

ISSN 1688-3691 | ISSN 1510-6593 [en línea]

Número 6  
Diciembre 2011

# INNOTEC

REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY



# INDICE

**INNOTEC (ISSN 1688-3691 | ISSN 1510-6593 [en línea]) es una revista científica arbitrada del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU).**

Esta publicación anual recopila las investigaciones realizadas por técnicos del LATU y autores externos con el objetivo de apoyar el desarrollo de tecnologías que aporten valor a los procesos de innovación.

Este número incluye como artículo invitado la investigación que recibió el primer premio al trabajo innovador por el comité científico de INNOVA 2011, V Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos (LATU, Montevideo, 11 a 13 de octubre de 2011).

Invitamos a los autores interesados en publicar en INNOTEC a contactarse con el Centro de Información Técnica a través del correo electrónico [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy) para recibir las Instrucciones a los autores (ver pág. 2) y los documentos de referencia de nuestro proceso editorial.

## Dirección

Ing. Mariela de Giuda, MBA

Gerente Gestión Empresarial

## Coordinación

Lic. Celeste Villagrán

Jefe del Centro de Información Técnica, LATU

## Edición

Lic. Marina Barrientos (edición)

Lic. Lorena Fiori (producción)

## Diseño

[veja.com.uy](http://veja.com.uy)

Centro de Información Técnica, LATU

Avda. Italia 6201. Tel.: (598) 2601 3724, int. 1364

[ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy)

[www.latu.org.uy](http://www.latu.org.uy)

[www.facebook.com/citein.latu](http://www.facebook.com/citein.latu)

[citein.blogspot.com](http://citein.blogspot.com)

<http://ojs.latu.org.uy/>

La distribución de esta revista es gratuita; para solicitar un ejemplar diríjase a [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy). Si desea consultar nuestra colección completa en línea puede hacerlo en <http://ojs.latu.org.uy>. Prohibida la reproducción total y parcial de artículos y/o materiales gráficos originales sin mencionar su procedencia. Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos son de responsabilidad de sus autores.

Todos los derechos reservados.

ISSN: 1688-3691

Título-clave: INNOTEC

Título-clave abreviado: Innotec

ISSN: 1510-6593

Título-clave: Innotec [en línea]

Título-clave abreviado: Innotec [en línea]

Instrucciones a los autores.....	2
Índice de autores.....	65
Índice temático .....	66

## TECNOLOGÍA ALIMENTARIA

- 3 Caracterización fisicoquímica y nutricional del fruto *Butia capitata* y de su pulpa tamizada  
*Crosa, M.J.; Burzaco, P.; Pastorino, N.; Irisity, M.; Gioscia, D.; Ayres, C.*
- 7 Desestabilización de emulsiones aceite-agua preparadas con proteínas de soja  
*Abirached, C.; Medrano, A.; Panizzolo, L.A.; Moyna, P.; Añón, M.C.*
- 11 Efecto de la dieta de cerdos en crecimiento sobre el valor nutritivo y la aptitud tecnológica de la carne y grasa  
*Capra, G.; Repiso, L.; Fradiletti, F.; Martínez, R.; Cozzano, S.; Márquez, R.*
- 21 Estabilidad de emulsiones preparadas con proteínas de sueros de soja  
*Wagner, J.R.; Sobral, P.A.*
- 24 Evolución de la proteólisis durante la maduración de quesos Danbo elaborados con distintos cultivos iniciadores  
*Panizzolo, L.A.; Araújo, A.C.; Taroco, L.V.; Rodríguez, A.; Schöpf, G.*
- 28 Influencia del pH en la estabilidad de emulsiones elaboradas con proteínas de salvado de arroz  
*Maldonado, L.; Latorre, K.; Rocha, P.; Medrano, A.; Abirached, C.; Panizzolo, L.A.*
- 32 Obtención de péptidos antioxidantes de glicinina de soja  
*Medrano, A.; del Castillo, M.D.*

## BIOTECNOLOGÍA

- 37 Encapsulación de quercetina en nano y micro-emulsiones alimenticias  
*Xavier, M.P.; Miraballes, I.; Pardo, H.; Mombrú, A.; López, T.; Medrano, C.A.*
- 42 Propiedades antioxidantes e inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA I) de fracciones ultrafiltradas de hidrolizados de hemoglobina bovina  
*Cian, R.E.; Drago, S.R.; González, R.J.*
- 47 Puesta a punto del método de PCR en tiempo real para la cuantificación de *Aspergillus carbonarius* en uvas *Vitis vinifera* cv. Tannat  
*Garmendía, G.; Vero, S.*

## MEDIO AMBIENTE

- 51 Las arañas en agroecosistemas: bioindicadores terrestres de calidad ambiental  
*Simó, M.; Laborda, A.; Jorge, C.; Castro, M.*
- 56 Triterpenoides de frutos de *Melia azedarach*: su potencial como agentes de control de insectos  
*Díaz, M.; Rossini, C.*

## INNOVA 2011

- 60 Desarrollo de "espumante de naranja" como alternativa biotecnológica en la actividad citrícola regional  
*Stefani Leal, A.; Cayetano Arteaga, M.C.; Schwab, M. del C.; Ferreyra, M.M.*

# Instrucciones a los autores para publicar en INNOTEC

## Ámbito de los artículos y proceso de revisión

INNOTEC publica artículos originales inéditos o artículos editados y autorizados por el correspondiente comité editor dentro de los campos de interés de la institución. Esta publicación anual recopila las investigaciones realizadas por técnicos del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) y autores externos en el marco de distintos proyectos.

El proceso de revisión de esta revista comienza con el (a) envío por parte del autor de su texto completo, por vía electrónica, a [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy). El Centro de Información Técnica (CITEIN) del LATU notifica al autor la recepción del texto de acuerdo al acuse de recibo de trabajos originales para su eventual publicación, y remite el artículo al miembro idóneo del (b) comité técnico editorial árbitro del proceso editorial de Innotec), quien evaluará el desarrollo específico del mismo, tanto en sus aspectos temáticos como metodológicos. El (c) responsable editorial se comunica con el autor en respuesta a los comentarios que hace el evaluador del artículo. El (d) CITEIN edita el artículo aplicando en el texto las normas del manual de estilo, y envía la última versión revisada al autor para su aprobación final.

Se debe considerar para poder incluir artículos completos que los mismos no deberán tener derechos de autor otorgados a terceros a la fecha de envío del artículo. Los autores deberán firmar un formulario de cesión de derechos autorales y enviarlo a [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy). En el caso de artículos con derechos de autor, sólo se publicarán aquellos que cuenten con autorización expresa de la empresa a cargo de su edición.

Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos publicados y el uso que otros puedan hacer de ellos son de responsabilidad de sus autores. Esta responsabilidad se asume con la sola publicación del artículo enviado.

LATU se reserva el derecho de publicar aquellos artículos que responden a las áreas estratégicas fijadas por la organización para cada edición y de realizar modificaciones que considere favorables a la óptima presentación de los contenidos en la revista.

Los artículos son publicados en papel y on line, en el caso de artículos on line los mismos son publicados bajo la modalidad de acceso abierto, estando los autores protegidos por Creative Commons (CC) que se indica en el sistema de procesamiento del artículo.

## Normas de presentación de los textos

Por favor, siga atentamente las siguientes normas de publicación. *Ante cualquier consulta, dirijase al correo electrónico de referencia [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy).*

Adjunte la siguiente información: **título** del artículo en mayúsculas y minúsculas, en inglés y español. **Nombre completo** de todos los autores, citados en orden decreciente de importancia para el desarrollo del artículo, sin que medien jerarquías funcionales. Indicar la sección o **departamento** al que pertenecen y empresa de la que forman parte; esta característica se consigna con números de referencia, colocados entre paréntesis junto al nombre de cada autor. Se debe señalar además el responsable que operará como contacto en las comunicaciones electrónicas.

La estructura de los textos incluye: un **resumen**, en inglés y español, de 200 palabras máximo en su versión castellana; **palabras clave** en inglés y español (que no repitan los términos ya utilizados en el título); el texto de tres (3) a veinticinco (25) páginas de desarrollo (introducción, métodos, descripción de equipos, descripción de programas, desarrollo de teorías, resultados y discusión, conclusiones, referencias, tablas, figuras e imágenes).

El texto deberá ser presentado en fuente **Arial 11, a espacio doble y numeración de líneas con la extensión que se especifica arriba**, con títulos en mayúsculas y minúsculas, y en formato .doc, de cualquier versión de Microsoft Word.

Por favor, evite las notas al pie.

## Formato y estilo

- **Autor.** Persona o colectividad responsable del contenido intelectual o artístico de un documento.
- **Título.** Refleja el contenido del texto con precisión, en un máximo de dos líneas. Es neutro e informativo.
- **Resumen.** Provee información específica. Sintetiza, anuncia y jerarquiza contenidos.
- **Introducción.** Incluye antecedentes concretos y datos del proceso, enumeración de objetivos e importancia del tema.
- **Material y Métodos.** Relato de los métodos y procedimientos que permitieron obtener los resultados presentados. Obtención del material, condiciones y metodología. Análisis estadísticos, programas.
- **Resultados.** Presentación y expresión de los mismos en tablas y figuras.
- **Discusión (Conclusión).** Se sigue el orden de presentación o el orden de importancia de los resultados. Se priorizan aquellos resultados que surgieron del diseño experimental. Se define y diferencia claramente el aporte del trabajo en relación al conocimiento previo.
- **Agradecimientos.** Breve reconocimiento a quienes colaboraron en la producción del artículo y/o que permitieron el desarrollo de la investigación.
- **Referencias.** Ver *Manual de estilo de presentación de citas y referencias documentales del LATU* (solicitar en el Centro de Información Técnica del LATU).

## Ejemplos usuales de referencias:

### Monografías

APELLIDO(S), Nombre. *Título del libro*. N° de edición. Lugar de edición: editorial, año de edición. (Serie; N°). ISBN.

BOBBIO, Norberto. *Autobiografía*. Madrid: Taurus, 1988. 299 p. ISBN: 84-306-0267-4.

*El Lazarillo de Tormes*. Maraño, Gregorio (prol.). 10a ed. Madrid: Espasa Calpe, 1958. (Colección Austral; 156).

### Revistas como un todo

*Título de la publicación*. RESPONSABILIDAD. Edición. Identificación del fascículo. Lugar de edición: editorial, fecha del primer volumen-fecha del último volumen. ISSN.

*Boletín económico*. BANCO DE ESPAÑA. 1998, (1). Madrid: Banco de España, Servicio de Publicaciones, 1979-. ISSN: 0210-3737.

### Artículos de revistas

APELLIDO(S), Nombre. Título del artículo. En: *Título de la publicación seriada*. Edición. Localización en el documento fuente: año, número, páginas.

LLOSA, Josep. Modulo scheduling with reduced register pressure. En: *IEEE Transactions on computers*. 1998, 47(6):625-638.

ALVAREZ, Begoña; BALLINA, F. Javier de la; VÁZQUEZ, Rodolfo. La reacción del consumidor ante las promociones. En: *MK Marketing + Ventas*. 2000, (143):33-37.

### Normas

ENTIDAD RESPONSABLE DE LA NORMA. País de la entidad responsable entre paréntesis. N° o código de la norma: *Título*. Lugar de publicación: editorial abreviada, año de publicación.

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN (España). UNE 166000 EX, UNE 166001 EX, UNE 166002 EX: *Gestión de la I+D+I*. Madrid: AENOR, 2002.

INSTITUTO URUGUAYO DE NORMAS TÉCNICAS (Uruguay). UNIT-ISO 9001: *Sistemas de gestión de calidad - requisitos*. Montevideo: UNIT, 2000.

### Textos electrónicos, bases de datos y programas informáticos

RESPONSABLE PRINCIPAL. *Título* [tipo de soporte]. Edición. Lugar de publicación: editor, fecha de publicación, fecha de actualización o revisión, [fecha de consulta]. Descripción física. (Colección). Notas. Disponibilidad y acceso. Número normalizado.

RAPP, A.; AUGUSTA, U.; PEEK, R. D. *Facts and ideas of testing wood durability above ground* [En línea]. Hamburgo: BFH, 2001. [Consulta: 25 de setiembre de 2008]. Disponible en: <http://www.bfah.de/inst4/43/pdf/3doubly.pdf>

### Patentes

MENCIÓN DE RESPONSABILIDAD PRINCIPAL. *Denominación del elemento patentado*. Identificador del documento (país u oficina que lo registra). Clase internacional de documento de patente. Número. Año-mes-día de publicación del documento.

GREEN, Daniel R. *Cereal flake with topical pieces*. United State Patent. 0101. D572,427. 2008-07-08

### Secciones

Los títulos de **sección** (que señalan Introducción, Materiales y Métodos, Discusión, etc.) deben ser escritos en mayúscula y minúsculas, estilo de fuente negrita o bold y centrados en el texto. Los subtítulos serán justificados a la izquierda, escritos en mayúscula y minúsculas, también en negrita o bold. Tanto la primera letra del título y la primera letra de los nombres propios deben ser escritas en mayúscula. Se debe dejar un espacio entre líneas antes y después de cada subtítulo.

### Fórmulas, figuras, tablas e imágenes

Las figuras deben numerarse correlativamente en orden de aparición en el texto, y deben incluir un breve título explicativo en el margen inferior a las mismas. Si es necesario incluir fotos o imágenes, éstas se deben designar como figuras. Las fotos deben ser nítidas y enviadas en formato jpg (mínimo 300 px aseguran una buena calidad de impresión). Las tablas deben ser numeradas correlativamente y en forma independiente de las figuras, y cada entrada debe ocupar su propia celda. Se deben numerar según el orden de aparición en el texto, incluyendo un título explicativo en la parte inferior de la tabla. Evitar utilizar líneas verticales y en la medida de lo posible no incluir más de dos tablas por carilla ni colocarlas en más de un folio o en forma perpendicular al texto.

El texto presenta las tablas, no desarrolla su contenido, éstas deben explicarse en sí mismas. Además de estar insertadas en el artículo, cada figura y tabla debe ser remitida en su propio archivo, con la referencia numérica correspondiente. Los números y símbolos empleados no deben ser menores al tamaño usado en el resto del texto (Arial 11).

### Denominaciones en latín

Deben ir en cursiva.

# Caracterización fisicoquímica y nutricional del fruto *Butia capitata* y de su pulpa tamizada

Crosa, M. J. <sup>(1)\*</sup>, Burzaco, P. <sup>(1)</sup>, Pastorino, N. <sup>(1)</sup>, Irisity, M. <sup>(2)</sup>, Gioscia, D. <sup>(1)</sup>, Ayres, C. <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Gerencia Proyectos Alimentarios. Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU - <sup>(2)</sup> Departamento Gestión y Transferencia Tecnológica para el Desarrollo Local, Gerencia de Gestión Empresarial. Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU.

Contacto: caayres@latu.org.uy

Recibido: 28/06/2011 - Aprobado: 8/12/2011

## Resumen

El butiá es un fruto silvestre proveniente de los palmares de Rocha, cuyo consumo y comercialización se limita principalmente a ese departamento. El análisis de las propiedades fisicoquímicas y nutricionales en el fruto fresco y en su pulpa tamizada favorecerá la valorización de un recurso genético nativo. El objetivo de este estudio fue ampliar el conocimiento acerca de las características físico químicas y nutricionales del fruto fresco y de su pulpa tamizada, y estudiar la evolución microbiológica de la pulpa tamizada almacenada a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 360 días. La caracterización del fruto fresco se realizó mediante los ensayos de sólidos solubles totales, pH, color, azúcares reductores, acidez titulable, materia seca, pectina, fibra alimentaria total y vitamina C. Los resultados más relevantes revelaron un contenido de vitamina C del entorno del 65 a 100 ppm de vitamina C y un contenido de fibra alimentaria de 4,9 % a 4,3 %. En la pulpa tamizada se analizó sólidos solubles totales, pH, color y vitamina C y pectina, microorganismos mesófilos aerobios, hongos y levaduras. El principal resultado fue la preservación de hasta un 55 % del contenido de vitamina C en la pulpa tamizada con respecto al fruto fresco. Durante los 360 días de almacenamiento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  no se observó crecimiento microbiano en la pulpa tamizada.

Palabras clave: *Butia capitata*, butiá, pulpa tamizada, propiedades químicas y nutricionales, fruto nativo, almacenamiento pulpa tamizada.

## Abstract

Butiá is a native fruit from the Butiá Palms in the east of Uruguay, whose consumption and commercialization is limited to this region. The analysis of physicochemical and nutritional properties in the fruit and its screened pulp will encourage the enhancement of this native genetic resource. The aim of this study was to expand knowledge about the physical, chemical and nutritional characteristics of the fresh fruit and its screened pulp. We also studied the microbiological evolution of the sieved pulp stored at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 360 days. In order to characterize the fruit, measurements of total soluble solids, pH, reducing sugars, titrable acidity, dry matter, pectin, total dietary fiber and vitamin C were carried out. Most relevant results obtained from the fruit were 65 to 100 ppm of vitamin C and 4,3 to 4,9 % of total dietary fiber. In the screened pulp, total soluble solids, pH, color, vitamin C, pectin, aerobic mesophilic microorganisms, fungi and yeast were analyzed. The high content of vitamin C in the fruit was preserved up to 55 % in the screened pulp. During the 360 days of storage at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  no microbiological growth in screened pulp were found.

Keywords: *Butia capitata*, butiá, sieved butiá pulp, chemical and nutritional properties, native fruit, sieved butiá pulp preservation.

## Introducción

Este estudio fue financiado por el Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), en el marco del proyecto "Aprovechamiento agroalimentario del fruto de la palmera butiá (*Butia capitata*) - FPTA 178", cuyo principal objetivo es promover el desarrollo local sostenible en la zona del Este de Uruguay mediante la innovación y mejora de productos vinculados al fruto del Butiá. El equipo de proyecto se caracteriza por su multidisciplinariedad de enfoques y trabajo interinstitucional.

La especie *Butia capitata* de la familia Arecaceae (Palmae) es una de las palmeras más australes del mundo. Se distribuye en el sur de

Brasil, en los estados de Santa Catarina y Rio Grande do Sul, y en el este de Uruguay, en los departamentos de Cerro Largo, Treinta y Tres, Lavalleja, Maldonado y Rocha. Las poblaciones actuales de la especie están formadas por individuos coetáneos y centenarios, debido a la ausencia de regeneración de estos palmares (Rivas y Barilani, 2004). Conjuntamente con la conservación de la diversidad biológica y de un paisaje único, la caracterización del fruto fresco y su aprovechamiento en productos elaborados por pobladores locales forman parte de la estrategia para el desarrollo local sostenible.

Se desarrollaron equipamientos para el aprovechamiento de la almendra del fruto, la fibra insoluble y la pulpa tamizada (Betancurt et al., 2008). En la actualidad existen en el departamento de Rocha no menos de 40 emprendimientos que cosechan el fruto y lo almacenan congelado con el objetivo de consumirlo durante el año. La pulpa

tamizada del Butiá es el principal componente para el desarrollo de los productos y, por lo tanto, el que requiere mayor atención. En el periodo 2010-2011 se han desarrollado cartillas de elaboración de productos en base a este fruto que fueron difundidas y transferidas a elaboradores de la zona (Burzaco et al., 2010a; 2010b; 2010c).

El objetivo de este trabajo fue ampliar el conocimiento acerca de las características físico químicas y nutricionales del fruto fresco y de su pulpa tamizada, así como estudiar la evolución microbiológica de la pulpa tamizada almacenada por congelación durante 360 días.

## Materiales y Métodos

### Descripción de cosecha y almacenamiento del fruto

Las muestras de fruto fresco se obtuvieron en un predio agropecuario ubicado en un palmar en la ruta 16 (Camino del Indio) a 5 km al norte de la ciudad de Castillos durante la zafra 2010. Los frutos se recolectaron según el procedimiento tradicional de cosecha: desprendimiento del cacho en forma mecánica y, una vez en el piso, selección de frutos de acuerdo a su integridad, firmeza y color. A partir de un muestreo aleatorio se extrajeron 5 muestras de 1 kg para analizar las propiedades físicoquímicas del fruto fresco. Del resto de la cosecha se seleccionaron frutos en el tono de amarillo y naranja, por ser los que se presentan con mayor frecuencia en esta región, y se dividieron en 4 lotes de 60 kg para los ensayos de elaboración de pulpa en escala piloto.

Inmediatamente luego de cosechadas, las muestras destinadas para análisis del fruto fresco se refrigeraron a 5 °C durante 48 hrs, se desinfectaron y se conservaron por un máximo de un mes en cámara de -18 °C. Antes de ser analizadas se descongelaron dentro de las bolsas hasta lograr temperatura ambiente. Para el ensayo de elaboración de pulpa tamizada las muestras recién cosechadas se mantuvieron refrigeradas a 5 °C durante 48 h y al tercer día se elaboró la pulpa tamizada.

### Descripción del proceso de elaboración de la pulpa tamizada

Para la elaboración de la pulpa tamizada se procesaron 4 lotes de 60 kg de fruta. Luego del lavado y desinfección se procedió a la cocción del fruto en paila con camisa con vapor a 1,5 kg/cm<sup>2</sup> de presión. Antes de iniciar el calentamiento se agregó 24 kg de agua, se llevó a ebullición durante 30 minutos y posteriormente se realizaron 3 pasajes por tamiz de 3 mm. Se realizó un muestreo por duplicado de cada lote de producción para su análisis.

La pulpa elaborada se envasó en bolsas de polietileno en porciones de 2 kg y se almacenó en cámara a -18 °C.

Se realizó toma de muestra en la pulpa tamizada congelada en los días 0, 90, 180, 270 y 360. En cada día de muestreo se seleccionaron aleatoriamente 2 muestras para los ensayos microbiológicos y 4 muestras para la medida de color.

### Tratamiento estadístico de los datos

Los resultados de análisis se presentan en forma de tablas, detallando el intervalo de confianza de los valores con un nivel de significancia del 95 %. Los valores informados corresponden al promedio del duplicado de cada ensayo.

## Descripción de procedimientos analíticos

### Fruto fresco

Se realizaron las siguientes medidas de caracterización del fruto fresco: sólidos solubles totales (SST), con refractómetro de mano ATAGO N-1E (0-32%Brix); pH, con pHmetro portátil Jenway 350; azúcares reductores, mediante titulación automática, aplicando el Compendium of International Methods of Analysis (OIV A4); acidez titulable (AT), expresada en ácido cítrico por valoración potenciométrica basada en la técnica ISO 750 humedad, por método gravimétrico a presión reducida, según Kirk et al. (1991); vitamina C, por cromatografía líquida, según Interlaboratorio (Brause et al., 2003) pectina, mediante método enzimático espectrofotométrico con kit Megazyme para determinación de pectina en alimentos (KPECID); fibra alimentaria total, por método enzimático gravimétrico, según AOAC, 1996- método 985.29. Se calculó la acidez en base seca y la relación entre los sólidos solubles totales y la acidez titulable (SST/AT o ratio).

Se analizó además el peso de pulpa, cáscara y coco de 40 unidades de fruto tomados aleatoriamente de las muestras cosechadas, y el Color Pantone, por comparación de escala Pantone Formula Guide/Solid coated en muestras de pulpa del fruto fresco.

### Pulpa tamizada

Se realizaron las siguientes medidas de caracterización de la pulpa tamizada: sólidos solubles totales, con refractómetro de mano ATAGO N-1E (0-32%Brix); pH, con pHmetro portátil Jenway 350; vitamina C, por cromatografía líquida, según Interlaboratorio (Brause et al., 2003); pectina, mediante método enzimático espectrofotométrico con kit Megazyme para determinación de pectina en alimentos (KPECID), y Color Pantone, por comparación de escala Pantone Formula Guide/Solid coated.

El cálculo de rendimiento en la producción de pulpa tamizada se realizó por medio del control del peso inicial del fruto fresco y el peso final de pulpa obtenida.

### Pulpa tamizada congelada

Para el seguimiento microbiológico de la pulpa tamizada congelada se aplicaron las siguientes técnicas de análisis: recuento de Hongos y Levaduras, según APHA, 2001a y recuento de aerobios totales, basado en APHA, 2001b y APHA, 2001c.

## Resultados

### Caracterización del butiá fresco

En la Tabla 1 se presentan los resultados de los análisis realizados en las muestras recolectadas del fruto fresco.

En la Tabla 2 se presenta el peso promedio de cada uno de los componentes del fruto fresco.

### Caracterización de la pulpa tamizada y rendimiento del proceso de elaboración

En la Tabla 3 se expresan los resultados de análisis de cada lote de pulpa tamizada producida en escala piloto.

En la Tabla 4 se describen los colores observados en las muestras de fruto fresco y de pulpa tamizada.

El rendimiento del proceso de producción de pulpa tamizada fue del (50 ± 1)% en los cuatro lotes estudiados.

FRUTO FRESCO - ZAFRA 2010										
	SST (°Bx)	PH	Azúcares Reductores (g/l)	Acidez titulable (AT) (g/100gr)	Acidez (g/100gr sólido seco)	Humedad (g/100gr pulpa)	Vitamina C (mg/100gr pulpa)	Pectina (g/mol)	Fibra Alimentaria Total (g/100gr pulpa)	SST/AT
MUESTRA 1	16	3,1	42	1,3	6,81	81	66	<LD	4,7	12
MUESTRA 2	15	3,2	44	1,6	8,89	82	96	<LD	4,7	9
MUESTRA 3	15	3,1	45	1,6	8,70	82	74	<LD	4,5	9
MUESTRA 4	16	3,0	54	1,5	8,67	83	90	<LD	SD	10
MUESTRA 5	15	3,1	38	1,6	8,04	80	88	<LD	SD	9
PROMEDIO	15	3,1	45	1,5	8	81	83	<LD	4,6	10
IC95%	0,5	0,10	8	0,2	1	1	17	-	0,3	2
Límite superior, IC95%	15,5	3,2	53	1,7	9	83	100	<LD	4,9	12
Límite inferior, IC95%	14,5	3,0	36	1,3	7	80	65	<LD	4,3	8

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de butiá fresco, zafra 2010. Ensayos realizados en la pulpa (L.D. = Límite de detección, 8E-9 g/mol; SD = sin datos).

Componentes	Peso (gramos)
Fruto	9,3 ± 0,7
Cáscara	0,97 ± 0,1
Pulpa	6,0 ± 0,6
Endocarpo leñoso (Coco)	2,3 ± 0,2

Tabla 2. Composición en gramos de cáscara, pulpa y endocarpo leñoso (coco) del fruto fresco, zafra 2010.

PULPA TAMIZADA ELABORADA EN ESCALA PILOTO, ZAFRA 2010				
	Sólidos solubles (°Brix)	PH	Vitamina C (mg/100gr pulpa)	Pectina (g/mol)
LOTE 1	15,3	3,1	54	<LD
LOTE 2	13,8	3,2	48	<LD
LOTE 3	13,8	3,3	40	<LD
LOTE 4	13,3	3,2	36	<LD
PROMEDIO	14,0	3,2	45	<LD
IC95%	1,0	0,1	9	--
Límite superior	15,0	3,3	54	<LD
Límite inferior	13,0	3,1	35	<LD

Tabla 3. Caracterización de pulpa tamizada elaborada en lotes de 60 kg, zafra 2010. (LD = Límite de detección, 8E-9 g/mol)

	COLOR BUTIA FRESCO				COLOR PULPA TAMIZADA				CAMBIOS DE COLOR		
	Color pantone	L <sub>o</sub>	a <sub>o</sub>	b <sub>o</sub>	Color pantone	L <sub>o</sub>	a <sub>o</sub>	b <sub>o</sub>	A <sub>(L* - L<sub>o</sub>)</sub>	A <sub>(a* - a<sub>o</sub>)</sub>	A <sub>(b* - b<sub>o</sub>)</sub>
LOTE 1	1365 C	80	21	60	1235 C	79	22	85	-1	1	25
LOTE 2	1365 C	80	21	60	1235 C	79	22	85	-1	1	25
LOTE 3	1235 C	79	22	85	130 C	75	18	86	-4	-4	1
LOTE 4	1235 C	79	22	85	130 C	75	18	86	-4	-4	1

Tabla 4. Medida del color por comparación Pantone en la pulpa del fruto fresco y en la pulpa tamizada.

Muestra	Tiempo almacenamiento	días				
		0	90	180	270	360
Pulpa tamizada congelada	Recuento de aerobios (ufc/g)	10	<10	<10	10	10
	Recuento de hongos y levaduras (ufc/g)	30	<10	<10	<10	<10

Tabla 5. Resultados microbiológicos de la pulpa tamizada congelada.

## Seguimiento de la pulpa tamizada conservada por congelación

En la Tabla 5 se describen los resultados del seguimiento microbiológico de la pulpa tamizada congelada.

Se realizó seguimiento de color de las pulpas congeladas; no se observaron cambios en todo el período de almacenamiento.

### Discusión

Se destaca el alto contenido de vitamina C y de fibra observado en el fruto fresco, comparable al de otros frutos conocidos por estos aportes nutricionales. El intervalo de valores observados de vitamina C en la pulpa del fruto fresco fue de 65 a 100 mg Vit. C/100g, comparable a los del kiwi (97.8 mg Vit. C/100 gr), frutilla (88.7 mg Vit. C/100g), limón (62.6 mg Vit. C/100g), naranja (59 mg Vit. C/100g), pomelo (48 mg Vit. C/100g), ananá (mg Vit. 40.3 C/100g), valores informados en Tabla de Composición de Alimentos del Uruguay (2002). El contenido de fibra total en el butiá resultó entre 4.3 y 4.9 g/100 gr de pulpa, comparable al contenido de fibra de limón (4.7 g/100 gr), naranja (2.3 g/100 gr), manzana (2.8 g/100 gr), según valores informados en Tabla de Composición de Alimentos del Uruguay (2002). El fruto no presentó valores detectables de pectina según el método de análisis aplicado. Los valores de sólidos solubles y acidez titulable fueron coincidentes con los reportados por Machado (2008) en pulpa de butiá del litoral medio de Rio Grande do Sul. La relación sólidos solubles/acidez titulable fue de  $SST/AT=10 \pm 2_{(IC=95\%)}$ , indicando frutos con grado de madurez similares en las muestras.

La pulpa tamizada elaborada según las condiciones descriptas presentó valores de sólidos solubles y pH dentro del mismo rango que los frutos frescos. El contenido de vitamina C en la pulpa tamizada, si bien se redujo entre un 45 % y 65 %, mantuvo valores de interés nutricional. El color de la pulpa tamizada no presentó cambios respecto al fruto fresco, ni tampoco en su almacenamiento a temperaturas de congelación, en 360 días.

El peso de las unidades de fruto fresco osciló entre 10 g a 8,6 g (IC 95%) y el de los cocos respectivos fue de 2,5 g a 2,1 g. El porcentaje de pulpa en el fruto resultó entre 69 % y 61 %; estos valores se pueden asociar al rendimiento teórico de la elaboración de pulpa tamizada. El rendimiento del proceso de elaboración de pulpa tamizada estuvo entre el 49 % y el 51 %. Esta pérdida de rendimiento se produjo debido a la pulpa que quedó adherida a los cocos y a la fibra del descarte del tamizado.

No se detectaron desviaciones microbiológicas durante el almacenamiento de la pulpa tamizada congelada.

### Conclusiones

El fruto de la palmera *Butia capitata* cosechada en el departamento de Rocha en zafra 2010 presenta aportes importantes de vitamina C y de fibra dietética, comparable al de otros frutos conocidos por estos aportes nutricionales (kiwi, frutilla, limón, naranja, pomelo y ananá).

El color, contenido de sólidos solubles y pH del fruto fresco son similares a los de la pulpa tamizada elaborada en las condiciones descriptas. La vitamina C se preserva hasta en un 55 % en la pulpa tamizada. Se logra un rendimiento del 50 % en la producción de pulpa tamizada en relación al fruto fresco.

En las condiciones de este estudio se concluye que la pulpa de butiá tamizada puede conservarse a -18 °C durante 360 días para su utilización en elaboración de alimentos en base a butiá.

## Reconocimientos

Agradecemos muy especialmente la colaboración de la Gerencia de Análisis y Ensayos del Laboratorio Tecnológico del Uruguay, así como a los demás integrantes del equipo del proyecto: Ing. Rivas, por el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Agronomía, abocada al desarrollo de una propuesta de reglamentación de manejo extractivo de los frutos de la palmera Butiá para su conservación y utilización sustentable; Dr. Dellacassa, por la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales de la Facultad de Química, en el estudio de los aromas y sabores de fruto y sus derivados; Msc. Flores en el estudio de las propiedades funcionales de fruto.

### Referencias

- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Gaithersburg: AOAC, 1996. Official Method 985.29.
- APHA. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4ta. ed. Washington: APHA, 2001a. Chapter 20- Yeasts and molds. p. 209.
- APHA. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4ta. ed. Washington: APHA, 2001b. Chapter 6-Culture methods for enumeration of microorganisms. p. 53.
- APHA. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4ta. ed. Washington: APHA, 2001c. Chapter 7- Aerobic plate count. p. 63.
- BETANCURT, P.; GIOSCIA, D.; AYRES, C.; ARCIA, P. Fruto autóctono butiá: innovación y transferencia tecnológica. En: *INNOTEC*. 2008, (3):63-71.
- BRAUSE, ALLAN R.; WOOLLARD, DAVID C.; INDYK, HARVEY E. Determination of Total vitamin c in fruit juices and related products by liquid chromatography: interlaboratory study. En: *Journal of AOAC*. 2003, 86(2):367.
- BURZACO, P.; RUIZ-DÍAZ, M. F.; SOSA, J.; PINTO, A.I. *Helado*. Montevideo: LATU, 2010a. (Serie Frutos Nativos: Butiá; 1).
- BURZACO, P.; RUIZ-DÍAZ, M. F.; SOSA, J.; PINTO, A. *Salsa para postres y helados*. Montevideo: LATU, 2010b. (Serie Frutos Nativos: Butiá; 2).
- BURZACO, P.; RUIZ-DÍAZ, M. F.; SOSA, J.; PINTO, A. *Mermelada y dulce de corte*. Montevideo: LATU, 2010c. (Serie Frutos Nativos: Butiá; 3).
- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (Switzerland). *ISO 750: Fruit and vegetable products -- Determination of titratable acidity*. Geneva: ISO, 1998.
- KIRK, R.; SAWYER, R. *Pearson's composition and analysis of foods*. London: Longman, 1991.
- MACHADO, S., TONIETTO, A., SCHLINDWEIN, G., DUARTE, A. C., DUPRAT, Á. COSTA, R. Caracterização química da polpa de Butiá (*Butia Capitata* Mart.) procedente do litoral médio do Rio Grande do Sul. En: *SOCIEDADE BRASILEIRA DE FRUTICULTURA. XX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture* (Brasil 12-17 de octubre de 2008). [s.l.]: SBF, 2008.
- RIVAS, M.; BARILANI, A. Diversidad, potencial productivo y reproductivo de los palmares de *Butia capitata* (Mart.) Becc. de Uruguay. En: *Agrociencia*. 2004, VII(1):11-20.

# Desestabilización de emulsiones aceite-agua preparadas con proteínas de soja

Abirached, C. <sup>(1)\*</sup>, Medrano, A. <sup>(1)</sup>, Panizzolo, L. A. <sup>(1)</sup>, Moyna, P. <sup>(1)</sup> y Añón, M. C. <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

<sup>(2)</sup> CIDCA-Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina

Contacto: abirached@fq.edu.uy

Recibido: 30/06/2011 - Aprobado: 13/10/2011

## Resumen

En este trabajo se realizó un estudio de las propiedades emulsionantes de las proteínas de soja glicinina y  $\beta$ -conglucina en comparación con el aislado proteico de soja. Para esto se aislaron las fracciones por precipitación isoeléctrica, se les determinó la solubilidad, hidrofobicidad superficial y comportamiento térmico. Se estudió la estabilidad frente al cremado de las emulsiones por medio de un analizador óptico vertical y se establecieron dos constantes de desestabilización correspondientes a los tamaños de partícula observados con un analizador de partículas, mediante una ecuación de segundo orden bifásica (Panizzolo, 2005). Se determinó que las emulsiones preparadas con glicinina son las más inestables en cuanto al cremado y que las preparadas con  $\beta$ -conglucina presentan un comportamiento similar al aislado proteico de soja.

Palabras Claves: Cremado, glicinina,  $\beta$ -conglucina, aislado proteico de soja.

## Abstract

In this paper a study of emulsifying properties of soy proteins, glycinin and  $\beta$ -conglycinin, compared with soy protein isolate was conducted. For this, the fractions were isolated by isoelectric precipitation and were examined for solubility, surface hydrophobicity and thermal behaviour. The stability against creaming of emulsions was studied by a vertical optical analyzer, determining two constants of destabilization for the particle sizes observed with a particle analyzer, based on a biphasic second order equation (Panizzolo, 2005). It was determined that the emulsions prepared with glycinin are the most unstable in terms of creaming. The prepared with  $\beta$ -conglycinin presents a soy protein isolate-like behaviour.

Keywords: Creaming, glycinin,  $\beta$ -conglycinin, soy protein isolate.

## Introducción

Muchas proteínas son moléculas con actividad interfacial que pueden ser utilizadas como emulsionantes por su habilidad de facilitar la formación, mejorar la estabilidad y producir propiedades fisicoquímicas deseadas en las emulsiones de aceite en agua (McClements, 2004).

El estudio de proteínas vegetales, como las proteínas de soja, resulta de interés tecnológico debido a la posibilidad de emplearlas como sustitutos de proteínas de origen animal para su uso en emulsiones alimentarias, de mayor costo. En Uruguay, así como en toda la región, el área sembrada y la producción de soja han tenido un crecimiento vertiginoso. Esta soja es utilizada por la industria aceitera y del biodiesel. Es más, para atender el compromiso de mezcla de 2 % de biodiesel en el gasoil establecido en el marco de la Ley 18.195 se generarán grandes volúmenes de harinas oleaginosas.

El aislado proteico de soja está constituido principalmente por las proteínas glicinina y  $\beta$ -conglucina.

El modelo estructural más aceptado de glicinina es un hexámero constituido por seis subunidades monoméricas que tienen la estructura general AB, donde A representa un polipéptido ácido y B un polipéptido

básico. Las cadenas A y B están unidas por un único puente disulfuro. La glicinina (11S) nativa se compone de seis subunidades ácidas (A) y seis subunidades básicas (B) ((AB)<sub>6</sub>). Las subunidades AB están asociadas en dos anillos hexagonales que forman un cilindro hueco que se mantiene unido por interacciones hidrofílicas (interacciones electrostáticas / puentes de hidrógeno). Según la solubilidad, el pH y la fuerza iónica, la glicinina (11S) se disocia en la forma 7S ((AB)<sub>3</sub>) y/o en la forma 3S (AB). La disociación se debe fundamentalmente a la repulsión electrostática. También puede ocurrir la asociación en la forma 15S (dímero de 11S). Diferentes cantidades de las formas 3S, 7S y 11S están presentes a diferentes pH; a pH mayores a 6,7 la glicinina está principalmente bajo la forma 11S (Martin et al., 2002).

La  $\beta$ -conglucina es una glicoproteína que contiene en torno al 5 % de glúcidos (manosa y N-acetil-glucosamina). Está compuesta por 3 subunidades  $\alpha$ ,  $\alpha'$  y  $\beta$ , de carácter ácido. La estructura completa trimérica se estabiliza mediante interacciones hidrofóbicas. Con pH comprendidos entre 5 y 10, cuando la fuerza iónica es baja (aproximadamente 0,1) se forma un dímero de 6 subunidades (9S) (Cheftel et al., 1989).

En este trabajo se estudió las propiedades emulsionantes de estas proteínas en comparación con el aislado proteico de soja.



## Materiales y Métodos

El aislado proteico de soja (APS), la  $\beta$ -conglucina (7S) y la glicinina (11S) se obtuvieron a partir de harina de soja desengrasada por precipitación isoelectrica (Petruccioli y Añón, 1994; Nagano et al., 1992). Se dispersaron en medio alcalino (pH 8,0) y se secaron por liofilización en un liofilizador Christ Alpha 1-4, European model LOC-1M.

Se determinó la solubilidad de las diferentes muestras dispersándolas en solución de fosfato de sodio 10 mM pH 8,0 a 0,1 % p/v durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. El contenido de proteína en el sobrenadante se determinó utilizando el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Los valores de hidrofobicidad aromática superficial ( $H_0$ ) de cada muestra fueron determinados por medio de la sonda fluorescente ANS (ácido 8-anilino 1 naftalen-sulfónico) de acuerdo al método de Hayakawa y Nakai (1985). La hidrofobicidad superficial se determinó como la pendiente inicial de la curva de intensidad de fluorescencia relativa porcentual versus la concentración de proteína según Kato y Nakai (1980).

Se realizaron ensayos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) con un calorímetro de barrido diferencial DSC Serie Q100 TA Instruments con software Universal Analysis 2000; se determinaron temperatura y entalpía de desnaturalización (Medrano et al., 2009).

Se estudiaron emulsiones de aceite en agua usando una proporción aceite:agua de 25:75 (v/v).

La fase acuosa fue una dispersión proteica de 1,0 mg/ml en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, fuerza iónica 0,02. Las emulsiones se prepararon a temperatura ambiente, con un homogenizador Ultraturax T25 (IKA-Labortechnik), utilizando el accesorio dispersante S25 N-10 G a una velocidad de 20.000 rpm durante un minuto. Se les analizó la estabilidad frente al cremado mediante un analizador óptico vertical (Turbiscan Classic MA2000). Las emulsiones se colocaron en una celda cilíndrica de vidrio (80 mm) para registrar el perfil de retrodispersión (RD) en función de la altura en la celda. Se realizaron medidas cada un minuto durante un período de 60 minutos.

Los datos de RD a una altura del tubo de 10 mm se ajustaron a una ecuación de segundo orden bifásica desarrollada por Panizzolo (2005) (ec. 1).

$$RD(t) = \frac{RD_1}{(RD_1 k_1 t + 1)} + \frac{RD_2}{(RD_2 k_2 t + 1)} \quad (\text{ec.1})$$

Siendo  $k_1$  y  $k_2$  las constantes de velocidad y  $RD_1$  y  $RD_2$  los porcentajes de retrodispersión a una altura de 10 mm del tubo a un tiempo  $t$  para cada término de la ecuación 1.  $k_1$  y  $RD_1$  corresponden a las gotas de mayor tamaño que son las que creman más rápido y  $k_2$  y  $RD_2$  corresponden a las gotas más pequeñas, las cuales creman más lentamente según lo predicho por la ley de Stokes.

La distribución de tamaño de partícula se determinó por difracción de luz láser y dispersión de luz polarizada, utilizando un analizador de partículas Coulter Counter Multisizer (Coulter Electronics Ltd.).

El tratamiento estadístico de datos se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) y prueba de mínimas diferencias significativas (LSD) con  $\alpha = 0,05$ , por medio del programa Statgraphics plus 7.0.

## Resultados y Discusión

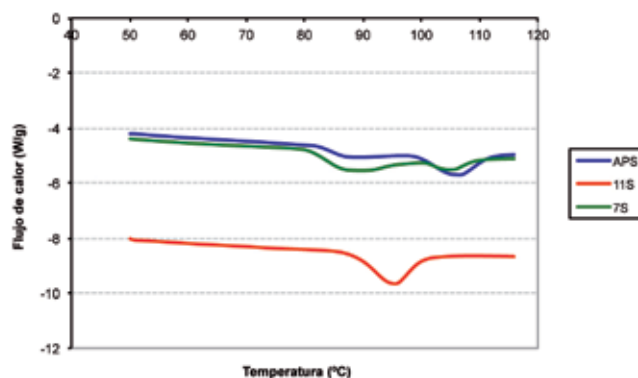


Figura 1. Termogramas de (—) APS, (—) 11S y (—) 7S.

Muestra	Solubilidad (%)	Hidrofobicidad superficial
7Sn	88±4 a	14±6 a
11Sn	88±6 a	17±2 a
APSn	93±8 a	30±5 b

Tabla 1. Hidrofobicidad superficial y solubilidad proteica de las distintas muestras, esta última expresada como: g de proteína soluble en 100g de proteína. Los valores que se encuentran en la misma columna con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $\alpha \leq 0,05$ ).

En la Figura 1 se muestra el termograma obtenido por DSC de APS, 11S y 7S. APS presentó dos picos endotérmicos uno a (86±10) °C y otro a (105±2) °C. El primero de ellos corresponde a la  $\beta$ -conglucina y el otro a la glicinina. La fracción 11S presentó un pico endotérmico a (96±1) °C. La fracción 7S presenta dos picos endotérmicos, uno correspondiente a la  $\beta$ -conglucina propiamente dicha (87±8) °C y otro correspondiente a la impurificación con glicinina (102±10) °C, lo cual ya había sido observado por Petruccioli y Añón (1994, 1995).

No se encontraron diferencias significativas ( $\alpha \leq 0,05$ ) en la hidrofobicidad superficial y solubilidad de 7S y 11S (Tabla 1).

Las distribuciones de tamaño de partícula expresadas tanto en volumen como en superficie de las emulsiones preparadas exhibieron un carácter bimodal con dos poblaciones de gotas bien definidas: gotas con diámetro mayor y menor a 5  $\mu\text{m}$  para 11S y mayor y menor a 3  $\mu\text{m}$  para 7S y APS (Figura 2). En el rango de partículas de mayor tamaño se distribuye más del 90 % del volumen y en el rango de partículas de menor tamaño se tiene la mayor área y el mayor número de gotas. Este tipo de comportamiento bimodal fue observado con anterioridad por Mitidieri y Wagner (2002) y Panizzolo (2005) y fue atribuido a las condiciones de homogenización. Por lo tanto, al encontrarse dos tamaños de partícula se aplica la ecuación 1.

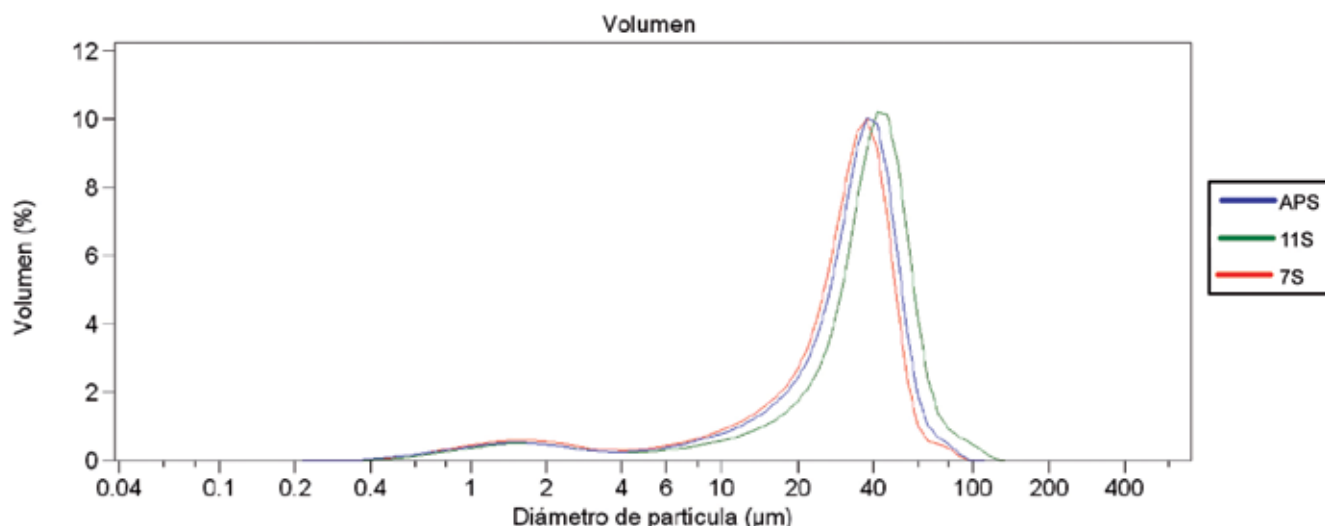


Figura 2. Distribución en volumen de tamaño de gota de las emulsiones preparadas con (—) APS, (—) 11S y (—) 7S.

	$RD_0$	$RD_1$	$k_1 \times 10^3 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$RD_2$	$k_2 \times 10^4 \text{ (min}^{-1}\text{)}$
APS	50±3 a	29±2 a	9±1 a	20±4 a	9±1 a
11S	39±10 b	25±5 b	16±9 b	13±5 b	7±1 b
7S	49±3 a	31±3 a	10±1 a	18±2 a	11±1 c

Tabla 2.  $RD_0$ ,  $k_1$ ,  $RD_1$ ,  $k_2$  y  $RD_2$  para las distintas proteínas. Los valores que se encuentran en la misma columna con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $\alpha \leq 0,05$ ).

El tamaño de las gotas producidas durante la formación de emulsiones depende de dos procesos: 1) la generación de gotas de pequeño tamaño y 2) la rápida estabilización de estas gotas, lo que evita su coalescencia una vez formadas (McClements, 1999). Bajo las mismas condiciones de homogenización se ha demostrado que emulgentes que se adsorben rápidamente producen tamaños de gota más pequeños que otros que se adsorben más lentamente. La tendencia de las gotas a coalescer durante la homogenización depende además de la efectividad de la membrana interfacial a resistir la coalescencia durante la colisión de gotas. Esta resistencia depende de la concentración de moléculas de emulgente presente, así como de su estructura y propiedades fisicoquímicas (dimensión, carga eléctrica, empaquetado, interacciones) (Schubert y Armbruster, 1992).

En general, se puede decir que la mayoría de las moléculas de proteínas adsorbidas son capaces de formar una red en la interfase, propiedad que depende del tipo de proteína usada.

Al pH de trabajo (pH 7,0) las subunidades constituyentes de 7S están cargadas negativamente, ya que se está a un pH mayor que los pI de las mismas (pI $\alpha$ : 5,2, pI $\alpha'$ : 5,3, pI $\beta$ : 5,8-6,2). En cambio, las subunidades A y B (pIA: 4,5-5,4, pIB: 8,0-8,5) de 11S están cargadas negativa y positivamente, cada una (Cheftel et al., 1989).

Aunque tanto la proteína 7S como la 11S son capaces de formar una red, la red de 11S es probablemente menos fuerte, ya que al pH de trabajo, según lo descrito por Martin et al. (2002), 11S tiene una estructura compacta (se presenta como un hexámero). La proteína 7S al tener alta repulsión electrostática dentro de la molécula, y encontrarse cargada negativamente al pH de trabajo, tendrá más facilidad para desplegarse durante la adsorción y por lo tanto, más probabilidad de formar enlaces físicos y covalentes intermoleculares. Esto explica que las emulsiones preparadas con 11S presenten un mayor tamaño de gota que las preparadas con 7S.

Además, la carga neta negativa de la proteína 7S que se encuentra en la interfase evita la coalescencia de las gotas en las emulsiones preparadas con esta proteína.

Según los valores de  $k_1$  presentados en la Tabla 2, las emulsiones más inestables frente al cremado son las preparadas con 11S. Esto es debido a que tienen un mayor tamaño de gota que 7S.

A partir de los valores de entalpía de desnaturalización obtenidos del termograma de APS (Figura 1) se obtiene que la proporción de proteína 7S en el APS es de (27±4)% y el de 11S es (73±4)%, calculados según las ecuaciones 1 y 2. Sin embargo, la proteína que rige el comportamiento interfacial de APS es la 7S, dado que no se encuentran diferencias significativas entre los valores de  $RD_0$ ,  $k_1$ ,  $RD_1$  y  $RD_2$  de éstas (Tabla 2).

Un  $RD_0$  alto implica un mayor número de gotas presente inicialmente y  $RD_0 = RD_1 + RD_2$ , por lo cual los valores de  $RD$  concuerdan con lo visto con el análisis de tamaño de partícula, las emulsiones preparadas con 11S presentan partículas de mayor diámetro y, por ende, son las que presentan el menor  $RD_0$ , ya que la fracción volumétrica de aceite se mantiene constante (Tabla 2).

Ninguna de las diferencias encontradas en la estabilidad de las emulsiones puede explicarse por diferencia de solubilidad o hidrofobicidad superficial debido a que, como se mencionó anteriormente, no existen diferencias significativas entre 11S y 7S.

## Conclusiones

Las emulsiones preparadas con glicinina son las más inestables en cuanto al cremado. Las preparadas con  $\beta$ -conglucina presentan un comportamiento similar al aislado proteico de soja.

## Reconocimientos

Los autores agradecen a LATU la beca otorgada por medio del convenio LATU-Facultad de Química y el soporte financiero del Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT) del Ministerio de Educación y Cultura, la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y el Plan de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Uruguay.

## Referencias

- CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. *Proteínas alimentarias; bioquímica, propiedades funcionales, valor nutritivo, modificaciones químicas*. Zaragoza: Acribia, 1989, ISBN: 84-200-0649-1.
- HAYAKAWA, S.; NAKAI, S. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. En: *Journal of Food Science*. 1985, 50(2):486-491.
- KATO, A.; NAKAI, S. Hydrophobicity determined by fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. En: *Biochimica et Biophysica Acta*. 1980, 624(1):13-20.
- LOWRY, Oliver H.; ROSEBROUGH, Nira. J.; FARR, Lewis, A.; RANDALL, Rose J. Protein measurement with the folin phenol reagent. En: *Journal of Biological Chemistry*. 1951, 193(1):265-275.
- MARTIN, A. H.; BOS, M.A.; VAN VLIET, T. Interfacial rheological properties and conformational aspects of soy glicinin at the air/water interface. En: *Food Hydrocolloids*. 2002, 16(1):63-71.
- McCLEMENTS, D. Protein-stabilized emulsions. En: *Current Opinion in Coloids & Interface Science*. 2004, 9(5):305-313.
- McCLEMENTS, D. *Food emulsions. Principles, practice and techniques*. Nueva York: CRC Press, 1999. ISBN: 0-8493-8008-1.
- MEDRANO, A.; ABIRACHED, C.; PANIZZOLO, L.; MOYNA, P.; AÑÓN, M.C. The effect of glycation on foam and structural properties of  $\beta$ -lactoglobulin. En: *Food Chemistry*. 2009, 113(1):127-133.
- MITIDIERI, F. E.; WAGNER, J. R. Coalescence of o/w emulsions stabilized by whey and isolate soybean proteins. Influence of thermal denaturation, salt addition and competitive interfacial adsorption. En: *Food Research International*. 2002, 35(6):547-557.
- NAGANO, T.; HIROTSUKA, M.; KOHYAMA, K.; NISHINARI, K. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1992, 40(6): 941-944.
- PANIZZOLO, L. A. *Modificación de proteínas por vía enzimática. Análisis de la relación estructura-funcionalidad de los productos de hidrólisis*. Montevideo: UDELAR. Facultad de Química, 2005. (Tesis de Doctorado).
- PETRUCCELLI, S.; AÑÓN, M. C. The relationship between the method of preparation and the structural and functional properties of soy protein isolates. Part I: Structural and hydration properties. En: *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1994, 42:2161-2169.
- PETRUCCELLI, S.; AÑÓN, M. C. Partial reduction of soy protein isolate disulfide bonds. En: *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1995, 43:2001-2006.
- SCHUBERT, H.; ARMBRUSTER, H. Principles of formation and stability of emulsions. En: *International Chemical Engineering*. 1992, 32(1):14-28.

# Efecto de la dieta de cerdos en crecimiento sobre el valor nutritivo y la aptitud tecnológica de la carne y grasa

Capra, G. <sup>(1)\*</sup>, Repiso, L. <sup>(2)</sup>, Fradiletti, F. <sup>(1)</sup>, Martínez, R. <sup>(3)</sup>, Cozzano, S. <sup>(4)</sup>, Márquez, R. <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA Las Brujas - <sup>(2)</sup> Gerencia de Proyectos Alimentarios. Laboratorio Tecnológico del Uruguay (12/12/1997-31/01/2011), LATU - <sup>(3)</sup> Facultad de Enfermería y Tecnologías de la Salud, Universidad Católica del Uruguay - <sup>(4)</sup> Facultad de Ingeniería y Tecnologías, Universidad Católica del Uruguay.

Contacto: gcapra@lb.inia.org.uy

Recibido: 30/06/2011 - Aprobado: 1/11/2011

## Resumen

Se sometieron cerdos con peso medio inicial de 53 kg a tres tratamientos: T1) dieta testigo conteniendo suplementos proteicos de origen vegetal y animal, T2) dieta basada exclusivamente en suplementos proteicos de origen vegetal y T3) dieta testigo restringida al 90 % de la cantidad ofrecida al T1 más libre acceso a pasturas. Se determinaron parámetros de comportamiento productivo y características de la canal en planta de faena. Se determinaron contenido de grasa intramuscular del Longissimus dorsi, perfil lipídico de la grasa subcutánea e intramuscular, contenido de hierro, zinc, magnesio, sodio y vitamina E. Se determinó también el punto de fusión de la grasa dorsal como indicador de aptitud tecnológica para la elaboración de productos fermentados. Con grasa procedente de cada tratamiento se elaboraron salames que fueron evaluados sensorialmente. En los parámetros de calidad de canal evaluados no hubo diferencias estadísticamente significativas. El acceso a pasturas determinó un incremento en el contenido de ácido linolénico y una mejora de la relación n6/n3 en la grasa subcutánea. No hubo diferencias significativas en el punto de fusión de la grasa. Las muestras de salame resultaron ser distintas, con un nivel de confianza del 95 % para los atributos textura e intención de compra.

Palabras clave: Cerdos, composición dieta, calidad carne, aptitud tecnológica, salames.

## Abstract

Pigs with an initial average weight of 53 kg were allocated to three feeding treatments: T1) control diet containing vegetal and animal protein supplements, T2) diet of only vegetal protein supplements and T3) control diet restricted to 90 % of the amount offered to T1 plus free access to pasture. Productive performance parameters and carcass traits at slaughter were determined. Intramuscular fat content of Longissimus dorsi, lipid profile of the subcutaneous and intramuscular fat, content of iron, zinc, magnesium, sodium and vitamin E were analyzed. The melting point of the back fat was also analyzed as an indicator of the technological aptitude for the manufacturing of fermented products. Fat from each treatment was used to manufacture salamis that were sensory evaluated. Carcass quality parameters did not show statistically significant differences. Access to pasture showed an increase in linolenic acid content and a better relationship n6/n3 in the subcutaneous fat. There were no significant differences in the fat melting point. Salami samples were different with a confidence level of 95 % for texture attributes and purchase intent.

Keywords: Pigs, diet composition, meat quality, technological aptitude, salami.

## Introducción

Este estudio se realizó en el marco del Programa Nacional de Producción Familiar del INIA, en un proyecto de investigación que tiene como objetivo general valorizar productos cárnicos de la producción familiar por medio del desarrollo de tecnología de producción y procesos de transformación que contribuyan a su diferenciación.

Según estimaciones realizadas en base al Censo Agropecuario del año 2000, la producción familiar constituye el 79 % de las explotaciones de Uruguay. En el subsector porcino el 84 % de los establecimientos que tienen a este rubro como principal fuente de ingresos corresponde a pequeños productores familiares, aunque sólo contribuyen con un 22 % del Valor Bruto de Producción de ese rubro productivo (IICA, 2007). En las dos últimas décadas se ha verificado una drástica reducción del número de establecimientos dedicados a la producción de cerdos, a la vez que se produce un proceso de concentración en unidades productivas de mayor tamaño.

Cifras oficiales señalan que en el período comprendido entre los años 2000 y 2006 se produjo una reducción del 54 % en el número de explotaciones dedicadas a la producción comercial de cerdos; el cese de la actividad se produjo principalmente en las unidades productivas de menor tamaño, ya que un 90 % de las que abandonaron el rubro eran explotaciones con menos de 50 porcinos (DIEA-MGAP e INIA, 2007). Uno de los factores determinantes de la reducción en el número de establecimientos dedicados al rubro y en el total de animales faenados ha sido la competencia del producto importado. En la actualidad se importa casi la mitad del volumen de carne y grasa requeridos por la industria chacinera (Errea, 2010).

La demanda en el mercado interno de cortes frescos de carne porcina presenta un crecimiento sostenido. De acuerdo a información estadística del Instituto Nacional de Carnes, el volumen comercializado de carne porcina destinada al abasto de la ciudad de Montevideo se incrementó un 23 % entre 2009 y 2010 (INAC, 2011). Esta evolución determina la necesidad de profundizar conocimientos sobre el aporte nutritivo de la carne obtenida en condiciones prevalecientes a nivel de

la producción familiar, con el fin de promover el consumo y propender a una mejor inserción de los pequeños productores en la cadena comercial.

Paralelamente, la industria de los chacinados muestra preocupación por la baja calidad de la grasa de origen nacional, para lo cual se entiende necesario realizar una evaluación del comportamiento de la materia prima obtenida en esas condiciones de producción. Una importante proporción de los industriales chacineros ha identificado como principal problema tecnológico, vinculado a la materia prima de origen nacional, la calidad de la grasa (Echenique y Capra, 2007). La problemática se relaciona al comportamiento térmico de la grasa, determinado por su composición química, que provoca efectos negativos sobre las cualidades de embutidos fermentados (Grompone e Irigaray, 2008). Echenique (2007) sostiene que desde el punto de vista tecnológico altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados generan problemas en la elaboración de productos fermentados crudos, dada la consistencia blanda de la grasa, la fluidización durante la fase de fermentación y los problemas de enranciamiento. En condiciones reales de producción de nuestro país se ha constatado que los niveles totales de ácidos grasos poliinsaturados de la grasa porcina se ubican en un rango muy amplio, comprendido entre 10,8 a 28,3 % (Echenique y Capra, 2006). En condiciones experimentales, mediante cambios en la composición de la dieta de cerdos en engorde, se han provocado variaciones en el contenido de ácido linoleico comprendidas entre el 12,9 y el 18,0 % (Capra et al., 2007).

El objetivo específico de este trabajo fue evaluar el efecto del sistema de producción y la composición de la dieta sobre las cualidades nutricionales de la carne y la aptitud tecnológica de la grasa para la elaboración de productos fermentados. Para esto se diseñaron dietas para cerdos en crecimiento-terminación representativas de aquellas a las que normalmente acceden los productores familiares uruguayos. Se compararon tres tratamientos alimenticios, evaluándose parámetros de comportamiento productivo, características de la canal en planta de faena y atributos de la carne y grasa en laboratorio. Se tomaron muestras de carne y grasa para la determinación del contenido de grasa intramuscular del músculo *Longissimus dorsi*, perfil lipídico de la grasa subcutánea e intramuscular, contenido de hierro, zinc, magnesio, sodio y vitamina E. También se determinó el punto de fusión de la grasa subcutánea, como indicador de la aptitud tecnológica para la elaboración de productos fermentados. Con la grasa obtenida en cada uno de los tratamientos se fabricaron salames en una industria chacinera, a los cuales se les realizaron análisis físico-químicos y sensoriales.

## Materiales y Métodos

### Animales

Se utilizaron 36 cerdos cuyo biotipo corresponde a cruzamientos recurrentes entre Landrace y Large White, que al inicio del estudio pesaban en promedio 53,4 kg. Los animales fueron asignados al azar a los tratamientos, con igual número de machos y hembras en cada uno de ellos.

### Alimentación de los animales

Se compararon tres tratamientos de alimentación consistentes en:

T1- dieta testigo conteniendo suplementos proteicos de origen vegetal y animal (ración balanceada R1).

T2- dieta basada exclusivamente en suplementos proteicos de origen vegetal (ración balanceada R2).

T3- dieta testigo restringida al 90 % del T1 (con ración balanceada R1) más acceso libre a pasturas.

Las raciones balanceadas R1 y R2 fueron formuladas en base a tablas de requerimientos nutricionales de los cerdos en crecimiento (NRC, 1998) y tablas de composición de ingredientes de dietas para cerdos (Fedna, 2003), de modo tal que cumplieran con la condición de

ser isocalóricas (3,2 Mcal/kg) e isoproteicas (15 % proteína cruda en base fresca). Se ajustaron a la formulación indicada en la Tabla 1, que resultó en la composición química detallada en la Tabla 2.

Ingrediente (en %)	R1	R2
Maíz	79,8	64,8
Afrechillo de arroz desgrasado	--	15,0
Harina de soja	12,0	15,0
Harina de carne	7,5	--
Fosfato monosódico de dihidrógeno	--	2,0
Carbonato de calcio	--	2,5
L Lisina	0,1	0,1
Cloruro de sodio	0,5	0,5
Núcleo vitamínico mineral	0,1	0,1

Tabla 1. Fórmula de las raciones utilizadas.

	R1	R2
Materia seca	86,6	86,2
Proteína cruda*	16,1	16,9
Fibra cruda*	2,0	2,0
Grasas y aceites*	5,4	3,9
Cenizas*	5,9	6,9
Calcio*	1,1	1,0
Fósforo total*	0,9	1,0

Tabla 2. Composición química de las raciones en porcentaje (\* Datos expresados en base seca).

La composición química de estas raciones fue determinada previo a este estudio, en base a los siguientes métodos analíticos: Materia seca según AOAC 930.15, proteínas según AOAC 988.05, fibra cruda según AOAC 962.09, aceites y grasas según AOAC 920.39, cenizas según AOAC 942.09, calcio según AOAC 927.02, fósforo según AOAC 969.31.

El suministro diario de alimento balanceado se ajustó a una escala basada en el peso vivo, de acuerdo al detalle expresado en la Tabla 3.

Peso vivo (kg)	Tratamientos T1 y T3	Tratamientos T2
30 - 40	1,55	1,40
40 - 50	1,90	1,70
50 - 60	2,20	2,00
60 - 70	2,50	2,25
70 - 80	2,75	2,50
80 - 90	2,90	2,60
90 - 100	3,00	2,70
100 - 120	3,10	2,80

Tabla 3. Asignación diaria de alimento balanceado en kilogramos por animal y por día según peso vivo (adaptado de Henry et al., 1984).

El acceso a pastura del T3 fue libre, pero se limitaron con hilo eléctrico franjas semanales de superficie variable, según la evolución del consumo y el estado de la pastura, una pradera de segundo año compuesta por trébol rojo y achicoria. No se determinó el consumo de pastura.

## Comportamiento productivo

Los parámetros de comportamiento productivo que se determinaron fueron la evolución del peso vivo individual y el consumo de alimentos e índice de conversión del lote.

Las características de la canal determinadas en planta de faena fueron:

- el peso de la canal: peso en caliente en segunda balanza de la canal con cabeza, sin grasa peri-renal y sin riñones,
- el largo de la canal: medido con cinta métrica sobre la media res izquierda, desde el borde anterior de la sínfisis isquiopubiana hasta la porción media del borde anterior de la primera costilla,
- el espesor de la grasa dorsal (EGD): promedio del espesor obtenido en dos puntos sobre la línea media medidos con calibre digital, a nivel del m. *Gluteus medio* (EGD gm) y de la última costilla (EGD uc),
- el espesor del músculo lumbar en el punto M medido con calibre digital (ancho M): distancia mínima entre el borde craneal del músculo *Gluteus medius* y el eje dorsal del canal vertebral (Daumas, 2001).

Tanto el espesor de la grasa dorsal como el del músculo lumbar en el punto M son utilizados para tipificación de canales porcinas en mataderos pequeños de algunos países de Europa (Método ZP o Zwick-Punkte).

Las muestras de carne para análisis de grasa intramuscular fueron tomadas del músculo *Longissimus dorsi*, extraídas a nivel de la 3ª y 4ª últimas costillas.

Las muestras de grasa subcutánea se tomaron en dos puntos de la línea media de la canal, ubicados a la misma altura donde se realiza la determinación del espesor de la grasa dorsal (Figura 1).

## Elaboración de los salames

Se elaboraron salames tipo Milán con el objetivo de utilizar la grasa de los animales de este estudio en un producto que pudiera incluirla sin ningún tratamiento previo. Para la elaboración de los salames se utilizó la fórmula de la industria que colaboró en esta investigación, que contiene 30 % de grasa firme de cerdo. Se elaboraron tres lotes de 100 kg cada uno, con grasa de cada tratamiento y utilizando carne de toro. Se embutieron en fundas de colágeno de 120 mm de diámetro y fueron colocados en estufa a 20 °C y 80 a 90 % de humedad relativa durante 2 días. Al tercer día se colocaron en estufa a 24 °C y 80 a 90 % de humedad relativa. Al cuarto día se pasaron a secaderos con 13 °C de temperatura y 75 % de humedad relativa, donde permanecieron hasta el día 12. Finalmente se analizó pH, actividad de agua y proteínas en una muestra de cada lote, según la metodología que se indica más adelante.



Figura 1. Puntos de la toma de muestra de grasa subcutánea y de medida del EGD.

## Determinaciones analíticas

### Perfil lipídico

Se utilizaron 30 muestras de carne y 30 muestras de grasa subcutánea (10 de cada tipo de alimentación), de 30 gramos cada una.

Las muestras fueron trituradas y homogeneizadas en una procesadora doméstica previo a su envasado a vacío en bolsas termocontraíbles de baja permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua, y luego fueron congeladas a -18 °C hasta el momento de su análisis. Los ensayos se realizaron por duplicado.

La valoración del porcentaje de grasa intramuscular se realizó según el método de Folch, Lees y Sloane (1957).

Los ácidos grasos se determinaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masa, en conformidad con el método de AOCS Oficial Method Ce 2-66, AOCS Ce 1-62, AOCS Ce 1-91.

### Relaciones entre componentes del perfil lipídico

Se calcularon relaciones entre diferentes fracciones que componen las grasas y que normalmente son utilizadas como indicadores de sus cualidades desde el punto de vista nutricional y de sus posibles efectos sobre la salud del consumidor. Entre estas relaciones se incluyen el cociente entre los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y los saturados (AGS), así como la relación entre los n-6 y los n-3. También se incluyen los índices de aterogeneidad (AI) y trombogeneidad (TI) propuestos por Ulbricht y Southgate (1991) y el cociente h/H entre la sumatoria de los ácidos grasos hipocolesterolémicos (mono y poliinsaturados) y los hipercolesterolémicos (mirístico y palmítico) planteados por Herranz et al. (2008) para la descripción de salames procedentes de diferentes países.

Las fórmulas de cálculo aplicadas fueron:

$$AI = [C12:0 + (4 * C14:0) + C16:0] / [(\sum AGPI) + (\sum AGMI)]$$

$$TI = [C14:0 + C16:0 + C18:0] / [(0,5 * \sum AGMI) + (0,5 * \sum n-6) + (3 * \sum n-3) + (n-3/n-6)]$$

$$h/H = (\sum AGMI + \sum AGPI) / (C14:0 + C16:0)$$

Asimismo, se estimó la relación entre el contenido de ácido esteárico y ácido linoleico, que ha sido propuesta como indicador de la aptitud tecnológica de la grasa (Daza y Bouxadó, 2000).

### Minerales

Para el análisis de los minerales se utilizaron 30 muestras de carne de 5 gramos cada una, 10 de cada tipo de alimentación. Las muestras se trituraron en procesadora doméstica, se homogeneizaron, se envasaron a vacío en bolsas termocontraíbles de baja permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua, y se congelaron a -18 °C hasta realizar el análisis.

Se determinaron hierro, zinc, magnesio y sodio en muestras digeridas en sistema cerrado a alta presión según método AOAC 999.10 adaptado, por emisión atómica (ICP-OES) basado en ISO 11885:1996 adaptada. Los ensayos se realizaron por duplicado.

### Vitamina E

El análisis de vitamina E se hizo sobre 30 muestras de 30 gramos de carne cada una, 10 de cada tipo de alimentación. Las muestras se trituraron en procesadora doméstica, se homogeneizaron, se envasaron a vacío en bolsas termocontraíbles de baja permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua, se cubrieron con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz y se congelaron a -18 °C hasta su análisis.

El análisis de vitamina E se basó en la norma BS EN 12822, que consta en una saponificación y posterior extracción con solvente orgánico. La capa orgánica se inyectó directamente en HPLC luego de filtrar por 0,22 micras. La separación cromatográfica se hizo en fase normal (Phenomenex Silica) usando un detector de fluorescencia a 290-330 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado; si en algún caso el rango normalizado está fuera de los gráficos de control, se realiza por quintuplicado.

### Punto de fusión

El punto de fusión se determinó sobre 30 muestras de grasa subcutánea de 50 g cada una, 10 de cada tipo de alimentación. El análisis se realizó en base al método AOCS Cc1-25(93) sobre la materia grasa extraída con hexano en equipo Soxtec con capilar cerrado.

### Proteínas

Se determinó el contenido en proteínas de los salames elaborados con grasa de cada tratamiento. El método utilizado se basó en la norma ISO 937:1978.

### Actividad de agua

Se midió la actividad de agua ( $a_w$ ) tanto en la pasta del salame (durante su elaboración) como en el producto final. La determinación se realizó con un equipo Aqualab Series 3TE a 25 °C.

### pH

Se midió el pH de los salames elaborados utilizando un medidor de pH Mettler Toledo SevenMulti S47.

### Evaluación sensorial

Se evaluó textura, agrado general e intención de compra de los salames elaborados con grasa de los diferentes tratamientos. Para la evaluación sensorial de los atributos de textura y agrado general se utilizó una escala hedónica estructurada de nueve puntos (1- Me disgusta mucho, 5- Me es indiferente, 9- Me gusta mucho). Para la evaluación de la intención de compra se utilizó una escala estructurada de siete puntos (1- Definitivamente no lo compraría, 4-Tal vez sí/ Tal vez no, 7-Definitivamente lo compraría). Finalmente se les pidió a los consumidores que indicaran qué muestra preferían y se calculó el porcentaje de preferencia de cada una.

Para la evaluación se convocó a consumidores esporádicos y habituales de salames.

Fueron reclutados 40 consumidores de 20 a 65 años de edad de los cuales 30 % eran de sexo femenino.

Las muestras fueron presentadas en fetas de 15-20 g contenidas en placas plásticas transparentes codificadas con números aleatorios de tres dígitos siguiendo un orden de presentación balanceado para cada participante. Los consumidores contaban con agua sin gas y galletitas cracker sin sal como borradores. La evaluación se realizó en una sala normalizada según ISO 8589:1988 bajo luz artificial blanca y con temperatura controlada (entre 22 y 24 °C).

Para el análisis de los resultados se hizo un análisis de varianza para cada atributo, se calculó la diferencia mínima significativa utilizando el test de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) con Infostat versión 2008.

### Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados utilizando el procedimiento GLM del SAS (SAS, 2003) con el tratamiento y el sexo incluidos en el modelo como efectos fijos; en parámetros vinculados a las características de la canal se incluyó como covariable el peso de la canal.

## Resultados y Discusión

### Comportamiento productivo y características de la canal

En este estudio no hubo diferencias significativas entre tratamientos en cuanto a espesor de grasa dorsal y contenido de grasa intramuscular, como se muestra en la Tabla 4, a diferencia de ensayos precedentes en los que se ha constatado reducción significativa del contenido de grasa intramuscular en los cerdos con acceso a pasturas (Bauzá et al., 2003; Echenique et al., 2009). Se verificaron diferencias entre tratamientos en la ganancia media diaria y en el peso final alcanzado.

Enfält et al. (1997) afirman que los cerdos criados a campo muestran ganancias de peso menores y carcasas más magras que los cerdos en estabulación. En este estudio no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ni en espesor de grasa dorsal ni en contenido de grasa intramuscular. Las ganancias más bajas de los animales con acceso a pastura podrían atribuirse a que el consumo de forraje no lograba compensar la restricción impuesta en la cantidad de alimento balanceado ofrecido.

	T1	T2	T3	P*
Peso final (kg)	113,5 ± 1,3 <sup>a</sup>	104,9 ± 1,4 <sup>b</sup>	107,4 ± 1,4 <sup>b</sup>	0,0083
Aumento peso (kg)	59,8 ± 1,1 <sup>a</sup>	53,1 ± 1,2 <sup>a, b</sup>	50,3 ± 1,2 <sup>b</sup>	<0,0001
GMD (kg/día)	0,792 ± 0,012 <sup>a</sup>	0,671 ± 0,018 <sup>a, b</sup>	0,651 ± 0,017 <sup>b</sup>	<0,0001
Peso canal (kg)	88,5 ± 1,5 <sup>a</sup>	81,3 ± 1,5 <sup>b</sup>	85,3 ± 1,5 <sup>a, b</sup>	0,0065
Índice de conversión	3,63	4,20	3,96	
Largo (mm)	839 ± 7 <sup>a</sup>	859 ± 7 <sup>a</sup>	858 ± 7 <sup>a</sup>	0,2046
EGD gm (mm)	21,5 ± 1,7 <sup>a</sup>	19,2 ± 1,8 <sup>a</sup>	17,8 ± 1,5 <sup>a</sup>	0,1502
EGD uc (mm)	24,0 ± 1,3 <sup>a</sup>	23,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	21,2 ± 1,2 <sup>a</sup>	0,1231
EGD medio (mm)	22,8 ± 1,3 <sup>a</sup>	21,1 ± 1,4 <sup>a</sup>	19,5 ± 1,2 <sup>a</sup>	0,0765
Ancho M (mm)	75,7 ± 2,3 <sup>a</sup>	75,5 ± 2,5 <sup>a</sup>	74,5 ± 2,1 <sup>a</sup>	0,7124
Punto fusión grasa (°C)	41,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	40,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	40,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,9252
Grasa intramuscular (g/100g)	2,57 ± 0,31 <sup>a</sup>	2,35 ± 0,29 <sup>a</sup>	2,05 ± 0,31 <sup>a</sup>	0,5018

Tabla 4. Parámetros de comportamiento productivo y características de la canal (\*P - Nivel de significancia del efecto del tratamiento en el modelo). Letras iguales dentro de una misma fila indican que no existe diferencia significativa para ese parámetro.

### Composición de la grasa intramuscular y aporte de micronutrientes de la carne

	T1	T2	T3	P*
C14:0	1,02 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,9487
C16:0	24,20 ± 0,31 <sup>a</sup>	24,12 ± 0,29 <sup>a</sup>	24,84 ± 0,31 <sup>a</sup>	0,2087
C16:1	2,32 ± 0,18 <sup>a</sup>	2,31 ± 0,17 <sup>a</sup>	2,38 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,9550
C18:0	14,63 ± 0,48 <sup>a</sup>	15,36 ± 0,46 <sup>a</sup>	14,75 ± 0,48 <sup>a</sup>	0,5040
C18:1	42,64 ± 0,91 <sup>a</sup>	41,31 ± 0,87 <sup>a</sup>	44,06 ± 0,91 <sup>a</sup>	0,5734
C18:2	9,96 ± 0,71 <sup>a</sup>	9,83 ± 0,68 <sup>a</sup>	9,73 ± 0,71 <sup>a</sup>	0,9746
C18:2 CLA	0,11 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,3913
C18:3	0,27 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,0482
C20:4	1,40 ± 0,32 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,25 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,28 <sup>a</sup>	0,3980
ΣAGS	40,86 ± 0,71 <sup>a</sup>	41,48 ± 0,68 <sup>a</sup>	41,56 ± 0,71 <sup>a</sup>	0,7502
ΣAGMI	46,46 ± 1,03 <sup>a</sup>	45,15 ± 0,99 <sup>a</sup>	45,84 ± 1,03 <sup>a</sup>	0,6574
ΣAGPI	12,22 ± 1,07 <sup>a</sup>	13,23 ± 1,02 <sup>a</sup>	12,33 ± 1,07 <sup>a</sup>	0,7532
Σn-6	11,06 ± 0,93 <sup>a</sup>	11,84 ± 0,88 <sup>a</sup>	11,04 ± 0,93 <sup>a</sup>	0,7723
Σn-3	0,92 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,01 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,8810

Tabla 5. Perfil lipídico de la grasa intramuscular expresado en porcentajes (\*P - Nivel de significancia del efecto del tratamiento en el modelo). Letras iguales dentro de una misma fila indican que no existe diferencia significativa entre las muestras para ese parámetro.

En el tratamiento T3 se logró un aumento significativo del ácido graso n-3  $\alpha$ -linolénico a nivel intramuscular respecto a los tratamientos T1 y T2. A pesar de que la diferencia es significativa y teóricamente favorable para los consumidores, debe ser relativizada por su magnitud y por el hecho de que existen otras fuentes alternativas de aporte de estos ácidos grasos, aunque para nuestro país las mismas son de bajo consumo. El contenido de ácido graso n-6 linoleico intramuscular no presentó diferencias significativas entre los tratamientos y tampoco se obtuvieron diferencias en la relación n-6/n-3. Dado que la grasa intramuscular es de consumo inevitable, es relevante desde el punto de vista nutricional valorar el mayor aporte de n-3  $\alpha$ -linolénico sin aumentar el contenido de n-6 linoleico en la porción de carne a recomendar, más que evaluar la relación n-6/n-3. Sin embargo, el incremento del n-3  $\alpha$ -linolénico constituye uno de los objetivos desde el punto de vista nutricional ya que posibilita la síntesis de eicosanoides que otorgan importantes beneficios para la salud de los consumidores, destacándose su funcionalidad antiemostática, antitrombótica y de mantenimiento de la fluidez de las membranas celulares (Coronado et al., 2006).

Vautier (2005), en una amplia revisión de factores que determinan variaciones en el valor nutritivo de la carne de cerdo, establece que hay resultados contradictorios en cuanto al efecto del sistema de producción sobre el contenido de grasa intramuscular, pero señala el efecto incremental del sistema de producción a campo sobre el contenido de ΣAGPI y de ácido  $\alpha$ -linolénico en comparación con la producción en confinamiento. Considerando que en este estudio el tratamiento T1 es estabulado y el tratamiento T3 es a campo, sólo se encontró diferencia en la cantidad de  $\alpha$ -linolénico en la grasa intramuscular, no así para ΣAGPI.



	T1	T2	T3	P*
$\Sigma$ AGPI / $\Sigma$ AGS	0,30 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,32 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,30 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,8128
n-6 / n-3	12,42 $\pm$ 1,41 <sup>a</sup>	12,61 $\pm$ 1,41 <sup>a</sup>	11,42 $\pm$ 1,41 <sup>a</sup>	0,1637
AI	0,43 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,43 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,45 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,4161
TI	1,29 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	1,27 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	1,30 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,8581
h/H	2,33 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	2,33 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	2,26 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,5593

Tabla 6. Relaciones entre componentes de la grasa intramuscular utilizadas como indicadores de cualidades nutricionales (\*P - Nivel de significancia del efecto del tratamiento en el modelo). Letras iguales dentro de una misma fila indican que no existe diferencia significativa entre las muestras para ese parámetro.

La determinación del AI y del TI propuestos por Ulbricht y Southgate (1991) no muestra diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Estos índices ponderan los efectos de los diferentes ácidos grasos relacionados a la incidencia de enfermedades coronarias, tanto en lo que respecta a la promoción como en la protección de su incidencia.

La relación h/H es otro índice utilizado para estimar las cualidades nutricionales de los alimentos (Herranz et al., 2008). En este trabajo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para este indicador.

	T1	T2	T3	P*
Hierro (mg/100g)	1,01 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,96 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	1,19 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,1234
Zinc (mg/100g)	2,24 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	2,14 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	2,37 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	0,5179
Magnesio (mg/100g)	21,50 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	20,00 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>	21,20 $\pm$ 0,52 <sup>a, b</sup>	0,1035
Sodio (mg/100g)	44,90 $\pm$ 1,97 <sup>a</sup>	43,00 $\pm$ 1,88 <sup>a</sup>	45,60 $\pm$ 1,97 <sup>a</sup>	0,6153
Vit. E (mg $\alpha$ -tocoferol/100g)	1,25 $\pm$ 0,15 <sup>a, b</sup>	1,05 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	1,58 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	0,0609

Tabla 7. Contenido en minerales y vitamina E de la carne de cerdo en cada tratamiento estudiado (\*P - Nivel de significancia del efecto del tratamiento en el modelo). Letras iguales dentro de una misma fila indican que no existe diferencia significativa entre las muestras para ese parámetro.

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el aporte de hierro, zinc y sodio entre los tratamientos estudiados y sus valores se encuentran dentro de lo esperado para los alimentos cárnicos según las Guías Alimentarias Basadas en Alimentos de Uruguay (MSP, 2005). La magnitud de las diferencias en el contenido de magnesio no es relevante desde el punto de vista nutricional, según la misma referencia. Los valores determinados para sodio, magnesio y zinc se encuentran dentro del rango verificado por Vautier (2006) para diferentes cortes comerciales de carne de cerdo; en el caso del hierro los valores se ubican por encima de los obtenidos por el autor.

En cuanto a vitamina E se observaron diferencias significativas entre los tratamientos T2 y T3, con el contenido mayor en el tratamiento T3. Este micronutriente es valorado por su comprobada capacidad antioxidante, como forma de aumentar la barrera antioxidante natural del consumidor (Elejalde, 2001).

Hoffman et al. (2003) no constataron efecto del sistema de producción (estabulado vs. a campo) en el contenido de minerales de la carne. Según Vautier (2005), no se ha podido establecer en forma consistente la existencia de un efecto de la cría a campo sobre el contenido de vitamina E.

	T1	T2	T3	P*
C16:0	22,90 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	23,90 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	23,40 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	0,3257
C16:1 cis	1,67 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	1,50 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	1,76 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,0511
C18:0	13,70 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	14,50 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	13,50 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	0,2194
C18:1 cis	43,80 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	43,10 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	42,60 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	0,5036
C18:2 n-6	12,30 $\pm$ 0,60 <sup>a</sup>	11,10 $\pm$ 0,60 <sup>a</sup>	12,50 $\pm$ 0,60 <sup>a</sup>	0,2546
C18:3 n-3	0,70 $\pm$ 0,13 <sup>a, b</sup>	0,39 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	0,95 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	0,0171
$\Sigma$ Saturados (AGS)	38,42 $\pm$ 0,93 <sup>a</sup>	40,94 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	39,07 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>	0,1734
$\Sigma$ Monoinsaturados (AGMI)	47,36 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>	46,56 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	46,27 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>	0,5180
$\Sigma$ Poliinsaturados (AGPI)	14,25 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>	12,53 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	14,65 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>	0,1415
$\Sigma$ n-6	12,51 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup>	11,33 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>	12,69 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup>	0,2683
$\Sigma$ n-3	1,38 $\pm$ 0,17 <sup>a, b</sup>	0,95 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	1,59 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	0,0438

Tabla 8. Perfil lipídico de la grasa subcutánea en cada tratamiento expresado en porcentaje (\*P - Nivel de significancia del efecto del tratamiento en el modelo). Letras iguales dentro de una misma fila indican que no existe diferencia significativa entre las muestras para ese parámetro.

	T1	T2	T3	P*
AGPI / AGS	0,38 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,1115
n-6 / n-3	10,71 ± 0,88 <sup>a, b</sup>	12,32 ± 0,92 <sup>a</sup>	8,83 ± 0,88 <sup>b</sup>	0,0326
AI	0,45 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,3137
TI	1,11 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,1290
h/H	2,59 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,36 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,2033
Relación esteárico / linoleico	1,14 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,2890

Tabla 9. Relaciones entre componentes de la grasa subcutánea utilizadas como indicadores de cualidades nutricionales o aptitud tecnológica (\*P - Nivel de significancia del efecto del tratamiento en el modelo). Letras iguales dentro de una misma fila indican que no existe diferencia significativa entre las muestras para ese parámetro.

El efecto de las pasturas en el incremento de contenido de ácido graso C18:3 n-3  $\alpha$ -linoléico en la grasa subcutánea, en el tratamiento T3, es consistente con resultados obtenidos por Basso et al. (2007) y Echenique et al. (2009) en cerdos con acceso a pasturas. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de n-6 linoleico entre los tres tratamientos estudiados. Dado que otras fuentes alimenticias cubren las necesidades de este ácido graso, no es de interés nutricional aumentar su cantidad en alimentos cárnicos. En este sentido los tratamientos T1 y T3 fueron los que presentaron los mayores contenidos de C18:3 n-3  $\alpha$ -linoléico, sin que se encontraran diferencias estadísticamente significativas entre ellos, pero sí entre los tratamientos T2 y T3. La ausencia de diferencias se podría explicar porque los tratamientos T1 y T3 comparten el 90 % de la composición de la ración.

De igual modo, T2 y T3 presentaron diferencias estadísticamente significativas en la relación n-6/n-3 de la grasa subcutánea, lo que se explica por el aumento significativo de los ácidos grasos de la serie n-3, especialmente el  $\alpha$ -linoléico. A pesar de que estos resultados son favorables desde el punto de vista nutricional, debe considerarse que el consumo de grasa subcutánea, salvo excepciones, se mantendrá como no recomendable por su elevado aporte de ácidos grasos saturados y concentración energética (OMS, 2008). Las relaciones AGPI/AGS y n-6/n-3 de la grasa subcutánea obtenidas en los diferentes tratamientos de este ensayo se ubican en un rango similar al determinado por Capra et al. (2007) para dietas formuladas con ingredientes con bajo aporte relativo de ácido linoleico. No se verificaron diferencias significativas en los otros índices utilizados para caracterizar las cualidades nutricionales de las grasas.

La comparación de la composición de las grasas subcutánea e intramuscular confirma que la composición de la grasa de la dieta tiene menor efecto sobre el perfil lipídico de la grasa intramuscular que sobre el tejido adiposo subcutáneo (Musella et al., 2009).

### Aptitud tecnológica de la grasa para la elaboración de salames

En la elaboración de salames se analizó la actividad de agua de la pasta de salame, antes de su fermentación. Los resultados analíticos arrojaron altos valores previsible, comprendidos entre 0,952 y 0,958. Finalizado el producto y cuando se consideró apto para su comercialización, se realizaron los análisis de la actividad de agua, proteína y pH final. La  $a_w$  se situó entre 0,931 y 0,941, el pH entre 4,66 y 4,73 y el nivel de proteínas entre 17,6 y 19,8 % ( $f=6,25$ ).

Dalla Santa et al. (2006) establecen en su estudio que los salames poseen mayor o menor estabilidad en función de su actividad de agua y pH. En dicho estudio se analizaron 50 muestras de salame y se presentan resultados con valores de  $a_w$  que oscilan entre 0,80 y 0,95, valores de pH entre 4,35 y 6,92 y valores de proteínas entre 11,32 y 41,27 %. De acuerdo al criterio establecido por estos autores, los salames obtenidos en este estudio pueden considerarse como un producto estable.

Debido a la importancia que reviste la aptitud tecnológica de

la grasa para la producción de productos cárnicos, especialmente productos fermentados crudos sometidos a temperaturas moderadas, se debe considerar la relación existente entre ácidos grasos saturados e insaturados. Warnants et al. (1998) afirman que el nivel máximo recomendable de AGPI en la grasa utilizada para elaboración de salames se ubicaría en el entorno del 20 %, y que si el ácido linoleico es el AGPI predominante en la dieta del cerdo no cabe esperar efectos sensoriales indeseables. Sin embargo, Boulard et al. (1995) y López-Bote et al. (1999) señalan que en grasas destinadas a la elaboración de embutidos crudos madurados, el contenido límite de C18:2 sería del 12 %, que en condiciones excepcionales se podría aumentar hasta el 14 %. Vautier (2005) cita trabajos de Wood (1984) en los que se recomienda no sobrepasar el 15 % de ácido linoleico en la grasa subcutánea, y de Mourot (2001), que sugiere un máximo de 12 % de ácido linoleico y un mínimo de 12 % de ácido esteárico. Echenique (2007) sostiene que los ácidos grasos que presentan una alta correlación con la consistencia de la grasa son los ácidos esteárico (C18:0) y linoleico (C18:2), y Whittington et al. (1986) hallaron que esta relación es la mejor forma de predecir la firmeza de la grasa y, por lo tanto, su comportamiento tecnológico. Se considera que una grasa es blanda cuando esta relación es inferior a 1,47 (Daza y Buxadé, 2000). En este trabajo esta relación se sitúa por debajo de ese índice y se ubica entre 1,05 y 1,23 para T1, 1,23 y 1,41 para T2 y entre 1,04 y 1,22 para T3. El contenido de ácido linoleico en los tres tratamientos se ubicó en valores próximos a 12 %, como se muestra en la Tabla 8, lo que podría explicar el buen comportamiento térmico de la grasa a pesar de la baja relación entre esteárico y linoleico.

No se verificaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de punto de fusión. Los valores obtenidos en este estudio son similares a los verificados por Galiotta (2005) para cerdos producidos en confinamiento o en pastoreo, con un nivel leve de restricción de concentrado. Este parámetro es presentado a los industriales nacionales como indicador de la calidad de la grasa importada. Si bien Toldrá (2002) sugiere utilizar grasa con punto de fusión elevado en la elaboración de productos cárnicos fermentados, para evitar efectos adversos en el flavor (rancidez), este parámetro resulta insuficiente para predecir posibles defectos derivados de la fusión parcial de la grasa o una consistencia excesivamente oleosa en el feteado.

Los resultados del análisis sensorial de los salames se presentan en la Tabla 10.

Tratamiento	Textura	Agrado general	Intención de compra
T1	6,9 b	6,5 a	5,2 b
T2	6,2 a,b	6,1 a	4,8 a,b
T3	5,9 a	5,6 a	4,3 a

Tabla 10. Análisis sensorial de los salames elaborados con la grasa de cada tratamiento. Letras iguales dentro de una misma columna indican que no existe diferencia significativa entre las muestras para ese parámetro.

El 55,3 % de los consumidores prefirió la muestra elaborada con grasa del tratamiento T1, mientras que un 18,4 % prefirió en igual medida las muestras procedentes de los otros dos tratamientos. La preferencia de los consumidores por el tratamiento T1 con respecto al T3 se podría atribuir a la composición de la grasa, fundamentalmente a la diferencia en contenido en ácido linoléico, aunque las mismas son cuantitativamente muy estrechas. Se ha establecido que el incremento en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados del grupo n-3 puede asociarse a sabores o aromas indeseables en las carnes (Wood et al., 2004). Bryhni et al. (2002) afirman que aunque altos niveles de AGPI pueden contribuir a una carne más saludable, sus efectos indeseables sobre las propiedades sensoriales pueden transformarse en limitante. Hoz et al. (2004) asocian estos efectos indeseables en productos fermentados crudos a la estabilidad oxidativa de los AGPI. Sin embargo, estos efectos se manifiestan con contenidos de C18:3 n-3 mayores a los obtenidos en este estudio.

## Conclusiones

Los cerdos alimentados con ración de proteínas de origen vegetal y animal restringida al 90 % y pasturas a voluntad (T3) presentaron un mayor contenido de ácido linoléico n-3 y de vitamina E, comparados con los animales sometidos a los otros tratamientos. A pesar de la pequeña magnitud de la diferencia, desde el punto de vista nutricional esto representa una oportunidad dentro del grupo de alimentos cárnicos recomendables, ya que ofrece un doble beneficio al consumidor: mayor contenido de ácido linoléico, precursor de eicosanoides y del mantenimiento de la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares, y mayor contenido de vitamina E, destacada por su efecto antioxidante. Los resultados alientan la posibilidad de mejorar el valor nutricional de la carne de cerdo por enriquecimiento en compuestos bioactivos a través del manejo de la dieta de los animales. Si bien la bibliografía internacional sobre esta temática es abundante, el desafío es lograr resultados nutricionalmente relevantes en base a los ingredientes disponibles en nuestras condiciones de producción. También es necesario considerar que en Uruguay no hay una producción de cerdos orientada hacia un destino específico (obtención de cortes frescos o elaboración de productos chacinados), sino que se busca lograr cualidades de la canal y de la carne que permitan satisfacer el doble propósito.

Desde el punto de vista tecnológico el comportamiento de la grasa utilizada fue acorde a lo esperado según los valores analíticos determinados. Los salames elaborados se consideran estables y con características técnicas y comerciales adecuadas, no presentando indicios de defectos por fusión de la grasa. Los resultados obtenidos sugieren que cuando se logra mantener los valores de ácido linoleico C18:2 en el entorno del 12 %, el comportamiento tecnológico de la grasa es adecuado, aunque la relación entre el contenido de los ácidos esteárico y linoleico sea inferior al valor recomendado.

Una adecuada formulación de las dietas para cerdos en crecimiento puede asegurar que la composición de las grasas destinadas a la elaboración de productos cárnicos fermentados se ajuste a las recomendaciones establecidas en la bibliografía. Este trabajo confirma que el objetivo puede ser logrado en las condiciones de producción prevalentes en sistemas familiares típicos de Uruguay, con formulaciones basadas en suplementos proteicos de origen animal o exclusivamente vegetal, tanto en sistemas de engorde en estabulación o con acceso a pasturas.

La preferencia del panel de consumidores por el salame correspondiente al T1, tanto en textura como en intención de compra, sugiere la necesidad de profundizar el conocimiento sobre el efecto del contenido de AGPI y de C18:3 n-3 en la grasa utilizada sobre las propiedades sensoriales del producto final.

## Reconocimientos

A los siguientes departamentos de LATU por su apoyo en análisis: Desarrollo de Métodos Analíticos, Cereales, Oleaginosos y Productos Derivados, Productos Lácteos, Cárnicos, Oleaginosos y de la Colmena.

A la empresa Antic S.A. por ceder sus instalaciones para el proceso de elaboración de los salames.

Al Dr. Gabriel Ciappesoni y la Ing. Agr. Andrea Ruggia, M.Sc. por su colaboración en los análisis estadísticos.

## Referencias

- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. *Official methods and recommended practices of the AOCS. Official Method Ce 2-66: Preparation of methyl esters of fatty acids*. 6a ed. Urbana: AOCS, 2009.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. *Official methods and recommended practices of the AOCS. Official Method Ce 1-62: Fatty acid composition by packed column gas chromatography*. 6a ed. Urbana: AOCS, 2009.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. *Official methods and recommended practices of the AOCS. Official Method Ce 1-91: Determination of fatty acids in edible oils and fats by capillary GLC*. 4a. ed., reapproved 1993. Urbana: AOCS, 1995.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. *Official methods and recommended practices of the AOCS. Official Method CC 1-25(93): Melting point capillary tube method Reapproved*. 6a ed., reapproved 2009. Urbana: AOCS, 2009.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 930.15.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 988.05.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 962.09.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 920.39.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 942.05.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 927.02.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 969.31.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18a ed., Gaithersburg: AOAC, 2005. Official Method 999.10.
- BASSO, L.R.; MOISÁ, S.; BRUNORI, J.; FRANCO, R.; BACCI, R.; PAPOTTO, D. Calidad de carne diferencial de cerdos producidos en sistemas al aire libre. En: *Agrociencia* (vol. Especial). IX Encuentro de Nutrición y Producción de Monogástricos. 2007:63-68.
- BAUZÁ, R.; GIL, M.J.; PETROCELLI, H. Evaluación del comportamiento productivo de cuatro tipos genéticos de cerdos sometidos a los tres sistemas de alimentación más comúnmente utilizados en el país. En: INIA. *Evaluación bioeconómica de sistemas de producción de cerdos*. Montevideo: INIA, 2003. (Serie FPTA, 15). pp.110-146.
- BOULARD, J.; BOUYSSIERE, M.; CHEVILLON, P.; KERISIT, P.; LE-JOSSEC, P. Le tri des jambons selon la qualité des gras en salle de découpe. En: *Techni-Porc*. 1995, 18: 21-32.

- BRITISH STANDARD INSTITUTION (England). BS EN 12822: *Foodstuffs. Determination of vitamin E by high performance liquid chromatography. Measurement of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$  tocopherols*. London: BSI, 2000.
- BRYHNI, E.A.; KJOS, N.P.; OFSTAD, R.; HUNT, M. Polyunsaturated fat and fish oil in diets for growing-finishing pigs: effects on fatty acid composition and meat, fat, and sausage quality. En: *Meat Science*. 2002, 62(1):1-8.
- CAPRA, G.; ECHENIQUE, A.; GROMPONE, M.A.; BAUZÁ, R.; GONZÁLEZ, A.; SILVA, D. Evaluación de la inclusión de grano de soja desactivada, afrechillo de arroz integral o suero de queso en la dieta de cerdos en engorde. 3. Efecto sobre el perfil lipídico de la grasa subcutánea. En: *Agrociencia* (vol. especial). IX Encuentro de Nutrición y Producción en Animales Monogástricos. 2007:59-63.
- CORONADO, M.; VEGA Y LEÓN, S.; GUTIÉRREZ, R.; GARCÍA, B.; DÍAZ, G. Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: nutrición, bioquímica y salud. En: *Revista de Educación en Bioquímica*. 2006, 25(003):72-79.
- DALLA SANTA, O.R.; COELHO, F.A.; FREITAS, J.R.S.; DALLA SANTA, H.S.; TERRA, N.S. Características de salames fermentados producidos sin adición de cultivo iniciador. En: *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 2006, 5(3):231-236.
- DAUMAS, G. Clasificación de las canales porcinas en Francia y Europa. En: *9º Seminario Nacional de Desarrollo de la Suinocultura*. Gramado: [s.n.], 2001. pp. 74-90.
- DAZA, A.; BOUXADÉ, C. *La calidad de la carne del cerdo blanco. Producción porcina: aspectos claves*. Madrid: Mundi-Prensa. 2000. pp. 237-257.
- DIEA-MGAP; INIA. *Encuesta Porcina 2006. Caracterización de la situación productiva tecnológica, comercial y social del sector porcino*. Montevideo: DIEA, 2007. (FPTA, 170).
- ECHENIQUE A. El efecto de la alimentación sobre la calidad de la carne y grasa de cerdo. En: *IX Encuentro de Nutrición y Producción de Monogástricos. Cursos Pre Evento* (Montevideo 14-16 de noviembre de 2007). Montevideo: [s.n.], 2007. pp. 55-63.
- ECHENIQUE, A.; CAPRA, G. Diagnóstico de la situación de la calidad de carne porcina para consumo fresco en Uruguay. En: *INIA Serie Técnica*. 2006, (160).
- ECHENIQUE, A.; CAPRA, G. Caracterización de los requerimientos de calidad de carne de cerdo por parte de las industrias cárnicas porcinas en Uruguay. En: *INIA Serie Actividades de Difusión*. 2007, (514).
- ECHENIQUE, A.; CAPRA, G.; PARDO, G.; GROMPONE, M.A.; URRUZOLA, N. Efecto de las pasturas sobre la composición química de la grasa intramuscular de cerdos machos enteros y castrados producidos al aire libre en Uruguay. En: *EEZ. AIDA XIII Jornadas sobre Producción Animal* (Zaragoza 12-13 de mayo de 2009). Tomo 2. Zaragoza: EEZ, 2009. pp. 622-624.
- ELEJALDE, J. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. En: *Anales de Medicina Interna*. 2001, 18(6):326-335.
- ENFÄLT, A.CH.; LUNDSTRÖM, K.; HANSSON, N.L.; NYSTRÖM, P.E. Effect of outdoor rearing and sire breed (Duroc or Yorkshire) on carcass composition and sensory and technological meat quality. En: *Meat Science*. 1997, 45(1):1-15.
- ERREA, E. Evolución reciente y perspectiva de los suinos. En: *MGAP-OPYPA. Anuario 2010*. Montevideo: MGAP, 2010. pp. 89-98.
- FEDNA. Tablas FEDNA de ingredientes para piensos [En línea]. [s.l.]: [s.n.], 2003. [Consulta: 06 de mayo de 2011]. Disponible en: [www.etsia.upm.es/fedna/tablas/htm](http://www.etsia.upm.es/fedna/tablas/htm)
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. En: *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226:497-509.
- GALIETTA, G. Calidad de la carne porcina. En: *Jornada Taller Utilización de pasturas en la alimentación de cerdos*. Facultad de Agronomía. Montevideo, diciembre 2005. p. 33-38.
- GROMPONE, M.A.; IRIGARAY, B. Composición y propiedades de la grasa de cerdo. En: *Carnes y Alimentos*. 2008, 9(26):11-19.
- HENRY, Y.; PEREZ, J.M.; SEVE, B. Alimentation des porcs en croissance. En: *L'alimentation des animaux monogastriques: porc, lapin, volaille*. Paris: INRA, 1984. pp. 49-66.
- HERRANZ, B.; ORDOÑEZ, J.A.; DE LA HOZ, L.; HIERRO, E.; SOTO, E., CAMBERO, M.I. Fatty acid composition of salami from different countries and their nutritional implications. En: *International Journal of Food Science and Nutrition*. 2008, 59(7-8): 607-618.
- HOFFMAN, L.C.; STYGER, E.; MULLER, M.; BRAND, T.S. The growth and carcass and meat characteristics of pigs raised in a free-range or conventional housing system. En: *South African Journal of Animal Science*, 2003, 33(3):166-175.
- HOZ, L.; D'ARRIGO, M.; CAMBERO, I.; ORDÓÑEZ, J.A. Development of an n-3 fatty acid and  $\alpha$ -tocopherol enriched dry fermented sausage. En: *Meat Science*. 2004, 67(3): 485-495.
- IICA. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. *La agricultura familiar en los países del Cono Sur*. [s.l.]: IICA, 2007.
- INAC. Instituto Nacional de Carnes. Dirección de Contralor de Mercado Interno. *Volúmenes comercializados de carne destino abasto en Montevideo* [En línea]. Montevideo: INAC, 2011. [Consulta: 05 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://www.inac.gub.uy/innovaportal/file/1882/1/volumenes%20montevideo%20hasta%20marzo%202011.pdf>
- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (Switzerland). ISO 937: *Meat and meat products. Determination of nitrogen content (Reference method)*. Geneva: ISO, 1978.
- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (Switzerland). ISO 8589: *Sensory analysis -- General guidance for the design of test rooms*. Geneva: ISO, 1988.
- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (Switzerland). ISO 11885: *Water quality -- Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)*. Geneva: ISO, 1996.
- LÓPEZ-BOTE, C.; ISABEL, B.; REY, A.I. Efecto de la nutrición y del manejo sobre la calidad de la grasa en el cerdo. En: *FEDNA. XV Curso de Especialización. Avances en nutrición y alimentación animal*. Madrid: FEDNA, 1999.
- MSP. PROGRAMA NACIONAL DE NUTRICIÓN. *Guías alimentarias basadas en alimentos de Uruguay: manual para la promoción de prácticas saludables de alimentación en la población uruguaya*. Montevideo: MSP, 2005.
- MOUROT, J.; HERMIER, D. Lipids in monogastric animal meat. En: *Reprod. Nutr. Dev*. 2001, 41:109-118. Citado en: VAUTIER, A. *Les valeurs nutritionnelles de la viande de porc: les facteurs de variation* [En línea]. Paris: Institut Technique du Porc, 2005. [Consulta: 05 de mayo de 2011]. Disponible en: [www.office-elevage.fr/dei/f-707a.pdf](http://www.office-elevage.fr/dei/f-707a.pdf)
- MUSELLA, M.; CANNATA, S.; ROSSI, R.; MOUROT, J.; BALDINI, P.; CORINO, C. Omega-3 polyunsaturated fatty acid from extruded linseed influences the fatty acid composition and sensory characteristics of dry-cured ham from heavy pigs. En: *Journal Animal Science*. 2009, 87(11):3578-3588.
- NRC. *Nutrient requirements of swine*. [s.l.]: National Academies Press, 1998.
- OMS. *Prevención y control de las enfermedades no transmisibles: aplicación de la estrategia mundial*. OMS: Vienna, 2008. (122ª reunión Consejo Ejecutivo EB122/9. Punto 4.6 del orden del día provisional). pp. 1-24.
- SAS INSTITUTE. *SAS*. Version 9.1.3. Cary, SAS Institute, 2003
- TOLDRÁ, F. *Dry-cured meat products*. Ed. Food & Nutrition Press, Connecticut. 2002. p. 65-66.
- ULBRICHT, T.L.V.; SOUTHGATE, D.A.T. Coronary heart disease: seven dietary factors. En: *Lancet*. 1991, 338:985-992.
- VAUTIER, A. *Les valeurs nutritionnelles de la viande de porc: les facteurs de variation* [En línea]. Paris: Institut Technique du Porc, 2005. [Consulta: 05 de mayo de 2011]. Disponible en: [www.office-elevage.fr/dei/f-707a.pdf](http://www.office-elevage.fr/dei/f-707a.pdf)
- VAUTIER, A. *Les valeurs nutritionnelles de la viande de porc:*

- analyses sur 9 pieces UVC* [En línea]. Paris: Institut Technique du Porc, 2006. [Consulta: 05 de mayo de 2011]. Disponible en: [www.office-elevage.fr/vpc/11jsmtv/11JSMTV.pdf](http://www.office-elevage.fr/vpc/11jsmtv/11JSMTV.pdf)
- WARNANTS, N.; VAN OECKEL, M.J.; BOUCQUÉ, Ch. V. Effect of incorporation of dietary polyunsaturated fatty acids in pork backfat on the quality of salami. En: *Meat Science*. 1998, 49(4):435-445.
  - WHITTINGTON, F.M.; PRESCOTT N.J.; WOOD J.D.; ENSER M. The effect of dietary linoleic acid on the firmness of backfat in pigs on 85 kg live weight. En: *Journal of the Science of Food and Agricultural*. 1986, 37:753-761.
  - WOOD, J.D. Fat deposition and the quality of fat tissue in meat animals. En: WISEMAN, J. *Fats in Animal Nutrition*. London: Butterworths, 1984. pp. 407-435. Citado en: VAUTIER, A. *Les valeurs nutritionnelles de la viande de porc: les facteurs de variation* [En línea]. Paris: Institut Technique du Porc, 2005. [Consulta: 05 de mayo de 2011]. Disponible en: [www.office-elevage.fr/dei/f-707a.pdf](http://www.office-elevage.fr/dei/f-707a.pdf)
  - WOOD, J.D.; RICHARDSON, R.I.; NUTE, G.R.; CAMPO, M.M.; KASAPIDOU, E.; SHEARD, P.R.; ENSER, M. Effects of fatty acids on meat quality: a review. En: *Meat Science*. 2004, 66(1): 21-32.
-

# Estabilidad de emulsiones preparadas con proteínas de sueros de soja

Wagner, J. R. <sup>(1)\*</sup>, Sobral, P. A. <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Pcia. de Buenos Aires, Argentina - <sup>(2)</sup> Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas (UNLP-CONICET), La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Contacto: [jwagner@unq.edu.ar](mailto:jwagner@unq.edu.ar)

Recibido: 30/04/2010 - Aprobado: 06/09/2011

## Resumen

Por precipitación con acetona en frío, se obtuvieron muestras de proteínas aisladas de dos sueros de soja, el suero SS proveniente de la obtención de aislados de soja y el suero de tofu ST. A partir del SS y del mismo suero previamente liofilizado y calentado (SSLC) se obtuvieron las proteínas denominadas PSS y PSSLC, respectivamente; a partir de ST se preparó la muestra PST. El objetivo del trabajo fue analizar la estabilidad de emulsiones o/w preparadas con las proteínas de sueros de soja en forma comparativa con un aislado de soja nativo (ASN). Las emulsiones se prepararon por homogeneización de dispersiones proteicas (0,1–1,0 % p/v en buffer fosfato 10 mM pH 7) y aceite de girasol ( $\Phi_{\text{máscico}}=0,33$ ), empleando un Ultraturrax T-25. La estabilidad fue evaluada por medida del aceite separado, distribución de tamaño de partículas (por difracción láser) y los grados de cremado y coalescencia evaluados a través de perfiles de BackScattering. Se observó que en todas las concentraciones ensayadas las emulsiones preparadas con proteínas aisladas (por precipitación con acetona en frío) de suero de tofu tratado térmicamente (PST) tenían una estabilidad comparable a la de emulsiones preparadas con ASN. Se halló una estabilidad menor en emulsiones con proteínas nativas de suero de soja (PSS) obtenido en laboratorio no tratado térmicamente. Las proteínas obtenidas de este suero liofilizado y calentado (PSSLC) exhibieron una mejor capacidad emulsionante. Los resultados mostraron que las proteínas de sueros de soja presentan buenas propiedades emulsionantes y estabilizantes dependientes del grado de desnaturalización y glicosilación alcanzado.

Palabras clave: Emulsificación, cremado, proteínas de soja, tofu, glicosilación, floculación, tamaño de partícula.

## Abstract

Soy whey proteins were obtained by precipitation with cold acetone from two whey, the whey resulting from soy isolate preparation (SS) and the tofu whey (ST). From the SS as such and of the same whey previously lyophilized and heated (SSLC), the samples called PSS and PSSLC were obtained, respectively; from ST it was prepared the PST sample. The objective of this work was to analyze the stability of emulsions prepared with whey soy proteins using native soybean isolated (ASN) as control. Emulsions were prepared by homogenization of aqueous dispersion of samples (protein range 0.1–1.0 % w/v in 10 mM phosphate buffer) and sunflower oil ( $\Phi_w=0.33$ ) using an Ultraturrax T-25. The stability was evaluated by oiling off, particle size distribution (laser diffraction) and creaming-coalescence degree by analysis of Backscattering profiles. At all protein concentration assayed it was observed that emulsions prepared with isolated proteins (precipitated with cold acetone) from a thermal treated tofu whey (PST) exhibited a similar stability as ASN emulsions. Smaller stability was found when native soy whey proteins (PSS) were used (proteins obtained from not thermally soybean whey). An increase of emulsion stability was observed with protein obtained from heated lyophilized soy whey. These results showed that whey soy proteins could be used as good emulsifying and stabilizing agents, depending on denaturation and glycosilation degree reached during thermal treatments.

Keywords: Emulsifying, creaming, soy proteins, tofu, glycosilation, flocculation, particle size.

## Introducción

Dos de los productos de soja con mayor contenido de proteínas son los aislados y el tofu. En los procesos para su obtención se busca un alto rendimiento en proteínas y la eliminación o inactivación de componentes indeseables. Los aislados se preparan a partir de un extracto alcalino de harina de soja, por precipitación ácida (pH 4,5) de las proteínas de reserva (7S y 11S) y separación del suero de soja, SS (Sorgentini y Wagner, 1999). En la obtención del tofu a partir de leche de soja, las proteínas de reserva se coagulan con sales de calcio y/o magnesio y calentamiento (10-30 min a 70-85 °C) y se crea también un suero (suero de tofu, ST). SS y ST contienen mayoritariamente hidratos de carbono y los factores antitripticos de Kunitz (FAK, 20 kDa) y de Bowman-Birk (FABB, 7 kDa) (Pearson, 1983; Cheftel, 1989). Se

generan cantidades elevadas de estos sueros a nivel industrial, lo que representa, por un lado, un problema ambiental si son descartados en forma directa y, por otro, una pérdida de componentes aprovechables por sus propiedades nutricionales o funcionales. Las proteínas de suero de soja cuando están inactivadas poseen un alto valor biológico. En el caso del ST, los factores antitripticos se encuentran casi totalmente inactivados debido a los tratamientos térmicos aplicados en la elaboración de la leche de soja y en la coagulación proteica (Sobral y Wagner, 2009).

El objetivo del trabajo fue estudiar la capacidad emulsionante de las proteínas aisladas obtenidas a partir de ST, SS, de este último secado e inactivado, en forma comparativa con el aislado nativo de soja obtenido en el laboratorio.

## Materiales y Métodos

### Obtención del aislado y de los sueros

El suero de soja (SS) y el aislado de soja nativo (ASN) fueron obtenidos, según los procedimientos descritos por Sorgentini y Wagner (1999), a partir de un extracto acuoso (pH=8,0) de harina de soja desgrasada no tratada térmicamente (Prosam™ R; Brasil). Por precipitación isoeléctrica (pH=4,5) de este extracto se separaron las globulinas de reserva y se obtuvo el SS. El precipitado resuspendido en agua (40 mg/ml, pH=8,0) y el suero fueron liofilizados, de donde resultaron las muestras ASN y SSL, respectivamente. El suero de tofu (ST) fue cedido por una industria local (Soyana S.H.). El suero de soja liofilizado calentado (SSLC) fue obtenido tratando térmicamente el SSL en condiciones anhidras a 5 °C/min hasta 150 °C para inactivar el FAK y desnaturalizar la lectina, L (Sobral y Wagner, 2007). A partir del SS y ST, se precipitaron las proteínas con acetona (0 °C, suero: acetona 1: 1 v/v), se separaron por centrifugación (10500g, 20 min, 4 °C) y se secaron por liofilización (PSS y PST, respectivamente). PSS contiene las proteínas FAK y L nativas en tanto que en PST están desnaturalizadas (Sobral y Wagner, 2009). De soluciones acuosas de SSLC (1: 10 p/v) se aislaron las proteínas con acetona en frío (PSSLC). En todas las muestras se determinó el contenido de proteína (Kjeldahl, Nx6,25) para preparar las emulsiones con contenidos comparables de proteína en la fase acuosa. Se estimó el grado de glicosilación (GG: g HC/100 g proteína) con el contenido de hidratos de carbono (HC) determinado por el método colorimétrico de fenol-sulfúrico.

### Preparación, caracterización y estudio de emulsiones

Las emulsiones o/w se prepararon homogeneizando 10 g de dispersión (1, 5 y 10 mg de proteína/ml buffer fosfato 10 mM pH 7) con 5 g de aceite refinado de girasol a 20.000 rpm (Ultraturax T-25, rotor S25N-10G, 1 min, 20 ± 2 °C). Los diámetros de partícula  $D_{1,0}$  (diámetro medio,  $\sum_i n_i d_i / \sum_i n_i$ ) y  $D_{4,3}$  (diámetro de De Brouckere,  $\sum_i n_i d_i^4 / \sum_i n_i d_i^3$ ), ambos expresados en  $\mu\text{m}$ , se determinaron con un equipo Malvern Mastersizer 2000E inmediatamente después de preparadas las emulsiones. El valor  $D_{1,0}$  da cuenta de la efectividad del proceso de homogeneización, en tanto que el  $D_{4,3}$  permite evaluar la existencia de partículas de gran tamaño. La cinética de separación gravitacional (cremado) de las emulsiones se estudió con un analizador óptico vertical (Quick Scan, Beckman), registrando los perfiles de backscattering (BS%) y transmitancia (T%) en función de la altura del tubo de medida (cada minuto durante 1 hora) y midiendo los valores promedio de BS% y T% en la base del tubo (8-10 mm). La constante cinética de separación gravitacional ( $K$ ,  $\text{min}^{-1}$ ) se calculó como:  $K = [10^3 / (BS_{0 \text{ prom}} \times t_{1/2})]$  donde  $BS_{0 \text{ prom}}$  es el valor promedio inicial de BS% y  $t_{1/2}$  el tiempo (min) para el cual  $BS_{\text{prom}} = 0,5 \times BS_{0 \text{ prom}}$ . El porcentaje de fase crema (FC%) se determinó a las 24 h a un  $BS_{\text{prom}} = 30\%$  como  $(A_c/A_0) \times 100$ , donde  $A_c$  = Altura crema y  $A_0$  = Altura inicial de la emulsión, ambos en mm. El aceite separado (AS%) de las emulsiones se determinó según Palanuwech et al. (2003), con leves modificaciones (Palazolo y Wagner, 2007).

### Análisis estadístico

Todas las emulsiones ensayadas fueron realizadas por duplicado y las determinaciones de tamaño de partícula y estabilidad se realizaron al menos por triplicado. Los valores medios obtenidos son expresados con su desviación estándar. Los resultados se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre medias mediante el Test de Fisher a un nivel de significación  $\alpha = 0.05$ . (Statgraphics Plus versión 2.1, Statistical Graphics Corp., Princeton, USA).

## Resultados y Discusión

En la Figura 1 se muestran las cinéticas de cremado de las emulsiones. A la menor concentración de muestra, la emulsión ASN (muestra referencia) tiene una estabilidad mayor, con valores de  $K$  más bajos (Tabla 1), en tanto que las demás emulsiones siguen un orden de estabilidad  $PST > PSS > PSSLC$ . A concentraciones medias, la estabilidad sigue el orden  $ASN > PSS \approx PST \approx PSSLC$ . Al aumentar la concentración, todas las muestras dan valores de  $K$  significativamente similares. El  $D_{1,0}$  fue similar (entre 0,63-0,66  $\mu\text{m}$ ) para todas las muestras, que exhibieron un comportamiento bimodal y valores altos de  $D_{4,3}$ : 42,86; 40,26; 39,64 y 37,11  $\mu\text{m}$  para PSSLC, ASN, PSS y PST, respectivamente. La clarificación en la zona inferior del tubo, cuantificada como T% a los 60 minutos (Tabla 1) da cuenta de la floculación de gotas pequeñas y el aumento de su velocidad de migración. Las emulsiones con PSS muestran la mayor tendencia a la floculación; a 10 mg/ml presentan la mayor clarificación, lo que explica la falsa señal de BS a partir de los 10 minutos (Figura 1).

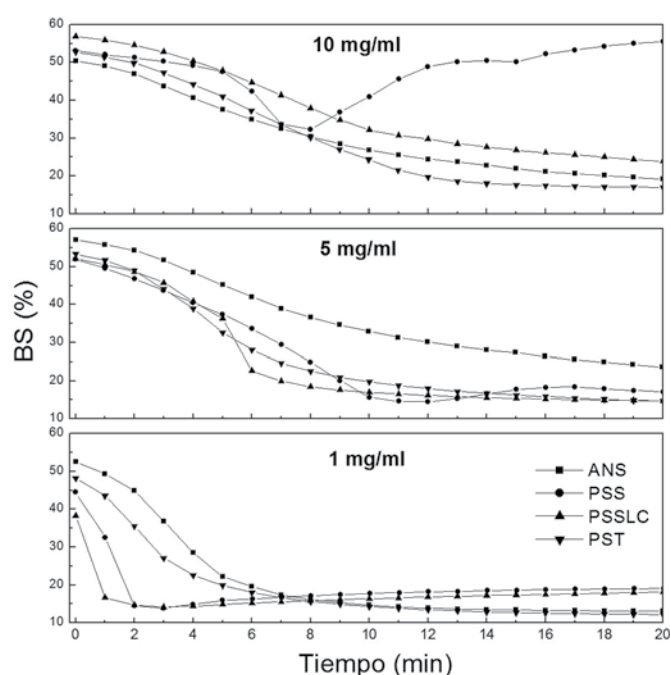


Figura 1. Separación gravitacional (cremado) de emulsiones o/w con 1, 5 y 10 mg de proteína/ml de fase acuosa. Se graficaron los valores medios de Backscattering (BS%) en la zona baja de la emulsión (8-10 mm) en función del tiempo de almacenamiento estacionario.

Muestra	Concentración de proteína en la fase acuosa (mg/ml)	Constante cinética de separación gravitacional ( $K$ , $\text{min}^{-1}$ )	Transmitancia (T%)
ASN	1	4,4 ± 0,9	0,60 ± 0,38
	5	1,3 ± 0,5	0,15 ± 0,12
	10	1,7 ± 0,7	0,31 ± 0,7
PSS	1	14,3 ± 0,8	9,02 ± 0,40
	5	2,6 ± 0,6	10,22 ± 0,83
	10	1,7 ± 0,5	63,52 ± 1,24
PST	1	5,7 ± 0,3	2,28 ± 1,40
	5	2,9 ± 0,1	0,70 ± 0,32
	10	2,1 ± 0,1	2,21 ± 0,71
PSSLC	1	29,5 ± 1,4	8,86 ± 1,45
	5	3,3 ± 0,1	0,26 ± 0,15
	10	1,3 ± 0,1	0,05 ± 0,03

Tabla 1. Constante cinética de separación gravitacional ( $K$ ) y valores de Transmitancia (T%) en la zona inferior de emulsiones con 1 hora de almacenamiento. Las emulsiones se prepararon con 1, 5 y 10 mg de proteína/ml de fase acuosa.

En las emulsiones PSSLC, T% disminuye significativamente con el incremento de la concentración, resultado opuesto a lo observado en PSS. T% en PST es menor en todas las concentraciones que en PSS. En la emulsión control y en PST el efecto de la concentración sobre T% no es significativo. Los resultados indican que las emulsiones PSSLC a 5 y 10 mg/ml (comparable con ASN a las mismas concentraciones) exhiben la menor clarificación, lo que indicaría una menor tendencia a la floculación o a la formación de floculos hidratados. Éstos últimos formarían una estructura tipo red, con mayor capacidad de retención de agua, propiedad en la que contribuirían las proteínas desnaturalizadas con un mayor grado de glicosilación. El GG fue: 12,21; 22,44; 21,16 y 46,63 % para ASN, PSS, PST y PSSLC, respectivamente. En las muestras PSS y PST, si bien tienen un valor GG similar, la presencia de proteínas desnaturalizadas en PST explica su diferente tendencia a la floculación.

La cantidad de aceite separado (AS%) fue bajo en todas las emulsiones (<5%), disminuyendo con el incremento de la cantidad de muestra (Tabla 2). A 10 mg/ml, la emulsión con el valor más bajo de AS% fue ASN; en el resto de las emulsiones el valor AS% fue significativamente similar. Dado que el  $\Phi_{\text{másico}}$  es el mismo en todas las emulsiones, el volumen que ocupan las gotas de aceite en las fases crema de todas las emulsiones es también el mismo. Por lo tanto, el volumen relativo que ocupa la fase crema a las 24 h (FC%) depende directamente de la cantidad de agua que se retiene entre gotas de aceite, o sea, del grado de hidratación de dicha fase. La fase crema de ASN resultó la menos hidratada a 5 y 10 mg/ml (Tabla 2). Las cremas de PST tuvieron un grado de hidratación intermedio, en tanto que las de PSSLC incrementaron significativamente su grado de hidratación con el aumento de la concentración utilizada, lo cual puede ser relacionado con la existencia de floculos hidratados.

J.N. A method to determine free fat in emulsions. En: *Food Hydrocolloids*. 2003, 17(1):55-62.

- PALAZOLO, G.G.; WAGNER J.R. Effect of freezing on stability of soy protein and sodium caseinate oil-in-water emulsions. En: LUPANO, C.E. *Functional properties of food components*. Kerala: Research Signpost, 2007. pp. 33-56.
- PEARSON, A.M. Soy proteins. En: *Developments in food protein-2*. HUDSON, B.J.F. London: Elsevier Applied Science, 1983. pp. 67-108.
- SOBRAL, P.A.; WAGNER, J.R. Thermal properties of soybean whey and its protein. En: LUPANO, C.E. *Functional properties of food components*. Kerala: Research Signpost, 2007. pp. 57-76.
- SOBRAL, P.A.; WAGNER, J.R. Relación entre la composición y la actividad antitriptica de sueros de soja y el comportamiento térmico de sus proteínas Aisladas. En: *Información Tecnológica*. 2009, 20(5):65-73.
- SORGENTINI, D.A.; WAGNER, J.R. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins. En: *Journal of Food Biochemistry*. 1999, 23(5):489-507.

Muestra	Concentración de proteína en la fase acuosa (mg/ml)		
	1	5	10
	AS%		
ASN	2,20 ± 0,59	0,53 ± 0,28	0,12 ± 0,05
PSS	4,77 ± 0,25	1,08 ± 0,17	0,65 ± 0,03
PST	1,07 ± 0,33	0,52 ± 0,37	0,49 ± 0,25
PSSLC	2,35 ± 0,52	1,19 ± 0,32	0,59 ± 0,11
	FC%		
ASN	60,2 ± 3,5	51,0 ± 3,0	48,5 ± 2,0
PSS	54,6 ± 2,9	65,7 ± 1,5	61,7 ± 2,8
PST	56,1 ± 2,7	54,8 ± 1,9	61,9 ± 1,3
PSSLC	52,1 ± 1,8	65,1 ± 2,6	63,7 ± 1,0

Tabla 2. Porcentajes de Aceite separado (AS%) en emulsiones iniciales y de Fase crema (FC%) en emulsiones luego de 24 h de almacenamiento.

## Conclusiones

Los resultados muestran que las proteínas aisladas de sueros de soja tienen buenas propiedades emulsionantes y estabilizantes según sea el grado de desnaturalización y glicosilación alcanzado. Las dispersiones con 10 mg/ml de proteínas desnaturalizadas de suero de soja y de tofu tienen capacidad de formar y estabilizar emulsiones o/w de manera similar al aislado nativo de soja, con la característica diferencial de formar cremas más hidratadas.

## Referencias

- CHEFTEL, J-C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. *Proteínas alimentarias*. Zaragoza: Acribia, 1989. pp.257-275.
- PALANUWECH, J.; POTINENI, R.; ROBERTS, R.F.; COUPLAND,



# Evolución de la proteólisis durante la maduración de quesos Danbo elaborados con distintos cultivos iniciadores

Panizzolo, L. A.<sup>(1)\*</sup>, Araújo, A. C.<sup>(1)</sup>, Taroco, L. V.<sup>(1)</sup>, Rodríguez, A.<sup>(1)</sup>, Schöpf, G.<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Cátedra de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

<sup>(2)</sup> Jucar Ltda, Nueva Helvecia, Colonia, Uruguay.

Contacto: arodriguez@fq.edu.uy

Recibido: 30/06/2011 - Aprobado: 7/11/2011

## Resumen

La determinación de nitrógeno soluble a pH 4,6 (NNC), nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (12 %) (NTCA) y nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico (5 %) (NPTA) se utiliza como índice de maduración de quesos, ya que proporciona información adecuada de la extensión global de la proteólisis. La formación de péptidos y aminoácidos durante la maduración del queso contribuye directamente al desarrollo del sabor y textura del queso, de allí la importancia de conocer si el uso de distintos cultivos iniciadores genera diferencias en el desarrollo de la proteólisis. En este trabajo se estudiaron los cambios proteolíticos durante la maduración de quesos Danbo elaborados con cultivos iniciadores que difieren en la proporción de sus microorganismos componentes: Lote A con: 60 % *Streptococcus thermophilus* subsp. *thermophilus* – 40 % (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* + *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) y Lote B con: 50 % *Streptococcus thermophilus* subsp. *thermophilus* – 50 % (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*). Se analizaron quesos con 0, 15, 30 y 45 días de maduración y se determinó contenido de humedad, pH, contenido de nitrógeno en queso y contenido de nitrógeno de las distintas fracciones nitrogenadas. El lote elaborado con un mayor porcentaje de cultivo mesófilo (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), lote B, fue el que presentó mayor proteólisis primaria y mayor formación de oligopéptidos y aminoácidos libres.

Palabras clave: Queso, Danbo, proteólisis, fracciones nitrogenadas.

## Abstract

The determination of soluble nitrogen at pH 4.6 (NNC), nitrogen soluble in trichloroacetic acid (12 %) (NTCA) and nitrogen soluble in phosphotungstic acid (5 %) (NPTA) is used as an index of cheese ripening because it provides tailored information to the global extent of proteolysis. The formation of peptides and amino acids during cheese ripening contributes directly to the development of cheese flavor and texture, hence the importance of knowing whether the use of different starter cultures generate differences in the development of proteolysis. The aim of this paper is to study the proteolytic changes during ripening of Danbo cheeses which were manufactured with starter cultures that differ in the ratio of their microorganisms components: batch A, 60 % *Streptococcus thermophilus* subsp. *thermophilus* – 40 % (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* + *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) and batch B, 50 % *Streptococcus thermophilus* subsp. *thermophilus* – 50 % (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* + *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*). Cheeses were analyzed at 0, 15, 30 and 45 days of ripening by determination of moisture content, pH, nitrogen content in cheese and nitrogen content of nitrogenous fractions. The batch made with a higher ratio of mesophilic cultures (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), batch B, presented the highest primary proteolysis and highest formation of oligopeptides and free amino acids.

Keywords: Cheese, Danbo, proteolysis, nitrogenous fractions.

## Introducción

El queso Danbo es un queso de mediana humedad, graso, elaborado por coagulación de la leche por medio de cuajo y/u otras enzimas coagulantes apropiadas. Para su fabricación pueden utilizarse fermentos de bacterias lácticas específicas (Reglamento MERCOSUR, 1996).

En la fabricación de la mayoría de las variedades de quesos se añaden a la leche, previo a la coagulación, cepas de una o más especies de bacterias lácticas cuidadosamente seleccionadas, denominadas cultivos iniciadores o *starters*, con el objetivo fundamental de

iniciar la fermentación. Su función principal es la producción de ácido láctico y, en algunos casos, la producción de compuestos secundarios responsables del sabor y aroma del queso, como ácido acético, acetaldehído y diacetilo. La producción de ácido tiene tres funciones importantes: favorece la actividad del cuajo, ayuda al desuerado de la cuajada, reduciendo así el contenido en humedad del queso, y ayuda a prevenir el crecimiento de bacterias indeseables en el queso (Poveda, 2001). Las enzimas proteolíticas presentes en los fermentos completan la acción del cuajo, liberando péptidos de pequeño tamaño y aminoácidos libres (Desmazeaud y Gripon, 1977); las peptidasas son las responsables de la degradación de los péptidos hidrofóbicos amargos, influyendo positivamente en la calidad

organoléptica del queso. Los compuestos así formados son, además, el origen de compuestos que intervienen directamente en el sabor de los quesos o constituyen precursores de los compuestos aromáticos (Law et al., 1993; Monnet et al., 1993). En particular los lactococos están dotados de un sistema proteolítico complejo y por ello son los principales agentes proteolíticos en los quesos de pasta prensada tipo Gouda o Saint-Paulin. Debido a esto los lactococos intervienen en la degradación de las caseínas, principalmente por sus proteasas de pared y por sus diferentes peptidasas intracelulares o unidas a la envoltura (Monnet et al., 1993; Pritchard y Coolbear, 1993).

La maduración es la etapa del proceso de elaboración del queso durante la cual la cuajada fresca se transforma en una masa homogénea y se desarrollan las características organolépticas típicas del queso: aspecto, textura, sabores, aroma. Esto se debe a una serie de cambios bioquímicos, de reacciones glicolíticas, lipolíticas y proteolíticas, estas últimas como las principales causantes de los cambios de textura durante la maduración del queso (Desmazeau y Gripon, 1977; Fox, 1999). La proteólisis en el queso se produce por la acción de las enzimas presentes: las proteinasas de la leche, las enzimas coagulantes, los cultivos iniciadores y otros microorganismos que se desarrollan en el queso (Sánchez-Ponte, 2003). Dentro de la proteólisis se distinguen la proteólisis primaria, que es la responsable de la textura blanda característica al principio de la obtención de la cuajada, y la proteólisis secundaria, en la que se generan péptidos de pequeño tamaño y alta hidrofobicidad que detectados por los receptores del sabor producen la sensación de amargor. Estos péptidos sirven como substratos precursores para las proteinasas y peptidasas bacterianas que los transforman en péptidos más pequeños y aminoácidos libres (Ferrandini Banchemo, 2006) como se mencionó anteriormente. Los aminoácidos, provenientes de la degradación de las proteínas durante la maduración del queso, pueden variar en cantidad e incluso en los tipos de aminoácido debido al catabolismo de aminoácidos. Por estas transformaciones pueden encontrarse aminoácidos ausentes en las proteínas de la leche, como es el caso de la ornitina por degradación del ácido glutámico (Hemme et al., 1982). En el esquema general del catabolismo microbiano de los aminoácidos en la maduración de los quesos propuesto por Hemme et al. (1982) se encuentra que en una primera etapa los aminoácidos podrían ser degradados por cuatro grupos de enzimas: descarboxilasas, transaminasas, desaminasas y liasas. Estos productos podrían continuar degradándose hasta la formación de compuestos volátiles tales como el amoníaco, cetonas, aldehídos, ácidos, o compuestos azufrados que forman parte del aroma de la mayoría de los quesos (Dumont y Adda, 1978; Curtin y McSweeney, 2004).

Para el estudio químico de la maduración de quesos son utilizados como índices de maduración la determinación de fracciones de nitrógeno soluble (NNC, NTCA y NPTA), que proporcionan información de la extensión global de la proteólisis. El NNC corresponde a los compuestos de nitrógeno solubles a pH 4.6, y se define como nitrógeno no caseínico, ya que las caseínas son insolubles a ese pH, éstos son producidos fundamentalmente por el cuajo y aumentan durante la maduración. Dentro de los NNC también entran las proteínas del suero y las peptonas proteosas, solubles a pH 4.6, aunque su contribución es relativamente menor. Por otro lado, las  $\gamma$ -caseínas son insolubles a pH 4.6. El ácido tricloroacético (TCA) es un precipitante de proteínas que ha sido ampliamente utilizado como índice de maduración en quesos. Yvon et al. (1989) hallaron que todos los péptidos con menos de siete residuos de aminoácidos eran solubles en TCA al 12 %. La renina es responsable de la producción de parte del nitrógeno soluble en TCA 12 %, pero las proteinasas y peptidasas del cultivo iniciador también contribuyen considerablemente a la formación del nitrógeno soluble en TCA 12%. El ácido fosfotúngstico (PTA) es un precipitante de proteínas muy selectivo. El nitrógeno soluble en PTA (1.0; 2.5; 5.0; 6.0 y 6.5 %) ha sido ampliamente utilizado como índice de aminoácidos libres en queso, sólo aminoácidos libres y péptidos menores son solubles en PTA 5 % (Sánchez-Ponte, 2003).

El objetivo de esta investigación fue estudiar, por medio del análisis de las diferentes fracciones nitrogenadas, los cambios proteolíticos durante la maduración de dos quesos Danbo elaborados

con diferentes cultivos iniciadores que difieren en la proporción de sus microorganismos componentes.

## Materiales y Métodos

Para el estudio de la proteólisis según el cultivo iniciador se utilizaron quesos Danbo, un lote elaborado con 60 % *Streptococcus thermophilus* sub *thermophilus* - 40% (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* + *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) como cultivo iniciador (lote A) y el otro elaborado con 50 % *Streptococcus thermophilus* subsp. *thermophilus* - 50 % (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* + *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) como cultivo iniciador (lote B). De cada lote se analizaron muestras con 0, 15, 30 y 45 días de maduración.

Se elaboraron ambos lotes de queso Danbo mediante tecnología tradicional en la planta de Jucar Ltda. Para ello se utilizó una tina de 120 litros, leche tipificada al 3 % de materia grasa, agregado del fermento correspondiente a 35 °C y maduración por 30 minutos, cuajado con cuajo Genético a 35 °C, corte, desuerado en tina del 20 % y agregado de un 15 % de agua caliente a 70 °C, cocción a 42 °C por 20 minutos. Pescado en tela y moldeado en moldes de 22x14x14 cm para hormas de 4 kg aproximadamente, prensado. Salazón en salmuera a 21° Baumé por 24 hs. Oreo, y maduración en cámara de maduración a 11 °C.

Se tomaron 2 quesos de cada lote para el estudio. La toma de muestra del queso se realiza por calado. El contenido de humedad se determinó por el método de secado convencional en estufa a 105°C en cápsulas con arena según la Norma FIL-IDF 4: 1958. La determinación de pH se realizó con un pH-metro ORION RESERCH digital ionalyzer/501, según Ferrandini Banchemo (2006). Para evaluar la proteólisis de los quesos durante el período de maduración, se utilizaron como índices:

- el Nitrógeno soluble a pH 4.4 – 4.6, también llamado Nitrógeno No Caseínico (NNC).
- el Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12 %, también llamado Nitrógeno No Proteico (NTCA).
- el Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico 5 % (NPTA).

Los métodos utilizados para el fraccionamiento y la determinación de las fracciones nitrogenadas fueron los descriptos por Ardö y Polychroniadou (1999) y Bütikofer, Rüegg y Ardö (1993). La determinación de Nitrógeno tanto en las muestras de queso como en las distintas fracciones nitrogenadas se realizó por el método de Kjeldahl utilizando la Norma FIL-IDF25:1964. Los resultados se expresaron como % del Nitrógeno total para cada queso.

Todos los análisis se realizaron por duplicado.

El análisis estadístico de los datos se hizo mediante análisis de varianza (ANOVA) y test de mínima diferencia significativa (LSD) con un  $\alpha=0.5$  para comparación de las medias, utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus 7.0.

## Resultados y Discusión

Se observó que los valores de pH entre ambos lotes fueron significativamente diferentes para todos los tiempos de maduración, menos para los 30 días (Figura 1). La mayor diferencia se encontró a los 45 días. El pH del lote B fue mayor al del lote A para los tiempos de maduración 0, 15 y 45 días. Dicha diferencia puede atribuirse a la variación en el cultivo iniciador que afecta al pH final el día de elaboración: el lote A se elaboró con fermento con una diferencia del 10 % adicional en la cantidad de cultivo Termófilo, y los cultivos termófilos poseen poder acidificante de moderado a alto dependiendo de la cepa (Guerrero et al., 1997).

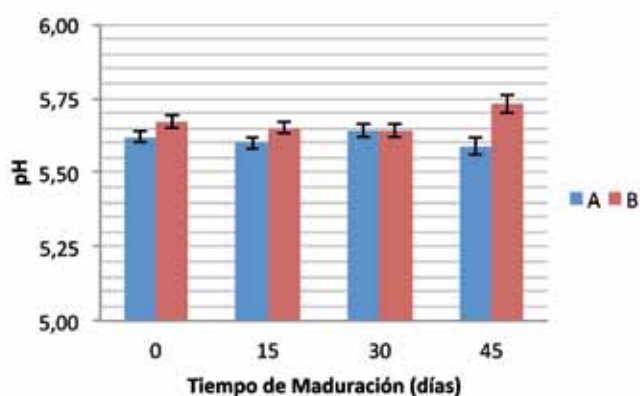


Figura 1. Variación del pH en queso con el tiempo de maduración.

El contenido de humedad disminuyó con el transcurso de la maduración de los quesos tanto en el lote A como en el B (Figura 2). Los valores de contenido de humedad del lote B fueron significativamente mayores a los del lote A en todos los tiempos de maduración estudiados (15, 30 y 45 días). Como en el caso del pH, esto podría explicarse por la diferencia en los cultivos iniciadores, ya que cuando ocurre una acidificación más lenta con reducida expulsión de suero se obtienen quesos de mayor humedad (Gómez et al., 1998).

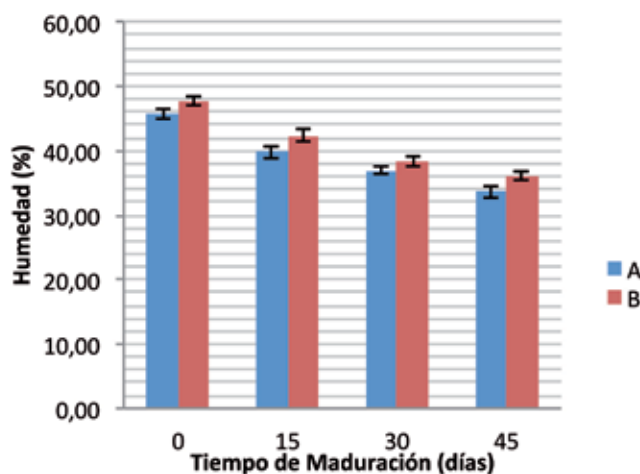


Figura 2. Variación de humedad en queso con el tiempo de maduración.

En el estudio de la proteólisis se observó que la fracción de nitrógeno insoluble a pH 4,6 (NNC) aumentó con el tiempo de maduración para ambos lotes A y B (Figura 3). Esto concuerda con lo observado por Spadoti et al. (2005) en estudios con queso Prato, similar al Danbo, pero que difiere en su elaboración en no ser de masa lavada. Al comparar entre los lotes A y B, se constató que con 0 y 15 días de maduración no existieron diferencias significativas de NNC entre ambos, pero con mayor tiempo de maduración comenzaron a aparecer diferencias significativas: a los 30 días de maduración el NNC del lote A fue mayor al NNC del lote B, mientras que a los 45 días de maduración el NNC del lote B fue mayor al NNC del lote A.

Poveda (2001) en su estudio de la fracción insoluble a pH 4,6 (NNC) en quesos Manchego elaborados con diferentes cultivos iniciadores (*Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis*, entre otros), no encontró diferencias entre los lotes para cada tiempo de maduración e indicó que ello podría ser debido a que los agentes responsables de la proteólisis a este nivel (proteólisis primaria) son el cuajo y la plasmina, mientras que las peptidasas del *starter* actúan sobre los péptidos liberados en la proteólisis primaria, produciéndose así la proteólisis secundaria.

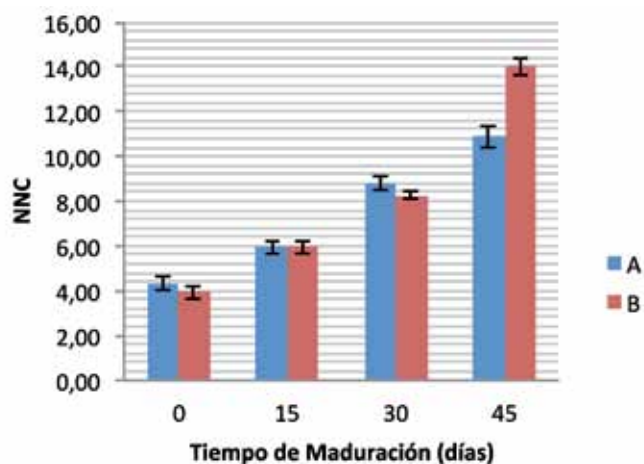


Figura 3. Evolución de la fracción nitrogenada NNC en el queso con el tiempo de maduración.

El hecho de que el NNC del lote B fuese mayor, finalizado el periodo de maduración de 45 días, podría deberse a la riqueza en enzimas proteolíticas de los lactococos, como fue mencionado anteriormente, pero también a la influencia de un mayor contenido de humedad si ambos lotes contuvieran el mismo contenido de sal, como explican Sorensen y Benfeldt (2001). Los valores de NNC obtenidos a los 45 días fueron similares a los obtenidos por Gorostiza et al. (2004) y los expuestos por Spadoti et al. (2005) para el queso Prato.

En cuanto a las fracciones nitrogenadas solubles en TCA 12 % (NTCA) se puede observar que aumentaron con el tiempo de maduración para ambos lotes (Figura 4). Este aumento de NTCA en el tiempo concuerda con lo informado por otros investigadores, Gorostiza et al. (2004) y Sanchez-Ponte (2003), en estudios en queso Prato y Danbo, respectivamente. Al comparar entre lotes se observó que al inicio la fracción NTCA es significativamente diferente para ambos: el NTCA del lote B fue mayor al NTCA del lote A, pero para los demás tiempos de maduración no se detectó la existencia de diferencias significativas.

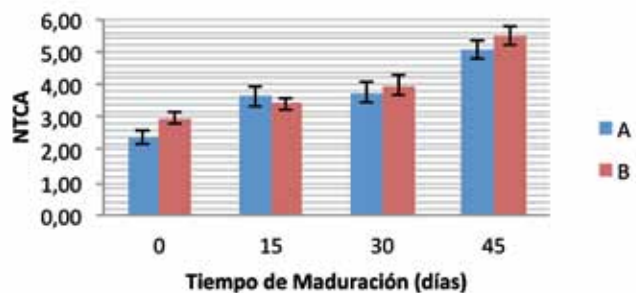


Figura 4. Evolución de la fracción nitrogenada NTCA con el tiempo de maduración.

Los valores de NTCA obtenidos a los 45 días fueron significativamente menores a los obtenidos por Gorostiza et al. (2004) para el queso Prato. Cabe destacar que el queso Prato al no ser de masa lavada no tiene las pérdidas de enzimas como el Danbo (Gorostiza et al., 2004); en conjunto con los diferentes orígenes y calidades de leche, de cuajo, fermentos y variaciones de tecnología, esto podría explicar la diferencia entre los investigadores.

La fracción nitrogenada soluble en ácido fosfotúngstico (NPTA) presentó un aumento continuo durante el tiempo de maduración para ambos lotes (Figura 5). Poveda (2001) informó un aumento de NPTA durante la maduración de Queso manchego elaborado con diferentes cultivos iniciadores y Gorostiza et al. (2004) también consignaron un aumento de aminoácidos totales durante el tiempo de maduración de queso Prato.

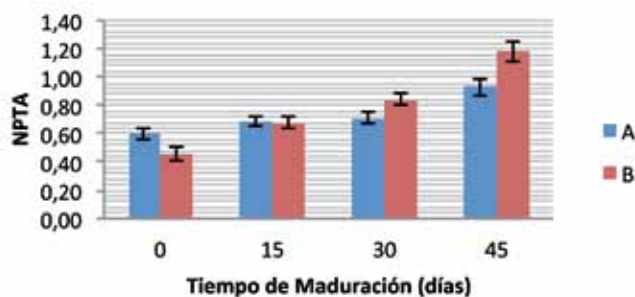


Figura 5. Evolución de la fracción nitrogenada NPTA con el tiempo de maduración.

Al inicio del estudio el NPTA del lote A fue significativamente mayor al del lote B, a los 15 días ya no se presentaron diferencias significativas, mientras que a los 30 y 45 días el NPTA del lote B fue significativamente mayor al NPTA del lote A.

Que el lote B haya presentado un mayor valor de NPTA podría atribuirse a que las proteinasas del lactococos, microorganismo que estaba en mayor proporción en el lote B, presentan un sistema peptidásico capaz de degradar un amplio rango de péptidos de medio y pequeño tamaño a aminoácidos (Lane y Fox, 1996), contribuyendo así a la producción de péptidos pequeños u oligopéptidos y aminoácidos libres.

## Conclusiones

Se encontraron diferencias en la proteólisis de los lotes de queso Danbo elaborados con diferentes proporciones en los cultivos iniciadores, mediante la determinación de las fracciones de nitrógeno soluble NNC, NTCA y NPTA.

El lote de queso Danbo elaborado con un mayor porcentaje de cultivo mesófilo (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris*), lote B, fue el que presentó mayor proteólisis primaria y mayor formación de oligopéptidos y aminoácidos libres.

## Referencias

- ARDÖ, Y.; POLYCHRONIADOU, A. *Laboratory manual for chemical analysis of cheese, cost 95: improvement of the quality of the production of raw milk cheeses*. Brussels: Office for Official Publications of the European Communities, 1999. pp. 30-42.
- BÜTIKOFER, U.; RÜEGG, M.Y.; ARDÖ, Y. Determination of nitrogen fractions in cheese: evaluation of collaborative study. En: *Lebersson- Wiss. u. Technol.* 1993, 26:271-275.
- CURTIN, A.C.; MC SWEENEY, P.L.H. Catabolism of amino acids in cheese during ripening. En: FOX, P.; MCSWEENEY, P.; COGAN, T.; GUINEE, T. *Cheese Chemistry, physics and microbiology*. 3ra. ed., vol.1. Maryland: Elsevier, 2004. p.435.
- DESMAZEAU, M.J.; GRIPON, J.C. General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. En: *Milchwissenschaft*, 1977, 32: 731-734.
- DUMONT, J. P.; ADDA, J. Occurrence of sesquiterpenes in mountain cheese volatiles. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1978, 26(2): 364-367.
- FERRANDINI BANCHERO, E. *Elaboración de queso de Murcia al vino con cuajo natural en pasta*. Murcia: Universidad de Murcia, 2006. (Tesis de Doctorado)
- FOX, F.P.; LAW, J.; MC SWEENEY, P.L. H; WALLACE, J.. Biochemistry of cheese ripening. En: FOX, F.P. *Cheese: chemistry, physics and microbiology. General aspects*. 2a. ed., vol.1.

Norwell: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 389.

- GUERRERO, L.; MUSET, G.; PACHECO, L. Evaluación de las actividades enzimáticas de cultivos comerciales usados para la elaboración de quesos. En: *Revista Científica, FCV-LUZ*. 1997, 7(3): 209-214.
- GOMEZ, M. J.; PILAR, G.; NUNEZ, M.; MÉDINA, M. *Streptococcus thermophilus* as adjunct for a semi-hard cow's milk cheese. En: *Lait*. 1998, 78(5):501-511.
- GOROSTIZA, A.; CICHOSCKI, A.J.; VALDUGA, A.T.; VALDUGA, E.; BERNARDO, A.; FRESNO, J.M. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. En: *Food Chemistry*. 2004, 85:407-414.
- HEMME, D.; BOUILLANE, C.; METRO, E.; DESMAZEAU, M.J. Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening. En: *Sci. Aliment.* 1982, 2:113-123.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (Belgium). IDF 4: *Cheese and processed cheese - Determination of the total solids content (Reference Method)*. Brussels: IDF, 1958
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (Belgium). IDF 25: *Processed cheese products - Determination of nitrogen content and crude protein calculation - Kjeldahl method*. Brussels: IDF, 1964
- LANE, C. N.; FOX, P. F. Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. En: *International Dairy Journal*. 1996, 6:715-728.
- LAW, J.; FITZGERALD, G.F; UNIAKKE-LOWE, T.; DALY, C.; FOX, P.F. The contribution of lactococcal starter proteinasas to proteolysis in Cheddar cheese. En: *Journal Dairy Science*, 1993, 76: 2455-2467.
- MERCOSUR. *Reglamento técnico MERCOSUR de identidad y calidad del queso Danbo*. [s.l.]: MERCOSUR, 1996. (MERCOSUR/GMC/RES, 29/96)
- MONNET, V.; CHAPOT-CHARTIER, M. P.; GRIPON, J. C. Les peptidasas des lactococoques. En: *Lait*, 1993, 73:97-108.
- POVEDA, J.M. *Efecto de la utilización de distintos cultivos iniciadores en la proteólisis del queso manchego. Otros aspectos de la maduración*. Ciudad Real: Universidad de Castilla-La Mancha, 2001. (Tesis de Doctorado)
- PRITCHARD, G. G.; COOLBEAR, T. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. En: *FEMS Microbiology Reviews*. 1993, 12:179-206.
- SANCHEZ-PONTE, M. D. Maduración acelerada de queso con bacterias lácticas atenuadas térmicamente. En: *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2003, 13(4):299-306.
- SORENSEN, J; BENFELDT, C. Comparison of ripening characteristics of Danbo cheeses from two dairies. En: *International Dairy Journal*. 2001, 11:355-362.
- SPADOTI, L.M.; FERREIRA DORNELLAS, J. R.; MASSAGUER ROIG, S. Proteolysis of prato type cheese produced using ultrafiltration. En: *Sci. Agric.* 2005, 62(3): 235-239.
- STATPOINT TECHNOLOGIES, INC. Statgraphics Plus [Software]. 7.0. Warrenton: Statpoint Technologies, INC., [s.d.].
- YVON, M.; CHABANET, C.; PÉLISSIER, J.P. Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions. En: *Int. J. Peptide Protein Res.* 1989, 34:166-176.

# Influencia del pH en la estabilidad de emulsiones elaboradas con proteínas de salvado de arroz

Maldonado, L. <sup>(1)\*</sup>, Latorre, K. <sup>(1)</sup>, Rocha, P. <sup>(1)</sup>, Medrano, A. <sup>(1)</sup>, Abirached, C. <sup>(1)</sup>, Panizzolo, L. A. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad de la República, Uruguay.

Contacto: lauramaldonado@fq.edu.uy

Recibido: 30/06/2011 - Aprobado: 17/10/2011

## Resumen

Si bien las proteínas de origen animal en muchas instancias pueden tener mejores características funcionales que las proteínas de origen vegetal, el incremento de su costo puede favorecer al uso expansivo de las fitoproteínas como reemplazo. Una de las fuentes de proteínas de origen vegetal es el salvado de arroz, que se obtiene como subproducto en el proceso de pulido del arroz integral (*Oryza sativa* L) para producir el arroz blanco. Se estudió los procesos de cremado, floculación y coalescencia de emulsiones preparadas con proteínas del salvado de arroz a pH 6,0 y 8,0. La obtención de las proteínas del salvado de arroz se realizó en un medio alcalino, partiendo de salvado de arroz desengrasado. El proceso de desestabilización de las emulsiones se analizó a partir de los datos obtenidos por el método de retrodispersión de luz mediante un equipo Turbiscan 2000; en el caso del cremado los datos fueron ajustados a una cinética bifásica con una componente de segundo orden (hiperbólica) y otra con un comportamiento sigmoidal. Las emulsiones preparadas a pH 8 presentaron una mayor estabilidad frente al cremado, mientras que los procesos de floculación y coalescencia no fueron influenciados por los distintos valores de pH.

Palabras clave: Cinética, desestabilización, cremado, floculación, coalescencia.

## Abstract

While animal protein in many instances may have better functional characteristics than vegetable proteins, their increasing cost may favour the expansive use of plant proteins as a replacement. One of the sources of plant protein is rice bran, which is obtained as a byproduct in the polishing process of integral rice (*Oryza sativa* L) to produce white rice. The processes of creaming, flocculation and coalescence of emulsions prepared with rice bran protein at pH 6,0 and 8,0, were studied. The obtaining of proteins from defatted rice bran was carried out in an alkaline environment. The process of destabilization of the emulsions was analyzed from data obtained by the method of backscattering of light by a Turbiscan 2000 equipment, in the case of creaming process the data fitted to a biphasic kinetics with a second order component (hyperbolic) and the other component with a sigmoidal behaviour. Emulsions prepared at pH 8 showed a higher stability against creaming while flocculation and coalescence processes were not influenced by different pH values.

Keywords: Kinetics, Destabilization, Creaming, Size particle, Flocculation, Coalescence.

## Introducción

La demanda de fuentes proteicas relativamente baratas que se puedan incorporar a los productos alimenticios incrementando así su valor agregado va mundialmente en aumento. Mucha de la reciente investigación en el tema ha estado dirigida al estudio de diferentes fuentes de fitoproteínas que puedan contribuir al aumento del valor nutricional de los productos alimenticios a un bajo costo (Gorinstein et al., 2002; Rangel et al., 2003; Sogi et al., 2002; Tomotake et al., 2002).

El salvado de arroz es una muy buena fuente alimentaria con un 13 % de proteína de buena calidad biológica, un alto contenido de fibras (20 %) y 12-15 % de lípidos, un perfil de ácidos grasos balanceado y un importante aporte de antioxidantes (Carroll, 1990). Uno de los principales aprovechamientos del salvado de arroz es la obtención de aceite. Este proceso es denominado desengrasado, por el cual se le extraen sus componentes lipídicos mediante extracción con solvente y posterior refinado. Debido a la presencia de enzimas como la lipasa y la lipooxigenasa es necesario, previo a la extracción de aceite, la inactivación de ellas por medio de un tratamiento térmico (Tang et al., 2002). La harina residual de la extracción del aceite del salvado así tratado constituye también un producto de gran valor nutritivo. El salvado de arroz contiene 12-20 % de proteína, de buen valor biológico y propiedades nutracéuticas (Saunders, 1990). La proteína del salvado de arroz es de alta calidad (Juliano, 1985), el perfil de aminoácidos de la proteína del arroz es mejor que el de la caseína y el aislado proteico de

soja, considerando los requerimientos de aminoácidos de niños de 2-5 años (Wang et al., 1999). Por otra parte, presenta baja alergenicidad, por lo que podría ser muy útil en formulaciones infantiles (Burks y Helm, 1994; Helm, 1996). Asimismo, la proteína del salvado de arroz ha trascendido por tener actividad anticancerígena (Kawamura y Muramoto, 1993).

La tendencia al consumo de productos naturales ha alcanzado ingredientes menores como los emulsificantes usados en la elaboración de emulsiones alimentarias. Desafortunadamente, y a excepción de la lecitina vegetal y animal, la mayoría de los emulsificantes usados en la industria alimentaria son sintéticos, por ejemplo, Tweens, Spans, monoglicéridos, etcétera, a pesar de los esfuerzos realizados para encontrar alternativas a éstos (Yun et al., 2007).

El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia del pH en las propiedades emulsificantes de las proteínas del salvado de arroz.

## Materiales y Métodos

### Obtención del concentrado proteico de salvado de arroz

Se partió de salvado de arroz (SA) desengrasado. Se determinó el contenido de proteínas en el SA por método de Kjeldahl. El concentrado proteico de salvado de arroz se obtuvo por solubilización

de las proteínas en medio alcalino, pH 12,0, el pH se ajustó con NaOH 2N, la relación salvado:solvente fue 1:10, el tiempo de extracción 7 horas, luego se centrifugó a 10.000 rpm, 20 °C, 30 min. Sobre el sobrenadante se realizó precipitación isoelectrica, llevando a pH 4,5 con HCl 6N, dejándolo a 4 °C durante la noche. Se separó el precipitado por centrifugación a 10.000 rpm, 4 °C, 30 min. Se resuspendió el precipitado en el mínimo volumen de agua destilada y se ajustó el pH a 12 con NaOH 2N. Se liofilizó 24 hs, según método de Chandi y Sogi (2007) modificado. Se determinó el contenido de proteína del concentrado obtenido por método de Lowry (1951).

## Solubilidad

Se determinó la solubilidad del concentrado obtenido dispersándolo en solución de fosfato de sodio 10 mM a pH 6,0 y 8,0 al 0,1 % p/v durante 1 hora a temperatura ambiente y velocidad constante. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El contenido de proteína en el sobrenadante se determinó utilizando el método de Lowry (1951).

## Preparación de las emulsiones en estudio

Se prepararon emulsiones aceite en agua,  $\Phi=0,25$  (v/v), con una concentración de proteína de 1,0 mg/ml en disolución de buffer fosfato 0,01 M, a pH 6,0 y 8,0, manteniendo constante la fuerza iónica en 0,03 M con NaCl. Las emulsiones fueron preparadas a temperatura ambiente con un homogenizador de alta velocidad Ultra-turrax T25 (IKA-Labortechnik, GmbH & Co., Staufen, Alemania), utilizando el rotor S25 N-10 G a una velocidad de 20.000 rpm durante un minuto a temperatura ambiente.

## Determinación de tamaño de partícula

El análisis de tamaño de gota se realizó en emulsiones preparadas a pH 6,0 y 8,0, con y sin tratamiento con solución Tris/HCl 0,05 M, pH 8,0 SDS 1 % en proporción 1:1, utilizando el analizador de tamaño de partículas Beckman Coulter LS 230. Beckman Coulter, Inc. Se determinó el diámetro promedio de gota  $D_{4,3}$ . La diferencia de valores de diámetro promedio obtenidos en ausencia y presencia de la solución que contiene SDS se tomó como una medida de formación de floculos o agregados en la emulsión (Anton et al., 2002). El grado de floculación se determinó según la ec. 1.

$$GF(\%) = \frac{(D_{4,3} - D_{4,3-SDS})}{D_{4,3-SDS}} \times 100 \quad (\text{ec. 1})$$

Donde:  $D_{4,3}$ : diámetro medio de Sauter para las emulsiones formadas;  $D_{4,3-SDS}$ :  $D_{4,3}$  en presencia de SDS; GF: grado de floculación.

## Análisis de estabilidad de emulsiones aceite-agua

La estabilidad global de las emulsiones se analizó con un analizador óptico vertical (Turbiscan Classic MA2000, Formulation, Toulouse, France). Se registró la retrodispersión (RD %) en función de la altura en la celda cada un minuto durante un período de 60 minutos y una única medida a las 24 horas. Los datos se tomaron a una altura de tubo de 10 mm desde la base. La cinética de desestabilización por cremado se estudió mediante los parámetros  $k$  y RD que surgen de la aplicación del modelo cinético propuesto por Panizzolo (2005), ec. 2.

$$RD(t) = \left( \frac{RD_h}{RD_h K_h t + 1} \right) + \left( \frac{2^2 \cdot RD_s}{2^2 + (k_s \cdot RD_s)^2 \cdot t^2} \right) \quad (\text{ec. 2})$$

Donde: RD (t): valor de RD a tiempo  $t$  a una altura de 10 mm desde la base del tubo;  $k_h$  y  $k_s$ : constantes de velocidad de variación de RD en función del tiempo para una cinética hiperbólica y sigmoidea, correspondientemente;  $RD_h$  y  $RD_s$ : parámetros de amplitud correspondientes a cinéticas hiperbólica y sigmoidea, respectivamente, tal que  $RD_h + RD_s = RD_i$ ;  $RD_i$  es el valor de RD a  $t=0$ . Los valores de  $k_h$ ,  $k_s$ ,  $RD_h$  y  $RD_s$  fueron estimados mediante regresión por mínimos cuadrados.

La desestabilización global de las emulsiones por floculación y coalescencia en la fase crema se estudió en un periodo de almacenamiento de 24 hs mediante el cambio de los valores promedio de retrodispersión en el intervalo de altura de celda 54-56 mm ( $RD_{p54-56}$ ) en función del tiempo. Se calculó el grado de desestabilización global según la ec. 3 (Palazolo et al., 2005).

$$D(\%) = \frac{(RD_{pmax} - RD_{p24})}{RD_{pmax}} \times 100 \quad (\text{ec. 3})$$

Donde D(%): grado de desestabilización global;  $RD_{pmax}$ : promedio del máximo valor de retrodispersión en el tiempo en el intervalo 54-56 mm, y  $RD_{p24}$ : promedio del valor de retrodispersión a las 24 horas en el intervalo 54-56 mm.

## Isoelectroenfoco

Se realizó la determinación del pI de las proteínas del concentrado proteico por el método de Isoelectroenfoco. El concentrado de SA se dispersó en agua destilada, 1mg/ml. Se dializó la dispersión durante la noche y se procedió a la determinación usando un equipo PhastSystem (Pharmacia, Uppsala, Suecia). El pI de las muestras se determinó usando un kit de calibración en el rango de pH 3-9 (PhastGel IEF 3-9). El patrón fue reconstituido en 35  $\mu$ L de agua destilada. Se realizó tinción del gel con plata de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

## Capacidad emulsionante

Se evaluó la capacidad emulsionante (CE), cantidad de aceite que puede emulsionar una solución de proteína a una concentración dada, al momento en que se produce la inversión de la emulsión (Wagner, 2000) por método conductimétrico. Se agregó aceite a una solución de proteína de 1,0 mg/ml en disolución de fosfato de sodio 0,01 M, a pH 6,0 y 8,0, fuerza iónica 0,03. Se agitó luego de cada agregado con un homogenizador Ultra-turrax T25 (IKA-Labortechnik, GmbH & Co., Staufen, Alemania), utilizando el rotor S25 N-10G a una velocidad de 20.000 rpm durante un minuto, y se registró la conductividad (conductímetro Oakton). La inversión se determinó como el volumen de aceite agregado al cual la conductividad disminuye a valores cercanos a cero. Se calculó  $CE(\%) = (\text{Volumen aceite} / \text{Volumen total}) * 100$ .

## Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de datos se realizó en todos los casos mediante análisis de varianza (ANOVA) con  $\alpha = 0,05$  y la comparación de medias por la prueba de mínimas diferencias significativas (LSD) con  $\alpha = 0,05$ .

## Resultados y Discusión

El contenido de proteínas del SA desgrasado por método de Kjeldahl fue de 40,2 %. El mayor rendimiento de extracción se obtuvo a pH 12,0 en una relación salvado:solvente de 1:10 durante un tiempo de extracción de 7 horas, posterior precipitación isoelectrica a pH 4,5.

El contenido proteico del concentrado fue  $66,9 \pm 2,9$  %, por lo que el rendimiento de extracción resultó en  $10,14 \pm 0,59$  %, lo cual

es bajo comparado con el informado por otros autores (Connor et al., 1976), quienes obtuvieron concentrados de hasta el 82 %. El rendimiento de extracción pudo verse afectado por el tratamiento térmico recibido por el SA. Cabe destacar que un mayor contenido proteico en el concentrado obtenido respecto al salvado de arroz se debe a la forma de extracción de las proteínas. Luego de colocar el SA en un medio alcalino en el cual se solubilizan las proteínas, se liofilizó el extracto acuoso y se obtuvo un polvo amarillento, con un contenido de proteínas del 66.9 %, siendo ésta una forma de concentración de las mismas.

La solubilidad del concentrado fue  $19,8 \pm 0,2$  % y  $60 \pm 1$  % a pH 6,0 y 8,0, respectivamente. El resultado es significativamente mayor a pH 8,0.

En la Figura 1 se muestran las curvas de distribución de tamaño de partícula a pH 6,0 y 8,0. Tanto a pH 6,0 como 8,0 se observó una distribución bimodal, correspondiente a dos poblaciones de partículas claramente definidas. Los valores obtenidos de  $D_{4,3}$  para pH 6,0 y 8,0 fueron  $62,7 \pm 0,6$   $\mu\text{m}$  y  $36,9 \pm 1,9$   $\mu\text{m}$ , respectivamente, lo cual fue significativamente menor a pH 8,0.

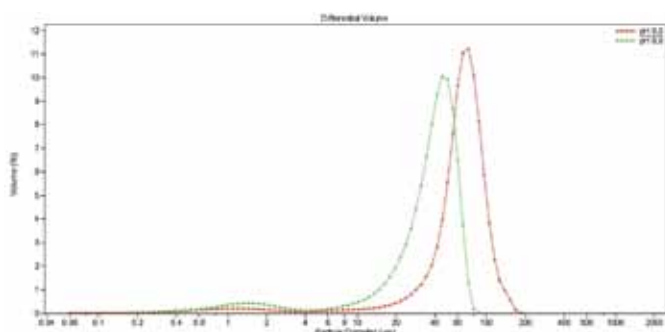


Figura 1. Distribución de tamaño de partícula para emulsiones formadas a pH 6,0 y 8,0 (Volumen vs Diámetro de partícula).

El análisis de diámetro de partícula con SDS reveló que la desestabilización inicial por floculación y coalescencia no fue apreciable.

En la Figura 2 se muestran los perfiles de RD en función de la altura del tubo, que surgen del estudio de estabilidad de las emulsiones formadas. En la zona inferior del tubo de muestra, zona I (altura 10 mm), se observó una disminución de los valores de RD con el transcurso de tiempo, lo que evidencia el desarrollo de un proceso de cremado, mientras que en la zona II RD aumentó, producto de la acumulación gotas de aceite en la parte superior del tubo (fase crema).

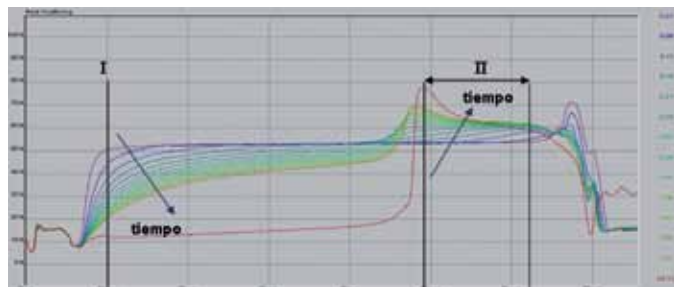


Figura 2. Perfil de retrodispersión (RD%) en función de la altura de la celda (mm) para una emulsión formada a pH 8,0. Las flechas indican el sentido de aumento del tiempo. I: zona inferior del tubo (altura 10 mm), II: zona superior del tubo en la que se observa la fase crema

Las curvas de variación de los valores promedio de RD (RD<sub>p</sub>) a una altura de 10mm, para emulsiones formadas a pH 6,0 y 8,0 se muestran en la Figura 3. Es posible constatar que las curvas presentan un perfil sigmoideo.

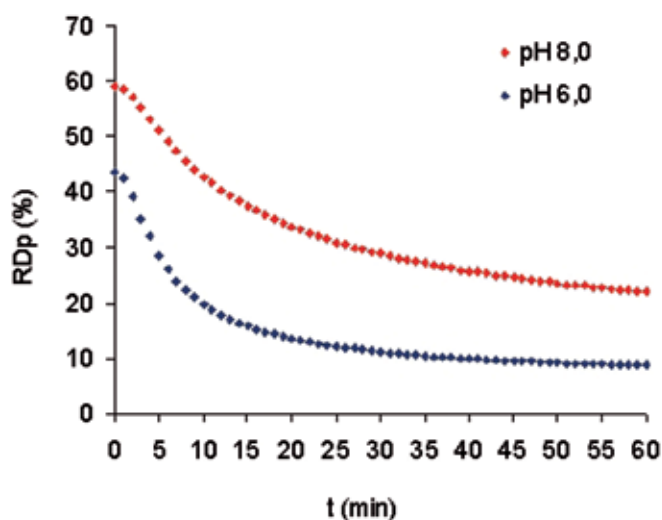


Figura 3. Curvas de RD, versus tiempo para emulsiones formadas con el concentrado proteico de SA a pH 6,0 (♦) y 8,0 (◆). El análisis de datos se realizó a 10 mm desde la base del tubo.

Según Panizzolo (2005), las emulsiones que presentan un perfil de RD<sub>p</sub> de forma sigmoidea, se describen adecuadamente mediante la ec. 2. El modelo cinético describe la desestabilización por cremado e implica la existencia de dos poblaciones de partículas. El término sigmoideo se vincula a las partículas de mayor tamaño, mientras que el hiperbólico se asocia a las partículas más pequeñas. En la Figura 4 se muestra la contribución de cada término de la ec. 2 a la cinética de desestabilización. Allí se evidencia que esta es la suma de una cinética hiperbólica y otra sigmoidea. El término sigmoideo contribuye sólo al principio, mientras que a tiempos mayores a 20 min es el término hiperbólico el que más contribuye a la cinética de desestabilización.

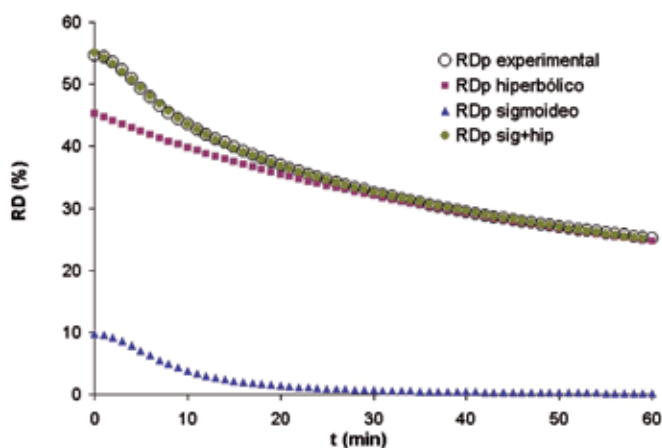


Figura 4. (o) Valores de RDp experimentales en función del tiempo para una emulsión formada a pH 8,0. (■) Variación de RDp ajustando los datos a una cinética hiperbólica. (▲) Variación de RDp ajustando los datos a una cinética sigmoidea. (●) Valores de RDp para la suma de las cinéticas hiperbólica y sigmoidea (sig+hip), ec. 2.

En la Tabla 1 se muestran los valores obtenidos para los parámetros  $k_s$  y  $k_h$  de la ec. 2 y los valores de RD<sub>i</sub>. Se puede observar que RD<sub>i</sub> a pH 8 es considerablemente mayor; los valores de RD<sub>i</sub> están vinculados con  $\phi$  y el tamaño medio de las gotas de la emulsión en función de la altura del dispositivo de medida (Abismail et al., 2000), por tanto implica que a pH 8 el tamaño de gota sería mucho menor. Este resultado se correlaciona muy bien con el obtenido en las curvas de distribución de tamaño de partícula. A pH 6,0 los valores de  $k_h$  fueron mayores, mientras que no existieron diferencias significativas en los valores de  $k_s$ , lo que implica una desestabilización más rápida a este pH.

PROMEDIOS	pH 8,00	pH 6,00
$k_h \times 10^4 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$5 \pm 1^a$	$9 \pm 1^b$
$k_s \times 10^2 \text{ (min}^{-2}\text{)}$	$1,6 \pm 0,3^a$	$1,3 \pm 0,4^a$
$RD_i(\%)$	$55 \pm 3^a$	$46 \pm 2^b$

Tabla 1. Parámetros cinéticos de desestabilización de emulsiones formadas con proteínas de SA a pH 6,0 y 8,0.  $RD = RD_s + RD_h$  a tiempo 0. Letras diferentes en la misma fila significa que existen diferencias significativas entre las muestras con un  $\alpha \leq 0,5$ .

La desestabilización por floculación o coalescencia en la fase crema fue despreciable durante las 24 hs de almacenamiento de las emulsiones. Los valores de D (%) fueron  $0,7 \pm 1,3$  % y  $1,0 \pm 1,5$  % a pH 6,0 y 8,0, respectivamente.

Por método de isoelectroenfoco se observaron bandas a pH 6,4 (imagen no mostrada) correspondientes al punto isoeléctrico de una o más proteínas del concentrado, indicando un mayor grado de agregación a este pH.

La capacidad emulsionante del concentrado fue de  $66 \pm 1$  % y  $64 \pm 2$  % para pH 8,0 y 6,0, respectivamente, sin que existan diferencias significativas entre ambos pH.

Con el fin de proveer buenas propiedades emulsificantes, las proteínas usadas como ingredientes en alimentos deben poseer una alta solubilidad. La solubilidad obtenida a pH 8,0 explica la mayor estabilidad de las emulsiones a este pH, ya que la proteína debe estar soluble para migrar a la interfase y ubicarse en ella. La solubilidad se ve modificada por varios factores como el pH, la fuerza iónica, temperatura, etcétera. La variación de alguna de estas condiciones promueve cambios en las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas en la estructura de las proteínas, llevando a diferentes conformaciones, lo cual afecta las propiedades funcionales. Un aumento en las interacciones hidrofóbicas resulta en una tendencia de las proteínas a formar agregados insolubles, disminuyendo por tanto la solubilidad, lo que sucede en rangos de pH cercanos al pI.

## Conclusiones

El análisis de los resultados obtenidos permite concluir que el concentrado de salvado de arroz es un mejor agente emulsificante a pH 8,0. Las emulsiones presentan menor tamaño de partícula y por tanto mayor estabilidad, ligado a una mayor solubilidad del concentrado a este pH. El mecanismo de desestabilización que primó fue el cremado. No existieron diferencias significativas entre pH 6,0 y 8,0 en cuanto a la capacidad emulsionante.

## Referencias

- ABISMAÏL, B.; CANSELIER, J. P.; WILHELM, A. M.; DELMAS, H. Y GOURDON C. Emulsification processes: on-line study by multiple light scattering measurements. En: *Ultrasonics Sonochemistry*. 2000, (7):187-192.
- ANTON, M.; BEAUMAL, V.; BROSSARD, C.; LLAMAS, G.; LE DENMAT, M. Droplet flocculation and physical stability of oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk. En: ANTON, M. *Food emulsions and dispersions*. Kerala: Research Signpost, 2002. pp.15-28.
- BURKS, A. W.; HELM, R. M. Hypoallergenicity of rice protein. En: AACC. *The annual meeting of the American Association of Cereal Chemists*, (Nashville 23-27 de octubre de 1994). Nashville: AACC, 1994.
- CARROLL, L. Functional properties and applications of stabilized rice bran in bakery products. En: *Food Technology*. 1990, 44 (4):74-76.
- CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Functional properties of rice bran protein concentrates. En: *Journal of Food Engineering*. 2007, 79:592-597

- CONNOR, M.A.; SAUNDERS, R.M.; KOHLER, G.O. Rice bran protein concentrates obtained by wet alkaline extraction. En: *Cereal Chemistry*. 1976, 53(4):488.
- GORINSTEIN, S.; PAWELZLK, E.; LICON, E. D.; HARUENKIT, R.; WEISZ, M.; TRAKHTENBERG, S. Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. En: *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2002, 82:886-891.
- HELM, R. M.; BURKS, A. W. Hypoallergenicity of rice bran protein. En: *Cereal Foods World*. 1996, 41 (11):839-843.
- JULIANO, B. O. Production and utilization of rice. En: JULIANO, B. O. *Rice: Chemistry and Technology*. 2a ed. Saint Paul: Amer Assn of Cereal Chemists, 1985. pp. 1-16
- KAWAMURA, Y.; MURAMOTO, M. Antitumorogenic and immunoactive protein and peptide factors in foodstuff. 2. Antitumorogenic factors in rice bran. En: WALDRON, K. W.; JOHNSON, I. T. FENWICK, G.R. *Food and cancer prevention. Chemical and biological Aspects*. Philadelphia: Woodhead, 1993. pp. 331-401
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. En: *Journal of Biological Chemistry*. 1951, 193:265-275.
- PALAZOLO, G.; SORGENTINI, D.; WAGNER, J. R. Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates. En: *Food Hydrocolloids*. 2005, 19:595-604.
- PANIZZOLO, L. A. *Modificación de proteínas por vía enzimática. Análisis de la relación estructura-funcionalidad de los productos de hidrólisis*. Montevideo: Facultad de Química de la Universidad de la República, 2005. (Tesis Doctoral).
- RANGEL, A.; DOMONT, G. B.; PEDROSA, C. Y FERRIERA, S. T. Functional properties of purified vicilins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and Pea (*Pisum sativum*) and cowpea protein isolate. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, 51:5792-5797.
- SAUNDERS, R. M. The properties of rice bran as a food stuff. En: *Cereal Foods World*. 1990, 35:632-662.
- SOGI, D. S.; GARG, S. K.; BAWA, A. S. Functional properties of seed meals and protein concentrates from tomato processing waste. En: *Journal of Food Science*. 2002, 67:2997-3001.
- TANG, S.; HETTIARACHCHY, N. S.; Y SHELLHAMMER, T. H. Protein Extraction from Heat-Stabilized Defatted Rice Bran. 1. Physical Processing and Enzyme Treatments. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50:7444-7448.
- TOMOTAKE, H.; SHIMAOKA, I.; KAYASHITA, J.; NAKAJOH, M. Y KATO, N. Physicochemical and functional properties of buckwheat protein product. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50:2125-2129.
- WAGNER, J. R. Propiedades superficiales. En: PILOSOFF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Buenos Aires: Eudeba, 2000. pp. 41-70.
- WANG, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, 47: 411-416.
- YUN, S. E.; TONG, S.T. Isolation and investigation of emulsifying properties of surface-active substances from rice bran. En: *Food Hydrocolloids*. 2007, 21(2):838-843



# Obtención de péptidos antioxidantes de glicinina de soja

Medrano, A. <sup>(1)\*</sup>, del Castillo, M. D. <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

<sup>(2)</sup> Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación. CSIC, España.

Contacto: medranoalejandra@gmail.com

Recibido: 30/06/2011 - Aprobado: 7/11/2011

## Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar la potencialidad de dos preparados enzimáticos, proteasas de *Streptomyces griseus* (PSG) y de *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme), en la obtención de péptidos antioxidantes de glicinina de soja. La reacción de hidrólisis se realizó bajo condiciones controladas de pH, temperatura y tiempo. El grado de hidrólisis (GH%) se estimó mediante determinación de grupos amino libres. Los hidrolizados obtenidos se caracterizaron por SDS-PAGE y análisis de sus propiedades antioxidantes por ABTS, ORAC y oxidación de desoxirribosa. Los compuestos fenólicos se determinaron por reacción con Folin-Ciocalteu. El GH% dependió del tiempo de reacción y de la naturaleza del preparado enzimático, con Flavourzyme más activa que PSG ( $p \leq 0.05$ ). Se observó una correlación directa entre GH% de Flavourzyme y la acción frente a radicales ABTS e hidroxilos ( $p \leq 0.05$ ) de sus hidrolizados. Los hidrolizados de PSG resultaron significativamente más efectivos ( $p \leq 0.05$ ) frente a radicales alquilperoxílicos que los de Flavourzyme. No se detectaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en las concentraciones de compuestos fenólicos de las muestras, por lo que las diferencias en capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos se pueden asociar a su composición peptídica. Las investigaciones de este equipo remarcan el interés del análisis de fenoles en hidrolizados proteicos con propiedades antioxidantes.

Palabras clave: glicinina de soja, péptidos antioxidantes, hidrólisis enzimática, proteasas de *Streptomyces griseus* (PSG), proteasas de *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme).

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the potential of two enzymatic preparations, proteases from either *Streptomyces-griseus* (PSG) or *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme), for the obtaining of antioxidant peptides from soybean glycinin. The hydrolysis was performed under controlled conditions of pH, temperature and time. The degree of hydrolysis (GH%) was estimated by analysis of free amino groups. Hydrolysates were characterized by SDS-PAGE and analysis of their antioxidant properties by ABTS, ORAC and oxidation of deoxyribose assays. Phenols were determined by Folin-Ciocalteu method. DH% depended on the hydrolysis time and the nature of the enzymes being Flavourzyme more effective than PSG ( $p \leq 0.05$ ). A direct correlation between the DH% of Flavourzyme and the activity of its hydrolysates against ABTS and hydroxyl radicals ( $p \leq 0.05$ ) was found. PSG's hydrolysates resulted significantly ( $p \leq 0.05$ ) more active against alkyl peroxy radicals than those of Flavourzyme. The concentration of phenols was not significantly different ( $p > 0.05$ ) among the samples. Differences in antioxidant capacity among the samples may be associated to their peptides. Our research underlines the interest for the analysis of phenol in protein hydrolysates with antioxidant properties.

Keywords: soybean glycinin, antioxidant peptides, enzymatic hydrolysis, proteases from *Streptomyces griseus* (PSG), proteases from *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme).

## Introducción

Soja (*Glycine max*) es un cultivo oriundo de Asia oriental. La proteína de soja puede ser fraccionada en cuatro grupos principales sobre la base de la velocidad de sedimentación (2S, 7S, 11S y 15S). Las proteínas de soja más abundantes (70 %) son las globulinas, glicinina (11S) y conglucina (7S). La glicinina es una proteína hexamérica con un peso molecular (PM) de alrededor de 350 kDa, que consta de cinco subunidades (A1aB2, A1bB1b, A2B1a, A3B4 y A5A4B3), cada sub-unidad compuesta de un polipéptido ácido de 37 a 42 kDa y uno básico de 20 kDa unidos por un puente disulfuro (Staswick et al., 1984; Nielsen, 1985).

El uso de proteína de soja como ingrediente funcional en los alimentos continúa generando aceptación debido a los beneficios para la salud y a su bajo costo, al ser un subproducto de la industria del aceite y el biodiesel. Estudios sugieren que las proteínas de los alimentos, como proteínas de la leche (Hogan et al., 2009; Liu et

al., 2007; Gómez et al., 2008), proteína de soja (Moure et al., 2006; Chen et al., 1995) y proteínas de huevo (Sakanaka, 2004, 2006) han presentado propiedades antioxidantes, atribuidas a ciertas secuencias específicas (péptidos) de las proteínas. Un antioxidante se define como "cualquier sustancia que, estando presente en baja concentración en comparación con las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de ese sustrato". La actividad antioxidante es especialmente importante, ya que la oxidación es una reacción inevitable en todos los organismos vivos (Halliwell, 1996a, 1996b). Los radicales libres y especies reactivas del oxígeno (ROS), nitrógeno y las especies de cloro contribuyen al desarrollo de varias enfermedades relacionadas con la edad, mediante la inducción de estrés oxidativo y el daño oxidativo. Debido a las consecuencias negativas de los procesos oxidativos, su inhibición es importante, por lo que la búsqueda de compuestos con actividad antioxidante es un área de intensa investigación.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la potencialidad de los

preparados enzimáticos PSG y Flavourzyme en la obtención de péptidos con propiedades antioxidantes a partir de un aislado de glicinina de soja.

## Materiales y Métodos

La obtención del aislado de glicinina se realizó a partir de porotos de soja desgrasados con hexano durante 6 horas, según el procedimiento estándar AOAC 920.85 (AOAC, 1990) y de acuerdo al procedimiento propuesto por Nagano et al. (1992), seguido por la dispersión del precipitado en medio alcalino (pH 8,0) y posterior liofilización. El contenido de proteína se determinó por el método de Lowry et al. (1951) y Kjeldahl (AOAC, 1975). El estudio térmico de la proteína se realizó con calorímetro diferencial de barrido Shimadzu DSC 50. El software utilizado fue el thermal analysis system TA-50 WSI. Todas las sustancias químicas utilizadas fueron de grado analítico.

### Preparación de hidrolizados de glicinina

La glicinina se hidrolizó con PSG y Flavourzyme, ambas Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). En primer lugar, la glicinina se disolvió en agua destilada 5 % (w/v), la suspensión se ajustó a 50°C y pH 8.0. La reacción se inició mediante la adición de las enzimas con una relación molar enzima:sustrato 1:50 y continuó durante 4 horas manteniendo el pH constante con la adición de NaOH.0,1 M. Después de la reacción, la mezcla se calienta a 85 °C durante 10 min para inactivar la enzima y se centrifuga a 3500g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue liofilizado y almacenado a -20 °C.

### Caracterización de los hidrolizados

El grado de hidrólisis (GH%) se estableció mediante la determinación de los grupos amino libre por el método del oftaldehído (OPA), de acuerdo a lo descrito por Goodno (1981). Las determinaciones fueron realizadas por triplicado utilizando una curva patrón de N- $\alpha$ -Acetil-L-Lisina L-leucina y medida de absorbancia a 420 nm.

$$GH = \frac{\text{Número de enlaces peptídicos hidrolizados}}{\text{Número total de enlaces peptídicos}} \times 100$$

La determinación de fenoles totales se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como patrón (Kosar et al., 2005).

El grado de pureza de la glicinina y la reacción de hidrólisis se siguió utilizando geles comerciales de Bis-Tris NuPAGE 12% (Invitrogen, Carlsbad, CA), empleando tampón de separación NuPAGE® MES-SDS (NP0002). La corrida se realizó durante 50 minutos con una corriente inicial de 120 mA / gel y una tensión constante de 200 V. Las bandas correspondientes a las subunidades individuales que conforman la estructura de la glicinina de soja y los hidrolizados se detectaron por tinción con plata (Blum et al., 1987) y para determinar el peso molecular se utilizó como marcador de peso molecular (Mark 12 Unstained standard).

### Actividad antioxidante

La Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORACFL) se llevó a cabo de acuerdo con el método propuesto por Del Castillo et al. (2005), utilizando como antioxidante de referencia trolox.

La capacidad de atrapamiento de los radicales catiónicos se determinó usando el método de decoloración del radical ABTS descrito por Re et al. (1999), modificado por Plaza et al. (2010), en el

que se utiliza como antioxidante de referencia trolox.

El Análisis de las Propiedades Antioxidantes de los hidrolizados Frente a Radicales hidroxilos se realizó siguiendo la técnica de degradación de la desoxirribosa, según el método propuesto por Halliwell et al. (1987), utilizando manitol como referencia.

Todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) y test de mínima diferencia significativa (LSD) con un ( $p \leq 0.05$ ) para comparación de las medias mediante el programa estadístico Statgraphics Plus 7.0.

## Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos por análisis de proteínas totales mediante el método de Kjeldhal indican un (40.1  $\pm$  0.4)% de proteína en los porotos de soja iniciales. Siguiendo el proceso de extracción se obtuvo a partir de éstos la fracción glicinina con (95  $\pm$  1) % de proteína total.

En la Figura 1 (electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras y desnaturalizantes) se observa las bandas correspondientes a las distintas subunidades de las proteínas de soja. En la glicinina los enlaces que estabilizan la estructura de la proteína se rompen por las condiciones del ensayo y permiten separar las subunidades ácidas con una masa molecular media de 36 kDa y las subunidades básicas con una masa molecular media de 22 kDa (calle 3). En la calle 2, correspondiente a la harina desgrasada obtenida a partir de los porotos de soja, se constata además de las 2 bandas correspondientes a la glicinina las bandas correspondientes a fracciones mayoritarias de la soja, como las subunidades  $\alpha$  (63 kDa),  $\alpha'$  (58 kDa) y  $\beta$  (42 kDa) de la  $\beta$ -conglucina (Bittencourt et al., 2005, 2007), proteína P34 (30 kDa) (Ogawa et al., 1991) y los inhibidores de proteasas de Kunitz (21 kDa) y de Bowman Birk (8 kDa) (Kato y Matsuda, 1997).

El termograma de glicinina obtenido por calorimetría diferencial de barrido presenta una endoterma alrededor de 92 °C (Figura 2). Este resultado concuerda con Hermansson (1978, 1986) y Wagner y Añón (1990), quienes informan que en la proteína de soja se observan dos endotermas, una a temperatura de 95 °C correspondiente a la glicinina y otra a temperaturas de 80 °C, perteneciente a la  $\beta$ -conglucina. Ambos resultados, la electroforesis y el DSC, reflejaron el alto grado de pureza presentado por el aislado de glicinina.

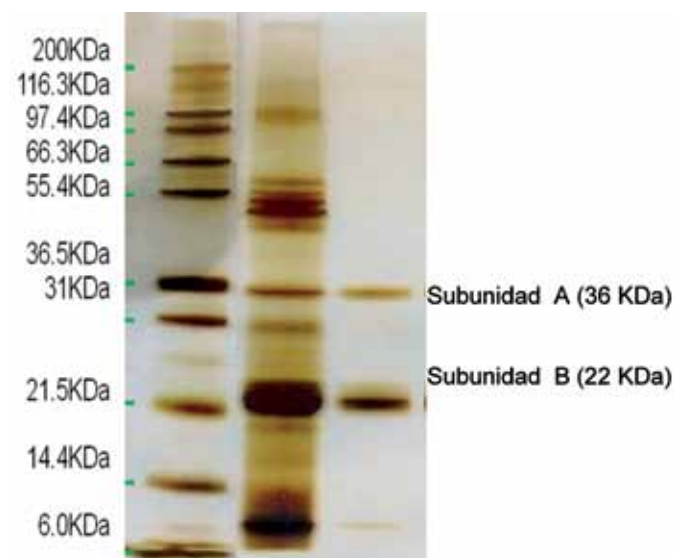


Figura 1. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (12 %) en condiciones reductoras y tinción de plata. Muestras: Marcador de peso molecular (calle 1), harina de soja desgrasada (calle 2), aislado de glicinina de soja (calle 3).

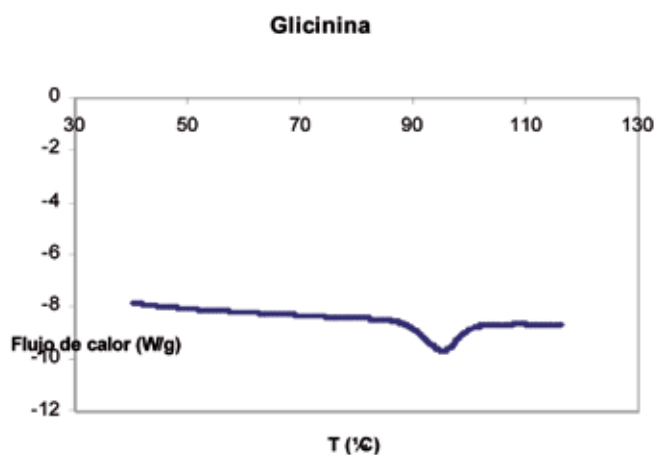


Figura 2. Termograma de Glicinina de soja aislada.

Una vez caracterizado el aislado se realizó la hidrólisis; los resultados indican que el grado de hidrólisis dependió del tiempo de reacción y de la naturaleza del preparado enzimático, con el resultado de que Flavourzyme es más activo que PSG ( $p \leq 0.05$ ) y alcanzó un grado de hidrólisis mayor al 50 % a las 2 horas, mientras que con PSG se superó el 50 % del GH a las 4 horas (Figura 3). Estos resultados correlacionaron con los presentados en la Figura 4 (electroforesis en geles de poliacrilamida), en el caso de la Flavourzyme calles 6 a 8 a las 2 horas de reacción (calle 7) desaparece la banda correspondiente a las subunidades ácida y básica de la glicinina y aparece un gran número de bandas con PM alrededor de 6KDa. Por otro lado, los hidrolizados obtenidos luego de 4 horas de reacción con PSG calle 4 presentaron PM menores a 14 KDa.

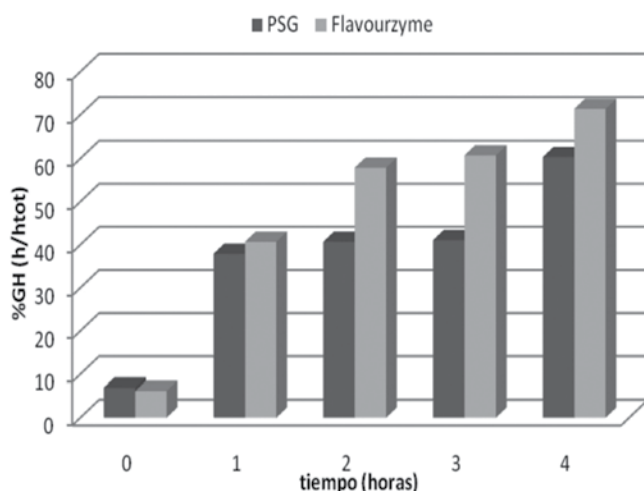


Figura 3. Grado de hidrólisis.

La acción de estas enzimas endo-exo peptidasas en las condiciones utilizadas resultaron ser eficientes para la obtención de péptidos con PM alrededor de 6 KDa. Estos resultados son similares a los descritos por otros autores para estas enzimas, con proteínas alimentarias tales como colágeno (Rosmus et al., 1967) y ovomucina (Hammershøj et al., 2008).

Los hidrolizados obtenidos con ambas enzimas presentaron propiedades antioxidantes frente a ABTS, ORAC y desoxirribosa.

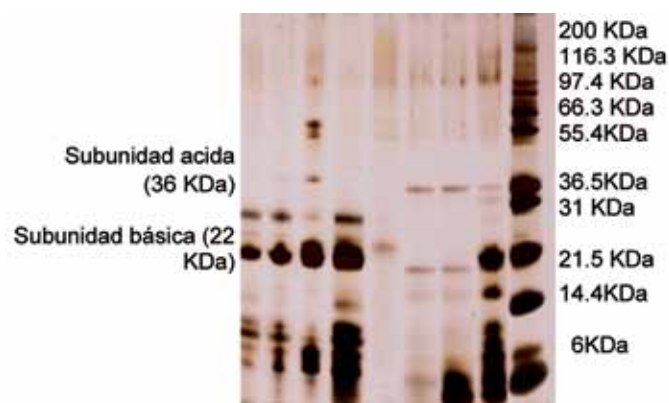


Figura 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (12 %) en condiciones reductoras y tinción de plata. Muestras hidrolizadas con PSG ( calle 1), 1 hora ( calle 2), 2 hora ( calle 3), 3 hora ( calle 4), 4 hora ( calle 5), libre Hidrolizados con flavourzyme ( calle 6), 3 hora ( calle 7), 2 hora ( calle 8), 1 hora patrón de PM ( calle 9)

Los hidrolizados obtenidos a partir de Flavourzyme presentaron mayor capacidad de actuar frente a radicales ABTS e hidroxilos ( $\alpha \leq 0.05$ ) que los hidrolizados con PSG (Figura 5). Estos resultados correlacionan con los descritos previamente por Moure et al. (2006), quienes encontraron valores de entre 820 y 3280  $\mu\text{moles TE/g}$  de proteína para la actividad frente a los radicales ABTS; la fracción mas activa fue la de masa molecular inferior a los 10 kDa.

En cambio, los hidrolizados obtenidos por actividad de PSG presentaron mayor capacidad de actuar frente a radicales alquilperoxílicos ( $p \leq 0.05$ ), como se ve en la Figura 5. El grado de capacidad antioxidante parece estar relacionado con el grado de hidrólisis de las proteínas, a menor PM mayor actividad frente a radicales ABTS e hidroxilos.

Los compuestos fenólicos, como es el caso de isoflavonas (daidzeína y genisteína) presentes en la semilla de soja, son capaces de atrapar radicales libres (Arora et al., 1998; Setchell y Cole, 2003), presentando propiedades antioxidantes. Para confirmar que las propiedades antioxidantes encontradas se deben a los péptidos presentes y no a estos compuestos fenólicos –que podrían quedar durante el proceso de extracción de las proteínas– se realizó su determinación. Los resultados indicaron que no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) para las muestras estudiadas, lo que sugiere que las diferencias en capacidad antioxidante de los hidrolizados pueden asociarse a los péptidos presentes.

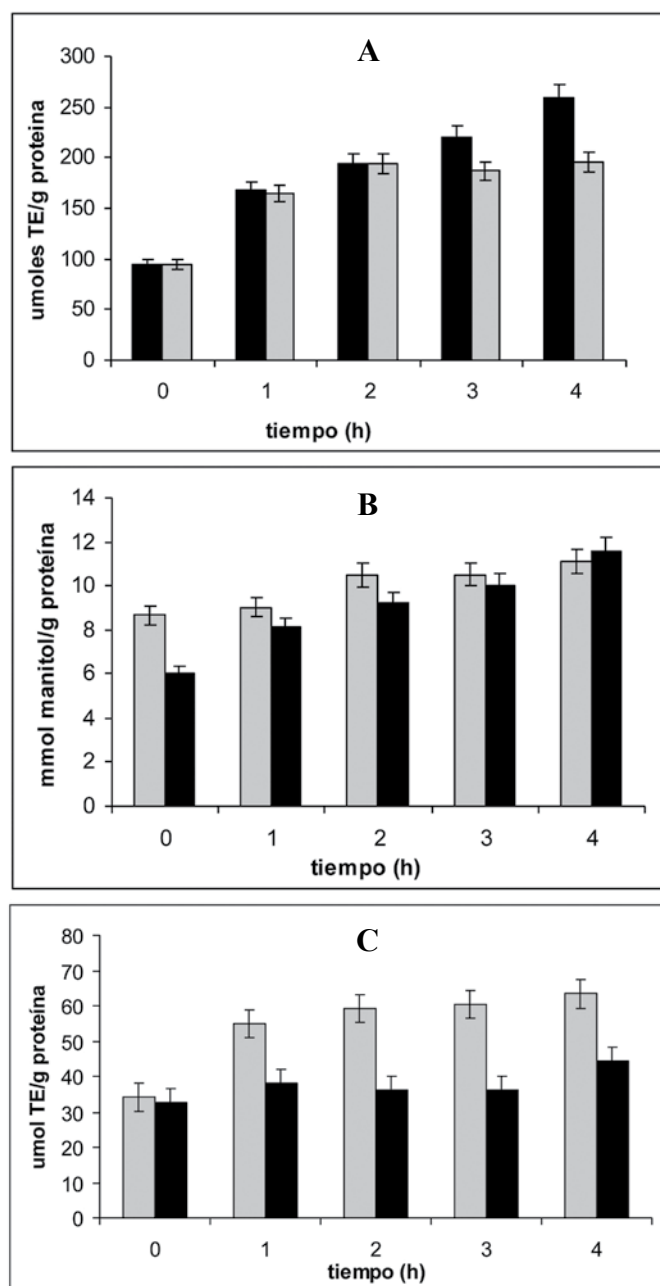


Figura 5. Determinación de la actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos por actividad de flavourzyme ■ y PSG ■ a distintos tiempos de reacción por los métodos (A) ABTS (B) desoxirribosa (C) ORACFL.

## Conclusión

Se concluyó que ambos preparados enzimáticos son efectivos para la obtención de péptidos antioxidantes de glicinina de soja. Resultan más efectivos frente a radicales ABTS e hidróxilos los hidrolizados de mayor %GH obtenidos por acción de flavourzyme.

Dado que no existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en las concentraciones de compuestos fenólicos de las muestras, las diferencias en capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos se puede asociar a su composición peptídica.

## Referencias

- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 12a ed. Gaithersburg: AOAC, 1975. Official Method 14.026.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 15a ed. Gaithersburg: AOAC, 1990. Official Method 920.85.
- ARORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in liposomal system. En: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1998, 356(2):133-141.
- BITTENCOURT, A.L.; FERNANDES, I.; PEREIRA, I.R.O.; HONMOTO, C.S.; TANAKA, M.K.; LIMA, F.S.P.; ABDALLA, D.S.P. Detection of 7S and 11S soy proteins fractions by monoclonal antibody-based immunoassays in food. En: *Food and Agricultural Immunology* 2005. 16(2):91-100.
- BITTENCOURT, A.L.; SOARES, M.F.; PIRES, R.R.; HONMOTO, C.S.; TANAKA, M.K.; JACOB, C.M.; ABDALLA, D.S.P. Immunogenicity and allergenicity of 2S, 7S and 11S soy proteins fractions. En: *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007, 43(4):597-606.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA polyacrylamide gels. En: *Electrophoresis*. 1987, 8(2):93-99.
- CHEN, H.M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglycinin. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1995, 43(3): 574-578.
- DEL CASTILLO, M.D.; GORDON, M.H.; AMES, J.M. Peroxyl radical-scavenging of coffee brews. En: *European Food Research and Technology*. 2005, 221(3-4):471-477.
- GÓMEZ, J.A.; LÓPEZ, I.; PIHLANTO, A.; RAMOS, M.; RECIO, I. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS. En: *European Food Research and Technology*. 2008, 227(4):1061-1067.
- GOODNO, C.C.; SWAISGOOD, H.E.; CATIGNANI, G.L. A fluorimetric assay for available lysine in proteins. En: *Analytical Biochemistry*. 1981, 115(1):203-211.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.; ARUOMA, O. The Deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. En: *Analytical Biochemistry*. 1987, 1652(15):2-19.
- HALLIWELL, B. Commentary oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. En: *Free Radical Research*. 1996a, 25(1):57-74.
- HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. En: *Annual Review of Nutrition*. 1996b, 16:33-50.
- HAMMERSHØJ, M.; NEBEL, C.; CARSTENS, J. H. Enzymatic hydrolysis of ovomucin and effect on foaming properties. En: *Food Research International*. 2008, 41(5):522-531.
- HERMANSSON, A. M. Physico-chemical aspects of soy proteins structure formation. En: *Journal of Texture Studies*. 1978, (9):33-58.
- HERMANSSON, A. M. Soy protein gelation. En: *Journal of the American Oil of Chemists' Society*. 1986, 63:658-666.
- HOGAN, S.; ZHANG, L.; LI, J.; WANG, H.; ZHOU, K. Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. En: *Food Chemistry*. 2009, 117(3):438-443.
- KATO, Y.; MATSUDA, T. Glycation of proteinous inhibitors: loss in trypsin inhibitory activity by blocking of arginine and lysine residues at their reactive sites. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997, 45(10):3826-3831.
- KOSAR, M.; DORMAN, H.J.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. En: *Food Chemistry*. 2005, 91:525-533.
- LIU, H.C.; CHEN, W.L.; MAO, S.J.T. Antioxidant nature of bovine milk  $\beta$ -Lactoglobulin. En: *Journal of Dairy Science*. 2007, 90(2):547-555.
- LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the folin-phenol reagent. En: *Journal of Biological Chemistry*. 1951, 193:265-275.
- MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Antioxidant

- properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. En: *Process Biochemistry*. 2006, 41 (2):447-456.
- NAGANO, T.; HIROTSUKA, M.; HIROYUKI M.; KOHYAMA, K.; Y NISHINARI K. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S Globulin from soybeans. En: *Food Chemistry*. 1992, 40:941-944.
  - NIELSEN, N.C. The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans. En: *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1985, 62(12):1680-1686.
  - OGAWA, T.; BANDON, N.; TSUJI, H.; OKAJIMA, H.; NISHIKAWA, K.; SASAOKA, K. Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with sera of the soybean-sensitive patients with atopic-dermatitis. En: *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 1991, 37(6):555-565.
  - PLAZA, M.; AMIGO M.; DEL CASTILLO, M.D.; IBÁÑEZ, E.; HERRERO, M. Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. En: *Food Research International*. 2010, 43:2341-2348.
  - RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloration assay. En: *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, 26(9-10):1231-1237.
  - ROSMUS, J.; DEYL, Z.; DRAKE, M.P. Studies on the structure of collagen: I. The sequence analysis of peptides released by pronase. En: *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure*. 1967, 140(3):507-514.
  - SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; ISHIHARA, N.; JUNEJA, L.R. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolyzates in linoleic acid oxidation system. En: *Food Chemistry*. 2004, 86(1):99-103.
  - SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y. Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolyzates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. En: *Food Chemistry*. 2006, 95(2): 243-249.
  - SETCHELL, K.D.R.; COLE, S.J. Variations in isoflavone levels in soy foods and soy protein isolates and issues related to isoflavone databases and food labelling. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, 51(14):4146-4155.
  - STASWICK, P.E.; HERMODSON, M.A.; NIELSEN, N.C. Identification of the cystines which link the acidic and basic components of the glycinin subunits. En: *The Journal of Biological Chemistry*. 1984, 259(21):13431-13435.
  - STATPOINT TECHNOLOGIES, INC. Statgraphics Plus [Software]. 7.0. Warrenton: Statpoint Technologies, INC., [s.d.].
  - UCHIDA, K.; KAWAKISHI, S. Sequence-dependent reactivity of histidine-containing peptides with copper(II)/ ascorbate. En: *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 1992, 40:13-16.
  - WAGNER, J. R.; AÑÓN, M. C. Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolate. En: *Journal of Food Science*. 1990, 50:765-770.
-

# Encapsulación de quercetina en nano y micro-emulsiones alimenticias

Xavier, M. P. <sup>(1)\*</sup>, Miraballes, I. <sup>(3)</sup>, Pardo, H. <sup>(3)</sup>, Mombrú, A. <sup>(3)</sup>, López, T. <sup>(1,2)</sup>, Medrano, C. A. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

<sup>(2)</sup> Centre Especial de Recerca, Planta de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona - <sup>(3)</sup> Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República.

Contacto: pazxavier@gmail.com

Recibido: 30/06/2011 - Aprobado: 26/10/2011

## Resumen

El objetivo de este estudio fue desarrollar, caracterizar y comparar nano y microemulsiones estables incorporando quercetina como compuesto bioactivo. Se estudiaron emulsiones aceite:agua con beta-lactoglobulina, utilizando dos procesos de elaboración: homogeneizador de alta velocidad (Ultra-turrax) y homogeneizador de alta presión (HPH, Emulsiflex-C5, 500-1200bar). Se evaluó la variación en la concentración de emulsionante, fracción volumétrica de aceite e incorporación de hidrocoloides. La formación y la estabilidad de las emulsiones se analizaron por su perfil de tamaño de gota (Malvern-Zetasizer Nano ZS) y constantes cinéticas de desestabilización obtenidas a partir del estudio de la retro dispersión de la luz en el tiempo (Turbiscan-Classie). Se determinó que utilizando el Ultra-turrax se logra formar nanoemulsiones con mayor estabilidad a una concentración de 2.2 % (m/v) de proteína y 0.2 % (m/v) de goma guar, mientras que utilizando HPH con una concentración de 1.5 % (m/v) de beta-lactoglobulina y sin necesidad de hidrocoloides se logra una emulsión de adecuado tamaño de gota ( $d < 500\text{nm}$ ) y mayor estabilidad ( $\alpha < 0.05$ ). Las nanoemulsiones elaboradas con HPH presentaron mayor porcentaje de encapsulación de quercetina.

Palabras clave: Antioxidante, beta lactoglobulina, vehículo alimentario.

## Abstract

The objective of this study was to develop, characterize and compare quercetin loaded nano and microemulsions systems. Oil in water emulsions were prepared using a high speed homogenizer (Ultra Turrax) and a high pressure homogenizer (HPH, Emulsiflex-C5, 500-1200bar). Hydrocolloids incorporation, Beta-lactoglobulin concentration and volumetric fraction variation were evaluated. Emulsifying capacity and stability were analyzed by light backscattering (Turbiscan Classic) and droplet profile analysis (Malvern Zetasizer Nano). Using the Ultra Turrax optimum conditions for stability with a suitable particle size ( $d < 500\text{nm}$ ) were achieved with a concentration of 2.2 % (m/v) protein and between 0.1-0.2 % (m/v) of guar gum, while using HPH emulsions showed higher stability ( $\alpha < 0.05$ ) achieved at a concentration of 1.5 % of Beta-lactoglobulin (m/v) and without using hydrocolloids. Emulsions made with high pressure achieved greater percentage of quercetin encapsulation.

Keywords: Antioxidants, Beta-Lactoglobulin, food vehicles.

## Introducción

Existen ciertas características en los alimentos que le confieren valor agregado y que son valoradas positivamente por los consumidores, tales como la escasa manipulación, la ausencia de aditivos o el empleo de aditivos naturales, la conservación de las propiedades nutricionales y de las cualidades beneficiosas para la salud, entre otras. La incorporación de compuestos bioactivos en sistemas alimentarios puede proporcionar un método simple para desarrollar alimentos funcionales innovadores, que pueden aportar beneficios fisiológicos o reducir la disposición a la enfermedad.

La problemática que existe en algunos casos es que los compuestos activos contenidos en los productos no llegan a aportar el debido beneficio al organismo por su degradación durante la elaboración, almacenamiento y/o transporte del producto, o porque el cuerpo humano los destruye antes de que puedan ejercer su efecto. Las nanotecnologías pueden ayudar a mejorar la liberación, absorción y/o protección de estos ingredientes, permitiendo al compuesto realizar su beneficio en el lugar adecuado, aumentando así la calidad nutricional

del alimento sin otorgarle propiedades sensoriales indeseables (Augustin, 2003). Si bien la nanotecnología se encuentra actualmente implantada en la industria farmacéutica y cosmética mundial, su aplicación al dominio alimentario ha sido más lenta, ya que la variedad de compuestos a utilizar se ve reducida y es necesario desarrollar nuevos polímeros y/o ingredientes de calidad alimentaria seguros para su ingesta en la dieta.

Dicha tecnología permite lograr, por ejemplo, nanoemulsiones, emulsiones de tamaño de gota muy pequeño (20-500 nm) (Solans et al., 2003), que pueden ser contenedores y transportadores de moléculas con principios activos (Tadros et al., 2004) y presentan mayor estabilidad que las emulsiones de tamaño de gota mayor (Lizarraga et al., 2008). Para lograr los nanovehículos mencionados se cuenta, entre otros métodos, con la alta presión de homogeneización (HPH), una tecnología basada en los principios de la homogeneización convencional (18-20MPa), pero que permite alcanzar presiones muy superiores de hasta 200-220MPa.

Resulta de suma utilidad incorporar en los alimentos consumidos habitualmente por la población, como es el caso de

los productos lácteos, compuestos bioactivos que no se encuentren o se degraden antes de ejercer su beneficio. La quercetina (Q) (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona) es un flavonoide presente en frutas y verduras con fuerte carácter antioxidante. La capacidad antioxidante total de la Q medida como actividad antioxidante equivalente en Trolox (TEAC) es de 4,7 mM, lo que representa un valor cinco veces superior a los cuantificados para las vitaminas E y C (Rice-Evans y Miller, 1998; Martínez-Florez et al., 2002).

Los flavonoides ingeridos a través de la dieta se encuentran abundantemente en forma 3-O-glicosilada. El glicósido más abundante de la Q es la rutina, quercetina unida mediante enlace O-glicósido a un disacárido glucosa-ramnosa. Dicha glicosilación aumenta su hidrosolubilidad, pero disminuye su poder antioxidante (Heim et al., 2002), por lo que sería provechoso poder hacer llegar al organismo la forma aglicona (quercetina) de este flavonoide. Los procesos de inclusión o encapsulación de estos compuestos bioactivos dentro de matrices deben ser estudiados, caracterizados y puestos a punto.

El objetivo del trabajo se orienta a la producción y comparación de nano y microemulsiones que puedan reintroducirse posteriormente en matrices alimentarias, con la incorporación de quercetina como compuesto bioactivo y utilizando proteínas lácteas para su estabilización. Este desarrollo podrá contribuir a la creación de alimentos de alto valor agregado.

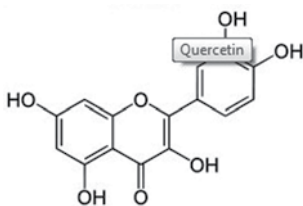


Figura 1. Estructura química de la quercetina.

## Materiales y Métodos

### 1. Preparación de las emulsiones

#### Preparación de emulsiones con homogeneizador de alta velocidad

Se prepararon emulsiones aceite en agua variando la fracción volumétrica ( $\phi$ =volumen aceite/volumen emulsión) y la concentración de Beta-lactoglobulina (Blg). Se utilizaron valores de  $\phi$  de 0,05; 0,25; 0,4; 0,5 y 0,75 y de Blg de 1, 3, 5, 7, 8 y 10 mg/ml en disolución de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4. Algunas de las emulsiones contaron con el agregado de pectina (de alto y bajo metoxilo) y otras de goma guar disueltas en igual solución que la proteína, en concentraciones de 0,5; 0,7 y de 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 mg/mL, respectivamente. Las emulsiones fueron preparadas a temperatura ambiente con un homogeneizador Ultra-turrax T25 (IKA-Labortechnik, GmbH & Co., Staufen, Alemania) (UT), utilizando el accesorio dispersante S 25 N-10G a una velocidad de 20.000 rpm durante un minuto. Previamente a la homogeneización se incorporaron a la fase oleosa 300 $\mu$ L de una solución de Q en etanol de concentración 5mg/mL cada 100mL de dicha fase.

#### Preparación de emulsiones por alta presión de homogeneización

Se prepararon emulsiones aceite:agua 50:50 con Blg como emulsionante en concentraciones 0,5; 1,5; 2,5 y 3,5 % m/v. La proteína fue dispersada en solución de fosfato de sodio 0,1 M pH 7,4. La preparación aceite-agua fue premezclada en un agitador de paleta durante 1 minuto previo a su pasaje por el equipo de HPH (Emulsiflex C5, Avestin). Se experimentaron dos rangos de presión (500-800bar) y (800-1200bar) y cada emulsión fue reciclada cinco veces. De cada uno de los rangos se analizaron muestras de los ciclos 1, 3 y 5. Las emulsiones ingresaron al equipo a 25 °C (temperatura de entrada del primer ciclo) y en los siguientes ciclos se determinaron la temperatura de entrada y salida.

Previo a la homogeneización se incorporaron a la fase oleosa 300 $\mu$ L de una solución de Q en etanol de concentración 5mg/mL cada 100mL de la fase.

### 2. Análisis de la capacidad para formar y estabilizar emulsiones aceite-agua

La estabilidad global de las emulsiones se analizó mediante un analizador óptico vertical (Turbiscan Classic MA 2000, Formulacion, Toulouse, France) (Palazolo et al., 2004; Palazolo et al., 2005). Las emulsiones recientemente preparadas se colocaron en una celda cilíndrica de vidrio (80 mm) para registrar el perfil de retrodispersión (RD %) o "Back Scattering" (%BS) en función de la altura en la celda. Se realizó el estudio de las cinéticas de cremado y desestabilización de las emulsiones mediante la medida de BS cada un minuto durante un período de 60 minutos y una medida a las 24 hs. En el caso de las emulsiones obtenidas con HPH el estudio se continuó con medidas a los 5, 15 y 30 días. El estudio se realizó en la parte inferior (8mm) del tubo. Se utilizaron modelos cinéticos planteados por Panizzolo (2005).

### 3. Determinación del tamaño promedio de gota en las emulsiones

La distribución del tamaño de partícula se determinó por difracción de luz láser y dispersión de luz polarizada mediante el uso de un analizador de partículas Coulter Counter Multisizer (Coulter Electronics Ltd) (Anton et al., 2002), que mide en un rango de 0.04  $\mu$ m hasta 2000  $\mu$ m, y por dispersión de luz láser mediante Malvern Zetasizer NanoZS, que mide en el rango de 0.1 nm y 6  $\mu$ m, en el caso de las emulsiones obtenidas mediante UT y HPH, respectivamente. Las emulsiones analizadas fueron preparadas según lo descrito en el apartado 1, Preparación de las emulsiones. Se utilizaron también como parámetros de comparación el diámetro de Sauter ( $D_{3,2} = \sum d^3/d^2$ ) y el diámetro de Broucker ( $D_{4,3} = \sum d^4/d^3$ )

### 4. Determinación del porcentaje de encapsulación de Quercetina (Q)

La determinación del porcentaje de encapsulación del compuesto bioactivo en las emulsiones se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello se usó un equipo de HPLC Shimadzu con detector UV Shimadzu SPD-20A y bomba Shimadzu LC-10AT, utilizando Acetonitrilo:Agua 40:60 como fase móvil (Kumari et al., 2010) y columna Jupiter C18 de tamaño 250 mm de largo, 4,6 mm de diámetro y 5  $\mu$ m de tamaño de poro. Se utilizó un flujo de 1 mL/min. La curva patrón se realizó con soluciones de Q en etanol abarcando concentraciones desde 0.001 a 0.1 mg/ml, la

linealidad se mantuvo entre 0.001 y 0.05 mg/ml con  $R^2=0.9991$ . %Q encapsulada=  $(Q_i - Q_s) / Q_i \times 100$  con  $Q_i$ : masa de Q incorporada en la emulsión y  $Q_s$ : masa de Q en el sobrenadante.

Para el análisis, las emulsiones fueron centrifugadas a 3000 g y 4 °C durante 2 y 5 horas en el caso de emulsiones obtenidas en UT y HPH, respectivamente, logrando así un cremado sin rompimiento de la emulsión. La emulsión fue congelada para obtener la fase acuosa libre de la fase crema. Luego la fase acuosa fue diluida (1/5) en etanol absoluto, de forma de precipitar la proteína, y posteriormente centrifugada a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue el analizado.

## 5. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de datos se efectuó en todos los casos mediante análisis de la varianza (ANOVA) con  $\alpha = 0,05$  y la comparación de medias por la prueba de mínimas diferencias significativas (LSD) con  $\alpha = 0,05$ , con el programa Statgraphics plus 7.0.

## Resultados y Discusión

Se determinó que las emulsiones de  $\phi=0.5$  sin hidrocoloides realizadas con ultraturrax presentan mayor estabilidad en comparación a los demás  $\phi$  estudiados. Se comprobó, tal como era esperado, que los estabilizantes experimentados (pectina, GG) aumentan la estabilidad de la emulsión frente a la floculación y al cremado. No hubo diferencia en los resultados de estabilidad al utilizar pectina de alto (HM=55) o de bajo (LM=32) metoxilo. Todas las condiciones ensayadas en emulsiones obtenidas con el UT con o sin pectina presentaron una cinética de desestabilización del tipo sigmoidea (S), hiperbólica (H) o una conjunción de ambas (C). Sin embargo, cuando se utilizó un hidrocoloide de mayor peso molecular, como es el caso de goma guar, aumentó significativamente la estabilidad; en el caso de la emulsión aceite agua de  $\phi=0.4$  con 2.2 % (m/v) de Blg y 0.2 % (m/v) de goma guar (GG) se logró una cinética de desestabilización lineal dentro de las 24 horas, comparable a las cinéticas obtenidas para las emulsiones tratadas con HPH presentadas y discutidas más adelante. Este tipo de cinética puede deberse al aumento de la viscosidad de la fase continua que provocaría una disminución en la velocidad de cremado, según la ley de Stokes.

Respecto al tamaño promedio de gota, fue menor significativamente cuando se manejaron concentraciones de 2 % o 3.5 % (m/v) de proteína y 0.5 % (m/v) de pectina. Comparándolas con las emulsiones de iguales características sin el agregado de pectina se observa (Figura 2) que el diámetro promedio al contener 0.5 % de pectina es cercano a los 100 nm, mientras que en emulsiones sin agregado del hidrocoloide ronda en los 450 nm. El valor de  $D_{3,2}$  es similar en ambas, no obstante el de  $D_{4,3}$  es levemente mayor en presencia de la pectina, es decir que, a pesar de que el tamaño promedio de partícula se redujo y casi el 100 % de las partículas tienen un diámetro menor a 500 nm, las pocas (<1%) restantes representan alrededor del 95 % del volumen. Pese a que un aumento en el valor del  $D_{4,3}$  podría provocar un aumento en la velocidad de cremado, la mayor estabilidad apuntada anteriormente –durante los primeros 60 minutos luego de formada la emulsión–, puede deberse al incremento de la viscosidad de la fase continua. La emulsión preparada con GG descripta mostró (Figura 2) un diámetro promedio menor al de la emulsión sin estabilizantes y mayor al de la emulsión con pectina ya analizada, en tanto que su  $D_{4,3}$  fue menor al de estas emulsiones. Dicho valor, junto con el aumento de la viscosidad de la fase continua, puede explicar su mayor estabilidad.

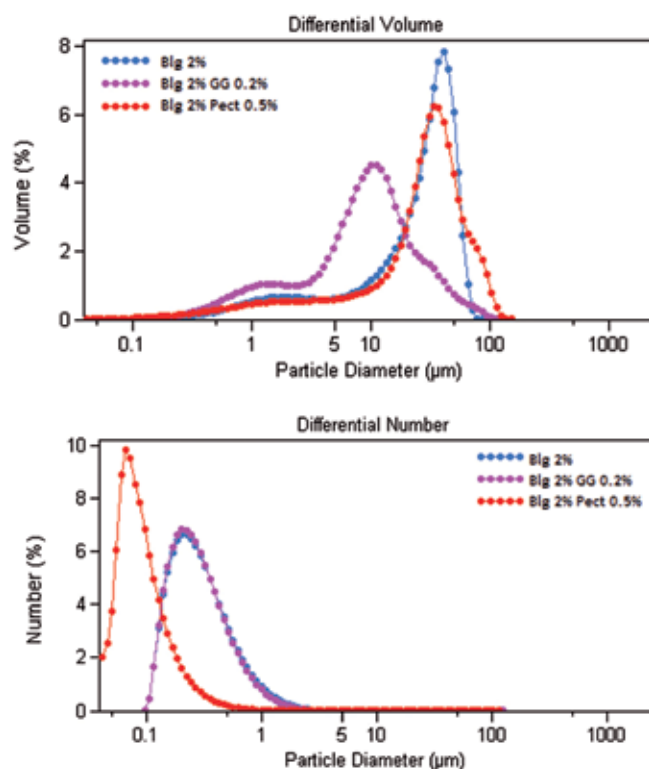


Figura 2. Distribución de tamaño en volumen (a) y en número (b) de emulsiones O/W 50:50 con Blg al 2% (m/v) sin goma, con 0.2% (m/v) de GG, con 0.5% (m/v) de pectina.

Dentro de las emulsiones tratadas con HPH se observó que para una concentración de proteínas de 0.5 % (m/v), todos los ciclos estudiados (1, 3 y 5) pasan de presentar una cinética lineal de desestabilización en la primera hora a una S, H o C a las 24 horas. Al aumentar la concentración a 1.5 y 2.5 % se mantiene la cinética lineal hasta los 5 días en el caso del primer reciclado, hasta los 15 días en el caso de tres pasajes y hasta los 30 días cuando es reciclada 5 veces. En la Fig. 3A) se puede observar las emulsiones con 1.5 % de Blg obtenidas con 1, 3 y 5 ciclos, el control del equipo (pasaje por el equipo de HPH a presión atmosférica) y la emulsión sin pasaje por el equipo de HPH luego de un mes. En la Fig. 3B) y 3C) se muestran sus cinéticas obtenidas con el turbiscan.

Una estabilidad aún mayor presentan las emulsiones con 3.5 % de Blg, logrando mantener una cinética de desestabilización lineal por 15 días en el primer ciclo y por más de 45 días en los ciclos 3 y 5, sin que se hallara diferencia de estabilidad entre los distintos rangos de presiones estudiados (500-800 bar; 800-1200 bar). El aumento de estabilidad al aumentar el número de ciclos se debe a la progresiva reducción de tamaño que se muestra en la Figura 4, sobre todo de las partículas más grandes, principales causantes de la rápida desestabilización. La mayor estabilidad de las emulsiones tratadas con HPH respecto a las obtenidas con UT se puede corresponder, además de al menor tamaño logrado en las primeras, a la conformación del emulsificante; en el caso de las proteínas séricas éstas se pueden ver afectadas por la HPH y sufrir desnaturalización cuando son tratadas con presiones superiores a los 200 MPa (Gracia et al., 2008)

Comparando los tamaños de partícula de ambos métodos es posible observar que al utilizar HPH el  $D_{3,2}$  disminuye entre 4 y 5 veces y el  $D_{4,3}$  lo hace en por lo menos 10 veces. Esta disminución de tamaño es un reflejo del mecanismo del homogeneizador de HPH, el cual consiste en un generador de alta presión ensamblado a una válvula diseñada para resistir la aplicación de muy altas presiones. Como consecuencia



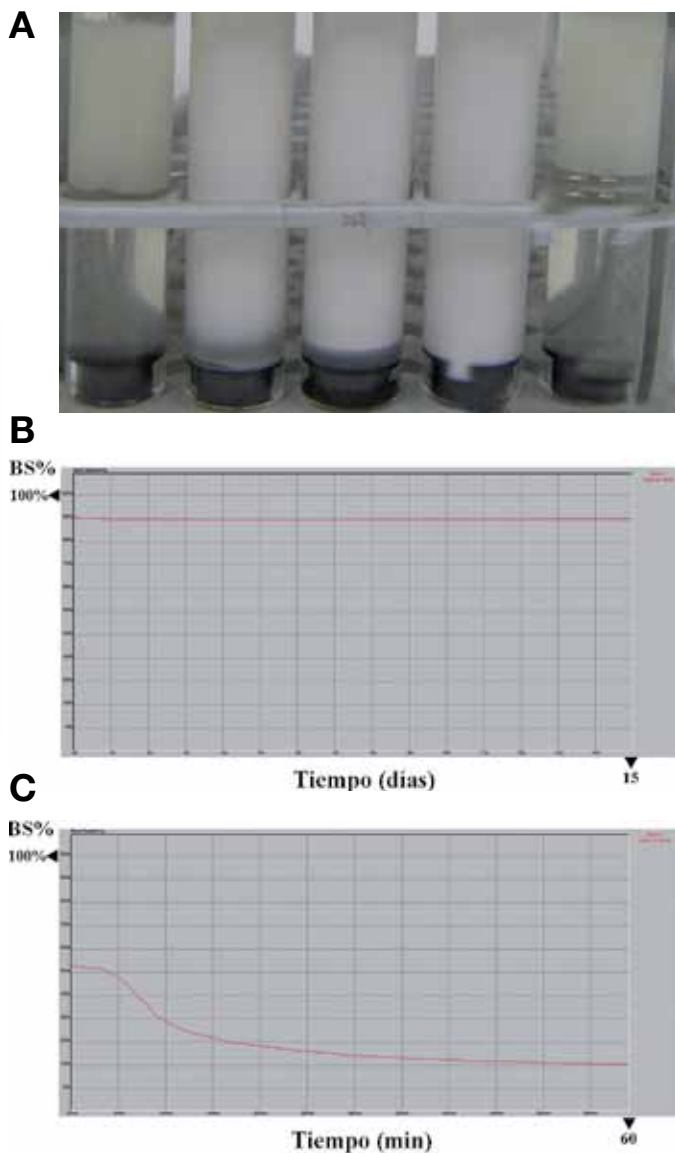


Figura 3. A) Emulsión 50:50 con Blg al 1.5% con un mes de antigüedad (a) Control (P atm), (b) ciclo 1, (c) ciclo 3, (d) ciclo 5, (e) control equipo. B) cinética lineal que presenta c. y b. C) cinética sigmoidea que presenta a.

se producen fuerzas de cizalla, cavitación, turbulencia y coalescencia en la superficie del fluido, que pueden causar, entre otros efectos, la ruptura de las gotas de grasa en el caso de una emulsión aceite en agua O/W, aumentando su estabilidad (Desrumaux y Marcand, 2002)

El porcentaje de encapsulación de quercetina en emulsiones obtenidas mediante enfoque tradicional fue de 12, mientras que en emulsiones con HPH (Blg 1.5% tercer ciclo, 800-1200bar) resultó de 40, lo cual se puede deber al tamaño de partícula más pequeño obtenido con HPH. El consiguiente aumento de la interfase entre las partículas y su medio circundante puede ser favorable para aumentar la biodisponibilidad de compuestos (Chen et al., 2006).

## Conclusión

Utilizando el método tradicional de obtención de emulsiones, la mayor estabilidad (24 horas) se logra con una concentración de 2.2 % (m/v) de proteína y 0.2 % (m/v) de goma guar. Utilizando HPH (800-1200 bar) con una concentración de 1.5 % (m/v) de beta-lactoglobulina y sin necesidad de hidrocoloides es posible lograr emulsiones con una estabilidad aceptable de 5 días con un ciclo y de 15 días al reciclarse 3 y 5 veces. Éstas tienen un 99 % de sus partículas de diámetro menor a 500 nm. Las nanoemulsiones elaboradas con HPH (1.5 % BLG) presentaron mayor porcentaje de encapsulación de quercetina.

## Referencias

- ANTON, M.; BEAUMAL, V.; BROSSARD, C.; LLAMAS, G.; LE DENMAT, M. Droplet flocculation and physical stability of oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk. En: ANTON, M. *Food emulsions and dispersions*. Kerala: Research Signpost, 2002. pp.15–28.
- AUGUSTIN, M. A. The role of encapsulation in the development of functional dairy foods. En: *Australian Journal of Dairy Science and Technology*. 2003, 58:156-160.
- CHEN, L.; REMONDETTO, G.E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. En: *Trends Food Science and Technology*. 2006, 17:272-83.

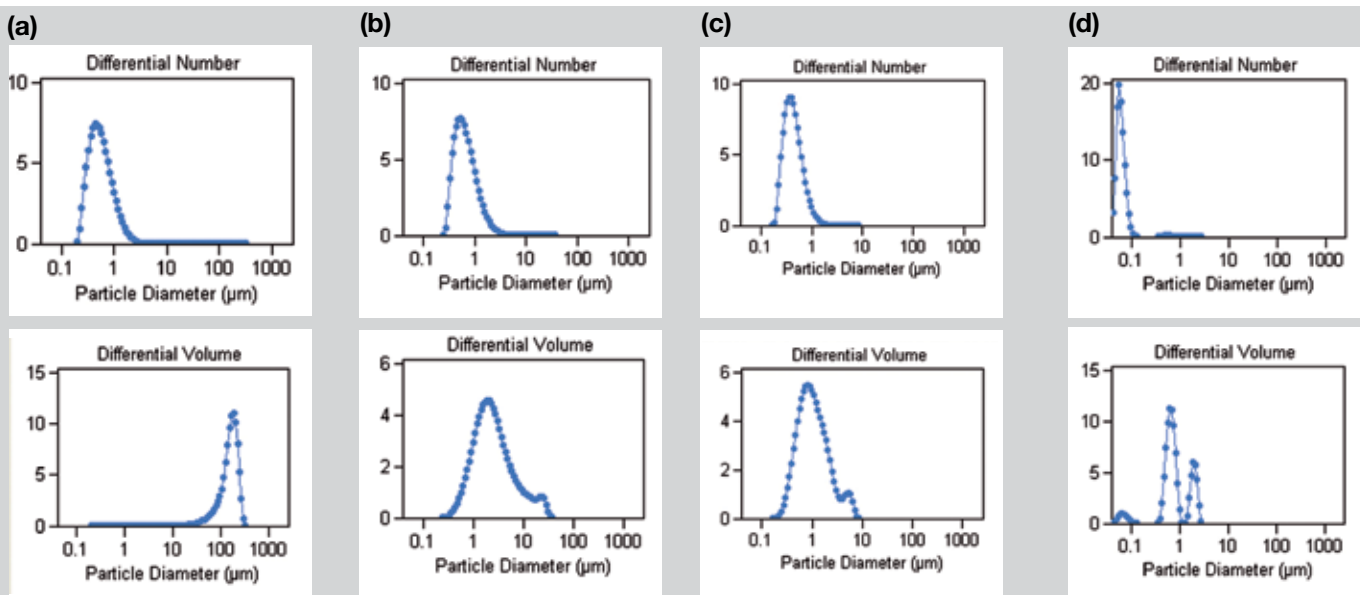


Figura 4. Gráficos de distribución de número y volumen de tamaño de gota de emulsión 50:50, Blg 3.5 % medidos inmediatamente luego de formada la emulsión en analizador óptico Coulter. (a) emulsión control (Patm); (b) ciclo 1 (500-800 bar); (c) ciclo 3 (500-800 bar); (d) ciclo 5 (500-800 bar).

- DESRUMAUX, A.; MARCAND, J. Formation on sunflower oil emulsions stabilized by whey protein with high-pressure homogenization: effect of pressure on emulsion characteristics. En: *International Journal of Food Science and Technology*. 2002, 37:263-269.
- GRACIA-JULIA, A.; RENE, M.; CORTES-MUÑOZ, A.; PICART, L.; LOPEZ-PEDEMONTE, T.; CHEVALIER, D.; DUMAY, E. Effect of dynamic high pressure on whey protein aggregation: a comparison with the effect of continuous short-time thermal treatments. En: *Food Hydrocolloids*. 2008, 22(6):1014-1032.
- HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. En: *J.Nutr.Biochem*. 2002, 13:572-584.
- KUMARI, A.; YADAV, S. K.; PAKADE, Y.; KUMAR, V.; SINGH, B.; CHAUDHARY, A.; YADAV, S. C. Nanoencapsulation and characterization of Albizia chinensis isolated antioxidant quercetin in PLA nanoparticles. En: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010, 82:224-332.
- LIZARRAGA, M.S.; PAN, L.G.; AÑOB, M.C.; SANTIAGO, L.G. Stability of concentrated emulsions measured by optical and rheological methods. Effect of processing conditions - I. Whey protein concentrate. En: *Food Hydrocolloids*. 2008, 22:868-878
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. En: *Nutr. Hosp.* 2002, XVII(6):271-278.
- PALAZOLO, G. G.; SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R. Emulsifying properties and surface behavior of native and denatured whey soy proteins in comparison with other proteins. Creaming stability of oil-in water emulsions. En: *Journal of the American Oil of Chemists' Society*. 2004, 81:625-632.
- PALAZOLO, G. G.; SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R. Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates. En: *Food Hydrocolloids*. 2005, 19:595-604.
- PANIZZOLO, L. A. *Modificación de proteínas por vía enzimática. Análisis de la relación estructura funcionalidad de los productos de hidrólisis*. Montevideo: Facultad de Química, 2005.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids. En: RICE-EVANS, C.A.; PACKER, L. *Flavonoids in health and disease*. New York: Marcel Dekker, 1998. pp. 541
- SOLANS, C.; ESQUENA, J.; FORGIARINI, A.M.; USÓN, N.; MORALES, D.; IZQUIERDO, P.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M.J. Nano-emulsions: formation, properties and applications. En: *Surfactant Sci Series*. 2003, 109:525-54.
- TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. En: *Adv Colloid Interface Sci*. 2004, (108-109):303-318

# Propiedades antioxidantes e inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA I) de fracciones ultrafiltradas de hidrolizados de hemoglobina bovina

Cian, R. E. <sup>(1,2)\*</sup>, Drago, S. R. <sup>(1,2)</sup>, González, R. J. <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina - <sup>(2)</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

Contacto: rec\_704@yahoo.com.ar

Recibido: 29/03/2011 - Aprobado: 10/11/2011

## Resumen

El estrés oxidativo y la hipertensión arterial juegan un rol muy importante en las enfermedades crónicas. Una alternativa para obtener péptidos con propiedades antioxidantes y antihipertensivas naturales es la hidrólisis enzimática de proteínas. El objetivo de este trabajo fue obtener fracciones de hidrolizados proteicos de concentrado de hemoglobina bovina (CHB) con propiedades antioxidantes y antihipertensivas concentradas. Se prepararon 4 hidrolizados a partir del CHB usando diferentes proteasas que fueron fraccionados por ultrafiltración (corte 5kDa). A las fracciones ultra-filtradas se les determinó la capacidad antioxidante (inhibición del radical ABTS<sup>+</sup>) y sus propiedades antihipertensivas (inhibición de ECA I). La hidrólisis enzimática incrementó la capacidad antioxidante y actividad antihipertensiva del CHB. El proceso de ultrafiltración permitió concentrar la actividad antioxidante de los diferentes hidrolizados proteicos. Sin embargo, para el caso de la actividad antihipertensiva no hubo diferencias importantes que justifiquen el empleo de dicho proceso ( $p < 0,05$ ).

Palabras clave: actividad antioxidante, actividad antihipertensiva, hidrolizados, ultrafiltración, hemoglobina bovina.

## Abstract

Oxidative stress and hypertension play an important role in chronic diseases. Enzymatic hydrolysis of proteins is an alternative to obtain peptides with antihypertensive properties and natural antioxidants. The aim of this study was to obtain fractions from bovine hemoglobin concentrate (BHC) protein hydrolysates with concentrated antioxidant and antihypertensive properties. Four hydrolysates from BHC were prepared using different proteases and then were fractionated by ultrafiltration (MWCO: 5kDa). Antioxidant capacity (ABTS<sup>+</sup> radical inhibition) and antihypertensive activity (ACE I inhibition) were determined on the ultrafiltered fractions. Enzymatic hydrolysis increased the antioxidant capacity and antihypertensive activity respect to BHC. Ultrafiltration process allowed to concentrate the antioxidant activity from different protein hydrolysates. However, there were no significant differences in the antihypertensive activity to justify the use of this process ( $p < 0.05$ ).

Keywords: ultrafiltered fractions, antihypertensive activity, antioxidant capacity, bovine hemoglobin hydrolysates.

## Introducción

El metabolismo oxidativo es esencial para la supervivencia celular. Un efecto secundario de este proceso es la producción de radicales libres y otras especies reactivas del oxígeno que causan daños en las células al oxidar lípidos de membrana, proteínas celulares, ADN y enzimas, lo que conlleva a la muerte celular (Pihlanto, 2006). Este estrés oxidativo juega un rol muy importante en enfermedades tales como arterioesclerosis, diabetes, artritis reumatoidea, cáncer, etcétera (Halliwell, 1997). Por otro lado, la oxidación de los lípidos deteriora la calidad de los alimentos y disminuye su tiempo de conservación, debido al desarrollo de olores y sabores desagradables, como consecuencia de la descomposición de los ácidos grasos insaturados mediada por radicales libres. Para inhibir la peroxidación de los lípidos y la formación de estos radicales libres, se puede recurrir a los antioxidantes naturales (Wang et al., 2007).

La hipertensión arterial es un proceso multifactorial, por lo que los inhibidores con acción antihipertensiva pueden actuar de formas muy diversas; la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina

(ECA) es el mecanismo de acción más estudiado. Como primeros inhibidores exógenos se estudiaron los extractos del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca*. A partir de estos extractos se han aislado distintos péptidos que inhiben la ECA (Hernández Ledesma et al., 2002). Actualmente, derivados sintéticos como Captopril, Enalapril, Lisinopril y otros han sido desarrollados y son efectivos para la disminución de la presión arterial. Sin embargo, algunos efectos secundarios indeseables han sido reportados (Atkinson et al., 1979). Esto ha llevado a la búsqueda de péptidos naturales inhibidores de la ECA, tanto para el tratamiento como para la prevención de la hipertensión.

Resulta de gran interés la búsqueda de péptidos bioactivos con propiedades antioxidantes e inhibidores de la ECA para ser utilizados como ingredientes naturales de los alimentos funcionales. Una alternativa de obtención de éstos es la hidrólisis enzimática seguida de un proceso de fraccionamiento.

La sangre bovina producida en los frigoríficos es una fuente proteica de alta calidad que se ha utilizado como ingrediente alimenticio, tanto por sus propiedades funcionales como por su valor nutritivo (Cian et al., 2011). Cabe acotar que la hemoglobina constituye más de la mitad

de dicha fracción proteica (Liu et al., 1996) y sus hidrolizados son una fuente de péptidos bioactivos, tales como péptidos opioides (Zhao et al., 1997), péptidos que estimulan el crecimiento bacteriano (Zhao et al., 1996), péptidos que transmiten fotosensibilidad (In et al., 2002) y péptidos que exhiben actividad antioxidante (Chang et al., 2007).

El objetivo de este trabajo fue obtener fracciones proteicas de hidrolizados de concentrado de hemoglobina bovina (CHB) con propiedades antioxidantes y antihipertensivas concentradas.

## Materiales y Métodos

### Materias primas y reactivos

Para la preparación de los hidrolizados se trabajó con hemoglobina bovina provista por YERUVÁ SA (Esperanza-Argentina) y las siguientes enzimas comerciales: P (Protex 6L), FC (Fungal Protease Concentrate), provistas por Genencor SA, y F, provista por Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. El orto-ftaldehído (OPA), ditioneitol (DTT), dodecilsulfato de sodio (SDS), ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), Hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL), 2,4,6-trichloro-s-triazine (TT), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), albúmina sérica bovina y L-Serina fueron provistos por Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) fue provisto por Aldrich Chemical Co., Gillingham, Dorset, UK. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

### Composición centesimal y elaboración de los hidrolizados

La composición del Concentrado de Hemoglobina Bovina (CHB), fue determinada usando los procedimientos de la AOAC (1995). Los hidrolizados fueron obtenidos empleando un reactor termostático del tipo batch de 800 ml. El pH de reacción fue medido de manera continua utilizando un pHmetro IQ Scientific Instruments. El ajuste de pH se realizó mediante el agregado de base (NaOH, 2 N) o ácido (HCl, 2 N). La concentración de sustrato fue en todos los casos de 8 % (P/P). Las condiciones de trabajo utilizadas para las distintas enzimas fueron: P: E/S: 0,1 %, T: 60 °C, pH: 9,5; para FC: E/S: 0,5%, T: 55°C, pH: 4,3 y para F: E/S: 0,1%, T: 55 °C, pH: 7. Se prepararon cuatro hidrolizados del CHB, basándose en experiencias previas: *Hidrólisis 1*: Enzima P durante 2 horas; *Hidrólisis 2*: Enzima FC durante 2 horas; *Hidrólisis 3*: Enzima P durante 2 horas + Enzima F durante 4 horas; *Hidrólisis 4*: Enzima FC durante 2 horas + Enzima F durante 4 horas. Una vez finalizadas las hidrólisis, la/s enzima/s fue/ron inactivada/s por tratamiento térmico de acuerdo a las condiciones descriptas por el fabricante y los hidrolizados fueron congelados a -20 °C y liofilizados.

Para el seguimiento de la reacción de hidrólisis se determinó el grado de hidrólisis (GH) por medio de la medición de aminos libres por orto-ftaldehído (OPA), según Nielsen et al. (2001) y como se describe a continuación:

$$GH = [(h - h_0) / h_t] \times 100\%$$

Donde:  $h_t$  es el número total de uniones peptídicas hidrolizables en la proteína (8,23 mEq/g proteína),  $h$  es el número de uniones peptídicas hidrolizadas y  $h_0$  es el contenido de aminos libres en la proteína de partida.

El GH obtenido para cada sistema fue el siguiente:  $8,33 \pm 1,02$ ;  $8,43 \pm 0,69$ ;  $19,84 \pm 0,21$  y  $16,67 \pm 0,11$  para P, FC, P+F y FC+F, respectivamente.

### Fraccionamiento por ultrafiltración

Se realizó una dispersión de los hidrolizados liofilizados al 2.6 % en PBS (pH 7,4) que se centrifugó a 3000xg durante 10 min. El sobrenadante fue ultrafiltrado, usando una membrana Molecular/Por® Cellulose Ester, cuyo cut-off fue de 5kDa. El proceso se llevó a cabo durante 150 min, recolectándose aproximadamente 20 ml de filtrado. Tanto a las fracciones obtenidas por UF (Retenido: R y Permeado: P), como a la fracción soluble total (ST) se les determinó el contenido de proteínas utilizando el método de Lowry et al. (1951). El tamaño promedio de la cadena polipeptídica (PCL) de las fracciones fue determinado de acuerdo a Adler-Nissen (1986) y como se describe a continuación:

$$PCL = (\text{Proteínas solubles} / h)$$

Donde:  $h$  es el número de uniones peptídicas hidrolizadas.

### Determinación de la actividad antioxidante y antihipertensiva de las diferentes fracciones ultrafiltradas

En todos los casos, para estimar la capacidad antioxidante se utilizó el método de inhibición del radical catión ABTS<sup>+</sup> propuesto por Pukalskas et al. (2002). Para estimar la Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) se utilizó como estándar al Trolox y se construyó una curva de Inhibición vs. Concentración de Trolox (0-2,5 mM).

La actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se determinó de acuerdo con Hayakari et al. (1978) con modificaciones. Además, se construyó una curva de concentración proteica (mg/ml) vs. inhibición de ECA y se obtuvo la concentración proteica que inhibe en un 50 % (IC50).

Las muestras (ST, R y P) se evaluaron a una concentración de proteínas de 5 y 2,3 mg/ml para el ensayo de actividad antioxidante y antihipertensiva, respectivamente.

### Análisis estadísticos

Todas las muestras se evaluaron por triplicado y se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus 3.0 para realizar análisis de ANOVA.

## Resultados y Discusión

### Actividad antioxidante de las diferentes fracciones obtenidas por ultrafiltración

En la Figura 1 se muestran los valores de TEAC de las diferentes fracciones: la fracción soluble total (FST) y aquellas obtenidas por ultrafiltración, tanto para el CHB como para sus hidrolizados. Exceptuando el caso del hidrolizado P, la fracción con mayor TEAC fue la de PM < 5kDa (*Permeado*), lo que demuestra que las fracciones con bajo PM son las que tienen mayor actividad antioxidante.

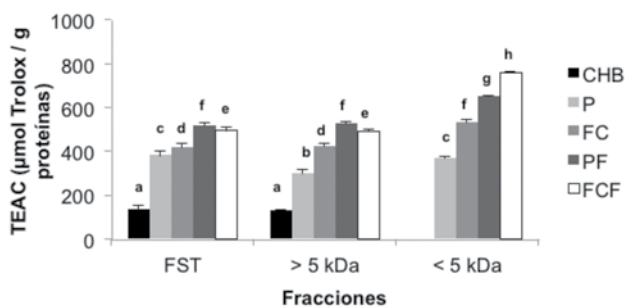


Figura 1. Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) medida a los 6 minutos de las diferentes fracciones del concentrado de hemoglobina bovina (CHB) y sus hidrolizados, obtenidas por ultrafiltración. FST: fracción soluble total.

También se puede ver que la muestra antes de ser fraccionada y la fracción >5kDa presentan actividad antioxidante que no difiere significativamente entre sí (excepto para P). Estos resultados coinciden con los reportados por Wang et al. (2007) para la capacidad antioxidante (inhibición del radical DPPH) para hidrolizados de gluten de trigo ultrafiltrados con una membrana de cuyo corte fu 5kDa. En este sentido, Peng et al. (2009) y Qian et al. (2008) reportaron que la actividad antioxidante es dependiente de la distribución de tamaños moleculares.

En la Figura 2 se observa la capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) y el valor de PCL de la fracción <5kDa del CHB y sus hidrolizados. Cabe mencionar que para el permeado del CHB no fue posible detectar actividad antioxidante bajo la concentración proteica obtenida ( $\approx 0,8\text{mg/ml}$  de proteínas) y que la enzima FC posee una leve actividad exoproteasa además de la acción endopeptidasa. La mayor TEAC se obtuvo para el hidrolizado FC+F, y en orden significativo le siguió la del hidrolizado P+F, lo cual indica que cuanto mayor es la actividad *endo-exopeptidasa* mayor es la TEAC obtenida. Esto se debe básicamente a la acción conjunta de estas enzimas sobre el sustrato, ya que las exopeptidasas van hidrolizando los enlaces peptídicos no sustituidos próximos al extremo amino o carboxilo terminal del sustrato, mientras que las endopeptidasas lo hacen en regiones internas de las cadenas peptídicas (Guadix et al., 2000). De esta manera el proceso de hidrólisis se torna más efectivo, permitiendo una degradación más completa de la proteína (Chang et al., 2007), que conduce a la generación de péptidos de diversos tamaños, con los de bajo PM como los principales componentes (Li et al., 2007).

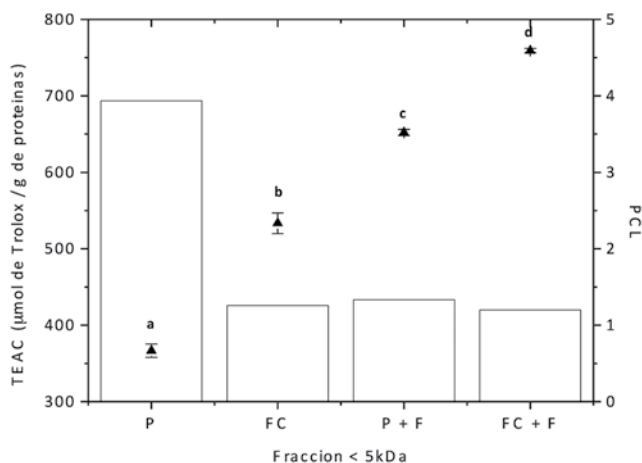


Figura 2. Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) de la fracción <5kDa de los hidrolizados del CHB, obtenidas por ultrafiltración para 6 min de reacción ( $\blacktriangle$ , ordenada izquierda). PCL de la fracción <5kDa (barras, ordenada derecha). Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, si bien la TEAC es mayor cuanto mayor es la acción *endo-exopeptidasa*, el valor de PCL es prácticamente el mismo para las tres fracciones (exceptuando P). Esto indica que no sólo influye sobre la actividad antioxidante el tamaño molecular de los productos, sino también la secuencia aminoacídica (posición de los aminoácidos en la estructura peptídica) de los péptidos generados (Xie et al., 2008). Este hallazgo concuerda con lo reportado por Yang et al. (2008) para hidrolizados de gelatina obtenida a partir de piel de *Rachycentron canadum* (Cobia).

## Actividad antihipertensiva de las diferentes fracciones obtenidas por ultrafiltración

En la Figura 3 se muestran los resultados de la actividad antihipertensiva (AH) de la fracción FST y de las fracciones obtenidas por UF (retenidos y permeados) del CHB y de los diferentes hidrolizados proteicos (FC, FC+F, P y P+F).

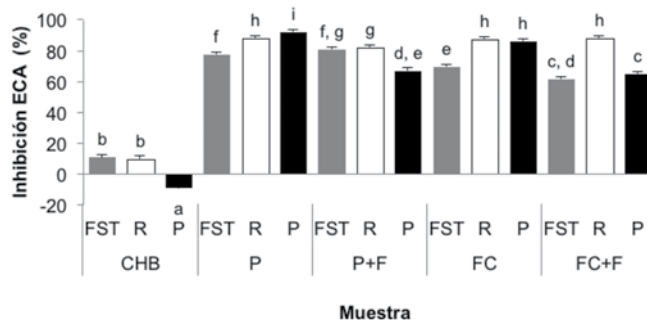


Figura 3. Actividad antihipertensiva de las diferentes fracciones del CHB y sus hidrolizados, obtenidas por ultrafiltración. Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ).

Los hidrolizados presentaron muy buena actividad AH (mayor al 60 % de inhibición de la ECA), mientras que la actividad de las fracciones del CHB fue baja (9 %). La fracción soluble (ST) de los hidrolizados obtenidos con P exhibió mayor actividad AH que los obtenidos con FC y, a su vez, el empleo de la exopeptidasa (F) disminuyó la actividad AH en el caso de FC+F respecto de FC.

Para evaluar el efecto de la ultrafiltración (UF) y de los distintos sistemas enzimáticos utilizados en la hidrólisis de la proteína en el porcentaje de inhibición de la ECA se realizó un ANOVA multifactor (Tabla 1).

FRACCIÓN	MEDIA	GRUPOS HOMOGÉNEOS
FST	$58 \pm 2$	a
P	$60 \pm 2$	a
R	$70 \pm 2$	b

Tabla 1. Contraste Múltiple de Rango para la actividad AH según UF. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Las fracciones proteicas retenidas mostraron mayor actividad AH que las fracciones proteicas del permeado (70 vs. 60, respectivamente). Por otro lado, al considerar los sistemas enzimáticos, las fracciones solubles (FST) correspondientes a hidrolizados obtenidos con endopeptidasas (P y FC) presentaron mayor actividad que aquellas muestras a las que se le adicionó una exopeptidasa (F) para la hidrólisis (Tabla 2).

MUESTRA	MEDIA	GRUPOS HOMOGÉNEOS
CHB	3 ± 4	a
FC+F	71 ± 3	b
P+F	77 ± 3	b
FC	81 ± 3	c
P	86 ± 3	c

Tabla 2. Contraste Múltiple de Rango considerando todas las muestras (FST, R y P) para la actividad AH según sistema enzimático. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

El valor de inhibición de la ECA hallado para la fracción FST correspondiente al hidrolizado obtenido con P (grado de hidrólisis 8,33 %) evaluada a una concentración de proteínas de 2,3 mg/ml es semejante al resultado informado por Yang et al. (2007) para un hidrolizado de gluten de maíz obtenido con Alcalasa (grado de hidrólisis 16,96 %) y determinado a una concentración de proteínas de 10 mg/ml (85 % de inhibición de la ECA). Vale subrayar que el valor de IC50 hallado para FST de P fue de 1,08 ± 0,05 mg/ml de proteínas.

En la Tabla 3 se muestran los valores de PCL de las fracciones del permeado y el retenido.

MUESTRAS	P	R
P	3,93	6,09
FC	1,26	5,12
P+F	1,33	2,47
FC+F	1,20	3,52

Tabla 3. Tamaño promedio de la cadena polipeptídica (PCL) de las fracciones del permeado (P) y del retenido (R).

Si bien la muestra que presentó mayor actividad fue la fracción permeada del hidrolizado P, cuyo tamaño medio de cadena polipeptídica fue de 3,93, esta fracción no presentó un valor mucho mayor respecto a los obtenidos en las fracciones retenidas de los sistemas enzimáticos evaluados (92 vs 82-88 %, respectivamente), cuyos PCL estuvieron comprendidos entre 2,5 y 6 (en promedio ≈ 500 Da). Esto coincide con lo reportado en la bibliografía en cuanto al tamaño de los péptidos con actividad AH (Torruco-Uco et al., 2008). La razón por la cual especies tan pequeñas permanecerían en la fracción R podría deberse a algún tipo de interacción entre las moléculas de mayor tamaño retenidas y los péptidos activos de bajo PM. Si bien para llevar a cabo la UF se parte de la fracción soluble de los hidrolizados (FST), libre de moléculas sin hidrolizar insolubles o agregados de péptidos insolubles, algunas fracciones proteicas de PM mayor a 5 kDa retendrían a los péptidos inhibidores de ACE, con lo cual se verían imposibilitados para pasar a la fracción permeada (P), concentrándose la actividad en el retenido (R). Además, es importante destacar que el PCL es una medida media del tamaño y que enmascara la verdadera distribución de tamaños peptídicos. Por otra parte, la adición de exopeptidasas que produce aminoácidos libres está asociada con la importante reducción en el PCL y, en general, con la disminución de la actividad AH.

Otro dato interesante es que en el caso de los sistemas enzimáticos P, FC y FC+F la actividad AH fue mayor en las fracciones de UF respecto a la fracción FST (valores entre 5 % y 43 %), pero en general no hubo diferencias significativas que justifiquen el uso de UF, salvo para el caso de FC+F en el que la fracción retenida presentó una diferencia de 43 % respecto de la muestra FST.

## Conclusiones

La hidrólisis enzimática incrementó la capacidad antioxidante y actividad antihipertensiva del concentrado de hemoglobina bovina.

Se logró establecer que el fraccionamiento por ultrafiltración permitió concentrar la actividad antioxidante de los diferentes hidrolizados proteicos y puso de manifiesto que las especies responsables de dicha actividad son componentes de bajo PM (<5kDa), siendo un procedimiento recomendable para obtener péptidos con dicha bioactividad. Sin embargo, para el caso de la actividad antihipertensiva no hubo diferencias importantes que justifiquen el empleo de este proceso, a excepción del hidrolizado FC+F cuya fracción R presentó una diferencia del 43 % respecto de la muestra FST.

## Reconocimientos

Los autores agradecen al Proyecto CAI + D 2009-PI-54-258 de la Universidad Nacional del Litoral por el apoyo en esta investigación.

## Referencias

- ADLER-NISSEN, Jens. *Enzymatic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16a ed., 2da. rev. Gaithersburg: AOAC, 1995. Official Method 948.12
- ATKINSON, A. B.; ROBERTSON, J. I. S. Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure. En: *Lancet*. 1979, 2:836-839.
- CHANG, Y.; WU, K.; CHIANG, S. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. En: *Food Chemistry*. 2007, 100:1537-1543.
- CIAN, R.; LUGGREN, P.; DRAGO, S. Effect of extrusion process on antioxidant and ACE inhibition properties from bovine haemoglobin concentrate hydrolysates incorporated into expanded maize products. En: *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2011, 62(7):774-780.
- GUADIX, A.; GUADIX, E.M.; PÁEZ-DUEÑAS, M.P.; GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F. Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. En: *Ars Pharmaceutica*. 2000, 41(1):79-89.
- HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. En: *Nutrition reviews*. 1997, 55:49-52.
- HAYAKARI, M.; KONDO, Y.; IZUMI, H. A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. En: *Analytical Biochemistry*. 1978, 84:361-369.
- HERNÁNDEZ LEDESMA, B.; AMIGO GARRIDO, L.; RECIO SÁNCHEZ, M.I. *Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 2002. ISBN: 84-669-2033-1.
- IN, M.; CHAE, H.; OH, N. *Process development for heme-enriched by enzymatic hydrolysis of hemoglobin*. En: *Bioresource technology*. 2002, 84:63-68.
- LI, B.; CHEN, F.; WANG, X.; JI, B.; WU, Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. En: *Food Chemistry*. 2007, 102:1135-1143.
- LIU, X.; YONEKURA, M.; TSUTSUMI, M.; SANO, Y. *Physicochemical Properties of Aggregates of Globin Hydrolysates*. En: *Journal Agriculture Food Chemistry*. 1996, 44:2957-2961.
- LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, L.; RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. En: *Journal of Biological Chemistry*. 1951, 193-265.

- NIELSEN, P.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. En: *Journal of Food Science*. 2001, 66:642-646.
- PENG, X.; XIONG, Y.; KONG, B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. En: *Food Chemistry*. 2009, 113:196-201.
- PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. En: *International Dairy Journal*. 2006, 16:1306-1314.
- PUKALSKAS, A.; VAN BEEK, T.; VENSKUTONIS, R.; LINSSEN, J.; VAN VELDHUIZEN, A.; DE GROOT, Æ. Identification of Radical Scavengers in Sweet Grass (*Hierochloa odorata*). En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50:2914-2919.
- QIAN, Z.; JUNG, W.; BYUN, H.; KIM, S. Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. En: *Bioresource Technology*. 2008, 99:3365-3371.
- STATPOINT TECHNOLOGIES, INC. Statgraphics Plus [Software]. 3.0. Warrenton: Statpoint Technologies, INC., [s.d.].
- TORRUCO-UCO, J.; DOMÍNGUEZ-MAGAÑA, M.; DÁVILA-ORTÍZ, G.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D. Antihypertensive peptides for treatment of natural origin: A review. En: *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2008, 6:158-168.
- WANG, J.; ZHAO, M.; ZHAO, Q.; JIANG, Y. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. En: *Food Chemistry*. 2007, 101:1658-1663.
- XIE, Z.; HUANG, J.; XU, X.; JIN, Z. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. En: *Food Chemistry*. 2008, 111:370-376.
- YANG, Y.; TAO, G.; LIU, P.; LIU, J. Peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten Meal. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55:7891-7895.
- YANG, J.; HO, H.; CHU, Y.; CHOW, C. Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. En: *Food Chemistry*. 2008, 110:128-136.
- ZHAO, Q.; GARREAU, I.; SANNIER, F.; PITOT, J. *Opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins*. En: *Biopolymers*. 1997, 43:75-98.
- ZHAO, Q.; PITOT, J.; GAUTIER, V.; GOTTENCEAU, G. Isolation and characterization of bacterial growth – stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate. *Appl. Microbiol.* En: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996, 45:778-784.

# Puesta a punto del método de PCR en tiempo real para la cuantificación de *Aspergillus carbonarius* en uvas *Vitis vinifera* cv. Tannat

Garmendia, G. <sup>(1)\*</sup>, Vero, S. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias. Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

Contacto: garmendia@fq.edu.uy

Recibido: 30/06/2011 - Aprobado: 7/11/2011

## Resumen

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina que ha sido detectada en uvas y vinos. Es producida por *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus carbonarius* y especies pertenecientes al agregado *Aspergillus niger*. En los últimos años se ha descrito la presencia de *Aspergillus aculeatus* y *Aspergillus japonicus* en la superficie de uvas y su capacidad de producir OTA. A pesar de que la concentración detectada de cepas pertenecientes a la Sección Nigri fue < 100/g de uva, se han aislado, identificado y caracterizado 56 cepas de *Aspergillus* pertenecientes a la Sección Nigri. El 51 % fue identificado como *A. niger*, el 39 % como *A. japonicus*, 5 % como *A. tubingensis*-like y 5 % como *A. foetidus*. Ninguna cepa de *A. carbonarius* fue aislada. Debido a que esta especie ha sido descrita como la principal responsable de la presencia de OTA en uvas y vinos por su capacidad de producir altas concentraciones de OTA, se requiere un método más sensible que los métodos convencionales para detectar y cuantificar la presencia de *A. carbonarius* en uva. En este trabajo se optimizó la técnica de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de esta especie en uvas de la variedad Tannat.

Palabras clave: Ocratoxina A, Sección Nigri, uva

## Abstract

Ochratoxin A has been detected in grapes and wines. It is produced by *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus carbonarius*, species belonging to *Aspergillus niger* aggregate. During the last years the presence of *Aspergillus aculeatus* and *Aspergillus japonicus* in grape surface and its ability to produce OTA has been reported. Our research group isolated, identified and characterized 56 *Aspergillus* strains; 51 % was identified as *A. niger*, 39 % as *A. japonicus*, 5 % as *A. foetidus*, and 5 % as *A. tubingensis* like. None *A. carbonarius* was isolated. This species have been reported as the principal source of OTA in wine grapes and wines due to its ability to produce high mycotoxin concentrations on fruit. Thus, a more sensitive method to quantify *A. carbonarius* would be important to ensure the absence of this pathogen in grape samples. In this work Real Time PCR for quantification of *A. carbonarius* in Tannat grapes was optimized.

Keywords: Ochratoxin A, Section Nigri, grape

## Introducción

Presentes como contaminantes de alimentos, las micotoxinas se han convertido en un gran problema para la salud humana y animal. En particular, la ocratoxina A (OTA) ha sido detectada en alimentos como cocoa, café, cereales y legumbres (Serra y Bonhevi, 2004; Vatinno et al., 2008; Mateo et al., 2007; Juan et al., 2008) y en bebidas como cerveza y vinos (Battilani et al., 2006; Chulze et al., 2006; Ponsone et al., 2007). Según Miraglia y Brera (2002), el vino es el segundo responsable de ingesta de OTA en Europa.

La OTA tiene efectos nefrotóxicos, carcinogénicos, teratogénicos e inmunosupresivos y ha sido asociada a la Nefropatía Endémica de los Balcanes (López de Cerain et al., 2000). A su vez, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer la ha clasificado dentro del grupo 2B, probable carcinogénico en humanos (IARC, 1993). Su principal mecanismo de acción es la inhibición de síntesis proteica. Compite con la fenilalanina en la unión con el ARN de transferencia, provocando la carencia de determinadas enzimas (López de Cerain et al., 2000).

La OTA es producida por especies de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. Dentro del género *Penicillium*, la única especie productora es *P. verrucosum* (Ostenfeld et al., 2001), mientras que dentro del género *Aspergillus* han sido descritas como productoras cepas de *A. ochraceus* y especies de la Sección *Nigri*, tanto monoseriadas (*A. japonicus* y *A. aculeatus*) como biseriadas (*A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. niger* y *A. brasiliensis*) (Abarca et al., 2004; Ponsone et al., 2007). Sin embargo, las cepas de la especie *A. carbonarius* son las principales causantes de la presencia de OTA en vinos, debido a su capacidad de producir altas concentraciones de esta toxina en uva (Bau et al., 2004; Serra et al., 2006).

En 2005 la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) estableció un límite máximo de 2 ppb para esta toxina en vino (Resolución CST 1/2002). Es por esto que la presencia de OTA en vinos uruguayos puede llegar a convertirse en una barrera no arancelaria, provocando una disminución en las exportaciones y, por consiguiente, una disminución en los ingresos del sector.

En 2006 nuestro grupo de investigación comenzó a estudiar la presencia de posibles cepas productoras de OTA en uvas para la



producción de vino. Se aislaron un total de 56 cepas de *Aspergillus* pertenecientes a la Sección *Nigri*. Estas cepas fueron identificadas fenotípica y molecularmente y caracterizadas respecto a su capacidad de producir OTA. Todas las cepas aisladas fueron productoras de OTA en las condiciones del ensayo, la mayoría pertenecientes a las especies *A. japonicus* y *A. niger*.

En ninguno de los casos las cepas de *Aspergillus* fueron flora predominante. Por el contrario, se puede decir que en la mayoría de los casos su concentración fue menor a 100ufc/g uva. Sin embargo, estos valores no eliminan el riesgo de presencia de OTA en vino, ya que, según Díaz et al. (2009), partiendo de un 0.5 % de uvas contaminadas con *Aspergillus carbonarius* se obtiene un vino con niveles de OTA que superan el límite máximo de contaminación aceptado por la OIV. Estas evidencias hacen necesario un método sensible para la cuantificación de inóculo sobre la uva utilizada como materia prima que permita predecir el riesgo de contaminación con OTA del vino que se elabora. Este trabajo plantea la puesta a punto de un método de PCR en tiempo real para la cuantificación de *A. carbonarius* sobre uva variedad Tannat. La investigación se centró en esta variedad dado que se trata de la uva emblemática de Uruguay y porque a nivel mundial no se han encontrado datos sobre el estudio de la contaminación de esta variedad de uva con cepas ocratoxigénicas.

## Materiales y Métodos

### 1. Cepas utilizadas

Para la puesta a punto del método de PCR en tiempo real se utilizó la cepa *Aspergillus carbonarius* CBS 111.26, perteneciente a la colección holandesa del Central Bureau voor Schimmelcultures (CBS). Las restantes cepas de la Sección *Nigri* utilizadas pertenecieron a las especies *A. niger*, *A. foetidus*, *A. tubingensis like* y *A. japonicus*. Estas cepas fueron aisladas de uvas uruguayas por este grupo de investigación e identificadas genotípicamente mediante secuenciación de la región ITS1-ITS2 y de parte del gen que codifica para la camodulina.

### 2. Extracción de ADN

Las cepas fueron cultivadas en 10mL de YES (2 % extracto de levadura, 15 % sacarosa) a 25 °C durante 5 días. Luego del tiempo de incubación una porción del micelio se trasvasó a un tubo de microcentrifuga estéril de 2mL y se molió hasta polvo fino en presencia de nitrógeno líquido utilizando una varilla de vidrio. A partir del micelio molido se extrajo el ADN total mediante la utilización del kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). El ADN obtenido se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8 % con bromuro de etidio como indicador. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook et al., 1989).

### 3. Puesta a punto de PCR en tiempo real para la cuantificación de *A. carbonarius*

El método de PCR en tiempo real se realizó de acuerdo a González Salgado (2010) y González Salgado et al. (2009). Los primers utilizados fueron QCarbo1 (5'- GGGCTTTGTCACATGCTCTGTA - 3') y QCarbo2 (5' - CTGGAAAAAAGGTTGGAGTTGTC - 3'), sintetizados por SBS Genetech Co., Ltd (Beijing, China). La reacción de PCR en tiempo real transcurrió en un volumen de reacción de 10 µL con 5 µL de mix Rotor gene SyBr Green PCR kit (Qiagen), 1 µL de cada primer de concentración 5 µM, 0.5 µL de agua miliQ estéril y 2.5 µL de ADN. El ciclo de amplificación consistió en un ciclo inicial de 10 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y

1 minuto a 60 °C. La reacción se llevó a cabo en un equipo RotorGene 6000, Corbett Life Science.

### 3.1. Especificidad de los primers por PCR convencional

Los primers Qcarbo1 y Qcarbo2 fueron enfrentados a las cinco especies de la Sección *Nigri* (*A. carbonarius*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. tubingensis-like* y *A. japonicus*) en una reacción de PCR de volumen final 25µL de acuerdo a las siguientes condiciones: 2,5 µL Buffer 10X (Fermentas International INC., Canada), 16,9 µL de agua miliQ estéril, 1 µL de cada primer 5 µM, 2,5 µL de dNTP 2 µM, 0,1 µL de Taq polimerasa (Fermentas International INC., Canada) 5u/ µL y 1 µL de ADN de concentración 90 ng/µL. El ciclo de amplificación consistió en 35 ciclos de 95 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min. La amplificación se realizó en un termociclador MultiGene Mini Labnet International, INC. (Edison, NJ, USA). El producto de PCR fue detectado mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8 % con bromuro de etidio como indicador. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook et al., 1989).

### 3.2. Curvas estándar

El ADN genómico de *A. carbonarius* fue cuantificado utilizando el fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen). Se realizaron diluciones seriadas en base diez de la solución del ADN genómico en agua. El rango de concentraciones utilizado fue entre  $2.7 \times 10^{-5}$  y 0.27 ng/µL. Para cada concentración de ADN se llevó a cabo la PCR en tiempo real. Paralelamente se realizó un blanco conteniendo agua miliQ estéril. Cada concentración de ADN se ensayó por triplicado. Para cada caso se determinó el Cycle threshold (Ct).

A partir de los valores de Ct de cada concentración se realizó una curva de calibración graficando Ct en función del logaritmo de la concentración de ADN. Se determinó la linealidad, la eficiencia y el rango dinámico.

### 3.3. Especificidad de los primers en PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real descrita anteriormente se realizó también para una cepa de *A. niger* y una cepa de *A. japonicus*. Para ambos casos, se cuantificó ADN genómico con el fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen) y se realizaron las diluciones correspondientes de forma de abarcar las mismas concentraciones de ADN ensayadas para la cepa de *A. carbonarius*. En ambos casos se incluyó un blanco y una concentración de *A. carbonarius* como control positivo. Se determinó Ct de cada concentración.

### 3.4. Influencia de la matriz PCR en tiempo real

Para el estudio de la matriz se ensayó la técnica de extracción de ADN para una muestra de 3g de uva Tannat. Al extracto obtenido se añadieron diferentes cantidades de ADN genómico de *A. carbonarius* y cada muestra se sometió a PCR en tiempo real. En paralelo se incluyó un blanco y diluciones realizadas con agua de forma de comparar los Ct obtenidos en cada caso y de esta forma determinar inhibición por la matriz.

## Resultados

Se comprobó la especificidad de los primers tanto en la PCR convencional como en la PCR en tiempo real. En el primer caso se observó amplificación de un fragmento de 66 pb sólo en el caso de *A. carbonarius*, en tanto que para las especies *A. niger* y *A. japonicus*

el Ct obtenido en PCR en tiempo real fue muy cercano al correspondiente al blanco. En la Figura 1 se observa la curva obtenida para dos concentraciones de *A. carbonarius* (0.27 ng -a-, y 0.0027ng -b-), las curvas obtenidas para las concentraciones del mismo orden de *A. niger* y *A. japonicus* y dos repeticiones del blanco (conjunto c). En la Tabla 1 se detallan varias concentraciones de *A. niger* y *A. japonicus* ensayadas y los Ct obtenidos, comparados con el blanco.

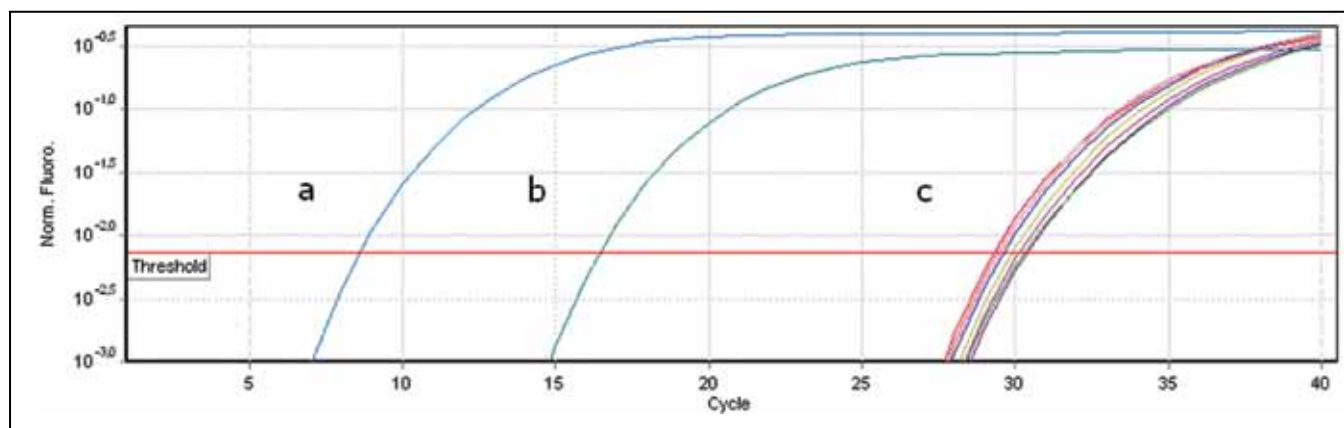


Figura 1. PCR en tiempo real para *A. carbonarius* (a y b), *A. japonicus* y *A. niger* (c)

ng ADN	Ct <i>A. niger</i>	Ct <i>A. japonicus</i>
0,12	27,1 ± 2,3	31,8 ± 3,7
0,012	30,8 ± 0,4	32,2 ± 3,7
0,0012	31,1 ± 2,71	32,3 ± 3,7
1,2 x 10 <sup>-4</sup>	33,4 ± 2,8	28,7 ± 1,3
blanco	29,5 ± 0,9	29,5 ± 0,9

Tabla 1. Comparación entre Ct *A. niger* y Ct *A. japonicus*

Las curvas estándar obtenidas para la cuantificación de *A. carbonarius* (Figura 2) presentaron una linealidad ( $r^2 = 0.997$ ) y eficiencia (107%) dentro de lo esperado. El rango dinámico se definió entre 0.27ng y  $2.7 \times 10^{-5}$ ng, ya que para cantidades de ADN superiores o inferiores la curva de calibración perdía linealidad. Las barras de error de la Figura 2 representan los intervalos de confianza de cada punto. En todos los casos el error no superó el 1.3 % del valor.

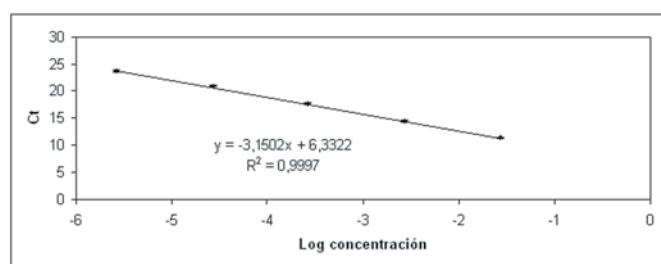


Figura 2. Curva estándar de cuantificación de *A. carbonarius*

La Tabla 2 muestra los resultados del análisis de la influencia de la matriz en el método. No se observó inhibición por la matriz en estudio en las condiciones del ensayo, ya que el Ct obtenido en presencia de extracto de uva fue similar al Ct obtenido en presencia de agua, y las diferencias de Ct se encontraron dentro del error del método.

ng ADN	Ct uva	Ct agua
0,27	11,42	11,35
0,0027	17,13	17,63
blanco	27,87	28,90

Tabla 2. Influencia de la matriz en la PCR en tiempo real.

## Discusión

El método puesto a punto fue específico para *A. carbonarius*. La fluorescencia generada con las especies *A. niger* y *A. japonicus* no mostró diferencias significativas con respecto al blanco, para todas las concentraciones ensayadas. Se postula que la fluorescencia generada a estos valores de Ct podría deberse a hibridación de primers.

Este resultado es de gran importancia, dado que las principales especies contaminantes de uva uruguaya resultaron *A. niger* y *A. japonicus* y, por ende, asegura que en uva no habrá cuantificación inespecífica en ausencia de *A. carbonarius*. Por otro lado, los primers utilizados en este ensayo fueron diseñados dentro de la región de ITS1-ITS2. La secuencia de esta región permite diferenciar entre *A. carbonarius*, el agregado *A. niger* y las especies monoseriadas de la Sección *Nigri*. El porcentaje de similitud entre las especies del agregado *A. niger* en esta región es cercano al 100 %, al igual que entre las especies de monoseriadas. Esto indicaría que si una especie perteneciente al agregado *A. niger* o una especie monoseriada de la Sección no genera fluorescencia durante la reacción de PCR en tiempo real, ninguna de las otras especies pertenecientes a cada grupo debería generarla. Es por este motivo que en el estudio de especificidad de los primers en la PCR en tiempo real se eligió un especie de cada grupo (*A. niger* y *A. japonicus*).

Con respecto a la eficiencia, para un método de PCR en tiempo real se espera que la misma esté entre 90 y 110 % (Rebrikov et al., 2006). En el caso de este trabajo la eficiencia se encontró dentro de este rango, por lo cual se puede inferir que la amplificación ha funcionado correctamente, sin interferencias. Con respecto al rango dinámico, el límite inferior del método fue de  $2.7 \times 10^{-5}$  ng. De acuerdo a Selma et al. (2008), una conidia de *A. carbonarius* contiene  $3.15 \times 10^{-5}$  ng de ADN, lo que permite afirmar que el límite mínimo de detección del método es menor a una conidia.

Por último, este método no presenta inhibición por la matriz; la fluorescencia generada en presencia de extracto de uva de la variedad Tannat es la misma que en presencia de agua, por lo que se trata de un método que podría ser aplicable para la cuantificación de *A. carbonarius* en uvas Tannat naturalmente contaminadas. El uso de este método haría posible predecir el riesgo de contaminación con OTA del vino elaborado a partir de la uva analizada, lo cual ayudaría a la bodega a tomar medidas preventivas a la hora de la elaboración.

## Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias a una Beca de posgrado LATU-Facultad de Química y PEDECIBA Química.

## Referencias

- ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F.J. Taxonomy and significance of black aspergilli. En: *Antonie van Leeuwenhoek*. 2004, 86:33-49.
- BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. En: *International Journal of Food Microbiology*. 2006, 111(1):S2-S4.
- BAU, M.; BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.L.; MINGUEZ, S.; CABAÑES, F.J. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. En: *International Journal of Food Microbiology*. 2004, 98(2):125-130.
- CHULZE, S.N.; MAGNOLI, C.E.; DALCERO, A.M. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. En: *International Journal of Food Microbiology*. 2006, 111(1):S5-S9

- DÍAZ, G.A.; TORRES, R.; VEGA, M.; LATORRE, B.A. Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. En: *International Journal of Food Microbiology*. 2009, 133(1-2):195-199
- GONZÁLEZ SALGADO, A. *Diagnóstico y control de especies de Aspergillus productoras de ocratoxina A*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2010. (Tesis Doctoral)
- GONZÁLEZ SALGADO, A.; PATIÑO, B.; GIL-SERNA, B.; VAZQUEZ, C.; GONZALEZ JAÉN, M.T. Specific detection of *Aspergillus carbonarius* by SYBr green and TaqMan quantitative PCR assays based on the multicopy ITS2 region of the rRNA gene. En: *FEMS Microbiological Letters*. 2009, 295 : 57-66
- IARC-INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human*. Paris: IARC, 1993. 56:489-521.
- JUAN, C.; MOLTÓ, J.C.; LINO, C.M.; MAÑES, J. Determination of ochratoxin A in organic and non organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. En: *Food Chemistry*. 2008, 107(1):525-530.
- LÓPEZ DE CERAIN, A.; JIMÉNEZ, A.M.; EZPELETA, O.; BELLO, J. Efectos tóxicos de la ocratoxina A. En: *Revista de Toxicología*: 2000, 17:61-69.
- MATEO, R.; MEDINA, A.; MATEO, E.M.; MATEO, F.; JIMÉNEZ, M. An overview of ochratoxin A in beer and wine. En: *International Journal of Food Microbiology*. 2007, 119 (1-2):79-83
- MIRAGLIA, M.; BRERA, C. *Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states*. Bruselas: Directorate-General Health and Consumer Protection, 2002. (Report on Tasks for Scientific Cooperation)
- OIV. *Resolución CST 1-2002 reducción de Ocratoxina A en los vinos*. Paris: OIV, 2002.
- OSTENFELD, L. T.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical characterization of Ochratoxin A-Producing Strains of the Genus *Penicillium*. En: *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, 67(8):3630-3635
- PONSONE, M.L.; COMBINA, M.; DALCERO, A.; CHULZE, S. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non organic systems. En: *International Journal of Food Microbiology*. 2007, 114:131-135.
- REBRIKOV, D.V.; TROFIMOV, D.Y. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. En: *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2006, 42(5):455-463.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MAGNATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2º ed. New York: CSHL, 1989
- SELMA, M.; MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.V.; AZNAR, R. Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. En: *International Journal of Food Microbiology*. 2008, 122:126-134.
- SERRA, R.; MENDOÇA, C.; VENÂCIO, A. Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. En: *Letters in Applied Microbiology*. 2006, 42:42-47.
- SERRA, R.; BONVEHI, J. Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. En: *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2004, 52(20):6347-6352.
- VATINNO, R.; ARESTA, A.; ZAMBONIN, C.G.; PALMISANO, F. Determination of Ochratoxin A in green coffee beans by solid-phase microextraction and liquid chromatography with fluorescence detection. En: *Journal of Chromatography A*. 2008, 1187(1):145-150.

# Las arañas en agroecosistemas: bioindicadores terrestres de calidad ambiental

Simó, M. <sup>(1)\*</sup>, Laborda, A. <sup>(1)</sup>, Jorge, C. <sup>(1)</sup>, Castro, M. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Sección Entomología. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

Contacto: simo@fcien.edu.uy

Recibido: 23/06/2010 - Aprobado: 28/04/2011

## Resumen

Las arañas son predadores generalistas en ecosistemas terrestres, ampliamente utilizadas en estudios de biodiversidad. En el último siglo, el paisaje de Uruguay se transformó en un mosaico de áreas formadas por ambientes naturales y agroecosistemas. ¿Qué nivel de cambio se espera hallar en la comunidad de arañas si las áreas de estudio están próximas? ¿Qué porcentaje de especies nativas serán reemplazadas con la plantación? ¿Cómo afecta esto a la biodiversidad local? Se realizó un estudio en cuatro áreas vecinas en INIA Las Brujas, Canelones: un bosque ribereño, un bosque de "Espinillo", una plantación de *Eucalyptus globulus* y una pradera artificial de *Trifolium pratense* y *Avena sativa*. Las arañas fueron capturadas con trampas de caída, trampas de tronco, segado, batido de follaje y colecta manual nocturna. Un total de 3.023 adultos fueron colectados. La mayor abundancia y riqueza de especies se observó en el bosque ribereño. A pesar de la proximidad de los sitios estudiados, se observó un alto reemplazo de especies, especialmente entre áreas naturales y agroecosistemas. Los protocolos de colecta utilizados podrían ser útiles para evaluar el impacto de agroecosistemas con diferentes tipos de manejos sobre la biodiversidad local y su aplicación en la certificación de calidad ambiental.

Palabras clave: Diversidad, artrópodos, producción agropecuaria, impacto antrópico.

## Abstract

Spiders are common generalist predators in terrestrial ecosystems, broadly used in diversity studies. The landscape of extensive areas of Uruguay was transformed in a mosaic of patches between natural habitats and agroecosystems. What level of change in the spider community could we expect if these areas are situated near from one another? What percentage of the native species are replaced after the plantation? How this affects the local biodiversity? A study was carried out in four neighboring areas in INIA Las Brujas, Canelones: a riparian forest, an "Espinillo" forest, an *Eucalyptus globulus* plantation and an artificial prairie of *Trifolium pratense* and *Avena sativa*. Spiders were captured with pitfall traps, trunk traps, sweep netting, beating and by nocturnal hand collection. A total of 3.023 adults were collected. Higher values of abundance and species richness were observed in the riparian forest. In spite of the proximity between the studied areas, a high level of replacement of species was observed, especially between natural areas and agroecosystems. The collecting protocols used could be useful to evaluate the impact of different managements of agroecosystems in the local biodiversity and its application in environmental quality certification.

Keywords: Diversity, arthropods, farming production, anthropic impact.

## Introducción

Las arañas son artrópodos que constituyen el séptimo grupo en riqueza específica conocida a nivel mundial con unas 42.055 (Platnick, 2011) especies descritas hasta el momento. Viven en casi todos los ecosistemas terrestres, sin reportes aún en la Antártida. Son predadores generalistas y su dieta está compuesta principalmente por otros artrópodos, tales como insectos y arácnidos. En las últimas décadas se ha estudiado su rol como controlador biológico de plagas en agroecosistemas, teniendo en cuenta la gran abundancia y riqueza específica de arañas en la biomasa animal de invertebrados de los cultivos. Por constituir un grupo megadiverso y ser fáciles de hallar, son sujetos de estudio para la estimación de la diversidad biológica así como en la conservación y calidad medioambiental (Coddington et al., 1996; Cristofoli et al., 2010).

### Las arañas como grupo bioindicador

Un bioindicador es una especie o grupos de especies que refleja el estado abiótico y biótico de un ambiente, es sensible a los cambios ambientales en el ecosistema donde habita y es indicativo

de la diversidad de un taxón de un lugar determinado (McGeoch, 1998). Otros criterios utilizados para definir un taxón bioindicador comprenden: buen conocimiento de su taxonomía e historia natural, facilidad para observar y manipular, pertenencia a un grupo con amplia distribución geográfica, sensibilidad a cambios del ambiente y patrones de biodiversidad reflejados sobre otros taxones (géneros o especies) (Pearson, 1994; Halffter et al., 2000). En tanto son predadores generalistas, las arañas se ubican en niveles intermedios de las cadenas tróficas y es importante su rol como predadores de herbívoros (Young y Lockley, 1985). Existen especies de arañas asociadas a ambientes con cierto grado de modificación. Algunas arañas se relacionan con ambientes urbanos y son indicadoras de impacto antrópico, habitan dentro de la vivienda humana o en el peridomicilio. Otras especies se benefician de la actividad humana para ampliar su dispersión geográfica y adaptarse a nuevos ambientes con gran facilidad, constituyéndose en especies introducidas o también invasoras que suelen desplazar a las nativas, generando posteriormente una pérdida de biodiversidad en el ambiente. Por tanto, desde hace un tiempo existe gran interés en la utilización de las arañas para el monitoreo ambiental y para el establecimiento de medidas de prevención (Taylor y Doran, 2001). La identificación de especies indicadoras requiere de estudios previos básicos de

diversidad biológica. En el caso de Uruguay la araneofauna de muchos ambientes nativos del país es desconocida, al igual que la de zonas con mayor impacto humano.

## Las arañas en agroecosistemas

El estudio de las arañas en agroecosistemas se desarrolló a partir del interés que plantea este grupo como posibles controladores de plagas (Nyffeler y Sutherland, 2003). Los grupos funcionales o gremios representan diferentes grupos de arañas que disponen de determinados mecanismos para la obtención de los recursos. En los estudios de la araneofauna de agroecosistemas, la identificación de los gremios predominantes permite conocer las principales estrategias de captura de la comunidad y en particular de aquella que resulta importante para establecer el control biológico. Las arañas tejedoras representan a gran parte de la comunidad de un cultivo y son las mejores a la hora de seleccionar un controlador biológico. Pero existen otros gremios como las arañas errantes del suelo, las errantes de vegetación y las cazadoras al acecho en vegetación que conforman la comunidad de arañas.

La superficie de Uruguay, sobre la que se realiza una gran producción agropecuaria, representa un mosaico de agroecosistemas. El relativamente pequeño tamaño y la alta diversidad paisajística convierten al país en un lugar muy acorde para estudiar la araneofauna en diversos ambientes. El primer estudio de arañas en agroecosistemas en Uruguay fue realizado en la década de 1990 en una huerta orgánica de Montevideo (Viera y Simó, 1996) y posteriormente se realizó otro en plantaciones de limón (Benamú Pino, 2005); ambos apuntaron a indicar las especies presentes en dichos ambientes. El desarrollo de la arcnología en el país en los últimos 10 años, así como el avance de la investigación científica basado en planes de posgrado ha llevado a que el estudio de las arañas en agroecosistemas se constituya en breve en una de las principales líneas de investigación en este grupo. Teniendo en cuenta que las arañas componen un grupo megadiverso, con metodologías relativamente sencillas para el muestreo y con una importante abundancia en las colectas, es posible emplearlas como grupo o taxa indicador de la biodiversidad local o regional. Esto permite evaluar de qué forma una práctica agrícola puede incidir en mayor o menor grado con el mantenimiento de la diversidad local de arañas y ser un elemento medible y comparativo para estimar la conservación de la biodiversidad (Haughton et al., 1999; Pinkus et al., 2006).

## Análisis de un estudio realizado en INIA Las Brujas

Tomando como punto de partida el mosaico de ambientes naturales y agroecosistemas que presenta Uruguay, se realizó un estudio para conocer el grado de recambio en la araneofauna producida por los agroecosistemas sobre los ambientes naturales circundantes. Las preguntas respondidas fueron: ¿qué grado de reemplazo de especies de arañas presentaban entre sí estos cuatro ambientes? y ¿qué especies se pueden considerar más representativas de la taxocenosis en los agroecosistemas?

## Materiales y Métodos

El estudio se realizó en un área de amortiguación del Parque Natural INIA Las Brujas (34°39'44''S; 56°20'19''W, Google Earth, 2009), entre 2004 y 2005, enmarcado en la zona de conservación de los Humedales del Santa Lucía.

Se analizaron dos áreas naturales, testigos del ambiente original de la zona, un bosque ribereño y un área de bosque parque de *Acacia caven* (Espinillo) y dos agroecosistemas contiguos: una pradera artificial (*Avena sativum* y *Trifolium pratense*) y una plantación de *Eucalyptus globulus* de 11 años (Figuras 1 y 2).

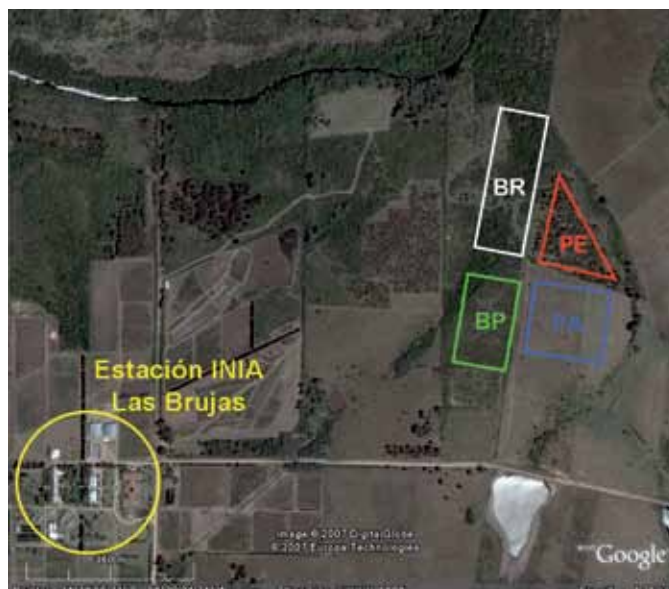


Figura 1. Imagen aérea de las zonas de muestreo. PA: plantación de avena; PE: plantación de *Eucalyptus globulus*; BP: bosque parque "Espinillar" y BR: bosque ribereño.

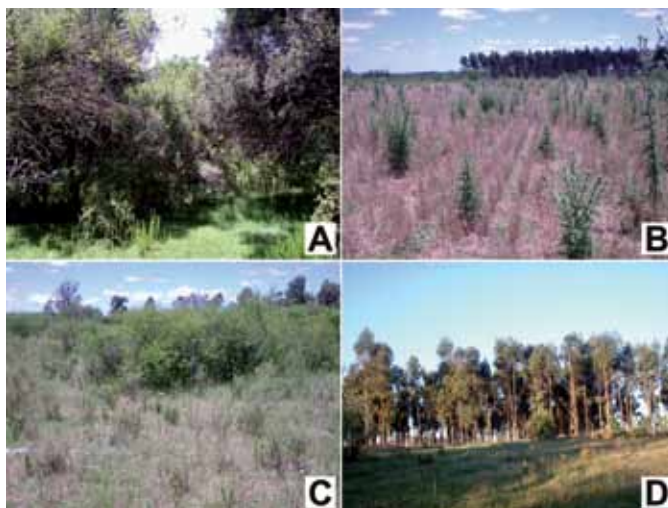


Figura 2. Vistas de las zonas de estudio. A: bosque ribereño; B: plantación de avena; C: bosque parque; D: plantación de *Eucalyptus globulus*.



Figura 3. Trampa de tronco en *Eucalyptus globulus*.

El estudio abarcó muestreos en las cuatro estaciones del año. En cada muestreo se emplearon métodos de recolección directos e indirectos. Los directos consistieron en 10 muestras de 10 pases de segado con red entomológica, 10 recolecciones de batido de follaje con una intensidad de 10 golpes por muestra y colecta manual nocturna durante 15 minutos en la que participaron 3 a 4 recolectores. Los métodos indirectos empleados fueron: 5 trampas de caída ubicadas cada 10 metros en cada zona de estudio y 5 trampas de tronco en la plantación de *Eucalyptus* y en el bosque ribereño. Las trampas fueron controladas cada 15 días durante todo el período de estudio. Se calcularon la riqueza, equitatividad y diversidad de cada área. La riqueza se evaluó en base al número de especies constatadas. La equitatividad se estableció de acuerdo a la proporción relativa en la que cada una de las especies está presente en cada sitio estudiado. La diversidad fue analizada mediante el índice de Shannon, el cual expresa un valor que relaciona el número de especies con sus abundancias relativas. Para el cálculo de estos valores se utilizó el programa Biodiversity Pro 2.0 (Mc Alece, 1997). La similaridad de la araneofauna entre las zonas de estudio fue analizada mediante el índice de Jaccard con el programa Simil & Divers (Fanja, 1993). Este índice estima la similaridad cualitativa en base a la presencia de especies compartidas entre las zonas de estudio.

## Resultados

Las mayores abundancias de arañas se registraron en el bosque ribereño y la pradera artificial (Figura 4). En cuanto a la riqueza específica, el bosque ribereño presentó el valor más alto (86 especies) y el menor correspondió al bosque parque (60 especies). Los mayores valores de equitatividad se registraron en la plantación de *E. globulus* (0.77) y en el bosque parque (0.72), y las menores en el bosque ribereño (0.63) y en la pradera artificial (0.61).

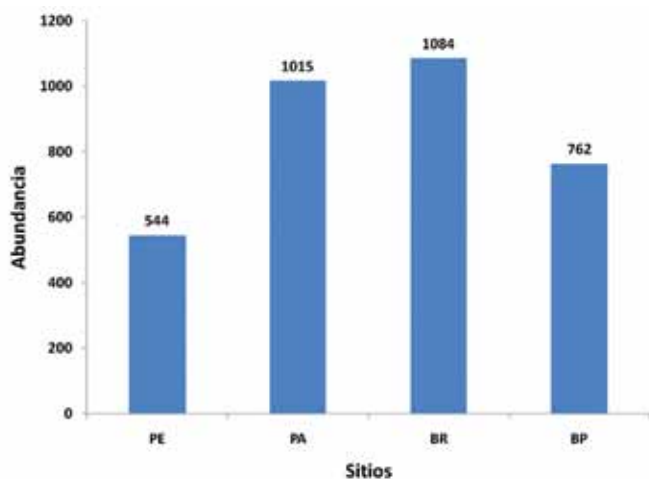


Figura 4. Abundancias de las arañas por zonas de muestreo. BR: bosque ribereño; BP: bosque parque "Espinillar"; PE: plantación de *Eucalyptus globulus*; PA: plantación de pradera artificial (*Avena sativa* y *Trifolium pratense*).

El bosque ribereño mostró también una mayor predominancia del gremio de las arañas tejedoras; las de telas irregulares fueron las que presentaron mayor número de especies en todos los ambientes estudiados.

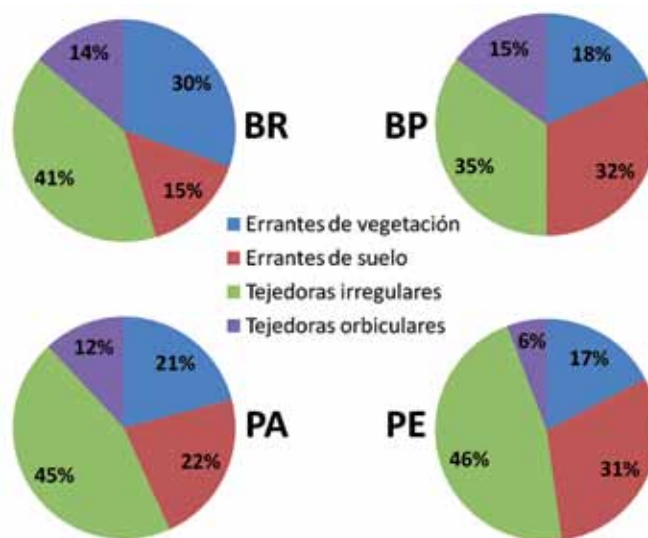


Figura 5. Representación de los gremios de arañas en cada una de las zonas de estudio. BR: bosque ribereño. BP: bosque parque "Espinillar". PE: plantación de *Eucalyptus globulus*. PA: plantación de pradera artificial (*Avena sativa* y *Trifolium pratense*).



Figura 6. *Badumna longinqua* sobre tronco de *Eucalyptus globulus*.

De un total de 3.023 arañas adultas recolectadas, *Badumna longinqua* (L. Koch, 1867) (Desidae) se halló exclusivamente sobre los troncos de la plantación de *Eucalyptus*. Otra especie común en los troncos fue *Polybetes pythagoricus* (Holmberg, 1875) (Sparassidae) y *Scolecuroa propinqua* (Millidge, 1991) (Linyphiidae) fue abundante sobre el suelo en la plantación. En la pradera artificial, *Oxyopes salticus* (Hentz, 1845) fue una de las especies mejor representadas en el muestreo.

La Tabla 1 expresa que la similaridad entre los ambientes estudiados, basada en datos cualitativos de ausencia y presencia, fue relativamente baja, ubicada entre el 24 % y 43 %.

Jaccard	BP	PA	PE
BR	0,33	0,24	0,36
BP		0,37	0,40
PA			0,43

Tabla 1. Índice de similaridad de Jaccard entre las zonas de estudio. Abreviaturas: BP: Bosque parque; PA: plantación de *Avena sativum*; PE: plantación de *Eucalyptus globulus*; BR: bosque ribereño.

## Discusión y Conclusiones

Estudios como el de Avalos et al. (2007) han demostrado que las arañas son buenos indicadores de impacto ambiental, debido a su sensibilidad a los cambios ambientales naturales y antrópicos. La sustitución de los ambientes naturales por agroecosistemas genera un recambio de especies en la comunidad de arañas local. En el estudio desarrollado, el bosque ribereño presentó el mayor número de especies, por lo que su conservación permitiría contribuir a mantener la diversidad local de este grupo. El establecimiento de medidas de conservación de los ambientes naturales de la zona de estudio, en este caso el bosque ribereño y el bosque parque de Espinillar, sería una estrategia adecuada para la conservación de la diversidad biológica local, tomando como grupo indicador las arañas. La mayor riqueza específica hallada en el bosque ribereño, así como el predominio de arañas tejedoras serían debidas a la mayor heterogeneidad espacial que presenta este ambiente nativo. Esta cualidad propicia la presencia de una mayor oferta de microhábitats, mayor soporte y refugio para el establecimiento de las especies. La mayor diversidad hallada en la plantación de *E. globulus* se explicaría por tratarse de la zona con mayor valor de equitatividad.

La araña pollito *Acanthoscurria suina* Pocock, 1903 que vive en nidos subterráneos (Pérez-Miles et al., 2005), sólo se encontró en los ambientes naturales. Su ausencia en los cultivos podría deberse a los cambios del suelo, como la presencia del manto de hojarasca en la plantación de *E. globulus*, o a su sensibilidad a los manejos agrícolas, como la acción de rotativas en la pradera artificial. Debido a ello esta especie podría ser considerada como buen indicador de impacto antrópico. Si bien las áreas cultivadas comparten un porcentaje de especies en común con las áreas naturales contiguas, se apreció que los cultivos permiten el establecimiento de nuevas especies como respuesta al cambio ambiental. Este estudio posibilitó conocer que el mosaico de ambientes estudiados, a pesar de ubicarse contiguos unos con otros, presentó una baja similaridad y, por tanto, un alto reemplazo de especies entre ellos. A pesar de diferir en el porte vegetal, la mayor similaridad a nivel de la araneofauna hallada entre las plantaciones de *E. globulus* y la pradera artificial sería respuesta a la presencia de especies asociadas al impacto humano. *Oxyopes salticus* fue una de las especies mejor representadas en el estrato herbáceo de las zonas estudiadas. Esta especie ha sido reportada como muy importante en el control de plagas agrícolas, especialmente estadios larvales de Lepidópteros en cultivos de algodón, soja, sorgo, alfalfa y arroz, y ha demostrado ser resistente a la aplicación de algunos insecticidas (Young y Lockley, 1985).

La presencia de dos arañas invasoras como *B. longinqua* y *Ostearius melanopygius* (Linyphiidae) en los agroecosistemas representa la colonización por especies oportunistas que pueden llegar a competir con las especies nativas, por lo que sería de interés su monitoreo y control. La modificación de ciertas prácticas en los cultivos permitiría minimizar el efecto negativo sobre la diversidad local. Estudios futuros podrían estar enfocados al posible papel de los agroecosistemas como

reservorios de especies de arañas nativas y corredores faunísticos entre los ambientes naturales. De esta manera el conocimiento de la comunidad de arañas puede ser utilizado para evaluar el impacto que los agroecosistemas producen en las comunidades biológicas nativas y constituirse en nuevos recursos de aporte de información para la certificación ambiental de las prácticas agrícolas.

## Reconocimientos

Al Ing. Agrónomo Oscar Blumetto de la Estación INIA Las Brujas por el apoyo al proyecto y en las gestiones para los estudios a campo. A la flia. Fernández, propietaria de uno de los sitios donde se realizaron los muestreos. A la Prof. Mag. Lucía Rodríguez por su ayuda para la elección del área de estudio. A Mónica Rodríguez, María Eugenia Rodríguez, Nadia Falero, Marcos Llhan, José Rodríguez y Clemente Olivera por la colaboración en los trabajos de campo. A Marcelo Dias y a un revisor anónimo por los aportes y comentarios al manuscrito.

## Referencias

- AVALOS, G.; RUBIO, G.; BAR, M.; GONZÁLEZ, A. Arañas (Arachnida: Araneae) asociadas a dos bosques degradados del Chaco húmedo en Corrientes, Argentina. En: *Revista de Biología Tropical*. 2007, 55(3-4):899-909.
- BENAMÚ PINO, M. A. *Estudio comparativo de la diversidad de arañas de un campo en abandono y un cultivo convencional de limonero (Citrus limon [L.] Burm.) en Rincón del Cerro, Montevideo, Uruguay*. Montevideo: Facultad de Ciencias; PEDECIBA, 2005. (Tesis de Maestría).
- CODDINGTON, J.; YOUNG, L.; COYLE, F. Estimating spider species richness in a Southern Appalachian Cove Hardwood Forest. En: *Journal of Arachnology*. 1996, 24(2):111-125.
- CRISTOFOLI, S.; MAHY, G.; KEKENBOSCH, R.; LAMBEETS, K. Spider communities as evaluation tools for wet heathland restoration. En: *Ecological Indicators*. 2010, 10:773-780.
- FRANJA. *Programa índice de diversidad (divers.exe) y medidas de similitud (simil.exe)* [En línea]. [s.l.]: Franja, 1993. [Consulta 4 de marzo de 2010]. Disponible en: <http://www.perso.wanadoo.es/Jp-L/descargas.html>
- GOOGLE INC. *Google Earth (Version 5.0.11733.9347)* [En línea]. [s.l.]: Google Inc, 2009. [Consulta: 3 de diciembre de 2009]. Disponible en: <http://earth.google.es/download-earth.html>
- HALFFTER, G.; MORENO, C. L.; PINEDA, E. O. Manual para evaluación de la biodiversidad en Reservas de la Biosfera. En: *Manuales & Tesis*. 2001, 2:1-77.
- HAUGHTON, A.; BELL, J.; BOATMAN, N.; WILCOX, A. The effects of different rates of the herbicide glyphosate on spiders in arable field margins. En: *The Journal of Arachnology*. 1999, 27:249-254.
- MC ALEECE, N. *Biodiversity Professional 2.0*. [En línea]. [s.l.]: The Natural History Museum; The Scottish Association for Marine Science, 1997. [Consulta 4 de marzo de 2010]. Disponible en: <http://www.sams.ac.uk/research/software>
- MCGEOCH, M. A. The selection, testing and application of terrestrial insects as bioindicators. En: *Biological Reviews*. 1998, 73:181-201.
- NYFFELER, M.; SUTHERLAND, K. Composition, abundance and pest control potential of spider communities in agroecosystems: a comparison of European and U. S. studies. En: *Agriculture Ecosystems Environment*. 2003, 95:579-612.

- PEARSON, D.L. Selecting Indicator Taxa for the quantitative assessment of Biodiversity. En: *Philosophical Transaction of The Royal Society of London, Series B : Biological Sciences*. 1994, 345 :75 -79.
  - PÉREZ-MILES, F.; COSTA, F. G.; TOSCANO-GADEA, C.; MIGNONE, A. Ecology and behaviour of the “road tarantulas” *Eupalaestrus weijenberghi* and *Acanthoscurria suina* (Araneae, Theraphosidae) from Uruguay. En: *Journal of Natural History*. 2005, 39(6):483-498.
  - PINKUS RENDÓN, M.; IBARRA-NÚÑEZ, G.; PARRA-TABLA, V.; GARCÍA-BALLINAS, J.; HÉNAUT, Y. Spider diversity in coffee plantations with different management in Southeast Mexico. En: *The Journal of Arachnology*. 2006, 34:104–112.
  - PLATNICK, N. I. *The World spider catalog, version 11.5* [En línea]. New York: American Museum of Natural History, 2011. [Consulta: febrero, 2011]. Disponible en: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>
  - TAYLOR, R. J.; DORAN, N. Use of terrestrial invertebrates as indicators of the ecological sustainability of forest management under the Montreal Process. En: *Journal of Insect Conservation*. 2001, 5:221-231.
  - VIERA, C.; SIMÓ, M. La comunidad de arañas epigeas de un agroecosistema orgánico de Uruguay (Araneae). Comunicación Preliminar. En: *Actas Resúmenes 21º Congresso Brasileiro de Zoología*. Porto Alegre: Brasil, 1996. pp. 35.
  - YOUNG, O. P.; LOCKLEY, T. The striped lynx spider, *Oxyopes salticus* (Araneae : Oxyopidae), in agroecosystems. En: *Entomophaga*. 1985, 30(4):329-346.
-



# Triterpenoides de frutos de *Melia azedarach*: su potencial como agentes de control de insectos

Díaz, M. <sup>(1,2,3)</sup>, Rossini, C. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, República Oriental del Uruguay - <sup>(2)</sup> Instituto de Ciencias Agrarias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España - <sup>(3)</sup> Instituto de Productos Naturales y Agrobiología de Canarias, IPNA-CSIC, España.

Contacto: martinadiaz@fq.edu.uy

Recibido: 25/03/2011 - Aprobado: 9/11/2011

## Resumen

*Melia azedarach* L. (Meliaceae) es nativa de Asia pero ha sido naturalizada en muchas partes del planeta. Variados compuestos bioactivos estructuralmente complejos fueron aislados de especímenes asiáticos. Este estudio tuvo como objetivo determinar la actividad anti-insecto de extractos orgánicos de frutos de *M. azedarach* de especímenes uruguayos y elucidar las estructuras de los compuestos activos.

El fraccionamiento sistemático de extractos etanólicos llevó a la obtención de una fracción rica en limonoides con actividad contra diferentes insectos modelo. Mostró fuerte deterrencia frente a larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) y adultos de *Epilachna paenulata* (Coleoptera: Coccinellidae) en bioensayos de opción. Además, inhibió el asentamiento de *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae). Sin embargo, no mostró toxicidad por contacto contra adultos de *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae).

Dos compuestos nunca antes reportados en esta especie vegetal y tres previamente reportados pero nunca antes testados contra los insectos nombrados fueron aislados de la fracción.

En síntesis, una fracción rica en triterpenoides del extracto etanólico de frutos de *M. azedarach* mostró potencial variable contra las diferentes especies de insectos plaga modelo, enfatizando así la importancia de testar los potenciales agentes biocontroladores contra diferentes insectos blanco.

Palabras clave: Limonoides, Paraíso, *Epilachna paenulata*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, *Spodoptera littoralis*.

## Abstract

*Melia azedarach* L. (Meliaceae) is native from Asia but it has been naturalized worldwide. Several structurally complex bioactive compounds have been isolated from Asian specimens. This study aimed to determine the anti-insect activity of organic extracts of *M. azedarach* fruits from Uruguayan populations, and to structurally elucidate the active compounds.

Systematic fractionation of ethanolic extracts led to a triterpenoid-rich fraction, with strong activity against different insect models. For instance, it was strongly deterrent against larvae of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) and adults of *Epilachna paenulata* (Coleoptera: Coccinellidae) in choice experiments. Besides, the same fraction showed settling inhibition activity on *Myzus persicae* and *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae). Such fraction showed no contact toxicity against adults of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae).

Two compounds never reported for this vegetal species and three previously reported but never evaluated against those insect species, were isolated from that fraction.

On the whole, a triterpenoid fraction from the ethanolic extract of fruits of *M. azedarach* has been evaluated on its anti-insect activity, showing variable potential against different insect pest models, emphasizing the value of testing potential biocontrol products against different insect targets.

Keywords: Limonoids, Paraíso, *Epilachna paenulata*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, *Spodoptera littoralis*.

## Introducción

El aumento de la población mundial ha generado la necesidad de incrementar los rendimientos de la producción primaria, lo que a su vez ha ocasionado un aumento del uso de plaguicidas convencionales para controlar las especies plagas. Sin dudas, su uso es efectivo en el corto plazo, pero no es sostenible en el largo plazo, debido al desarrollo de mecanismos de resistencia en dichas especies y a los efectos adversos en el medio ambiente, tanto desde el punto de vista biótico como abiótico. Por estos motivos existe actualmente una tendencia, aun en la producción convencional, a utilizar alternativas a los plaguicidas de síntesis (como parte de lo que se denomina mundialmente Manejo

Integrado de Plagas). Asimismo, se ha intensificado paulatinamente el uso de prácticas alternativas de producción, tales como la llamada "producción orgánica", en la que se tiende a adoptar medidas de control amigables con el medio ambiente, excluyendo el uso de los plaguicidas sintéticos. Se hace por lo tanto necesario contar con opciones, entre las cuales una posibilidad son los productos naturales derivados de plantas ("plaguicidas botánicos").

El árbol de Paraíso, *Melia azedarach* L. es nativo de Persia, India y China, pero naturalizado en África, Australia y las Américas. El uso de esta especie ornamental con fines medicinales ha sido previamente estudiado (Chinese Pharmacopeia, 2005; Everist, 1974; Hurst, 1942; Watt et al., 1962). Además, esta especie ha mostrado poseer actividad anti-insecto. Han sido descritas propiedades deterrentes de

oviposición e ingesta, reducción del crecimiento y toxicidad contra diferentes especies de Lepidópteros, Coleópteros (Carpinella et al., 2006) y Dípteros (Coria et al., 2008), no solamente en sus extractos crudos, sino también de algunos constituyentes puros.

Este estudio tuvo como objetivo determinar la actividad anti-insecto de extractos orgánicos de frutos de *M. azedarach* de especímenes uruguayos y elucidar las estructuras de los compuestos activos.

## Materiales y Métodos

### Material vegetal

Los frutos maduros de *M. azedarach* fueron colectados en Montevideo, Uruguay, en julio de 2008. Fueron secados durante 48 – 72 h a 40 °C antes de la molienda y extracción.

### Extracción y aislamiento

Los frutos secos (716 g) fueron molidos y extraídos con hexano en caliente (1300 mL, temperatura ambiente, x 3) antes de la maceración etanólica (1300 mL etanol, temperatura ambiente, 24 h, x 3). El extracto etanólico de frutos (EE frutos) fue concentrado y disuelto en metanol/agua (95:5), para ser particionado con hexano y luego acetato de etilo (AcOEt). El extracto AcOEt (8,8 g) fue fraccionado por cromatografía flash, eluyendo con AcOEt, de lo que se obtuvieron 8 fracciones. Las fracciones 2 y 3 (4,3 g) fueron sometidas a otra cromatografía flash eluida con cloroformo/acetonitrilo desde 6:1 a 6:2 para obtener 14 fracciones (F1 - F14).

De la fracción 4 (0.57 g) fueron aislados: 3 (1 mg), 4 (< 1 mg) y 5 (< 1 mg) y de las fracciones 5-7 (1.14 g) fueron aislados: 1 (27 mg), 2 (3.7 mg), 5 (5 mg) y otras fracciones que mostraron ser mezclas de aquellos compuestos, así como los mismos en bajo grado de pureza (ej.: mezcla 5+3); se realizaron sobre todos ellos análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) mono y bidireccionales y de Espectrometría de Masas de Alta Resolución (EM).

Asimismo, fue obtenido un extracto etanólico de frutos y fraccionado, siguiendo un protocolo muy similar al anteriormente descrito. En esa instancia se obtuvo un extracto rico en limonoides (E lim); los estudios en TLC, HPLC y RMN mostraron una alta concentración de este tipo de compuestos.

### Colonias de insectos

Los adultos de *Epilachna paenulata* Germar (Coleoptera: Coccinellidae) (especialista en cucurbitáceas) fueron mantenidos sobre plantas de zapallo (*Cucurbita pepo* L.) bajo condiciones controladas de temperatura (20 ± 2 °C) y fotoperíodo (14L:10O) (Luz:Oscuridad) (Bellomo et al., 2009). En el caso de *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae), ninfas y adultos fueron mantenidas por separado, alimentados con chauchas y germinadores de lentejas, a 25 ± 1 °C, > 70 % humedad relativa ambiente y con un fotoperíodo controlado (16L:8O). Ambos insectos fueron criados y utilizados en el Laboratorio de Ecología Química, Uruguay.

Las larvas de *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae) (generalista) fueron mantenidas con dieta artificial (Poitout et al., 1974) a 25 ± 1 °C, > 70 % humedad relativa ambiente y fotoperíodo controlado (16L:8O). Los adultos de *Rhopalosiphum padi* L. (Hemiptera: Aphididae) (especialista en gramíneas) y de *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) (generalista) fueron mantenidos sobre plantas de *Hordeum vulgare* L. a 20 ± 1 °C y *Capsicum annuum* L. a 25 ± 1 °C, respectivamente. Ambas colonias a > 70 % humedad relativa ambiente y con fotoperíodo controlado (16L:8O). Estos tres insectos fueron mantenidos y utilizados en Instituto de Ciencias Agrarias de Madrid, España.

## Bioensayos

Los bioensayos con insectos masticadores (*E. paenulata* y *S. littoralis*) se realizaron en placas de Petri (9 cm × 1 cm) cubiertas con agar (2 %). A los insectos se les ofreció, luego de hambreados por 3 h y en forma individual, cuatro discos de hojas (1 cm<sup>2</sup>) de su planta hospedera (*C. pepo* y *C. annuum* para *E. paenulata* y *S. littoralis*, respectivamente). Dos de los discos (T) se trataron con 100 µg del extracto o 50 µg de los productos puros (10 µL de una solución metanólica al 10 % o 5 %), y los otros dos (C) con 10 µL de metanol. Se realizaron 10-15 réplicas para adultos de *E. paenulata* (5 a 10 días de edad) y 6 réplicas para larvas L4 de *S. littoralis* (cada réplica consistió en una placa con un insecto y los cuatro discos de hojas). Se registraron visualmente –en intervalos de 1/16– el área consumida de discos en cada placa y luego fue calculado un Índice de Preferencia usando la fórmula:  $IP = (C - T)/(C + T)$ , donde C y T son las cantidades consumidas de control y tratado (Bellomo et al., 2009) tras 3 h de ensayo o cuando había sido consumido el 75% de uno de los casos.

Los bioensayos con áfidos (*M. persicae* y *R. padi*, 20 réplicas de 10 áfidos cada una por especie de insecto) fueron realizados en cajas (3 × 3 × 1.5 cm) cubiertas con agar (2 %) que contenían dos trozos de hojas (1 cm<sup>2</sup>) de las plantas hospederas (*C. annuum* y *H. vulgare* para *M. persicae* y *R. padi*, respectivamente) sobre una de las cuales se había aplicado previo al ensayo el extracto (T, 100 µg/cm<sup>2</sup>), y sobre la otra la misma cantidad de disolvente (metanol, 10 µL, C). En cada caja se colocaron 10 áfidos, y se registró el porcentaje de áfidos asentados en la superficie de cada hoja luego de 24 h, de acuerdo a lo reportado en trabajos anteriores (Castillo et al., 2009; Guitiérrez et al., 1997). “Asentados” fueron posados quietos sobre las hojas. Dado el tamaño tan pequeño de estos insectos no se puede constatar visualmente si se están alimentando o no, pero se sabe que si se posan es porque han pasado por las primeras etapas de selección de la comida, y que una vez posados (cuando la detección periférica ha funcionado como elemento decisivo positivo) el siguiente paso corresponde al comienzo de los comportamientos estereotipados que llevan a la ingesta. Un Índice de Preferencia se calculó como  $IP = (\%C - \%T)/(\%C + \%T)$ , donde % T y % C son los porcentajes de áfidos asentados en las superficies T y C.

El bioensayo de toxicidad contra chinches fue realizado en viales cilíndricos de vidrio cuyas paredes fueron empapadas con las soluciones etanólicas a testar (N = 5 para cada caso), siguiendo las directivas de “The Insecticide Resistance Action Committee” (IRAC, 2006). Luego de evaporado el disolvente se introdujo un adulto en cada vial y se registró la sobrevivencia de los mismos a las 24 y 48 h. Se utilizó viales empapados en etanol como control negativo y viales empapados (6,3 × 10<sup>-3</sup> mg/cm<sup>2</sup>) en solución de Engeo 247 C (Thiametoxam 14 g - Lambda-cihalotrina 14:11 % p/v) como control positivo. Fueron testadas varias concentraciones de EE frutos y E lim; 25 mg/cm<sup>2</sup> y 0,6 mg/cm<sup>2</sup> fueron las mayores cantidades testadas en uno y otro caso.

### Análisis estadísticos

Los datos obtenidos de los bioensayos fueron analizados por Test de Rangos de Wilcoxon (nivel de significancia: p < 0,05). En el caso de los ensayos con áfidos, las réplicas donde menos de 5 áfidos se asentaban no fueron consideradas.

## Resultados y Discusión

En la Figura 1 se muestran las estructuras elucidadas de los compuestos aislados (1 a 5) del extracto etanólico de frutos de *M. azedarach*.

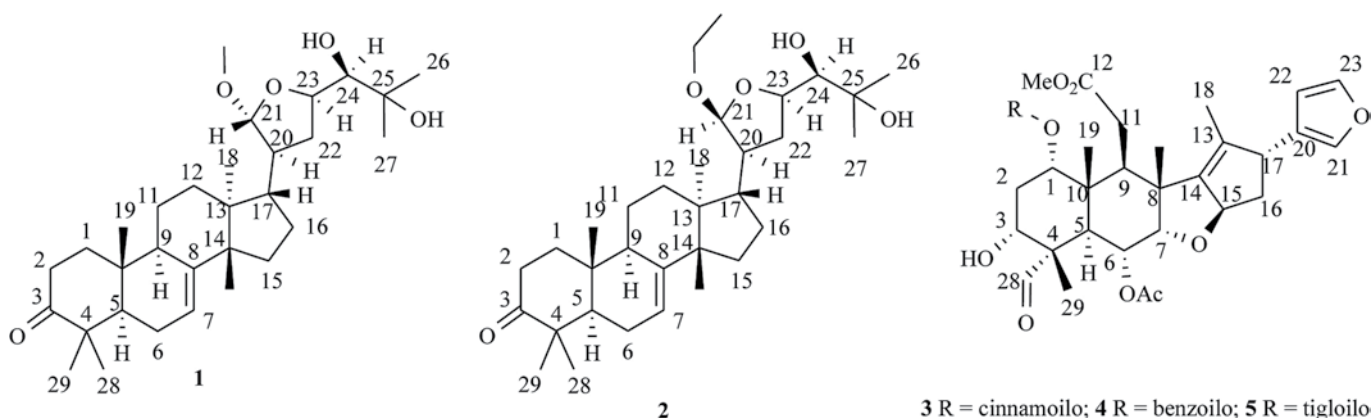


Figura 1. Compuestos aislados del árbol del Paraíso: 1: 21 $\alpha$ -metilmelianodiol; 2: 21 $\beta$ -etilmelianodiol; 3: 1-O-Detigloyl-1-O-cinnamoylchinchinol; 4: 1-O-Detigloyl-1-O-benzoylchinchinol; 5: Ohchinol.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de actividad del extracto etanólico bruto, el extracto rico en limonoides y los compuestos puros testados.

Especies de insectos				
Índice de preferencia (IP $\pm$ ES)				
	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>E. paenulata</i>
EE frutos	<b>0,3 <math>\pm</math> 0,1*</b>	0,1 $\pm$ 0,1	<b>0,8 <math>\pm</math> 0,1*</b>	0,3 $\pm$ 0,3
E lim	<b>0,5 <math>\pm</math> 0,1*</b>	<b>0,19 <math>\pm</math> 0,06*</b>	<b>1,00 <math>\pm</math> 0,00*</b>	<b>0,98 <math>\pm</math> 0,02*</b>
1	-0,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,4
3	0,2 $\pm$ 0,1	-0,06 $\pm$ 0,09	0,3 $\pm$ 0,2	<b>0,9 <math>\pm</math> 0,1*</b>
5	-0,2 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	<b>0,93 <math>\pm</math> 0,07*</b>	<b>0,7 <math>\pm</math> 0,2*</b>
5 + 3	-0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	<b>0,92 <math>\pm</math> 0,04*</b>	<b>1,0 <math>\pm</math> 0,0*</b>

Tabla 1. Actividad del extracto bruto, E lim y compuestos aislados contra los insectos testados.

Los estudios de RMN y EM revelaron que 1 correspondía a 21  $\alpha$ -metilmelianodiol, el análogo metilado de melianodiol, compuesto completamente elucidado estructuralmente por Puripattanavon et al. (2000), cuando lo aisló de la meliácea *Aglaia andamanica*. 1 fue aislado, previo a este trabajo, de *Cedrela silensis* (Meliaceae) (Mitsui et al., 2007), así como de *Poncirus trifoliata* (Rutaceae) (Xu, 2008), pero nunca de nuestro árbol del Paraíso. Asimismo, 2 resultó ser un compuesto con un esqueleto principal idéntico a 1 pero que presenta un sustituyente etoxilo en lugar de metoxilo en la posición 21, orientado éste en posición  $\beta$  en lugar de  $\alpha$ : 21  $\beta$ -etilmelianodiol. 2 tampoco había sido antes reportado para esta especie vegetal. El análisis de los espectros de RMN y MS reveló que los compuestos 3-5 resultaron ser: 1-O-Detigloyl-1-O-cinnamoylchinchinol, 1-O-Detigloyl-1-O-benzoylchinchinol y ohchinol, los cuales habían sido aislados de este árbol anteriormente (Zhou et al., 2004; Fukuyama et al., 1983).

El extracto bruto de frutos de Paraíso mostró deterrencia frente a ambos insectos generalistas, pero fue inactivo frente a los especialistas (Tabla 1). Dadas las diferencias en hábitos alimenticios de insectos especialistas y generalistas, con frecuencia se espera que los generalistas muestren mayor tolerancia a metabolitos secundarios de plantas que los especialistas. En el caso de este extracto, al ser testado contra los cuatro insectos modelo, se observó lo contrario. Una explicación probable para este hecho es que los insectos especialistas a lo largo de la evolución no han desarrollado receptores que les indiquen el estímulo negativo que significan estos metabolitos

secundarios para los generalistas. El extracto de limonoides mostró mayor actividad que el crudo frente a los generalistas y además fue activo contra los especialistas, revelando deterrencia absoluta contra *E. paenulata*. Los limonoides son compuestos que se encuentran presentes en varias especies de Meliaceae y han demostrado poseer actividad anti insecto (Murray, 2001); es esperable, entonces, que un extracto rico en este tipo de productos naturales sea más activo que el extracto bruto. Ni el EE frutos ni E lim mostraron toxicidad contra los adultos de *N. viridula* (resultados no mostrados).

Los compuestos 1, 3 y 5 resultaron ser inocuos frente a los áfidos cuando se testaron individualmente, pero algunos de ellos retuvieron la actividad contra los insectos masticadores. Este fue el caso de 3 y 5; 3 fue activo solamente frente al especialista, aunque mostrando actividad al ser testado como mezcla 3/5 (1:1). Esto y la fuerte actividad de E lim expresan que puede existir cierta sinergia entre estos compuestos frente a la acción contra los insectos testados. Asimismo, la inocuidad frente a los áfidos puede deberse a que el estímulo negativo que necesitan este tipo de insectos para rechazar el alimento se encuentre en algún otro paso del complejo proceso de selección del hospedero que involucra tanto estímulos químicos como físicos (Powel et al., 2006), que no están siendo investigados en los bioensayos realizados en este estudio.

## Conclusiones

En síntesis, 1, 2, 3, 4 y 5 fueron aislados del extracto de frutos de Paraísos locales (1 y 2 aislados por primera vez de esta especie vegetal), presentando diferentes patrones de actividad contra insectos modelo que, en su mayoría, habían mostrado sensibilidad a un extracto rico en todos estos compuestos juntos. Estos compuestos no habían sido testados nunca antes contra los insectos utilizados en este trabajo. Asimismo, el extracto bruto de frutos de este árbol presentó actividad frente a dos de los insectos testados.

## Reconocimientos

Agradecemos a Eduardo Alonso Paz, Gustavo Seoane, Roberto Zoppolo, Facundo Ibáñez, Azucena González Coloma, Ricardo Guillermo Álvarez y Carmen Elisa Díaz Hernández por su asesoría técnica en diversas materias; a PEDECIBA-Química y los convenios LATU-Facultad de Química y CSIC, España-UdelAR, por diversos financiamientos para llevar adelante estos estudios.

## Referencias

- BELLOMO, A.; CAMARANO, S.; ROSSINI, C.; GONZALEZ, D. Enantiospecific synthesis and insect feeding activity of sulfur-containing cyclitols. En: *Carbohydrate Research*. 2009, 344(1):44-51.
- CARPINELLA, M.; DEFAGO, M.; VALLADARES, G.; PALACIOS, S. Role of *Melia azedarach* L (Meliaceae) for the control of insects and acari: present status and future prospects. En: CARPINELLA, M. (ed). *Naturally occurring bioactive compounds*. London: Elsevier, 2006.
- CASTILLO, L.; GONZALEZ-COLOMA, A.; GONZALEZ, A.; DIAZ, M.; SANTOS, E.; ALONSO-PAZ, E.; BASSAGODA M. J.; ROSSINI, C. Screening of Uruguayan plants for deterrent activity against insects. En: *Industrial Crops and Products*. 2009, 29:235-240.
- CHINESE PHARMACOPEIA COMMITTEE. *Chinese Pharmacopeia*. Beijing: Chemical Industry Press, 2005. Vol. 3, p. 248.
- CORIA, C.; ALMIRON, W.; VALLADARES, G.; CARPINELLA, C.; LUDUENA, F.; DEFAGO, M.; PALACIOS, S. Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera : Culicidae). En: *Bioresource Technology*. 2008, 99(8):3066-3070.
- EVERIST, S. L. Poisonous Plants of Australia. Sydney: Angus and Robertson, 1974. p. 368.
- FUKUYAMA, Y.; MIURA, I.; OCHI, M. Bitter limonoids from the fruit of *Melia azedarach* L. var. *japonica* Makino. En: *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1983, 56:1139-1142.
- GUTIÉRREZ, C.; FERRERES, A.; REINA, M.; CABRERA, R.; GONZÁLEZ-COLOMA, A. Behavioral and sub-lethal effects of structurally related lower terpenes on *Myzus persicae*. En: *Journal of Chemical Ecology*. 1997, 23:1641-1650.
- HURST, E., Poisonous plants of New South Wales. Sydney: [s.n.], 1942. p 214.
- IRAC. *Insecticide Resistance Action Committee*. [En línea]. [s.l.]: [s.n.], 2006. [Consulta: mayo de 2011]. Disponible en: <http://www.irc-online.org/>
- MITSUI, K.; SAITO, H.; YAMAMURA, R.; FUKAYA, H.; HITOTSUYANAGI, Y.; TAKEYA, K. Apotirucallane and tirucallane triterpenoids from *Cedrela sinensis*. En: *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2007, 55:1442-1447.
- MURRAY, B. I.; Biopesticides based on phytochemicals. En: Koul, O.; Dhaliwal, G. S. *Phytochemical Biopesticides*. [s.l.]: [s.n.], 2001. p 1.
- POITOUT, S.; BUES, R. Rearing larvae of twentyeight species of Noctuidae and two species of Arctiidae (Lepidoptera) on a simple artificial diet breeding peculiarities according to the different species. En: *Annales de Zoologie Ecologie Animale*. 1974, 6(3):431-441.
- POWELL, G.; TOSH, C.; HARDIE, J. Host plant selection by aphids: behavioural, evolutionary and applied perspectives. En: *Annu. Rev. Entomol.* 2006, 51:309-330.
- WATT, J. M.; BREYER-BRANDWICK, M. G. *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*. 2nd ed. London: [s.n.], 1962.
- XU, G.; KIM, J.; KIM, S.Y.; RYU, J.; KIM, Y.; JUNG, S. Terpenoids and coumarins isolated from the fruits of *Poncirus trifoliata*. En: *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2008, 56:839-842.
- ZHOU, H.L.; HAMAZAKI, A.; FONTANA, J.D.; TAKAHASHI, H.; ESUMI, T.; WANDSCHEER, C.B. New ring C-seco limonoids from Brazilian *Melia azedarach* and their cytotoxic activity. En: *Journal of Natural Products*. 2004, 67:1544-1547.

# Desarrollo de “espumante de naranja” como alternativa biotecnológica en la actividad citrícola regional \*

Stefani Leal, A. <sup>(1)\*</sup>, Cayetano Arteaga, M. C. <sup>(1)</sup>, Schwab, M. del C. <sup>(1)</sup>, Ferreyra, M. M. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Facultad de Ciencias de la Alimentación. Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina.

Contacto: cayetanoc@fcal.uner.edu.ar

\* Primer premio al trabajo innovador por el comité científico de INNOVA 2011: V Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, (Montevideo 11 al 13 de octubre de 2011). Montevideo: LATU, 2011.

## Resumen

El objetivo de la producción citrícola de la región de Salto Grande es obtener fruta para consumo fresco. No existen a nivel nacional productos industriales derivados de la biotransformación de jugo de naranja. En este trabajo se sometieron “vinos de naranja” a una segunda fermentación en botella adaptando el método “champenoise” para obtener un “espumante de naranja”, estudiando así su factibilidad técnica. Se elaboró vino base, con jugo de naranja var. Valencia, inoculado con pie de cuba adaptado al medio. Se preparó licor de tiraje con levaduras del género *Saccharomyces*, sacarosa y coadyuvantes de clarificación. Se distribuyó el vino con el licor en botellas resistentes a la presión, se taparon con opérculos y tapa corona, se dispusieron horizontalmente en oscuridad a temperatura controlada. Finalizada la segunda fermentación se desarrolló la crianza, se dispusieron en pupitres para remover las borras, se realizó el degüelle, se adicionó con licor de expedición preparado con vino de naranja añejado y azúcar y se procedió al cierre con tapón de corcho y mordazas de metal. El “espumante de naranja” presentó 6,5 atm de presión, 13,27±0,52 %v/v de alcohol; pH=3,46±0,04; acidez=9,39±0,04 g de ácido Cítrico/l.

Palabras clave: Biotransformación, variedad Valencia, método champenoise.

## Abstract

The aim of citrus production in the Salto Grande region is fruit for the fresh market. There are no industrial products derived from biotransformation of orange juice in Argentina. The objective of this study was to obtain an orange sparkling wine from “orange wine”, by a second fermentation in bottles –as stated in traditional “champenoise” method– and study its technical feasibility. Orange base wine was prepared from orange juice inoculated with started culture adapted to the environment. Tirage liquor was prepared with *Saccharomyces* yeasts, sucrose and aids. The wine with the liquor tirage was distributed in pressure resistant bottles and capped with crown caps. The bottles were arranged horizontally in a dark cellar room and kept at controlled temperature. Once the second fermentation was finished, the aging process was developed, the bottles were riddled to facilitate settling of the yeast lees to the neck of the bottles, and disgorgement was performed. The wine supplemented with dosage liquor prepared with aged orange wine and sugar. Then the bottles were closed with corks and metal jaws. The orange sparkling wine contained 6,5 atm pressure, 13,27±0,52 %v/v alcohol; pH=3,46±0,04; acidity=9,39±0,04 g Citric acid/l.

Keywords: Biotransformation, Valencia variety, Champenoise method.

## Introducción

### La cadena citrícola de la región de Salto Grande

En la región de Salto Grande la producción citrícola es una actividad económica muy relevante, que comenzó a desarrollarse en la década del 50 y actualmente representa el 42,77 % de la actividad citrícola regional; se desarrolla en una región agro económica de 30 km (oeste – este) de suelos arenosos sobre la costa del Río Uruguay, se inicia al norte del departamento Colón en Entre Ríos, se extiende hacia el norte por los departamentos Concordia y Federación, siguiendo hasta el departamento Monte Caseros en la provincia de Corrientes, y en Uruguay en los departamentos de Salto y Paysandú. La cadena citrícola de Entre Ríos está formada por:

- Producción primaria, desde la plantación hasta la obtención de la fruta en condiciones de ser cosechada.

- Etapas secundarias: cosecha, transporte a empaque, procesos de acondicionamiento, conservación y transporte de la fruta a mercados mayoristas o puertos; industria: compuesta por la industria elaboradora de jugos y derivados, obtención de aceite esencial, de elevado valor agregado, que se utiliza en la industria alimenticia, cosmética y de limpieza.

Los actores principales en la cadena citrícola regional incluyen los viveristas, productores, empacadores (mercado interno y externo), las industrias de jugos y derivados. En otro nivel de análisis aparecen los proveedores de insumos, las empresas de servicio de cosecha y acondicionamiento, las empresas proveedoras de cámaras de desverdizado, de fumigación, frío y transportistas, fábricas de envases (aserraderos, cajoneros), etcétera.

También existe un entramado institucional específico de apoyo a la cadena, como cámaras de productores y empacadores locales (Concordia, Federación, Chajari, Villa del Rosario) nucleados a nivel provincial en la Federación de Citrus de Entre Ríos (Federicitrus), cámaras vinculadas a otros eslabones de la cadena y con jurisdicción mayor a la provincia, como la Asociación de Viveristas del NEA y la

Cámara de Exportadores del NEA.

Desde ciencia y tecnología se cuenta con INTA, Estación Experimental Agropecuaria Concordia (y sus Agencias de Extensión Rural de Chajarí y Concordia), y la Facultad de Ciencias de la Alimentación de la UNER (Universidad Nacional de Entre Ríos), con cierta especialización en la actividad, que aportan en la investigación y servicios en temas como determinación de plaguicidas, recubrimientos comestibles, biotecnología, entre otros. A nivel interinstitucional el Polo Tecnológico de la Región de Salto Grande tiende a articular actividades de ciencia y tecnología y las actividades productivas (Díaz Vélez, 2010).

El objetivo principal de la citricultura de la provincia es la producción de fruta para consumo fresco, el destino a industria es secundario o más bien un subproducto. El sector industrial cuyo componente fundamental es la producción de jugos concentrados y derivados es complementario a la producción de fruta fresca y habitualmente la fruta procesada en industria no supera el 20 % del total de producción (Vera et al., 2007). El volumen de producción de cítricos en Entre Ríos representa aproximadamente el 30 % de la producción nacional. De la producción de cítricos de Entre Ríos, un 15-18 % es destinado a exportación como fruta fresca. Existen en la región citrícola de Entre Ríos 14 empaques dedicados a exportación, el 14,5 % del total del país, mientras que hay 368 empaques que destinan su producción al mercado interno. Éstos representan el 78,3 % del total de empaques de mercado interno argentino (Federcitrus, 2011). Estos empaques de mercado interno integran gran parte de la cadena citrícola, ya que los mismos actores son productores, empacadores, transportistas y comercializadores en la etapa mayorista.

La noción de agregar valor se presenta como mecanismo de aumentar las rentas y de retenerlas en el ámbito de la economía local, donde se encuentra la producción primaria (Wilkinson, 2003). En el caso de los *specialities* (productos diferenciados de alto valor unitario que son elaborados con técnicas apropiadas que en muchos casos resaltan su carácter personal y/o artesanal), la competitividad se basa en poder ofrecer un producto casi único con el máximo nivel de calidad posible para su venta en canales apropiados y claramente identificados (Tito y Cattaneo, 2000).

Son conocidos los vinos de frutas, en particular los de naranja, como productos regionales, elaborados de manera artesanal, pero no se han registrado a nivel industrial nacional productos derivados de la biotransformación de jugo de naranja.

En este contexto en la Facultad de Ciencias de la Alimentación se ha desarrollado y caracterizado el llamado "vino de naranja" (Ferreira, 2006; Schwab, 2006), obtenido por biotransformación de jugo de naranja.

Los espumantes son bebidas alcohólicas obtenidas a partir de vino base sometido a una segunda fermentación. El término "champagne" con Denominación de Origen Controlada (DOC) es una marca protegida legalmente por el Tratado de Madrid (1891) y confirmado en el Tratado de Versalles después de la Primera Guerra Mundial. Se refiere únicamente a vino espumoso producido en su región homónima, y sus estándares son definidos por una Appellation d'Origine Controlée. En España el producto obtenido aplicando el método tradicional se conoce con denominación de origen "Cava" (reglamentada por BOE 189278:37587-93, 1991); en Italia se produce de manera similar el "prosecco". En el Código Alimentario Argentino (Ley 18284/69, Decreto 2126/71), Art. 1099, se definen los vinos espumosos o espumantes.

En Argentina, aunque la producción de estos vinos espumantes es menor comparada con la de los vinos (representan 1,6 % de la producción mundial de vinos), el impacto económico para la industria enológica es muy importante por el elevado valor agregado de la mayoría de los espumantes (Pozo-Bayón et al., 2009).

El aumento de la demanda durante los últimos años se relaciona con los precios más accesibles y con una mejor calidad de las marcas de menor valor. Además, una oferta más variada en sabores dulces y secos permitió captar nuevos consumidores. La producción nacional de champaña creció 122 % en el período 1990-1996, esto equivale a una tasa promedio anual del 20 %. El aumento en los niveles de

producción a partir de 1991 coincide con la recuperación del sector vitivinícola que se inclinó a la elaboración de productos con alto valor agregado.

## Elaboración de espumantes

Los espumantes se clasifican, según las diferentes tecnologías de producción, en vinos espumantes fermentados en botellas y aquellos fermentados en grandes *cuvée* o *granvas*.

El método de *cuvée* o *granvas* consiste en fermentar el vino base en tanques herméticamente sellados durante al menos 20 días antes de ser transferidos a las botellas, con lo que se ahorran costosas manipulaciones. Algunos vinos italianos, como Lambrusco y Asti, se producen por este medio.

En 1916 se ideó otro sistema para elaborar espumosos en grandes cantidades, el procedimiento llamado *Charmat*, que se realiza en grandes recipientes o cubas, como se muestra en la Figura 1.

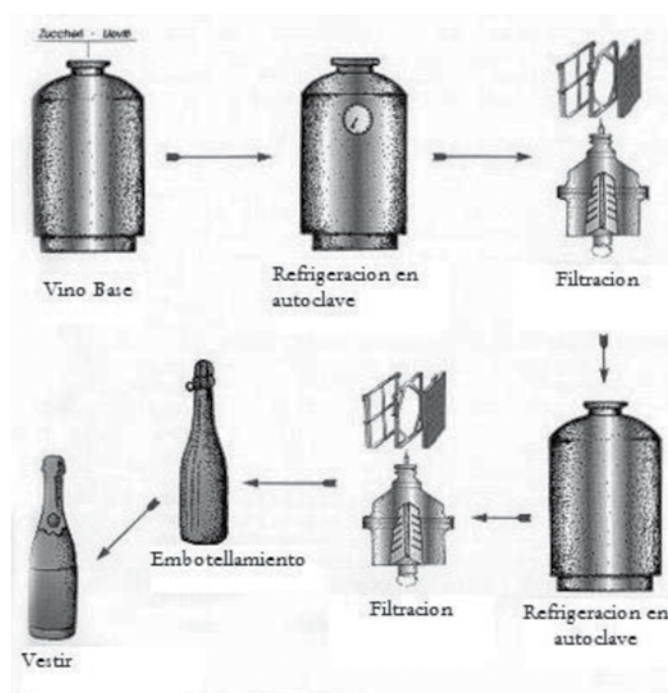


Figura 1. Esquema de obtención de espumantes por el método Charmat

El vino base es encubado en el primer recipiente, donde es envejecido artificialmente por calentamiento. Más tarde se transvasa a una segunda cuba, en la que se le añaden las levaduras y el licor azucarado para que fermente durante 10 o 15 días. En la tercera cuba se clarifica por refrigeración. Por último, desde la cuarta cuba se filtra y se embotella, manteniendo todo el proceso en condiciones isobáricas para conservar el dióxido de carbono formado.

El proceso de elaboración según el método tradicional o *champanoise* (Figura 2) conduce a la obtención de los espumantes de mejor calidad. Consta de dos etapas claramente diferenciadas: la elaboración del vino base y la segunda fermentación en botella.

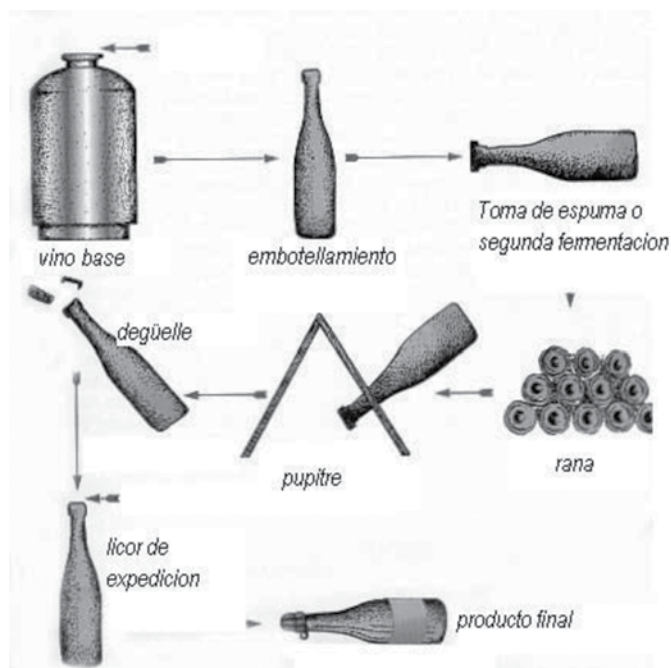


Figura 2. Esquema de obtención de espumante por el método champenoise.

Las características recomendadas para un vino base de uva apropiado para la elaboración de espumantes, según la norma BOE189278:37587-93,1991 son las siguientes:

Graduación alcohólica adquirida: mínima 9,5%(v/v); máxima 11,5% (v/v)

Acidez total mínima 5,5 g/L

Acidez volátil total (en ácido acético) inferior a 0,50 g/L

pH: mínimo 2,8-máximo 3,3

Resulta cada vez mayor la necesidad de contar con tecnologías alternativas para generar productos innovadores, de creciente demanda por los consumidores, con más valor agregado e identidad local, teniendo en cuenta el concepto de *specialities*. Surge así la idea de someter a los vinos de naranja a una segunda fermentación en botella, adaptando el tradicional método *champenoise* y obtener así un vino espumante de naranja.

El desarrollo de este nuevo producto se plantea como factible técnicamente, lo que permitiría la generación de nuevos puestos de trabajo y el posicionamiento del sector citrícola en mercados emergentes.

## Materiales y Métodos

Para la obtención del vino base de naranja se seleccionó la variedad Valencia Late, por sus condiciones sávido aromáticas y alto rendimiento en jugo. La naranja Valencia Late utilizada en este trabajo se cosechó en noviembre de 2009 en óptimas condiciones fisiológicas.

### Obtención del vino base de naranja

La vinificación comenzó con la extracción del jugo de naranjas en extractora FMC modelo FS BR 1, el cual se recogió en tanque de acero inoxidable donde se sulfitó con  $\text{KHSO}_3$  (150 ppm) para evitar el desarrollo de levaduras *non Saccharomyces*. Se realizó tratamiento enzimático para clarificar el jugo, con enzimas Rheopect (20 ppm). Luego de la inactivación enzimática se dejó decantar y se trasegó el jugo clarificado, se ajustó la concentración de azúcar con sacarosa, hasta 15°Brix. La cantidad de azúcar necesaria para alcanzar 9-10° GL se agregó en varias etapas para evitar el efecto inhibitorio osmótico sobre las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*: al preparar el mosto, a las 24 horas y luego del primer trasiego. El método que se

usó para la fermentación fue el agregado de un pie de cuba que se preparó a partir de jugo de naranja adicionado de nutrientes para el desarrollo de la biomasa (Ferreira, 2006).

El jugo se distribuyó en damajuanas de vidrio oscuro de 25 litros, donde se inoculó con el pie de cuba, se cubrieron las damajuanas con torundas de algodón y se mantuvieron en aerobiosis durante 24 horas para desarrollo de biomasa. Se agregó nuevamente sacarosa y se colocaron los tapones hidráulicos, dando comienzo a la etapa de fermentación tumultuosa; la temperatura de la cámara se mantuvo a  $15 \pm 1$  °C durante todo el proceso. Finalizada la fermentación tumultuosa se efectuó el primer trasiego por decantación natural. Se realizó un nuevo agregado de azúcar y nuevamente se sellaron las damajuanas con los tapones hidráulicos. El proceso fermentativo continuó hasta agotamiento de los azúcares. A los 30 días se filtraron los vinos con filtros de celulosa y se obtuvo así el vino base de naranja.

### Segunda fermentación

La segunda fermentación, por adaptación del método Champenoise (Figura 1), comenzó con la preparación del licor de tiraje en vino base adicionado de un cultivo de levaduras del género *Saccharomyces*, de manera tal que la población fue superior a  $4 \times 10^6$  células viables /mL, la cantidad necesaria de azúcar para obtener una presión de  $\text{CO}_2$  no mayor a 6 atm a 15 °C (aprox. 4-4,3 g/l para producir 1 atm a 10 °C), nutrientes y coadyuvantes de clarificación. Se ensayaron diferentes concentraciones de bentonita: 0,2g/l y 0,5 g/l.

Se mezcló el licor con el vino base y se llenaron las botellas resistentes a la presión con agitación para favorecer la presencia de oxígeno en la mezcla; se taparon con opérculos y tapa corona.

Las botellas se dispusieron en rima para la toma de espuma, a temperatura de cámara de  $15 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  y al resguardo de la luz. Para asegurar el contacto de las levaduras con la masa del líquido durante esta etapa de fermentación se aplicó movimiento de "clavas" a las botellas, que consiste en una agitación manual vigorosa, hacia atrás y adelante, tomando la botella del cuello y girando su posición una media vuelta cada día.

Una vez finalizada la segunda fermentación comenzó la crianza del espumante. Las levaduras inactivadas por el gas acumulado y el agotamiento del azúcar se depositaron en el fondo. Al cabo de 9 meses las botellas se dispusieron en pupitres de madera para la remoción de las borras hacia el cuello. Diariamente se les aplicó un movimiento giratorio de 1/8 de vuelta en sentido horario hasta completar dos vueltas y luego en sentido antihorario 1/4 de vuelta cada día hasta completar dos giros. El pupitre se desplazó paulatinamente hasta que las botellas finalmente quedan en punta (de cabeza). Cuando el líquido se observó límpido se procedió al degüelle de las botellas, etapa que se realizó en instalaciones de una bodega comercial.

Las botellas, previamente enfriadas en heladera, se sumergieron en un baño de solución incongelable (etilenglicol al 45 %) a una temperatura de -25 °C. Al quitar la tapa corona se expulsaron los opérculos arrastrando las borras acumuladas, se completó el volumen de las botellas con el denominado licor de expedición, preparado con vino de naranja añejado y azúcar. Se utilizó cantidad de azúcar para lograr una concentración en botella: de 25 g/L y obtener un espumante de la categoría demi-sec; otra fracción de botellas sin agregado de azúcar obteniendo un espumante tipo extra brut. Por último se procedió al cierre definitivo de las botellas con tapón de corcho y mordazas de metal.

### Parámetros enológicos en vino base de naranja y en espumante

Para caracterizar el vino base de naranja y el espumante se determinaron los siguientes parámetros enológicos:

- Graduación alcohólica: por aerometría (según técnica MA-E. AS312-01-TALVOL, O.I.V., 2009).

- pH: potenciométricamente (pHmetro BOECO BT- 500).

- Sólidos solubles: Con refractómetro ATAGO modelo DTM-1, expresados en °Brix.
- Sacarosa, glucosa y fructosa: método enzimático (Boehringer Mannheim/Biopharm, kit # 0716260), expresados como g/100 mL.
- Acidez total: por titulación (AOAC, 1984), determinada como ácido cítrico anhidro y expresada en g/L).
- Color: se determinó sobre muestras centrifugadas 5 min a 4000 rpm mediante la medida de las absorbancias a 450, 520, 570 y 630 nm en espectrofotómetro (Shimadzu UV 1603), paso de luz 10 mm, para obtener los parámetros CIELab (L\*, a\*, b\*) y se procesaron con programa MSCV (Grupo de color, Universidad de La Rioja-Universidad de Zaragoza; Ayala et al., 2001).

## Resultados y Discusión

Se procesaron 200 kg de naranjas, el rendimiento en jugo fue del 51 % y se obtuvieron 71 litros de espumante de naranja.

El vino base de naranja presentó las características mostradas en la Tabla 1:

	CONTENIDO
Alcohol (%v/v)	12,80±0,57
Sólidos solubles °Bx	8,28±0,28
Az. Reductores (%)	3,93±0,98
Acidez (g ac. Cítrico/l)	1,07±0,05
pH	3,44±0,02

Tabla 1. Parámetros enológicos del vino base de naranja.

El vino base presentó características similares a las requeridas para un vino base de uva: producto de sabor y aroma marcadamente afrutado. Se consideró apropiado para la elaboración del espumante. Podrá obtenerse un vino base con menor graduación alcohólica para obtener un espumante más suave, ya que el proceso de segunda fermentación aumenta hasta 1,5 % el contenido de alcohol.

En el sentido estrictamente químico un vino espumante es una solución hidroalcohólica sobresaturada en CO<sub>2</sub> que contiene una gran diversidad de moléculas, desde las más sencillas, producto de la fermentación, hasta las más complejas, liberadas al medio por la lisis celular durante el proceso de envejecimiento.

Es fundamental que la fermentación se realice a temperaturas controladas y no superiores a los 16 °C, para conducir a una mejor toma de espuma, es decir, una mejor integración del anhídrido carbónico en el líquido en el que se desprende y, por lo tanto, una mejora del «perlaje» por finura de la burbuja y por persistencia superior del fenómeno. De formarse burbujas más gruesas en la copa, al ser más inestable la unión del CO<sub>2</sub> con el vino, serán efímeras. Los aromas también están muy influenciados por la temperatura a la que se realiza la fermentación.

	CONTENIDO
Alcohol (%v/v)	13,27±0,52
Sólidos solubles (°Bx)	8,85±0,94
Az. Reductores (%)	0,728±0,010
Acidez (g ac. Cítrico/l)	9,39±0,04
pH	3,46±0,04

Tabla 2. Parámetros enológicos del espumante de naranja.

Se ensayaron dos dosis de bentonita en el licor de tiraje y los parámetros cromáticos mostraron los resultados expresados en la Tabla 3.

RESPUESTAS	Vino base	Espumante 0,2 g/L	Espumante 0,5 g/L
L	94,2±0,83	94,1±0,22	93,3±1,37
C*ab	24,21±1,811	19,10±1,344	14,43±0,327
h*	93,46±1,19	92,45±1,38	104,04±1,65
a*	1,55±0,08	0,76±0,05	2,08±0,61
b*	24,13±0,71	19,09±1,06	13,32±0,98
ΔE		6,201	

Tabla 3. Parámetros de color en vino base y espumantes de naranja

Al cabo de los 9 meses de crianza en el espumante de naranja se observó intensa formación de burbujas aunque de tamaño pequeño y poca estabilidad del collar de espuma. La formación y liberación de burbujas al servir una copa de vino espumante fascina a los consumidores desde los tiempos de Dom Perignon. La efervescencia (del Latin *fervere*, hervir) de estos vinos es adquirida exclusivamente durante la segunda fermentación y puede definirse como la progresiva liberación de burbujas a través del medio líquido, que se genera al descorchar una botella de espumante.

Otros aspectos como el sabor y el aroma desempeñan un papel muy importante, pero son la efervescencia y la persistencia de la espuma los atributos particulares de los vinos efervescentes y, por tanto, presentan una importancia capital en su evaluación organoléptica (Pozo-Bayón et al., 2009; Moreno-Arribas et al., 2000; Obiols et al., 1998). Uno de los factores que más afectan las características visuales de los vinos espumantes es la persistencia de la espuma (Marchal, Bouquetet & Maujean, 1996). La formación de un collar estable de burbujas es considerada por los consumidores como un criterio muy importante de calidad (Brissonet y Maujean, 1993). Por otro lado, la efervescencia y la espuma no son únicamente atributos visuales ligados a la belleza de un vino, sino que influyen de manera significativa sobre las sensaciones que se perciben en el paladar (Vanrell, 2007); el tamaño de las burbujas puede afectar la liberación de aromas y la percepción en boca (Liger-Belair, 2005).

Los componentes que afectan la formación y estabilidad de las burbujas son liberados al medio durante la etapa de crianza del espumante. Consecuencia de esta ruptura y fragmentación del material celular son liberadas al espumante moléculas de distinta naturaleza, que afectan a su equilibrio coloidal, estructura, estabilidad de color y perfil aromático, con importantes repercusiones organolépticas. Las moléculas mayoritariamente liberadas se pueden clasificar como procedentes del interior celular: nucleótidos y nucleósidos (se comportan como agentes de flavor), aminoácidos y péptidos (actúan como precursores de aromas, algunos pueden presentar sabores dulces o amargos y juegan un importante papel como activadores de la fermentación maloláctica); o bien de las paredes celulares: Glucanos y manoproteínas presentan interacciones con volátiles aromáticos, tienen un importante papel en la modificación de la estructura y densidad en boca y actúan como coloides protectores estabilizando la materia colorante. Un período más prolongado en contacto con las borras, además de favorecer el desarrollo del bouquet, podrá mejorar las características de la espuma.

La espuma se debe caracterizar y relacionar con características fisicoquímicas y sensoriales. Actualmente se está trabajando mediante técnicas cromatográficas (GC-MS y GC-O) en la construcción del perfil aromático del “vino base de naranja” y “espumante de naranja” y en la construcción del perfil sensorial por medio de ensayos con consumidores. Se estudiarán las características de la espuma en base a técnicas de análisis de imágenes digitales en movimiento. Este método



presenta la ventaja de evaluar la calidad de la espuma automáticamente y en tiempo real en una copa, utilizando una cámara de video (Pozo Bayón et al., 2009). Las consecuencias comerciales de las propiedades de la espuma son muy importantes; el conocimiento de los factores que influyen en la formación de burbujas y en la estabilidad de la espuma permite tomar decisiones y actuar sobre el proceso de elaboración del espumante.

## Conclusiones

Es factible obtener un “espumante de naranja” adaptando la tecnología tradicional “champenoise”, sometiendo a un vino base de naranja a una segunda fermentación en botella. Los parámetros evaluados de este nuevo producto nos alientan a seguir ajustando variables de proceso y caracterizarlo de manera más detallada (formación de espuma, correlación entre propiedades fisicoquímicas y sensoriales), a fin de optimizar el proceso y obtener un producto de óptima calidad.

El “espumante de naranja” se presenta como una alternativa potencial a desarrollar para agregar valor a la producción primaria de cítricos de la región.

## Reconocimientos

A las empresas Litoral Citrus y ECA S.A. de Concordia (Entre Ríos) y Bodegas Calvinor (Bella Unión, Uruguay) por su aporte en materia prima y recursos tecnológicos. Al grupo de la sección Enología de la Facultad de Química, Universidad de la República, por sus consejos y generosos aportes en el conocimiento del vino.

## Referencias

- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 14va ed. Gaithersburg: AOAC, 1984. Official Method 9.135.
- AYALA, F.; ECHÁVARRI, J.F.; NEGUERUELA, A.I. *Programa MSCV. Grupo de color*. La Rioja: Universidad de La Rioja; Universidad de Zaragoza, 2001.
- Boletín Oficial del Estado 20 de Noviembre de 1991. Reglamento de la Denominación “Cava” y de su Consejo Regulador. Orden 14 de Noviembre 1991 BOE nº 189278: 37587-93
- BRISSONET, F.; MAUJEAN, A. Identification of some foam-active compounds in champagne wines. En: *Am. J. Enol. Vitic.* 1993, 42:97-102.
- CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO. [En línea]. Buenos Aires: Anmat, [s.d.]. [Consultado el 15 de diciembre de 2011]. Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoo/Capitulo\\_XIII.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoo/Capitulo_XIII.pdf)
- DÍAZ VÉLEZ, Rubén; VERA, Luis María. *PEA de cítricos 2010/2016*. Concordia: INTA EEA, 2010.
- FERREYRA, M.M. *Estudio del proceso biotecnológico para la elaboración de una bebida alcohólica a partir de jugo de naranja*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, 2006. (Tesis Doctoral)
- FEDERCITRUS. La actividad citrícola Argentina, año 2011 [En línea]. Federcitrus, 2011. [Consulta: 12 de noviembre de 2011] Disponible en: <http://www.federcitrus.org/actividad-citricola-2011.pdf>
- LIGER-BELAIR, G. The physics and chemistry behind the bubbling properties of champagne and sparkling wines: a state-of-the-art review. En: *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53(8):2788–2802
- MARCHAL, R.; BOUQUELET, S.; MAUJEAN, A. Purification and partial biochemical characterization of glycoproteins in a Champenois Chardonnay wine. En: *Journal Agric Food Chem.* 1996, 44:1716-1722.
- MORENO ARRIBAS, V.; PUEYO, E.; NIETO, F.J.; MARTÍN ÁLVAREZ, P.J.; POLO, M.C. Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. En: *Food Chemistry*. 2000, 70:309-317.
- OBIOLS, J.M.; DE LA PRESA-OWENS, C.; BUXADERAS, S.; BORI, J.L.; DE LA TORRE-BORONAT, M.C. Protocolo de evaluación de la formación de la efervescencia de la espuma en un vino espumoso, ACE. En: *Revista d.Enologia*. 1998, 15(44):3-15
- ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIN. *Compendium of international methods of wine and must analysis*. [s.l.]: OIV, 2009.
- POZO-BAYÓN, M.A.; MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, A.; PUEYO, E.; MORENO-ARRIBAS, M.V. Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. En: *Trends in Food Science and Technology*. 2009, 20:289-299.
- SCHVAB, María del Carmen. *Bebida alcohólica de jugo de naranja: Estudio de los parámetros de calidad, influencia de las variables de proceso y caracterización del producto*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, 2006. (Tesis Doctoral)
- TITO, G.; CATTANEO, C. *Producción de alimentos sanos a pequeña escala, comercialización y limitaciones reglamentarias: elementos para un análisis del tema*. Buenos Aires: PSA-PROINDER, 2000.
- VANRELL, G.; CANALS, R.; ESTERUELAS, M.; FORT, F.; CANAS, J.M.; ZAMORA, F. Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (Cava). En: *Food Chemistry*. 2007, 104:148–155.
- VERA, L.; DIAZ VELEZ, R.; RIVANDERNEIRA, F.; GARRAN, S.; GARIN, R. *Informe citricola regional de Entre Ríos*. Entre Ríos: INTA-FEDERCITRUS, 2007.
- WILKINSON, J. Oportunidades y desafíos para la pequeña producción en el nuevo cuadro de dominación del Sistema Agroalimentario en América Latina. En: ALACEA. *VII Congreso Internacional ALACEA*, (Lima 6-7 de noviembre de 2003). Lima: ALACEA, 2003.

# ÍNDICE DE AUTORES

Abirached, Cecilia; 7, 28  
Añón, María Cristina; 7  
Araújo, Ana Claudia; 24  
Ayes, Carlos; 3  
Burzaco, Patricia; 3  
Capra, Gustavo; 11  
Castro, Manuel; 51  
Cayetano Arteaga, María Cristina; 60  
Cian, Raúl E.; 42  
Cozzano, Sonia; 11  
Crosa, María José; 3  
del Castillo, María Dolores; 32  
Díaz, Martina; 56  
Drago, Silvina R.; 42  
Ferreira, María M.; 60  
Fradiletti, Florencia; 11  
Garmendia, Gabriela; 47  
Gioscia, Diego; 3  
González, Rolando J.; 42  
Irisity, Mariana; 3  
Jorge, Carolina; 51  
Laborda, Álvaro; 51  
Latorre, Karina; 28  
López, Tomás; 37  
Maldonado, Laura; 28  
Márquez, Rosa; 11  
Martínez, Rosana; 11  
Medrano, Claudia Alejandra; 7, 32, 28, 37  
Miraballes, Iris; 37  
Mombrú, Álvaro; 37  
Moyna, Patrick; 7  
Panizzolo, Luis Alberto; 7, 24, 28  
Pardo, Helena; 37  
Pastorino, Natalia; 3  
Repiso, Luis; 11  
Rocha, Paula; 28  
Rodríguez, Analía; 24  
Rossini, Carmen; 56  
Schöpf, Gonzalo; 24  
Schwab, María del Carmen; 60  
Simó, Miguel; 51  
Sobral, Pablo A.; 21  
Stefani Leal, Andreína; 60  
Taroco, Laura Vanina; 24  
Vero, Silvana; 47  
Wagner, Jorge R.; 21  
Xavier, María de la Paz; 37

# ÍNDICE TEMÁTICO

---

## A

Actividad antihipertensiva; 42, 44, 45  
Actividad antioxidante; 32, 33, 42, 43, 44, 45  
Aislado proteico de soja; 7, 8, 10, 28  
Almacenamiento pulpa tamizada; 3  
Antioxidante; 16, 18, 19, 28, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45  
Aptitud tecnológica; 11, 12, 14, 17  
Artrópodos; 51

## B

Beta lactoglobulina; 37  
**Bioteología; 37 - 50**  
Biotransformación; 60, 61  
Butiá; 3, 4, 5, 6

## C

Calidad carne; 11  
Cerdos; 11, 12, 14, 17, 18, 19  
Cinética; 22, 28, 29, 30, 37, 38, 39, 40  
Coalescencia; 9, 21, 28, 29, 30, 31, 40,  
Composición dieta; 11  
Cremado; 7, 8, 9, 10, 21, 22, 28, 29, 30, 31, 38, 39

## D

Danbo; 24, 25, 26, 27  
Desestabilización; 7, 28, 29, 30, 31, 37, 38, 39  
Diversidad; 6, 51, 52, 53, 54

## E

Emulsificación; 21  
Epilachna paenulata; 56, 57

## F

Floculación; 21, 22, 23, 28, 29, 30, 31, 39  
Fracciones nitrogenadas; 24, 25, 26  
Fruto nativo; 3

## G

Glicinina; 7, 8, 10, 32, 33, 34, 35  
Glicinina de soja; 32, 33, 34, 35  
Glicosilación; 21, 22, 23, 38

## H

Hemoglobina bovina; 42, 43, 44, 45  
Hidrólisis enzimática; 32, 42, 43, 45  
Hidrolizados; 33, 34, 35, 42, 43, 44, 45

## I

Impacto antrópico; 51, 54  
**Innova 2011; 60 - 64**

## L

Limonoides; 56, 57, 58

## M

**Medio Ambiente; 51 - 59**  
Método champenoise; 60, 62  
Myzus persicae; 56, 57, 59

## O

Ocratoxina A; 47, 50

## P

Paraíso; 56, 58  
Péptidos antioxidantes; 32, 35  
Producción; 4, 6, 7, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 24, 25, 27, 38, 42, 48, 51, 52, 56, 60, 61, 64  
Propiedades químicas y nutricionales; 3  
Proteasas de *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme); 32  
Proteasas de *Streptomyces griseus* (PSG); 32  
Proteínas de soja; 7, 21, 32, 33  
Proteólisis; 24, 25, 26, 27  
Pulpa tamizada; 3, 4, 5, 6

## Q

Queso; 19, 24, 25, 26, 27

## R

Rhopalosiphum padi; 56, 57

## S

Salames; 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19  
Sección Nigri; 47, 48, 50  
Spodoptera littoralis; 56, 57

## T

Tamaño de partícula; 8, 9, 21, 22, 29, 30, 31, 38, 40  
**Tecnología Alimentaria; 3 - 36**  
Tofu; 21, 22, 23

## U

Ultrafiltración; 42, 43, 44, 45  
Uva; 47, 48, 49, 50, 60, 62, 63

## V

Variedad Valencia; 60, 62  
Vehículo alimentario; 37

$\beta$ -conglucina; 7, 8, 10, 33



# **INNOTEC**

REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY