente y rebozado en un preparado de 30 g sal fina y 100 g mezcla pre-elaborada para saborizar provenzal
- T10- Inmersión en aceite de oliva a temperatura ambiente, y rebozado en un preparado de 30 g sal fina y 100 gr mezcla comercial pre-elaborada para saborizar pizza.
- T11- Inmersión en aceite de oliva a temperatura ambiente y rebozado en un preparado de 30 g sal fina y 100 g mezcla comercial pre-elaborada para saborizar pesto
- T12- Inmersión en aceite de oliva a temperatura ambiente y rebozado en un preparado de 30 g sal fina y 100 g mezcla pre-elaborada para saborizar provenzal

Las muestras correspondientes a cada tratamiento, fueron posteriormente secadas en horno a temperatura de 60 °C durante 30 minutos y luego enfriadas a temperatura ambiente.

Terminado el proceso, fueron almacenadas en recipientes abiertos durante 24 horas que, luego de cerrados herméticamente, fueron conservados a temperatura ambiente.

RESULTADOS

En los tratamientos en que se utilizó clara de huevo como agente de adhesión para los sabores a incorporar, el aspecto externo obtenido tenía características de costra firme, aireada, en la cual no se diferenciaban o sobresalían las partículas de especias, cacao y café finamente molidos. La costra formó una capa consistente y homogénea pero rugosa, que resiste el roce de los frutos sin quebrarse o separarse aún después de 6 meses de almacenamiento.

La fruta tratada con jarabe de sacarosa de 57 °Brix obtuvo una apariencia externa más azucarada, de cristales finos que se distinguían incluso en boca, mostrando buena adhesión inicial de las partículas de las sustancias utilizadas para incorporar el sabor, pudiendo observarse las tonalidades originales de cada ingrediente en el acabado de la cobertura final. Estas muestras, mostraron tendencia a la separación de partículas, cristales de sacarosa, por roce durante el periodo de 6 meses de almacenamiento.

Para los tratamientos en que se utilizó el aceite de canola como agente para la adhesión en la superficie de los ingredientes elegidos, la apariencia fue más brillante, aunque no aceitosa al tacto, y las partículas de aromáticas y especias molidas finas, podían diferenciarse de la superficie de la almendra y del pistacho, manteniendo sus colores originales en forma independiente unas de otras. No se observó la aparición de sabores ni olores rancios debidos al aceite de canola, por lo que el producto se mantuvo estable durante los 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente.

Finalmente, aquellas muestras en las que se utilizó aceite de oliva, sí se observó al tacto una sensación aceitosa y el olor característico a aceituna fue desvaneciéndose durante el almacenamiento mostrando incluso la aparición de un leve aroma a rancio al finalizar los 6 meses de guarda.

SABORIZADO EN PAILA ROTATIVA O BOMBO GRAGEADOR

INTRODUCCIÓN

Con el objeto de llevar a escala industrial la producción de snacks de frutos secos se utilizó una técnica similar a la del grageado, en la cual la gragea se fabrica con centros hechos en una paila bombo en rotación (Fig. 1 y 2), en la que se forma una envoltura constituida por diferentes capas de azúcar recristalizado con una humedad residual que puede variar del 1 al 3%



Figura 1. Bombo con conductos para soplado con aire

Figura 2. Paila bombo rotativa

Los centros se clasifican en naturales y fabricados, según el origen de los mismos que en este caso, son naturales, por tratarse de frutas, pepitas de almendra y pistacho.

En la técnica del grageado, la solución del grageado es clave para que cada capa de envoltura siga el contorno de los centros, en este caso centros naturales constituidos por las pepitas de almendra y de pistacho. El mojado, es la etapa en que se añade en el bombo el jarabe de engrosado, que formará una capa alrededor de los centros. Se utiliza generalmente para el grageado un jarabe de azúcar de 65 a 80 % de Sólidos Solubles.

La segunda etapa es la de engrosado, que consiste en la formación sucesiva de capas por adición sucesiva de jarabe. Las grageas duras son productos de confitería compuestos de un centro recubierto de varias capas.

Es importante el calibrado correcto y homogéneo de los frutos para que en el proceso, las grageas queden del mismo tamaño.

La formación de cada capa, necesita de tres etapas:

- 1) La adición de jarabe de engrosado
- 2) La distribución homogénea de jarabe en la superficie de los centros (pepitas)
- 3) El secado, que se produce por la inyección de aire seco cuya temperatura puede oscilar entre 40 – 60 °C

La velocidad de rotación del bombo se regula en función del tamaño y peso de la fruta de manera de garantizar que todos los centros estén en movimiento permanente rotativo sin resbalar por las paredes, sino rozando en forma continua unos sobre otros mientras giran sobre sus ejes.

MATERIALES Y MÉTODOS

En estos ensayos se trabajó con almendra variedad Non Pareil, tamaño grande y uniforme, de piel clara y de baja rugosidad, cuya pepita de forma plana es de apariencia atractiva.

El tostado de la fruta con piel, sin repelado, para asegurar la adhesión o incrustación de las sustancias saborizantes, se realizó en horno panadero, de bandejas rotatorias y con corriente de aire caliente a 65.5°C, lo que permitió dar a toda la partida de fruta un nivel de humedad y color finales homogéneos.

Para este ensayo, se preparó un jarabe de sacarosa de 57° Bx al que posteriormente se le incorporó goma arábiga en una proporción del 25% (Fig. 3).



Figura 3. Jarabe concentrado de sacarosa y goma arábica.

La fruta desecada y tostada, fue incorporada dentro de la paila rotatoria tipo bombo grageador. Se procedió a mojarla con el jarabe, dejándola rotar en el interior primero durante 5 minutos para garantizar que toda la fruta había sido mojada por el jarabe homogéneamente, cumpliendo esta fase líquida con la función de goma, sobre la cual se adhieren las partículas de especias y/ o de las aromáticas molidas, además de endulzar.

Posteriormente se fueron incorporando las especias y aromáticas, lentamente, de a poco, dejando la fruta rotar en el bombo para garantizar la cobertura de toda la superficie del fruto con las partículas que se deseaba incorporar.

Durante 30 minutos, para cada muestra, se realizaron agregados intercalados de jarabe con goma, aceite de canola, especias y aromáticas secas (Fig. 4) según lo estipulado para cada tratamiento.

Durante el proceso, al girar, se fueron formando capas de goma y aromas sobre cada pepita de fruto, a medida que van secándose unas sobre otras. El giro de la paila, sumado al soplado de aire seco y fresco por la boca, facilita el secado rápido de la mezcla almíbar y goma sobre la superficie de la fruta, entre giro y giro, lo que permite obtener al final del proceso una textura granulosa y seca en cada fruta, con las especias y aromáticas bien adheridas y distribuidas. En el interior de la paila los frutos fueron sometidos a un movimiento rotativo, por lo que las superficies resultaron bien cargadas, sin excesos, debido a la fricción entre los frutos.



Figura 4. Fruta girando sobre su propio eje en el interior del bombo

El punto final fue determinado para cada muestra en función de la sensación al tacto (seco), la apariencia visual (cobertura homogénea) y sabor (agradable, en el que se pudieron reconocer los aromas)

Los tratamientos evaluados en paila tipo bombo rotatorio para grageado, fueron los siguientes:

T1: 5 kg de almendra + 125 g café instantáneo sabor mokaccino + 120 g café instantáneo sabor capuccino + 130 g cacao amargo + 25 g canela molida. Jarabe 500 ml

T2: 1 kg de almendra + 25 g canela molida + 50 g nuez moscada molida. Jarabe 250 ml

T3: 1 kg de almendra + 75 g premezcla condimento deshidratado sabor pizza + 50 ml de aceite de canola. Jarabe 250 ml.

T3: 1 kg de almendra + 75 g premezcla condimento deshidratado sabor pizza + 10 g de ajo en polvo + 50 ml de aceite de canola. Jarabe 250ml.

T4: 1 kg de almendra + 100 g premezcla condimento deshidratado sabor provenzal + 20 g de ajo en polvo + 50 ml de aceite de canola. Jarabe 250 ml.

T5: 1 kg de almendra + 50 g albahaca molida deshidratada + 50 ml de aceite de canola. Jarabe 200 ml.

Las muestras fueron almacenadas en bolsas semiabiertas (Fig. 5) durante 5 días al cabo de los cuales, la superficie estaba totalmente seca y los aromas habían sido ya incorporados a la fruta en un todo.



Figura 5. Producto terminado húmedo

Después de ese período, se degustaron comprobando que la textura era seca pero se habían estabilizado los aromas, pudiendo distinguirse perfectamente cada sabor en cada muestra, detectando todas las especias y aromáticas intervinientes.

El procesado en paila rotatoria dio recubrimientos mejor adheridos a la pared de las pepitas, lo que le confirió mayor estabilidad en el almacenamiento (Fig. 6 a 9).



Figura 6. Sabor canela y nuez moscada



Figura 6. Sabor cacao, café mokaccino y capuccino

**Figura 7.** Sabor pizza**Figura 8.** Sabor pesto

CONCLUSIONES

La obtención de snacks a partir de pistachos con este tipo de metodología es totalmente posible. En este trabajo se lograron los resultados esperados, abriéndose un sinfín de posibilidades para la agroindustria local, ya que el proceso es simple, de bajo costo, de baja inversión en equipamiento, y la posibilidad de ofrecer variedad de aromas es tan amplia como la creatividad de quien desarrolle cada fórmula. También existe una amplia gama de aditivos alimentarios que podrían realzar los aromas y prolongar el almacenamiento de estos productos y que todavía deben ser testeados. Se debe tener en cuenta que incluso los sabores cambian en función de la variedad de fruta elegida. Este trabajo, se transforma en el punto de inicio para el desarrollo de productos de alto valor agregado con un gran potencial para el mercado local e internacional.

AGRADECIMIENTOS

Para la segunda etapa, de producción a escala industrial, se agradece especialmente al Sr. Sergio Montilla, por haber abierto a INTA las puertas de su empresa y facilitar el uso de su equipamiento industrial e infraestructura, acompañándonos en el proceso de elaboración y aportando parte de los insumos requeridos.

REFERENCIAS

1. Jackson, E.B. (1995) Sugar Confectioner y Manufacture
2. Jackson, E.B. (1995) Sugar Confectionery Manufacture. Springer
3. Madrid, A. (1994). Manual de técnicas de pastelería y confitería. Ediciones Almansa
4. Meiners, A.; Kreiten, K., Joike Sielesia, H. (1983). El Nuevo Manual para la Industria de Confitería. Sielesia-Essenzenfabrik Gerhard Hanke KG. Noef FRG. Alemania
5. Gianola, C. (1980) La industria de la fruta seca, en almíbar y confitada, Parainfo, 2da ed. Pp. 13- 17, 47-73, 100-106, España.
6. Gianola, C. (1980) La industrialización del chocolate, bombones, caramelos y confitería, Parainfo, 2da ed. Pp. 16-26, España.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LECHUGA

R.E. González^{1,2} y M. Lanza Volpe¹

¹EEA La Consulta, INTA. Ex Ruta 40 s/n km 96 (5567), La Consulta, San Carlos, Mendoza.

²Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNCuyo. Padre Jorge Contreras 1300. Parque General San Martín (M5502JMA), Mendoza.

Correo electrónico: gonzalez.roxana@inta.gob.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue la optimización del método de extracción de compuestos fenólicos presentes en lechuga (*Lactuca sativa* L.) mediante la metodología de superficie de respuesta. Para ello, se utilizó un diseño D-Optimal a partir del cual fueron evaluadas diferentes combinaciones de proporción de metanol como solvente de extracción (metanol al 30, 50 y 70% con agua acidificada, v/v), temperatura (25, 45 y 60 °C) y tiempo (1 y 2 horas) sobre el contenido de compuestos fenólicos totales. El análisis de ANOVA, evidenció que el modelo fue consistente para los datos experimentales ($R^2=0,67$, $p<0,0001$) con falta de ajuste no significativa (p lack of fit > 0.05). Los valores predichos de la variable respuesta calculados a partir del modelo presentaron un alto coeficiente de correlación con los resultados experimentales. Las condiciones óptimas de extracción para los compuestos fenólicos fueron una temperatura de 25 °C durante un intervalo de tiempo de 2 h independientemente de la concentración de metanol.

Palabras clave: optimización, método de extracción, compuestos fenólicos, *Lactuca sativa* L.

ABSTRACT

The main objective of the present work was to optimize the extraction conditions for total phenolics content present in lettuce (*Lactuca sativa* L.), using response surface methodology. For this, a design of D-Optimal with different combinations of proportion of methanol as solvents (methanol at 30, 50 y 70 % with acid water, v/v), temperature (25, 45 and 60 °C) and extraction time (1 and 2 hour) on total phenolics content were applied. ANOVA analysis showed consistent fittings using the models of the experimental data with regard to total phenolics content ($R^2=0,67$ and $p<0,001$) with lack of fit not significant (p lack of fit > 0.05) independently of methanol proportion. A close agreement between experimental and predicted values was found when applying these conditions. The optimum extraction conditions for total phenolics content were 25 °C and 2 h, independently of methanol proportion.

Keywords: optimization, extraction method, polyphenols compounds, *Lactuca sativa* L.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha desarrollado un creciente interés en los compuestos bioactivos presentes en hortalizas, tanto por investigadores como por consumidores. Ello se fundamenta en los beneficios sobre la salud humana asociados al consumo de hortalizas. Entre los vegetales de hoja, la lechuga se destaca por su contenido de compuestos bioactivos, entre los cuales se encuentran los compuestos fenólicos, vitaminas C y E, clorofilas y carotenoides (1). En lechuga, la determinación de compuestos fenólicos se lleva a cabo a partir de extractos líquidos obtenidos bajo diferentes condiciones, entre ellas: a) empleando metanol como solvente de extracción (2) con agitación continua durante 1 h (3); a temperatura ambiente agitando durante 30 s (4) o mediante reflujo por 1 h (5); b) empleando agua como solvente de extracción bajo reflujo por 1 h (5), por 6 o 24 h a temperatura ambiente (6, 7) o por 10 min a 80 °C (6); c) empleando metanol:agua:ácido acético (85:15:0,5 v/v) con sonicación por 5 min y luego manteniendo a temperatura ambiente por 20 min (8, 9); d) empleando fosfato de sodio (pH: 7,5) por 1 min seguido de la extracción con acetato de etilo (10) y e) empleando acetona:agua:ácido acético (70:29:5:0,5, v/v) por 24 h a 4 °C (11). El tipo de solventes de extracción empleado determina que compuestos son extraídos, mientras que la proporción del mismo, temperatura y tiempo, influyen en la eficiencia, rendimiento y estabilidad de los compuestos en solución, lo cual conduce en general a diferentes resultados. Para evitar ello y obtener resultados reproducibles, comparables a los obtenidos por diferentes grupos de trabajo y matrices, las condiciones de extracción deben ser optimizadas y maximizadas.

La extracción de los principios bioactivos es el paso inicial para su detección y cuantificación en diferentes matrices vegetales. Debido al alto costo de reactivos y las variables que afectan los procesos analíticos, resulta esencial contar con métodos adecuados para este propósito. En química analítica, la optimización de los métodos es imprescindible al momento de determinar la serie de condiciones que se requieren para obtener un resultado deseable u óptimo (12). El diseño multivariado de experimentos o modelado de la superficie de respuesta (DOE) presenta como ventajas requerimientos mínimos de tiempo, esfuerzo y recursos, comparado con los procedimientos univariados, facilitando la obtención de información mientras se minimiza la cantidad de experimentos (13). DOE y la metodología de superficie de respuesta (RSM) han demostrado ser útiles para el desarrollo, mejora y optimización de procesos, siendo utilizados en aplicaciones analíticas, en la industria y en bioprocesos (13).

El objetivo del presente trabajo fue la optimización de los parámetros críticos (concentración de solvente, temperatura y tiempo) que afectan la extracción de compuestos fenólicos presentes en lechuga usando la metodología de superficie de respuesta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Lechuga cv Rapidmor oscura fue implantada en la EEA La Consulta en un diseño de bloques completos al azar. Las plantas fueron cosechadas e inmediatamente acondicionadas en el laboratorio para su posterior análisis. Hojas sanas, libres de defectos y ataque de insectos fueron seleccionadas para cada experimento.

Procedimiento de extracción

La extracción fue efectuada siguiendo el método propuesto por Viacava *et al.* 2015 (14), variando los parámetros: concentración de metanol (MeOH):agua acidificada (v/v), temperatura y duración del proceso de extracción. Hojas frescas fueron homogeneizadas en un blender durante 1 min. Luego, 10 mL del solvente de extracción fueron adicionados a 1 g de tejido. Las proporciones de metanol evaluadas fueron: 30, 50 y 70%, el tiempo: 1 y 2 horas y la temperatura de extracción: 25, 45 y 60 °C. Durante la extracción, cada intervalo de 25 min., se realizó agitación en baño de ultrasonido (5 min.) y vortex. Una vez finalizado el proceso, los homogenatos fueron centrifugados a 14000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se conservó en freezer a -20 °C hasta el momento de análisis.

Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT)

El análisis fue llevado a cabo siguiendo la metodología propuesta por Singleton (15), usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR) con ácido gálico como estándar. Para ello, se adicionaron de 2,5 mL de agua y 0,25 mL de FCR a 50 µL de extracto de lechuga. Luego de 3 min., se agregaron 0,75 mL de carbonato de sodio (25% p/v) y 1,5 mL de agua. La mezcla se incubó a temperatura ambiente y a la oscuridad durante 60 min. La absorbancia fue medida a 765 nm y el CFT se calculó usando una curva de calibración lineal. Los resultados obtenidos fueron expresados en mg de ácido gálico equivalentes por gramo de tejido fresco de lechuga (mg GAE/g pf).

Diseño experimental y análisis estadístico

La metodología de superficie de respuesta fue utilizada para evaluar la influencia de las condiciones de extracción de CFT en lechuga fresca. Los datos fueron analizados mediante el software Design-Expert 6.0.10. El análisis estadístico incluyó el análisis de la varianza (ANOVA), el estimador F, el cual establece la significancia del modelo y el coeficiente de determinación R². El test de falta de ajuste del modelo se estableció para un nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 muestra el contenido de fenoles totales bajo las condiciones establecidas para un diseño D-Optimal de 15 ensayos, observándose la variación en CFT en función de las condiciones de extracción evaluadas. El contenido más alto de CFT fue hallado en la extracción bajo las condiciones del experimento 4 mientras que el más bajo, en las condiciones del experimento 2. Los valores de CFT fueron superiores a los reportados por Gomes *et al.* (16) y Viacava *et al.* (17), quienes emplearon como solventes de extracción metanol, acetona y etanol, respectivamente. Estas diferencias en los valores pueden deberse no solo a los solventes de extracción utilizados sino también a las temperaturas, tiempos y condiciones de extracción (agitación vs baño de ultrasonido).

Tabla 1. Matriz del diseño D-Optimal evaluado.

Run	Factor 1 Temperatura (°C)	Factor 2 Tiempo (h)	Factor 3 Metanol (%)	Respuesta CFT (mg g ⁻¹ pf)
1	25	2	70	1,657
2	45	1	70	1,403
3	25	2	30	1,720
4	25	1	70	1,039
5	60	1	30	1,824
6	45	2	30	1,398
7	45	1	50	1,573
8	25	1	50	0,964
9	25	2	50	2,027
10	45	1	30	0,916
11	60	2	50	1,064
12	60	2	30	1,007
13	60	1	50	1,775
14	25	1	30	0,972
15	45	2	50	1,100

A continuación, se presentan las ecuaciones del modelo que explica el CFT en términos de los factores codificados (Ec. 1) y sin codificar (Ec. 2):

Ecuación 1:

$$\text{CFT} = 1,36 - 5,15E - 003 * A + 0,025 * B - 0,39 * A * B$$

Ecuación 2:

$$\text{CFT} = -1,54 + 0,07 * \text{temperatura} + 1,94 * \text{tiempo} - 0,04 * \text{temperatura} * \text{tiempo}$$

Como puede observarse en la ecuación, el CFT dependió de los factores temperatura y tiempo así como de la interacción de estas variables pero no de la concentración del solvente de extracción. Otros investigadores han optimizado estas mismas variables tanto para la extracción de compuestos fenólicos como para distintas actividades biológicas como por ejemplo la actividad antioxidante en lechuga y otras matrices vegetales (17). A partir de ello se han ajustado diferentes modelos evidenciando discrepancias atribuidas a la composición y estructura particular de cada matriz vegetal que contienen diversos compuestos fenólicos, así como otros constituyentes, los cuales pueden afectar los procesos de extracción (17). Adicionalmente, cada sistema biológico puede responder de manera diferencial a las condiciones de procesamiento y extracción, lo que demuestra la importancia de evaluar diferentes variables de extracción en cada matriz de alimentos utilizando técnicas de diseño experimental multivariado.

El análisis de ANOVA evidenció que el modelo fue significativo ($p < 0,0001$) para los datos experimentales con falta de ajuste no significativa. Además, los valores estimados de la variable respuesta calculados a partir del modelo (Ec 2) presentaron un alto coeficiente de correlación con los resultados experimentales (Figura 1), confirmando la capacidad del modelo para describir el CFT de extractos de lechuga fresca.

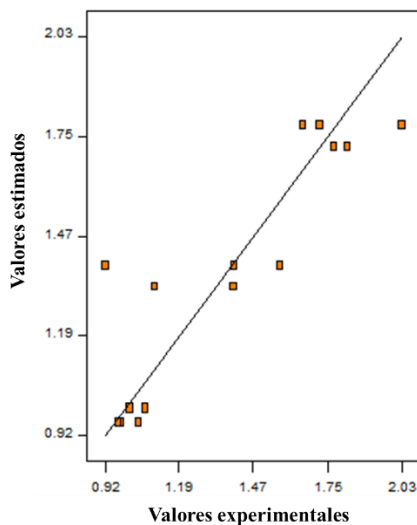


Figura 1. Gráfico de valores estimados por el modelo vs valores experimentales para el CFT en extractos de lechuga.

Debido a la interacción de las variables tiempo y temperatura, fue posible observar que el mayor CFT se halló en la combinación de menor temperatura y mayor tiempo (25 °C y 2 h) o bien para la combinación de mayor temperatura y menor tiempo (60 °C y 1h), independientemente de la concentración de metanol utilizada (Figura 2). Sin embargo, teniendo en cuenta la función de deseabilidad, la máxima concentración de compuestos fenólicos se obtendría llevando a cabo las extracción a la menor temperatura y durante el mayor tiempo evaluados. En concordancia con lo reportado previamente por otros autores (4, 6) el aumento de la temperatura favorece la extracción de compuestos fenólicos debido a que se incrementa su solubilidad, coeficiente de difusión, viscosidad del solvente y tensión superficial. También se ha descrito que las altas temperaturas favorecen la migración de los compuestos fenólicos hacia el solvente de extracción debido a la ruptura de las uniones con proteínas y polisacáridos resultando en un CFT mayor (18).

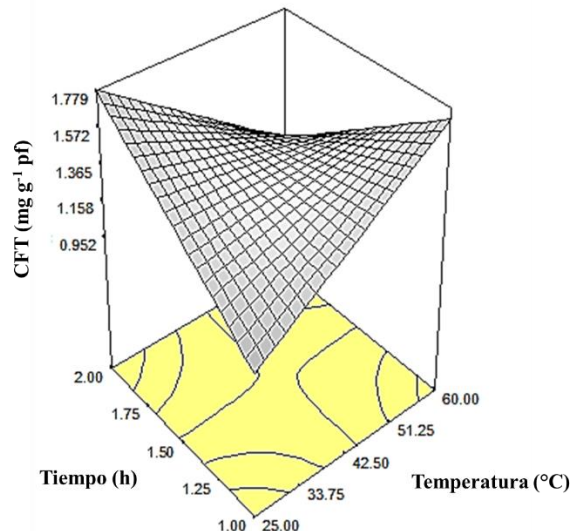


Figura 2. Gráfico de superficie de respuesta que muestra el efecto combinado del tiempo y la temperatura sobre el CFT en extractos de lechuga.

CONCLUSIONES

De acuerdo al diseño de respuesta del modelo optimizado, las condiciones para lograr la máxima extracción de los CFT en lechuga, serían de 25 °C durante un período de 2 h. En el presente trabajo, el diseño multivariado de experimentos resultó ser una técnica estadística útil que permitió determinar las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos presentes en lechuga. Esta metodología maximiza la cantidad de información que puede ser obtenida a partir de un mínimo de experimentos con la ventaja de reducción de los costos experimentales.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras de este trabajo agradecen el financiamiento aportado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria a través del Programa Nacional de Agroindustria y Agregado de Valor (PNAIyAV 1130043); Programa Nacional de Hortalizas, Flores y Aromáticas (PNHFA 1106073) y el Proyecto Regional con Enfoque Territorial (PRET-MZASJ 1251204).

REFERENCIAS

1. Kim, M.J., Moon, Y., Tou, J.C., Mou, B., Waterland, N.L. (2016) Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 49: 19–34.
2. Ríos, J.J., Rosales, M.A., Blasco, B., Cervilla, L.M., Romero, L., Ruiz, J.M. (2008). Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. *Sci. Hortic.* 116: 248–255.
3. Chisari, M., Todaro, A., Barbagallo, R.N., Spagna, G. (2010). Salinity effects on enzymatic browning and antioxidant capacity of fresh-cut baby Romaine lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Duende). *Food Chem.* 119: 1502–1506.
4. Kang, H.M., Saltveit, M.E. (2002). Antioxidant capacity of lettuce leaf tissue increases after wounding. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7536–7541.
5. Llorach, R., Tomás-Barberán, F.A., Ferreres, F. (2004). Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5109–5116.
6. Altunkaya, A., Becker, E.M., Gökmen, V., Skibsted, L.H. (2009). Antioxidant activity of lettuce extract (*Lactuca sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. *Food Chem.* 115: 163–168.
7. Altunkaya, A., Gökmen, V. (2008). Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Chem.* 107: 1173–1179.
8. Boo, H.O., Heo, B.G., Gorinstein, S., Chon, S.U. (2011). Positive effects of temperature and growth conditions on enzymatic and antioxidant status in lettuce plants. *Plant Sci.* 181: 479–484.

9. Li, Z., Zhao, X., Sandhu, A.K., Gu, L. (2010). Effects of exogenous abscisic acid on yield, antioxidant capacities, and phytochemical contents of greenhouse grown lettuces. *J. Agric. Food Chem.* 58: 6503–6509.
10. Cano, A., Arnao, M.B. (2005). Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity in different leaves of three lettuce varieties. *Int. J. Food Prop.* 8: 521–528.
11. Ozgen, S., Sekerci, S. (2011). Effect of leaf position on the distribution of phytochemicals and antioxidant capacity among green and red lettuce cultivars. *Span. J. Agric. Res.* 9: 801–809.
12. Candiotti, L.V., De Zan, M.M., Cámara, M.S., Goicoechea, H.C. (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* 124: 123-148.
13. Brereton, R. (2003). *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, John Wiley & Sons, Chichester.
14. Viacava, G.E., Roura, S.I., Agüero, M.V. (2015). Antioxidant activity of butterhead lettuce: evaluation of significant factors affecting antioxidant extraction and quantification. *Food Meas.* 9: 206–214.
15. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152–178.
16. Gomes, T., Delgado T., Ferreira, A., Pereira, J.A., Baptista, P., Casal, S., Ramalhos, E. (2013). Application of response surface methodology for obtaining lettuce (*Lactuca sativa* L.) by-products extracts with high antioxidative properties. *Industrial Crops and Products* 44: 622– 629.
17. Viacava, G.E., Roura, S.I., Agüero, M.V. (2014). Optimization of critical parameters during antioxidants extraction from butterhead lettuce to simultaneously enhance polyphenols and antioxidant activity. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 146: 47–54.
18. Chethan S., Malleshi N. (2007). Finger millet polyphenols: optimization of extraction and the effect of pH on their stability, *Food Chem.* 105: 862–870.

PULPA DE FRAMBUESA: VEHÍCULO PARA CEPAS DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

M. Luján¹; S. Coria¹; V. Kleinjan¹; M. Ochoa¹; A. De Michelis^{1,2}

¹Facultad Ciencias y Tecnología de los Alimentos, Universidad Nac. del Comahue. 25 de Mayo 113, Villa Regina, Río Negro, Argentina. Tel: 54-298-4463200.

²INTA AER El Bolsón- CONICET, Ap. 108 (8430) El Bolsón- Río Negro, FAX (0294-4492422)

Correo electrónico: maria.lujan@facta.uncoma.edu.ar

RESUMEN

Desde hace un tiempo se están utilizando frutas como vehículos de bacterias probióticas, por un lado, para ampliar la oferta de alimentos funcionales y, por otro lado, para satisfacer la demanda de consumidores que no consumen lácteos (vegetarianos, lactosa intolerantes, alérgicos a proteínas lácteas o por la percepción negativa del contenido de colesterol en leche). En Argentina se ha publicado muy poco sobre la factibilidad del empleo de frutas finas para vehicular microorganismos probióticos, lo que le sumaría importantes propiedades por sobre las que ya poseen naturalmente. El objetivo del presente trabajo fue determinar el potencial de una cepa probiótica de *Lactobacillus plantarum* para fermentar pulpa de frambuesa y la factibilidad de poder formular un alimento funcional con la misma.

Se utilizó pulpa de frambuesa, de frutas cosechadas en El Bolsón, Patagonia Argentina. Los estudios se realizaron con la cepa *L. plantarum* 998 control (C) y la cepa *L. plantarum* 998 preadaptada (P). Las experiencias de fermentación se realizaron en 100 g de pulpa estéril, inoculada al 2% con el cultivo de *L. plantarum* 998 C y 998 P, e incubadas a 37 °C por 24 horas. Se realizaron recuentos de células viables al tiempo 0 y 24 horas. Se evaluó la viabilidad de la cepa *L. plantarum* 998 C y 998 P a 4 °C durante tres semanas, realizando recuentos de células viables a los 7, 14 y 21 días. La simulación gastrointestinal *in vitro* se realizó a los tiempos 0, 24 horas y 7, 14 días. Los resultados obtenidos mostraron que las cepas no utilizaron la pulpa de frambuesa para su crecimiento, pero se mantuvieron a las 24 horas de fermentación en órdenes superiores a 6 log UFC/ml. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los resultados entre la cepa *L. plantarum* 998 Control y la Preadaptada. En el almacenamiento a 4 °C, las cepas se mantuvieron en valores superiores a 6 UFC/ml hasta los 7 días, luego los valores disminuyeron significativamente. Los valores obtenidos al finalizar la simulación gastrointestinal *in vitro* luego de los 7 días de almacenamiento a 4 °C, fueron relativamente bajos. Es necesario realizar estudios *in vivo* en animales, para obtener la evidencia final que indique si *L. plantarum* 998 en pulpa de frambuesa fermentada y almacenada en frío durante 7 días, puede colonizar el intestino.

Palabras Clave: Alimentos Funcionales, Frutas, Bacterias Probióticas, Fermentación.

ABSTRACT

In recent years, many studies have explored the usage of fruits as a vehicle for probiotic bacteria. Firstly, as a way to find new functional foods. Secondly, in order to cope with the needs of non-dairy consumers (e.g. vegetarians, lactose intolerants, people with allergy to cow's milk, or those consumers who deem milk as a source of cholesterol). In Argentina, there are too few studies addressing the possibility of using small fruits to transmit probiotic microorganisms and the resulting improvement of its nutritional properties. In the current study, we evaluate the potential as ferment for raspberry pulp of a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum*, and the feasibility of formulating a functional food from it. The results reported herein were obtained from experiments performed on the pulp of raspberries harvested in El Bolsón (Patagonia Argentina). The strains under study were *L. plantarum* 998 as a control (C) and preadapted *L. plantarum* 998 (P). Fermentations were carried out on sterilized pulp (100 g) inoculated with *L. plantarum* 998 C and 998 P cultivars (2%) and kept at 37 °C for 24 h. Viable cell counts were performed at 0 and 24 h. Viability of *L. plantarum* 998 C and P was evaluated at 4°C during 3 weeks, with viable cell counts performed at 7, 14 and 21 days. Gastrointestinal simulations were run at 0, 1, 7 and 14 days. The results show that the strains did not use the raspberry pulp on its growing, but they stood over 6 log UFC/ml after 24 h fermentation. *L. plantarum* 998 C and 998 P did not present significant differences. The strains kept values over 6 log UFC/ml for 7 days under storage at 4 °C, and decreased significantly after that. At the end of the 7 day and 4 °C *in vitro* gastrointestinal simulation, values were relatively low. In order to determine if *L. plantarum* 998 can colonize the gastrointestinal tract using raspberry pulp fermented under 7 days cooling, further *in vivo* studies are required.

Keywords: Functional Foods, Fruits, Probiotic Bacteria, Fermentation.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha producido un cambio sustancial en la actitud frente a la alimentación. Los consumidores son conscientes de la influencia de la dieta en la modulación del riesgo de desarrollo de enfermedades y de la relación entre dieta y calidad de vida (1). Los alimentos funcionales son consumidos como parte de la dieta. Además de la función nutritiva básica, se ha demostrado que presentan propiedades fisiológicas o que disminuyen el riesgo de contraer ciertas enfermedades. De forma general, se puede decir que un alimento funcional es aquel que confiere al consumidor una determinada propiedad beneficiosa para la salud, independientemente de sus propiedades nutritivas. Son alimentos convencionales, que poseen naturalmente componentes bioactivos, o a los que se les ha añadido o eliminado un determinado componente. Deben presentarse como un alimento propiamente dicho y sus efectos deben observarse cuando el alimento se consume dentro de una dieta equilibrada diaria, es decir, dentro del modelo alimentario habitual (2).

Las frambuesas (*Rubus idaeus*) pertenecen al grupo de las frutas pequeñas (berries), son frutos de reducido tamaño, con coloración que va del rojo oscuro al amarillo, sabor agrídulce y rápida perecibilidad. Son ricos en vitaminas C y E, carbohidratos, fibras y azúcares, siendo la Patagonia Argentina una de las zonas de producción más importante del país en este tipo de cultivares. Las formas de consumo más difundidas son en fresco, mermeladas o conservas. Estas frutas poseen naturalmente actividad antioxidante, lo que les confiere importantes beneficios sobre la salud, pudiendo considerarse como alimento funcional en sí mismo o por el agregado de otras propiedades para ampliar su posible funcionalidad.

Dentro de esta línea, los alimentos probióticos se definen como un suplemento alimentario con contenido microbiano vivo que beneficia al huésped mejorando su equilibrio intestinal. Adicionar microorganismos probióticos a alimentos proporciona beneficios a la salud, incluyendo la reducción del nivel de colesterol en suero sanguíneo, mejora de la función gastrointestinal, el sistema inmune y reducción del riesgo de contraer cáncer de colon (3).

Ya se han utilizado jugos de fruta como vehículos de bacterias probióticas (4, 5), por un lado para ampliar la oferta de alimentos funcionales y por otro lado para satisfacer la demanda de consumidores que no consumen lácteos (vegetarianos, lactosa intolerantes, alérgicos a proteínas lácteas o por la percepción negativa del contenido de colesterol en leche).

Ningún organismo “elabora” bacterias, es decir no las genera, su incorporación es siempre externa y sólo permanecen temporalmente en el intestino, por ello se recomienda una ingesta continua de los mismos (6). Existen tres estrategias alimentarias que promueven el mantenimiento de un equilibrio más saludable de la microflora intestinal, consistentes en la alteración beneficiosa de su composición, mediante el incremento de las cantidades de bifidobacterias, de lactobacilos o de ambos.

Dentro del género *Lactobacillus*, *Lactobacillus plantarum* forma parte del grupo facultativo y heterofermentativo de los lactobacilos. Es una especie heterogénea y versátil que puede encontrarse en una gran variedad de ambientes incluyendo, lácteos, carne, pescado, y en muchas fermentaciones vegetales. Además, algunas cepas de *L. plantarum* han demostrado la capacidad de sobrevivir al sistema digestivo y colonizar parcialmente el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos. Se han descubierto varias propiedades terapéuticas asociadas a *L. plantarum*, tales como la disminución de la incidencia de diarrea en los centros de cuidado de niños, reducción en el dolor y la constipación asociada con el síndrome del colon irritable, disminución en la hinchazón, flatulencia, habilidad de desplazar enteropatógenos, y capacidad de ejercer un efecto positivo en el sistema inmune de niños VIH+ (7).

La simulación gastrointestinal *in vitro* es necesaria para comprobar la viabilidad y resistencia de los microorganismos probióticos a las condiciones menos favorables del tracto gastrointestinal; por ejemplo, en el estómago el pH es la peor condición y en el duodeno son las sales biliares (8). Este ensayo permite obtener una aproximación de lo que sucederá en la situación *in vivo*, sin embargo, debido a las complejas interacciones que ocurren en el estómago e intestino, los resultados obtenidos de estudios *in vitro* pueden diferir de los obtenidos *in vivo*, esto fundamentalmente depende del organismo de cada consumidor.

Para poder evaluar la viabilidad y resistencia de microorganismos probióticos, se han propuesto modelos que simulan las condiciones del tracto gastrointestinal, los cuales se clasifican en modelo convencional y modelos dinámicos. Estos últimos, se diferencian del primero por ser continuos (9).

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de la pulpa de frambuesa para ser fermentada y/o constituirse en vehículo para cepas probióticas de *Lactobacillus plantarum*, con el propósito de diseñar posibles alimentos funcionales, para lo cual se planteó:

- Estudiar la viabilidad de *L. plantarum* 998 durante la fermentación en pulpa de frambuesa.
- Estudiar la viabilidad de *L. plantarum* 998 en la pulpa de frambuesa durante el almacenamiento refrigerada a 4 °C durante 3 semanas.
- Estudiar *in vitro*, mediante ensayos de simulación gastrointestinal, la viabilidad de *L. plantarum* 998 en pulpa de frambuesa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

Se utilizó pulpa de frambuesa var. Tulameen de frutas cosechadas en El Bolsón, Patagonia Argentina. Para obtener la pulpa, las frambuesas congeladas a una temperatura de -20 °C, se sometieron a la acción de un homogeneizador tipo mixer. A continuación, se colocó 100 gramos de la misma en frascos de vidrio de 200 ml. Estos se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos.

Cepas

Se utilizó una cepa probiótica de *Lactobacillus plantarum* INLAIN 998, cedida por el equipo profesional del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), Universidad Nacional del Litoral, CONICET, Santa Fé, República Argentina. Las mismas tienen propiedades

probióticas (aumento de defensas intestinales) demostradas en animales en estudios previos (7). Para conservarlas, se colocaron en una solución de glicerol al 20% y se almacenaron a -20 °C.

Reactivación de las cepas

Control (C): Para reactivar las cepas conservadas, se colocó 100 µL de la suspensión de glicerol en 5 ml de caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe). Se incubó por 72 horas a 37 °C y se continuó con repiques Over Night (ON) inoculando 100 µl de la suspensión del microorganismo en 5 ml de MRS nuevo durante 48 horas a 37°C. Luego, se lavó la cepa con buffer fosfato salino de pH 7 (PBS) (10). A esta cepa se la denominó *Lactobacillus plantarum* 998 C.

Preadaptada (P): Se realizó una preadaptación de la cepa *L. plantarum* 998 en la matriz a estudiar de la siguiente forma: se colocó 100 µL de la suspensión de glicerol en 5 ml de caldo MRS. Se incubó por 72 horas a 37 °C. Luego se continuó con repique ON, inoculando 100 µl de la suspensión del microorganismo en una solución de 5 ml de caldo MRS con 25% de pulpa de frambuesa durante 24 horas a 37 °C. Luego de este período, se inoculó 100 µl de la suspensión anterior en 5 ml de caldo MRS con 50% de pulpa de frambuesa durante 24 horas a 37°C. Al igual que la cepa control, luego se le hizo un lavado con PBS (10). A esta cepa se la denominó *Lactobacillus plantarum* 998 P.

Fermentación de la pulpa de frambuesa

Las experiencias de fermentación se realizaron con las cepas control (C) y preadaptada (P) por triplicado, con 100 g de pulpa estéril de frambuesa. Las pulpas fueron inoculadas al 2% con los cultivos de *L. plantarum* 998 C y 998 P, e incubadas a 37 °C en estufa de cultivo durante 24 horas. Se tomaron muestras de cada pulpa a tiempo: 0 (momento de inoculación) y 24 horas y se hizo el recuento de las unidades formadoras de colonia de células viables (UFC) a través del método estándar de recuento en placa con medio MRS, después de 48 horas de incubación a 37°C. Además, se realizó simulación gastrointestinal *in vitro* según se describe en el punto 5.

Almacenamiento a 4 °C de la pulpa de frambuesa fermentada

Las pulpas de frambuesa fermentadas con cepas de *L. plantarum* 998 C y 998 P, fueron almacenadas a temperaturas de refrigeración (4 °C) durante tres semanas. Se tomaron muestras a los 7, 14 y 21 días de almacenamiento en frío y se determinó el número de microorganismos viables mediante recuento en placa (según se detalló en el punto 3) y se realizó simulación gastrointestinal *in vitro* según se describe en el punto 5, estos ensayos se realizaron por triplicado.

Simulación gastrointestinal *in vitro* de la pulpa de frambuesa fermentada

La simulación gastrointestinal *in vitro* se realizó en cada pulpa fermentada, frambuesa con *L. plantarum* 998 C y frambuesa con *L. plantarum* 998 P, a tiempo 0, 24 horas de fermentación y 7 y 14 días de almacenamiento en frío, por triplicado. Para la determinación *in vitro* de la resistencia de las cepas de *L. plantarum* 998 C y 998 P, se procedió según Reinheimer (10), realizando una simulación del tipo convencional. Se tomó 10 g de pulpa inoculada al 2% con la cepa y se agregó 10 ml de una solución de saliva con 0,6% de pepsina (punto A, recuento de viables). Luego, se acidificó a pH 2,5 con HCl se incubó la muestra durante 90 minutos en baño de agua termostático a 37 °C (punto B, recuento de viables). A continuación, se tomó 1,4 ml en eppendorf, se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces con PBS. Luego se realizó el shock duodenal de bilis (se resuspendió en 1,4 ml de una solución de bilis bobina al 1% en PBS) y se incubó en baño de agua termostático a 37 °C por 10 minutos (punto C, recuento de viables). Se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, se descartó sobrenadante y se lavó dos veces con PBS. A continuación, se resuspendió en 1,4 ml de la solución de jugo intestinal (bilis al 0,3% más 0,1% pancreatina en PBS). Se incubó durante 90 minutos a 37 °C (punto D, recuento de viables).

Análisis químicos

Durante la experiencia, se midió el pH potenciométricamente a las pulpas de frambuesa con *L. plantarum* 998 C y *L. plantarum* 998 P, a los tiempos: 0, 24 horas, 7 y 14 días.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis de los datos obtenidos, se utilizó el programa estadístico InfoStat® versión 2015. Los resultados fueron expresados como la Media de las tres réplicas realizadas \pm Desvío Estándar (DE). Se realizó un análisis ANAVA y las diferencias significativas entre grupos fueron determinadas por un Test de Tukey. Estos estudios se realizaron con una significancia del 99%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fermentación de la pulpa de frambuesa

En la tabla 1 y figura 1, se muestra el avance de la fermentación de las pulpas de frambuesa con las cepas *L. plantarum* 998 C y 998 P. En los resultados obtenidos, se observó que, a las 24 horas de fermentación, los recuentos de células viables de las cepas *L. plantarum* 998 C y 998 P disminuyeron desde el momento de la inoculación en la matriz (tiempo 0), además el pH no se modificó en el transcurso de la misma, demostrando que no utilizaron la pulpa para su crecimiento. Si bien estas cepas son ácido tolerantes, la disminución de los recuentos se pudo deber al bajo pH de la matriz estudiada. Se comunicó la fuerte influencia del pH sobre la supervivencia celular en varios productos alimenticios (11). Sin embargo, se encuentran en concentraciones superiores a 1×10^6 UFC/ml, concentraciones mínimas que son requeridas para que los microorganismos probióticos sobrevivan a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal y alcancen el colon en número suficiente. Estudios *in vivo* e *in vitro* (12, 13) indicaron que algunas cepas de *Lactobacillus* sólo sobreviven parcialmente al pasaje a través del tracto gastrointestinal y, generalmente, debería estar presente una población de bacterias de 10^7 - 10^9 UFC/ml en los alimentos para colonizar, al menos temporalmente, el intestino (14).

El análisis de varianza mostró que los resultados sólo se vieron afectados por el factor tiempo, es decir que no influyó el tipo de cepa utilizada. El test de Tukey mostró que no hubo diferencias significativas entre los tiempos 0 y 24 horas, para ambas cepas. En base a los resultados obtenidos, se observó que la preadaptación de la cepa *L. plantarum* 998 en la matriz no logró mejorar la tendencia observada en la fermentación.

Tabla 1. Avance de fermentación (log UFC/ml) de pulpas de frambuesa con las cepas de *L. plantarum* 998 C y 998P

Tiempo (horas)	pH	<i>L. plantarum</i> 998 C	pH	<i>L. plantarum</i> 998 P
0	3,00±0,08	7,20±0,37 ^a	3,03±0,05	7,30±0,11 ^a
24	3,00±0,00	6,66±0,31 ^a	2,98±0,02	6,86±0,31 ^a

Para cada determinación

(±DE) que poseen superíndices comunes, no difieren significativamente (P>0,01)

los valores medios

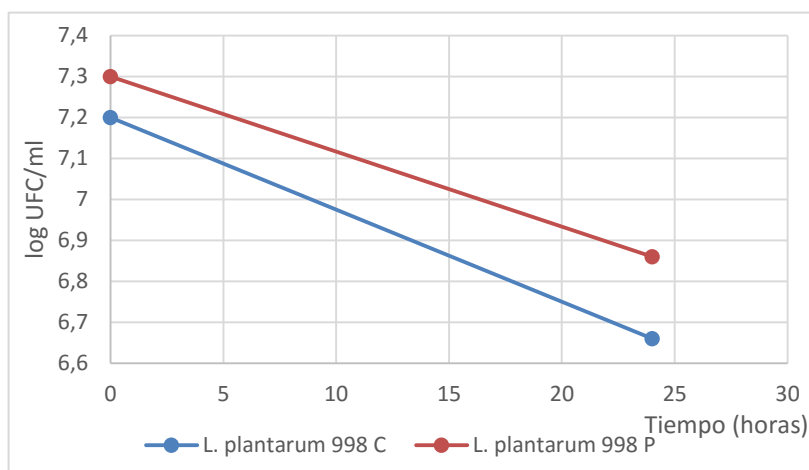


Figura 1: Avance de fermentación (log UFC/ml) en pulpas de frambuesa con las cepas de *L. plantarum* 998 C y 998P

Almacenamiento en frío de la pulpa de frambuesa fermentada

Los microorganismos probióticos son capaces de desarrollar una respuesta al estrés producido por el contacto con medios ácidos. Esta respuesta protege a los microorganismos de las fuertes condiciones de acidez (15 y 16) y depende fuertemente de la cepa probiótica de interés (17 y 18). Además, un estudio realizado por Champagne y Gardner (19), demostró que *L. plantarum* se mantiene en altos valores (10^7 UFC/ml) durante el almacenamiento en frío (4°C), en un jugo de fruta sin fermentar de pH 4,2, por 80 días. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos del seguimiento del almacenamiento en frío de las pulpas de frambuesa fermentadas y los valores de pH obtenidos. El análisis de varianza mostró que sólo el factor tiempo influyó en los resultados, es decir que estos son independientes del tipo de cepa utilizada. Se observó que, a los 7 días no se produjo una disminución significativa de los recuentos de *L. plantarum* 998 C y 998 P respecto a los valores iniciales; los recuentos en este punto se mantuvieron en el orden de 1×10^6 UFC/ml (6 log UFC/ml). A los 14 días, los recuentos de *L. plantarum* 998 C y *L. plantarum* 998 P no disminuyeron significativamente con respecto a los 7 días de almacenamiento en frío. A los 21 días, los recuentos disminuyeron significativamente, quedando en el orden de 3 log UFC/ml (figura 2). Los resultados de tolerancia al almacenamiento en frío obtenidos en el presente estudio, difieren notablemente de los resultados expuestos por Champagne y Gardner (19). Esto probablemente se debió al estrés sufrido por la cepa durante la fermentación de la pulpa de frambuesa (24 horas, pH 3, 37°C), previo al tratamiento en frío. Por otro lado, el pH de la pulpa no varió durante 14 días de almacenamiento, observándose el mismo comportamiento en el estudio realizado por Champagne y Gardner (19).

Tabla 2: Efecto del almacenamiento a 4 °C (log UFC/ml) en pulpas de frambuesa con las cepas de *L. plantarum* 998 C y 998P

Cepas	pH Rec. Inic.	Recuento inicial	pH 7 días	7 días	pH 14 días	14 días	21 días
<i>L.plantarum</i> 998 C	3,00±0,00	6,66±0,31 ^a	3,00±0,00	6,13±0,29 ^{a, b}	3,00±0,00	5,05±0,42 ^b	3,51±0,64 ^c
<i>L.plantarum</i> 998 P	2,98±0,02	6,86±0,31 ^a	2,98±0,02	6,33±0,58 ^{a, b}	2,98±0,02	5,37±0,75 ^b	3,84±0,50 ^c

Para cada determinación los valores medios (±DE) que poseen superíndices comunes, no difieren significativamente (P>0,01)

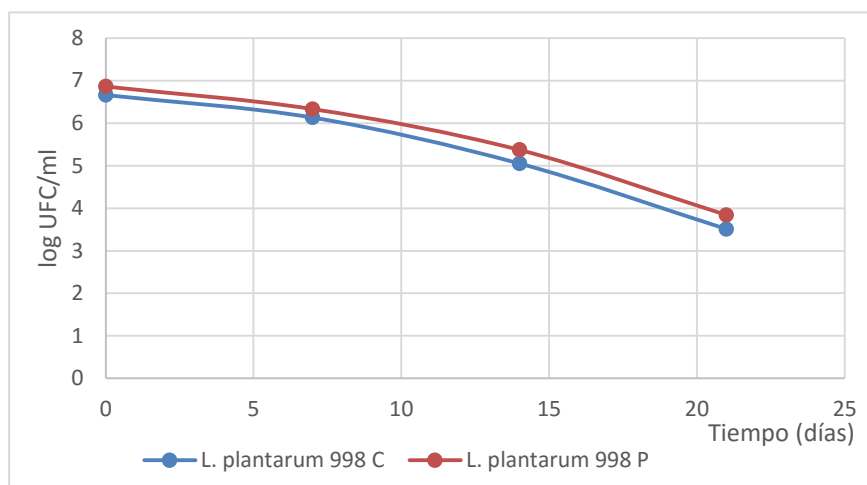


Figura 2: Efecto del almacenamiento a 4°C (log UFC/ml) en pulpas de frambuesa con las cepas de *L. plantarum* 998 C y 998P.

Simulación gastrointestinal in vitro de la pulpa de frambuesa fermentada

En la tabla 3 y la figura 3 se muestran los resultados obtenidos en la simulación gastrointestinal *in vitro*. Tanto para *L. plantarum* 998 C como 998 P, se observó la misma tendencia en los diferentes momentos de la simulación (puntos A, B, C y D). Luego de la acidificación, se produjo una reducción significativa en el número de células viables. Por otro lado, se observó que luego del tratamiento con shock duodenal y jugo intestinal, no se produjo un descenso significativo en los recuentos, esto concordó con los resultados obtenidos por Champagne y Gardner (19), quienes evaluaron la estabilidad de una cepa de *L. plantarum* a pH 2, el efecto de enzimas pancreáticas y el tratamiento con bilis al 0,3%, en una bebida de frutas.

El análisis de varianza mostró que sólo la interacción entre el tipo de cepa y el tiempo posee significancia, es decir que los resultados obtenidos no dependen del momento de la simulación gástrica (A, B, C, D) y, por ende, son válidos para todas las combinaciones tiempo-cepa. Es decir, la tendencia de la disminución de los recuentos durante la simulación gástrica fue la misma para la cepa *L. plantarum* 998 C al tiempo 24 horas que para la cepa *L. plantarum* 998 P a los 7 días de almacenamiento en frío.

Tiempo	A (post saliva+ pepsina)		B (post acidificación)		C (post shock duodenal)		D (post jugo intestinal)	
	998 P	998 C	998 P	998 C	998 P	998 C	998P	998 C
0 horas (ferm.)	6,93±0,06 a,1	6,79±0,32 a,1,2	6,32±0,26 b,1	5,56±0,39 b,1,2	6,32±0,20 ^{b,1}	5,44±0,46 b,1,2	6,30±0,21 ^{b,1}	5,34±0,53 b,1,2
24 horas (ferm.)	6,43±0,33 c,3,4	6,23±0,28 c,2,3	4,43±0,16 d,3,4	5,09±0,61 d,2,3	4,24±0,18 d,3,4	5,07±0,68 d,2,3	4,11±0,30 d,3,4	4,88±0,61 d,2,3

7 días (frío)	5,80±0,73 e,4	5,83±0,22 e,3,4	3,88±0,32 f,4	4,15±0,40 f,3,4	3,58±0,46 f,3,4	4,03±0,36 f,3,4	3,38±0,60 f,3,4	3,72±0,33 f,3,4
14 días (frío)	4,98±0,70 g,5	4,56±0,52 g,5	2,88±0,76 h,5	3,07±0,62 h,5	2,33±0,73 h,5	2,70±0,57 h,5	1,91±0,66 h,5	2,44±0,60 h,5

Tabla 3: Ensayo de resistencia gastrointestinal simulada (log UFC/ml) de pulpa de frambuesa fermentada con cepa de *L. plantarum* 998 C y 998 P

Los superíndices indicados con letras corresponden a la comparación entre momentos (A, B, C, D) y los números corresponden a la comparación de los tiempos (0, 24 horas, 7 y 14 días). Para cada determinación los valores medios (±DE) que poseen superíndices comunes, no difieren significativamente (P>0,01).

Por otro lado, luego de los 7 días de almacenamiento en frío, los recuentos de células viables obtenidos posteriores a la simulación gastrointestinal (punto D) de *L. plantarum* 998 C y 998 P, disminuyeron significativamente; lo cual indica que no es factible extender el almacenamiento en frío, ya que los probióticos deben llegar al intestino grueso en concentraciones lo más elevadas posible, para instalarse y realizar su función probiótica.

Los resultados obtenidos luego de realizar la simulación gastrointestinal al tiempo cero, fueron similares a los de Champagne y Gardner (19), quienes partieron con recuentos de células viables de *Lactobacillus plantarum* del orden de 7 log UFC/ml en una bebida de frutas de pH 4,2 y luego de la simulación gástrica *in vitro* obtuvieron recuentos del orden de 4 log UFC/ml. En el trabajo citado, también se realizó la simulación gástrica *in vitro*, en la misma matriz, a los 35 días de almacenamiento en frío; partiendo de recuentos de células viables del orden de 7 log UFC/ml, luego del tratamiento obtuvieron recuentos próximos a 3 log UFC/ml. Estos resultados son superiores a los obtenidos en el presente estudio, ya que en la simulación gástrica a los 14 días de almacenamiento en frío, se obtuvieron valores próximos a 2 log UFC/ml.

Si bien los valores obtenidos fueron relativamente bajos, el estudio *in vitro* es sólo exploratorio, requiriéndose un estudio *in vivo* en animales en el cual se podrá medir la estimulación inmunológica real otorgada por el probiótico.

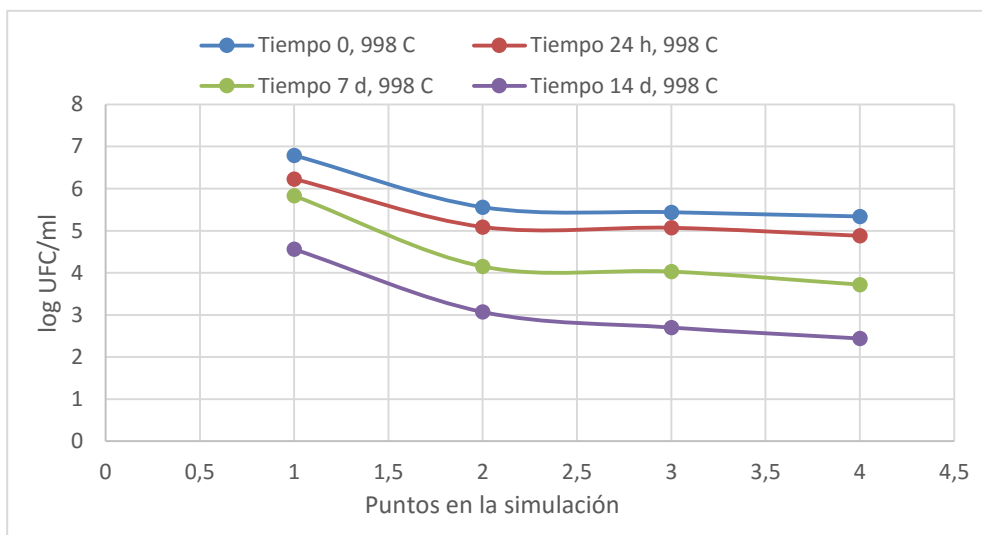


Figura 3: Ensayo de resistencia gastrointestinal simulada (log UFC/ml) de pulpa de frambuesa fermentada con cepa de *L. plantarum* 998 C

CONCLUSIONES

- *L. plantarum* 998 se mantuvo a las 24 horas de fermentación en valores superiores a 6 log UFC/ml, valor mínimo requerido para un alimento probiótico, aunque no logró fermentar la pulpa de frambuesa, ya que no la utilizó para su crecimiento.
- No hubo diferencias significativas en todos los ensayos realizados con la cepa control y preadaptada, por lo cual no sería necesario preadaptar la cepa de *L. plantarum* 998 en pulpa de frambuesa.
- En el estudio de almacenamiento en frío de la pulpa de frambuesa, la cepa *L. plantarum* 998 se mantuvo en valores superiores a 6 log UFC/ml durante 7 días. Luego de este período, los recuentos disminuyeron significativamente, con valores del orden de 3 log UFC/ml a los 21 días de almacenamiento en frío.
- En el estudio de resistencia gastrointestinal *in vitro*, el número de células viables de la cepa *L. plantarum* 998 Control al finalizar el ensayo (punto D) en pulpa de frambuesa a los 7 días de almacenamiento en frío, fue de 3,72 log UFC/ml. Este valor es relativamente bajo. Sin embargo, es necesario realizar estudios *in vivo* en animales, y de esta forma se obtendrá la evidencia final que indique si *L. plantarum* 998 en pulpa de frambuesa fermentada y almacenada en frío durante 7 días, puede colonizar el intestino y así ejercer una función benéfica en el consumidor.
- En base a los resultados obtenidos, se sugiere estudiar la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* 998 en pulpa de frambuesa, utilizando una concentración inicial del microorganismo superior a la aplicada en el presente estudio. Al mismo tiempo, se recomienda hacer el estudio con la incorporación de la cepa utilizando la matriz como vehículo, sin que interactúe con la misma y realizar el seguimiento del almacenamiento en frío (4 °C).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional del Comahue y al PNAIyAV1130043 (INTA) por el financiamiento de este trabajo y al Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) de la Universidad Nacional del Litoral por la cepa utilizada.

REFERENCIAS

1. Barrio Merino A. (2006). Probióticos, prebióticos y simbióticos. Definición, funciones y aplicación clínica en pediatría. Revista Pediatría Atención Primaria. Publicación Oficial de la Asociación Española de Pediatría de Atención Primaria.
2. Aranceta J.; Gil A. (2010). Alimentos funcionales y salud en las etapas infantil y juvenil. Editorial Médica PANAMERICANA.
3. Yoon K.Y.; Woodams E.E., Hang Y.D. (2007). Jugo de tomate probiótico con bacterias ácido lácticas. Revista Mundo Alimentario. 7-11.
4. Nualkaekul, S.; Charalampopoulos, D. (2011). Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. International Journal of Food Microbiology, 146, 111-117.
5. Yoon K.Y.; Woodams E.E.; Hang Y.D. (2005). Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. Lebensm.-Wiss.u.-Technol. 38, 73-75.
6. Reinheimer, J. (2014). Alimentos Funcionales. Buenos Aires.
7. Zago, M.; Fornasari, M. E.; Carminati, D.; Burns, P.; Suárez, V.; Vinderola, Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. Food Microbiology, 28, 1033-1040.
8. Serna Jiménez, J.A. (2012). Elaboración de Jugos de Fruta con Adición de Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Probiótico. Universidad de La Sabana, Chía.
9. Juárez-Roldán, A.R.; Jiménez-Munguía, M.T. (2013). Condiciones Gastrointestinales modelo utilizadas para evaluar probióticos encapsulados. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 7(2), 15-24.
10. Reinheimer, J. (2011). Pasantía en el Instituto de Lactología Industrial. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fé, Argentina.
11. Champagne, C.; Gardner, N. (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45, 61-84.
12. Reid, G. (2008). Probiotics and Prebiotics - Progress and Challenges. International Dairy Journal, 969-975.
13. Charteris, W.; Kelly, P.; Morelli, L.; Collins, J. (1998). Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology, 759-768.
14. Lee, Y.; Salmien, S. (1995). The coming of age of probiotics. Trends in Food Science and Technology, 241-245.
15. Lorca, G.; Font de Valdez, G. (2001). A Low-pH-Inducible, Stationary-Phase Acid Tolerance Response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. Current Microbiology, 42, 21-25.

16. Hartke, A.; Bouche, S.; Giard, J.; Benachour, A.; Boutibonnes, P.; Auffray, Y. (1996). The Lactic Acid Stress Response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Current Microbiology*, 33(3), 194-199.
17. Van de Guchte, M.; Serror, P.; Chervaux, C.; Smokvina, T.; Ehrlich, S.D.; Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1), 187-216.
18. Takahashi, N.; Xiao, J.-Z.; Miyaji, K.; Yaeshiima, T.; Hiramatsu, A.; Iwatsuki, K.K.; Hosono, A. (2004). Selection of acid tolerant Bifidocateria and evidence for low-pH-inducible acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Research*, 71(03), 340-345.
19. Champagne, C.P.; Gardner, N.J. (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*, 41, 539-543

SELECCIÓN DE LEVADURAS NATIVAS DEL VALLE CALCHAQUÍ SALTEÑO PARA VINO TORRONTÉS

R. Semke¹; M. Fili³; M. Gonzalez²; M. Combina²; L. Del Castillo⁴

¹CDV Salta-Valle Calchaquí, Rivadavia 369 (4427), Cafayate, Salta, Argentina

²INTA EEA Mendoza, San Martín 3853, Lujan de Cuyo (5507), Mendoza, Argentina

³INTA EEA Salta, Ruta Prov. 68, Km 172 (4402), Cerrillos, Salta, Argentina

⁴INTA AER Cafayate, Rivadavia 369 (4427), Cafayate, Salta, Argentina

Correo electrónico: delcastillo.lourdes@inta.gov.ar

RESUMEN

El Torrontés Riojano es una variedad emblemática en el Valle Calchaquí Salteño. La obtención de levaduras nativas seleccionadas es una herramienta de diferenciación de los vinos, resaltando características únicas del *terroir*. Se aislaron levaduras nativas a partir de fermentaciones espontáneas de uvas torrontés cosechadas en nueve zonas del Valle. Se obtuvieron 45 aislamientos. Se eligieron 3 fermentaciones por su perfil sensorial, de las cuales, se analizaron 13 cepas por sus características macro y microscópicas, y por biología molecular. Se estudió la producción de ácido sulfhídrico y la eficiencia de fermentación de algunos aislamientos en comparación con dos cepas comerciales de referencia. Se realizaron microvinificaciones con *Saccharomyces cerevisiae* seleccionadas en base a sus características enológicas distintivas, en comparación con una cepa comercial y una fermentación espontánea. Los vinos obtenidos se analizaron química y sensorialmente. Quince cepas fueron analizadas por PCR *interdelta*, se obtuvieron 8 patrones moleculares, 2 corresponden a cepas comerciales y 1 no amplificó. En el estudio de eficiencia, la cepa nativa F9-3 presentó una velocidad de fermentación (2.38 g CO₂/d) significativamente superior a todas las cepas estudiadas. La cepa nativa F9-5 presentó el mayor rendimiento de fermentación (16.33 AR/Et) y produjo la mayor concentración de alcohol (13.35% v/v). Las cepas EC1118, F9-5 y F6-7 presentaron similar vigor fermentativo y fue significativamente superior al de las demás cepas. En la evaluación sensorial, el vino de la cepa F9-5 obtuvo una mejor calificación en su impresión global y fue preferido por el 47% de los expertos.

Palabras clave: levaduras nativas, selección, Torrontés Riojano

ABSTRACT

The Torrontés Riojano is an emblematic variety in the Calchaquí Salteño Valley. The obtaining of selected native yeasts is a tool of differentiation of the wines, highlighting unique characteristics of the *terroir*. Native yeasts were isolated from spontaneous fermentations of Torrontés grapes harvested in nine zones of the Valley. We obtained 45 isolates. Three fermentations were chosen for their sensorial profile, of which 13 strains were analyzed for their macro and microscopic characteristics and molecular biology. We studied the production of hydrogen sulphide and the fermentation efficiency of some isolates compared to two commercial reference strains. Micro-vinifications with *Saccharomyces cerevisiae* were selected based on their distinctive oenological characteristics, as compared to a commercial strain and spontaneous fermentation. The wines obtained were analyzed chemically and sensorially. Fifteen strains were analyzed by *interdelta* PCR, 8 molecular patterns were obtained, 2 correspond to commercial strains and 1 non-amplified. In the efficiency study, the native strain F9-3 presented a fermentation rate (2.38 g CO₂/d) significantly higher than all strains studied. The native strain F9-5 presented the highest fermentation yield (16.33 AR/Et) and produced the highest concentration of alcohol (13.35% v/v). The strains EC1118, F9-5 and F6-7 presented similar fermentative vigor and were significantly superior to the other strains. In the sensory evaluation, the wine of strain F9-5 obtained a better score in its overall impression and was preferred by 47% of experts.

Keywords: native yeasts, selection, Torrontés Riojano

INTRODUCCIÓN

El vino blanco más importante de la Argentina para el mundo es el Torrontés Riojano, siendo la variedad blanca más cultivada en el Valle Calchaquí (88.38%) (1), con la particularidad que en esta región encuentra su mayor expresión en aroma y sabor (2). En la fermentación alcohólica (FA) las levaduras contribuyen a la complejidad de sabores de los vinos. La inoculación con levaduras nativas seleccionadas, además de resaltar características únicas de los vinos obtenidos, se encuentran mejor adaptadas a las condiciones climáticas de la zona y de la materia prima, y permiten un mayor control del proceso de vinificación. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue rescatar y seleccionar cepas de levaduras nativas del Valle Calchaquí para elaboración de vino Torrontés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante la vendimia 2015, se recolectaron uva Torrontés de 9 zonas diferentes del Valle Calchaquí salteño con alrededor de 23°Brix, para realizar fermentaciones espontaneas a escala de laboratorio. Las muestras fueron tomadas asépticamente y prensadas manualmente en bolsas estériles (6 L / unidad experimental). Se adicionó SO₂ (50mg/L), ácido tartárico (7.5 g/L) y Fermoplus Blanc (20 g/HL). Las fermentaciones se realizaron a 20°C y finalizando la FA (0°Bo ó δ 1000), se tomaron muestras de vino para el aislamiento de levaduras en agar WL. Se seleccionaron 3-8 colonias de levaduras por FA y se conservaron a -18°C en glicerol al 30%. Finalizada la FA, a las muestras de vino se les realizó el análisis químico y luego de 2 meses, el análisis sensorial.

Para la identificación presuntiva de las levaduras, se llevó a cabo una observación microscópica de las células y la morfología macroscópica de las colonias en medio WL (3). La identificación intraespecífica de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se realizó con un análisis del polimorfismo en el tamaño de secuencias *interdelta*. La amplificación de las regiones *interdelta* se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Legras y Karst (4). Se compararon los patrones moleculares de las cepas aisladas con las cepas comerciales más utilizadas en bodegas de la región, BDX (*S. cerevisiae*) y EC1118 (*S. bayanus*) y con un marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder.

La caracterización enológica de las cepas de *S. cerevisiae* se realizó en mosto semisintético (MS), con una concentración de azúcares de 230 g/L (MS 230) y también de 300g/L (MS300) (pH 3.6). Además, para estudiar la demanda de nitrógeno, a una parte del mosto se le adicionó 1% de extracto de levadura. Los tratamientos consistieron en: a) MS230 s/N₂ 25°C; b) MS230 c/N₂ 25°C; c) MS230 c/N₂ 15°C; d) MS300 c/N₂ 25°C (por duplicado/cepa). Las unidades experimentales fueron de 300 mL, se tinalizaron y se inocularon (10⁶UFC/mL). La FA fue monitoreada diariamente por pérdida de peso. A los vinos se les determinó etanol (Et), acidez volátil (AV) y azúcar reductor (AR), utilizando un equipo Wine analyser (ALPHASISTEM, Bruker). Se calcularon los principales parámetros de interés enológicos como lo indican Vázquez y col. (2000): eficiencia de fermentación (EF), velocidad (VeF, en CO₂/d) y vigor fermentativo (ViF). También se estudió el potencial genético de las cepas para producir ácido sulfhídrico siguiendo la metodología propuesta por Jiranek y col. (5).

Con las cepas de *S. cerevisiae* preseleccionadas se realizaron microvinificaciones. En la vendimia 2016 se recolectó uva Torrontés Riojano de la zona, se molió y prensó en condiciones de asepsia, y se realizó las correcciones correspondientes. Las unidades experimentales fueron de 6 L y se inocularon a razón de 2x10⁶UFC/mL (por triplicado). Las FA se llevaron a cabo a 20°C aproximadamente y fueron monitoreadas diariamente hasta rastros de azúcar. Al ir finalizando la FA, se realizó el muestreo para control de implantación. Finalizada la FA se estabilizó en cámara de frío a 15°C, se filtró y se embotelló para el análisis sensorial. Los diferentes análisis químicos de los mostos y los vinos se llevaron a cabo utilizando la metodología estándar de bodega (6).

Para el análisis organoléptico se aplicó un diseño estadístico balanceado para la presentación de copas. A los vinos elaborados en las microvinificaciones se aplicó la prueba “Diferencia con un control”, para determinar diferencias y cuantificarlas, entre las vinificaciones con levaduras nativas y una levadura comercial (referencia). Se utilizó una escala numérica de 0 a 10 (0: ninguna diferencia y 10: diferencia muy grande respecto al control). Tanto para las fermentaciones espontaneas como a las microvinificaciones, se les realizó un análisis descriptivo estructurado por evaluadores enólogos de la zona, sobre sensaciones visuales, olfativas y gustativas. La intensidad de cada descriptor se evaluó del 0 al 3 (ausencia a mucha intensidad). También se evaluó la impresión global de los vinos, y se discriminó en alta, media o baja, para las fermentaciones espontaneas. Y para las microvinificaciones, se categorizó en vino defectuoso, mediocre, bueno, muy bueno, gran vino, o excepcional. Posteriormente, se indagó sobre la preferencia de las muestras, en un orden de mayor a menor. Los resultados de la prueba de preferencia se analizaron con el test de Friedman (7) y con el test de Kramer (8)

Los análisis estadísticos se realizaron con el software InfoStat (9). Se aplicó Análisis de Varianza (ANOVA) de los datos y se utilizó el Test LSD Fisher para detectar diferencias significativas (p≤0.05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el aislamiento de levaduras nativas, se seleccionaron 9 zonas geográficas, en base a diferentes factores que *a priori* pudieran influenciar la flora microbiana natural de los viñedos. Se buscaron viñedos que se encontraran lejos de los efluentes de bodega para evitar una posible contaminación con levaduras comerciales (10). También se tuvo en cuenta la antigüedad de las viñas y el manejo del cultivo, prefiriendo las más antiguas y con manejo orgánico o agroecológico. Durante la vendimia 2015, se realizó la cosecha de uva Torrontés de cada viñedo seleccionado. Se trató que la uva tuviera similar grado de madurez (23°Brix). Se realizaron las fermentaciones espontaneas a escala de laboratorio (F1-F9) con una temperatura promedio de 20°C, y demoraron en finalizar entre 13 y 33 días, con distinta cinética para cada FA. Dos de las fermentaciones (F1 y F2), pararon a los 11 días, dejando cantidades considerables de azúcar (Tabla 1).

Tabla 1. Características químicas de las fermentaciones espontaneas

Nombre	°Brix inicial	Día final FA	VeF	Parámetros químicos			
				Et	AR	AT	AV
F1	23.2	11	0.011	7.1	118.68	6.11	0.70
F2	24.5	11	0.008	6.7	121.89	6.79	0.65
F3	19.5	25	0.004	12.2	1.00	8.9	0.82
F4	23.8	33	0.013	14.3	1.69	6.67	0.68
F5	20.7	18	0.017	12.2	1.20	6.22	0.34
F6	26	29	0.017	15.9	1.00	7.12	0.56
F7	22.6	14	0.020	12.8	1.06	9.77	0.56
F8	21	13	0.015	11.8	1.24	5.25	0.33
F9	24.2	23	0.020	14.6	1.00	7.09	0.49

Las fermentaciones de mayor velocidad fueron F9, F7, F6 y F5; y las que presentaron mayor concentración de etanol al final de la FA fueron F6, F9 y F4, que a la vez fueron muy eficientes en la transformación de azúcar a etanol. La fermentación F3, a pesar de tener una cinética de fermentación muy baja, lo hizo muy eficientemente ya que con bajo nivel del azúcar inicial produjo una cantidad considerable de etanol, dejando rastros de azúcar residual. Estas diferencias pueden ser atribuidas a las diferencias en la población inicial de levaduras nativas en cada mosto y a las capacidades de cada levadura para realizar la FA.

En una experiencia preliminar, se realizó la degustación de las fermentaciones espontaneas para elegir con cuales continuar la selección de las levaduras nativas. Se cuantificaron descriptores considerados críticos en la vinificación de Torrontés, tales como presencia de aromas frutados y cítricos; moderada sensación gustativa ácida y amarga; además de la ausencia de aromas volátiles indeseables (Fig. 1).

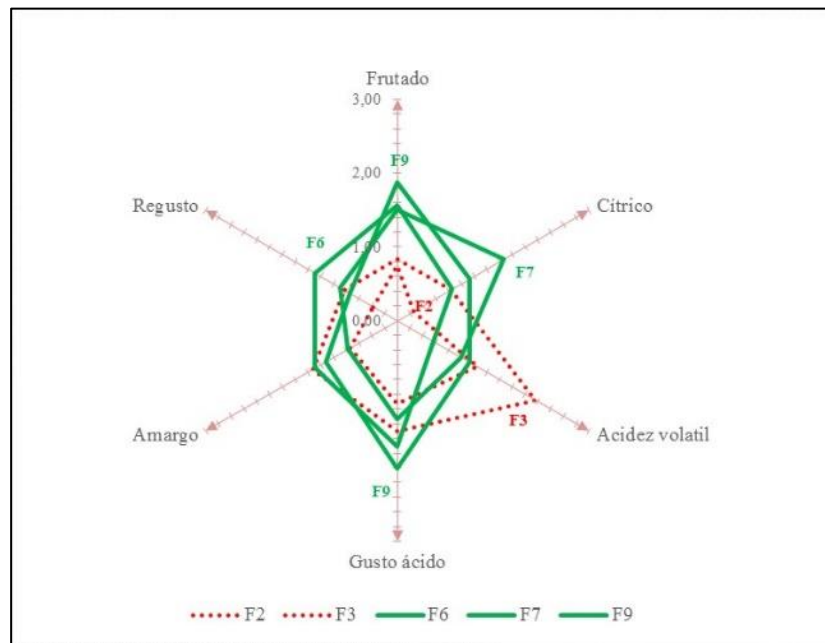


Figura 1. Análisis descriptivo estructurado de las fermentaciones espontaneas.

La evaluación contemplaba también la impresión global de los vinos obtenidos, valoradas en alta, media o baja (Fig. 2). Esta evaluación nos permitió descartar las fermentaciones menos favorables (F3, F4, F5 y F8) y continuar el estudio con las que dieron características deseables: F6, F7 y F9.

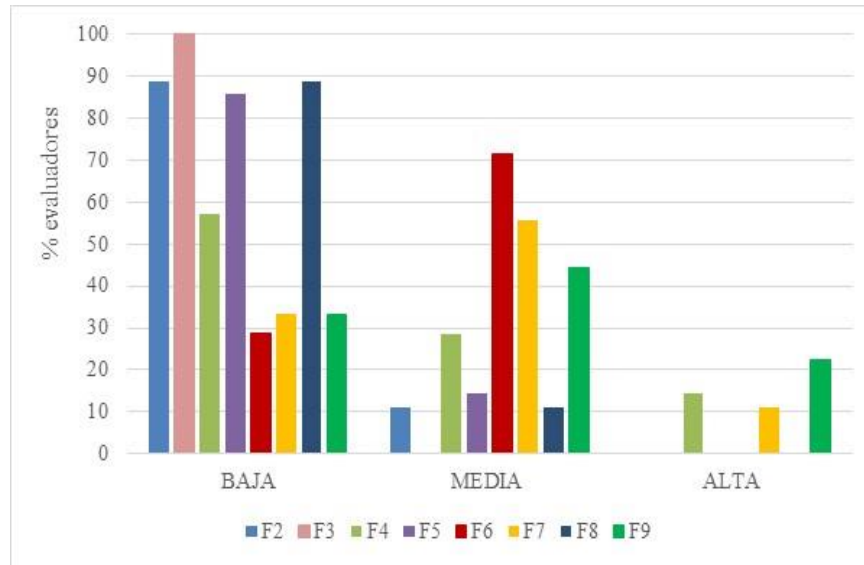


Figura 2. Impresión global de los vinos

De las 45 cepas de levaduras aisladas, se continuó trabajando con 15 aislamientos provenientes de F6: 6 aislamientos (F6-2, F6-3, F6-4, F6-5, F6-6 y F6-7); de F7: 3 levaduras (F7-1, F7-2 y F7-3); y F9: 6 aislamientos (F9-1, F9-2, F9-3, F9-4, F9-5 y F9-6). A estos aislamientos se les realizó una caracterización macroscópica de las colonias en agar WL y la observación microscópica de la morfología celular y se identificaron presuntivamente como *Saccharomyces spp.*

Se realizó la identificación intraespecífica de 13 cepas nativas y 2 comerciales por amplificación de sus secuencias *interdelta*, específica para *S. cerevisiae*. Como se observa en la Figura 3, de quince cepas analizadas, se obtuvieron 8 patrones moleculares distintos. El patrón I corresponde a la cepa F6-2; el patrón II tuvo cuatro cepas idénticas, F6-3, F6-5 (no mostrado (NM) en fig. 3), F6-6 y F7-1. El patrón III fue de la cepa F6-4 sola y el IV de la F6-7. De las seis cepas aisladas durante la fermentación espontánea F9, 3 de ellas presentaron el patrón idéntico V (F9-2, F9-3 y F9-4); otras dos presentaron el patrón VI (F9-5 y F9-6); y en el caso de la cepa F9-1, no amplificó la secuencia *interdelta* en reiteradas ocasiones, podría no pertenecer al grupo *S. cerevisiae*. Los patrones VII y VIII, corresponden a dos cepas comerciales controles y de uso frecuente en bodegas de la región.

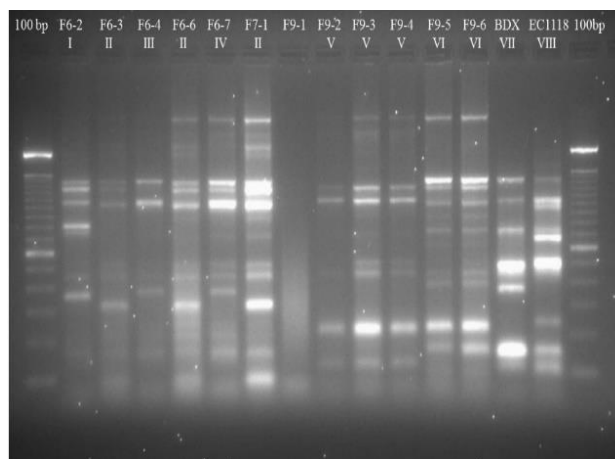


Figura 3. Patrones moleculares

de secuencias *interdelta*

Los resultados muestran que una misma cepa pudo ser aislada más de una vez en la misma fermentación, y a la vez, también hubo aislamientos de cepas diferentes. En el caso de la cepa F7-1, que pertenece al patrón II, junto con cepas aisladas de la F6, sería conveniente repetir este ensayo nuevamente, junto a otras dos cepas más aisladas de la F7, para descartar una contaminación cruzada, dado que la uva de F6 y F7 provienen de lugares geográficos muy distantes, y, por lo tanto, es poco probable que presenten la misma flora nativa.

Se caracterizó enológico 4 cepas nativas con patrones moleculares diferentes y se utilizaron dos cepas comerciales como control, BDX y EC1118. Para ello se evaluaron los diferentes parámetros fermentativos en mosto semisintético. Los resultados de los análisis químicos y de los principales parámetros de interés enológico de las fermentaciones a 25 °C y con suplemento nutritivo (MS230 c/N₂ 25 °C) se observan en la Tabla 2.

Tabla 2. Caracterización enológica a escala de laboratorio

Cepas	Análisis químicos			Parámetros Fermentativos		
	Et	AR	AV	VeF	EF	ViF
BDX	^a 10.45±1.77	^{ab} 18.77±15.39	^b 1.19±0.05	^b 1.81±0.02	^b 20.03±1.92	^a 10.30±0.00
EC1118	^{ab} 11.40±0.28	^a 5.23±0.18	^a 1.04±0.02	^{bc} 1.99±0.00	^b 19.41±0.50	^b 11.95±0.21
F6-4	^a 10.80±0.99	^{ab} 21.28±14.81	^{ab} 1.09±0.00	^b 1.72±0.15	^b 19.01±0.37	^a 10.20±0.99
F6-7	^a 10.60±0.28	^{ab} 17.82±2.33	^{ab} 1.12±0.10	^b 1.93±0.13	^b 19.68±0.31	^{ab} 10.95±1.06
F9-3	^a 9.75±0.64	^b 31.17±1.98	^a 1.03±0.06	^c 2.38±0.12	^b 20.06±1.11	^a 10.45±0.07
F9-5	^b 13.35±0.21	^a 8.42±2.98	^a 1.03±0.01	^a 1.28±0.00	^a 16.33±0.04	^{ab} 11.20±0.14
<i>p-value</i>	0.06	0.18	0.11	0.013	0.0485	0.15

En base a los parámetros estudiados, se observó que la cepa nativa F9-5 tiene un buen potencial para realizar la vinificación de Torrontés, ya que, aunque presenta una VeF menor, tuvo un rendimiento significativamente mayor (EF 16.33) al de las demás cepas estudiadas. Con una misma cantidad de azúcar, produjo la mayor cantidad de etanol (Et 13.35%). Además, cuando se estudió la tolerancia a situaciones de estrés en un medio con alta concentración de azúcar (MS300 c/N₂ 25 °C), si bien la levadura F9-5 presentó similar vigor fermentativo que las cepas EC1118 y F6-7, el mismo, fue significativamente superior al del resto de las levaduras estudiadas. Por otra parte, el ensayo realizado con el mosto sintético MS230 s/N₂, muestra que todas las cepas estudiadas tienen requerimientos nutricionales de nitrógeno ya que ninguna pudo crecer en ese medio a 25°C (NM). En el tratamiento que se realizó a baja temperatura en MS230 c/N₂ (15 °C), no se observan diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de fermentación entre las cepas estudiadas. Por otro lado, aunque todas las cepas fermentaron a menor velocidad que a 25 °C, lo hicieron de forma más eficiente ya que produjeron en promedio una concentración de etanol significativamente mayor que a 25 °C (NM). Además, se observó que F6-4 y F6-7 no son

productoras de H₂S, sus colonias en el medio son blancas. La cepa F9-3 es una escasa productora de H₂S (marrón claro). La cepa comercial BDX y la nativa F9-5 presentaron bajo nivel de producción de H₂S (marrón). Por lo tanto, estas cepas podrían utilizarse y no causarían defecto sulfhídrico en los vinos obtenidos.

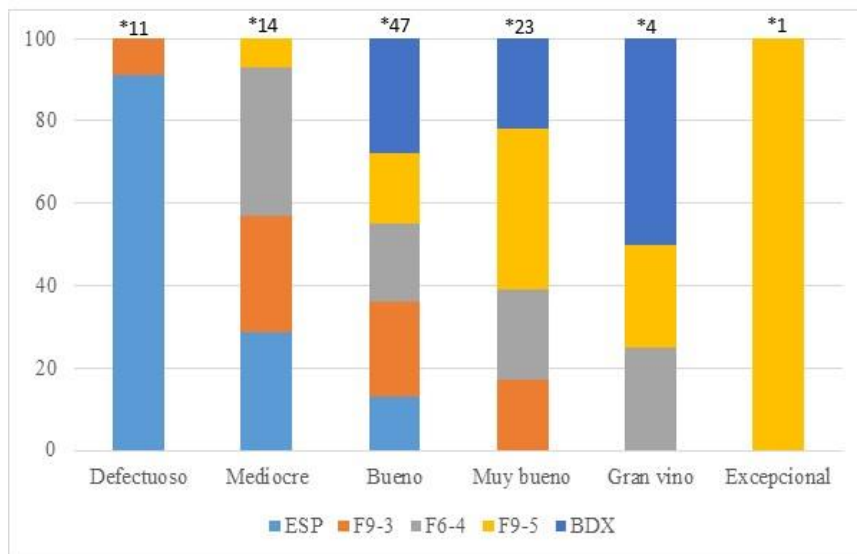
Se preseleccionaron 3 cepas nativas para evaluar su capacidad de vinificación de uva ttorrontés. Para este fin, en la vendimia 2016, se inoculó mosto a escala de laboratorio (6L) con las cepas F6-4, F9-3 y F9-5, una cepa comercial de referencia (BDX) y también se realizó una fermentación espontánea del mosto. Las fermentaciones se realizaron a 20.2±1.9°C, y terminaron a los 21 días desde la inoculación con las levaduras. Estadísticamente las cepas ensayadas no mostraron diferencias en VeF (0.010±0.001) y presentaron similar EF (16.6±0.5) y alcanzaron una concentración promedio de Et de 13.5±0.4%. El resultado de la prueba sensorial de diferencia con el control se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Prueba sensorial de diferencias contra un control

Muestra	Diferencia con el control (Medias)
F9-3	2.67 ^a
F9-5	0.86 ^{ab}
F6-4	0.50 ^b
BDX	0.00 ^b

Al comparar las medias, se determinó que la cepa F9-3 presenta una diferencia significativa pero leve a moderada respecto al control y las otras cepas estudiadas no difieren. Respecto a la impresión global, la mayoría de los juicios de enólogos expertos (47+23) categorizaron como “buenos” y “muy buenos” a las vinificaciones BDX y F9-5, en mayor proporción (Fig. 4) y esta última (F9-5) obtuvo una calificación de “vino excepcional” por uno de los evaluadores. En relación al ordenamiento de preferencia, el panel encontró diferencias significativas entre la vinificación espontánea, comparadas con las otras microvinificaciones (F6-4, F9-3, F9-5 y BDX) y según el test de Kramer, F9-5 fue el vino más aceptado y el preferido del 47% de los evaluadores; F6-4, F9-3 y BDX, fueron medianamente aceptado, mientras que ESP fue la menos aceptada (89%) (dato no mostrado).

Figura 4. Impresión global de las microvinificaciones.



* número de juicios

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se creó una colección de levaduras autóctonas del Valle Calchaquí salteño para vinificación de vino blanco Torrontés, las cuales fueron evaluadas por diferentes parámetros enológicos. Algunas de estas levaduras pudieron expresar las características propias de la variedad y del *terroir* del valle, además de presentar una FA rápida y uniforme, con consumo total de azúcar

y buena producción de etanol, por lo que fueron seleccionadas. El uso de las mismas por elaboradores de vino de la región, permitiría obtener vinos de calidad homogénea, diferenciada, y con repetitividad. Se evitarían problemas de arranque, ralentización o paradas de fermentación, ya que las mismas se encuentran aclimatadas a condiciones locales del viñedo y del mosto a fermentar, por lo que tienen ventajas competitivas respecto a otros microorganismos. Es necesario continuar con el estudio de la capacidad de vinificación de las levaduras nativas seleccionadas a escala piloto y su aptitud de escalado, para disponer de las mismas en mayores cantidades.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración con este trabajo a la Delegación Cafayate del INV, a enólogos de las Bodegas del Valle Calchaquí salteño, y a los productores que brindaron su uva desinteresadamente. Agradecemos el financiamiento de las investigaciones llevadas a cabo al Proyecto específico PNAIyAV1130043 “Estrategias de Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios” del PN de Agroindustria y Agregado de Valor del INTA.

REFERENCIAS

1. Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2014). La viticultura de la región Noroeste de Argentina. Mendoza, Argentina. http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/estadisticas/vinos/regiones/Informe_RegionNoroeste.pdf.
2. Jofre V., Assof M. V., Fanzone M.L. (2013). Composición química de vinos Torrontés riojanos provenientes de diferentes regiones agroecológicas de Argentina. Proc. Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. Tarija, Bolivia. 59.
3. Pallmann C., Brown J.A., Olineka T.L., Cocolin L., Mills D., Bisson L. (2001). Use of WL medium to profile native flora fermentations. American Journal of Enology and Viticulture, 52 198-203.
4. Legras J.-L., Karst F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. FEMS, 221 249-255.
5. Jiranek V., Langridge P., Henschke P.A. (1995). Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H2S-producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts under enological conditions. American Journal of Enology and Viticulture, 46 (2) 269-273.
6. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV). (2005). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, París, Francia.
7. Newel G.J., Mac Farlane J.D. (1987). Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. Journal of Food Science, 52 1721.
8. Kramer A. (1960). A rapid method for determining significance differences from rank sums. Food Technology, 14 576.
9. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
10. Combina M., Elia A., Mercado L., Catania C., Gangac A., Martinez C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. International Journal of Food Microbiology, 99 237–243.

PROYECTO ESPECÍFICO

Estrategias para la diferenciación de alimentos y el desarrollo de nuevos productos alimentarios.

PROYECTO INTEGRADOR Optimización de calidad integral y otras estrategias de agregado de valor.

UTILIZACIÓN DE PÉTALOS DE ROSA COMO INSUMO EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

J. Gabilondo¹, L.I. Schelegueda^{3,4}; C.A. Campos^{3,4}; F. Carduzz²; L.E. Langman²; T. Soterias²; L. Arroyo¹; G. Corbino¹

¹Estación Experimental Agropecuaria (EEA) San Pedro – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

²Instituto de Alimentos (ITA). Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. INTA.

³Departamento de Industrias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

⁴CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Correo Electrónico: corbino.graciela@inta.gob.ar

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo fueron: i) determinar el contenido de fenoles totales (FT), las actividades antioxidantes (AA) y antimicrobiana en pétalos de diversas variedades de la zona; ii) evaluar la aceptabilidad sensorial de infusiones obtenidas con pétalos de las mismas variedades; y iii) determinar el contenido de FT y AA de las infusiones evaluadas. Las variedades evaluadas fueron *Kardinal* (K), *Gran Gala* (GG), *Cristóbal Colón* (CC); *Bella época* (BE) y *King Rawson* (KR). Las variedades K y GG presentaron mayor contenido de FT y AA con diferencias significativas ($p < 0.05$) al resto. Estas también mostraron capacidad para inhibir el crecimiento de *Zygosaccharomyces balli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Shewanella putrefaciens* K, además, fue efectiva frente a *Listeria innocua*. Las infusiones de K, BE y CC mostraron una mayor aceptabilidad global ($p < 0.05$) mientras que la infusión de KR fue la de menor aceptabilidad. En cuanto a la puntuación por atributos, no hubo diferencias significativas en el olor de todas las infusiones evaluadas pero sí en color, siendo GG y K las de mayor puntuación; y en sabor, KR presentó la menor aceptabilidad. Las infusiones elaboradas con GG y K fueron las de mayor AA y FT, incluso con diferencias significativas al té verde.

Palabras clave: flores comestibles, antioxidantes, infusiones, actividad antimicrobiana

ABSTRACT

The objectives of this study were: i) to determine the content of total phenols (TP), the antioxidant (AA) and antimicrobial activities in fresh petals of different varieties of the area; ii) to evaluate the sensory acceptability of infusions obtained with dried petals of the same varieties; and iii) to determine the content of TP and AA in infusions evaluated. Evaluated varieties were *Kardinal* (K), *Gran Gala* (GG), *Cristóbal Colón* (CC); *Bella Epoca* (BE) and *King Rawson* (KR). K and GG presented higher content of TP and AA with significant differences ($p < 0.05$) from the rest. These also showed ability to inhibit the growth of *Zygosaccharomyces Balli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Shewanella putrefaciens*. K also was effective against *Listeria innocua*. Infusions of K, BE and CC showed greater global acceptability ($p < 0.05$) while KR infusion exhibited lower acceptability. Regarding the score for attributes, there were no significant differences in the odor of all infusions evaluated but the color showed significant differences being GG and K the ones with the highest score. KR presented the lower acceptability in taste. Infusions made with GG and K showed the higher values in AA and TP, even with significant differences to green tea.

Keywords: edible flowers, antioxidants, infusions, antimicrobial activity

INTRODUCCIÓN

En San Pedro, provincia de Buenos Aires, el cultivo de rosas es una actividad característica dentro del sistema de producción de plantas de vivero. Se cultivan alrededor de 150 hectáreas, que representan aproximadamente el 16% de la superficie destinada a vivero en el área, distribuidas en más de 100 viveros de diferentes estratos productivos y sociales, con una producción anual estimada de 1 millón de plantas comerciales (1). Estas especies se venden bajo la modalidad de planta ornamental en maceta o a raíz desnuda. Durante su período de producción, hasta obtener un tamaño comercial, se producen varias floraciones, dejando el material secarse a campo. Las flores descartadas podrían ser aprovechadas en la industria alimentaria. Diversas flores, como las amapolas, rosas, claveles, azahares, crisantemos, malvas, pensamientos, jazmín, gladiolos, salvia o violetas se utilizan desde tiempos remotos en la preparación de alimentos. Las flores comestibles suelen utilizarse en infusiones, tortas, ensaladas, postres, bebidas e innumerables comidas (2, 3). En países como China, México y Brasil han mantenido estos condimentos en la cocina tradicional, por sus cualidades medicinales y propiedades saludables (4). Debido a que la mayoría de las flores de estas especies, presentan colores intensos y atractivos, agregarían valor *per se*, en estos alimentos, además de aportar nutrientes, vitaminas y compuestos bioactivos como ácidos fenólicos, antocianinas y carotenoides. Estos últimos poseen actividad antioxidante y están asociados a un impacto positivo en la salud humana por contrarrestar los efectos del estrés oxidativo. Además, estos ejercen un amplio rango de actividades biológicas como antimicrobianos, anti-inflamatorios,

antisépticos, inmuno-supresivos y actividad pre biótica entre otras (5, 6, 7, 8). Además sólo pueden ser obtenidos de la dieta ya que no son sintetizados por el organismo.

Los objetivos del presente trabajo fueron: determinar el contenido de fenoles totales (FT), las actividades antioxidante (AA) y antimicrobiana en pétalos de distintas variedades de rosa - *Kardinal (K)*, *Gran Gala (GG)*, *Cristóbal Colón (CC)*; *Bella época (BE)* y *King Rawson (KR)* - ; y evaluar la aceptabilidad sensorial, la AA y el contenido de FT de infusiones obtenidas con pétalos secos de las mismas variedades.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras vegetales frescas: Se trabajó con cinco variedades de rosa híbridas de té, de distinto color de pétalo. Las variedades utilizadas fueron *Bella Época* (Color rosa), *King Rawson* (Color amarillo), *Kardinal* (Color rojo brillante), *Gran Gala* (Color rojo oscuro) y *Cristóbal Colón* (Color naranja). Se tomaron muestras de flores abiertas de 3 cosechas por cultivar. Se separaron los pétalos y se congelaron en nitrógeno líquido. Las muestras congeladas fueron liofilizadas, trituradas y almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Preparación de los extractos etanólicos

Cada muestra liofilizada (aprox. 0,5 g) se mezcló con etanol 96° durante 30 minutos en agitación a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se almacenó a $4 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 hs. El sobrenadante se separó por centrifugación, 10 minutos a 6000 rpm y $4 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se pasó a un tubo estéril. Luego, se utilizó para la determinación de la actividad antimicrobiana, la AA y el contenido de FT.

Muestras vegetales deshidratadas: Se trabajó con las variedades mencionadas anteriormente: *Bella Época*, *King Rawson*, *Kardinal*, *Gran Gala* y *Cristóbal Colón*. Se realizaron cosechas semanales de flores abiertas durante toda la campaña (Octubre 2014 - marzo 2015). Se separaron los pétalos y se secaron sobre camastros en cámara $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ con corriente de aire. Se mantuvieron allí hasta que su textura fuera quebradiza y luego se almacenaron a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la elaboración del té.

Preparación de las infusiones

Las infusiones se prepararon siguiendo la metodología de Vanderjagta *et al.* (9) con algunas modificaciones. En vasos de precipitado se colocaron 20 g de pétalos secos por litro de agua filtrada a $80 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, manteniéndose la temperatura en baño termostático con agitación suave por 10 minutos y luego se filtraron los pétalos. Las infusiones se utilizaron para el análisis de aceptabilidad del consumidor y las determinaciones de AA y contenido de FT.

Métodos analíticos

Humedad

Se determinó por secado de la muestra en estufa a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 hs (10).

Determinación de fenoles totales

Se empleó el reactivo de Folin-Ciocalteu de acuerdo al método de Singleton y Rossi (11) con algunas modificaciones, utilizando ácido clorogénico como estándar. A 250 μL de extracto se le agregaron 4 ml de agua destilada y 250 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego de 3 minutos, se incorporaron 500 μL de Na_2CO_3 1N, se mantuvo 120 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 25. La curva estándar se realizó utilizando concentraciones de ácido clorogénico desde 75 hasta 400 mg/L. El contenido total de polifenoles se informó como mg de ácido clorogénico por g base seca (bs). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Determinación de la actividad antioxidante

Cada extracto se analizó por triplicado mediante la reducción del radical DPPH· de acuerdo al método de Brand-Williams *et al.* (12). A 400 μl de extracto se le agregaron 3,6 ml de DPPH· 0,1 mM, se mantuvo en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 25. La AA se calculó usando una curva estándar con concentraciones de TROLOX desde 20 μM hasta 450 μM . Los resultados se expresaron como mg equivalentes TROLOX por g bs.

Determinación de la actividad antimicrobiana

Se evaluó la posible acción de los extractos para inhibir el desarrollo de microorganismos de colección que se asocian al deterioro de alimentos (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Shewanella putrefaciens* ATCC 8071, *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256) y de *Listeria innocua* ATCC 33090 como alternativa al patógeno *Listeria monocytogenes*. La actividad antimicrobiana de los extractos se determinó mediante el método de difusión en agar. Para ello, se inculó agar al 1,2% con 10^6 UFC/ml de los cultivos indicadores. En el caso de las bacterias se utilizó agar Mueller Hinton y en el de *Z. bailii*, agar Sabouraud. Se vertieron 20 ml del agar inoculado en placas de Petri. Cuando el agar estuvo solidificado, se formaron pocillos de 6 mm de diámetro, utilizando un sacabocados. Se colocaron 50 μl de extracto en cada pocillo. Las placas se incubaron a $4 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas para facilitar la difusión en el agar y luego a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. En un pocillo se colocó etanol, para descartar su posible acción inhibitoria. Luego de la incubación se midió el diámetro de los halos de inhibición. Una vez verificada la acción antimicrobiana de los extractos, se procedió a determinar los títulos de los mismos, para ello, se repitió el procedimiento previamente descripto, sembrando en los pocillos sucesivas diluciones de los extractos.

Evaluación de la aceptabilidad del consumidor

El ensayo de aceptabilidad se realizó en el mes de marzo de 2015. Se reclutaron 100 personas que asiduamente bebieran infusiones, representadas por hombres y mujeres en un rango de edad entre 18 y 60 años, de distintos Institutos de Investigación del INTA Castelar. Con el objetivo de evaluar sólo la preferencia de las infusiones entre cultivares, no se ofreció ningún edulcorante ni alimento. Se entregó cada una de las variedades de té en un vaso térmico con tapa conteniendo aprox. 25 ml de infusión. Las muestras fueron entregadas a los evaluadores en orden aleatorio codificadas con números de tres dígitos al azar. Se evaluaron color, olor, sabor y aceptabilidad global

utilizando para cada caso una escala hedónica lineal no estructurada con tres anclas (me disgusta extremadamente, no me gusta ni me disgusta y me gusta extremadamente) (13).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos experimentales se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias se efectuó mediante prueba DGC utilizando el programa InfoStat versión 2013.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pétalos frescos

Fenoles totales:

En la Figura 1 puede observarse el contenido de FT en pétalos frescos de las variedades de rosa: *King Rawson*, *Bella Época*, *Cristóbal Colón*, *Gran Gala* y *Kardinal*. Del mismo modo que lo hallado en las infusiones, *Gran Gala* y *Kardinal* presentaron los mayores ($p < 0,05$) valores siendo 49,9 y 52,5 mg ácido clorogénico / g bs respectivamente. *Bella Época* y *Cristóbal Colón* no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre sí hallándose 19,8 y 20,4 mg ácido clorogénico / g bs respectivamente. *King Rawson* fue la variedad de menor contenido (15,8 mg ácido clorogénico / g bs). Algunos investigadores, en china, analizaron el contenido de fenoles totales de 10 especies diferentes de flores comestibles y los resultados indicaron que éstas son una muy buena fuente de compuestos fenólicos (14). Por otro lado, Li *et al.* (15) evaluaron también los fenoles totales de 51 especies de flores silvestres y comestibles y hallaron que *rosa híbrida* fue la que presentó el mayor contenido de estos compuestos.

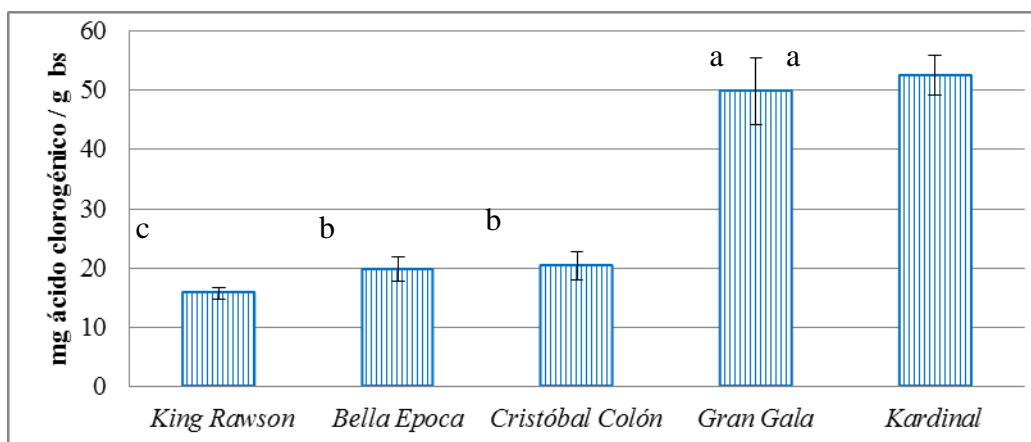


Figura 1. Contenido de fenoles totales en pétalos frescos de distintas variedades de rosa. (Resultados expresados en mg ácido clorogénico / g bs). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Actividad antioxidante

En la Figura 2 se muestra la actividad antioxidante de las variedades *King Rawson*, *Bella Época*, *Cristóbal Colón*, *Gran Gala* y *Kardinal*. Las variedades de mayor actividad antioxidante fueron *Gran Gala* (56,0 mg TROLOX / g bs) y *Kardinal* (54,9 mg TROLOX / g bs), ambas de pétalos color rojo, sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre sí. Le siguen, aunque con valores muy inferiores a las anteriores, *Cristóbal Colón* (27,8 mg TROLOX / g bs), *Bella época* (24,7 mg TROLOX / g bs) y *King Rawson* (11,9 mg TROLOX / g bs). Del mismo modo que lo hallado en este trabajo, Benvenuti *et. al* (16) reportaron que las flores comestibles de color rojo son asociadas a altos valores de AA y aquellas de colores claros como el blanco y amarillo, a baja AA. Otros estudios han reportado que extractos metanólicos de *Rosa chinensis* exhibieron altos niveles de AA y aproximadamente cincuenta veces más que los extractos de tomate, brócoli, o de manzana (17) y más que en otras plantas medicinales (18). A su vez, Friedman *et al* (19) destacó la importancia de la AA en flores de begonia, rosas y jazmín.

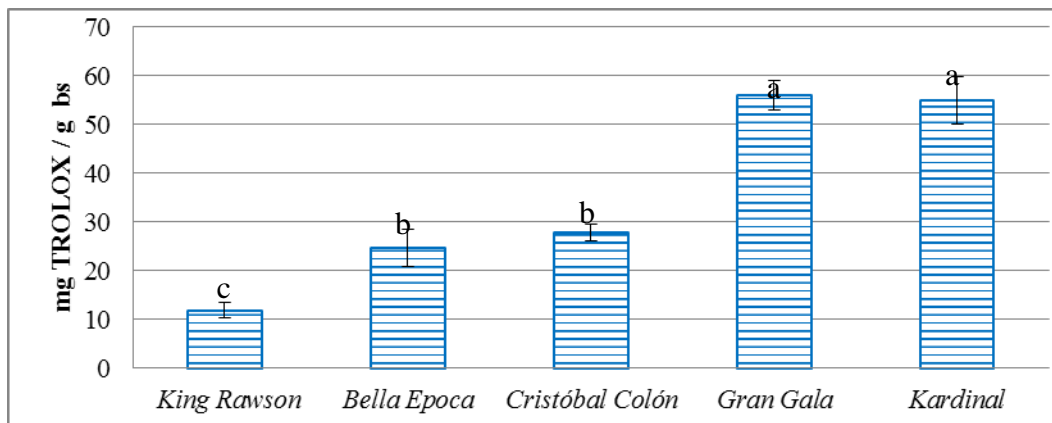


Figura 2. Actividad antioxidante en pétalos frescos de distintas variedades de rosas. (Resultados expresados como mg TROLOX / g bs). Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

Correlación entre el contenido de FT y la AA de los pétalos frescos

En la Figura 3 puede observarse la correlación entre el contenido de FT y la AA de los pétalos frescos evaluados. Se halló una alta correlación ($R^2= 0,885$) entre el contenido de FT y la AA de las muestras analizadas. Del mismo modo que lo observado en las infusiones, estos resultados indicarían que los compuestos fenólicos presentes en las variedades de rosa evaluadas poseen una fuerte contribución a la actividad antioxidante de las mismas. Nuestros resultados están en concordancia con Kaisoon *et al* (20) quienes hallaron una fuerte correlación de estos compuestos en distintas flores comestibles.

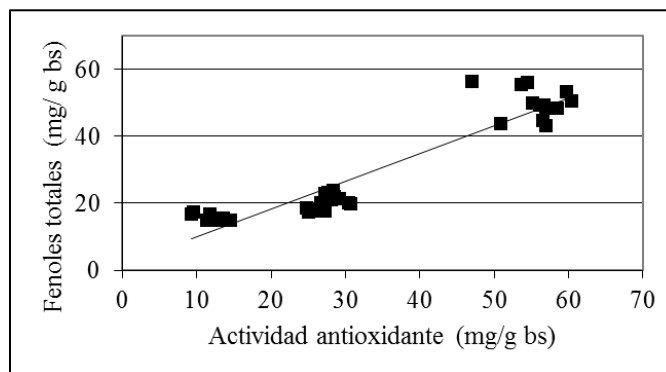


Figura 3. Correlación entre la AA y el contenido de FT de los pétalos frescos.

Actividad antimicrobiana

De los extractos evaluados, las variedades *Kardinal* y *Gran Gala*, ambas de pétalos rojos, mostraron acción antimicrobiana sobre todos los indicadores evaluados. Se pudo verificar que el etanol no ejerció acción inhibitoria. En la Tabla 1 se detallan los resultados obtenidos, puede apreciarse que la variedad *Kardinal* presenta mayor actividad que *Gran Gala*. Es de destacar que ambas variedades son la que presentaron mayor contenido de polifenoles y actividad antioxidante. Esta tendencia es coincidente con la reportada en bibliografía (21).

Tabla 1. Diámetros de los halos de inhibición (mm) obtenidos en la determinación de los títulos de los extractos

Cepa indicadora / Diluciones	<i>Kardinal</i>				<i>Gran Gala</i>			
	1	1/2	1/4	1/8	1	1/2	1/4	1/8
<i>Z. bailli</i>	11	10	10	---	11	9	---	---
<i>Ps. aeruginosa</i>	10,5	9	8,5	---	11,5	10,5	---	---
<i>L. innocua</i>	13	11,5	---	---	---	---	---	---
<i>S. putrefaciens</i>	15,5	13	9,5	---	14	11,5	9	---

---no se detecta actividad antimicrobiana

Pétalos deshidratados

Evaluación de la aceptabilidad sensorial de infusiones

En la Figura 4 se observan los resultados de las evaluaciones de color, olor, sabor y aceptabilidad global para las cinco infusiones elaboradas con pétalos de rosa de las variedades *King Rawson*, *Kardinal*, *Bella época*, *Gran Gala* y *Cristóbal Colón*.

Las infusiones pertenecientes a las variedades *Kardinal*, *Bella época*, *Gran Gala* y *Cristóbal Colón* mostraron una aceptabilidad general con valores superiores a 5.

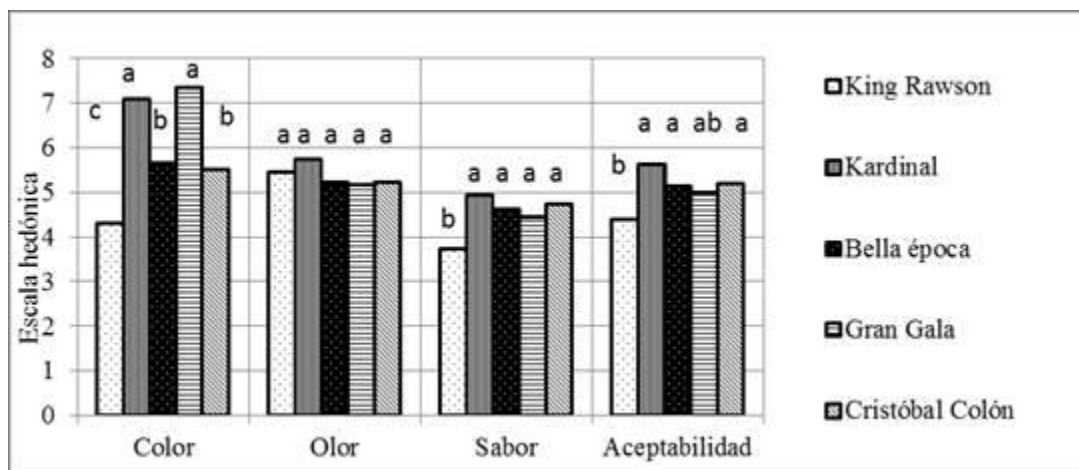


Figura 4. Evaluación de aceptabilidad sensorial de infusiones elaboradas con pétalos de distintas variedades de rosa. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05)

En cuanto a la aceptabilidad por atributos, como se observa en la Figura 1, se hallaron diferencias significativas entre las distintas variedades en las evaluaciones de color y sabor (p<0,05) mientras que para el atributo olor todas las infusiones presentaron valores cercanos a 5 sin diferencias significativas entre sí (p>0,05). Las mayores puntuaciones se observaron para el atributo color, siendo *Kardinal* y *Gran Gala* las de mayor aceptabilidad. En cambio, para el atributo sabor, se presentaron los menores valores de aceptabilidad y *King Rawson* fue el valor más bajo y significativamente diferente al resto. Un aspecto a destacar es que, en el promedio de las pruebas realizadas, ninguna infusión recibió la puntuación equivalente a “me disgusta extremadamente”.

Fenoles totales en infusiones:

En la Figura 5 se muestra el contenido de FT de las infusiones de rosa junto a dos téis comerciales: negro y verde. Las infusiones elaboradas con los pétalos de rosa *Kardinal* y *Gran Gala* presentaron los mayores contenidos (p < 0,05) en FT (55,1 y 48,5 mg ácido clorogénico/g bs respectivamente) incluso más elevados que el té verde (34,8 mg ácido clorogénico / g bs). *King Rawson* y *Cristóbal Colón* fueron las variedades con menor contenido de FT (29,1 y 29,2 mg ácido clorogénico/g bs respectivamente) aunque sin diferencias significativas con el té negro (p > 0,05). El alto contenido de fenoles totales en las variedades de pétalos de color rojo está asociado a una mayor concentración de compuestos fenólicos: antocianinas (3). Por otro lado, los pétalos de color amarillo y naranja están vinculados al contenido de compuestos antioxidantes no fenólicos: los carotenoides. Altos contenidos de luteína se han hallado en variedades de flores color naranja (22).

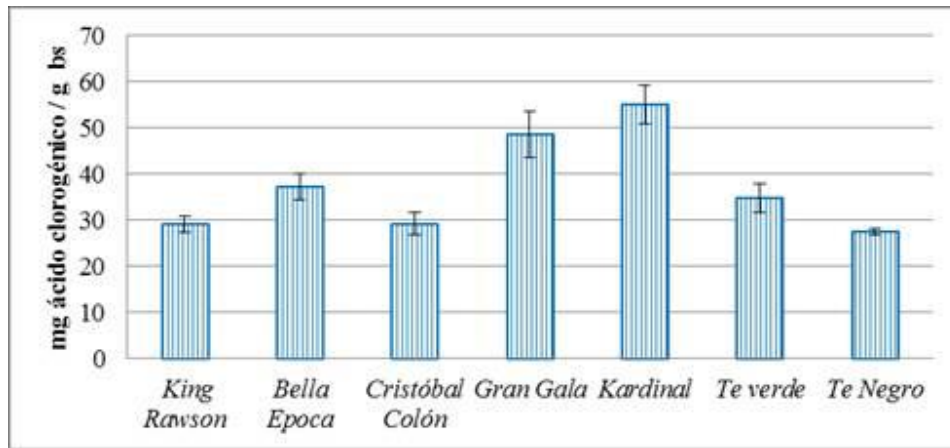


Figura 5. Contenido de fenoles totales en infusiones elaboradas con distintas variedades de rosa. (Resultados expresados en mg ácido clorogénico / g bs). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Actividad antioxidante en infusiones

En la Figura 6 se observa la AA de las infusiones de rosa junto a dos té comerciales: té negro y té verde. Estos té pertenecen al grupo de estimulantes que son importantes para la salud debido a su elevada actividad antioxidante (3). Al igual que lo observado en el contenido de FT, las infusiones elaboradas con los pétalos de rosa *Gran Gala* y *Kardinal* presentaron mayor ($p < 0,05$) AA (59,9; 63,1 mg TROLOX/ g bs respectivamente) que el té verde (56,6 mg TROLOX/ g bs) y el té negro (37,8 mg TROLOX/ g bs). *King Rawson* (33,1 mg TROLOX/ g bs) fue la única variedad en la que se observó una AA inferior ($p < 0,05$) a los té comerciales. Vinokur *et al.* (23) evaluaron la AA de infusiones elaboradas con distintas variedades de rosa y, al igual que en el presente estudio, las infusiones elaboradas con pétalos color rojo presentaron mayor AA que el té verde y aquellas elaboradas con pétalos de color amarillo fueron las únicas infusiones en las que la AA fue menor al contenido hallado en té comerciales. Del mismo modo que lo reportado por estos autores, la AA de la mayoría de las infusiones presentó un patrón similar al contenido de FT. Las infusiones elaboradas con flores comestibles presentan una ventaja nutricional con respecto a los té debido a que no contienen cafeína, representando esta última un factor que promueve un incremento transitorio de la presión sanguínea (24). A su vez, las infusiones elaboradas con pétalos de rosa son consideradas de una elevada AA comparadas con otras plantas medicinales (9).

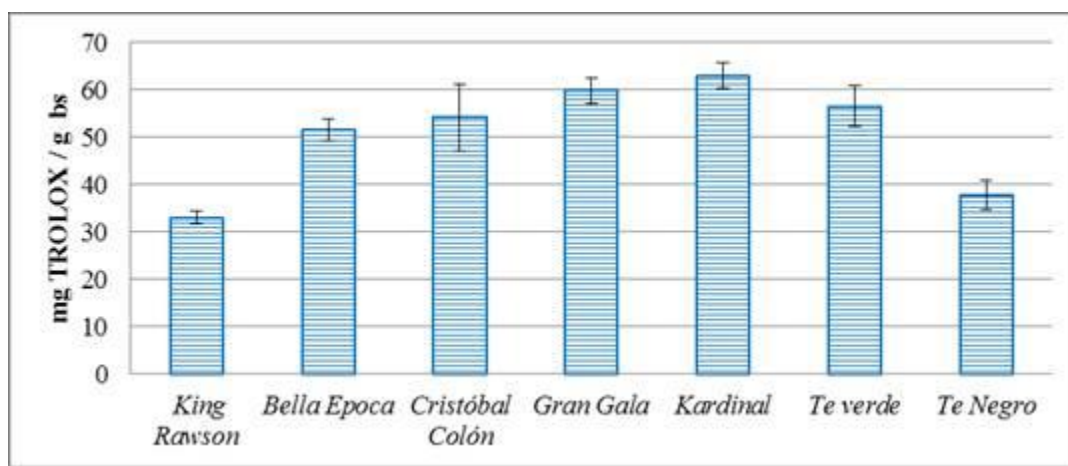


Figura 6. Actividad antioxidante de infusiones elaboradas con distintas variedades de rosas. (Resultados expresados como mg TROLOX / g bs). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Correlación entre el contenido de FT y la AA de las infusiones

En la Figura 7 puede observarse la correlación entre el contenido de FT y la AA de las infusiones evaluadas menos de la variedad *Cristóbal Colón*. Al comparar la totalidad de las muestras se halló una baja correlación entre los parámetros evaluados ($R^2 = 0,5876$). Por lo tanto, se decidió descartar el punto que más se alejaba de la recta (variedad *Cristóbal Colón*). De esta manera se obtuvo una

correlación alta entre la AA y el contenido de FT ($R^2= 0,7543$) coincidiendo con lo reportado por Vinokur *et al.* (23). Esto sugiere que la AA de la mayoría de las infusiones podría atribuirse a la presencia de polifenoles.

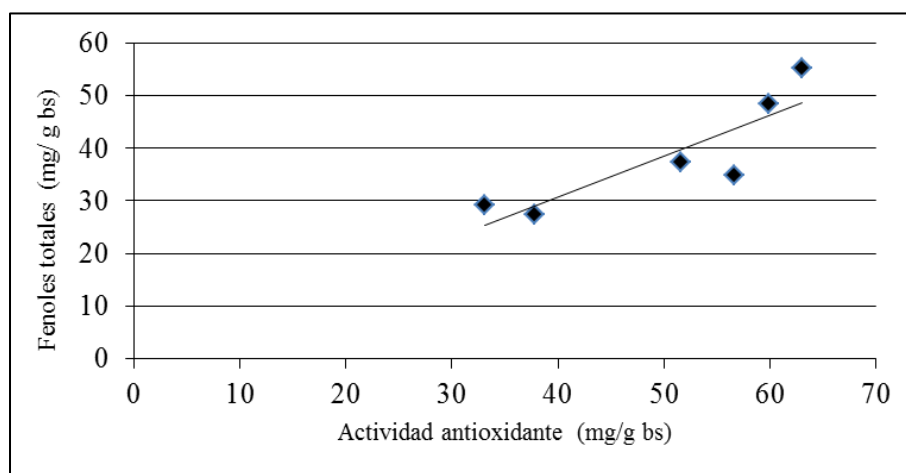


Figura 7. Correlación entre la AA y el contenido de FT de las infusiones.

CONCLUSIONES

Los pétalos de rosa son una buena fuente de compuestos bioactivos que podrían utilizarse para inhibir el crecimiento microbiano y/o la oxidación de lípidos en alimentos. Además, de ser empleados en el desarrollo de alimentos funcionales o farmacéuticos para la prevención y tratamiento de enfermedades causadas por el estrés oxidativo. La elaboración de infusiones de pétalos de rosa representaría una alternativa para su aprovechamiento.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento de estas actividades al Proyecto Nacional de Agroindustria y Agregado de Valor (PNAIyAV) 1130043 y al Proyecto Regional con Enfoque Territorial San Pedro- Baradero (PRET) 1271208.

REFERENCIAS

- Hansen, L. (2007). Caracterización de los viveros de la zona de San Pedro (Buenos Aires)(En línea) <http://inta.gov.ar/documentos/caracterizacion-de-los-viveros-de-la-zona-de-san-pedro-buenos-aires/> consulta <11/07/13> http://anterior.inta.gov.ar/sanpedro/info/doc/2008/lh_0802.htm
- Barash, C.W. (1998). The flavours of flowers. *Herb companion* 10: 32-37.
- Mlcek, J., Otakar, R. (2011). Fresh edible flowers of ornamental plants: A new source of nutraceutical foods. *Trends in Food Science and Technology* 22 p. 561-569.
- Kumar, N., Bhandari, P., Singh, B. (2009). Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: *Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* and *Rosa brunonii*. *Food and Chemical Toxicology*. 47 (2): 361-367.
- Bernal, J., Mendiola, J.A., Ibañez, E., Cifuentes, A. (2011). Review: Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55: 758–774.
- Liu, R.H. (2013). Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of Food Science*, 78 (1): A18–A25.
- Rajeshwari, C.U., Shobha, R.I., Andallu, B. (2014). Review: Phytochemicals in diet and human health with special reference to polyphenols. *Annals of Phytomedicine*, 3(2): 4-25.
- De Ancos, B., Colina-Coca, C., González-Peña, D., Sánchez-Moreno, C. (2015). Chapter 1. Bioactive compounds from vegetable and fruit by-products. En: *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications*. Ed. Vijai
- VanderJagta, T.J., Ghattasa, R., VanderJagta, D.J., Crosseyb, M., Glew, R.H. (2002). Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *Life Sciences* 70. 1035–1040.
- Association of Official Agricultural Chemist. (1960). *Official methods of analysis*. Association of Official Agricultural Chemist, 9th edition, 832 pp. Washington (USA).
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.Jr. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144-158.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science Technology*, 28: 25-30.

13. Lawless, H.T., Heymann, H. (2010). *Sensory Evaluation of Food. Principles and Practices*. 2nd ed. New York. Springer-Verlag New York. P 325-347.
14. Xiong, L., Yang, J., Jiang, Y., Lu, B., Hu, Y., Zhou, F., Mao, S., Shen, C. (2014). Phenolic Compounds and Antioxidant Capacities of 10 Common Edible Flowers from China. Vol. 79, Nr. 4. *Journal of Food Science*
15. Li, A.N., Li, S., Li, H.B., Xu, D.P., Xu, X.R., Chen, F. (2014). Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. *J Funct. Foods*, 6: 319-330.
16. Benvenuti, S., Bortolotti, E., Maggini, R. (2016). Antioxidant power, anthocyanin content and organoleptic performance of edible flowers. *Scientia Horticulturae* 199: 170–177.
17. Cai, Y.Z., Xing, J., Sun, M., Zhan, Z.Q., Corke, H. (2005). Phenolic antioxidants hydrolyzable tannins, flavonols, and anthocyanins identified by LC-ESI-MS and MALDI-QIT-TOF MS from *rosa chinensis* flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 9940–9948.
18. Mavi, A., Terzi, Z., Ozgen, U., Yildirim, A., Coskun M. (2004). Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum subsp.verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27: 702–705.
19. Friedman, H., Rot, I., Agami, O., Vinokur, Y., Rodov, V., Resnick, N., Umiel, N., Dori, I., Ganot, L., Shmuel, D., Matan, E., (2007). Edible flowers: new crops with potential health benefits. *Acta Hort.* 755, 283–290.
20. Kaisoon, O., Konczak, I., Siriamornpun, S. (2012). Potential health enhancing properties of edible flowers from Thailand. *Food Research International* 46: 563–571.
21. China, R., Mukherjee, S., Sena, S., Bose, S., Datta, S., Koley, H., Ghosh, S., Dhar, P. (2012). Antimicrobial activity of *Sesbania grandiflora* flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiological Research* 167:500– 506.
22. Bhattacharyya, S., Roychowdhury, A., Ghosh, S. (2008). Lutein content, fatty acid composition and enzymatic modification of lutein from marigold (*Tagetes patula* L.) flower petals. *Journal of the Indian Chemical Society*, 85, 942-944.
23. Vinokur, Y., Rodov, V., Reznick, N., Goldman, G., Horev, B., Umiel, N., Friedman, H. (2006). Rose Petal Tea as an Antioxidant rich Beverage: Cultivar Effect. *Journal of Food Science*. Vol. 71-1. P. 42-47.
24. Hodgson, J.M., Puddey, I.B., Burke, V., Beilin, L. J., Jordan, N. (1999). Effects on blood pressure of drinking green and black tea. *Journal of Hypertension*, 17: 457- 463.

VARIACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS EN DOS CULTIVARES DE BATATA DURANTE EL ALMACENAMIENTO.

J. Gabilondo¹, G. Corbino¹, H. Chludil², L. Malec³

¹Estación Experimental Agropecuaria INTA San Pedro- Buenos Aires. Argentina.

²Cátedra de Biomoléculas. Fac. de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina.

³Dpto. Química Orgánica. Fac. de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina.

Correo electrónico: gabilondo.julieta@inta.gob.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar y comparar el contenido de polifenoles totales (PFT), la actividad antioxidante (AA) y separar los principales fenoles ácidos en piel y pulpa de dos cultivares de batata (*Beauregard* y *Colorado INTA*) en el producto fresco y luego de 90 días de almacenamiento en cámara a 13°C. El contenido de PFT se determinó con el reactivo de Folin-Ciocalteu, la AA mediante la reducción del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH) y los fenoles ácidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa. El contenido de PFT y la AA tanto en la pulpa como en la piel, resultaron considerablemente mayores en el cultivar *Colorado INTA*. Los valores de PFT y AA obtenidos en la piel, fueron superiores a los de la pulpa para ambos cultivares. Después del almacenamiento, el contenido de PFT y la AA aumentaron en la pulpa del cultivar *Colorado INTA*. Por el contrario, en la piel, ambos parámetros disminuyeron aproximadamente 30% en ambos cultivares. Los principales fenoles identificados fueron los isómeros de los ácidos clorogénico y dicafeoilquinicos. El incremento observado en los compuestos bioactivos de la batata acentuaron aún más las diferencias entre las propiedades funcionales de ambos cultivares.

Palabras clave: capacidad antioxidante, polifenoles, ácido clorogénico, ácidos dicafeoilquinicos, *Ipomoea batata L.*

ABSTRACT

The aim of this work was to study and to compare the content of total polyphenols (PP), the antioxidant activity (AA) and to separate the main phenolic acids in skin and pulp of two sweetpotato cultivars (*Beauregard* and *Colorado INTA*) in the fresh product and after 90 days of storage at 13°C chamber. The PP content was determined with the Folin-Ciocalteu reagent, AA by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) radical-scavenging activity assay and phenolic acids were performed by high performance liquid chromatography (HPLC) on reversed phase. The PP content and AA in pulp and skin were significantly higher in the cultivar *Colorado INTA*. PP and AA values obtained from skin were superior to those of pulp for both cultivars. After storage, the PP and AA increased in the pulp of cultivar *Colorado INTA*. By contrast, both parameters decreased approximately 30% in the skin of both cultivars. The main polyphenols identified were the isomers of chlorogenic and dicaffeoylquinic acids. The observed increase of the bioactive compounds of the sweetpotatoes during storage further accentuated the differences between the functional properties of both cultivars.

Keywords: antioxidant activity, polyphenols, chlorogenic acids, dicaffeoylquinic acids, *sweetpotato Ipomoea L.*

INTRODUCCIÓN

La batata (*Ipomoea batata L. Lam*) es un cultivo que se produce en más de 100 países. En la Argentina, el área plantada de batata es de aproximadamente 10000 hectáreas con una producción de 120000 toneladas y un consumo por habitante por año de 3kg (INTA-CMCBA, 2013). Las principales zonas de producción son la región pampeana (Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe) y el Noreste argentino (NEA). En la zona de San Pedro, es uno de los cultivos tradicionales. Se plantan unas 3000 a 4000 ha anuales de batata, destinadas a abastecer principalmente a la ciudad de Buenos Aires y el conurbano. Su importancia económica se incrementa con la cantidad de galpones de empaques de la zona que procesan batatas provenientes de distintas regiones del país durante gran parte del año. La época de cosecha depende de la región geográfica ya que por ser un cultivo sensible al frío se cultiva durante la estación templada. Para disponer de batatas durante todo el año, una vez cosechadas, éstas pueden ser almacenadas bajo condiciones controladas (13 °C ± 2 °C – 90% HR) por 6-10 meses. Durante la conservación, las raíces sufren cambios en el metabolismo afectando su composición fisicoquímica (2, 3). De la planta de batata se pueden aprovechar las raíces tuberosas y el follaje. La importancia de la raíz de batata como alimento radica en su contenido de almidón, fibra dietaria, minerales, vitaminas y compuestos con actividad antioxidante, como ácidos fenólicos, antocianinas y β-caroteno. Los compuestos antioxidantes actúan como eliminadores de radicales libres y/o inhibidores de las especies reactivas del oxígeno que se forman naturalmente durante el metabolismo humano. Estas moléculas provocan daños en las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos de las estructuras biológicas e inducen en el hombre una variedad de enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo (4, 5) como cardiovasculares, cáncer y aquellas vinculadas con la degeneración neuronal (6). Debido a que algunos antioxidantes sintéticos han demostrado ser tóxicos

presentar efectos mutagénicos (7), en los últimos años se ha incrementado el interés por los antioxidantes de origen natural como los que se encuentran en frutas, vegetales y bebidas. Entre los compuestos fenólicos, los ácidos cafeoilquínicos poseen fuerte actividad antioxidante (8). Incluso Robards *et al.*, (9) reportaron que la AA de estos compuestos es superior a la del tocoferol. Sus propiedades antioxidantes han sido vinculadas a potenciales efectos benéficos sobre la salud humana, incluyendo supresión de melanogénesis (10), inhibición de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (11, 12, 13), actividad antiinflamatoria (14), antiespasmódica (15) antihiper glucémica (16) y antimutagénica (17), entre otros. En distintos cultivares de batata se identificaron los siguientes compuestos cafeoilquínicos: ácido clorogénico, cafeico y sus derivados dicafeoilquínicos (18, 19, 20, 21). La composición y contenido de los compuestos antioxidantes varía ampliamente entre los distintos cultivares de batata, dependiendo de factores genéticos y ambientales, como edad y partes de la raíz, clima, prácticas del cultivo y almacenamiento luego de la cosecha (22, 23). En particular, distintos investigadores han reportado que la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles totales en la piel de batata fueron superiores al contenido de la pulpa (24, 25). El conocimiento de la composición funcional de los cultivares *Colorado INTA* y *Beauregard*, ambos de pulpa naranja, nuevos en la región, aportará información para caracterizar su calidad.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la AA, el contenido de polifenoles totales e identificación de los principales fenoles ácidos en dos cultivares de batata (*Beauregard* y *Colorado INTA*), de importancia comercial para el norte de la provincia de Buenos Aires, en el producto fresco (pulpa y piel) recién cosechado y luego de 90 días de almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de muestras vegetales

Se utilizaron muestras de los cultivares *Beauregard* y *Colorado INTA* cultivados en idénticas condiciones.

Se realizaron dos muestreos, uno al momento de la cosecha y otro luego de 90 días en cámara a $13^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se tomaron, al azar, 10 batatas por cultivar. Cada muestra se formó utilizando un cuarto de cada una de ellas y se congeló la piel y la pulpa por separado en N_2 líquido. Las muestras congeladas fueron liofilizadas, trituradas y almacenadas a -20°C hasta su uso.

Preparación de los extractos

Cada muestra liofilizada (aprox. 1g) se mezcló con metanol 80% (v/v) durante 15 minutos a 80°C y el sobrenadante se separó por centrifugación, 15 minutos a 3500 rpm. Los extractos se realizaron por triplicado.

Métodos analíticos

Humedad

Se determinó según el método AOAC: 920.151 (26) por secado de la muestra en estufa de vacío (100 mmHg) a 70°C hasta obtener peso constante.

Determinación de la actividad antioxidante (AA)

Se analizó por triplicado mediante la reducción del radical DPPH· de acuerdo al método de Brand-Williams *et al.* (27). A 400 μl extracto se le agregaron 3,6 ml de DPPH 0,1 mM, se mantuvo en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 25. La AA se calculó usando una curva estándar con concentraciones de TROLOX desde 20 μM hasta 450 μM . Los resultados se expresaron como mg equivalentes TROLOX por g bs.

Determinación de polifenoles totales (PFT)

Se realizó por triplicado con el reactivo de Folin-Ciocalteu de acuerdo al método de Singleton y Rossi (28) con algunas modificaciones, utilizando ácido clorogénico como estándar. A 250 μL de extracto se le agregaron 4 ml de agua destilada y 250 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego de 3 minutos, se incorporaron 500 μL de Na_2CO_3 1N, se mantuvo 120 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 25. La curva estándar se realizó utilizando concentraciones de ácido clorogénico desde 75 hasta 400 mg/L. El contenido total de polifenoles se informó como mg de ácido clorogénico por g bs.

Identificación y cuantificación de fenoles ácidos

La identificación y cuantificación se realizaron mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa según Padda y Picha (29) con algunas modificaciones. Una alícuota de los extractos metanólicos se filtraron por una membrana de 0.45 μm . Una muestra de 5 μl se inyectó en una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4,6 x 250 mm, 5 micrones usando un equipo *Agilent Technologies 1200 Series* conectado a una bomba cuaternaria. La fase móvil consistió en A: 0,1% ácido acético en solución acuosa; B: acetonitrilo con 0,1 % ácido acético (v/v) con un flujo de 0.75 ml/min en gradiente: B, 10 a 25% de 0 a 35 minutos (min.) y 25 a 50 % de 35 a 50 min. Los picos de los ácidos clorogénico (5-cafeoil-quínico) y ácido cafeico se identificaron y cuantificaron comparando los tiempos de retención y las áreas con sus respectivos estándares. Los picos de los isómeros de ácido clorogénico (3 y 4 cafeoil-quínico) y de los isómeros di-cafeoil-quínicos (3,4; 3,5 y 4,5 dicafeoil-quínicos) fueron identificados por referencia bibliográfica para similares sistemas cromatográficos. Los isómeros de ácido clorogénico se cuantificaron por comparación con el estándar del 5-cafeoil-quínico y los isómeros di-cafeoil-quínicos, por comparación con el estándar del 1,5 di-cafeoil-quínico. La cuantificación se basó en la absorbancia a 320nm usando un detector UV-VIS 1260 *Infinity* de onda múltiple.

Análisis estadísticos

Los datos experimentales se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa *InfoStat versión 2008*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** figuran los contenidos de polifenoles totales/g bs para los cultivares (cv) *Beauregard* y *Colorado INTA*, a los 0 y 90 días de su conservación y en la **Tabla 2** se muestra la AA/g bs para las mismas muestras. En la pulpa de las batatas recién cosechadas, tanto el contenido de PFT como los valores de la AA resultaron aproximadamente el doble en el cv *Colorado INTA* que en el cv *Beauregard*. En la piel, ambos parámetros resultaron muy superiores que en la pulpa y similares para ambos cultivares. Padda y Picha (30) reportaron una amplia variabilidad en el contenido de PFT y AA para distintos genotipos de batatas con pulpa color naranja. Además estos resultados coinciden con Padda y Picha (31, 32) quienes reportaron que el contenido de PFT y AA fue bastante mayor en el tejido de la piel que en la pulpa del cv *Beauregard* al momento de la cosecha. Jung *et al.* (33) también encontraron diferencias en la AA y el contenido de fenoles incluso, dentro de la pulpa de una misma raíz, pudiendo variar de médula a corteza. Walter y Schadel, (24) y Harrison *et al* (34) han atribuido los mayores valores de PFT registrados en los tejidos de la piel de la batata a un mecanismo de defensa química natural de la misma contra enfermedades e insectos. El alto contenido de compuestos fenólicos en la piel podría despertar el interés de las industrias en utilizarla para su incorporación en diversos alimentos con el fin de aprovechar su potencial antioxidante natural y a su vez, minimizar los residuos industriales.

Tabla 1. Contenido de polifenoles totales expresados en mg equivalentes de ácido clorogénico /g bs para los cultivares *Beauregard* y *Colorado INTA*, a los 0 y 90 días de su conservación.

	0 días		90 días	
	<i>Beauregard</i>	<i>Colorado INTA</i>	<i>Beauregard</i>	<i>Colorado INTA</i>
Pulpa	1,9 ± 0,10	3,59 ± 0,27	2,15 ± 0,13	5,78 ± 0,19
Piel	21,2 ± 1,41	21,7 ± 2,4	14,1 ± 1,4	14,3 ± 1,5

Cada valor es el promedio ± la Desviación Estándar de los resultados obtenidos.

Tabla 2. Actividad antioxidante expresada en mg equiv. TROLOX /g bs para los cultivares *Beauregard* y *Colorado INTA*, a los 0 y 90 días de su conservación.

	0 días		90 días	
	<i>Beauregard</i>	<i>Colorado INTA</i>	<i>Beauregard</i>	<i>Colorado INTA</i>
Pulpa	2,05 ± 0,22	4,64 ± 0,33	2,55 ± 0,24	7,14 ± 0,23
Piel	23,8 ± 0,59	22,2 ± 2,1	16 ± 1,3	14,2 ± 1,5

Cada valor es el promedio ± la Desviación Estándar de los resultados obtenidos.

En la **Figura 1** se muestra la variación de PFT y la AA para los cultivares *Beauregard* y *Colorado INTA* durante su conservación. Se puede observar que la variación de PFT es similar a la de la AA en ambos cultivares. Luego de 90 días de almacenamiento, los PFT y la AA aumentaron en la pulpa de ambos cultivares pero en mucho mayor proporción en el cv *Colorado INTA*. Los valores alcanzados para los respectivos parámetros fueron 60% y 50% más elevados que los iniciales, mientras que en el cv *Beauregard* no hubo variaciones significativas. Por el contrario, en la piel, ambos parámetros disminuyeron aproximadamente 30% tanto para *Colorado INTA* como para *Beauregard*.

Estudios realizados sobre otros cultivares (35) encontraron que los PFT y la AA durante 37 días de almacenamiento a 15°C aumentaron en el cv. *J-Red*, de pulpa naranja, pero disminuyeron en otros tres cv. Por otro lado, Grace *et al.* (36) observaron una disminución en el contenido de PFT de distintos cv de batata almacenadas a temperatura óptima durante 4 y 8 meses aunque manifestaron que algunos PF individuales se vieron incrementados durante el almacenamiento. Varios autores coinciden en que la variación en el contenido de PFT y la AA depende del cultivar (37, 38, 36). Dependiendo del tipo de estrés, los compuestos fenólicos pueden ser inducidos como resultado del incremento de la transcripción de genes que codifican la biosíntesis de las enzimas correspondientes (39). El incremento en el contenido de PFT puede ser atribuido a un aumento en paralelo de la actividad de la fenil-alanina amonio-liasa (PAL), una importante enzima involucrada en el camino fenilpropanoide de la síntesis fenólica (31).

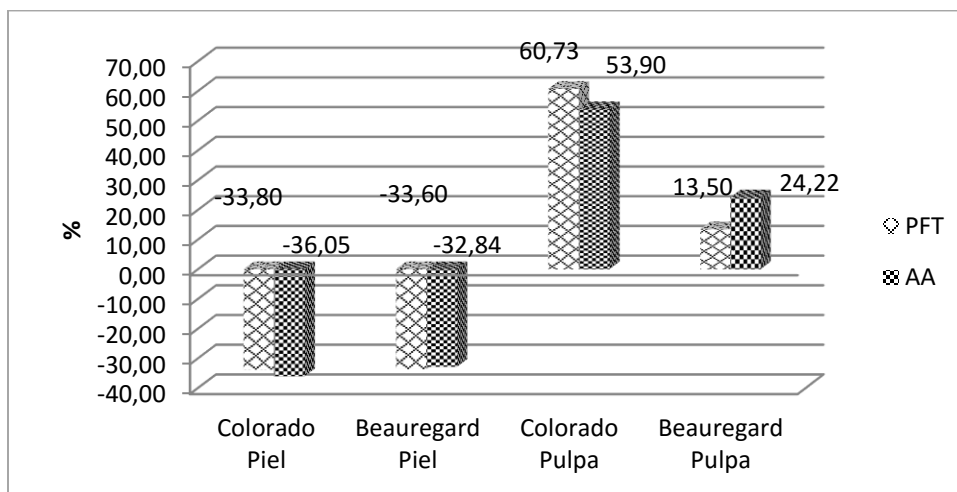


Figura 1. Variación de polifenoles totales y la actividad antioxidante para los cultivares *Beauregard* y *Colorado* INTA durante su conservación.

En la **Figura 2**, puede observarse que los valores de AA mostraron una alta correlación ($r^2 = 0,991$) con los contenidos de PFT. Otros autores, también encontraron una alta correlación entre PFT y AA en distintos cultivares de batata (32, 40). Esto sugiere que la AA de las batatas podría ser causada principalmente por la presencia de PF.

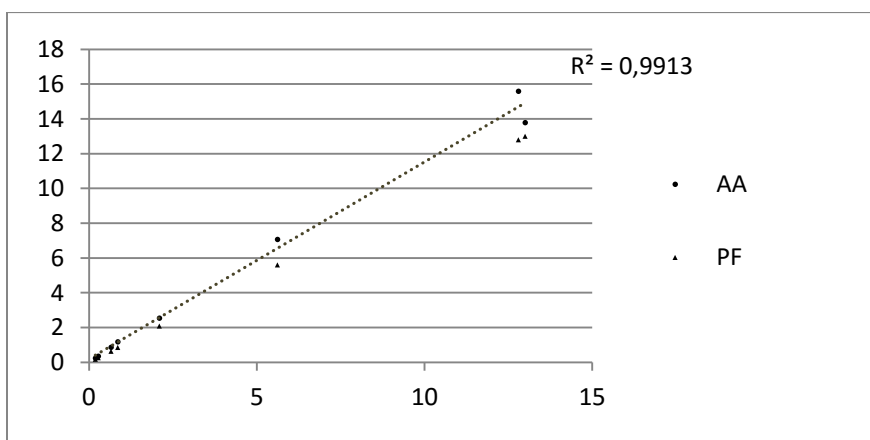


Figura 2. Correlación entre PFT y AA para ambos cultivares, en tejido fresco de piel y pulpa

Al analizar los PF individuales en las batatas recién cosechadas (**Tabla 3**), se encontró que los PF más abundantes en la pulpa de ambos cv, fueron los isómeros del ácido clorogénico. En cambio en la piel, los isómeros del ácido clorogénico fueron mayoritarios en *Colorado* INTA, pero en *Beauregard*, predominaron los isómeros dicafeoilquinicos (3,4; 3,5; 4,5). El ácido cafeico sólo se identificó en la piel de ambos cv y en baja concentración. Estos resultados coinciden con Bellail *et al* (41) quienes reportaron que no se encontró ácido cafeico en la pulpa de ninguno de los cultivares analizados, entre ellos *Beauregard*. Otros estudios (30, 42) realizados sobre diferentes cv de batata, también identificaron como PF mayoritarios a los isómeros de los ácidos clorogénico y dicafeoilquinico y al ácido cafeico como componente minoritario.

Tabla 3. Contenido PFT, AA, isómeros de ácido clorogénico, ácido cafeico e isómeros de ácidos dicafeoilquinicos de piel y pulpa para los cultivares *Beauregard* y *Colorado INTA* antes y después de su almacenamiento. Los valores están expresados en mg/g bs.

mg/g bs	Beauregard				Colorado INTA			
	90 días		0 días		90 días		0 días	
	Pulpa	Piel	Pulpa	Piel	Pulpa	Piel	Pulpa	Piel
Isómeros Ac. Clorog.	0,642	2,29	0,525	5,73	2,43	1,67	1,25	8,42
Ac. Cafeico	0,000	1,29	0,000	0,793	0,000	1,20	0,000	0,563
Isómeros dicafeoilq.	0,370	4,17	0,338	7,97	1,89	2,93	0,610	4,13
Total	1,01	7,75	0,86	14,5	4,32	5,80	1,86	13,1
AA	2,55	16,0	2,05	23,8	7,14	14,2	4,64	22,2
PFT	2,15	14,1	1,90	21,2	5,78	14,3	3,59	21,7
% en PFT	47,1	55,0	45,4	68,3	74,8	40,5	51,7	60,4

El aumento de los PFT en la pulpa de *Colorado INTA* durante el almacenamiento se debió a un incremento parejo de los isómeros de los ácidos clorogénicos y dicafeoilquinicos (**Figura 3**). En la pulpa del cv *Beauregard*, en coincidencia con los resultados obtenidos al analizar los PF totales, no se registraron variaciones significativas en los diferentes PF durante el almacenamiento. En la piel del cv *Beauregard* (**Figura 4**), la disminución del contenido de PFT también se debió a la variación de los ácidos clorogénicos y dicafeoilquinicos. En la piel del cv *Colorado INTA*, en cambio, la disminución se debió fundamentalmente a la variación de los isómeros del ácido clorogénico quedando entonces como mayoritarios en las batatas almacenadas los ácidos dicafeoilquinicos. El ácido cafeico fue el único compuesto que se incrementó, luego de la conservación, en la piel de ambos cv, aunque su proporción sigue siendo minoritaria con respecto al resto. Estudios previos han reportado resultados contradictorios con respecto al incremento y disminución de estos ácidos fenólicos durante el almacenamiento. Al igual que en el contenido de PFT y la AA, manifestaron que estas variaciones dependen del cultivar (37, 38, 36, 35).

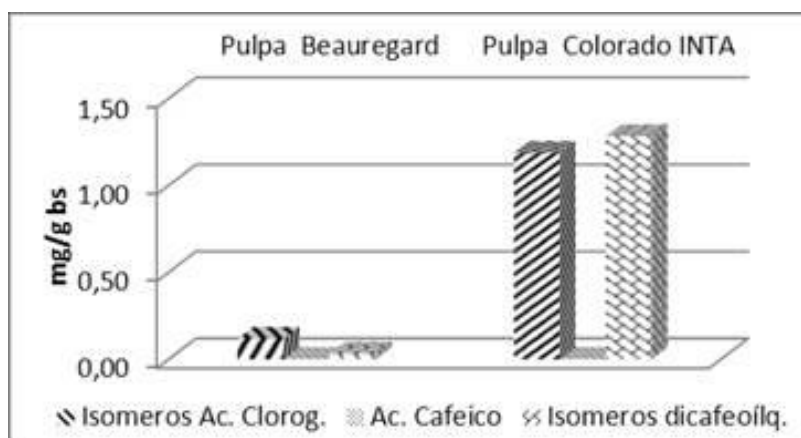


Figura 3. Variación de los isómeros de ácido clorogénico y dicafeoilquinico y del ácido cafeico en la pulpa de los cultivares *Beauregard* y *Colorado INTA* durante su almacenamiento. Los valores están expresados en mg/g bs.

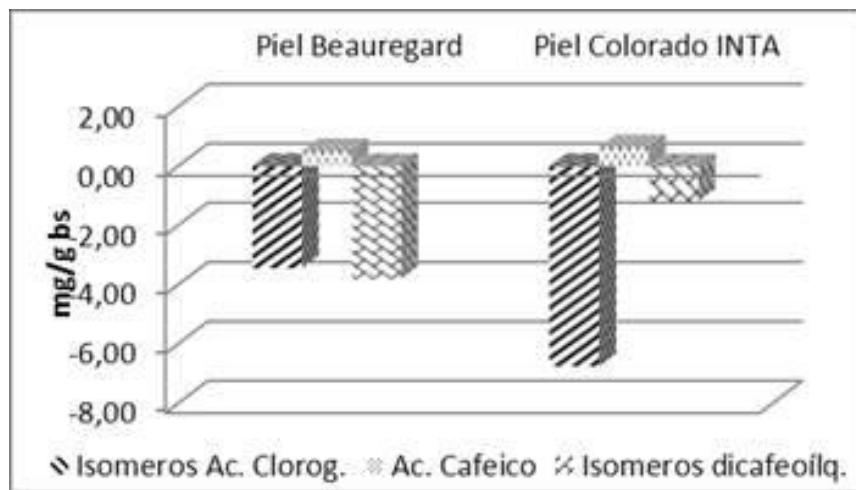


Figura 4. Variación de los isómeros de ácido clorogénico y dicafeoilquinico y del ácido cafeico en la piel de los cultivares *Beauregard* y *Colorado INTA* durante su almacenamiento. Los valores están expresados en mg/g bs.

CONCLUSIONES

El cv *Colorado INTA*, con vetas color púrpura, resultó más rico en PF que el cv *Beauregard* y las diferencias se incrementaron durante el almacenamiento. En la pulpa de ambos cv los PF más abundantes fueron los isómeros del ácido clorogénico. La conservación a temperaturas controladas favoreció el valor funcional de la pulpa del cv Colorado INTA. Pero en la piel, hubo una importante disminución de sus compuestos bioactivos. Por lo tanto, si se quiere aprovechar el alto contenido de antioxidantes naturales en la piel para su agregado en alimentos para prevenir la oxidación lipídica, es aconsejable extraerlos de las batatas recién cosechadas.

REFERENCIAS

1. INTA-CMCBA. (2013). Gacetilla de Frutas y Hortalizas del Convenio INTA- CMCBA N° 21. Marzo 2013. En: <http://www.mercadocentral.gob.ar/gacetilla/gacetilla21.pdf>
2. Takenaka, M., Nanayana, K., Isobe, S., Murata, M. (2006). Changes in caffeic acid derivatives in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) during cooking and processing. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70. 1: 172-177.
3. Huang, Y.H., Picha, D.H., Johnson, C.E. (1998). An alternative method for enzymatic assay of plant invertases. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3158-3161.
4. Elahi, M.M., Malata, B.M. (2006). Free radicals in blood: evolving concepts in the mechanism of ischemic heart disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 450: 78-88.
5. Thrasyvoulou, C., Soubeyre, V., Ridha, H., Giuliani, D., Giaroni, C., Michael, G.J., Saffrey, M.J., Cowen, T. (2006). Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons. *Aging Cell.* 5: 247-257.
6. Ames, B.M., Shigena, M.K., Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidant and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90:7915-7922.
7. Krishnakumar, V., Gordon, I. (1996). Antioxidants, trends and developments. *International Food Ingredients.* 12: 41-44.
8. Chuda, Y., Ono, H., Ohnishi-Kameyama, M., Nagata, T., Tsushida, T. (1996). Structural identification of two antioxidant quinic acid derivatives from garland (*Chri'santhemuni coronariwn* L.). *J. Agr. Food Chem.* 44:2037-2039.
9. Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66:401-436.
10. Shimozono H, Kobori M, Shinmoto H and Tsushida T. (1996). Suppression of mouse melanoma B 16 cells by sweetpotato extract. *Nippon Shokuhin Kogaku Kaishi* 43:313-317.
11. Mahmood, N., Moore, P.S., De Tommasi, N. (1993). Inhibition of HIV infection by caffeoylquinic acid derivatives. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 4: 235-240.

12. Robinson, E.W., Cordeiro, M., Abdel-Malek, S., Jia, Q., Chow, S.A., Reinecke, M.G., Mitchell, W.M. (1996). Dicafeoylquinic acidinhibitors of human immunodeficiency virus integrase: Inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus inte-grase. *Mol. Pharmacol.* 50:846-855.
13. Zhu, K.M.L., Coreiro, J., Atienza, W.E, Robinson, J., Chow, S.A. (1999). Irreversible inhibition of human immunodeficiency virus typeI integrase by dicafeoylquinic acids. *J. Virol.* 73:3309-3316.
14. Peluso, G., De Feo, V., De Simone, F., Bresciano, E., Vuotto, M.L. (1995). Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acid on monocyte migration and superoxide ion production. *J. Nat. Prod.* 58:639-646.
15. Trute, A., Gross, J., Mutschler, F., Nahrstedt, A. (1997). In vitro antispasmodic compounds of the dry extract obtained from *Hederahelix*. *Planta Med.* 63:125-129.
16. Guan, Y., Wu, T., Lin, M., Ye, J. (2006). Determination of pharmacologically active ingredients of sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J. Agr. Food Chem.* 54:24-28.
17. Yoshimoto, M., Okuno, S., Yoshinaga, M., Yamakawa, O., Yamaguchi, M., Yamada, J. (1999). Antimutagenicity of sweet potato (*Ipomoea batatas*) roots. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63: 537–541.
18. Yamakawa, O., Yoshimoto, M. (2001). Sweet potato as food material with physiological functions. Proceeding of the First International Conference on Sweet Potato. Food and Health for the Future. *Acta Horticulturae*, 583:173-184.
19. Yoshimoto, M., Okuno, S., Yamaguchi, M., Yamakawa, O. (2001). Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purplefleshed sweet potato. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65: 1652–1655.
20. Yoshimoto, M., Yamakawa, O., Tanoue, H. (2005). Potential chemopreventive properties and varietal difference of dietary fiber from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) root. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 39. 1: 37-43.
21. Teow, C.C., Truong, V.D., McFeeters, R.F., Thompson, R.L., Pecota, K.V, Yencho, G.C. (2007). Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry* 103:829–838.
22. Kidmose, U., Christensen, L.P., Agili, S.M., Thilsted, S.H. (2007). Effect of home preparation practices on the content of provitamin A carotenoids in coloured sweet potato varieties (*Ipomoea batatas* Lam.) from Kenya. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8:399–406.
23. Bovell-Benjamin, A.C. (2007). Sweet potato: A review of its past, present, and future role in human nutrition. *Advances in Food and Nutrition Research*, 52: 1–59.
24. Walter, W.M., Schadel, W.E. (1981). Distribution of phenols in ‘Jewel’ sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 29: 904–906.
25. Cevallos-Casallas, B.A., Cisneros-Zevallos, L.A. (2003). Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from Andean purple corn and red-fleshed sweetpotato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:3313–3319.
26. A.O.A.C. Association of the Official Analytical Chemists. (1990). 920.151. Official Methods of the Association of the Official Analytical Chemists. Ed. Horwitz W. 14th ed. Washington DC.
27. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science Technology*, 28: 25-30.
28. Singleton, V.L., Rossi, J.A.Jr. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144-158.
29. Padda, M.S., Picha, D.H. (2007). Methodology optimization for quantification of total phenolics and individual phenolic acids in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) roots. *J. Food Sci.* 72: C412–C416.
30. Padda, M.S., Picha, D.H. (2008c). Quantification of phenolic acids and antioxidant activity in sweetpotato genotypes. *Scientia Horticulturae* 119: 17–20.
31. Padda, M.S., Picha, D.H. (2008a). Effect of low temperature storage on phenolic composition and antioxidant activity of sweetpotatoes. *Postharvest Biology and Technology* 47:176–180.
32. Padda, M.S., Picha, D.H. (2008b). Phenolic composition and antioxidant capacity of different heat-processed forms of sweetpotato cv. Beauregard. *International Journal of Food Science and Technology*. 43:1404–1409.
33. Jung, J.K., Lee, S.U., Kozukue, N., Levin, C.E., Friedman, M. (2011). Distribution of phenolic compounds and antioxidative activities in parts of sweet potato (*Ipomoea batata* L.) plants and in home processed roots. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 29–37.
34. Harrison, H.F., Peterson, J.K., Snook, M.E., Bohac, J.R., Jackson, D.M. (2003). Quantity and potential biological activity of caffeic acid in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] storage root periderm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:2843–2848.
35. Ishiguro, K., Yahara, S., Yoshimoto, M. (2007). Changes in Polyphenolic Content and Radical-Scavenging Activity of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) during Storage at Optimal and Low Temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 55: 10773–10778.
36. Grace, M.H., Yousef, G.G., Gustafson, S.J., Truong, V.D., Yencho, G.C., Lila, M.A. (2014). Phytochemical changes in phenolics, anthocyanins, ascorbic acid and carotenoids associated with sweetpotato storage and impacts on bioactive properties. *Food chemistry*. 145: 717-724.
37. Lieberman, M., Craft, C., Wilcox, M.S. (1959). Effect of chilling on the chlorogenic acid and ascorbic acid content of Port Rico sweetpotatoes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 74: 642–648.
38. Lattanzio, V., Cardinali, A., Palmieri, S. (1994). The role of phenolics in the postharvest physiology of fruits and vegetables: browning reactions and fungal diseases. *Ital. J. Food Sci.* 1: 3–22.

39. Dixon, R.A., Paiva, N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085–1097.
40. Wang, P., Zhu, Z. (2006). Effects of pickling on the contents of antioxidant compounds and antioxidant activities in different cultivars of leaf mustard. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*. 20: 516-520.
41. Bellail, A.A., Shaltout, O.E., Youssef, M.M., El Gamal, A.M.A. (2012). Effect of home-cooking methods on phenolic composition and antioxidant activity of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars grown in Egypt. *Food and Nutrition Sciences*. 3: 490-499.
42. Walter, W.M., Purcell, A.E., McCollum, G.K. (1979). Use of high-pressure liquid chromatography for analysis of sweet potato phenolics. *J. Agric. Food Chem*. 27: 938–941.

VARIACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN UN CULTIVAR DE BATATA DE PULPA NARANJA DURANTE EL ALMACENAMIENTO

MV., Szentivanyi ¹, J., Gabilondo ², M V., Feijoo ¹, C., Budde ², L., Malec ¹

¹Dpto. Química Orgánica. Fac. de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina.

²Estación Experimental Agropecuaria INTA San Pedro- Buenos Aires. Argentina.

Correo electrónico: malec@qo.fcen.uba.ar

RESUMEN

Se analizó y comparó la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales y de carotenos totales en batatas de un cultivar de pulpa naranja, *Beauregard*, durante el almacenamiento en cámara y en pila. Las batatas una vez cosechadas se almacenaron durante 110 días, divididas en dos lotes: uno de ellos en cámara a 13°C y el otro en pila al aire libre bajo un tinglado. El contenido de fenoles totales en la pulpa de las batatas del cultivar *Beauregard*, recién cosechadas, fue 2,60 mg clorogénico /g ms, la actividad antioxidante 3,37 mg TROLOX /g ms y los carotenos totales 608 µg β-caroteno /g ms. No se observaron diferencias significativas (p>0,05) en ninguna de las variables estudiadas entre las batatas almacenadas en cámara y en pila. Tampoco se detectaron variaciones en la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales a lo largo del almacenamiento, registrándose en cambio, un incremento del 18% en el contenido de carotenos durante los primeros 30 días de conservación, manteniéndose luego sin modificaciones significativas.

Palabras clave: actividad antioxidante, fenoles totales, carotenos totales, *Ipomoea batata L.*

ABSTRACT

Antioxidant activity, total phenolic and total carotene contents were analyzed and compared in sweet potatoes with orange pulp, *Beauregard*, during storage in chamber and pile. Harvested sweet potatoes were stored for 110 days divided in two batches: one at 13 °C chamber and the other in piles in the open air under a shed. The total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, the AA by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity assay and total carotene spectrophotometrically. The total phenolic content in the freshly harvested sweetpotatoes was 2,60 mg chlorogenic /g dm, the AA was 3,37 mg TROLOX /g dm and the total carotene 608 µg β-caroteno /g dm. No significant differences (p>0,05) were observed in any of the parameters analyzed between sweetpotatoes stored in chamber and in pile. In addition, no variations were detected in the AA or in the total phenolic content during storage. However, carotene content increased 18% during the first 30 days of storage, and then remained without significant changes.

Keywords: antioxidant activity, total phenols, total carotenes, sweetpotato *Ipomoea L.*

INTRODUCCION

La batata (*Ipomoea batata L. Lam*), cada vez más, es considerada un alimento saludable debido a su contenido en compuestos nutraceuticos tales como fibra dietaria y compuestos con actividad antioxidante como vitamina C, polifenoles y carotenoides 1. Estos compuestos antioxidantes actúan como eliminadores de radicales libres y/o inhibidores de las especies reactivas del oxígeno que se forman naturalmente durante el metabolismo humano. Estas moléculas provocan daños en las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos de las estructuras biológicas e inducen en el hombre una variedad de enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo (2, 3) como cardiovasculares, cáncer y aquellas vinculadas con la degeneración neuronal (4).

Además de actuar como antioxidantes, los carotenoides y compuestos fenólicos, proveen a las batatas de colores distintivos a la pulpa (crema, amarillo profundo, naranja y púrpura). Los cultivares de pulpa naranja son ricos en carotenoides, de los cuales el β-caroteno es el más abundante (5, 6). Este último es considerado un precursor de la vitamina A (retinol) debido a que luego de ser absorbido en el organismo humano se convierte en esta vitamina. El consumo de este tipo de vegetales puede jugar un papel clave como paliativo de la deficiencia de vitamina A. Su biodisponibilidad en las batatas de pulpa color naranja es superior a la de zanahoria y vegetales de hojas verdes (7). Debido a que la batata es un cultivo sensible al frío, se cultiva durante la estación templada. En Argentina, para disponer de batatas durante todo el año, una vez cosechadas suelen almacenarse en pila al aire libre bajo un tinglado. Pero lo recomendable es hacerlo bajo condiciones controladas (13 °C ± 2 – 90% HR). Durante la conservación se producen cambios en el metabolismo que afectan su composición físicoquímica (8, 9). El contenido de los compuestos antioxidantes puede variar además entre los distintos cultivares de batata, dependiendo de factores genéticos y ambientales, como edad y partes de la raíz, clima, prácticas del cultivo y almacenamiento luego de la cosecha (10, 11). Actualmente, se busca desarrollar cultivares de pulpa naranja debido a que en algunos países los consumidores prefieren estos colores de pulpa y, como se mencionó anteriormente, suelen tener mayores niveles de carotenos. La obtención de estos cultivares podría constituir una herramienta que le permita al productor diferenciar el producto, captar el creciente

segmento de consumidores interesados en alimentos saludables, y así aumentar el consumo. En los últimos años, la Estación experimental Agropecuaria (EEA) del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) de San Pedro (Buenos Aires, Argentina) ha realizado trabajos de investigación para su incorporación al mercado, con el cultivar *Beauregard* de pulpa naranja, poco difundido en la Argentina, por ser el más utilizado en EE.UU. En la zona, se ha destacado por su precocidad y rendimiento.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar y comparar la variación de la actividad antioxidante y los contenidos de fenoles totales y carotenos totales en batatas de un cultivar de pulpa naranja, *Beauregard*, nuevo en la región, durante el almacenamiento en cámara y en pila. Se investigó además, si existía correlación entre el contenido de carotenos y el color de la pulpa. También se compararon los valores de estos compuestos bioactivos en las batatas recién cosechadas con los de dos cultivares de pulpa amarilla, *Arapey* y *Morada INTA*, consumidos comúnmente en Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de muestras vegetales

Se utilizaron muestras, al momento de la cosecha, de los cultivares *Beauregard*, *Arapey* y *Morada INTA* cultivados en idénticas condiciones.

Luego de la cosecha, las batatas del cultivar *Beauregard* se almacenaron divididas en dos lotes, uno de ellos en cámara a $13\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 90% HR, y el otro en pila al aire libre bajo un tinglado. En cada lote se realizaron análisis a los 30, 60, 90 y 110 días de almacenamiento. Para todos los muestreos, cosecha y almacenamiento, se tomaron diez batatas por cultivar y se formó un pool utilizando un cuarto de cada una de ellas. Se congeló la pulpa en N_2 líquido, se liofilizó, molió y almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Métodos analíticos

Humedad

Se determinó según el método AOAC: 920.151 (1990) (12) por secado de la muestra en estufa de vacío (100 mmHg) a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta obtener peso constante.

Preparación de los extractos

Cada muestra liofilizada (aprox. 1g) se mezcló con metanol 80% (v/v) durante 15 minutos a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el sobrenadante se separó por centrifugación, 15 minutos a 3500 rpm. Los extractos se realizaron por triplicado, determinando en cada uno el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante.

Determinación de fenoles totales (FT)

Se realizó por triplicado con el reactivo de Folin-Ciocalteu de acuerdo al método de Singleton y Rossi (13) con algunas modificaciones, utilizando ácido clorogénico como estándar. A 250 μL de extracto se le agregaron 4 ml de agua destilada y 250 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego de 3 minutos, se incorporaron 500 μL de Na_2CO_3 1N, se mantuvo 120 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro UV/Vis HP 8453 (Hewlett Packard, Estados Unidos). La curva estándar se realizó utilizando concentraciones de ácido clorogénico desde 75 hasta 400 mg/L. El contenido total de polifenoles se informó como mg de ácido clorogénico por g bs.

Determinación de la actividad antioxidante (AA)

Se analizó por triplicado mediante la reducción del radical DPPH de acuerdo al método de Brand-Williams et al. (14). A 400 μl extracto se le agregaron 3,6 ml de DPPH 0,1 mM, se mantuvo en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro UV/Vis HP 8453 (Hewlett Packard, Estados Unidos). La AA se calculó usando una curva estándar con concentraciones de TROLOX desde 20 μM hasta 450 μM . Los resultados se expresaron como mg equivalentes TROLOX por g bs (base seca).

Determinación de carotenos totales

Se pesaron aprox. 0,3g para el tejido de pulpa liofilizado y se analizaron según el método Rodríguez-Amaya y Kimura (15) con algunas modificaciones. Las absorbancias se midieron a 450 nm en un espectrofotómetro UV/Vis HP 8453 (Hewlett Packard, Estados Unidos). La curva estándar se realizó utilizando concentraciones de β -caroteno en el rango de 0,9 $\mu\text{g/ml}$ a 8 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados se expresaron como μg β -caroteno por g bs. Los extractos se realizaron por triplicado.

Color: se determinó por triplicado con un colorímetro marca Minolta modelo CR-400 (Minolta Co. Ltd., Osaka, Japón) según las coordenadas L^* (luminosidad), a^* (componente rojo-verde) y b^* (componente amarillo-azul).

Análisis estadísticos

Los datos experimentales se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa *InfoStat versión 2008*.

RESULTADOS Y DISCUSION

Batatas recién cosechadas

En la **Tabla 1** se observa el contenido de FT y la AA en las batatas recién cosechadas del cultivar *Beauregard*, de pulpa naranja. Los valores hallados en ambos parámetros coinciden con los reportados por Padda y Picha (16, 17) para este cultivar en Estados Unidos. También en esta tabla figuran los mismos parámetros determinados, a efectos comparativos, en dos cultivares de pulpa amarilla, *Arapey* y *Morada INTA*, comúnmente consumidos en nuestro país. Los contenidos de FT resultaron similares para los tres cultivares evaluados. En cuanto a la AA, sólo la correspondiente al cultivar *Arapey* resultó menor ($p < 0,05$) que las de los otros dos cultivares.

Tabla 1: Contenido de fenoles totales, carotenos totales y la actividad antioxidante para los cultivares *Beauregard*, *Arapey* y *Morada INTA* al momento de la cosecha.

	Fenoles totales mg eq ácido clorogénico /g bs	Actividad antioxidante mg eq TROLOX /g bs	Carotenos totales µg β-caroteno/g bs
<i>Beauregard</i>	2,60 ^a ± 0,20	3,37 ^a ± 0,25	608 ^a ± 18
<i>Arapey</i>	2,54 ^a ± 0,42	2,82 ^b ± 0,47	46,6 ^b ± 0,02
<i>Morada INTA</i>	2,66 ^a ± 0,27	3,66 ^a ± 0,26	46,9 ^b ± 0,27

Cada valor es el promedio ± la desviación estándar de los resultados obtenidos.

Letras distintas indican diferencias significativas (p < 0.05) entre valores de una misma columna

En la misma **Tabla 1** se muestra además el contenido de carotenos totales al momento de la cosecha, para los cultivares arriba mencionados. Confirmando lo esperado, en el cultivar de pulpa naranja el contenido fue mucho más elevado que en los de pulpa amarilla alcanzando el valor de un orden superior a estos últimos. Varios autores, como Grace et al. (18) y Hagenimana et al. (19) analizaron el contenido de carotenos totales en cultivares de batata de distinto color de pulpa y encontraron valores similares a los del presente trabajo tanto para los cultivares de pulpa naranja como para los de pulpa amarilla. Por otro lado, De Moura et al. (20) reportaron un amplio rango en el contenido de carotenos totales, de 2 a 632 µg / g bs entre cultivares de pulpa blanca, amarilla, naranja y púrpura. Teniendo en cuenta estos valores, el cultivar *Beauregard* analizado en este trabajo se encuentra entre los de mayor contenido. Algunos autores han demostrado que el β-caroteno es el carotenoide mayoritario (60-90%) en cultivares de pulpa naranja (10, 19, 21, 22). En este sentido, Huang et al. (9) y Hagenimana et al. (19) observaron que el porcentaje de β-caroteno aumenta con un mayor contenido de carotenos totales, por lo que se podría inferir que el cultivar de pulpa naranja estudiado posee un elevado contenido de este compuesto que podría representar al menos un 50% de los carotenos totales. Trumbo et al. (23) estimaron que 12 µg β-caroteno corresponden a 1 µg retinol. Este factor está basado en la bioeficacia de los carotenoides en una dieta mixta de una población saludable en países desarrollados. De acuerdo a la Junta de Alimentación y Nutrición del Instituto de Medicina del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, la dosis diaria recomendada de vitamina A (µg/día) para niños en edad pre-escolar es de 400 µg equivalente de actividad de retinol (EAR)/día. Por lo tanto, tomando el factor de conversión mencionado anteriormente, podríamos estimar que 20 g de batata seca/día (equivalentes a 100 g batata fresca/día) del cultivar *Beauregard*, cubrirían la dosis diaria recomendada. Esta cifra correspondería a un peso menor al de una unidad de batata, lo que muestra la riqueza de este producto como fuente de provitamina A. Cabe destacar que este valor calculado es menor que los 125 g de batata fresca/día necesarios para cubrir la dosis diaria reportados por el Centro Internacional de la Papa (CIP, 2012) para los cultivares de pulpa naranja. Debe tenerse en cuenta que el contenido hallado para este cultivar es considerablemente elevado, y que el valor estimado por el CIP probablemente considere un cierto margen de seguridad, teniendo en cuenta que el contenido de β-caroteno puede variar ampliamente de acuerdo a diversos factores, como el cultivar, la edad de la raíz, el clima y las prácticas agronómicas y de poscosecha (24, 21).

Almacenamiento

En la **Figura 1** se muestra la variación en el contenido de FT y la AA para el cultivar *Beauregard* durante su conservación. No se observaron diferencias significativas (p > 0,05) en ninguna de las variables estudiadas entre las batatas almacenadas en cámara y en pila. Tampoco se detectaron variaciones en la AA y el contenido de FT a lo largo del almacenamiento. Estudios realizados sobre otros cultivares (25), encontraron que los FT y la AA durante 37 días de almacenamiento a 15 °C aumentaron en el cultivar *J-Red*, de pulpa naranja, pero disminuyeron en otros tres cultivares. Por otro lado, Grace et al. (18) observaron una disminución en el contenido de FT de distintos cultivares de batata almacenadas a temperatura óptima durante 4 y 8 meses. Varios autores coinciden en que la variación en el contenido de FT y la AA depende del cultivar (26, 27, 18).

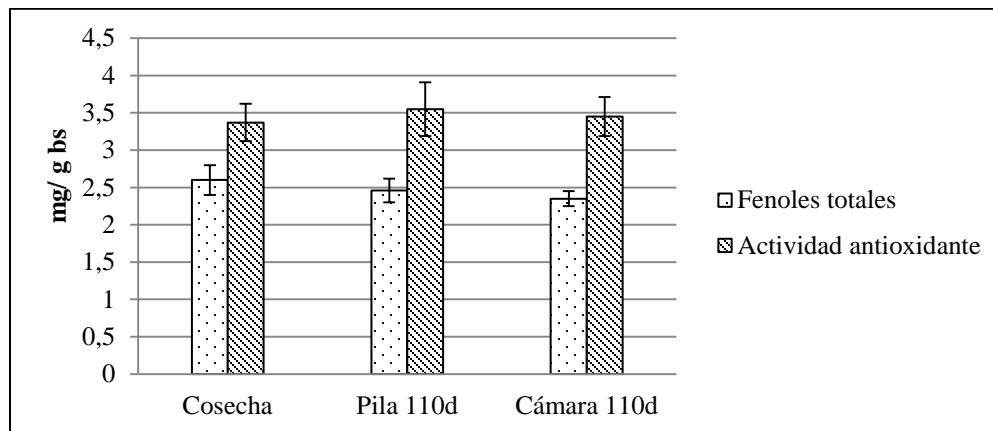


Figura 1: Variación del contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante para el cultivar *Beauregard* durante su conservación en cámara y en pila.

En la **Figura 2** se observa la variación en el contenido de β -caroteno para el cultivar *Beauregard* durante su conservación en cámara y en pila.

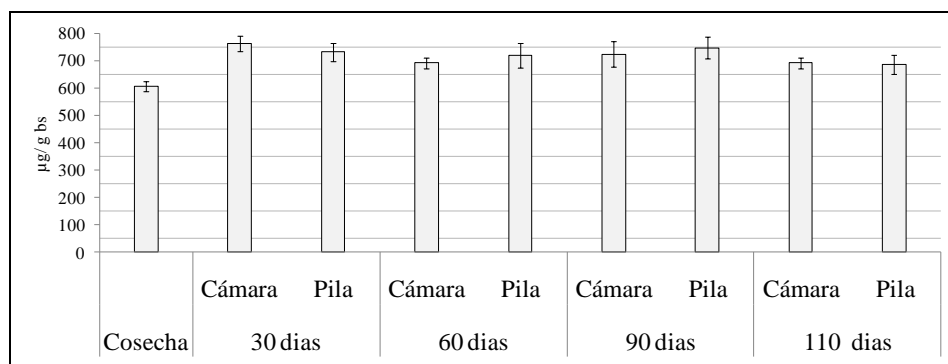


Figura 2: Variación en el contenido de β -caroteno para el cultivar *Beauregard* durante su conservación en cámara y en pila.

Se registró un incremento del 18% durante los primeros 30 días de conservación tanto en pila como en cámara, manteniéndose luego sin modificaciones significativas ($p > 0,05$) hasta los 110 días. Esto coincide con lo expuesto por Stathers et al. (28) quienes manifestaron que el almacenamiento de las batatas frescas afecta sólo en forma leve el contenido de β -caroteno. Al igual que en los parámetros descriptos anteriormente, no se registraron diferencias significativas entre las batatas almacenadas en cámara y pila.

Correlación entre el contenido de carotenos totales y las variables de color

Se analizó la correlación entre las variables de color y el contenido de carotenos totales de los tres cultivares evaluados al momento de cosecha y durante el almacenamiento del cultivar *Beauregard*. Se observó que los parámetros a^* y b^* presentaron buena correlación, con valores de R^2 superiores a 0.90, lo que permitiría asociar altos valores de a^* y b^* a un mayor componente rojo y amarillo respectivamente.

En la **figura 3** se muestran las correlaciones entre estas variables y el contenido de carotenos totales. Las expresiones matemáticas fueron:

$$Y = 0,0199x + 33,4 \quad R^2 = 0,923 \quad \text{para } b^*$$

$$Y = 0,0240x + 4,34 \quad R^2 = 0,944 \quad \text{para } a^*$$

Estos resultados coinciden con los de otros estudios (29, 19) en los que se reportaron elevados coeficientes de determinación para las correlaciones de las variables a^* y b^* con el contenido de β -caroteno en cultivares de pulpa naranja y amarilla.

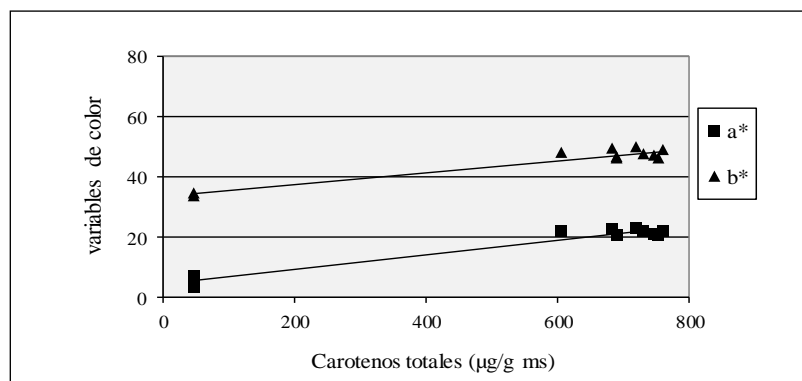


Figura 3: Correlación entre el contenido de carotenos totales y las variables de color en los cultivares *Beauregard*, *Arapey* y *Morada* INTA.

CONCLUSIONES

El contenido de carotenos en las batatas del cultivar *Beauregard* supera ampliamente los contenidos de los cultivares de pulpa amarilla que se consumen tradicionalmente en nuestro país. Debido a su elevado valor, podrían constituir una fuente importante de vitamina A. Además, el almacenamiento no afecta en gran medida el contenido de este compuesto, registrándose inclusive, leves incrementos en el mismo, tanto en las batatas almacenadas en cámara como en pila.

BIBLIOGRAFÍA

1. Padmaja, G. (2009). Uses and Nutritional Data of Sweetpotato. En: Loebenstein G, Thottappilly G editors. The sweetpotato. Berlin: Springer. Pag. 189-234.
2. Elahi, M.M., Malata, B.M. (2006). Free radicals in blood: evolving concepts in the mechanism of ischemic heart disease. Archives of Biochemistry and Biophysics. 450: 78-88.
3. Thrasivoulou, C., Soubeyre, V., Ridha, H., Giuliani, D., Giaroni, C., Michael, G.J., Saffrey, M.J., Cowen, T. (2006). Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons. Aging Cell. 5: 247-257.
4. Ames, B.M., Shigena, M.K., Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidant and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90:7915-7922.
5. Rodriguez-Amaya D.B. (1997). Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods. Arlington: John Snow, Inc. pag 1-88.
6. Wu, X., Sun, C., Yang, L., Zeng, G., Liu, Z., Li, Y. (2008). β -carotene content in sweet potato varieties from China and the effect of preparation on β -carotene retention in the Yanshu No. 5. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9: 581-586.
7. Van Jaarsveld, P.J., Faber, M., Tanumihardjo, S.A., Nestel, P., Lombard, C.J., Benade, A.J. (2005). Carotene-rich orange-fleshed sweet potato improves the vitamin A status of primary school children assessed with the modified-relative-dose-response test. The American Journal of Clinical Nutrition, 81: 1080-1087.
8. Takenaka, M., Nanayana, K., Isobe, S., Murata, M. (2006). Changes in caffeic acid derivatives in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) during cooking and processing. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 70: 172-177.
9. Huang, Y.H., Picha, D.H., Johnson, C.E. (1998). An alternative method for enzymatic assay of plant invertases. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 3158-3161.
10. Kidmose, U., Christensen, L.P., Agili, S.M., Thilsted, S.H. (2007). Effect of home preparation practices on the content of provitamin A carotenoids in coloured sweet potato varieties (*Ipomoea batatas* Lam.) from Kenya. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 8:399-406.
11. Bovell-Benjamin, A.C. (2007). Sweet potato: A review of its past, present, and future role in human nutrition. Advances in Food and Nutrition Research, 52: 1-59.
12. AOAC. Association of the Official Analytical Chemists (1990). Official methods of analysis of the association of official analytical Chemists. 15th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists.
13. Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16:144-158.
14. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology, 28: 25-30.

15. Rodriguez-Amaya, D.B., Kimura, M. (2004). Harvestplus Handbook for Carotenoid Analysis. HarvestPlus Technical Monograph 2. Washington, DC: International Food Policy Research Institute and International Center for Tropical Agriculture. pag 1–58.
16. Padda, M.S., Picha, D.H. (2008a). Effect of low temperature storage on phenolic composition and antioxidant activity of sweetpotatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 47:176–180.
17. Padda, M.S., Picha, D.H. (2008c). Quantification of phenolic acids and antioxidant activity in sweetpotato genotypes. *Scientia Horticulturae*, 119: 17–20.
18. Grace, M.H., Yousef, G.G., Gustafson, S.J., Truong, V.D., Yencho, G.C., Lila, M.A. (2014). Phytochemical changes in phenolics, anthocyanins, ascorbic acid and carotenoids associated with sweetpotato storage and impacts on bioactive properties. *Food Chemistry*, 145: 717-724.
19. Hagenimana, V., Carey, E.E., Gichiki, S.T., Oyunga, M.A., Imungi, J.K. (1999). Carotenoid content in fresh, dried and processed sweet potato products. *Ecology of Food and Nutrition*, 37: 455-473.
20. De Moura, F., Miloff, A., Boy, E. (2015). Retention of Provitamin A Carotenoids in Staple Crops Targeted for Biofortification in Africa: Cassava, Maize and Sweet Potato. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55: 1246-1269.
21. K'osambo, L.M., Carey, E.E., Mirsa, A.K., Wilkes, J., Hagenimana, V. (1998). Influence of age, farming site, and boiling on ro-vitamin A content in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) storage roots. *Journal of Food Composition and Analysis*, 11:305–321.
22. Takahata, Y., Nota, T., Nagata, T. (1993). HPLC determination of β -carotene content of sweet potato cultivars and its relationship with color values. *Japanese Journal of Breeding*, 43: 421-427.
23. Trumbo, P., Yates, A.A., Schlicker, S., Poos, M. (2001). Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Journal of the American Dietetic Association*, 101:294–301.
24. Mozafar, A. (1994). Plant vitamins. Agronomic, physiological and nutritional aspects. Florida: CRC Press, Inc. pag 19–87.
25. Ishiguro, K., Yahara, S., Yoshimoto, M. (2007). Changes in Polyphenolic Content and Radical-Scavenging Activity of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) during Storage at Optimal and Low Temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 10773–10778.
26. Lieberman, M., Craft, C., Wilcox, MS. (1959). Effect of chilling on the chlorogenic acid and ascorbic acid content of Port Rico sweetpotatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 74: 642–648.
27. Lattanzio, V., Cardinali, A., Palmieri, S. (1994). The role of phenolics in the postharvest physiology of fruits and vegetables: browning reactions and fungal diseases. *Italian Journal of Food Science*. 6: 3–22.
28. Stathers, T., Bechoff, A., Sindi, K., Low, J., Ndyetabula, D. (2013). Everything You Ever Wanted to Know about Sweetpotato: Reaching Agents of Change ToT Manual. Nairobi: International Potato Center. Pag. 188.
29. Ameny, M.A., Wilson, P.W. (1997). Relationship between Hunter color values and b-carotene contents in white-fleshed African sweetpotatoes (*Ipomoea batatas* Lam). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73: 301–306.

VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN DOS CULTIVARES DE BATATA (*IPOMOEA BATATA L.*) DURANTE EL PROCESADO TÉRMICO PARA LA ELABORACIÓN DE DULCE.

J. Gabilondo ¹, G. Corbino ¹, H. Marti ¹, L. Malec ²

¹Estación Experimental Agropecuaria INTA San Pedro- Buenos Aires.

²Dpto. Química Orgánica. FCEyN. Universidad de Buenos Aires.

Correo electrónico: gabilondo.julieta@inta.gob.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la variación del contenido de polifenoles totales (PFT) y la actividad antioxidante (AA) en dos cultivares de batata de pulpa color naranja (*Beauregard* y *Colorado INTA*) durante las distintas etapas de la elaboración de dulce utilizando pulpa con y sin piel. Se analizó además la influencia del agregado de sacarosa en la variación de los parámetros anteriormente mencionados. El contenido de PFT se determinó con el reactivo de Folin-Ciocalteu y la AA mediante la reducción del radical del hidrato de 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH·). El contenido de PFT y la AA en el cultivar *Colorado INTA* fueron considerablemente mayores que en *Beauregard*. Los valores de ambos parámetros en todos los dulces fueron significativamente menores ($p < 0,05$) que los productos crudos, siendo las pérdidas mayores en *Beauregard* que en *Colorado INTA*. El efecto la cocción con vapor fue diferente para cada cultivar ya que en *Beauregard*, el contenido de PFT y la AA disminuyeron y en la batata entera de *Colorado INTA* se incrementaron. Durante el procesamiento, las disminuciones más importantes se produjeron luego del agregado del azúcar. Por lo tanto, para reducir las pérdidas de PFT y la AA en el dulce de batata debería considerarse reducir el tiempo de cocción del puré con el azúcar o analizar el efecto de otros edulcorantes nutritivos. Además de utilizar cultivares, como *Colorado INTA*, con mejores propiedades funcionales.

Palabras clave: capacidad antioxidante, polifenoles totales, *Ipomoea batata L.*, dulce de batata

ABSTRACT

The objective of this work was study the variation of the content of total polyphenols (TPP) and the antioxidant activity (AA) in two orange-fleshed sweetpotato cultivars (*Beauregard* and *Colorado INTA*) during the different stages of the elaboration of sweetpotato paste using pulp with and without skin. The influence of the aggregated sucrose was also analyzed on the variation of the aforementioned parameters. The content of TPP was determined with the Folin-Ciocalteu reagent and the AA by reducing the radical of the 2,2-diphenyl-1-picryl hydracil hydrate (DPPH·). The content of TPP and AA in the *Colorado INTA* cultivar was considerably higher than in *Beauregard*. The values of both parameters in all the sweetpotato pastes were significantly lower ($p < 0.05$) than the raw products, being greater the losses in *Beauregard* that in *Colorado INTA*. The effect of steam cooking was different for each cultivar since in *Beauregard*, the PPT content and the AA decreased and in the whole *Colorado INTA* sweetpotato they increased. During processing, the most important decreases happened after the addition of sugar. Therefore, to reduce losses of PPT and AA in sweet potato paste should be considered to reduce the cooking time of the puree with sugar or to analyze the effect of other nutritive sweeteners. Also to using cultivars, such as *Colorado INTA*, with better functional properties.

Keywords: antioxidant capacity, total polyphenols, *Ipomoea batata L.*, paste sweet potato

INTRODUCCIÓN

Los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno que se forman naturalmente durante el metabolismo humano, provocan daños en las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos de las estructuras biológicas induciendo una variedad de enfermedades en el hombre (1, 2). Los compuestos antioxidantes actúan como eliminadores de radicales libres y/o inhibidores de las especies reactivas del oxígeno contribuyendo a prevenir el riesgo de enfermedades crónicas, como cardiovasculares, cáncer y aquellas relacionadas con la degeneración neuronal (3). Debido a que algunos antioxidantes sintéticos han demostrado ser tóxicos y presentar efectos mutagénicos (4), en los últimos años se ha incrementado el interés por los antioxidantes de origen natural como los que se encuentran en frutas, vegetales y bebidas. La batata (*Ipomoea batata L.*; *Lam*) es una raíz rica en fibra dietaria, minerales, almidón, vitaminas y compuestos con actividad antioxidante, como ácidos fenólicos, antocianinas y β -caroteno (5, 6). Se consume utilizando diferentes sistemas de cocción: hervido, horneado, frito o en productos procesados tales como tortas, dulces o jugos. La dulzura natural de muchas variedades de batata posibilita la preservación de las raíces por la adición de azúcar para obtener una variedad de productos confitados, como caramelos, mermeladas y dulces, que son especialmente populares en América Latina y particularmente en Argentina. Algunas investigaciones revelan una marcada variación tanto del contenido en polifenoles como de la actividad antioxidante en frutos y vegetales debido a distintos tratamientos térmicos, como hervido, cocción por microondas, horneado y freído (7, 8, 9). Turkmen y col. (10) estudiaron el efecto de

distintos métodos de cocción sobre el contenido de éstos parámetros en distintas especies vegetales (pimientos, brócoli, apio, arvejas, espinaca, etc.) y encontraron que el incremento o la disminución de ambos parámetros dependía de la especie y no del tratamiento térmico. En batata, estos efectos difieren entre cultivares, incluso entre las distintas partes de una misma raíz. En el cultivar *Beauregard*, Bellail y col. (11) observaron que el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante en la pulpa aumentaron luego de aplicar distintos tratamientos térmicos; por otro lado, Padda y Picha (12) encontraron que ambos parámetros disminuyeron en la piel de este cultivar, cuando se aplicaron los mismos tratamientos térmicos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la variación del contenido de polifenoles totales (PFT) y la actividad antioxidante (AA) en dos cultivares de batata de pulpa color naranja de importancia comercial para el norte de la provincia de Buenos Aires (*Beauregard* y *Colorado INTA*), durante las distintas etapas de la elaboración de dulce utilizando pulpa con y sin piel. Se analizó además la influencia del agregado de sacarosa en la variación de los parámetros anteriormente mencionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de humedad

Se determinó según AOAC (13), secado de las muestras en estufa de vacío (100 mmHg) a 70 °C hasta obtener peso constante.

Preparación de muestras vegetales

Se utilizaron muestras de los cultivares *Beauregard* y *Colorado INTA* cultivados en idénticas condiciones. Para el análisis de las muestras crudas se tomaron al azar, 10 batatas por cultivar. Cada muestra se formó utilizando un cuarto de c/u y se congeló piel y pulpa por separado en N₂ líquido. Las muestras congeladas fueron liofilizadas, trituradas y almacenadas a -20 °C hasta su análisis.

Preparación del dulce

Las batatas, con y sin piel, se vaporizaron 28 minutos a 94,5 °C en cacerola doméstica con soporte vaporizador. Al finalizar la cocción se las trituró hasta obtener un puré cremoso. Para elaborar el dulce se procedió a pesar 100g de puré con 70g azúcar blanca, se mezcló hasta homogenizar y se calentó 2 minutos en microondas. Luego se adicionaron 2g de agar-agar disueltos en 50 ml de agua, se homogenizó y calentó nuevamente 1 minuto en microondas. Se refrigeró hasta gelificación y se almacenó a -20 °C hasta su uso. En paralelo se realizó el mismo proceso omitiendo el agregado de sacarosa.

Preparación de los extractos

Se pesó aproximadamente 1g del material crudo y 10 g del obtenido luego de cada tratamiento térmico. Las muestras se trataron con metanol 80% (v/v) durante 15 minutos a 80 °C y el sobrenadante se separó por centrifugación, 15 minutos a 3500 rpm. Las extracciones se realizaron por triplicado.

Determinación de polifenoles totales

Se realizó por triplicado con el reactivo de Folin-Ciocalteu de acuerdo al método de Singleton y Rossi (14) con algunas modificaciones, utilizando ácido clorogénico como estándar. A 250 µl de extracto se le agregaron 4 ml de agua destilada y 250 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego de 3 minutos, se incorporaron 500 µL de Na₂CO₃ 1N, se mantuvo 120 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 25. La curva estándar se realizó utilizando concentraciones de ácido clorogénico desde 75 hasta 400 mg/L. El contenido total de polifenoles se informó como mg de ácido clorogénico por g base seca (b.s.).

Determinación de la actividad antioxidante

Se analizó por triplicado mediante la reducción del radical DPPH· de acuerdo al método de Brand-Williams y col. (15). A 400µl de extracto se le agregaron 3,6 ml de DPPH· 0,1 mM, se mantuvo en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 25. La AA se calculó usando una curva estándar con concentraciones de TROLOX desde 20µM hasta 450 µM. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de TROLOX por g bs.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics Plus (5.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 figuran los contenidos de polifenoles totales/g bs para la piel, pulpa y batata entera (con piel) crudas de los cultivares (*cv*) *Beauregard* y *Colorado INTA* y en la Tabla 2 se muestra la AA/g bs para las mismas muestras. El contenido de PFT y la AA en la pulpa del *cv Colorado INTA* resultaron significativamente mayores ($p < 0,05$) que en la del *cv Beauregard*. Padda y Picha (12) reportaron una amplia variabilidad en el contenido de PFT y AA para distintos genotipos de batatas con pulpa color naranja. A su vez, estudios previos encontraron que las batatas de pulpa color púrpura presentan mayores concentraciones de PFT y AA que las de pulpa color naranja y blanca (17-20). Estos mayores valores estarían asociados a la presencia de compuestos fenólicos, principalmente antocianinas (21). Por lo tanto, los mayores valores de PFT y la AA en el *cv Colorado INTA* podrían atribuirse a la presencia de vetas color púrpura, que no fueron observadas en el *cv Beauregard*. Los valores en piel en cambio, no evidenciaron diferencias entre ambos cultivares ($p > 0,05$), aunque fueron muy superiores a los obtenidos en pulpa. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Padda y Picha (22, 23) quienes reportaron que el contenido de PFT y la AA fueron bastante mayores en el tejido de la piel que en la pulpa del *cv Beauregard*. Algunos autores también encontraron diferencias en la AA y el contenido de PFT dentro de la pulpa de una misma raíz, pudiendo variar de médula a corteza (23, 24, 25). Walter y Schadel (26) y Harrison y col. (27) han atribuido los mayores valores de PFT registrados en los tejidos de la piel de la batata a un mecanismo de defensa química natural de la misma contra enfermedades e insectos. El alto contenido

de compuestos fenólicos en la piel podría despertar el interés de las industrias en utilizar extractos de la misma para su incorporación en diversos alimentos con el fin de aprovechar su potencial antioxidante natural y a su vez, minimizar los residuos industriales.

Tabla 1. Contenido de polifenoles totales de piel, pulpa y batata entera cruda expresados en mg equivalentes de ácido clorogénico /g b.s.

Cultivar	Piel	Pulpa	Entera
<i>Colorado INTA</i>	14,3 ± 1,5	5,78 ± 0,19	6,11 ± 0,26
<i>Beauregard</i>	14,1 ± 1,4	2,15 ± 0,13	2,74 ± 0,20

Cada valor es el promedio ± la Desviación Estándar de los resultados obtenidos

Tabla 2. Actividad antioxidante de piel, pulpa y batata entera expresada en mg equiv. TROLOX /g b.s.

Cultivar	Piel	Pulpa	Entera
<i>Colorado INTA</i>	14,2 ± 1,5	7,14 ± 0,23	7,53 ± 0,31
<i>Beauregard</i>	16,0 ± 1,3	2,55 ± 0,24	3,34 ± 0,30

Cada valor es el promedio ± la Desviación Estándar de los resultados obtenidos

En las Fig 1 y 2 se grafican los contenidos de polifenoles totales y la actividad antioxidante en las muestras de pulpa y batata entera crudas, luego de la cocción con vapor, dulces y procesadas sin agregado de azúcar de los cultivares *Beauregard* y *Colorado INTA*. Puede observarse en todas las muestras analizadas, que el cultivar *Colorado INTA* presentó valores de PFT y AA significativamente mayores ($p < 0,05$) que los del cultivar *Beauregard*. En el cultivar *Beauregard* ambos parámetros disminuyeron luego de la cocción con vapor, provocando una merma del 22% y 31% para la batata entera y 42% y 55% para la pulpa. En cambio, en el cultivar *Colorado INTA* frente a los mismos métodos de cocción, el contenido de PFT y la AA, en la pulpa disminuyeron un 7% y 15% y en la batata entera se incrementaron un 18% y 14% respectivamente. Probablemente las diferencias encontradas entre ambos cultivares se deba a una distinta composición en PFT. En concordancia con estos resultados, Shih y col (28) encontraron que el contenido de los PFT y la AA luego del tratamiento térmico disminuyeron en un cultivar de pulpa naranja y no presentaron diferencias en otro de pulpa amarilla. Además, puede observarse en ambos cultivares que el contenido de PFT y la AA resultaron más elevados ($p < 0,05$) en las muestras de batata entera que en las de pulpa. Jung y col. (25) observaron, en ocho cultivares de origen coreano, que el contenido de ambos parámetros disminuyó durante todos los tratamientos térmicos y lo atribuyeron, además de a la degradación de los PFT por efecto del calor, a la acción de la polifenoloxidasas sobre estos compuestos. Por lo tanto, la mayor disminución de estos parámetros en la pulpa podría atribuirse a la descompartimentalización de la polifenoloxidasas durante el pelado para la separación de la pulpa.

El incremento observado en el cv *Colorado INTA* coincide con otros autores que reportaron aumentos en estos parámetros durante distintos tratamientos térmicos y los atribuyeron a la formación de nuevos compuestos fenólicos y/o rotura de las uniones de los polifenoles presentes por acción del calor generando nuevos sitios activos (11, 18, 29, 30, 31, 32).

Al elaborar el dulce a partir de las muestras cocidas con vapor, se observó una pérdida importante en el contenido de PFT y la AA. En el cultivar *Beauregard*, ambos parámetros se redujeron un 38% y 21% respectivamente en el dulce elaborado con la batata entera y un 31% y 8% en el dulce elaborado con pulpa. En el cultivar *Colorado INTA*, el contenido de PFT y la AA disminuyó 39% y 40% para el dulce elaborado con la batata entera y 26% y 29% para el dulce elaborado con pulpa. Para analizar si esta disminución se debió al agregado de azúcar o a la prolongación del tratamiento térmico, se comparó el contenido en PFT y la AA del dulce con las batatas procesadas de la misma forma, sin agregado de azúcar. Puede observarse (fig. 1 y 2) que el dulce elaborado con batatas del cultivar *Beauregard*, con y sin piel, presentaron un menor contenido de PFT y de AA, 49% y 35% para la batata entera y 53% y 27% para la pulpa respectivamente, con respecto a las batatas procesadas sin el agregado de azúcar. En el cultivar *Colorado INTA*, los parámetros mencionados disminuyeron 68% y 52% para la batata entera y 66% y 39% para la pulpa. Por lo tanto, el agregado de azúcar incrementa la pérdida del contenido de PFT y la AA. A diferencia de los resultados obtenidos durante la cocción por vapor, durante la elaboración del dulce, las mayores pérdidas ocurrieron en el cultivar *Colorado INTA*, posiblemente debido a la presencia de antocianinas. La estabilidad de estas últimas se ve afectada por varios factores durante el procesado de alimentos como pH., temperatura, luz, oxígeno, iones metálicos, enzimas y azúcares (33). Nuestros resultados coinciden con lo observado por Kim y Padilla-Zakour, (34) durante la elaboración de mermelada con berries, quienes manifestaron que la disminución del contenido de compuestos fenólicos, principalmente antocianinas, se debió al calentamiento con altas concentraciones de azúcar. Algunos autores indicaron además, que la degradación térmica de las antocianinas aumenta con la concentración de sólidos solubles (33, 35).

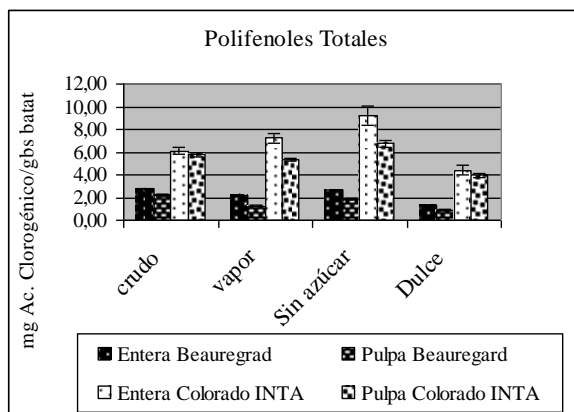


Figura 1. Contenido de polifenoles totales expresados en mg de equivalente de ácido clorogénico / g bs batata en las muestras de pulpa y batata entera durante el procesamiento

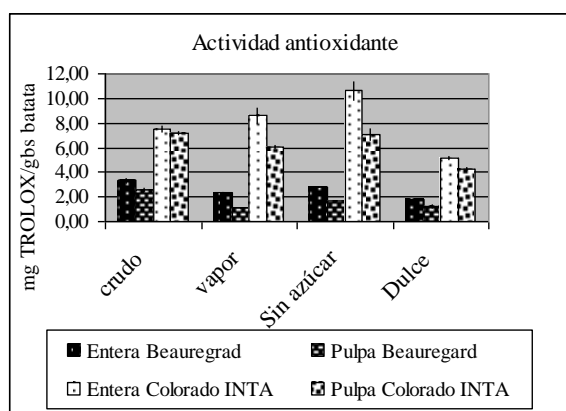


Figura 2. Actividad antioxidante expresada en mg de equivalente de TROLOX / g bs batata en las muestras de pulpa y batata entera durante el procesamiento

CONCLUSIONES

El cv *Colorado INTA*, con vetas color púrpura, resultó más rico en PFT que el cv *Beauregard*, tanto en las muestras crudas como procesadas. El efecto de la cocción con vapor fue diferente para cada cultivar; en *Beauregard* el contenido de PFT y la AA disminuyeron mientras que en batata entera de *Colorado INTA* se incrementaron. Durante el procesamiento, las disminuciones más importantes se produjeron luego del agregado del azúcar. Por lo tanto, para disminuir las pérdidas de PFT y la AA en el dulce de batata debería considerarse reducir el tiempo de cocción del puré con el azúcar o analizar el efecto de otros edulcorantes nutritivos. Además de utilizar cultivares, como *Colorado INTA*, con mejores propiedades funcionales.

REFERENCIAS

1. Elahi, M.M.; Matata, B.M. (2006). Free radicals in blood: evolving concepts in the mechanism of ischemic heart disease. Arch. Biochem. Biophys. 450: 78-88.
2. Thrasyvoulou, C.; Soubeyre, V.; Ridha, H.; Giuliani, D.; Giaroni, C.; Michael, G.J.; Saffrey, M.J.; Cowen, T. (2006). Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons. Aging Cell. 5: 247-257.
3. Ames, B.M.; Shigena, M.K.; Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidant and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90:7915-7922.
4. Krishnakumar, V.; Gordon, I. (1996). Antioxidants – trends and developments. International Food Ingredients, 12: 41-44.
5. Ishida, H.; Suzuno, H.; Sugiyama, N.; Innami, S.; Tadokoro, T.; Maekawa, A. (2000). Nutritional evaluation on chemical components of leaves stalks and stems of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* Poir). Food Chemistry, 68:359-367.
6. Bovell-Benjamin, A.C. (2007). Sweet potato: A review of its past, present, and future role in human nutrition. Advances in Food and Nutrition Research, 52:1-59.

7. Young, G.S.; Jolly, P.G. (1990). Microwaves: the potential for use in dairy processing. *Austrian J Dairy Technol* 45:34–7.
8. Makris, D.P.; Rossiter, J.T. (2001). Domestic processing of onion bulbs (*Allium cepa*) and asparagus spears (*Asparagus officinalis*): effect on flavonol content and antioxidant status. *J Agric Food Chem* 49:3216–22.
9. Zhan, D.; Hamauzu, Y. (2004). Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chem* 88:503–9.
10. Turkmen, N.; Sari, F.; Velioglu, S. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*. 93:713–718.
11. Bellail, A.A.; Shaltout, O.A.; Youssef, M.M.; El Gamal, A.M.A. (2012). Effect of Home-Cooking Methods on Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) Cultivars Grown in Egypt. *Food and Nutrition Sciences*, 3: 490–499.
12. Padda, M.S.; Picha, D.H.; (2008b). Phenolic composition and antioxidant capacity of different heat-processed forms of sweetpotato cv. Beauregard. *International Journal of Food Science and Technology*. 43:1404–1409.
13. A.O.A.C., Association of the Official Analytical Chemists. (1990). 920.151. Official Methods of the Association of the Official Analytical Chemists, Ed. Horwitz, W., 14th ed., Washington, DC.
14. Singleton, V.L.; Rossi, J.A.Jr. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144–158.
15. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science Technology*, 28:25–30.
16. Padda, M. S.; Picha, D. H. (2008c). Quantification of phenolic acids and antioxidant activity in sweetpotato genotypes. *Scientia Horticulturae* 119:17–20.
17. Furuta, S.; Suda, I.; Nishiba, Y.; Yamakawa, O. (1998). High tertbutylperoxyl radical scavenging activities of sweetpotato cultivars with purple flesh. *Food Science and Technology International of Tokyo*, 4: 33–35.
18. Huang, Y.C.; Chang, Y.H.; Shao, Y.Y. (2006). Effects of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in Taiwan. *Food Chemistry* 98:529–538.
19. Teow, C.C.; Truong, V.D.; McFeeters, R.F.; Thompson, R.L.; Pecota, K.V.; Yencho, G.C. (2007). Antioxidant activities, phenolic and b-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry* 103:829–838.
20. Rumbaoa, R.G.O.; Cornago, D.F.; Geronimo, I.M. (2009). Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (*Ipomoea batatas*) varieties *Food Chemistry*, Volume 113, Issue 4, 15:1133–1138.
21. Oki, T.; Masuda, M.; Furuta, S.; Nishiba, Y.; Terahara, N.; Suda, I. (2002). Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radical-scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars. *J. Food Sci.* 67:1752–1756.
22. Padda, M.S.; Picha, D.H. (2008a). Effect of low temperature storage on phenolic composition and antioxidant activity of sweetpotatoes. *Postharvest Biology and Technology* 47:176–180.
23. Padda, M.S.; Picha, D.H. (2007). Antioxidant Activity and Phenolic Composition in ‘Beauregard’ Sweetpotato Are Affected by Root Size and Leaf Age. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 132(4):447–451.
24. Harrison, Jr.H.F.; Mitchell, T.R.; Peterson, J.K.; Wechter, W.P.; Majetich, G.F.; Snook, M.E. (2008). Contents of Caffeoylquinic Acid Compounds in the Storage Roots of Sixteen Sweetpotato Genotypes and Their Potential Biological Activity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133(4):492–500.
25. Jung, J.K.; Lee, S.U.; Kozukue, N.; Levin, C.E.; Friedman, M. (2011). Distribution of phenolic compounds and antioxidative activities in parts of sweet potato (*Ipomoea batata* L.) plants and in home processed roots. *J. of Food Composition and Analysis* 24: 29–37.
26. Walter, W.M.; Schadel, W.E. (1981). Distribution of phenols in ‘Jewel’ sweet potato [*Ipomoea batatas* Lam.] roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29: 904–906.
27. Harrison, H.F.; Peterson, J.K.; Snook, M.E.; Bohae, J.R.; Jackson, D.M. (2003). Quantity and potential biological activity of caffeic acid in sweet potato storage root periderm. *J. Agr. Food Chem.* 51:2943–2948.
28. Shih, M.C.; Kuo, C.C.; Chiang, W. (2009). Effects of drying and extrusion on colour, chemical composition, antioxidant activities and mitogenic response of spleen lymphocytes of sweet potatoes. *Food Chemistry* 117:114–121.
29. Rautenbach, F.; Faber, M.; Laurie, S.; Laurie R. (2010). Antioxidant Capacity and Antioxidant Content in Roots of 4 Sweetpotato Varieties. *Journal of Food Science*, Vol. 75. 5: 400–405.
30. Dincer, C.; Karaoglan, M.; Erden, F.; Tetik, N.; Topuz, A.; Ozdemir, F. (2011). Effects of Baking and Boiling on the Nutritional and Antioxidant Properties of Sweet Potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] Cultivars. *Plant Foods Hum Nutr.* 66:341–347.
31. Tokusoglu O.; Yildirim Z. (2012). Effects of cooking methods on the anthocyanin levels and antioxidant activity of a local Turkish sweet [*Ipomoea batatas* (L.) LAM] cultivar HATAY KIRMIZI: boiling, steaming and frying effects. *Turkish Journal of Field Crops*. 17(1):87–90.
32. Wang, T.H.; Chen, B.Y.; Shen, Y.P.; Wong, J.J.; Yang, C.C.; Lin, T.C. (2012) Influences of superheated steaming and roasting on the quality and antioxidant activity of cooked sweet potatoes. *I. J. of Food Science and Technology*, 47:1720–1727.
33. Rhim J-W. (2002). Kinetics of thermal degradation of anthocyanin pigment solutions driven from red flower cabbage. *Food Sci Biotechnol* 11:361–4.
34. Kim, D.O.; Padilla-Zakour, O.I. (2004). Jam Processing Effect on Phenolics and Antioxidant Capacity in Anthocyanin-rich

Fruits: Cherry, Plum, and Raspberry. *Journal of Food Science*. Vol. 69:9, 395-400.

35. Cemeroglu, B.; Velioglu, S.; Isik, S. (1994). Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. *J Food Sci* 59:1216–8.

La investigación y desarrollo en el ámbito de la Ciencia y Tecnología de Alimentos es un proceso que involucra la acción conjunta y articulada de una multiplicidad de actores, ,entre otros, los organismos de Ciencia y Técnica, las Universidades y el Sector Productivo; cuyo resultado origina la generación de nuevas ideas, productos y servicios.

El Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria promueve y potencia esas interacciones principalmente a través de proyectos desarrollados en el marco de su estructura Programática.

En este libro se propone un recorrido de los avances logrados en materia de diferenciación de alimentos y desarrollo de nuevos productos alimentarios como resultado de las acciones generadas en el marco del Programa Nacional de AgroIndustria y Agregado de Valor.