

ISSN 1688-6593 [en línea]

Número 15  
Enero - junio 2018

# INNOTEC

REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY



---

**INNOTEC ISSN 1688-6593 [en línea]**

es una revista científica arbitrada editada por el Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

**Equipo editorial****Dirección**

Dr. Jorge Silveira,  
Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

**Consejo editorial**

Dra. Sofía Barrios,  
Universidad de la República (UdelaR),  
Facultad de Ingeniería, Instituto de Ingeniería Química, Uruguay

MBA. Ing Mariela De Giuda,  
Gerente de Tecnología y Gestión,  
Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

Dr. Andrés Dieste,  
Universidad de la República (UdelaR),  
Facultad de Ingeniería, Instituto de Ingeniería Química, Uruguay

Dr. Gustavo Domínguez,  
Gerente de Latitud - Fundación LATU, Uruguay

Dra. Gabriela Eguren,  
Universidad de la República (UdelaR),  
Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología y  
Ciencias Ambientales, Uruguay

PhD. Federico Harte,  
Profesor adjunto de Food Science, Penn State University, Estados Unidos

MSc. Rosa Márquez,  
Latitud - Fundación LATU, Uruguay

Dr. Eduardo Méndez,  
Universidad de la República (UdelaR),  
Facultad de Ciencias, Instituto de Química Biológica, Uruguay

PhD. Laura Moya Silva,  
Universidad ORT Uruguay, Facultad de Arquitectura, Uruguay

Dr. Daniel Vázquez,  
INIA La Estanzuela, Plataforma de Agroalimentos, Uruguay

MSc. Daniel Volpe,  
Gerente de Análisis, Ensayo y Metrología,  
Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

**Edición**

Lic. Marina Barrientos,  
Edición revistas INNOTEC, Centro de Información Técnica,  
Laboratorio Tecnológico del Uruguay-LATU, Uruguay

**Editor asociado**

MSc. Rosa Márquez

**Acerca de INNOTEC**

INNOTEC es una publicación arbitrada en modalidad doble ciego por un comité independiente de revisores externos a su entidad editora, el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). Editada en Montevideo, Uruguay, contiene artículos originales inéditos y su periodicidad es semestral (enero-junio y julio-diciembre).

El objetivo de la revista es la divulgación y transferencia del conocimiento en las áreas de Forestales, Medio Ambiente, Metrología y Tecnología Alimentaria. INNOTEC está dirigida a académicos, investigadores y técnicos de la comunidad científica uruguaya e internacional.

INNOTEC se encuentra indexada en las siguientes bases de datos: Latindex, Google Académico, Fuente Académica Premier de EBSCOhost y DOAJ.



La colección completa se puede consultar en línea en <http://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTEC/index>

Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional.

Los conceptos y opiniones vertidas en los artículos aquí publicados, así como el uso que otros puedan hacer de ellos, son de responsabilidad exclusiva de los autores y no reflejan el punto de vista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

**INNOTEC - NÚMERO 15 - Enero a junio de 2018**

ISSN electrónico: 1688-6593

Título clave: INNOTEC (En línea)

Título clave abreviado: Innotec (En línea)

Centro de Información Técnica, LATU  
Av. Italia 6201. Tel. (598) 2601 3724, ints. 1314 y 1350  
[ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy)  
<http://www.latu.org.uy>  
<http://ojs.latu.org.uy>

---

**Administración de OJS y gestión de información**

Lic. Lorena Fiori,  
Centro de Información Técnica,  
Laboratorio Tecnológico del Uruguay-LATU, Uruguay

**Diseño**

Manosanta Desarrollo Editorial

## Política editorial LATU

La actividad editorial del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) tiene como finalidad la difusión en la comunidad académica y profesional uruguaya de las investigaciones que apoyen el desarrollo de tecnologías y modelos de gestión que aporten valor a los procesos de innovación.

## Misión

Nuestra misión es la publicación de trabajos originales, con un enfoque de rigor y calidad teórica y metodológica, que contribuyan a la producción sistemática de nuevo conocimiento científico tecnológico y al fortalecimiento de la presencia uruguaya en redes regionales e internacionales. Es de interés del LATU consolidar el campo de la documentación científica a nivel local mediante la creación e innovación de productos editoriales.

## Los objetivos específicos son:

- Promover la publicación de investigaciones de excelencia en las áreas de conocimiento estratégicas del LATU, alineadas a su misión como impulsor del desarrollo sustentable del país y su inserción internacional a través de la innovación.
- Posicionar a los autores, técnicos y colaboradores en las plataformas electrónicas internacionales, estimulando su participación en el marco de un proceso de edición arbitrado por especialistas.
- Contribuir al desarrollo y transferencia de tecnologías de innovación orientadas a la mejora de procesos industriales, empresariales y sociales.
- Aportar y divulgar conocimiento científico de calidad a los técnicos, académicos, investigadores y a la sociedad en su conjunto, tanto para la efectiva transmisión de las experiencias como para el crecimiento profesional.
- Facilitar el intercambio y la creación de nuevo conocimiento entre instituciones.

Invitamos a los autores interesados en publicar en INNOTEC a ingresar a nuestra página en la plataforma Open Journal Systems (<http://ojs.latu.org.uy>) o a contactarse con el Centro de Información Técnica del LATU a través del correo electrónico [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy) para recibir instrucciones para el envío de artículos a nuestro proyecto editorial.

# SUMARIO

Instrucciones a los autores . . . . . 4

## ARTÍCULOS

- 07 Efecto de la aplicación de ácido láctico sobre *Listeria monocytogenes* en carne envasada al vacío en Uruguay**  
Effect of lactic acid application on *Listeria monocytogenes* in vacuum packed meat in Uruguay  
Brugnini, Giannina; Acquistapace, María Jesús; Rodríguez, Soledad; Rufo, Caterina.
- 15 Aceptabilidad sensorial de una hamburguesa de carne vacuna y vegetales**  
Sensory acceptability of a beef hamburger with vegetable ingredients  
Urruzola, Nahir; Santana, Maite; Gámbaro, Adriana.
- 23 Osmodehidrocongelación de batata fortificada con Zinc y Calcio**  
Osmodehydrofreezing of the sweet potato fortified with Zinc and Calcium  
Bosco, Daniela; Roche, Luis; Della Rocca, Patricia; Mascheroni, Rodolfo.
- 32 Formación de nanocomplejos entre polifenoles de cáscaras de manzanas y beta lactoglobulina para su potencial aplicación en alimentos funcionales**  
Nanocomplexes formation between polyphenols of apple peels and beta-lactoglobulin for their potential application in functional foods  
Llopart, Emilce E.; Busti, Pablo A.; Verdini, Roxana A.; Delorenzi, Néstor J.
- 37 Obtención de leche bovina reducida en grasa saturada y naturalmente enriquecida en ácido linoleico conjugado**  
Production of bovine milk reduced in saturated fat and naturally enriched in conjugated linoleic acid  
Gagliostro, Gerardo. A.; Antonacci, Liliana. E.; Carabajal, Augusto; López Plaván, Juan. M.; Crujeira, Yolanda.
- 44 Complejos vitamina E- $\beta$ -lactoglobulina incluidos en películas biopoliméricas de alginato de sodio**  
Vitamin E- $\beta$ -lactoglobulin complexes included in sodium alginate biopolymeric films  
Berino, Romina, P.; Pezzelatto, Diego A. F.; Báez, Germán, D.; Llopart, Emilce E.; Ballerini, Griselda, A.; Moro, Andrea; Delorenzi, Néstor; Busti, Pablo, A.
- 50 Efecto de la alta presión hidrostática en la exposición del contenido de sulfhidrilos libres en amilasa fúngica**  
Effect of high hydrostatic pressure on free sulfhydryl content from fungal  $\alpha$ -amylase  
Ormando, Paula; Vranic, María L.; Guidi, Silvina; Ambrosi, Vanina.

# Instrucciones a los autores para publicar en INNOTEC

## Ámbito de los artículos y proceso de revisión

INNOTEC publica artículos originales inéditos en español e inglés. Los campos temáticos que aborda responden a las áreas estratégicas de investigación del LATU: Forestales, Medio Ambiente, Metrología y Tecnología Alimentaria.

Esta publicación semestral arbitrada por un comité de revisores externos, recopila las investigaciones realizadas en el marco de distintos proyectos y procesos de transferencia de conocimiento para el desarrollo de sistemas innovadores, productivos y de investigación.

Las publicaciones editadas por el Centro de Información Técnica son gestionadas en Open Journal Systems, software para la gestión del proceso editorial, desarrollado, soportado y libremente distribuido por el Public Knowledge Project bajo licencia pública general GNU.

INNOTEC no cobra cargos de ningún tipo por el envío de originales ni por su procesamiento. El tiempo estimado para los procesos de evaluación y publicación es de 8 a 12 semanas.

El proceso de envío de artículos para la revista incluye los siguientes pasos:

- (a) Ingreso por parte del autor del artículo completo en el sistema utilizado por el Centro de Información Técnica para la edición de sus publicaciones en la web: <http://ojs.latu.org.uy>.
- (b) Por medio del sistema se notifica al autor la recepción del artículo y su eventual publicación. En este paso se considera la originalidad del trabajo y se priorizan aquellos de áreas estratégicas y temáticas nacionales.
- (c) Una vez aprobado por el Consejo editorial de la revista, el artículo es enviado a proceso de arbitraje.
- (d) Se asignan los árbitros, independientes y externos, quienes evaluarán el desarrollo específico del manuscrito, tanto en sus aspectos temáticos como metodológicos.
- (e) Devuelto el informe de arbitraje, el editor se comunica con el/los autor/es en respuesta de los comentarios que hace el evaluador del artículo. En caso de ser necesario habrá otras rondas de evaluación.
- (f) Se edita el artículo aplicando en el texto las normas del Manual de estilo del LATU y se envía la última versión diseñada al/los autor/es para su aprobación final.

Para poder incluir artículos completos, se debe considerar que estos no tengan derechos de autor otorgados a terceros a la fecha de envío y que no se hayan presentado a otras publicaciones simultáneamente. Los artículos son publicados en OJS y se distribuyen bajo la modalidad de acceso abierto. Los derechos autorales son protegidos por Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial 4.0 Unported. Al ingresar al sistema <http://ojs.latu.org.uy> los autores deberán aceptar la nota de copyright en la que se asumen los términos de responsabilidad, se reconoce la licencia CC y se establece el compromiso a realizar la cita completa de la edición institucional de esta primera

publicación del artículo en sus siguientes publicaciones –completas o parciales– efectuadas en cualquier otro medio de divulgación, impreso o electrónico.

Los autores están autorizados a realizar una publicación simultánea en sistemas de autoarchivo o repositorios institucionales.

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. El 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.

## Proceso de revisión

El arbitraje de esta revista se realiza por pares y bajo modalidad doble ciego, por lo que autores y árbitros permanecen anónimos a lo largo de todo el proceso. El arbitraje es el proceso de evaluación crítica especializada de un manuscrito por parte de pares idóneos que operan en el área temática que dicho texto desarrolla. Cada artículo es revisado por un mínimo de dos árbitros. Los comentarios y recomendaciones de los evaluadores son un insumo determinante para la aceptación o rechazo de un manuscrito en el proceso editorial de publicaciones técnicas del LATU, no obstante el equipo editor es responsable de la decisión final de publicación o rechazo de un artículo y de la notificación al autor de contacto.

El comité técnico de arbitraje de INNOTEC es un cuerpo de especialistas técnicos seleccionados por su grado de especialización, prestigio académico y experiencia profesional y editorial. Nuestros árbitros cumplen la vital función de evaluar el desarrollo específico del contenido de las publicaciones, tanto en sus aspectos temáticos como metodológicos, guiados por un formulario de revisión que una vez completo es presentado a los autores del artículo.

Los autores cuentan con un plazo de siete días para la devolución del artículo corregido según las recomendaciones de los árbitros.

## Normas de presentación y envío de los textos

Para que el artículo sea considerado para su publicación, debe cumplir con las siguientes normas de presentación. Ante cualquier consulta diríjase al correo electrónico de referencia [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy).

Para el correcto envío de su artículo, siga las instrucciones que se indican en OJS. Recuerde completar todos los datos del artículo, entre ellos: título, autores, filiación, resumen y palabras clave.

Nota: Los nombres completos de los autores deberán ser incluidos en los metadatos en la forma en la que se solicitan en OJS pero omitidos en el documento Word del artículo, primera medida para asegurar la integridad de la revisión ciega.

## Definiciones:

**Autor.** Persona o colectividad responsable del contenido intelectual del documento.

**Título.** Refleja el contenido del texto con precisión, 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.

**Materiales 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 hallazgos en tablas, gráficos y/o figuras.

**Discusión y Conclusiones.** Síntesis de los avances y las contribuciones más relevantes de la investigación. En esta sección se discuten los resultados en el orden en el que fueron presentados. Asimismo, se define y diferencia claramente el aporte del trabajo en relación al conocimiento previo. Si procede, se mencionan posibles líneas futuras de investigación y de aplicación de los resultados.

**Reconocimientos.** Breve agradecimiento a quienes colaboraron en la producción del artículo y/o que permitieron el desarrollo de la investigación.

**Referencias.** Referencias al material bibliográfico consultado para la elaboración del artículo.

## Los artículos deben presentar:

**Título** del artículo en mayúsculas y minúsculas, en inglés y español.

**Nombre completo de todos los autores (solo en metadatos de OJS)**, ingresados en orden decreciente según el grado de responsabilidad en el desarrollo del artículo, sin que medien jerarquías funcionales. Indicar la sección o departamento al que pertenecen y empresa de la que forman parte. Se debe señalar además el autor de contacto para las comunicaciones electrónicas subsiguientes. Los autores deberán contar con un número de registro en ORCID, que se consigna en OJS al ingresar los autores en metadatos. Para más información sobre ORCID y su relevancia para los autores puede consultar esta página: <https://orcid.org/>.

**Resumen** en inglés y español, de 200 palabras máximo en su versión castellana.

**Palabras clave**, de dos a cinco, las cuales no deben repetir los términos ya utilizados en el título.

**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, gráficos e imágenes, (ver sección *Estilo y formato de citas y referencias* en este documento). El texto deberá ser presentado en fuente Arial 11, a espacio doble y con numeración de líneas, con títulos en mayúsculas y minúsculas y en formato .doc, de cualquier versión de Microsoft Word.

**Secciones.** Los títulos de sección (que señalan Introducción, Materiales y Métodos, Discusión, etc.) deben ser escritos en mayúscula y minúsculas, estilo de fuente bold y centrados en el texto. Los subtítulos serán justificados a la izquierda, escritos en mayúscula y minúsculas, también en 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 y gráficos.** Las figuras deben numerarse correlativamente en orden de aparición en el texto, y deben incluir un breve título explicativo en el margen inferior. Si es necesario incluir fotos o imágenes, estas se deben designar como figuras, deben ser nítidas y enviadas en formato jpg (mínimo 300 px aseguran una buena calidad de visualización). Las tablas deben ser numeradas correlativamente y en forma independiente de las figuras, y cada entrada debe ocupar su propia celda. Las tablas se numeran según el orden de aparición en el texto, y su título explicativo debe ubicarse en el margen inferior. Evite utilizar líneas verticales, incluir más de dos tablas por carilla y dividir tablas en más de un folio o en forma perpendicular al texto. Recuerde que el texto presenta las tablas, no desarrolla su contenido, estas deben explicarse en sí mismas.

Los gráficos deben ser enviados en formato xls o doc, con los datos editables, para su eventual utilización en la etapa de diseño. No se consideran válidos los gráficos enviados en formato jpg, salvo en los casos en los que hayan sido creados en programas que no habilitan la exportación a Excel.

Además de estar insertadas en el artículo, cada figura, gráfico y tabla debe ser remitida en su propio archivo como fichero complementario en OJS, con la referencia numérica correspondiente. Los números y símbolos empleados no deben ser menores al tamaño usado en el resto del texto (Arial 11).

Evite las notas al pie en el desarrollo del artículo.

Denominaciones en latín: deben ir en cursiva.

## Estilo de citas y referencias según el sistema Harvard

Si el texto está en inglés utilizar "and" en lugar de "y", "In:" en lugar de "En:", "[Accessed: day month year]" en lugar de "[Consulta: día mes año]" y "Available at:" en lugar de "Disponible en:"

## Ejemplos usuales de citas

*Registro de citas textuales*

(López, 1985, p.93)

(González y Rubio, 1990, pp.110-111)

(Johnson, et al., 1970, pp.25-26)

*Para más de una obra del mismo autor y año en citas textuales*

(Alonso, 1988a, p.126-128)

(Alonso, 1988b, p.84)

*Registro de cita ideológica o paráfrasis*

---

Amor (2000) analiza los motivos para comenzar un negocio en línea...

Si el motivo para comenzar un negocio en línea es sólo para imitar a la competencia, se puede considerar que dicha razón no es la estrategia adecuada (Amor, 2000).

(Pérez y González, 2005)

(Rodríguez, et al., 2011).

(Pérez, 2014a)

(Pérez, 2014b)

### **Ejemplos usuales de referencias Monografías (libros)**

Apellidos(s), Nombre o Inicial, año de edición. Título del libro en cursiva. Nº de edición. Lugar de edición: editorial. (Serie; Nº). ISBN (Este último si se posee)

Bobbio, Norberto, 1958. *Autobiografía*. Madrid: Taurus. ISBN: 84-306-0267-4.

Newman, R., Walter, C., 2008. *Barley for food and health: science, technology, and products*. Nueva York: John Wiley & Sons

### **Revistas como un todo**

Título de la publicación en cursiva. 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 o Inicial, año. Título del artículo. En: Título de la publicación seriada, Volumen(Número), páginas.

Llosa, J., Smith, M., Moore, A. y Cave, K., 1998. Modulo scheduling with reduced register pressure. En: *IEEE Transactions on computers*, 47(6), pp.625-638.

Álvarez, Begoña, Ballina, F. Javier de la y Vázquez, Rodolfo, 2000. La reacción del consumidor ante las promociones. En: *MK Marketing + Ventas*, (143), pp.33-37.

### **Normas**

Entidad responsable de la norma (País de la entidad), año de publicación. No. o código de la norma: Título. Lugar de publicación: editorial abreviada.

Asociación Española de Normalización y Certificación (España), 2010. UNE 166000 EX, UNE 166001 EX, UNE 166002 EX: *Gestión de la I+D+I*. Madrid: AENOR.

Instituto Uruguayo de Normas Técnicas (Uruguay), 2000. UNIT-ISO 9001: *Sistemas de gestión de calidad - requisitos*. Montevideo: UNIT.

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

Responsabilidad principal, año. Título [tipo de soporte]. Edición. Lugar de publicación: editor, [fecha de consulta]. Descripción física. (Colección). Notas. Disponibilidad y acceso. Número normalizado

Rapp, A. O., Augusta, U. y Peek, R. D., 2001 *Facts and ideas of testing wood durability above ground* [En línea]. Hamburgo: BFH. [Consulta: 25 de setiembre de 2008]. Disponible en: <http://www.bfafh.de/inst4/43/pdf/3doublay.pdf>

### **Patentes**

Mención de responsabilidad principal, Año de publicación del documento. Denominación del elemento patentado. Identificador del documento (país u oficina que lo registra). Clase internacional de documento de patente. Número.

Green, Daniel R., 2008. *Cereal flake with topical pieces*. United State Patent. 0101. D572,427.

Crosa, M. J., Harispe, R., Repiso, L., Silvera, C. y Wurtz, P, 2009. *Sistema que acelera el ingreso de solutos en alimentos porosos*. Uruguay. Dirección Nacional de la Propiedad Industrial. 31620.

# Efecto de la aplicación de ácido láctico sobre *Listeria monocytogenes* en carne envasada al vacío en Uruguay

## Effect of lactic acid application on *Listeria monocytogenes* in vacuum packed meat in Uruguay

Brugnini, Giannina (1); Acquistapace, María Jesús (1); Rodríguez, Soledad (1); Rufo, Caterina (1).  
(1) Área de Alimentos y Nutrición, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República, Canelones, Uruguay.

Contacto: gbrugnini@fq.edu.uy

RECIBIDO: 22/3/2018 – APROBADO: 4/6/2018

### Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto de la aplicación de ácido láctico en carne envasada al vacío sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, utilizando cepas aisladas de frigoríficos nacionales. Se aislaron e identificaron 35 cepas de *Listeria*: 29 *L. innocua* y 6 *L. monocytogenes* pertenecientes a más de un serotipo. Todos los aislamientos presentaron sensibilidad al ácido láctico in vitro. La concentración mínima inhibitoria en TSB-YE fue de 0,3% y la concentración mínima bactericida, de 0,7%.

En muestras de carne inoculadas con el aislado L100A1 tratadas con ácido láctico al 2,5%, envasadas al vacío y conservadas a 4 °C, se logró una reducción inicial de L100A1 de 1,1 log; al final de las ocho semanas la reducción había alcanzado 1,5 log, mostrando un efecto sinérgico entre el ácido láctico y el envasado al vacío. A concentraciones de ácido láctico de 5% no se observó sinergia y la inhibición de 1,4log inicial se mantuvo constante en el tiempo. En suma, el uso de ácido láctico entre 2,5 y 5% en carne envasada al vacío reduce significativamente los recuentos de *L. monocytogenes* y puede utilizarse como estrategia adicional para su control en cortes cárnicos de alto valor.

**Palabras clave:** Inocuidad, microorganismos patógenos, productos cárnicos.

### Abstract

In this work, the effect of the application of lactic acid on *Listeria monocytogenes* growth was evaluated in vacuum packed meat using strains isolated from local slaughter houses. Thirty-five strains of *Listeria* were isolated and identified: 29 *L. innocua* and 6 *L. monocytogenes* belonging to more than one serotype. All the isolates showed sensitivity to lactic acid in vitro. The minimum inhibitory concentration in TSB-YE was 0,3% and the minimum bactericidal concentration was 0,7%. The L100A1 isolate was used in the meat study. In meat samples treated with 2,5% lactic acid, packed in vacuum and stored at 4 °C, an initial reduction of L100A1 of 1,1 log was achieved. By the end of eight weeks the reduction had reached 1,5 log showing a synergistic effect between lactic acid and vacuum packaging. When 5% lactic acid concentrations were used, no synergy was observed and the initial 1,4 log growth inhibition remained constant over time. In sum, the use of lactic acid at concentrations between 2,5 and 5% in vacuum packed meat significantly reduces *L. monocytogenes* counts and can be used as an additional hurdle in high value meat cuts.

**Keywords:** Food Safety, pathogenic microorganisms, meat products.

## Introducción

*Listeria monocytogenes* es una bacteria patógena causante de listeriosis, una enfermedad rara pero severa con una alta tasa de mortalidad (Buchanan, et al., 2017). Tanto en Estados Unidos como en la Unión Europea se evidenció una tendencia creciente en el número de brotes de listeriosis entre los años 2008 y 2015 (EFSA-ECDC, 2016; CDC, 2014). En Uruguay, en el año 2016 hubo un aumento de casos de listeriosis invasiva, y se reportaron 13 casos de los cuales cuatro fueron letales (MSP, 2017).

*L. monocytogenes* puede crecer en ausencia de oxígeno, en un amplio rango de pH (entre 4,4 – 9,4) y a temperatu-

ras de refrigeración (Nychas, et al., 2008), y es uno de los patógenos más prevalentes en carne y productos cárnicos (Mor-Mur y Yuste, 2010).

En lo que respecta a carne producida en Uruguay, los datos disponibles indican que la contaminación con *L. monocytogenes* es frecuente. En este sentido, Bosilevac et al. (2007) encontraron al analizar 226 muestras de carne uruguaya que el 24% estaban contaminadas con *L. monocytogenes*. También se reportaron hallazgos de *L. monocytogenes* en carne uruguaya exportada a Rusia (European Commission, s.d.).

Debido al riesgo potencial que presentan la carne y sus productos, la industria frigorífica debe implementar distintas

estrategias para reducir las poblaciones de patógenos en la carne cruda. La aplicación de ácidos orgánicos ha sido investigada como una posible estrategia para reducir los niveles bacterianos en carne (Rajkovic, et al., 2010).

El ácido láctico, que posee efectos bacteriostáticos y bactericidas, fue aprobado principalmente como estrategia para disminuir la contaminación por *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella*. Mientras que Estados Unidos permitió su uso en carne desde 1999 (Koohmaraie, et al., 2005), la Unión Europea (UE) lo aprobó recién en 2013 (Unión Europea, 2013). Actualmente, en muchos países se aplica en establecimientos frigoríficos de manera rutinaria para reducir la contaminación bacteriana.

El Reglamento de la UE establece un rango permitido de concentración de la solución de ácido láctico de entre 2 y 5%, y 2% es la concentración más utilizada en la industria (Dormedy, et al., 2000). Cuando se usa entre 2 y 4%, reduce el número de *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* (Gill y Badoni, 2004; Yoder, et al., 2012) y *L. monocytogenes* (Theron y Lues, 2007; Byelashov, et al., 2010). También se ha descrito para *L. monocytogenes* un efecto de inhibición sobre la cepa *L. monocytogenes* Scott A sinérgico entre el envasado al vacío y la aplicación de ácido láctico (Ariyapitipun, et al., 2000). Sobre la carne envasada al vacío proliferan bacterias ácido lácticas que pueden ejercer efecto bactericida sobre *L. monocytogenes* mediante la producción de ácido láctico y bacteriocinas (Vignolo, et al., 2012).

El mecanismo de acción del ácido láctico depende de la capacidad del ácido no disociado para penetrar a través de la membrana celular y disociarse dentro de la bacteria, causando una disminución en el pH interno que puede interrumpir la producción de ATP, la síntesis de ARN, la replicación del ADN y el crecimiento celular (Rajkovic, et al., 2010). Algunas cepas de *L. monocytogenes* tienen la habilidad de adaptarse y persistir en plantas de procesamiento de alimentos (Ferreira, et al., 2014). Esta persistencia puede explicarse por la capacidad de formar biofilms y por la tolerancia a los distintos sanitizantes y estrategias de control como el pH, temperatura y estrés salino que se utilizan a menudo en la industria. Se ha observado heterogeneidad y resistencia a distintos tipos de estrés entre cepas (Metselaar, et al., 2013), por ello es importante estudiar el comportamiento frente al ácido láctico de cepas aisladas de la misma matriz en las mismas condiciones de procesamiento que se pretende implementar la intervención.

Los cortes cárnicos de mayor valor se comercializan envasados al vacío con una vida útil de hasta dos meses si son conservados a 4 °C (García, et al., 2015), y debe garantizarse su inocuidad durante toda su vida útil. Por ello, se espera que el ácido láctico controle el crecimiento de *L. monocytogenes* en el sistema carne envasada al vacío. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue aislar cepas de *L. monocytogenes* presentes en establecimientos frigoríficos nacionales y estudiar el efecto del ácido láctico sobre su crecimiento en carne envasada al vacío y las implicancias de su aplicación sobre la inocuidad del producto durante su vida útil.

## Materiales y Métodos

### Muestreos

Las muestras fueron tomadas en dos establecimientos frigoríficos (F1 y F2) de Uruguay en dos visitas a cada frigorífico durante julio y agosto. Estos frigoríficos no estaban utilizan-

do la aplicación de ácido láctico sobre carcasa. Se realizó un muestreo dirigido, se tomaron muestras de superficie de 12 medias reses antes de ingresar a cámaras de maduración, y se tomaron 10 muestras de carne en diferentes puntos de la cinta transportadora de la línea de desosado de los cortes del trasero.

Las muestras de superficie de las medias reses se realizaron utilizando esponjas estériles (Whirl-Pak<sup>®</sup>) previamente hidratadas con 10 mL de buffer Butterfield. Se utilizó una esponja por cada media res, y la superficie total muestreada fue de aproximadamente 8000 cm<sup>2</sup> (4000 cm<sup>2</sup> del trasero y 4000 cm<sup>2</sup> del delantero de una misma media res) como lo reporta Arthur (2004). El muestreo se realizó haciendo trazos verticales con la esponja de arriba hacia abajo y horizontales de izquierda a derecha. La esponja se volteó en el pasaje de los trazos horizontales a verticales. Para las muestras de carne se tomaron asépticamente 100 gramos de 10 cortes seleccionados al azar y se colocaron en bolsas estériles.

Las esponjas y las muestras de carne se conservaron refrigeradas y se trasladaron hacia el laboratorio para su análisis.

### Aislamiento de *Listeria* spp.

Los aislamientos de *Listeria* spp. se realizaron directamente de las esponjas para el caso de las muestras tomadas de la superficie de las medias reses, mientras que para la carne se tomaron 10 gramos de cada muestra. Esponjas y carne se colocaron individualmente en bolsas estériles para stomacher con 90 mL de medio Half Fraser (Oxoid), con suplemento Half Fraser SR0166 (Thermo) y se incubaron a 30 °C durante 24 ± 3 horas. Posteriormente, se transfirieron 0,1 mL de los cultivos a 10 mL de medio de enriquecimiento secundario Fraser (Oxoid), con agregado de suplemento Fraser SR0156 (Thermo) y se incubaron a 37 °C durante 48 ± 3 horas. Luego, se sembró por estrías una ansada sobre placas de agar Palcam con agregado del suplemento selectivo para Palcam SR0150 (Thermo) y se incubaron 48 horas a 37 °C. Las colonias características de *Listeria* spp. en agar Palcam presentan aproximadamente 2 mm de diámetro y una coloración verde-grisácea con halo marrón oscuro-negro. Las colonias con esta morfología se aislaron sucesivamente en placas con agar tripticosa de soja (TSA) (Oxoid) suplementado con 0,6% de extracto de levadura (YE) (Oxoid) con el fin de obtener cultivos puros, y se incubaron 18 horas a 37 °C. Para su conservación, se repicaron de una colonia a un tubo de TSA-YE inclinado, y se incubaron 18-20 horas a 37 °C. Luego se mantuvieron refrigeradas (4 ± 1 °C) hasta el momento de su uso.

### Identificación según propiedades bioquímicas

Se caracterizaron los aislamientos mediante tinción de Gram, actividad catalasa y galerías API. Para realizar la tinción de Gram y la prueba de catalasa se partió de una colonia de un cultivo joven (18-24 horas) de placas de TSA-YE. Para el sistema de galerías API *Listeria*, se suspendieron tres colonias aisladas de cultivos jóvenes (18-24 horas) en una ampolla de API Suspension Medium (2 mL) y se ajustó a una suspensión igual a 1 de McFarland. Se sembraron 50 µL con la suspensión en todos los tubos de la galería, excepto en el ensayo DIM, que se sembraron 100 µL según instrucciones del fabricante. Se incubó 18-24 horas a 36 ± 2 °C en atmósfera aerobia.



## Identificación molecular

Se realizó la confirmación de género y especie de los aislamientos a nivel molecular usando una PCR multiplex a tiempo final y una PCR a tiempo real. Para la extracción de ADN genómico de todos los aislamientos de *Listeria* se utilizó el kit Mericon™DNA Bacteria Plus Kit (Qiagen), a partir de 1 mL de cultivo en medio TSB con extracto de levadura incubados a 37 °C durante 18 horas. La PCR múltiplex utilizada fue una modificación de la reportada por Bubert et al. (1999). Se utilizaron los cebadores, MonoA(F), Ino2(F) y Siwi2(F) y Lis1B(R) (Bubert, et al., 1999) y Gra1(F) (Acquistapace, 2015). Los cebadores fueron sintetizados por MacroGen Inc. (Seúl, Corea). La reacción consistió en 30 ciclos: 95 °C durante 15 segundos, 58 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 50 segundos. Se utilizó un termociclador Rotor-Gene Q. Se usó como control negativo agua miliQ estéril, como control positivo para *L. innocua*, la cepa de *L. innocua* ATCC 33090, y como control positivo para *L. monocytogenes*, la cepa de ATCC 19111. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en buffer TAE 1X. Los productos de PCR se sembraron con buffer Loading Dye 6X (Thermo Scientific) y se utilizó el marcador de peso molecular de 1 Kb (Thermo Scientific).

Para la PCR a tiempo real se utilizaron los pares de cebadores prs-2(F) y prs-2-deg(R) para identificar *Listeria* spp., el par hlyA-177(F) y (R) y el par hlyA-146-deg-tronc(F) y (R), ambos para identificar *L. monocytogenes* (Barbau-Piednoir, et al., 2013). El programa térmico para las tres reacciones consistió en: un ciclo de activación de ADN polimerasa de 5 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos de amplificación de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. Luego se realizó la curva de desnaturalización (*melting*) de los productos de la amplificación mediante el aumento gradual de la temperatura de 60 a 95 °C en 20 minutos ( $\pm 0,6$  °C/20 segundos) utilizando el mismo termociclador que para la PCR multiplex. La reacción se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ L, con 2  $\mu$ L de ADN muestra, 1X Rotor-Gene™SYBR Green PCR MasterMix (Qiagen) y 500 nM de cada cebador.

## Sensibilidad de los aislamientos frente al ácido láctico en placa

Para evaluar la sensibilidad al ácido láctico de los aislamientos de *Listeria*, se determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) mediante la técnica de microdilución en caldo y posterior siembra en placas de agar Palcam con agregado del suplemento selectivo para Palcam (SR0150 Thermo) para el recuento de viables. Para ello se seleccionaron todos los aislamientos identificados como *L. monocytogenes*. Los inóculos se prepararon a partir de cultivos en fase exponencial, ajustando la absorbancia (625 nm) en un rango entre 0,08 y 0,10 equivalente al patrón 0,5 de la escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  ufc/mL). A continuación se realizó la dilución correspondiente en buffer Butterfield estéril para alcanzar una concentración final de  $1 \times 10^6$  ufc/mL.

Las soluciones de ácido láctico de diferentes concentraciones se prepararon con agua destilada estéril a partir de una solución comercial de ácido láctico 85% (m/v) (Nortetur S.A., Montevideo).

Para determinar la CMI se utilizaron placas de 96 pocillos. La concentración inicial del inóculo en cada pocillo fue de

$2,5 \times 10^6$  ufc/mL y las concentraciones finales de ácido láctico en el pocillo fueron 1,2%, 0,7%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1% y 0%. Se realizaron controles positivos (inóculo + TSB-YE) y controles negativos (la concentración más alta de ácido láctico + TSB-YE). Las placas se incubaron a 35 °C durante 16-20 horas. La lectura de absorbancia de la microplaca se realizó en un lector de placas Multiskan Ex, Thermo Scientific® a 620 nm. Se considera la concentración mínima inhibitoria (CMI) a la mínima concentración de ácido láctico en la que no se observa desarrollo bacteriano (valor de OD  $\leq 0,05$ ) (Branen, et al., 2004). A su vez, se midió el pH en la microplaca luego del periodo de incubación para las distintas concentraciones de ácido utilizando un pHmetro Hanna® modelo 9025c.

Para determinar la CMB se tomaron 100  $\mu$ L de los pocillos sin crecimiento visible de la bacteria (OD  $\leq 0,05$ ) y se sembraron en placas de agar Palcam con agregado del suplemento selectivo para Palcam (SR0150 Thermo). Las placas de agar Palcam se incubaron 24-48 horas a 37 °C. Se considera la concentración mínima bactericida (CMB) a la menor concentración de ácido láctico que en placas de agar es capaz de eliminar el 99,99% del inóculo inicial (lo que se visualiza por la ausencia de colonias en placa). Los ensayos se realizaron por triplicado para cada aislamiento seleccionado. Las diferencias entre los tratamientos se determinaron mediante ANOVA, seguido de la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando el programa IBM SPSS Statistics 20.

## Sensibilidad de los aislamientos frente al ácido láctico en carne

Para evaluar la sensibilidad al ácido láctico en carne se eligió el aislado de *L. monocytogenes* L100A1. La carne usada correspondió a un corte de bife angosto (músculo largo dorsal) envasado al vacío adquirido en una carnicería de Montevideo, del cual se cortaron trozos de 10 gramos (5 cm x 5 cm). Luego se colocaron sobre una superficie limpia, previamente expuesta a radiación UV durante 20 minutos y se inocularon asepticamente con 1 mL de L100A1 de  $1 \times 10^6$  ufc/mL (preparado como se indica en los ensayos de sensibilidad de los aislamientos frente al ácido láctico en placa). Se dejaron 20 minutos a temperatura ambiente (22 °C) para permitir la fijación del inóculo a la superficie de cada trozo de carne (Carpenter, et al., 2011) previo a aplicar el tratamiento de ácido láctico.

### Ensayo 1

Seis trozos de 10 gramos de carne se inocularon con 1 mL de un cultivo  $1 \times 10^6$  ufc/mL del aislado L100A1 y se trataron por duplicado con ácido láctico al 0, 2,5% y 5% en una relación de 0,03 mL de ácido por cm<sup>2</sup> de carne (Youssef, et al., 2012). Luego de 20 minutos, los trozos de carne tratados se envasaron al vacío individualmente en bolsas Cryovac T7335B, utilizando una envasadora SAMMIC modelo V-410SGI. Un grupo de muestras se analizó inmediatamente (tiempo cero) y el segundo grupo fue almacenado a 4 °C y analizado a los 14 días. A su vez, se prepararon seis trozos de carne adicionales (uno por cada concentración de ácido láctico) sobre los cuales se midió y registró el pH superficial de la carne para ambos tiempos, utilizando un pHmetro Hanna® modelo 9025c con un electrodo de superficie.

Para el análisis de cada muestra se transfirió asepticamente el trozo de carne a una bolsa estéril para stomacher y se

homogeneizó con 90 mL de buffer Butterfield en Stomacher Seward 400C LabBlenders, a 230 rpm durante 2 minutos. Se plaquearon 100  $\mu$ L de ese caldo en placas de agar Palcam con agregado del suplemento selectivo para Palcam (SR0150 Thermo), y se incubaron 24-48 horas a 37 °C. Se realizaron los recuentos de *L. monocytogenes* y los resultados se expresaron como log ufc/g de carne. Las diferencias entre los tratamientos se determinaron mediante ANOVA, seguido de la prueba de Tukey con un nivel de significación del 5% ( $p < 0,05$ ) utilizando el programa IBM SPSS Statistics 20.

## Ensayo 2

Quince trozos de 10 gramos de carne se inocularon con 1 mL de  $1 \times 10^6$  ufc/mL del aislado L100A1, y se separaron en tres subgrupos que se trataron con diferentes concentraciones de ácido láctico (5%, 2,5% y 0%). Todas las muestras se envasaron individualmente al vacío y se almacenaron a 4 °C. Los recuentos de *L. monocytogenes* se determinaron a la semana 1, 2, 3, 5 y 8, como se describió para el ensayo 1. También se realizó recuento de bacterias ácido lácticas (BALs) a las muestras tratadas con 5% y sin ácido láctico en medio MRS agar mediante siembra incorporada. Las placas se incubaron a 25 °C durante 72 horas. Se realizaron dos ensayos independientes y los resultados de los recuentos se analizaron como se mencionó en el ensayo 1.

## Resultados y Discusión

### Búsqueda de *Listeria* spp.

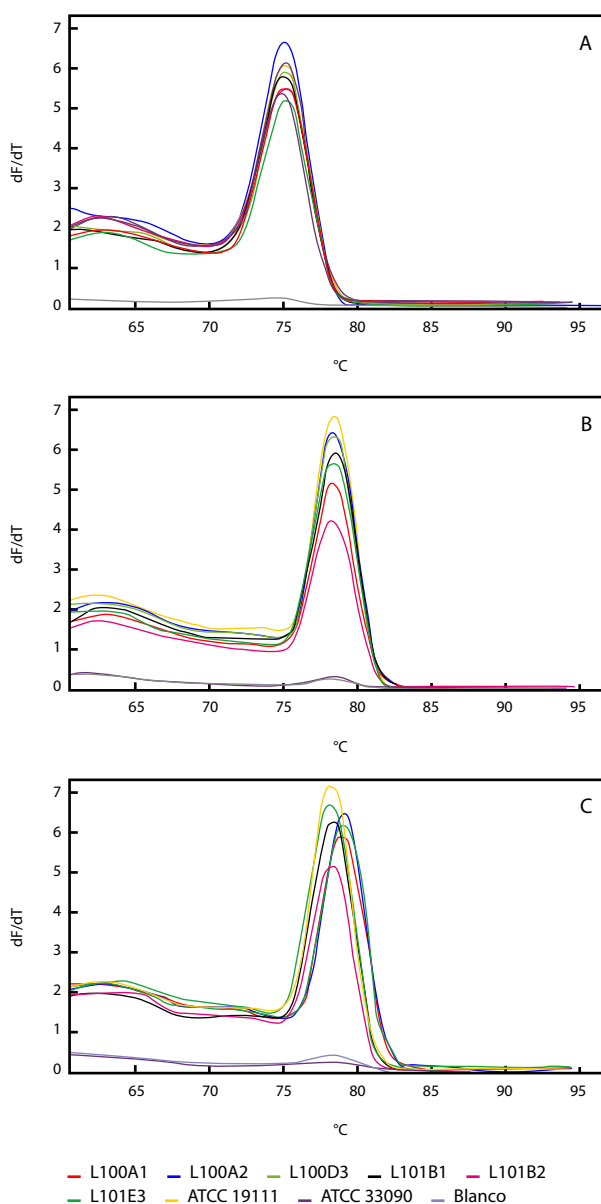
Del muestreo realizado sobre la superficie de las medias reses antes de la cámara de maduración, no se recuperó *Listeria* spp., pero sí se recuperó de todas las muestras de carne tomadas en la sala de desosado de ambos establecimientos frigoríficos. A pesar de haber analizado un número bajo de muestras, los resultados concuerdan con lo reportado por Nychas et al. (2008) y McLaughlin (2004): la contaminación por *Listeria* spp. se debe principalmente a la contaminación que se produce durante la manipulación por cepas presentes en ambiente y equipos.

Por otro lado, el hecho de que se haya recuperado *Listeria* de todas las muestras de carne analizadas en ambos establecimientos se debe a que las muestras se tomaron en sitios de alto riesgo de contaminación y a la existencia de una alta prevalencia. En este sentido, Bosilevac et al. (2007) determinaron en carne uruguaya exportada a Estados Unidos una prevalencia de *Listeria* del 29%, es decir, 66 de las 226 muestras analizadas contenían al menos una especie.

En cuanto a las características de los aislamientos, todos fueron Gram positivos y catalasa positivos, características propias del género *Listeria*. Los amplicones obtenidos utilizando la PCR multiplex (Bubert, et al., 1999) correspondieron a los tamaños esperados para *L. innocua* (870 bp) y para *L. monocytogenes* (660pb). No se observaron amplicones correspondientes a las especies *L. seliigeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. Los resultados del método molecular coincidieron con la identificación mediante galerías API. De los 35 aislamientos obtenidos, 29 correspondieron a *L. innocua* y 6 a *L. monocytogenes*. Todos los aislados de *L. monocytogenes* estudiados presentaron únicamente el perfil API 6510. Según Ballesteros (2009), los perfiles numéricos

más frecuentes en galerías API de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos son 6510 y 6110.

A los seis aislamientos identificados como *L. monocytogenes* por PCR multiplex y galerías API se les confirmó su identidad determinando la presencia de los genes *prs* y *hlyA* (Gráfico 1A y Gráfico 1B). A su vez, utilizando el par de cebadores *hlyA*-146-deg-tronc(F) y *hlyA*-146(R) se observa que las curvas de disociación de los amplicones correspondientes a los seis aislamientos se separan en dos grupos (Gráfico 1C). Barbau-Piednoir et al. (2013) reportaron que los serotipos 1/2a, 1/2c, 3a, 3c, 4a, 4d y 4e presentan una temperatura de melting ( $T_m$ ) de entre 73,5-74 °C, mientras que los serotipos 1/2b, 3b, 4b y 4c presentan una  $T_m$  de 75 °C. En este estudio, los aislados L100A1, L100A2 y L100D3 presentaron una  $T_m$  de 79 °C, mientras que L101B1, L101B2, L101E3 y la ATCC 19111 una  $T_m$  de 78,2 °C. El control positivo ATCC 19111



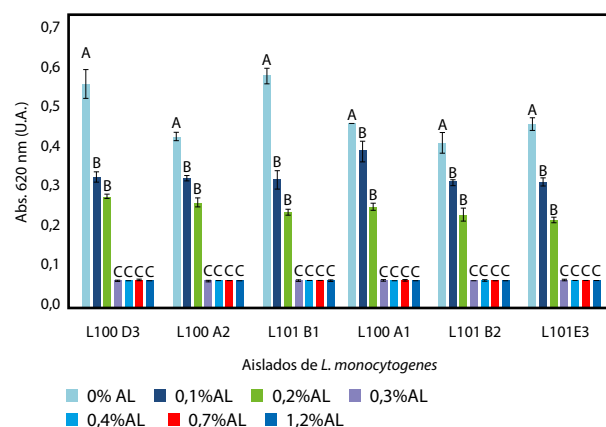
**Gráfico 1.** Curvas de disociación de qPCR obtenidas con SYBR® Green. Los diferentes ensayos de qPCR son **A:** *prs*-2-deg, **B:** *hlyA*-177 y **C:** *hlyA*-146-deg-tronc.

pertenece al serotipo 1/2a, en coincidencia con la presencia de esta cepa en el grupo de menor Tm. Por tanto, se puede inferir que se encontraron por lo menos dos serotipos distintos de *L. monocytogenes*. En línea con este resultado, Bosilevac et al. (2007) reportaron la existencia de distintos serotipos en las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de carne uruguaya: el 5% pertenecían al serotipo 1/2a, 28% al 1/2b, 29% al 1/2c y el 38% al 4b. A su vez, Braga (2017) también encontró que los serotipos de mayor frecuencia en alimentos uruguayos son los serotipos 1/2b y 4b, seguidos de los serotipos 1/2a y 1/2c.

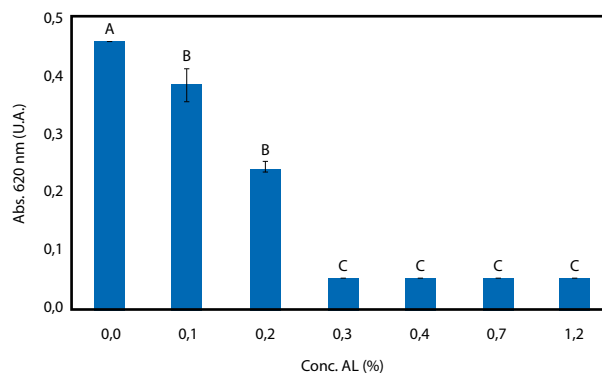
## Sensibilidad al ácido láctico en placa

Todos los aislados de *L. monocytogenes* (6) expuestos al ácido láctico presentaron el mismo patrón de inhibición de crecimiento (Gráfico 2). La mínima concentración de ácido láctico en el pocillo a partir de la cual no se observó crecimiento fue de 0,3%. La siembra en placas de agar Palcam de los cultivos provenientes de los pocillos de la microplaca en los que hubo inhibición de crecimiento mostró que a partir de una concentración de 0,7% ya no se recuperaron colonias viables (Tabla 1). Valores similares fueron reportados por Oh (1993), quien observó que una concentración de 0,25% de ácido láctico inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes* en caldo de TSB-YE a 35 °C. La inhibición del crecimiento de *Listeria* por ácido láctico ha sido ampliamente reportada y se atribuye a dos factores: al descenso del pH en el medio ambiente y a la capacidad de la forma no disociada de atravesar la membrana celular e interferir con el funcionamiento celular (Rajkovic, et al., 2010).

Para la condición ensayada con 0,7% de ácido láctico, donde no se observaron colonias viables, el pH fue de 4,5, acorde a los resultados de Sorrels (1989), que indican que el ácido láctico es más efectivo en inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* cuando alcanza valores de pH de entre 4,5 a 4,6. Los valores definidos como CMI y CMB para L100A1 se muestran en el Gráfico 3 y en la Tabla 1, respectivamente. El aislado L100A1 se eligió para continuar con los estudios en carne.



**Gráfico 2.** Sensibilidad de los aislamientos de *L. monocytogenes* frente a diferentes concentraciones de ácido láctico. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres medidas independientes. Para cada aislamiento letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 3.** Curvas de inhibición en TSB-YE en función de la concentración de ácido láctico (AL) para L100A1 (*L. monocytogenes*). Las barras de error representan el error estándar de la media de tres medidas independientes. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Aislado	Concentración de ácido láctico (%)				
	1,2	0,7	0,4	0,3	0,2
L100A1	-	-	+	+	+

**Tabla 1.** Recuperación de células viables en placas de agar Palcam provenientes del cultivo de la microplaca para L100A1. (-) ausencia de crecimiento bacteriano visible en placas (+) crecimiento bacteriano visible en placas.

## Efectos de la aplicación del ácido láctico sobre L100A1 en carne envasada al vacío

### pH superficial

La aplicación de ácido láctico reduce el pH de la superficie de la carne, que llega a 5,1 y 4,8 para los tratamientos de 2,5 y 5% de ácido láctico. La reducción es significativa ( $p < 0,05$ ) cuando se aplica ácido láctico al 5% (Tabla 2). A los 14 días no se observaron cambios significativos en los valores de pH y se mantiene la diferencia entre las muestras tratadas y no tratadas. Esta diferencia en pH debida a la aplicación de ácido láctico en carnes envasadas al vacío y conservadas a 4 °C fue reportada por Ariyapitipun et al. (2000), quienes observaron

Ácido láctico (%)	Tiempo cero		14 días	
	pH promedio	DS	pH promedio	DS
0	5,43 <sup>A</sup>	0,03	5,37 <sup>A</sup>	0,04
2,5	5,00 <sup>A,B</sup>	0,36	5,09 <sup>A,B</sup>	0,07
5	4,76 <sup>B</sup>	0,23	4,83 <sup>B</sup>	0,13

**Tabla 2.** Valores de pH superficial promedio de los trozos de carne medidos a tiempo 0 y a los 14 días de envasado. DS: desviación estándar. Para cada tiempo letras distintas en columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

que las diferencias de pH entre tratamientos seguían siendo significativas hasta los 21 días. Luego de este tiempo ya no se percibían diferencias, debido a que el pH de las muestras tratadas había aumentado, posiblemente por la penetración del ácido láctico en la carne y a la neutralización del ácido por las proteínas de la carne (Woolthuis, et al., 1985).

### Efecto bactericida y bacteriostático del ácido láctico sobre L100A1 en carne

La aplicación de ácido láctico en carne tiene un efecto bactericida inmediato sobre *L. monocytogenes* L100A1. Para las dos concentraciones de ácido láctico ensayadas a tiempo cero, la mayor disminución en los recuentos de *L. monocytogenes* se produjo con 5% de ácido láctico. La aplicación de ácido láctico al 2,5% redujo en 1,1 log, y al 5% la reducción fue de 1,4 log, significativa con respecto al control. Varios estudios mostraron el efecto bactericida del ácido láctico sobre *L. monocytogenes* (Gráfico 4). En este sentido, DeGeer et al. (2016) obtuvieron reducciones similares de *L. monocytogenes* en carne fresca tratada con soluciones de 2 y 4%, 0,85 log ufc/cm<sup>2</sup> y 1,3 log, respectivamente, mientras que Ariyapitipun et al. (2000) lograron una reducción de 1,56 log ufc/cm<sup>2</sup> aplicando una solución de ácido láctico al 2%. Las diferencias en la magnitud de la reducción entre los diferentes estudios pueden deberse, entre otros factores, a la variación entre las cepas utilizadas y al modo de aplicación de las soluciones de ácido láctico. En este estudio la cepa usada, L100A1, fue aislada de ambiente frigorífico luego de haber sufrido diferentes tipos de estrés que, según Skandamis (2008), pueden afectar la tolerancia en medios ácidos. Por otro lado, en este estudio el ácido láctico fue aplicado por aspersión, mientras que en los trabajos de DeGeer et al. (2016) y Ariyapitipun et al. (2000) fue por inmersión. Es posible que la aplicación de ácido láctico por inmersión logre obtener una mayor cantidad de ácido sobre la superficie de la carne.

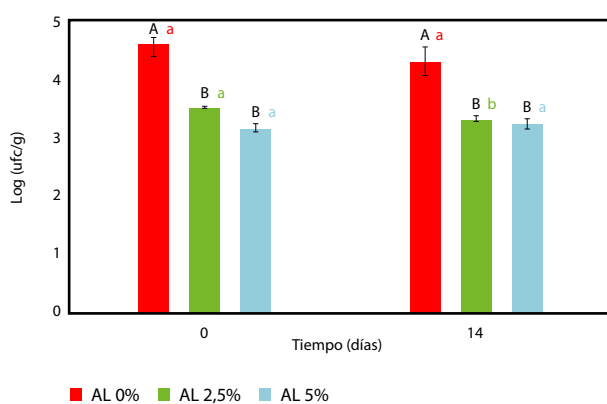
A los 14 días, las muestras envasadas al vacío y conservadas a 4 °C presentaron un descenso no significativo en los recuentos de L100A1 para las muestras sin tratar y significativo

( $p < 0,05$ ) para las muestras tratadas con 2,5% de ácido láctico (Gráfico 4) con respecto a su valor al tiempo 0. Para las muestras tratadas con 5% de ácido láctico no hubo cambios significativos al final de los 14 días.

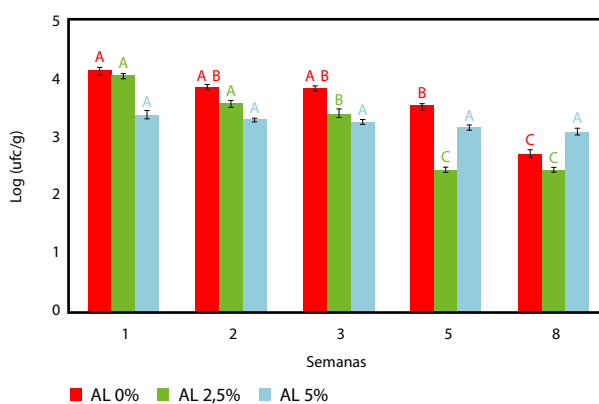
Este efecto bacteriostático de la aplicación de ácido láctico en condiciones de envasado al vacío y conservación a 4 °C se estudió durante ocho semanas, tiempo máximo de vida útil de la carne envasada al vacío y conservada a 4 °C (García, et al., 2015).

Durante este tiempo el patrón de crecimiento de *L. monocytogenes* L100A1 en las muestras no tratadas mostró que el envasado al vacío impidió el crecimiento de este organismo (Gráfico 5). Su crecimiento fue significativamente inhibido ( $p < 0,05$ ) hasta las ocho semanas. En este tiempo de almacenamiento, el número de células se redujo en aproximadamente 1,4 log ufc/g. Por otro lado, en las muestras tratadas con ácido láctico 2,5% se observó una reducción más pronunciada en el tiempo que en las muestras control, el número de L100A1 se redujo 1,6 log en cinco semanas, en línea con el efecto sinérgico previamente reportado por Ariyapitipun et al. (2000) entre el envasado al vacío, la baja temperatura y la aspersión con ácido láctico al 2,5%. Sin embargo, en las muestras tratadas con 5% de ácido láctico, el número de L100A1 se mantuvo constante durante las ocho semanas (Gráfico 5).

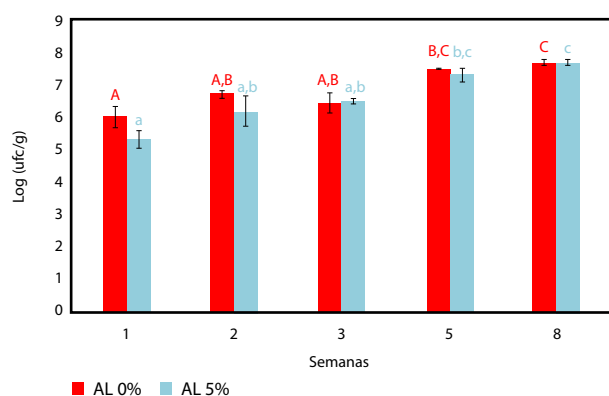
En la carne envasada al vacío y conservada a 4 °C se generan condiciones que inhiben el crecimiento de *Listeria*: pH 5,4 o inferior, baja temperatura y anaerobiosis. Además, en estas condiciones proliferan las bacterias ácido lácticas naturales de la carne, que producen ácidos orgánicos y bacteriocinas (Castellano, et al., 2008; Vignolo, et al., 2012) e inhiben el crecimiento de *Listeria* (Guerrieri, et al., 2009; Chaillou, et al., 2005; Holzapfel, et al., 1995; Jones, et al., 2004). En este trabajo, en paralelo a la disminución de *Listeria*, la población de bacterias ácido lácticas aumentó, tanto en las muestras tratadas como en las no tratadas con ácido láctico, desde 2,7 log ufc/g hasta valores por encima de 7 log ufc/g en cinco semanas (Gráfico 6), lo cual explicaría parte del efecto bacteriostático observado para las muestras control y las tratadas con 2,5% de ácido láctico. Sin embargo,



**Gráfico 4.** Recuentos promedio de *L. monocytogenes* L100A1 a tiempo 0 y a los 14 días en carnes con 5%, 2,5% y sin ácido láctico (AL). Las barras de error representan el error estándar de la media de dos medidas independientes. <sup>A,B</sup> Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en un mismo tiempo para diferentes tratamientos. <sup>a,b</sup> Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para un mismo tratamiento en diferentes tiempos.



**Gráfico 5.** Recuentos promedio de *L. monocytogenes* L100A1 durante ocho semanas para carnes tratadas con 5%, 2,5% y sin ácido láctico (AL). Las barras de error representan el error estándar de la media de dos medidas independientes. <sup>A,B,C</sup> Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el tiempo para un mismo tratamiento.



**Gráfico 6.** Recuentos de bacterias ácido lácticas (log ufc/g) durante ocho semanas en muestras tratadas con 5% y sin ácido láctico (AL). Las barras de error representan el error estándar de la media de dos medidas independientes. A,B,C Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el tiempo para las muestras sin AL. a,b,c Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el tiempo para las muestras con 5% de AL.

y a pesar de estar en las mismas condiciones, las bacterias que sobrevivieron a la aplicación inicial de ácido láctico al 5% aparentan ser más resistentes al estrés generado por el envasado al vacío y las bajas temperaturas. En línea con esta observación, la combinación de estrés subletales puede afectar la tolerancia de *L. monocytogenes* a medios ácidos o tratamientos térmicos posteriores (Skandamis, et al., 2008), lo que presenta un riesgo mayor en aquellos productos elaborados a partir de carne que no usan la cocción como estrategia de descontaminación.

## Conclusiones

La estrategia planteada de muestreo permitió aislar *Listeria monocytogenes* de muestras de carne tomadas en establecimientos frigoríficos nacionales. De los aislamientos estudiados hasta el momento, se evidencia la presencia de más de un serotipo de *L. monocytogenes*. Los aislamientos fueron sensibles al ácido láctico, tanto *in vitro* como en el sistema carne envasada al vacío y conservada a 4 °C. En este sistema se observó un efecto combinado entre el ácido láctico al 2,5% aplicado sobre la carne y el envasado al vacío. Sin embargo, a concentraciones de ácido láctico de 5% se observó una mayor resistencia a las condiciones generadas por el envasado al vacío. Se debe estudiar con mayor profundidad tanto la incidencia sobre la sobrevivencia de *L. monocytogenes* de la concentración del ácido láctico aplicado sobre la carne antes de envasarla a vacío como también el comportamiento, en esta situación, de los distintos aislamientos que persisten en el ambiente frigorífico nacional.

## Reconocimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por el Proyecto INNOVA 2, Cooperación Europea – ANII y a los dos establecimientos frigoríficos por toda su colaboración y por permitirnos el ingreso a sus instalaciones.

## Referencias

- Acquistapace, M.J., 2015. *Efecto de la aplicación de ácido láctico sobre el crecimiento de Listeria spp. aisladas de establecimientos frigoríficos nacionales*. Montevideo: Facultad de Ciencias. (Tesina de Grado).
- Ariyapitipun T., Mustapha A. y Clarke A. D., 2000. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid, and nisin. En: *Journal of Food Protection*, 63(1), pp.131-136.
- Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Nou, X., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Kent, M. P., Jaroni, D., Pauling, B., Allen, D. M. y Koohmaraie, M., 2004. *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. En: *Journal of Food Protection*, 67, pp.658–665.
- Ballesteros, L., 2009. *Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de listeria monocytogenes aisladas de vegetales congelados*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. (Tesis de Maestría).
- Barbau-Piednoir, E., Botteldoorn, N., Yde, M., Mahillon, J. y Roosens, N. H., 2013. Development and validation of qualitative SYBR® Green Real-Time PCR for detection and discrimination of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, pp.4021–4037.
- Bosilevac, J. M., Guerini, M. N., Brichta-Harhay, D. M., Arthur, T. M. y Koohmaraie, M., 2007. Microbiological characterization of imported and domestic boneless beef trim used for ground beef. En: *Journal of Food Protection*, 70(2), pp.440–449.
- Braga, V., Vázquez, S., Vico, V., Pastorino, V., Mota, M. I., Legnani, M., Schelotto, F., Lancibidad, G. y Varela, G., 2017. Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Montevideo-Uruguay. En: *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(8), pp.689-694.
- Branen, J. K. y Michael Davidson, P., 2004. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. En: *International Journal of Food Microbiology*, 90, pp.63-74.
- Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., Yoon, B., Goebel, W. y Wagner, M., 1999. Detection and Differentiation of *Listeria* spp. by a Single Reaction Based on Multiplex PCR. En: *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), pp.4688-4692.
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C. y Whiting, R. C., 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. En: *Food Control*, 75, pp.1–13.
- Byelashov, O. A., Daskalov, H., Geornaras, I., Kendall, P. A., Belk, K. E., Scanga, J. A., Smith, G. C. y Sofos, J. N., 2010. Reduction of *Listeria monocytogenes* on frankfurters treated with lactic acid solutions of various temperatures. En: *Food Microbiology*, 27, pp.783-790.
- Carpenter, C. E., Smith, J. V. y Broadbent, J. R., 2011. Efficacy of washing meat surfaces with 2% levulinic, acetic, or lactic acid for pathogen decontamination and residual growth inhibition. En: *Meat Science*, 88(2), pp.256-260.
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S. y Vignolo, G., 2008. A review of bacterogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. En: *Meat Science*, 79, pp.483-499.

- CDC, 2014. *CDC national health report: Leading causes of morbidity and mortality and associated behavioral risk and protective factors - United States, 2005 -2013* [En línea]. Atlanta: CDC. [Consulta: 7 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/25809>.
- Chaillou, S., Champomier-Vergès, M.C., Cornet, M., Crutz-Le, C., Dudez, A. M., Martin, V., Beaufile, S., Darbon-Rongère, E., Bossy, R., Loux, V. y Zagorec, M., 2005. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. En: *Nature Biotechnology*, 23(12), pp.1527–1533.
- DeGeer S. L., Wang, L., Hill, G. N., Singh, M., Bilgili, S. F. y Bratcher, C. L., 2016. Optimizing application parameters for lactic acid and sodium metasilicate against pathogens on fresh beef, pork and deli meats. En: *Meat Science*, 118, pp.28-33.
- Dormedy, E. S., Brashears, M. M., Cutter, C. N. y Burson, D. E., 2000. Validation of acid washes as critical control points in hazard analysis and critical control point systems. En: *Journal of Food Protection*, 63, pp.1676–1680.
- EFSA-ECDC, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. En: *EFSA Journal*, 14(12), pp.4634.
- European Commission, [s.d.]. *RASFF Portal. Food and feed safety alerts* [En línea]. [s.l.]: EuropeanCommission. [Consulta: 7 demarzo de 2018]. Disponible en: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList>
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P. y Stasiewicz, M. J., 2014. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. En: *Journal of Food Protection*, 77(1), pp.150–170.
- García, L., Brugnini, G., Rodríguez, S., Mir, A., Briano, B., Carriquiry, J. y Rufo, C., 2015. Vida útil de carne fresca de res envasada al vacío a 0°C y +4°C. En: *Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, 4, pp.27-45.
- Gill, C. O. y Badoni, M., 2004. Effects of peroxyacetic acid, acidified sodium chlorite or lactic acid solutions on the microflora of chilled beef carcasses. En: *International Journal of Food Microbiology*, 91, pp.43-50.
- Guerrieri, E., de Niederhäusern, S., Messi, P., Sabia, C., Iseppi, R., Anacarso, I. y Bondi, M., 2009. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. En: *Food Control*, 20, pp.861-865.
- Holzapfel W., Geisen R. y Schillinger U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food grade enzymes. En: *International Journal of Food Microbiology*, 24(3), pp.343-362.
- Jones, R. J., 2004. Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef. En: *International Journal of Food Microbiology*, 90(3), pp.273-282.
- Koohmaraie, M., Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Guerini, M., Shackelford, S. D. y Wheeler, T. L., 2005. Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. En: *Meat Science*, 71, pp.79–91.
- McLauchlin, J. M., Mitchell, R. T., Smerdonc, W. J. y Jewell, K., 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. En: *International Journal of Food Microbiology*, 92(1), pp.15-33.
- Metselaar, K. I., den Besten, H. M. W., Abee, T. A., Moezelaar, R. y Zwietering, M. I. H., 2013. Isolation and quantification of highly acid resistant variants of *Listeria monocytogenes*. En: *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), pp.508-514.
- Mor-Mur, M. y Yuste, J., 2010. Emerging bacterial pathogens in meat and poultry: an overview. En: *Food and Bioprocess Technology*, 3, pp.24-35.
- MSP, 2017. *Boletín epidemiológico - Mayo 2017* [En línea]. Montevideo: MSP. [Consulta: 7 de marzo de 2018] Disponible en <http://www.msp.gub.uy/publicaci%C3%B3n/bolet%C3%ADn-epidemiol%C3%B3gico-mayo-2017>
- Nychas, G., Panos, Skanadamis, P., Tassou, C. y Koutsoumanis, K., 2008. Meat spoilage during distribution. En: *Meat Science*, 78, pp.77-89.
- Oh, D. H. y Marshall, D. L., 1993. Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. En: *International Journal of Food Microbiology*, 20(4), pp.239-246.
- Rajkovic, A., Smigic, N. y Devlieghere, F., 2010. Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. En: *International Journal of Food Microbiology*, 141, pp.29–42.
- Skandamis, P. N., Yoon, Y., Stopforth, J. D., Kendall, P. A. y Sofos, J. N., 2008. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. En: *Food Microbiology*, 25(2), pp.294-303.
- Sorrels, K. M., Enigl, D.C. y Hatfield, J. R., 1989. Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. En: *Journal of Food Protection*, 52, pp.571-573.
- Theron, M. M. y Lues, J. F. R., 2007. Organic acids and meat preservation: a review. En: *Food Reviews International*, 23(2), pp.141-158.
- Unión Europea. Reglamento (UE) N° 101/2013. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 05 de febrero de 2013, L 34/1.
- Vignolo, G., Saavedra, L., Sesma, F. y Raya, R., 2012. Food bioprotection: lactic acid bacteria as natural preservatives. En: Bhat, Rajeev, Alias, Abd Karim y Paliyath, Gopinadhan, eds. *Progress in food preservation*. Cap.22. Nueva Jersey: John Wiley & Sons. pp.453–483.
- Woolthuis, C. H. J. y Smulders, F. J. M., 1985. Microbial decontamination of calf carcasses by lactic acid sprays. En: *Journal of Food Protection*, 48(10), pp.832-837.
- Yoder, S. F., Henning, W. R., Mills, E. W., Doores, S., Ostiguy, N. y Cutter, C. N., 2012. Investigation of chemical rinses suitable for very small meat plants to reduce pathogens on beef surfaces. En: *Journal of Food Protection*, 75(1), pp.14-21.
- Youssef, M. K., Yang, X., Badoni, M. y Gill, C. O., 2012. Effects of spray volume, type of surface tissue and inoculum level on the survival of *Escherichia coli* on beef sprayed with 5% lactic acid. En: *Food Control*, 25(2), pp.717-722.

# Aceptabilidad sensorial de una hamburguesa de carne vacuna y vegetales

## Sensory acceptability of a beef hamburger with vegetable ingredients

Urruzola, Nahir (1); Santana, Maite (1); Gámbaro, Adriana (1).

(1) Área Evaluación Sensorial, Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Contacto: [msantana@fq.edu.uy](mailto:msantana@fq.edu.uy)

RECIBIDO: 22/3/2018 APROBADO: 10/5/2018

### Resumen

El consumo de productos cárnicos ha sido en tiempos recientes evitado por consumidores, dado que se lo asocia con la prevalencia de enfermedades crónicas no transmisibles y obesidad. En función de esto se han elaborado estrategias para la mejora nutricional de este tipo de productos. En este trabajo, 100 consumidores evaluaron sensorialmente hamburguesas elaboradas a base de carne vacuna, verduras y condimentos, contra una hamburguesa casera de carne vacuna y orégano y una hamburguesa comercial congelada, utilizando escalas hedónicas y una pregunta marque-todo-lo-que-corresponda (CATA) compuesta de 32 términos. Al final del estudio se solicitó la descripción de una hamburguesa ideal. Los resultados obtenidos muestran que existe un segmento de la población estudiada interesada en una hamburguesa con incorporación de ingredientes vegetales y que le asignó un alto puntaje de aceptabilidad a la formulación desarrollada, describiéndola como tierna, natural, deliciosa, nutritiva, saludable y sabrosa y muy cercana a su concepto de hamburguesa "ideal".

**Palabras clave:** Hamburguesas, nutrición, saludable, carne, vegetales, análisis sensorial.

### Abstract

In recent times, the consumption of meat products has been avoided by consumers, as it is associated with the prevalence of noncommunicable diseases and obesity. As a consequence, recent strategies have been developed in order to enhance the nutritional composition of these types of products. In this study, 100 consumers evaluated from the sensory standpoint hamburgers produced with beef, vegetables and spices against a homemade formulation (composed of beef, salt and oregano), and a frozen commercial beef burger. 9-point hedonic scales were used, as well as a check-all-that-apply (CATA) composed of 32 terms; consumers were also asked to describe an "ideal hamburger". Results show that there is a segment of the studied population that is interested in a hamburger formulated with the addition of vegetable ingredients, having assigned a high acceptance score to the developed formula, and describing it as tender, natural, delicious, nutritious, healthy and tasty, as well as close to their concept of an ideal hamburger.

**Keywords:** Hamburgers, nutrition, healthy, meat, vegetables, sensory analysis.

## Introducción

La carne roja, un componente básico de la dieta uruguaya, presenta un importante aporte de nutrientes en forma de proteínas, ácidos grasos, minerales (hierro, zinc, cobre, manganeso, iodo, selenio), vitaminas del complejo B y micronutrientes varios (De Smet y Vossen, 2016). A pesar de ello, ha sido en las últimas décadas percibida como nociva para la salud ya que múltiples estudios han concluido que eliminar o reducir el consumo de carne roja es una manera efectiva de reducir la ingesta de grasas saturadas, asociada a la prevalencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer colorrectal y afecciones coronarias (Binnie, et al., 2014). Por esta razón, el consumo de productos cárnicos es a menudo evitado por

los consumidores, para reducir el riesgo de obesidad y enfermedades crónicas no transmisibles (Angiolillo, et al., 2015).

La carne roja es un producto susceptible a la modificación y en los últimos años se han desarrollado variados estudios con el fin de mejorar o suplementar su perfil nutricional de diversas formas (Carballo, et al., 2001; Hathwar, et al., 2012; Zhang, et al., 2010). Ejemplos de esto son la modificación del perfil lipídico en los productos cárnicos por incorporación de aceites de pescado o aceites vegetales (Selani, et al., 2016), la adición de fibra dietaria como una estrategia para el reemplazo de grasa (Gök, et al., 2011; Pintado, et al., 2018; Piñero, et al., 2008; Verma y Banerjee, 2010) o la fortificación con proteína de origen vegetal (Baugreet, et al., 2016). Estos cambios en la formulación pueden contribuir

a contrarrestar la percepción negativa de los consumidores hacia los productos cárnicos.

En un estudio realizado por Orellana et al. (2013), la acepción de las frases “alimentación saludable”, “comer carne”, “vegetarianismo” y “persona vegetariana” fue analizada mediante técnicas proyectivas (libre asociación de palabras, y jerarquización según la relación o importancia de cada una frente al estímulo). Este estudio, realizado con una población predominantemente universitaria, indicó que la percepción de la carne como alimento se ve focalizada principalmente en el aspecto nutricional y se limita al concepto de proteínas, mientras que la frase “alimentación saludable” es relacionada principalmente al consumo de frutas y verduras, con algunas menciones de otros grupos alimenticios (como lácteos y carnes). Asimismo, la población estudiada consideró que patrones alimentarios basados principalmente en frutas y verduras (determinados por “vegetarianismo” y “persona vegetariana”) están asociados a una salud frágil y a femineidad (Orellana, et al., 2013).

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de una formulación de hamburguesa con la incorporación de ingredientes vegetales y la determinación de su aceptabilidad por parte del consumidor.

## Materiales y Métodos

### Desarrollo de la formulación

Se utilizó como materia prima carne picada comercial adquirida en un comercio de plaza. Con el fin de asegurar el cumplimiento del decreto 39/015 del Reglamento Bromatológico Nacional (Ministerio de Salud Pública, 1994), según

el cual la carne picada debe tener un contenido graso menor al 20%, se realizó una determinación de contenido de lípidos por el método establecido en la Norma UNIT 478 (Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, 1975).

El desarrollo de la formulación se realizó incorporando a la carne picada diferentes cantidades de sal, orégano, avena, zanahoria, manzana, cebolla y chí. Las cantidades de cada ingrediente fueron ajustadas por medio de un análisis sensorial descriptivo realizado por el panel de jueces sensoriales entrenados de Facultad de Química (Universidad de la República), hasta obtener un producto equilibrado desde el punto de vista de apariencia y sabor y con una textura adecuada.

Las hamburguesas fueron elaboradas realizando una mezcla manual de manera tal que los ingredientes quedaran homogéneamente distribuidos. Los vegetales fueron procesados previamente para minimizar el impacto que pudieran llegar a tener sobre el aspecto y la textura del producto. La mezcla fue moldeada con un molde comercial de 10,5 cm de diámetro interno para obtener una hamburguesa de 85 gramos y 1 cm de espesor.

### Cocción de las muestras

Con el fin de estudiar la aceptabilidad de la fórmula desarrollada, se realizó un estudio con consumidores utilizando tres muestras: (A) la formulación de hamburguesa desarrollada, (B) una hamburguesa “casera” elaborada únicamente con carne picada, sal y orégano como ingredientes y (C) una hamburguesa comercial (congelada) de una reconocida marca nacional.

Las tres muestras fueron cocinadas en horno eléctrico a 180 °C durante 8 minutos de cada lado (16 minutos en total) hasta alcanzar una temperatura interna de 73 °C, con la cual se garantiza la muerte bacteriana de microorganismos pató-

Variable sociodemográfica	Total (n = 100)	Grupo 1 (n = 55)	Grupo 2 (n = 45)	valores-p (Prueba Chi-cuadrado)
<b>Sexo</b>				
Hombres	50	32 (58%)	18 (40%)	0,070
Mujeres	50	23 (42%)	27 (60%)	
<b>Edad (años)</b>				
18 – 35	73	40 (73%)	33 (73%)	0,946
36 - 70	27	15 (27%)	12 (27%)	
<b>Estado civil</b>				
Sin pareja	68	37 (67%)	31 (69%)	0,966
Con pareja	32	18 (33%)	14 (31%)	
<b>Nivel de estudio</b>				
Hasta bachillerato terminado	20	13 (24%)	7 (16%)	0,317
Carrera técnica y universidad incompleta	39	23 (41%)	16 (37%)	
Profesional universitario	41	19 (35%)	22 (47%)	

**Tabla 1.** Características sociodemográficas de la muestra de la población: frecuencia total y dentro de cada grupo de consumidores.



genos como *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157: H7 (Feiner, 2006).

## Análisis fisicoquímicos

Los análisis fisicoquímicos se realizaron sobre las muestras A y C para comparar el perfil nutricional de las dos hamburguesas. Se realizaron las siguientes determinaciones: contenido de grasa total (Determinación del contenido de grasa total, Norma UNIT 478; Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, 1975); cenizas (Determinación de cenizas: método de referencia, Norma UNIT 475; Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, 1977); fibra total (Método Gravimétrico-Enzimático; AOAC International, 1990); proteínas (método Kjeldahl; AOAC International, 2010) y sodio (UNE-EN: 15505 Determinación de sodio, magnesio y calcio por espectrometría de absorción atómica de llama (AAS) tras digestión en microondas; Asociación Española de Normalización y Certificación, 2008).

## Estudio con consumidores

El estudio se realizó en la ciudad de Montevideo (Uruguay) con 100 consumidores habituales de hamburguesas (mínimo una vez por semana), reclutados al azar en sitios públicos e invitados a concurrir al Laboratorio de Evaluación Sensorial de la Facultad de Química (UdelaR) para la realización del estudio. El reclutamiento se realizó por medio de una pequeña encuesta en la que se evaluaron datos sociodemográficos (edad, sexo, estado civil y nivel de estudios) y su frecuencia de consumo de hamburguesas. Es importante señalar que el método de muestreo no probabilístico y el procedimiento de reclutamiento no permitieron obtener una muestra estadísticamente representativa, por lo que los resultados no permiten ser generalizados para el total de la población. Sin embargo, como se observa en la Tabla 1, la muestra cubrió un amplio rango de consumidores, en términos de variables sociodemográficas. Asimismo, presentó un sesgo hacia individuos con mayor nivel de educación, quienes pueden ser asociados con una mayor disposición a participar en las encuestas en general.

Una vez completada la encuesta, se invitaba a los consumidores a concurrir a la Facultad de Química a realizar la prueba en horas y días de su conveniencia. La prueba se realizó en la sala de degustación del Laboratorio de Evaluación Sensorial de Facultad de Química (UdelaR), diseñada según ISO 8589 (International Organization for Standardization, 1988).

Cada consumidor recibió las muestras codificadas con números aleatorios de tres cifras, en forma monádica y en orden alternado de presentación. Se utilizó agua potable como borrador. Se solicitó a los consumidores que evaluaran la aceptabilidad con una escala hedónica estructurada de nueve puntos con los extremos 1 = me disgusta muchísimo a 9 = me gusta muchísimo. La prueba se completó con una pregunta marque-todo-lo-que corresponde (*check-all-that-apply*, CATA), según una lista de 32 atributos, y se solicitó a los consumidores que marcaran todas las palabras que se podrían aplicar a cada hamburguesa. Los términos utilizados fueron: seis de aspecto (*color claro, color adecuado, color oscuro, color extraño, color natural, pálida*), nueve de textura (*seca, jugosa, dura, tierna, poco grasosa, grasosa, poco compacta, compacta, demasiado compacta*), 10 de sabor (*muy condimentada, poco condimentada, salada, poco salada, poco sabor, sabor intenso, sabrosa, poco sabor a carne, mucho sabor a carne, sabor extraño*), dos hedónicos (*fea, deliciosa*) y cinco

de calidad (*nutritiva, saludable, natural, casera, industrial*). Los términos de la pregunta CATA fueron generados por los integrantes del panel de jueces sensoriales que participaron en el desarrollo de la formulación.

Al final de la prueba se solicitó a los consumidores que, utilizando los mismos términos de la pregunta CATA, caracterizaran a una hamburguesa “ideal”.

## Análisis estadístico

Los datos de aceptabilidad fueron analizados por medio de un análisis de conglomerados jerárquico, con el fin de identificar grupos de consumidores con diferente percepción sobre los productos evaluados. La formación de los grupos se basó en el criterio de agregación de Ward y en distancias euclídeas. Se realizó la prueba estadística Chi-cuadrado para determinar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la frecuencia de distribución de las variables sociodemográficas.

Posteriormente, sobre los datos de aceptabilidad de las muestras se realizó un análisis de varianza utilizando “muestra”, “grupo” y su interacción como factores de variación. Las diferencias significativas entre los promedios se determinaron por medio de la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Para las preguntas CATA se determinó la frecuencia de mención para cada término contando el número de consumidores que utilizaron los términos para describir cada producto. Para cada término se realizaron las pruebas Q de Cochran y de Bonferroni para evaluar diferencias de percepción de los consumidores entre las hamburguesas evaluadas.

Finalmente, se identificó la relación entre las muestras evaluadas y los términos utilizados por cada grupo de consumidores por medio de un Análisis Factorial de Correspondencia (AFC).

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa XL-Stat 2017 (Addinsoft, NY).

## Resultados

El contenido de lípidos de la carne picada utilizada como materia prima para la elaboración de las muestras A y B fue de 16,0%, por lo que se considera que cumple con lo establecido en el decreto 39/015 del Reglamento Bromatológico Nacional (Ministerio de Salud Pública, 1994).

Los resultados de los análisis fisicoquímicos de las dos hamburguesas estudiadas se detallan en la Tabla 2. Como se observa, la hamburguesa de carne y vegetales (muestra A) presenta un perfil nutricional más saludable que las

Nutrientes	Muestra A	Muestra C
Lípidos	5,9 g/100 g	14,8 g/100 g
Proteínas	25,5 g/100g	23,5 g/100 g
Carbohidratos	0 g/100 g	0 g/100 g
Cenizas	1,5 g/100 g	2,0 g/100 g
Fibra	5,9 g/100 g	0 g/100 g
Sodio (mg)	6,2 ppm	13,9 ppm

Tabla 2. Contenido de nutrientes en las muestras A y C.

otras dos muestras, con un contenido lipídico reducido en aproximadamente un 60%, un contenido de sodio menor y la presencia de fibra.

El análisis de conglomerados jerárquico realizado sobre los datos de aceptabilidad permitió identificar dos grupos de consumidores: el grupo 1, compuesto por 55 individuos, y el grupo 2, compuesto por 45 individuos. Se encontró diferencia significativa ( $p=0,0004$ ) en los puntajes de aceptabilidad asignados por los dos grupos de consumidores a las muestras A y C. En la Tabla 3 se observan los puntajes de aceptabilidad asignados por cada grupo a las tres muestras evaluadas y los resultados del análisis de varianza.

El grupo 1 de consumidores le asignó muy bajos puntajes de aceptabilidad a las muestras A y B, mientras que la muestra comercial (C) recibió un puntaje de aceptabilidad signifi-

Muestra	Grupo 1 (n = 55)	Grupo 2 (n = 45)
A	4,2 b B	7,5 a A
B	4,8 b A	4,9 b A
C	6,2 a A	4,9 b B

**Tabla 3.** Puntajes de aceptabilidad en escala de nueve puntos asignados por cada grupo de consumidores. Letras minúsculas diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre muestras para un mismo grupo, según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), letras mayúsculas diferentes en una misma fila indican diferencias significativas entre grupos para una misma muestra, según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Atributos	valores-p (Prueba Q de Cochran)	A	B	C
Color claro	0,001	12,7 a	10,9 a	36,4 b
Color oscuro	0,011	7,3 a	23,6 b	7,3 a
Pálida	0,593	18,2 a	14,5 a	21,8 a
Color adecuado	0,507	25,5 a	34,5 a	29,1 a
Color extraño	0,000	30,9 b	7,3 a	9,1 a
Color natural	0,417	3,6 a	9,1 a	5,5 a
Casera	0,018	29,1 b	29,1 b	10,9 a
Comercial	0,007	34,5 ab	32,7 a	54,5 b
Seca	0,000	34,5 a	81,8 b	29,1 a
Jugosa	0,000	18,2 b	1,8 a	49,1 c
Dura	0,000	1,8 a	38,2 b	1,8 a
Tierna	0,000	52,7 b	18,2 a	47,3 b
Poco grasosa	0,012	30,9 a	52,7 b	34,5 b
Grasosa	0,002	18,2 b	1,8 a	25,5 b
Poco salada	0,004	41,8 b	36,4 b	18,2 a
Salada	0,001	1,8 a	9,1 b	23,6 b
Demasiado compacta	0,000	7,3 a	40,0 b	7,3 a
Compacta	0,003	16,4 a	36,4 ab	41,8 b
Poco compacta	0,000	25,5 b	0 a	3,6 a
Poco sabor	0,097	23,6 a	23,6 a	10,9 a
Sabor intenso	0,017	10,9 a	10,9 a	27,3 b
Poco sabor a carne	0,000	60,0 b	27,3 a	25,5 a
Mucho sabor a carne	0,000	0 a	25,5 b	29,1 b
Sabor extraño	0,000	41,8 b	9,1 a	9,1 a
Muy condimentada	0,001	30,9 b	27,3 b	3,6 a
Poco condimentada	0,422	23,6 a	32,7 a	23,6 a
Natural	0,678	14,5 a	20,0 a	18,2 a
Fea	0,232	18,2 a	14,5 a	9,1 a
Deliciosa	0,135	0 a	3,6 a	7,3 a
Nutritiva	0,687	5,5 a	7,3 a	3,6 a
Saludable	0,148	9,1 a	10,9 a	1,8 a
Sabrosa	0,000	9,1 a	20,0 a	43,6 b

**Tabla 4.** Frecuencia de mención de los términos de la pregunta “marque todo lo que corresponda”. Grupo 1 de consumidores (n = 55). Letras diferentes en una misma fila indican diferencia significativa según prueba de Bonferroni.

vamente mayor. Por el contrario, el grupo 2 de consumidores le asignó puntajes de aceptabilidad muy bajos a las muestras B y C, mientras que la formulación desarrollada (A) recibió un muy alto puntaje de aceptabilidad.

De acuerdo a la prueba Chi-cuadrado, los dos grupos de consumidores no difirieron significativamente ( $p > 0,05$ ) en ninguna de las variables socioeconómicas relevadas, lo que evidencia que existen otros factores no explorados en este estudio que pueden llegar a influir en la aceptabilidad de las muestras evaluadas (Tabla 1).

Las Tablas 4 y 5 muestran la frecuencia de mención de cada término de la pregunta CATA usada por cada grupo de consumidores para describir las hamburguesas.

El grupo 1 de consumidores ( $n=55$ ) percibió a las tres muestras evaluadas como *comerciales* y *poco grasosas*. Las

dos muestras elaboradas en forma artesanal (A y B) fueron descritas como *poco saladas* y *secas*, principalmente la muestra B, que recibió un 81,8% de menciones en el término *seca*.

La fórmula desarrollada (A) fue percibida por más de la tercera parte de estos consumidores como con *color extraño*, *tierna*, con *poco sabor a carne* y con *sabor extraño*. Además, recibió un mayor número de menciones en los términos *poco sabor* y *casera* que la muestra C, y un mayor número de menciones en el término *poco compacta* que las otras dos muestras.

La otra hamburguesa elaborada en forma artesanal (B) fue descrita como con *color adecuado*, *dura*, *seca*, *demasiado compacta* y *poco condimentada*. Además, recibió un mayor número de menciones en los términos *poco sabor* y *casera* que la muestra C, un mayor número de menciones en el término

Atributos	valores-p (Prueba Q de Cochran)	A	B	C
Color claro	0,004	6,7 a	15,6 ab	33,3 b
Color oscuro	0,000	2,2 a	31,1 b	2,2 a
Pálida	0,097	2,2 a	11,1 a	15,6 a
Color adecuado	0,000	68,9 b	37,8 a	33,3 a
Color extraño	0,008	15,6 b	0 a	4,4 a
Color natural	0,062	22,2 a	11,1 a	6,7 a
Casera	0,000	64,4 c	33,3 b	8,9 a
Comercial	0,000	4,4 a	24,4 b	60,0 c
Seca	0,000	11,1 a	84,4 c	35,6 b
Jugosa	0,003	28,9 b	4,4 a	26,7 b
Dura	0,000	0 a	44,4 b	13,3 a
Tierna	0,000	82,2 b	13,3 a	35,6 a
Poco grasosa	0,002	46,7 b	46,7 b	20,0 a
Grasosa	0,000	2,2 a	11,1 a	46,7 b
Poco salada	0,001	28,9 b	24,4 b	2,2 a
Salada	0,000	8,9 a	2,2 a	31,1 b
Demasiado compacta	0,000	0 a	28,9 b	11,1 ab
Compacta	0,074	26,7 a	48,9 a	46,7 a
Poco compacta	0,068	13,3 a	0 a	4,4 a
Poco sabor	0,282	8,9 a	20,0 a	13,3 a
Sabor intenso	0,486	22,2 a	15,6 a	24,4 a
Poco sabor a carne	0,465	22,2 a	15,6 a	24,4 a
Mucho sabor a carne	0,209	13,3 a	26,7 a	26,7 a
Sabor extraño	0,008	8,9 a	4,4 a	24,4 b
Muy condimentada	0,076	24,4 a	24,4 a	8,9 a
Poco condimentada	0,337	17,8 a	17,8 a	28,9 a
Natural	0,000	37,8 b	22,2 b	2,2 a
Fea	0,001	0 a	26,7 b	8,9 ab
Deliciosa	0,000	31,1 b	4,4 a	2,2 a
Nutritiva	0,000	37,8 b	6,7 a	0 a
Saludable	0,000	35,6 b	11,1 a	0 a
Sabrosa	0,000	60,0 b	22,2 a	24,4 a

**Tabla 5.** Frecuencia de mención de los términos de la pregunta “marque todo lo que corresponda”. Grupo 2 de consumidores ( $n = 45$ ). Letras diferentes en una misma fila indican diferencia significativa según prueba de Bonferroni.

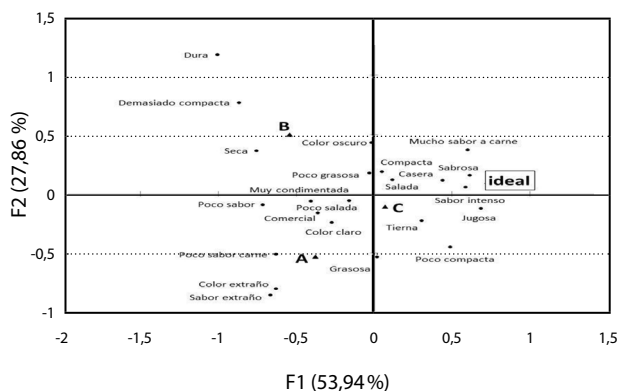
*mucho sabor a carne* que la muestra A y un mayor número de menciones en el término *color oscuro* que las otras dos muestras.

La muestra con mayor aceptabilidad para este grupo (C) fue percibida como con *color claro*, *jugosa*, *tierna*, *compacta* y *sabrosa*. Recibió un mayor número de menciones a *mucho sabor a carne* que la muestra A y un mayor número de menciones en los términos *salada* y con *sabor intenso* que las otras dos hamburguesas evaluadas.

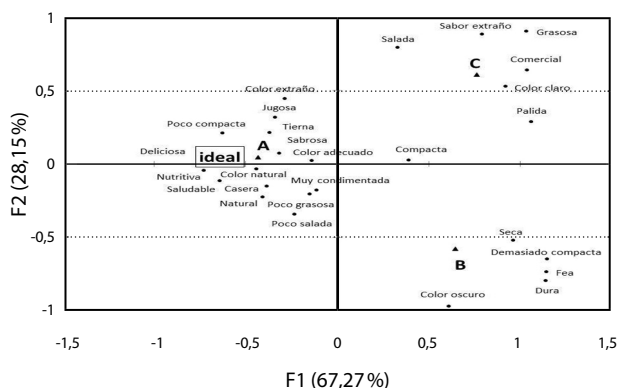
El grupo 2 de consumidores (n=45) percibió a las tres muestras evaluadas como con *color adecuado*. Las dos muestras elaboradas en forma artesanal (A y B) fueron descriptas también como *caseras* y *poco grasosas*, principalmente la muestra A, que recibió un 64,4% de menciones en el término *casera*.

La fórmula desarrollada (A), que obtuvo para este grupo el mayor puntaje de aceptabilidad, fue percibida por más de la tercera parte de estos consumidores como *tierna*, *natural*, *deliciosa*, *nutritiva*, *saludable* y *sabrosa*. Además, recibió un mayor número de menciones en el término *jugosa* que la muestra B, un mayor número de menciones en el término *poco salada* que la muestra C, y un mayor número de menciones en el término *color extraño* que las otras dos muestras.

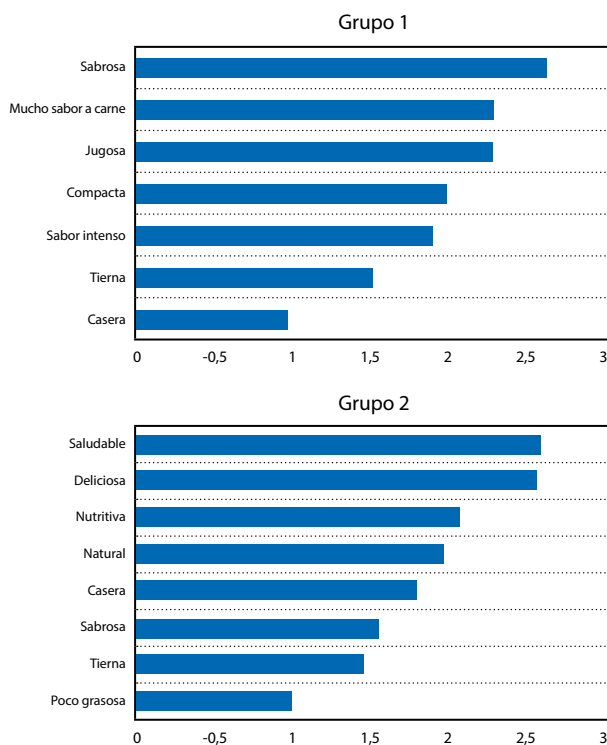
La otra hamburguesa elaborada en forma artesanal (B) fue descripta como con *color oscuro*, *seca*, *dura* y *compacta*. Además, recibió un mayor número de menciones en los términos



**Figura 1.** Análisis Factorial de Correspondencia. Relación entre los términos de la pregunta CATA y las muestras evaluadas. Grupo 1 de consumidores.



**Figura 2.** Análisis Factorial de Correspondencia. Relación entre los términos de la pregunta CATA y las muestras evaluadas. Grupo 2 de consumidores.



**Figura 3.** Términos de la pregunta CATA que influyeron en forma positiva en la aceptabilidad de las muestras para cada grupo de consumidores.

*demasiado compacta* y *fea* que la muestra A y un mayor número de menciones en el término *poco salada* que la muestra C.

La muestra comercial (C) fue percibida como con *color claro*, *comercial*, *seca*, *tierna*, *grasosa*, *salada* y *compacta*. Recibió un mayor número de menciones en el término *jugosa* que la muestra B y un mayor número de menciones en el término *sabor extraño* que las otras dos hamburguesas evaluadas.

En las Figuras 1 y 2 se observa la relación entre los términos de la pregunta CATA y las muestras evaluadas, incluyendo a la hamburguesa "ideal", a través de los resultados del AFC.

En la Figura 3 se observan los términos de la pregunta CATA que más influyeron en la aceptabilidad de las muestras para cada grupo de consumidores.

El AFC del grupo 1 de consumidores explicó el 81,8% de la variabilidad entre los datos. Se observa que las tres muestras estudiadas están separadas en el espacio; lo que indica la diferente percepción que tienen los consumidores sobre ellas. La hamburguesa comercial (C) se encuentra más cercana en el espacio a la hamburguesa "ideal"; los términos que mejor la describen son: *mucho sabor a carne*, *sabrosa*, *sabor intenso* y *jugosa*. Estos términos, junto con *compacta*, *tierna* y *casera*, son los que tuvieron un mayor peso en la aceptabilidad de las hamburguesas estudiadas.

El AFC del grupo 2 de consumidores explicó el 95,43% de la variabilidad entre los datos. Las tres muestras estudiadas se encuentran distribuidas en distintos cuadrantes del espacio; la hamburguesa desarrollada (A) está muy cercana al producto "ideal". Las muestras fueron descriptas con los términos *saludable*, *deliciosa*, *nutritiva*, *natural*, *casera*, *sabrosa*, *tierna* y *poco grasosa*, explicando de esta manera los altos puntajes de aceptabilidad que recibió la hamburguesa desarrollada por parte de este grupo de consumidores.

## Discusión

Realizando un relevamiento de publicaciones asociadas al tema se encuentra que hay muy pocos estudios de aceptabilidad de hamburguesas con incorporación de ingredientes vegetales. En general, se han realizado incorporaciones vinculadas a aspectos nutricionales y las características funcionales o tecnológicas, sin tener como objetivo determinar los aspectos sensoriales y la aceptabilidad del producto.

En aquellos estudios que incurrieron en el aspecto sensorial se halla que las respuestas a la incorporación de ingredientes vegetales son variables. Desmond et al. (1998) y Pintado et al. (2018) apuntaron a la caracterización de los productos cárnicos mediante un panel de jueces semientrenados. El uso de paneles semientrenados se orientó en este caso a comparar las características sensoriales de productos cárnicos enriquecidos con almidón de tapioca, fibra de avena y proteínas de suero lácteo, y emulsiones de chí y avena, respectivamente. La caracterización se basó principalmente en la comparación de determinados atributos para los productos enriquecidos contra un control, por lo que los resultados obtenidos se limitan a describir las diferencias encontradas en ellos. Esto aportó información interesante respecto a los efectos del enriquecimiento sobre ciertos parámetros del producto obtenidos, pero, al tratarse de un estudio realizado con un panel semi entrenado, se obtuvieron resultados poco representativos de la población de consumidores. Por lo tanto, si bien se recabó información valiosa respecto a los atributos sensoriales que se ven afectados, podría considerarse que se halla en cierto modo limitada (Desmond, et al., 1998; Pintado, et al., 2018).

En el caso de Piñero et al. (2008), quienes realizaron estudios con consumidores para evaluar la aceptabilidad de hamburguesas enriquecidas con fibra, se detectó un incremento en la aceptabilidad asociado al cambio de textura. Esto es atribuible al agregado de fibra, dado que varios estudios reportan la capacidad de la fibra de avena para absorber agua y grasa (Piñero, et al., 2008).

En este estudio se detectó una tendencia similar a la evidenciada por Piñero et al. (2008) para la hamburguesa desarrollada; tanto el grupo 1 como el grupo 2 describieron a la muestra A como “tierna”, con un 52,7% y un 82,2% de menciones para cada grupo, respectivamente. Estos valores son más altos para la formulación desarrollada que para las otras dos muestras ensayadas, lo que implica que el agregado de vegetales tuvo influencia sobre la textura del producto cárnico. En particular, podría atribuirse este efecto a la incorporación de avena y chí, dado que se ha demostrado que fibras provenientes de estos ingredientes contribuyen a aumentar la capacidad de retención de agua de los productos cárnicos, modificando así la textura de los productos (Desmond, et al., 1998).

La incorporación de ingredientes vegetales a un alimento tradicional puede afectar sus características sensoriales, de manera positiva o adversa, y llegar a incrementar la aceptación o el rechazo del consumidor hacia el producto (Siró, et al., 2008). Aunque las modificaciones sensoriales en un producto tradicional serán mejor toleradas por aquellos consumidores que estén familiarizados con los efectos beneficiosos para la salud de los ingredientes que se incorporen, el grado de tolerancia dependerá de la actitud del consumidor hacia tales beneficios (Ares, et al., 2008).

Muchos consumidores sienten que tienen que sacrificar las características sensoriales de algunos alimentos por el bien de su salud, pero se ha encontrado que esta percepción depende

de la naturaleza específica del beneficio esperado (Tuorila y Cardello, 2002). Además, varios autores han observado que los consumidores son reacios a comprometer el sabor de los alimentos, aunque estos les proporcionen beneficios para la salud (Ares, et al., 2008).

Si bien en este trabajo no se informaba a los consumidores sobre los ingredientes de cada hamburguesa, los vegetales incorporados en la formulación desarrollada (A) eran fácilmente detectables, tanto en su apariencia como en la textura y en el sabor, lo que podría llevar a rechazar este alimento a un grupo de consumidores poco dispuestos a incorporar vegetales a un producto tradicional como la hamburguesa. Esto podría explicar el bajo puntaje de aceptabilidad asignado por los consumidores del grupo 1 a la muestra A. La descripción de esta hamburguesa con términos como *color extraño*, *poco sabor a carne* y *sabor extraño* podría explicar la poca preferencia por esta muestra y que este grupo de consumidores no desea modificar los ingredientes tradicionales de una hamburguesa ni los aspectos sensoriales que la caracterizan. Este grupo de consumidores priorizó además las características sensoriales de las hamburguesas evaluadas, ya que los atributos que más influyeron en los puntajes de aceptabilidad asignados a las muestras fueron de sabor (*sabrosa*, *mucho sabor a carne*, *sabor intenso*) y de textura (*jugosa*, *compacta*, *tierna*). Este grupo de consumidores podría tener una preferencia hacia los sabores fuertes y tradicionales en este tipo de productos, y podría no estar dispuesto a sacrificar características sensoriales de una hamburguesa por la incorporación de vegetales en la formulación.

Por el contrario, el grupo 2 de consumidores priorizó aspectos no sensoriales de las hamburguesas evaluadas. Esto es evidente en el uso de los términos *saludable*, *nutritiva*, *natural* y *casera*, que tuvieron la mayor influencia en los puntajes de aceptabilidad y explican la alta preferencia de estos consumidores por la hamburguesa de carne con vegetales. Esta formulación fue también percibida como *poco grasosa*, lo que podría haber fortalecido la imagen de saludable de esta muestra. Asimismo, la muestra A tuvo una imagen muy cercana al ideal de hamburguesa para este grupo de consumidores.

En futuros trabajos se podría explorar en profundidad el segmento de la población que evidencia una actitud positiva hacia una hamburguesa de carne con incorporación de vegetales, desde el punto de vista de su interés en aspectos vinculados a la salud y a su estilo de vida.

## Conclusiones

A partir de los estudios realizados se concluye que existe un nicho de mercado para la introducción de una hamburguesa con una formulación que incorpore ingredientes vegetales.

Las metodologías empleadas en este estudio permitieron identificar claramente a los consumidores con una actitud positiva hacia el producto desarrollado, si bien habría que profundizar en las razones que los llevan a preferir este tipo de productos.

## Reconocimientos

Este trabajo fue posible gracias a los integrantes del panel de jueces de Facultad de Química (UdelaR) y a los consumidores que participaron del estudio.

## Referencias

- Angiolillo, L., Conte, A. y Del Nobile, M. A., 2015. Technological strategies to produce functional meat burgers. En: *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), pp.697–703. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.021>
- Asociación Española de Normalización y Certificación, 2008. UNE-EN: 15505: *Productos alimenticios. Determinación de elementos traza. Determinación de sodio, magnesio y calcio por espectrometría de absorción atómica de llama (AAS) tras digestión en microondas*. Madrid: AENOR.
- AOAC International, 2010. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 928.08, first action 1928 - final action 1974.
- AOAC International, 1990. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 15a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method AOAC: 985.29, first action 1985 -final action 1986.
- Ares, G., Giménez, A. y Gámbaro, A., 2008. Uruguayan consumers' perception of functional foods. En: *Journal of Sensory Studies*, 23(5), pp.614–630. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2008.00176.x>
- Baugreet, S., Kerry, J. P., Botineştean, C., Allen, P. y Hamill, R. M., 2016. Development of novel fortified beef patties with added functional protein ingredients for the elderly. En: *Meat Science*, 122, pp.40–47. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.07.004>
- Binnie, M. A., Barlow, K., Johnson, V. y Harrison, C., 2014. Red meats: time for a paradigm shift in dietary advice. En: *Meat Science*, 98(3), pp.445–451. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.024>
- Carballo, J., Cofrades, S., Jime, F., Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J. y Cofrades, S., 2001. Healthier meat and meat products: their role as functional foods. En: *Meat Science*, 59(1), pp.5-13. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00053-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00053-5)
- De Smet, S. y Vossen, E., 2016. Meat: the balance between nutrition and health. A review. En: *Meat Science*, 120, pp.145–156. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.008>
- Desmond, E., Troy, D. y Buckley, D., 1998. The effects of tapioca starch, oat fibre and whey protein on the physical and sensory properties of low-fat beef burgers. En: *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 31(7–8), pp.653–657. <https://doi.org/10.1006/fstl.1998.0415>
- Feiner, G., 2006. *Meat products handbook*. Sawston: Woodhead Publishing
- Gök, V., Akkaya, L., Obuz, E. y Bulut, S., 2011. Effect of ground poppy seed as a fat replacer on meat burgers. En: *Meat Science*, 89(4), pp.400–404. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.032>
- Hathwar, S. C., Rai, A. K., Modi, V. K. y Narayan, B., 2012. Characteristics and consumer acceptance of healthier meat and meat product formulations-a review. En: *Journal of Food Science and Technology*, 49(6), pp.653–664. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0476-z>
- Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, 1975. UNIT 478. *Carne y sus productos. Determinación del contenido de grasa total*. Montevideo: UNIT.
- Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, 1977. UNIT 475. *Carne y sus productos. Determinación de cenizas. Método de referencia*. Montevideo: UNIT.
- International Organization for Standardization, 1988. ISO 8589: *Sensory analysis: general guidance for the design of test rooms*. Ginebra: ISO.
- Ministerio de Salud Pública, 1994. *Reglamento bromatológico nacional, decreto 315/994*. Montevideo: Ministerio de Salud Pública.
- Orellana, L. M., Sepúlveda, J. A. y Denegri, M., 2013. Psychological meaning of eating meat, vegetarianism and healthy diet in university students: a natural semantic network study. En: *Revista Mexicana de Trastornos Alimentarios*, 4(1), pp.15–22. [https://doi.org/10.1016/S2007-1523\(13\)71988-8](https://doi.org/10.1016/S2007-1523(13)71988-8)
- Pintado, T., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F., Pasqualin Cavalheiro, C. y Ruiz-Capillas, C., 2018. Chia and oat emulsion gels as new animal fat replacers and healthy bioactive sources in fresh sausage formulation. En: *Meat Science*, 135, pp.6-13. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.08.004>
- Piñero, M. P., Parra, K., Huerta-Leidenz, N., Arenas de Moreno, L., Ferrer, M., Araujo, S. y Barboza, Y., 2008. Effect of oat's soluble fibre ( $\beta$ -glucan) as a fat replacer on physical, chemical, microbiological and sensory properties of low-fat beef patties. En: *Meat Science*, 80(3), pp.675–680. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.03.006>
- Selani, M. M., Shirado, G. A. N., Margiotta, G. B., Rasera, M. L., Marabesi, A. C., Piedade, S. M. S. y Canniatti-Brazaca, S. G., 2016. Pineapple by-product and canola oil as partial fat replacers in low-fat beef burger: Effects on oxidative stability, cholesterol content and fatty acid profile. En: *Meat Science*, 115, pp.9–15. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.01.002>
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B. y Lugasi, A., 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. En: *Appetite*, 51(3), pp.456–467. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.05.060>
- Tuorila, H. y Cardello, A. V., 2002. Consumer responses to an off-flavor in juice in the presence of specific health claims. En: *Food Quality and Preference*, 13(7–8), pp.561–569. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(01\)00076-3](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(01)00076-3)
- Verma, A. K. y Banerjee, R., 2010. Dietary fibre as functional ingredient in meat products: a novel approach for healthy living - A review. En: *Journal of Food Science and Technology*, 47(3), pp.247–257. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0039-8>
- Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E. J. y Ahn, D. U., 2010. Improving functional value of meat products. En: *Meat Science*, 86(1), pp.15–31. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.018>

# Osmodehidrocongelación de batata fortificada con Zinc y Calcio

## Osmodehydrofreezing of the sweet potato fortified with Zinc and Calcium

Bosco, Daniela (2,4); Roche, Luis (1,2,3); Della Rocca, Patricia (1,2); Mascheroni, Rodolfo (1,3).

(1) Centro de Tecnologías Químicas, CTQ, Universidad Tecnológica Nacional, UTN, Argentina.

(2) Departamento de Ingeniería Química, UTN, Facultad Regional Buenos Aires, FRBA, Argentina.

(3) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología, CIDCA (CONICET y UNLP), Argentina.

(4) Escuela de posgrado, UTN, FRBA, Argentina.

Contacto: [patriciadellarocca@hotmail.com](mailto:patriciadellarocca@hotmail.com)

RECIBIDO: 16/3/2018 – APROBADO: 8/6/2018

### Resumen

La batata, *Ipomoea batatas* L. (Lam), es un alimento muy consumido por sus características nutricionales. Puede considerarse como un alimento funcional por su importante contenido de minerales (K, Mg) y compuestos con actividad antioxidante (carotenos, vitamina E, antocianinas y polifenoles). El objetivo de este trabajo fue estudiar la osmodehidrocongelación de batatas, que consiste en un proceso previo de deshidratación osmótica/impregnación con Zn y Ca para mejorar sus características nutricionales y texturales y posterior congelación, y para contribuir a evitar algunas carencias nutricionales de la población. Asimismo, se realizó el ajuste de los datos experimentales a modelos de la literatura que describen el comportamiento del proceso de deshidratación osmótica/impregnación (DO/I) y de congelación. El contenido de Zn y de Ca de las muestras frescas y de las deshidratadas osmóticamente se midió por espectrofotometría de absorción atómica de llama. Se aplicaron satisfactoriamente los modelos de DO de Page (1949), Henderson y Pabis (1961), Midilli et al. (2002), Azuara et al. (1992) y Crank (1975). Posteriormente, se procedió a la congelación en un túnel de bandejas hasta que el centro de los cubos de batata alcanzó una temperatura de -18 °C. Los tiempos de congelación con y sin pretratamiento de DO se estimaron favorablemente con el modelo de Salvadori-Mascheroni (1991), sin requerir los valores de las propiedades térmicas del alimento congelado ni del cálculo de la entalpía efectiva del cambio de fase.

**Palabras clave:** Osmodehidrocongelación, batatas, fortificación, Zn, Ca, impregnación, alimentos funcionales.

### Abstract

Sweet potato, *Ipomoea batatas* L. (Lam), is a widely consumed food for its excellent nutritional characteristics. This vegetable can be considered as a functional food due to its higher mineral content (K, Mg) and antioxidant components as carotenoids, vitamin E, anthocyanins and polyphenols.

In this work, the shelf life of the sweet potatoes was intended to be extended by osmodehydrofreezing. Zn and Ca were added during the process in order to increase its level in the final product, avoiding nutritional deficiencies. The adjust of the experimental data was carried out with literature models that describe the behaviour of the osmotic dehydration/impregnation and freezing process. Zn and Ca contents in the fresh and OD samples was determined by flame absorption spectrophotometry. Models of the OD like Page, Henderson y Pabis, Midilli et al., Azuara et al. and Crank were applied satisfactorily. Later, the samples were frozen in a tunnel of trays until the center of the sweet potatoes cubes reached -18 °C. The freezing times of the samples with and without OD pretreatment were estimated favorably with the Salvadori-Mascheroni model without requiring the value of the thermal properties of the frozen food or the calculation of the effective enthalpy of the phase change.

**Keywords:** Osmodehydrofreezing, sweet potatoes, fortification, Zn, Ca, impregnation, functional foods.

## Introducción

La deshidratación osmótica (DO) es un método de conservación que permite eliminar parcialmente el agua de los tejidos de los alimentos por inmersión en una solución hipertónica, generalmente de azúcares, polialcoholes y/o sales. La fuerza

impulsora para el egreso del agua es el gradiente de presión osmótica entre el alimento y la solución. La cinética del proceso es afectada por numerosas variables, entre ellas la temperatura, la concentración de solutos en la solución deshidratante, la relación masa de solución a masa de producto, el grado de agitación, el tiempo de proceso (Kumar Yadav y

Vir Singh, 2014). Durante la deshidratación osmótica las paredes celulares actúan como membranas semipermeables que permiten ser atravesadas por el agua, principalmente, y, en menor grado, por los solutos que se hallan en la solución. Este último fenómeno se denomina impregnación con solutos. El proceso de deshidratación osmótica/impregnación (DO/I) proporciona productos de humedad intermedia. Debido a que el descenso de la actividad de agua ( $a_w$ ) alcanzado en condiciones prácticas no es suficiente para detener totalmente el deterioro microbiano de este proceso, se requiere la aplicación de otros procesos posteriores para disminuir la actividad acuosa a un nivel seguro. Entre estos procesos se encuentran el secado en sus diferentes formas: convección con aire caliente, microondas, secados combinados, fritura, liofilización, congelación.

Cuando la etapa inicial o pretratamiento de alimentos por deshidratación osmótica/impregnación se combina con una sucesiva congelación, se la denomina osmodehidrocongelación o dehidrocongelación. Las ventajas principales que ofrece este procesamiento respecto de la congelación tradicional sola son:

- Elaboración de productos con características especiales, al poder adicionar durante la deshidratación osmótica/impregnación minerales y vitaminas con el propósito de fortificar el producto.
- Formación de una capa superficial de soluto (por ejemplo: sacarosa) que impide la salida de compuestos volátiles responsables del aroma del alimento.
- Disminución de la cantidad de agua que se solidificará en el proceso posterior de congelación. Esto conduce a un menor daño de la estructura y a la obtención de una mejor calidad final del producto. Además, se produce un ahorro energético al congelar menor contenido de agua.
- Se facilita el manejo de los productos debido a un menor volumen, ahorro en el uso de embalajes, disminución del espacio requerido en almacenes y vehículos de transporte.

La deshidratación osmótica/impregnación ha sido estudiada por numerosos investigadores (Azua, et al., 1992; Lenart y Flink, 1984; Della Rocca, 2010; Silva Paz, 2015; Lovera, 2016).

La creciente demanda actual de productos naturales y nutritivos motiva a desarrollar productos alimenticios fortificados con minerales y vitaminas. Es el caso de la adición de calcio, que presenta las siguientes ventajas:

- Previene la pérdida de masa ósea, vital para prevenir la osteoporosis.
- Interviene en la contracción de los músculos.
- Regula la transmisión nerviosa y del latido cardíaco.
- Regula la función de hormonas y la activación de enzimas intra y extracelulares.

Asimismo, el zinc es otro mineral muy importante en la dieta. Actúa como cofactor en una gran cantidad de reacciones enzimáticas, cumple una función estructural, es regulador de la expresión de genes y es fundamental para fortalecer el sistema inmune (Carbajal Azcona, 2013).

Durante la congelación y posterior descongelación se produce el ablandamiento o pérdida de firmeza de los tejidos vegetales. Estos cambios texturales se relacionan con alteraciones de la pared, laminilla media y membranas celulares de

los tejidos vegetales. La impregnación de las frutihortícolas con calcio permite mantener la firmeza del vegetal debido a que los iones calcio tienen la capacidad de interactuar formando puentes con los carboxilos libres de las pectinas. La impregnación en solución de calcio combinado con el tratamiento térmico a bajas temperaturas (40-60 °C) constituye un procedimiento global que ejerce una sinergia sobre el efecto reafirmante del tejido vegetal (Lovera, 2016).

También es posible considerar la impregnación con componentes bioactivos como una técnica que se aplica para la obtención de alimentos funcionales.

Durante la congelación disminuye la  $a_w$  en los tejidos del alimento por la cristalización del agua, y de esta forma se reduce el agua líquida del alimento. Tanto la conversión de agua líquida en hielo como la reducción de la temperatura provocan una disminución de las reacciones responsables del deterioro. El inicio de la congelación sucede a una temperatura inferior a la de congelación del agua pura, debido al descenso crioscópico que depende del tipo de solvente y de la concentración (número de partículas) de las sustancias disueltas. La congelación está caracterizada por la nucleación, aparición de los primeros cristales de hielo, y el crecimiento cristalino, etapa posterior que es función de la velocidad de enfriamiento. Cuando las velocidades de congelación son altas se produce gran cantidad de cristales pequeños, intra y extracelulares; por el contrario, a bajas velocidades de enfriamiento se originan cristales extracelulares de mayor tamaño, que crecen a expensas del agua del interior de la célula, que migra hacia el exterior por ósmosis. Una vez definidas las características del alimento (forma, composición, tamaño, empaque) y seleccionado el equipo a utilizar y sus condiciones operativas (temperatura del refrigerante, coeficiente de transferencia calórica, temperatura inicial del producto), interesa principalmente poder calcular el tiempo de residencia del producto en el equipo de congelación. El tiempo de congelación puede calcularse en función de diversos puntos, ya que distintos autores han tomado diferentes temperaturas como representativas del final de la congelación. Como punto de referencia se adoptará el centro térmico, que se define como el punto de mayor temperatura al finalizar la congelación. En alimentos de forma regular (placa plana, cilindro infinito o finito, esfera, prisma) y cuando el fenómeno de transferencia de calor está gobernado por conducción y las condiciones operativas son simétricas, el centro térmico coincide con el centro geométrico de la pieza. Como definición del tiempo de congelación se adopta la presentada por el IIR (1972): "El tiempo efectivo de congelación es el tiempo requerido para bajar la temperatura de su valor inicial a un valor dado en el centro térmico" (Salvadori, 1994).

En el proceso de congelación pueden distinguirse tres etapas:

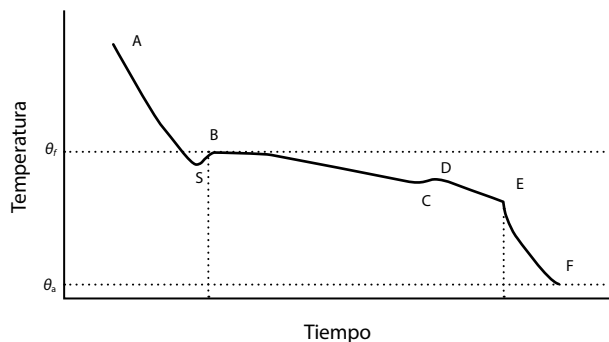
- Preenfriamiento: El alimento se enfría desde su temperatura inicial (generalmente superior a los 0 °C) hasta la temperatura de inicio de cambio de fase.
- Cambio de fase: La matriz alimentaria está integrada por sólidos insolubles y una fase acuosa que contiene una cierta cantidad de sólidos disueltos. Los sólidos disueltos en la solución acuosa de la matriz son los responsables del descenso crioscópico, que es proporcional a su concentración. A medida que desciende la temperatura, el agua de la solución se solidifica y la solución acuosa incrementa su concentración, por consiguiente, se solidifica a temperaturas inferiores al transcurrir el tiempo. A temperaturas muy bajas, inferiores a los -40 °C,



todavía existe una fracción de agua sin congelar que es la denominada “agua ligada”.

- La temperatura de inicio de congelación es aquella en la que solo aparecen cristales de hielo puro. A medida que transcurre la congelación, empiezan a formarse cristales de agua hasta alcanzar cierta concentración denominada eutéctica. Pueden existir varios puntos eutécticos en un alimento, según su complejidad en la composición.
- Atemperado: Es la etapa final en la que el alimento se enfría hasta la temperatura final de congelación en su centro térmico.

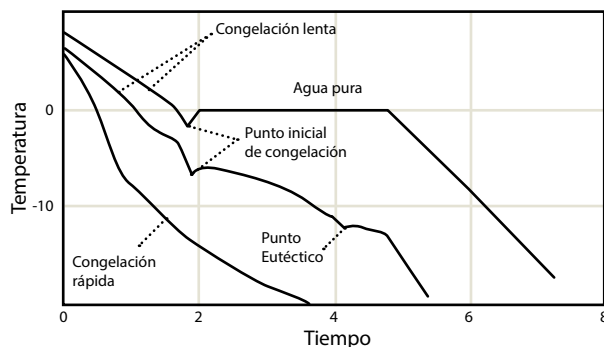
Las curvas de congelación representan la evolución de la temperatura del centro térmico, en función del tiempo. En ella se distinguen las tres etapas anteriores (Gráfico 1).



**Gráfico 1.** Evolución de la temperatura en el centro térmico con el tiempo durante el proceso de congelación AS etapa de preenfriamiento, BE etapa del cambio de fase, EF etapa de atemperado.

El tramo SB corresponde al momento en que el calor liberado durante la congelación de los primeros cristales es superior a la extracción de energía por parte del equipo, por ello se produce en la curva un leve aumento de temperatura desde el subenfriamiento S hasta el comienzo de la etapa de cambio de fase B.

Las curvas de enfriamiento difieren entre una sustancia pura y un alimento (Figura 1). En el caso de una sustancia pura existe una zona de meseta para el cambio de fase. Sin embargo, para un alimento el cambio de fase no se produce a temperatura constante. Se presenta una cierta pendiente, la cual se hace más abrupta a medida que incrementa la velocidad de congelación.



**Figura 1.** Esquema del proceso de congelación en una sustancia pura (agua) y en un alimento a velocidades de congelación lenta y rápida

El objetivo de este trabajo fue estudiar la osmodehidrocongelación de batatas, que consiste en un proceso previo de deshidratación osmótica/impregnación con Zn y Ca para mejorar sus características nutricionales y texturales y posterior congelación.

## Materiales y Métodos

La batata o camote (*Ipomoea batatas L. o Lam*) puede ser considerado un alimento funcional por sus compuestos con actividad antioxidante como carotenos, vitamina E, antocianinas, polifenoles y minerales. La Tabla 1 presenta la composición de la batata.

Componentes	Cantidad por kg
Carbohidratos	248-344 g
Proteínas	11,3-18,0 g
Grasas	3,7-6,0 g
Agua	640-710 g
Calcio	280-350 mg
Potasio	2086-2504 mg
Fósforo	420-488 mg
Magnesio	244-315 mg
Zinc	1,12-1,73 mg
Hierro	7-13,8 mg
Vitamina A	8 U.I
Riboflavina	0,6-0,7 mg
Niacina	6-12,9 mg
Ácido ascórbico	220-400 mg

**Tabla 1.** Composición de la batata (Cusumano, 2013).

## Experiencias de deshidratación

Las batatas fueron lavadas, peladas y luego cortadas en cubos de 1 cm de arista. Luego se sumergieron en una solución deshidratante: concentración de sacarosa (40% m/m), cloruro de calcio (5% m/m), gluconato de Zn (0,5% m/m), ácido ascórbico (5% m/m) y ácido cítrico (1% m/m). La temperatura de las experiencias fue de 40 °C, la relación masa de solución a masa de batata ( $R = 4$ ) y el nivel de agitación fue de 120-130 rpm.

Durante el proceso de deshidratación osmótica se determinó la variación de peso de la muestra de batata en los intervalos de tiempo: 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 y 300 min. De la misma manera, se registró la variación de humedad a los diferentes tiempos, según método de la AOAC International (1996). Los ensayos se realizaron por triplicado. Asimismo, se determinó la absorción de Ca y Zn por la batata inmersa en la solución deshidratante mediante espectrofotometría de absorción atómica para los tiempos anteriores hasta los 240 min.

## Modelos de deshidratación osmótica

Las ecuaciones para determinar la humedad (H), los sólidos totales (ST), la pérdida de peso (PP), la pérdida de agua (PA) y la ganancia de sólidos (GS) se detallan a continuación:

$$H(\%) = 100 - ST(\%) \quad (1)$$

$$ST(\%) = \left( \frac{m_s}{m_o} \right) \times 100 \quad (2)$$

$$PP(\%) = \left( \frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (3)$$

$$PA(\%) = \left[ \left( 1 - \frac{ST_0}{100} \right) - \left( 1 - \frac{ST}{100} \right) \left( 1 - \frac{PP}{100} \right) \right] \times 100 \quad (4)$$

$$GS(\%) = \left[ \left( 1 - \frac{PP}{100} \right) \frac{ST}{100} - \frac{ST^0}{100} \right] \times 100 \quad (5)$$

$m_i$ , masa inicial de muestra de batata fresca;  $m_f$ , masa de muestra deshidratada osmóticamente a tiempo  $t$ ;  $m_s$ , masa de muestra seca;  $m_o$ , masa de muestra antes de secar,  $H$  (%), porcentaje de humedad;  $ST^0$  y  $ST$ , contenido de sólidos totales iniciales y en el tiempo, respectivamente.

Se utilizaron los siguientes modelos para ajustar los datos experimentales:

- Modelo de Page (1949)
- Modelo de Henderson Pabis (1961)
- Modelo de Midilli et al. (2002)
- Modelo de Azuara et al. (1992)
- Modelo de Crank (1975), que se basa en la segunda Ley de Fick de la difusión.

Los modelos de Page (1949), Henderson y Pabis (1961) y Midilli et al. (2002) plantean una relación directa entre el contenido de humedad y el tiempo de deshidratación.

Modelo de Page (1949)

$$\frac{(H_t - H_e)}{(H_0 - H_e)} = e^{-K t^N} \quad (\text{parámetros } K \text{ y } N) \quad (6)$$

Modelo de Henderson y Pabis (1961)

$$\frac{(H_t - H_e)}{(H_0 - H_e)} = A e^{-Kt} \quad (\text{parámetros } A \text{ y } K) \quad (7)$$

Modelo de Midilli et al. (2002)

$$\frac{(H_t - H_e)}{(H_0 - H_e)} = A * e^{-K t^N} + B * t \quad (\text{parámetros } A, B, K \text{ y } N) \quad (8)$$

### Modelo de Azuara et al. (1992)

Este modelo se basa en el balance de agua en el alimento. Consiste en una ecuación de dos parámetros que puede predecir la cinética de la deshidratación osmótica y la pérdida de agua en el equilibrio. La principal ventaja es que la pérdida de agua a tiempo infinito se puede estimar utilizando datos obtenidos durante un período relativamente corto de tiempo. Además, su

aplicación a los datos experimentales no requiere de las dimensiones, la forma, ni de la estructura del alimento. Sin embargo, como todo modelo empírico, su principal inconveniente es que su validez se limita a las condiciones experimentales para las que se obtuvieron los parámetros. La ecuación que representa el modelo es:

$$PA = PA_{\infty} [S_1 t / (1 + S_1 t)] \quad (9)$$

Donde  $PA_{\infty}$  es la pérdida de agua en el equilibrio y  $S_1$  es la velocidad de pérdida de agua. La ecuación precedente suele linealizarse y escribirse de la siguiente forma:

$$\frac{t}{PA} = \frac{t}{PA_{\infty}} + \frac{1}{S_1 PA_{\infty}} \quad (10)$$

### Modelo de Crank (1975)

Consiste en un grupo de soluciones de la segunda Ley de Fick para diferentes geometrías, condiciones límite y condiciones iniciales. Con este modelo se puede estimar el coeficiente de difusión efectiva del agua ( $D_{\text{ef},a}$ ) y de los solutos ( $D_{\text{ef},s}$ ), resolviendo las ecuaciones de manera analítica o numérica. No obstante, las suposiciones que se consideran no siempre son fáciles de lograr, lo que implica grandes limitaciones.

Suposiciones del modelo:

- El alimento es sólido, homogéneo y uniforme.
- Se asume que la concentración de los solutos en la solución osmótica se mantiene constante. Esto se logra con una relación masa de solución a masa de alimento muy grande.
- Por inmersión del alimento en la solución hipertónica se producen dos movimientos difusivos:
  - Difusión del agua del interior del alimento hacia la superficie y posteriormente hacia la solución.
  - Difusión de solutos desde la solución hipertónica bien agitada hacia el interior del sólido.
- Las condiciones de equilibrio se determinan experimentalmente y, por lo general, no se alcanza el equilibrio a los tiempos que se consideran en las experiencias.
- Se considera que no hay efecto de los solutos ganados ni de los solutos perdidos en el proceso de difusión del agua.
- Se desprecia el encogimiento del alimento debido a la transferencia de masa.
- Se considera que el único mecanismo para la transferencia de agua es la difusión molecular; si bien este es el principal, también existen otros mecanismos.
- Se desprecia la resistencia externa a la transferencia de masa lograda con la agitación de la solución hipertónica. Esta suposición no se puede lograr a bajas temperaturas ni a una alta concentración de soluto en la solución.

Por consiguiente, el uso del modelo de Crank (1975) se convierte en un procedimiento empírico que intenta ajustar los datos experimentales para determinadas condiciones de operación y el coeficiente de difusión efectiva del agua resulta un parámetro cinético fuertemente dependiente de las condiciones experimentales y del método matemático.

### Determinación de coeficientes de difusión

La segunda Ley de Fick para la difusión unidireccional en estado transitorio está dada por:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{ef} \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (11) \quad \text{Ordenada al origen: } 3 \ln C_1 \quad (18)$$

Donde:

C: concentración

t: tiempo

$D_{ef}$ : coeficiente de difusión efectivo o aparente

x: dimensión en la que se produce la difusión, distancia desde el centro de la placa.

Para las siguientes suposiciones y condiciones límite:

$$C = C_e \text{ a } t = 0 \text{ -} L < x < +L$$

donde L es el semiespesor de la placa y  $C_0$  es la concentración inicial.

$$C = C_1 \text{ a } t > 0 \text{ } x = \pm L$$

donde  $C_1$ : la concentración en el seno del fluido.

La solución de la ecuación – promediada en el volumen – cuando se plantea en tres dimensiones para la difusión del agua en los cubos de batata se detalla a continuación:

$$\frac{(H_t - H_e)}{(H_0 - H_e)} = \sum_{n=1}^{\infty} C_n^3 \exp \left[ -D_{efa} t q_n^2 \left( \frac{3}{a^2} \right) \right] \quad (12)$$

H se reemplaza por C (concentración) en la Ecuación 12, cuando se calcula la difusividad efectiva de los iones calcio o zinc:

$$C_n = \frac{2\alpha(1+\alpha)}{1+\alpha+\alpha^2 q_n^2} \quad (13)$$

$$\tan q_n = -\alpha q_n \quad (14)$$

$D_{efa}$ : coeficiente de difusión efectivo del agua.

Los subíndices 0, t y e se refieren a las condiciones iniciales, a cualquier tiempo t y al equilibrio, respectivamente.

a: semiarista del cubo.

$q_n$  son las raíces positivas no nulas de la Ecuación 14.

$\alpha$  es la relación entre el volumen de solución y el volumen del producto (batata).

El número de Fourier para la transferencia de agua.

$$F_{oa} = \frac{3D_{efa} t}{a^2} \quad (15)$$

Cuando el número de Fourier para la transferencia de agua es mayor que 0,1, solamente el primer término de la serie en la Ecuación 12 es significativo y los demás términos pueden despreciarse.

Entonces, las ecuaciones se reducen a las siguientes expresiones cuando se aplica logaritmo natural a ambos miembros:

$$\ln \left[ \frac{H_t - H_e}{H_0 - H_e} \right] = 3 \ln C_1 - D_{efa} q_1^2 \frac{3}{a^2} t \quad (16)$$

Si se grafican el primer miembro de esta ecuación versus el tiempo de deshidratación empleando los datos experimentales, en ambos casos se obtiene aproximadamente una recta, cuya pendiente y ordenada al origen correspondiente a la ecuación anterior son las siguientes:

$$\text{Pendiente: } -D_{efa} q_1^2 \frac{3}{a^2} \quad (17)$$

El valor de  $D_{efa}$  puede determinarse a partir de la pendiente de la recta.

Se consideró como criterio de ajuste de los modelos a los datos experimentales, el coeficiente de determinación,  $R^2$

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (V_{pre_i} - \bar{V})^2}{\sum_{i=1}^N (V_{exp_i} - \bar{V})^2} \quad (19)$$

$\bar{V}$  = promedio de todos los datos experimentales

N = número de datos experimentales

Subíndices

<sub>pre</sub> indica valor predicho por el modelo

<sub>exp</sub> indica valor experimental

## Experiencias de congelación

Las batatas en cubos frescas y las batatas deshidratadas osmóticamente durante 1 h se congelaron en un túnel con circulación forzada de aire a  $-31, 5 \pm 1$  °C en bandejas de acero inoxidable perforadas. El coeficiente de transferencia de calor del equipo de congelación se halla en el rango de 20-23 W/m<sup>2</sup>°C. Las temperaturas de las muestras (en su centro) y del aire se registraron con termocuplas de cobre-constantán, conectadas a un adquirente de datos a intervalos de tiempo de 10 seg. El tiempo de congelación se determinó experimentalmente y se estimó de forma teórica con el modelo de Salvadori-Mascheroni (1991) hasta que el centro térmico, centro de los cubos, alcanzó una temperatura de  $-18$  °C.

## Estimación de tiempos de congelación

Generalmente, se emplean dos métodos para la predicción de tiempos de congelación: los numéricos y los aproximados. Las soluciones aproximadas, basadas en suposiciones simplificadas, fueron aplicadas por varios investigadores, entre ellos Cleland et al. (1987) y Salvadori-Mascheroni (1991).

Los métodos numéricos se basan en la siguiente ecuación diferencial en estado no estacionario para un sistema multidimensional:

$$\rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla \cdot (k \nabla T) \quad (20)$$

Donde  $\rho$  es la densidad,  $c_p$  el calor específico,  $k$  la conductividad térmica,  $t$  el tiempo y  $T$  la temperatura.

En la resolución numérica de la ecuación diferencial se emplean elementos finitos o diferencias finitas. Las diferencias finitas es un método satisfactorio en geometrías regulares, mientras que los elementos finitos es más adecuado cuando se trata de geometrías irregulares.

Salvadori y Mascheroni (1991) desarrollaron un método de predicción de tiempos de congelación de alimentos (Ecuación 21) válido para las formas regulares, cuya fórmula de cálculo es extremadamente simple; solo es necesario conocer dos propiedades termofísicas del producto sin congelar: la difusividad térmica ( $\alpha$ ) y la conductividad térmica ( $k$ ) en las

condiciones de temperatura inicial. El método cuenta con la ventaja de no requerir valores de propiedades térmicas del producto congelado ni del cálculo de la entalpía efectiva del cambio de fase.

La ecuación es válida para un rango amplio de condiciones operativas, simétricas o asimétricas, frecuentes en la congelación industrial. Para la obtención de la ecuación, Salvadori y Mascheroni (1991) emplearon datos experimentales propios y de otros autores, también calculados por métodos numéricos.

Asimismo, el método es válido para una gran variedad de alimentos de composición y estructura diferentes, como carne vacuna entera y picada, distintos pescados, productos frutihortícolas, geles, etcétera. En general, el método se puede aplicar a alimentos con alto contenido inicial de agua.

$$t_{c,pl} = \frac{L^2}{\alpha} (a T_c + b) \left( \frac{1}{Bi} + c \right) (1 + T_i)^n (-T_a - 1)^{-d} \quad (21)$$

Donde  $t_{c,pl}$  es el tiempo de congelación de una placa plana en s;  $\alpha$ , la difusividad térmica del producto sin congelar ( $\alpha=k/\rho c_p$ ), en  $m^2/s$ ;  $L$ , el semiespesor de la placa en m;  $T_i$ , la temperatura inicial;  $T_a$ , la temperatura del refrigerante (aire) y  $T_c$  la temperatura final a alcanzar en el centro térmico (generalmente  $-18^\circ C$ ) expresadas todas en  $^\circ C$ ,  $Bi$  es el número adimensional de Biot. Las constantes, empíricas, dependen de la geometría. Para placa plana infinita  $a = -1,272$ ;  $b = 65,489$ ;  $c = 0,184$ ;  $n = 0,096$  y  $d = 1,070$ . Las condiciones de aplicación son:

$$2^\circ C \leq T_i \leq 25^\circ C, -45^\circ C \leq T_a \leq -25^\circ C \text{ y } 1 \leq Bi \leq 50.$$

El número de Biot ( $Bi$ ) es un número adimensional que relaciona la resistencia interna del producto con la resistencia externa a la transferencia de energía y cuya expresión es:

$$Bi = h L/k. \quad (22)$$

Donde  $h$  es el coeficiente de transferencia de calor por convección expresado en  $W/(m^2^\circ C)$  y  $k$  es la conductividad térmica del producto expresada en  $W/(m^\circ C)$ .

Para tener en cuenta la influencia de la forma de los alimentos multidimensionales en el tiempo de proceso se han utilizado distintos tipos de factores de forma.

Cleland et al. (1987) han desarrollado varias versiones de estos. La más ampliamente utilizada es la siguiente:

$$t_{total} = \frac{t_{cpl}}{E} \quad (23)$$

Donde  $t_{cpl}$  es el tiempo de congelación de una placa plana y  $E$  es el factor de forma o número equivalente de dimensiones de transferencia de calor. Para una placa infinita  $E=1$ , para un cilindro infinito  $E=2$  y para una esfera o un cubo  $E=3$ .

El tiempo total calculado con la ecuación de Salvadori y Mascheroni (1991) tiene en cuenta los tiempos empleados en cada etapa:

$$t_{total} = t_p + t_f + t_a \quad (24)$$

donde  $t_p$  es el tiempo de preenfriamiento,  $t_f$  es el tiempo de congelación y  $t_a$  es el tiempo de atemperado que sería el que transcurre entre el final de la etapa anterior y el tiempo final total del proceso, que en la industria se considera generalmente cuando se alcanza  $-18^\circ C$ .

Los errores en la estimación de los tiempos de congelación se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Error} = (\text{Valor experimental} - \text{Valor teórico}) / (\text{Valor teórico}) \quad (25)$$

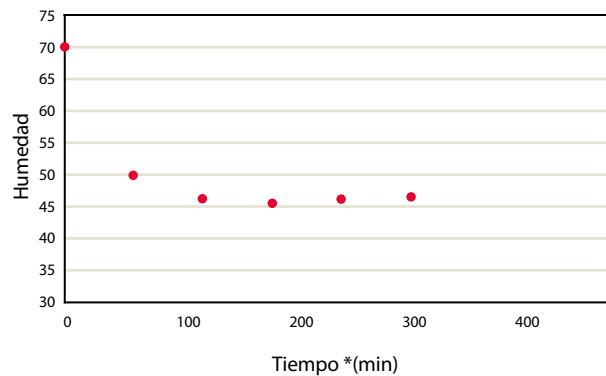
### Estimación de propiedades físicas y térmicas de la batata

Se utilizaron las correlaciones de Choi y Okos (1986) para estimar las propiedades de la batata fresca y deshidratada que dependen de la composición del producto y su temperatura.

## Resultados

### Estimación de parámetros de los modelos de deshidratación osmótica

En el Gráfico 2 se presentan los datos experimentales de humedad de la batata en base húmeda ( $b.h$ ) en función del tiempo de deshidratación osmótica.



**Gráfico 2.** Humedad en función del tiempo de deshidratación osmótica para los cubos de batata de 1 cm de arista para un tiempo de deshidratación osmótica total de 5 h.

Modelo	A	K (min <sup>-1</sup> )	N	B	R <sup>2</sup>
Page (1949)		0,032	0,983		0,9999
Henderson y Pabis (1961)	0,7457	0,023			0,9196
Midilli et al. (2002)	0,9988	0,0389	0,934	3,1 10 <sup>-5</sup>	0,9973

**Tabla 2.** Parámetros de las ecuaciones de los modelos y bondad del ajuste.

La humedad tiende a tomar un valor constante a los 120 min del proceso de deshidratación osmótica. Los valores de humedad para tiempos 120 min, 180 min, 240 min y 300 min son muy cercanos entre sí e iguales al valor obtenido al final del proceso de deshidratación osmótica (46% de humedad b.h). Por consiguiente, se puede considerar como humedad de equilibrio este último valor, que fue el que se empleó en los modelos.

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos al modelar la transferencia de agua en el proceso de deshidratación osmótica con los modelos de Page (1949), Henderson y Pabis (1961) y Midilli et al. (2002).

El parámetro N tanto en el modelo de Page (1949) como el de Midilli et al. (2002) se aproximan a 1. Los modelos de Page (1949) y Midilli et al. (2002) son los que ajustaron mejor los datos experimentales. Varios autores encontraron que el modelo de Midilli et al. (2002) describe muy satisfactoriamente la cinética de secado de frutas y vegetales (Onwude, et al., 2016).

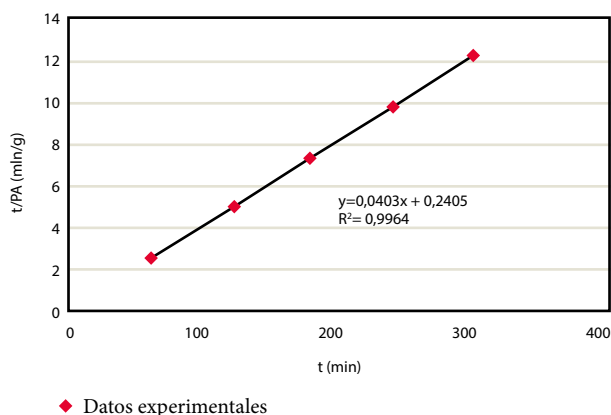
Se aplicó el modelo de Azuara et al. (1992) a los datos experimentales de pérdida de agua y se graficó el primer miembro de la ecuación,  $t/PA$ , en función del tiempo de deshidratación osmótica,  $t$ . En la Tabla 3 se exponen los parámetros correspondientes al modelo. En el Gráfico 3 se presentan los datos experimentales y su correspondiente ajuste con el modelo.

$S_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$PA_\infty$	$R^2$
0,04	24,8	0,9964

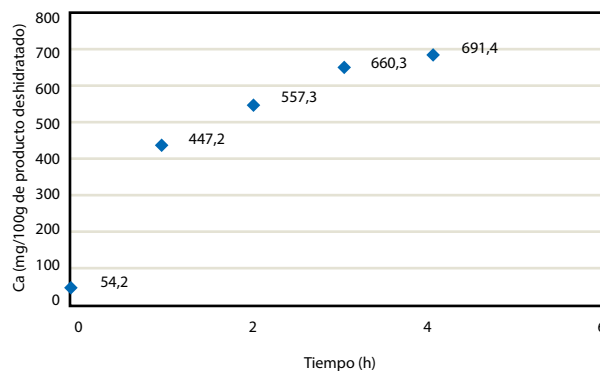
**Tabla 3.** Parámetros del modelo de Azuara et al. (1992).

Este modelo ajustó muy satisfactoriamente los datos experimentales, lo cual puede evidenciarse en el valor de  $R^2$  obtenido. Cabe resaltar la ventaja de este modelo que permite predecir la pérdida de agua en el equilibrio sin tener que llegar a él.

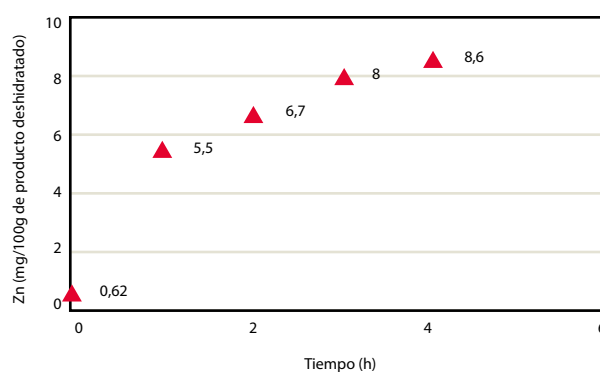
A partir de los datos experimentales de humedad inicial (71%) y humedad final a  $t$ : 5 h (46%) se calculó la pérdida de agua en el equilibrio, que resultó ser 25%. Si se compara este valor experimental con el valor obtenido con el modelo de Azuara et al. (1992), 24,8%, el error diferencial porcentual es del 0,8% en defecto.



**Gráfico 3.** Datos experimentales de  $t/PA$  en función del tiempo y ajuste con el modelo de Azuara et al. (1992) para la deshidratación osmótica.



**Gráfico 4.** Absorción de calcio en batata durante el proceso de deshidratación osmótica.



**Gráfico 5.** Absorción de zinc en batata durante el proceso de deshidratación osmótica.

Los Gráficos 4 y 5 exhiben la absorción de minerales Ca y Zn durante el tiempo de deshidratación osmótica, respectivamente.

La absorción de minerales durante la deshidratación osmótica crece con el tiempo hasta alcanzar un valor máximo aproximadamente a las 4 horas. Asimismo, se puede apreciar que durante la primera hora se absorbe un 63-67% del valor máximo alcanzado. Esto se cumple tanto para el calcio como para el zinc.

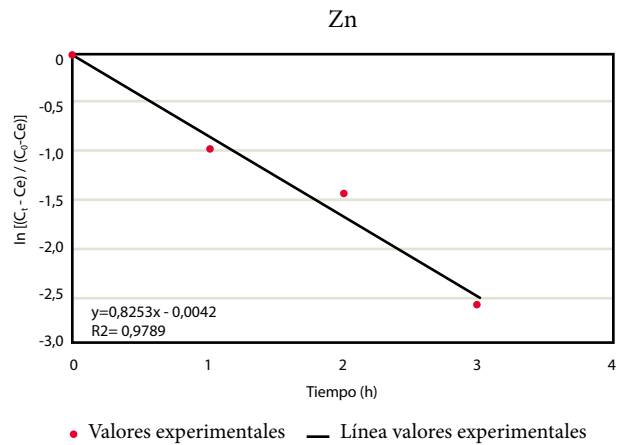
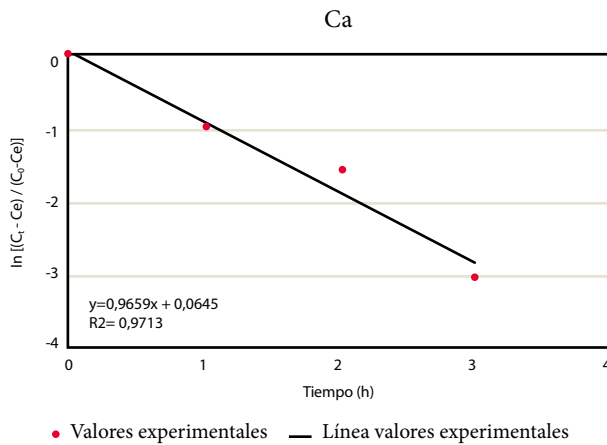
### Ajuste de los datos experimentales al modelo de Crank (1975) y cálculo de los coeficientes de difusividad efectiva de los iones calcio y zinc

En los Gráficos 6 y 7 se presenta el ajuste del modelo de Crank (1975) a los datos experimentales de absorción de calcio y de zinc, respectivamente. En ellos se muestra también la ecuación y la bondad del ajuste,  $R^2$ .

A partir de la pendiente de las rectas de regresión de los Gráficos 6 y 7 se obtienen los coeficientes de difusividad efectiva (Ecuación 16).

El coeficiente de difusividad efectiva del ión calcio fue de  $2,24 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  y el del ión zinc fue de  $8,7 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ .

Asimismo, se aplicó el modelo de Crank (1975) para determinar el coeficiente de difusión del agua, que resultó



**Gráfico 6.** Ajuste de los datos experimentales de absorción de Ca en la batata al modelo de Crank (1975) durante la deshidratación osmótica.

**Gráfico 7.** Ajuste de los datos experimentales de absorción de Zn en la batata al modelo de Crank (1975) durante la deshidratación osmótica.

ser  $1,4 \times 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s. Este valor se encuentra en el rango de valores de los coeficientes encontrados por Genina Soto et al. (2001) en batata deshidratada osmóticamente en solución de 70° Brix a T= 50 °C.

congelación final en menor tiempo que la batata fresca debido a que posee menor contenido de agua.

La Ecuación 23 predice el tiempo de congelación con un error del +1,8 respecto del experimental para la batata fresca y de +7,9% para la batata pretratada por DO.

### Predicción del tiempo de congelación

El Gráfico 8 exhibe las curvas de congelación correspondientes a la batata fresca y a la deshidratada osmóticamente. La velocidad de congelación es superior cuando se emplea el pretratamiento de DO (batata deshidratada), tal como puede observarse en las curvas de congelación (temperatura versus tiempo) de pendientes más abruptas en sus distintas zonas y en las que no se aprecian prácticamente zonas amesetadas como en el caso de las sustancias puras.

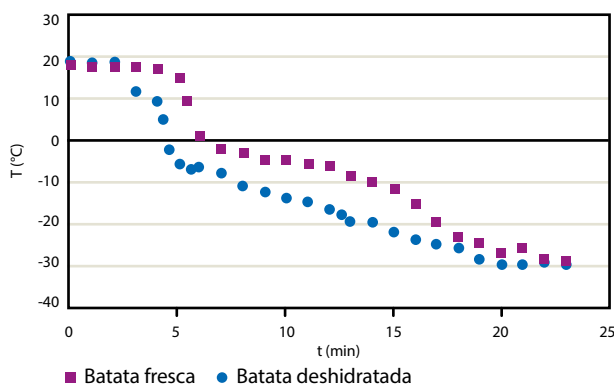
Los tiempos de congelación de la batata con y sin el pretratamiento de DO se estimaron muy satisfactoriamente aplicando el modelo de Salvadori-Mascheroni (1991) (Ecuaciones 21 y 23). En la Tabla 4 se presentan los valores de tiempos de congelación experimentales y calculados y sus respectivos errores. La batata deshidratada alcanza una temperatura de

	Tiempo experimental (min)	Tiempo calculado (min)	Error (%)
Batata fresca	17	17,3	1,8
Batata con DO 1h	14	15,1	7,9

**Tabla 4.** Tiempos de congelación experimental y calculado con la ecuación de Salvadori-Mascheroni (1991) para batata fresca y batata pretratada por deshidratación osmótica durante 1 h.

## Discusión

- La deshidratación osmótica de cubos de batata resulta ser un proceso eficiente desde el punto de vista energético, ya que permite obtener una reducción significativa de la humedad sin un consumo importante de energía (humedad inicial: 71%, humedad final: 46%). La deshidratación osmótica se realiza a temperatura de 40 °C cercana al ambiente.
- La deshidratación osmótica/impregnación permitió fortificar la batata con calcio y zinc.
- Los modelos de Page (1949), Midilli et al. (2002) y Azuara et al. (1992) ajustaron los datos experimentales muy satisfactoriamente para el proceso de deshidratación osmótica.
- La ecuación de Mascheroni-Salvadori (1991) predijo satisfactoriamente los tiempos de congelación sin requerir los valores de las propiedades térmicas del alimento congelado ni el cálculo de la entalpía efectiva del cambio de fase. Los errores respecto de los tiempos experimentales fueron menores al 10%.



**Gráfico 8.** Curvas de congelación para la batata fresca y la batata pretratada con deshidratación osmótica (DO) durante 1 h.

- El proceso de osmodehidrocongelación disminuye el tiempo necesario de congelación del producto al reducir el contenido de humedad durante el pretratamiento por deshidratación osmótica. De esta forma, se puede lograr un ahorro energético significativo del proceso total.
- Los resultados y las conclusiones alcanzadas aportan información relevante para predecir la tendencia de algunas variables determinantes en la eficiencia del proceso de conservación y pueden contribuir a optimizar las condiciones de proceso a escala industrial.

## Referencias

- AOAC International, 1996. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 934.06, first action 1934, revised 1996.
- Azuara, E., Beristain, C. I. y García, H.S., 1992. Development of a mathematical model to predict kinetics of osmotic dehydration. En: *International Journal of Food Science and Technology*, 29(4), pp.239-242.
- Carbajal Azcona, A., 2013. *Manual de nutrición y dietética* [En línea]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. [Consulta: marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.ucm.es/nutricioncarbajal>.
- Cusumano, Cosme y Zamudio, Néstor, 2013. *Manual técnico para el cultivo de batata (camote o boniato) en la Provincia de Tucumán (Argentina)*. Tucumán: INTA. ISBN 978-987-679-134-2.
- Cleland, D.J., Cleland, A.C. y Earle, R.L., 1987. Prediction of freezing and thawing times for multidimensional shapes by simple methods. Part I: Regular shapes. En: *Int. J. Refrig.*, 10, pp.156.
- Crank, J., 1975. *The mathematics of diffusion*. 2a ed. London: Clarendon Press.
- Choi, Y. y Okos, M.R., 1986. Effects of temperature and composition on the thermal properties of foods. En: Le Maguer, M. y Jelen, P., ed. *Food engineering and process application*. Vol.1. Londres: Elsevier. pp.93-101.
- Della Rocca, P., 2010. *Secado de alimentos por métodos combinados: deshidratación osmótica y secado por microondas y aire caliente*. Buenos Aires: UTN FRBA. (Tesis de maestría).
- Genina-Soto P., Barrera-Cortés J., Gutiérrez-López G.F. y Azuara, N.E., 2001 Temperature and concentration effects of osmotic media on OD profiles of sweet potato cubes. En: *Drying Technol.*, 19, pp.547-558.
- Henderson, S.M. y Pabis, S., 1961. Grain drying theory. En: *I. Agric. Eng. Res.*, 6(3), pp.169- 174.
- IIR, 1972. *Recommendations for the processing and handling of frozen foods*. 2a ed. Paris: International Institute of Refrigeration.
- Kumar Yadav, A. y Vir Singh, S., 2014. *Osmotic dehydration of fruits and vegetables: a review*. En: *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), pp.1654-1673.
- Lenart, A. y Flink J., 1984, Osmotic concentration of potato. I. Criteria for the end-point of the osmosis process. En: *Journal Food Technology*, 19, pp.45-63.
- Lovera, N.N., 2016. *Estudio de la impregnación con calcio en la preservación de papaya*. La Plata: UNLP. (Tesis de doctorado).
- Mascheroni, R.H., 1982. The utilization of numerical methods for solution of the heat balance during the thawing of meat blocks under industrial conditions. En: *Lat Am J Heat Mass Transf.*, 6, pp.13.
- Midilli, A., Kucuk, H. y Yapar, Z., 2002. A new model for single layer drying. En: *Dry Technol.*, 20(7), pp.1503-1513.
- Onwude, D., Hashim, N., Janius, R., Nawi, L. y Abdan, K., 2016. Modeling the thin layer drying of fruits and vegetables: a review. En: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, pp.599-618.
- Page, G.E., 1949. *Factors influencing the maximum rates of air drying shelled corn in thin layers*. Purdue: Department of Mechanical Engineering. (Tesis de Maestría).
- Salvadori, V.O. y Mascheroni R.H., 1991. Prediction of freezing and thawing times of foods by means of a simplified analytical method. En: *Journal of Food Engineering*, 13(1), pp.67-78.
- Salvadori, V.O., 1994. *Transferencia de calor durante la congelación, el almacenamiento y la descongelación de alimentos*. La Plata: UNLP. (Tesis de Doctorado).
- Silva Paz, R. J., 2015. *Osmodehidrocongelación de papa (Solanum Tuberosum) impregnada con vitamina C y calcio envasada en atmósfera modificada*. Entre Ríos: UNER. (Tesis de Doctorado).

# Formación de nanocomplejos entre polifenoles de cáscaras de manzanas y beta-lactoglobulina para su potencial aplicación en alimentos funcionales

## Nanocomplexes formation between polyphenols of apple peels and beta-lactoglobulin for their potential application in functional foods

Llopert, Emilce E. (1,2); Busti, Pablo A. (1); Verdini, Roxana A. (1,3); Delorenzi, Néstor J. (1).

(1) Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Santa Fe, Argentina.

(2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Rosario, Santa Fe, Argentina.

(3) Instituto de Química Rosario (IQUIR, UNR-CONICET), Rosario, Santa Fe, Argentina.

Contacto: ndeloren@fbioyf.unr.edu.ar

RECIBIDO: 15/3/2018 APROBADO: 4/6/2018

### Resumen

Los polifenoles (PF) ejercen una importante influencia sobre la salud humana, principalmente por su capacidad antioxidante. Las manzanas poseen PF principalmente en su cáscara. La proteína mayoritaria del lactosuero, la beta-lactoglobulina ( $\beta$ -lg), puede unir compuestos anfifílicos, como PF, protegiéndolos de agentes externos. Se estudió la posibilidad de vehiculizar PF de cáscara de manzanas rojas (Red Delicious), formando nanocomplejos (NC) con  $\beta$ -lg. El contenido de PF de cáscara de manzana roja ensayada fue de  $266 \pm 2$  mg AG/100 g. Por ultrafiltración se determinó que el 57% formó NC con  $\beta$ -lg. Por medidas de extinción de la fluorescencia de los PF sobre  $\beta$ -lg se confirmó la formación de un complejo estático entre PF y  $\beta$ -lg. Las experiencias de extinción de la fluorescencia con acrilamida no mostraron diferencia significativa ante la presencia de PF, indicando que los PF se unen a un sitio distinto al del bolsillo hidrofóbico de la proteína. El tamaño de partícula y el potencial  $\zeta$  de  $\beta$ -lg no se modificaron por agregado de PF. Se observó que la mayor parte de los PF forman NC con  $\beta$ -lg. Son necesarios más estudios para caracterizar el complejo con la finalidad de utilizarlo para enriquecer alimentos.

**Palabras clave:** Polifenoles, cáscaras de manzanas, beta-lactoglobulina, nanocomplejos.

### Abstract

Polyphenols (PF) exert an important influence on human health, mainly due to their antioxidant capacity. Apples have PF mainly in their peel. The major whey protein, beta-lactoglobulin ( $\beta$ -lg), can bind amphiphilic compounds, such as PF, protecting them from the action of external agents. In this work, nanocomplexes (NC) of PF extracted from red apple peel (Red Delicious), and  $\beta$ -lg were studied. By ultrafiltration it was determined that 57% of the PF added bound to the protein. Fluorescence extinction of  $\beta$ -lg by PF addition performed at different temperatures confirmed the formation of a static complex. The fluorescence extinction of  $\beta$ -lg with acrylamide did not vary significantly in the presence of PF, indicating that PF bound to a site different from the hydrophobic pocket of the protein. Particle size and  $\zeta$  potential measurements of  $\beta$ -lg were not significantly modified by the addition of PF. This fact pointed to a low number of PF bounded to the dimer of the protein. In conclusion, NC would allow PF vehiculation, their protection and use for enrichment functional foods.

**Keywords:** Polyphenols, apple peel, beta-lactoglobulin, nanocomplexes.

## Introducción

Existe abundante evidencia científica que correlaciona la ingestión de polifenoles (PF) con una menor incidencia de enfermedades crónicas, tales como las cardiovasculares, diabetes y cáncer, debido a su actividad antioxidante (Landete, 2012; Del Río, et al., 2013; Lima, et al., 2014). Esto generó un creciente interés en aumentar el contenido de PF en la

dieta, incorporándolos en alimentos funcionales (Benzie y Wachtel-Galor, 2012).

La manzana es una fruta ampliamente consumida. La Cámara Argentina de Fruticultores Integrados estima que la producción mundial de manzanas es de alrededor de 85 millones de toneladas (CAFI, 2017). Esta fruta posee, entre otros nutrientes, PF, y presenta el mayor contenido en la cáscara (Escarpa y González, 1998; Solovchenko y Schmitz-Eiberger, 2003; Wolfé,



et al., 2003). Esta característica resultaría de interés para los productores, ya que podrían encontrar usos alternativos para los cultivos que no cumplen con los estándares de calidad y, por lo tanto, son considerados como descarte (Reyes y Cisneros-Zevallos, 2003; Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zevallos, 2012).

La proteína mayoritaria del lactosuero, la betalactoglobulina ( $\beta$ -lg), es muy estudiada por su capacidad de ligar compuestos hidrofóbicos y anfífilicos como vitaminas liposolubles, ácidos grasos y PF (Livney, 2010; Livney, 2017). La interacción entre  $\beta$ -lg y PF del té ha sido muy estudiada, no así la interacción con PF extraídos de cáscara de manzanas, alimentos que presentan diferentes tipos y cantidades de PF (Rodríguez, et al., 2015). La interacción de la  $\beta$ -lg con estos compuestos está regida principalmente por interacciones en su bolsillo hidrofóbico, pero también se han descrito enlaces a través de otros sitios presentes en la cavidad cercana a la estructura de alfa-hélice y en la superficie externa de la molécula (Kontopidis, et al., 2004; Delorenzi, 2005).

La incorporación de sustancias bioactivas a alimentos es una manera de desarrollar productos alimenticios funcionales que pueden proveer beneficios fisiológicos y/o disminuir el riesgo de contraer enfermedades (Chen y Subirade, 2006). Con el fin de incorporar sustancias bioactivas a alimentos a través de técnicas nanotecnológicas, el proceso de encapsulación presenta gran potencial para el desarrollo de productos innovadores en la industria alimentaria (Sekhon, 2010). Al atrapar un bioactivo dentro de un núcleo encapsulante se lo protege de posibles condiciones adversas (pH, luz, temperatura, humedad u oxígeno), preservando su funcionalidad, aumentando su vida útil y posibilitando su transporte (Tavares, et al., 2014; Quintanilla-Carvajal, et al., 2010).

Por lo antedicho, se propuso evaluar la posibilidad de vehicular PF de cáscara de manzanas rojas (*Red Delicious*), formando nanocomplejos (NC) con  $\beta$ -lg.

## Materiales y Métodos

### Reactivos

Se utilizó  $\beta$ -lg DAVISCO Foods International, Inc. (Le Sueur, MN). Se preparó una solución madre de  $\beta$ -lg 100  $\mu$ M en buffer fosfato 20 mM (pH 6,8). La solución de acrilamida (Sigma, USA) 5 M se preparó en buffer fosfato 20 mM (pH 6,8). Todos los demás productos químicos fueron de calidad analítica.

### Manzanas

Se adquirieron manzanas *Red Delicious* que se lavaron, escurrieron y secaron con papel. Luego se procedió a pelarlas y, a partir de la cáscara, extraer los PF.

### Extracción de PF

Los PF de las manzanas fueron extraídos por un método adaptado del trabajo de Wolfe et al. (2003). Se mezclaron 5 g de cáscara de manzana trozada con 20 mL de una solución fría de metanol/agua 80:20 durante 5 min. La preparación se homogeneizó durante 3 min. Luego se filtró a través de papel Whatman N° 1 y los sólidos se mezclaron con 15 mL de metanol 80%. Se homogeneizó nuevamente por 3 min antes de filtrar. El filtrado se recuperó y se evaporó hasta sequedad usando un evaporador rotatorio Buchi (Alemania) a 45 °C.

Los extractos se reconstituyeron en 3,5 mL con buffer fosfato 20 mM pH 6,8 y se congelaron a -40 °C hasta su análisis. Todos los extractos se realizaron por triplicado.

### Determinación del contenido de PF

Se determinó el contenido de PF por la técnica de Folin-Ciocalteu (Singleton, et al., 1999) usando una curva patrón de ácido gálico (AG) en un rango de concentración de 0 a 500  $\mu$ g/ mL. Los resultados se expresaron como equivalentes de AG g/100g de muestra seca.

### Determinación de formación de complejos de $\beta$ -lg con PF por ultrafiltración

El porcentaje de PF unidos a  $\beta$ -lg fue determinado por ultrafiltración con un equipo Amicon Modelo 12 75 PSI max provisto de una membrana de filtración molecular de celulosa MWCO 10,000. En el ultrafiltrado el ligando libre se midió por Folin-Ciocalteu y el porcentaje de ligando fijado se calculó según la siguiente fórmula:  $\text{PF unidos (\%)} = (\text{PF total} - \text{PF en el filtrado}) / \text{PF total} \times 100$

### Extinción de la fluorescencia intrínseca de la $\beta$ -lg por PF

Esta extinción fue estudiada usando una solución de proteína 20  $\mu$ M en buffer fosfato 20 mM, pH 6,8. Se colocaron alícuotas de 3 mL de esta solución en la cubeta de un espectrofluorómetro Jasco FP-770 y se tituló con una solución madre de PF de 210  $\mu$ M. La intensidad de fluorescencia a 336 nm fue medida después de cada adición de solución de PF utilizando una excitación de 295 nm. Todas las experiencias fueron llevadas a cabo a dos temperaturas: 25 °C y 35 °C.

Las correspondientes constantes de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) fueron obtenidas a partir de las pendientes de las gráficas  $F_0/F$  vs. concentración de agente extintor, de acuerdo con la siguiente ecuación (Liang y Subirade, 2012):

$$F_0/F = 1 + K_{sv} [\text{extintor}]$$

$F_0$  y  $F$  son la fluorescencia en ausencia y presencia de extintor.

### Extinción de la fluorescencia intrínseca de la $\beta$ -lg y por acrilamida

La extinción fue estudiada usando una solución de proteína 20  $\mu$ M, en buffer fosfato 20 mM, pH 6,8, en ausencia y presencia de 100  $\mu$ L de PF 210  $\mu$ M de cáscara de manzana. Se colocaron alícuotas de 3 mL de esta solución en la cubeta de un espectrofluorómetro Jasco FP-770 y se tituló con una solución madre de acrilamida de 5 M. La intensidad de fluorescencia a 336 nm fue medida después de cada adición de alícuota de acrilamida con una excitación de 295 nm. Todas las experiencias fueron llevadas a cabo a 25 °C. Las constantes de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) se obtuvieron de manera similar a lo descrito en la sección anterior.

### Mediciones de tamaño de partícula y potencial Z

Las mediciones del tamaño de partícula fueron llevadas a cabo mediante el uso de un instrumental que mide la dispersión

dinámica de la luz (DLS) (Horiba, Nano Particle Analyzer SZ-100, Kyoto, Japan). El diámetro hidrodinámico es el diámetro de una esfera que difunde a la misma velocidad promedio que la partícula bajo investigación. El diámetro hidrodinámico medio ( $d$ ) es el pico obtenido de la curva que representa la intensidad versus el diámetro de partícula. La carga eléctrica (potencial  $\zeta$ ) de la proteína en presencia de PF fue determinada usando medidas electroforéticas. Antes de la determinación, las muestras fueron filtradas a través de microfiltros de 1  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Las medidas de DLS y potencial  $\zeta$  fueron llevadas a cabo sobre soluciones de  $\beta$ -lg 100  $\mu\text{M}$ , en ausencia y presencia de cantidades variables de 210  $\mu\text{M}$  PF de cáscaras de manzanas. Las medidas se efectuaron por triplicado. La temperatura se mantuvo en 25  $^{\circ}\text{C}$ .

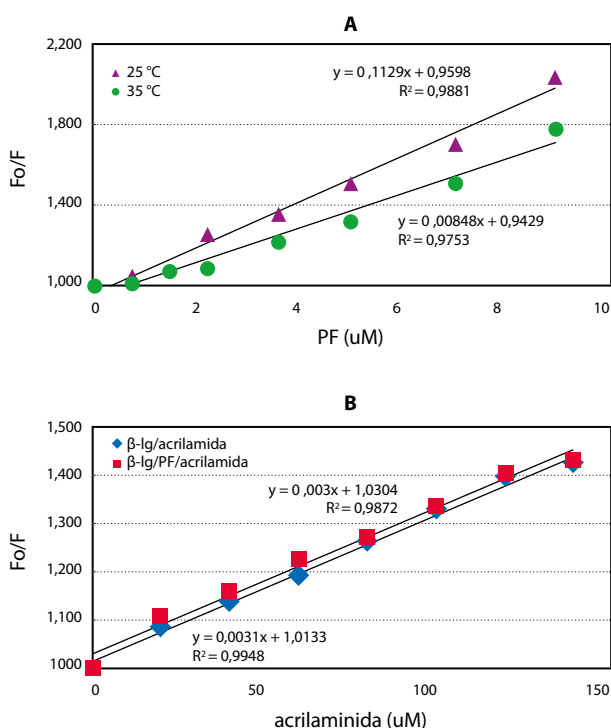
### Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado y se informaron los promedios y desvíos correspondientes. Para la realización del análisis de varianza se utilizó el software estadístico Statgraphics plus 3.0.

## Resultados

El contenido de PF de la cáscara de manzana roja *Red Delicious* obtenido fue de  $266 \pm 2$  mg AG/100 g. Por ultrafiltración se determinó luego que el 57% del total de los PF presentes se ligó a la  $\beta$ -lg.

El análisis de la extinción de la fluorescencia intrínseca de la  $\beta$ -lg por PF presentó una constante de Stern-Volmer de 0,11  $\text{M}^{-1}$  a 25  $^{\circ}\text{C}$  y 0,08  $\text{M}^{-1}$  a 35  $^{\circ}\text{C}$ , y fue significativamente menor la última ( $p < 0,05$ ) (Figura 1A).



**Figura 1.** A) Extinción de la fluorescencia de  $\beta$ -lg por PF. B) Extinción de la fluorescencia de la  $\beta$ -lg con acrilamida en ausencia y presencia de PF.

Sistema	Tamaño de partícula (nm)
$\beta$ -lg	$4,98 \pm 0,97$
$\beta$ -lg + 0,4 $\mu\text{M}$ PF	$5,30 \pm 0,67$
$\beta$ -lg + 0,7 $\mu\text{M}$ PF	$4,88 \pm 1,11$
$\beta$ -lg + 1,1 $\mu\text{M}$ PF	$4,70 \pm 0,94$
$\beta$ -lg + 1,5 $\mu\text{M}$ PF	$5,36 \pm 0,90$
$\beta$ -lg + 1,9 $\mu\text{M}$ PF	$5,42 \pm 0,96$
$\beta$ -lg + 2,2 $\mu\text{M}$ PF	$5,42 \pm 0,93$
$\beta$ -lg + 3,7 $\mu\text{M}$ PF	$5,36 \pm 1,02$
$\beta$ -lg + 4,5 $\mu\text{M}$ PF	$4,62 \pm 0,74$
$\beta$ -lg + 6,0 $\mu\text{M}$ PF	$4,24 \pm 0,96$
$\beta$ -lg + 7,4 $\mu\text{M}$ PF	$4,62 \pm 0,61$

**Tabla 1.** Tamaño de partícula de  $\beta$ -lg y complejos de PF con  $\beta$ -lg. Los resultados se expresaron como  $x \pm \text{DE}$ .

Sistema	Potencial $\zeta$ (mV)
$\beta$ -LG	$-12,89 \pm 1,18$
$\beta$ -LG + 0,6 $\mu\text{M}$ PF	$-11,87 \pm 1,09$
$\beta$ -LG + 1,2 $\mu\text{M}$ PF	$-12,45 \pm 1,50$
$\beta$ -LG + 1,7 $\mu\text{M}$ PF	$-11,98 \pm 0,78$
$\beta$ -LG + 2,3 $\mu\text{M}$ PF	$-11,48 \pm 3,09$
$\beta$ -LG + 2,9 $\mu\text{M}$ PF	$-12,60 \pm 1,79$
$\beta$ -LG + 3,5 $\mu\text{M}$ PF	$-12,65 \pm 0,15$
$\beta$ -LG + 4,6 $\mu\text{M}$ PF	$-12,20 \pm 0,77$

**Tabla 2.** Potencial  $\zeta$  de  $\beta$ -lg y complejos de PF con  $\beta$ -lg. Los resultados se expresaron como  $x \pm \text{DE}$ .

Al realizarse las experiencias de extinción de la fluorescencia con acrilamida de  $\beta$ -lg, en ausencia y presencia de PF, no se observó diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 1B).

La  $\beta$ -lg mostró una distribución monomodal que se ensancha de 3,00 a 6,80 nm, con un pico máximo a 25  $^{\circ}\text{C}$  (4,98 nm). Cuando se agregaron concentraciones crecientes de PF, no se observó ningún cambio significativo en el tamaño de partícula ( $p > 0,05$ ) (Tabla 1).

La adición de PF de cáscara de manzana no modificó en forma significativa el potencial  $\zeta$  de la  $\beta$ -lg ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2).

## Discusión y Conclusión

El valor hallado para el contenido de PF de la cáscara de manzana roja *Red Delicious* es cercano al publicado por Jakobek y Barron (2016), quienes trabajando con manzanas de piel roja obtuvieron contenidos de PF de entre 184 y 417 mg AG/100 g. Otros autores, trabajando con diferentes variedades de

manzanas, hallaron contenidos de entre 165 y 400 mg AG/ 100 g (Valavanidis, et al., 2009), 206 y 472 mg AG/100 g (Wang, et al., 2015), 305 y 713 mg AG/100 g (Vieira, et al., 2011), y 309 y 598 mg AG/100 g (Wolfe, et al., 2003).

Rodríguez et al. (2015) estudiaron por ultrafiltración el porcentaje de PF de té verde unidos a  $\beta$ -lg y obtuvieron valores de entre 62 y 85%, moderadamente superiores a los hallados en este trabajo.

La extinción de la fluorescencia de los PF sobre  $\beta$ -lg mostró una reducción de la constante de Stern-Volmer al aumentar la temperatura, lo cual confirma la formación de un complejo estático entre  $\beta$ -lg y PF (Lakowicz, 2006). Por otra parte, el hecho de que no se observa diferencia en la extinción de la fluorescencia de la  $\beta$ -lg con acrilamida en ausencia y presencia de los PF indicaría que los PF se unirían a un sitio distinto al del bolsillo hidrofóbico sin producir cambios conformacionales evidentes (Moro, et al., 2001). Contrariamente, Kanakis et al. (2011), quienes estudiaron la interacción de  $\beta$ -lg con PF del té, observaron que estos se unen débilmente a la proteína en solución por interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas, produciendo notables cambios conformacionales.

El tamaño de partícula determinado para la  $\beta$ -lg nativa estuvo de acuerdo con los datos previos informados por Von Staszewski et al. (2012) y Von Staszewski et al. (2014). En el rango de trabajo ensayado, el complejo entre la proteína y los PF involucró al dímero de  $\beta$ -lg, tal como lo evidencia la Tabla 1. Asimismo, la unión de PF cargados no fue suficiente para modificar la carga superficial de la proteína e indicó un número relativamente bajo de los PF unidos a la proteína (Tabla 2).

Utilizando PF de distinto origen (PF de té verde) y a concentraciones superiores a las de este trabajo, Rodríguez et al. (2015) observaron la formación de estructuras multimeras. Bajo estas condiciones, otros autores suponen también un apilamiento de PF sobre zonas hidrofóbicas de la proteína debido a su estructura planar (Charlton, et al., 2002; Poncet-Legrand, et al., 2006; Von Staszewski, et al., 2014). La unión entre proteínas del lactosuero y PF se ha caracterizado como interacciones de enlace no covalente, que comprenden interacción hidrofóbica, van der Waals, puente de hidrógeno e interacción iónica (Nagy, et al., 2012).

La formación de NC entre los PF de cáscara de manzanas y dímeros de la  $\beta$ -lg como modelo de proteínas del lactosuero permitiría su vehiculización, protección y posterior utilización para el enriquecimiento de alimentos. Para tal fin se deberían realizar estudios de estabilidad de los NC ante la acción de agentes externos y de biodisponibilidad. Además, debería evaluarse la aceptabilidad sensorial de los alimentos enriquecidos.

## Referencias

- Benzie, I.F. y Wachtel-Galor, S., 2012. Increasing the antioxidant content of food: A personal view on whether this is possible or desirable. En: *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(1), pp.62-70.
- CAFI- Cámara Argentina de Fruticultores Integrados, 2017. *Mercado mundial de la manzana* [En línea]. Río Negro: CAFI. [Consulta: 10-02-2018]. Disponible en: <http://www.cafi.org.ar/mercado-mundial-de-la-manzana/>
- Charlton, A.J., Baxter, N.J., Lokman Khan, M., Moir, A.J.G., Haslam, E., Davies, A.P., et al., 2002. Polyphenol/peptide binding and precipitation. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp.1593-1601.
- Chen, L. y Subirade, M., 2006. Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. En: *Biomaterials*, 27(26), pp.4646-4654.
- Del Río, D, Rodríguez-Mateos, A, Spencer, JPE, Tognolini, M, Borges, G. y Crozier, A, 2013. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. En: *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(14), pp.1818-1892.
- Delorenzi, N. J., 2005. Beta-lactoglobulin conformational changes studied by fluorescence quenching. En: Riley, Arthur P., ed., 2005. *Food research, safety and policies*. Cap.7. New York: Nova Science Publishers. pp.159-174.
- Escarpa, A. y González, M.C., 1998. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. En: *Journal of Chromatography*, 823, pp.331-337.
- Jacobo-Velázquez, D.A. y Cisneros-Zevallos, L., 2012. An alternative use of horticultural crops: stressed plants as biofactories of bioactive phenolic compounds. En: *Agriculture*, 2(3), pp.259-271.
- Jakobek, L. y Barron, A.R., 2016. Ancient apple varieties from Croatia as a source of bioactive polyphenolic compounds. En: *Journal of Food Composition and Analysis*, 45, pp.9-15.
- Kanakis, C.D., Hasni, I., Bourassa, P., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G. y Tajmir-Riahi, H.A., 2011. Milk  $\beta$ -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. En: *Food Chemistry*, 127(3), pp.1046-1055.
- Kontopidis, G., Holt, C. y Sawyer, L., 2004. Beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. En: *Journal of Dairy Science*, 87, pp.785-796.
- Lakowicz, J.R., 2006. Quenching of fluorescence. En: Lakowicz, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. Cap.8. New York: Springer. pp.323-350.
- Landete, J.M., 2012. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. En: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(26), pp. 936-948.
- Liang, L. y Subirade, M., 2012. Study of the acid and thermal stability of  $\beta$ -lactoglobulin-ligand complexes using fluorescence quenching. En: *Food Chemistry*, 132(4), pp.2023-2029.
- Lima, G.P.P., Vianello, F., Corrêa, C.R., da Silva Campos, R.A. y Borguini, M.G., 2014. Polyphenols in Fruits and Vegetables and Its Effect on Human Health. En: *Food and Nutrition Sciences*, 5(11), pp.1065.
- Livney, Y.D., 2010. Milk proteins as vehicles for bioactives. En: *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, pp.73-83.
- Livney, Y.D., 2017. Nanoencapsulation technologies. En: Roos, Yrjö H. y Livney, Yoav D., eds. *Engineering foods for bioactives stability and delivery*. New York: Springer. pp.143-169.
- Moro, A., Gatti, C.A. y Delorenzi, N.J., 2001. Hydrophobicity of whey protein concentrates measured by fluorescence quenching and its correlation with surface functional properties. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, pp.4784-4789.
- Nagy, K., Courtet-Compondu, M.C., Williamson, G., Rezzi, S., Kussmann, M. y Rytz, A., 2012. Non-covalent binding of proteins to polyphenols correlates with their amino acid sequence. En: *Food Chemistry*, 132, pp.1333-1339.

- Poncet-Legrand, C., Edelmann, A., Putaux, J.L., Cartalade, D., Sarni-Manchado, P. y Vernhet, A., 2006. Poly (L-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. En: *Food Hydrocolloids*, 20(5), pp.687-697.
- Quintanilla-Carvajal, M.X., Camacho-Díaz, B.H., Meraz-Torres, L.S., Chanona-Pérez, J.J., Alamilla-Beltrán, L., Jiménez Aparicio, A. y Gutiérrez-López, G.F., 2010. Nanoencapsulation: a new trend in food engineering processing. En: *Food Engineering Reviews*, 2(1), pp.39-50.
- Reyes, L.F. y Cisneros-Zevallos, L., 2003. Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), pp.5296-5300.
- Rodríguez, S.D., Von Staszewski, M. y Pilosof, A.M., 2015. Green tea polyphenols-whey proteins nanoparticles: Bulk, interfacial and foaming behavior. En: *Food Hydrocolloids*, 50, pp.108-115.
- Sekhon, B.S., 2010. Food nanotechnology e an overview. En: *Nanotechnology, Science and Applications*, (3), pp.1-15.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. y Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. En: *Methods in Enzymology*, 299, pp.152-178.
- Solovchenko, A. y Schmitz-Eiberger, M., 2003. Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits. En: *Journal of Experimental Botany*, 54, pp.1977-1984.
- Tavares, G.M., Croguennec, T., Carvalho, A.F. y Bouhallab, S., 2014. Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. En: *Trends in Food Science & Technology*, 37, pp.5-20.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Psomas, A., Zovoili, A. y Siatis, V., 2009. Polyphenolic profile and antioxidant activity of five apple cultivars grown under organic and conventional agricultural practices. En: *International Journal of Food Science & Technology*, 44(6), pp.1167-1175.
- Vieira, F.G.K., Borges, G.D.S.C., Copetti, C., Di Pietro, P.F., da Costa, Nunes, E. y Fett, R., 2011. Phenolic compounds and antioxidant activity of the apple flesh and peel of eleven cultivars grown in Brazil. En: *Scientia Horticulturae*, 128(3), pp.261-266.
- Von Staszewski, M., Jara, F.L., Ruiz, A.L., Jagus, R.J., Carvalho, J.E. y Pilosof, A.M., 2012. Nanocomplex formation between  $\beta$ -lactoglobulin or caseinomacropéptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity. En: *Journal of functional foods*, 4(4), pp.800-809.
- Von Staszewski, M., Ruiz-Henestrosa, V.M.P. y Pilosof, A.M., 2014. Green tea polyphenols- $\beta$ -lactoglobulin nanocomplexes: Interfacial behavior, emulsification and oxidation stability of fish oil. En: *Food Hydrocolloids*, 35, pp.505-511.
- Wang, X., Li, C., Liang, D., Zou, Y., Li, P. y Ma, F., 2015. Phenolic compounds and antioxidant activity in red-fleshed apples. En: *Journal of Functional Foods*, 18, pp.1086-1094.
- Wolfe, K., Wu, X. y Liu, R.H., 2003. Antioxidant activity of apple peels. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), pp.609-614.

# Obtención de leche bovina reducida en grasa saturada y naturalmente enriquecida en ácido linoleico conjugado

## Production of bovine milk reduced in saturated fat and naturally enriched in conjugated linoleic acid

Gagliostro, Gerardo. A. (1); Antonacci, Liliana. E. (1); Carabajal, Augusto (2); López Plaván, Juan. M. (2); Crujeira, Yolanda (2)

(1) INTA EEA Balcarce, Argentina.

(2) Complejo Agroindustrial Talar, Laguna del Sauce, Punta del Este, Uruguay.

Contacto: [gagliostro.gerardo@inta.gob.ar](mailto:gagliostro.gerardo@inta.gob.ar)

RECIBIDO: 12/3/2018 – APROBADO: 1/6/2018

### Resumen

El objetivo del trabajo fue reducir la presencia de los ácidos grasos (AG) saturados potencialmente aterogénicos (C12:0, C14:0 y C16:0) de la leche y aumentar la presencia del ácido linoleico conjugado (CLA) en vacas lecheras estabuladas alimentadas con ración completamente mezclada (RCM) a través del aporte suplementario de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Se utilizaron dos lotes de 70 vacas multíparas en el primer tercio de lactancia. Luego de seis semanas experimentales y durante cinco días consecutivos se obtuvieron cinco muestras de leche estándar (LE) provenientes del tanque colector del lote vacas sin AGPI suplementarios, y cinco muestras de leche CLA (LCLA) provenientes del tanque de las vacas suplementadas con los AGPI. El tenor graso (g/100g) de la LE (3,84) resultó superior ( $p < 0,001$ ) al de LCLA (2,84) por reducción (17,21%) de los AG potencialmente aterogénicos. El índice aterogénico fue mayor ( $p < 0,001$ ) en la LE (4,07) comparado al de la LCLA (2,58). La concentración del CLA aumentó ( $p < 0,001$ ) un 122% en LCLA (0,77 g/100 g) respecto al valor registrado en LE (0,34 g/100 g). El ácido oleico (g/100 g) resultó superior ( $p < 0,001$ ) en la LCLA (23,37) comparado con la LE (18,78). El aporte suplementario de AGPI permitió incrementar el valor saludable de la leche producida en un sistema de alimentación estabulado manteniendo una adecuada relación (6,59) omega-6/omega-3 en la leche y confirmando la plasticidad en la composición de los AG constitutivos de la grasa láctea.

**Palabras clave:** Vaca lechera, alimentación estabulada, perfil de la grasa láctea.

### Abstract

The aim of the work was to reduce the presence of the potentially atherogenic fatty acids (FA) of milk (C12: 0, C14: 0 and C16: 0) and increase the presence of conjugated linoleic acid (CLA) in confined dairy cows fed a total mixed ration (TMR) supplemented with polyunsaturated fatty acids (PUFA). Two batches of 70 multiparous cows in the first third of lactation were used. After six experimental weeks and for five consecutive days, milk samples (5) were obtained from the collector tank of non-supplemented cows (LE) and of CLA milk (LCLA) from the tank of PUFA supplemented cows. Fat content (g/100g) in LE (3,84) was higher ( $p < 0,001$ ) than LCLA (2,84) explained by a significant reduction (17,21%) in the concentration of the potentially atherogenic FA of milk. The milk atherogenic index was higher ( $p < 0,001$ ) in LE (4,07) compared to LCLA (2,58). Milk CLA content increased ( $p < 0,001$ ) by 122% in LCLA (0,77 g/100 g FA) compared to LE (0,34 g/100 g FA). Oleic acid concentration (g/100 g FA) resulted higher ( $p < 0,001$ ) in LCLA (23,37) compared to LE (18,78). Supplementation with PUFA in confined dairy cows increased the healthy value of the milk produced maintaining an adequate omega-6/omega-3 ratio (6,59) and confirmed the plasticity in milk fatty acid composition.

**Keywords:** Dairy cow, confined production system, milk fatty acid profile.

## Introducción

La creciente incidencia en la sociedad moderna de enfermedades cardiovasculares (ECV) y crónicas no transmisibles (ECNT) implica una importante carga económica y social para los estados y genera la necesidad de producir alimentos más saludables capaces de atenuar esos riesgos. La leche y sus

derivados han sido blanco de críticas ya que representan la mayor contribución al consumo de AG saturados (AGS) en el ser humano (Chilliard, et al., 2000; Chilliard y Ferlay, 2004) y, en consecuencia, la ingestión de lácteos ha sido desvalorizada (Siurana y Calsamiglia, 2016). Sin embargo, numerosos estudios sugieren que la relación entre el consumo de AGS con la aterosclerosis y las ECV resulta a veces inconsistente y hasta

contradictoria (Siurana y Calsamiglia, 2016). Recientes trabajos afirman que el consumo de lácteos reduce la incidencia de ECV a pesar de su exceso en grasa saturada y atribuyen parte del efecto cardioprotector a la presencia del isómero *cis*-9, *trans*-11 del ácido linoleico llamado ácido linoleico conjugado natural o CLA (Smit, et al., 2010). Otros compuestos presentes en los lácteos (calcio, péptidos bioactivos, ácido fólico y vitaminas) son también saludables y contribuyen a potenciar el efecto (Siurana y Calsamiglia, 2016). El CLA natural está presente únicamente en carnes y leches de ruminantes (Siurana y Calsamiglia, 2016; Smit, et al., 2010), y la leche es la principal fuente de este AG saludable (Chilliard, et al., 2007, Smit, et al., 2010). A partir del análisis de nueve estudios en humanos, Livingstone et al. (2012) concluyeron que el consumo crónico de leche con un perfil en AG modificado resultó beneficioso para la salud cardiovascular en individuos normales e hipercolesterolémicos. Por su parte, Smit et al. (2010) reportaron que una concentración alta de CLA utilizado como biomarcador en tejido adiposo humano como consecuencia del consumo de leche rica en CLA, estuvo asociada a un menor riesgo de infarto de miocardio en una población de 1813 casos de primer infarto agudo no fatal y 1813 individuos control agrupados por edad, sexo y área de residencia. Según estos autores, el CLA natural puede ventajosamente contrarrestar el riesgo de consumir en exceso la grasa saturada presente en los lácteos (Chilliard, et al., 2000) sin riesgo sobre infarto agudo de miocardio. En adición a los efectos cardio protectores del CLA (Chilliard, et al., 2000; Roy, et al., 2017; Livingstone, et al., 2012), estudios con animales o cultivos celulares con diferentes líneas tumorales han demostrado promisorios efectos anticáncer (Chilliard, et al., 2000; Bhattacharya, et al., 2006; De La Torre, et al., 2006; Larson, et al., 2005). El consumo de lácteos estándar no permitiría alcanzar la ingestión diaria de CLA necesaria para la expresión de sus potenciales efectos preventivos de patologías cardiovasculares (Bhattacharya, et al., 2006), diabetes (Ryder, et al., 2001; Houseknecht, 1998), aterosclerosis (Lee, et al., 1994), cáncer (Ha, et al., 1990; Ip, et al., 1999), hipertensión (Bhattacharya, et al., 2006) y obesidad (Watkins y Li, 2003; Bhattacharya, et al., 2006). También se describen efectos antiinflamatorios del CLA (Yang y Cook, 2003; Miller, et al., 1994).

La leche bovina es la principal fuente natural del CLA, pero la producida en sistemas de alimentación estabulados sin acceso a pastoreo directo se caracteriza por bajos contenidos de CLA y un exceso de grasa saturada (Dhiman, et al., 2005). Consumidos en exceso, los AGS no saludables de la leche serían el láurico (C12:0), el mirístico (C14:0) y el palmítico (C16:0) por su potencial rol aterogénico (Ulbricht y Southgate, 1991) y por estar asociados al riesgo de ECV (Grummer, 1991; Stanton, et al., 2003). Aunque el efecto no saludable de los AGS de cadena media es aún controversial, su consumo excesivo puede prevenirse reduciendo en forma natural la presencia en leche de los mismos a través de la alimentación estratégica del ganado lechero (Chilliard, et al., 2000; Chilliard y Ferlay, 2004), mejorando la imagen y el valor saludable de los lácteos.

La suplementación con AG poliinsaturados (AGPI) en vacas lecheras permite modificar la composición en AG de la leche y sus derivados en un sentido favorable a la salud humana (Chilliard, et al., 2000; Chilliard, et al., 2007). El objetivo de este trabajo fue conocer el efecto del aporte de un suplemento lipídico con AGPI sobre el perfil en AG de la leche bovina producida en un sistema de alimentación estabulado sin acceso a forraje fresco.

## Materiales y Métodos

El trabajo se llevó a cabo en el complejo agroindustrial Talar, situado en la localidad de Laguna del Sauce, Ruta 12, km 10, Maldonado (Uruguay). El establecimiento cuenta con vacas de raza Holstein alimentadas en un sistema estabulado sin acceso a pastoreo directo. Se utilizaron 70 vacas multíparas alimentadas con una ración completamente mezclada (RCM) sin lípidos suplementarios para obtención de la leche estándar (LE) y 70 vacas productoras de leche CLA (LCLA) que consumieron la misma RCM con el agregado de 0,7 kg/vaca/día de un suplemento lipídico comercial (90% de materia seca (MS) y 68,6% de grasa) con 10,3% de ácido palmítico (C16:0), 3,9% de ácido esteárico (C18:0), 24,9% de ácido oleico (C18:1), 45,6% de ácido linoleico (C18:2), 4,8% de ácido linolénico (C18:3), 0,6% de ácido eicosapentaenoico (EPA, C<sub>20:5</sub>) y 1% de ácido docosahexaenoico (DHA, C<sub>22:6</sub>). El suplemento fue incorporado a la RCM sin acostumbramiento previo de los animales.

Las vacas produjeron en promedio 35 litros/vaca.día y se encontraban en el primer tercio de lactancia (<100 días postparto). En alimento tal cual, la RCM estuvo compuesta por ensilaje de planta entera de maíz planta (45,09%), ensilaje de raigrás (20,89%), heno de raigrás (1,7%), suero de leche (9,3%), grano de maíz molido (9,81%), harina de soja (5,03%), expeller de soja (5,58%), harina de trigo (1,3%) y un núcleo (1,3%) vitamínico-mineral de uso habitual en el tambo (Nutral).

Luego de seis semanas de alimentación y durante cinco días consecutivos, se obtuvieron cinco muestras diarias (100 mL) de leche del tanque colector de la LE y del tanque colector de la LCLA. En cada día de muestreo y para cada muestra de tanque (100 mL) se separaron 20 mL para las determinaciones de composición química (grasa butirosa, proteína, lactosa, sólidos totales y sólidos no grasos) en el Laboratorio de Calidad de Leche del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Los 80 mL restantes fueron inmediatamente congelados (-20 °C) para el ulterior análisis del perfil en AG por cromatografía gas-líquido (GLC), según se describe en Masson et al. (2015). Las diferencias de composición de leche y perfil de AG entre lotes (LE vs LCLA) fueron analizadas a través del test T de Student para observaciones independientes.

## Resultados y Discusión

La composición química de la leche estándar (LE) y de la leche CLA (LCLA) se presenta en la Tabla 1.

El tenor graso de la leche resultó menor (-0,96g/100g) en LCLA, lo que significó un 25,08% de disminución respecto a la LE. La inhibición de la síntesis *de novo* mamaria con la correspondiente reducción en la concentración de AGS en la leche (Tabla 2) explica la caída en el tenor graso. En vacas lecheras en alimentación base pastoril el suministro de lípidos insaturados suele reducir el contenido de grasa butirosa de la leche en un 8% en promedio (Schroeder, et al., 2004), resultado inferior al obtenido en este ensayo (25%). La presencia en el suplemento utilizado del DHA (inhibidor de la lipogénesis mamaria *de novo*), más la generación de ciertos AG como el *trans*-10 C<sub>18:1</sub> y su posterior transferencia a la leche (Tabla 2), explicarían la importante disminución (Chilliard, et al., 2000). Se ha informado una relación directa entre niveles crecientes de *trans*-10 C<sub>18:1</sub> en leche y reducción de la síntesis mamaria

Parámetro	LE	LCLA	p<(1)	Δ%(2)
Grasa butirosa, g/100g	3,84 (± ,15)	2,88 (± 0,23)	****	-25,08
Proteína, g/100g	3,39 (± 0,05)	3,32 (± 0,10)	****	-2,33
Lactosa, g/100g	5,04 (± 0,04)	4,95 (± 0,11)	****	-1,73
Grasa/Proteína	1,13 (± 0,04)	1,01 (± 0,14)	****	-10,67
Sólidos totales, g/100g	13,05 (± 0,20)	12,40 (± 0,71)	****	-4,97

(1)\*\*\*\* Probabilidad significativa (p<0,001, Test t de Student).

(2) Variación porcentual respecto al lote estándar. Los resultados se expresan a través del promedio ± el desvío estándar.

**Tabla 1.** Composición química de la leche de vacas alimentadas con la ración control (LE) y de las suplementadas con ácidos grasos poliinsaturados (LCLA).

Ácido Graso (g/100 g de AG)	LE	LCLA	p<(2)	Δ %(3)
C12:0	3,80(±0,13)	2,73(± 0,19 )	0,00001	-28,19
C14:0	12,71(± 0,07)	11,26(± 0,32)	0,00001	-11,42
C16:0	36,43(± 2,97)	29,84(± 0,70)	0,00001	-18,08
ΣC12:0-C16:0	52,94 (± 0,27)	43,83 (1,15)	0,00001	-17,21
C18:0	8,11(± 0,05)	10,77(± 1,20)	0,00001	+32,81
<i>trans</i> -9 C18:1	0,09(± 0,03)	0,29(± 0,06)	0,0002	+211
<i>trans</i> -10 C18:1	0,23(± 0,02)	1,05(± 0,24)	0,00001	+358
<i>trans</i> -11 C18:1, AV	0,54(± 0,04)	1,30(± 0,16)	0,00001	+138,6
<i>cis</i> -9 C18:1	18,78(± 0,08)	23,37(± 0,61)	0,00001	+24,43
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 C18:2	1,92(± 0,04)	2,51(± 0,14)	0,00001	+30,83
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C18:2 (CLA)	0,34(± 0,01)	0,76(± 0,10 )	0,00001	+122
<i>cis</i> -9,12, 15 C18:3	0,29(± 0,01)	0,38(± 0,03)	0,0001	+32,64
IA <sup>(4)</sup>	4,07 (± 0,03)	2,58 (0,18)	0,00001	-36,75
Relación n 6/n 3	6,67 (± 0,10)	6,59 (± 0,29)	0,57	Sin efecto

(1) Los resultados se expresan a través del promedio ± el desvío estándar (n=5).

(2) Probabilidad estadística de la diferencia entre promedios.

(3) Diferencia porcentual respecto al Lote Estándar.

(4) Índice de aterogenicidad.

**Tabla 2.** Composición en ácidos grasos de interés de la leche producida por las vacas del lote estándar (LE) y de la leche del lote CLA (LCLA) (1)

*de novo* (Piperova, et al., 2000), lo que contribuye a explicar la caída en el tenor graso. Una alta concentración de *trans*-10 C<sub>18:1</sub> ha sido asociada a disfunciones en la actividad de las enzimas lipoproteína lipasa (LPL) y estearil CoA desaturasa (SCD) que intervienen en la síntesis de grasa causando así una disminución en el tenor graso de la leche (Griinari y Bauman, 1999). En este trabajo la reducción en la concentración graso se produjo a expensas de los AG potencialmente hipercolesterolémicos, lo que contribuye a disminuir el índice aterogénico de la leche (Tabla 2).

La diferencia en el tenor proteico de la leche del lote CLA resultó muy leve (-0,08 g/100g) respecto a la LE, lo que implicó un 2,33% de disminución (Tabla 1). La relación grasa/proteína resultó cercana a 1, y por ende adecuada para la elaboración de quesos a partir de leche CLA. En condiciones de alimentación pastoril, la suplementación con lípidos no suele afectar la concentración proteica de la leche (Bargo, et. al., 2003; Schroeder, et al., 2004), mientras que en alimentación estabulada este parámetro resulta sistemáticamente afectado (Gagliostro y Chilliard, 1992; Wu y Huber, 1994). El efecto negativo sobre

la concentración de proteína en la leche de vacas (Gagliostro y Chilliard, 1992; Palmquist, et al., 1993) resulta más consistente ante el uso de grasas saturadas (-0,18 g/100 g) y sales cálcicas de aceite de palma (-0,12 g/100 g) respecto a los aceites vegetales poliinsaturados (Gagliostro y Chilliard, 1992).

La concentración de lactosa resultó ligeramente menor en la leche CLA (-0,09 g/kg, Tabla 1), lo que puede juzgarse como positivo en casos de intolerancia a la lactosa o desde el punto de vista industrial (menor acidez en quesos). Finalmente, la concentración de sólidos totales fue menor en la leche CLA (-0,65 g/100 g) como consecuencia de la menor concentración grasa observada en este lote.

## Perfil en ácidos grasos de la leche

Si bien se dispone de un perfil completo de los AG constitutivos, a los fines de este trabajo se presentan y discuten solo aquellos que resultan más relevantes para mejorar el valor saludable o funcional de la leche (Tabla 2).

Respecto a la LE, la LCLA presentó una importante reducción (-17,21%) en la concentración total de los AGS potencialmente aterogénicos (C12:0 a C16:0), cuyo consumo excesivo resulta prudente evitar (Ulbricht y Southgate, 1991). Expresada en valor absoluto, la reducción fue del orden de 9,11 g/100 g de AG totales y satisface el criterio de funcionalidad que menciona la reducción de un componente o componentes no saludables. La concentración en LE (12,71 g/100 g) del ácido mirístico (C14:0), cuyo rol pro-aterogénico fue considerado muy potente (Ulbricht y Southgate, 1991), se redujo a 11,26 g/100 g en la LCLA. Expresadas en forma porcentual respecto a valores de la LE, las reducciones fueron de 28,19% para el C12:0, 11,42% para el C14:0 y del 18,08% para el C16:0 (Tabla 2). El consumo excesivo de estos tres AGS podría elevar el colesterol plasmático total y el colesterol asociado a las lipoproteínas plasmáticas (LDL) de baja densidad (Schrezenmeir y Jagla, 2000). En consecuencia, estos resultados mejoran el valor nutricional de la LCLA.

La reducción en la concentración de estos AGS como consecuencia del consumo de AGPI como los contenidos en el suplemento utilizado es un efecto bien documentado (Chilliard, et al., 2000; AbuGhazaleh y Jenkins, 2004; Zheng, et al., 2005; Huang, et al., 2008) que se explicaría por la producción a nivel de rumen de ciertos AG *trans* como el *trans*-10 C18:1 por biohidrogenación de los AGPI. Estos AG *trans* resultan potentes inhibidores de enzimas clave de la lipogénesis mamaria, como la acetil-CoA carboxilasa (Chilliard, et al., 2000; Chilliard y Ferlay, 2004). Como resultado asociado, el IA de la leche disminuyó desde un valor de 4,07 en la LE a uno de 2,58 en la LCLA. Esto implicó un 36,75% de reducción de este parámetro asociado al riesgo cardiovascular de origen dietario. Resultados previos también indicaron disminuciones en el IA de la leche desde un valor basal de 1,88 a 0,5-0,8 en vacas lecheras que recibieron aceites de girasol y de pescado (Gagliostro, et al., 2017). Estos resultados contribuyen a evitar un exceso en el consumo de AGS no saludables y, potencialmente, a disminuir la presencia de marcadores sanguíneos asociados al riesgo cardiovascular.

La concentración en LE de los AG *trans*-9 C18:1 (0,09 g/100 g) y *trans*-10 C18:1 (0,23 g/100 g de AG) resultaron normales y compatibles con los elevados valores de concentración de grasa láctea obtenidos (3,84 g/100 g, Tabla 1). Tanto las concentraciones del *trans*-9 C18:1 como la del *trans*-10 C18:1 fueron incrementadas en la LCLA y alcanzaron

registros promedio de 0,29 y de 1,05 g/100 g, respectivamente (Tabla 2). Estos valores pueden considerarse inocuos en salud humana o sin riesgos sobre el grado de cardiopatía isquémica en seres humanos (Roy, et al., 2007). La presencia del DHA en el suplemento utilizado pudo haber contribuido a mantener niveles bajos del *trans*-10 C<sub>18:1</sub>, ya que la concentración de este isómero en la leche tendió a disminuir ante la participación creciente del aceite de pescado (fuente natural de DHA y EPA) en mezcla con aceite de girasol (Palmquist y Griinari, 2006).

La concentración del ácido vaccénico (*trans*-11 C18:1, AV) en la LCLA fue de 1,30 g/100 g de AG, lo que representó un 138,6% de aumento respecto al valor de 0,54 g/100 g de AG registrado en la LE. El AV representó el 62,79% del total de los AG *trans*-C18:1 en la leche Control, resultado bajo en relación al 80,41% esperable y a lo reportado por Antonacci et al. (2017). Dicha proporción disminuyó en la leche CLA a valores de 49,24%, mientras que en vacas en sistema pastoril suplementadas con aceites de soja y lino la proporción permaneció elevada (77 a 82%), con proporciones de *trans*-9 y *trans*-10 C18:1 de tan solo 11,5 y 28,9%, respectivamente (Antonacci, et al., 2017). En este trabajo, la proporción del *trans*-9 resultó baja (Control=10,47% y CLA=10,98%) pero la del *trans*-10 C18:1 experimentó un importante aumento en el tratamiento CLA (Control=26,74% y CLA=39,77). Estos resultados podrían indicar una actividad subóptima de biohidrogenación ruminal por parte de bacterias clave como el *Butivibrio fibrisolvens* inducida por el tipo de ración, por alguno de sus componentes y/o por algún factor desconocido, lo que limita los objetivos de obtener una leche con mayor contenido de CLA. Un desvío hacia la formación de *trans*-10 C18:1 también explicaría en parte el resultado obtenido (Tabla 2).

El AV presente en los lácteos puede otorgar propiedades beneficiosas a través de un efecto anticarcinogénico directo (Awad, et al., 1995), o mediado por su conversión endógena al CLA a una tasa estimada en un 20% (Turpeinen, et al., 2002) por acción de la enzima  $\Delta 9$  desaturasa en el ser humano (Chilliard, et al., 2000; Parodi, 2003). La metabolización del AV a CLA ha demostrado ser efectiva en la prevención del cáncer químicamente inducido en ratas (Banni, et al., 2001) e incrementa la biodisponibilidad del compuesto en los tejidos (Chilliard, et al., 2000; Siurana y Calsamiglia, 2016). Por las razones expuestas, el incremento obtenido fue moderado (Tabla 2) y deberá potenciarse.

La concentración del CLA (Tabla 2) se incrementó en un 122% al comparar el valor en la LE (0,34 g/100g) al observado en la LCLA (0,77 g/100g). Dado que el AV y el CLA correlacionaron positivamente ( $r=0,85$ ) y no se ha informado ninguna asociación de riesgo para el AV (Hodgson, et al., 1996) ni para el par AV/CLA (Roy, et al., 2007), estos parámetros deberán ser mejorados posiblemente mediante la inclusión adicional de una dosis baja de aceites poliinsaturados de girasol o soja.

En este trabajo, la relación CLA/AV (producto/precursor) resultó de 0,63 en la LE (Tabla 2), con una ligera disminución en la LCLA, pero manteniendo un valor alto (0,58). El resultado fue mayor al rango (0,39-0,46) observado por Gagliostro et al. (2012) ante el suministro de dosis crecientes del suplemento a vacas lecheras de raza Holstein. Esto permite inferir que la actividad de la  $\Delta$ -9 desaturasa mamaria (generadora del CLA a partir del AV) fue adecuada en las vacas de ambos lotes. Puesto que dicha relación fue mayor al valor promedio de 0,33% informado por otros autores para vacas suplementadas con AGPI (Antonacci, et al., 2017; Griinari y



Bauman, 1999) puede inferirse que la biodisponibilidad del AV pudo haber sido limitante.

Al igual que en Gagliostro et al. (2017), la concentración del ácido linoleico (*cis-9 cis-12 C18:2*) fue incrementada desde un valor basal de 1,92 g/100 g en la LE a 2,51 g/100 g en la LCLA. Esos valores se encuentran dentro del rango normal de concentración (2-3%) informado por Chilliard et al. (2007). El incremento porcentual en la LCLA del ácido linoleico (30,83%) respecto a la LE resultó superior al 19,69% observado en un trabajo previo (Gagliostro, et al., 2017). Estos incrementos sugieren cierta protección del compuesto (liberación ruminal atenuada) que no resulta deseable para la generación del AV y del CLA y para mantener una baja relación omega-6/omega-3 en la leche.

En la LE, la concentración del *cis-9, cis-12, cis-15 C18:3* o ácido  $\alpha$ -linolénico (0,29 g/100 g) estuvo dentro del rango (0,28-0,33 g/100 g) registrado en un ensayo precedente (Gagliostro, et al., 2013). Este AG de la serie omega 3 es esencial y de gran importancia en la salud humana. Por lo tanto, el fuerte aumento (32,64%) en la concentración basal de este compuesto en la LCLA (Tabla 2) resulta relevante y comparable al obtenido en un ensayo precedente (Gagliostro, et al., 2013) con el mismo producto a igual dosis (0,32-0,39 g/100 g de  $\alpha$ -linolénico). Esto podría indicar una acción protectora del DHA contenido en el suplemento utilizado sobre la bioidrogenación del ácido linolénico (AbuGhazaleh, et al., 2009; Chilliard, et al., 2000). Es de interés saludable ya que se trata de un AG esencial, precursor del EPA y del DHA, y de gran importancia en la salud humana y de la piel.

En el hombre, estudios epidemiológicos y experimentales han demostrado que los ácidos de la serie omega-3 presentan propiedades hipocolesterolémicas, antiinflamatorias, anti-trombóticas, anti-inflamatorias e inmunosupresoras (Davignus, et al., 1997; Calder, 2006, 2008 y 2012). Los AG omega-3 ( $\alpha$ -linolénico, EPA y DHA) presentan un mayor grado de insaturación, lo que mejora la fluidez y la diversidad de las estructuras en las que participan. Esto facilita la función de "comunicación celular" y un correcto funcionamiento del tejido nervioso y la retina, potenciando la inteligencia, la memoria y las facultades mentales en general. Los reguladores derivados de los ácidos grasos omega-3 atenúan los efectos de los omega-6 y son eficaces en la prevención de problemas cardiovasculares (efecto antiaterogénico, hipotensor (menor al de los AG n-6) y anti-trombótico), y en la reducción de la incidencia de tumores y de procesos inflamatorios y degenerativos crónicos. Por lo tanto, es importante mantener una adecuada relación entre el consumo de AG omega-6/omega-3 (entre 10:1 a 5:1 o menor) para asegurar un buen equilibrio entre los reguladores perjudiciales (omega-6) y los moderados (omega-3).

En la LE, la relación omega-6/omega-3 resultó de 6,67, mientras que en la LCLA alcanzó un valor similar de 6,59 sin diferencias entre ambas leches ( $p < 0,57$ , Tabla 2). En vacas lecheras suplementadas con una combinación de aceite de soja y lino (75:25) se obtuvieron relaciones omega-6/omega-3 de 5,6 en la leche (Antonacci, et al., 2017). Puesto que en la dieta habitual de los humanos la relación está entre 10 y 30 puede considerarse que estas leches contribuyen a reducir dicho parámetro.

Finalmente, la presencia del ácido oleico (*cis-9 C18:1*) fue significativamente superior (+24,43%) en la LCLA respecto a la LE (Tabla 2). Este compuesto presente en la llamada "dieta mediterránea" resulta abundante en el aceite de oliva, con efectos beneficiosos sobre el perfil de lípidos sanguíneos y factores

de riesgo de enfermedades cardiovasculares (Mensink, et al., 2003). Se ha descrito que los AG monoinsaturados modulan la presión sanguínea, mejoran la sensibilidad a la insulina y regulan los niveles de glucosa circulantes (Gillingham, et al., 2011). El aumento del ácido oleico luego del aporte de AGPI es un hecho bien documentado (Glasser, et al., 2008; Chilliard, et al., 2009).

## Conclusiones

La LCLA presentó diferencias en sus ácidos grasos constitutivos respecto a la LE. Estas diferencias mejoran su valor saludable a través de una menor concentración de grasa saturada e índice aterogénico, con un aumento simultáneo de ácidos grasos saludables como el CLA natural, el oleico y el linolénico, manteniendo una adecuada relación omega-6/omega-3. El aumento en la concentración del ácido vaccénico deberá mejorarse por sus propiedades saludables intrínsecas y por ser el precursor de CLA a nivel mamario. Las razones que explican la baja respuesta en AV podrían estar asociadas al modo de suministro del producto, a algún componente desconocido de la ración con efectos inhibidores sobre las bacterias involucradas, a una liberación ruminal lenta y/o subóptima del ácido linoleico, a desvíos hacia la producción de *trans-10 C18:1* en alimentación estabulada o a una combinación de estos factores. Estos aspectos merecen evaluarse experimentalmente.

Los resultados permitieron obtener una leche de mayor valor saludable para consumo directo o para elaboración de productos lácteos, pero la magnitud del incremento del CLA deberá mejorarse.

## Reconocimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), proyecto Leche Talar CLA, Res. N° 2484-017, y por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Agradecemos al personal de Tambo Talar por la colaboración en el manejo de los animales experimentales.

## Referencias

- AbuGhazaleh, A. y Jenkins, T. C., 2004. Short communication: decosahexaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed rumen cultures when incubated with linoleic acid. En: *Journal Dairy Sci.*, 87, pp.1047-1050.
- AbuGhazaleh, A.A., Potu, R.B. y Ibrahim, S., 2009. Short communication: the effect of substituting fish oil in dairy cow diets with docosahexaenoic acid-micro algae on milk composition and fatty acids profile. En: *Journal of Dairy Science*, 92(12), pp.6156-6159.
- Antonacci, L.E., Gagliostro, G.A., Cano, A.V. y Bernal, C.A., 2017. Effects of feeding combinations of soybean and linseed oils on productive performance and milk fatty acid profile in grazing dairy cows. En: *Agricultural Sciences*, 8, pp. 984-1002. <https://doi.org/10.4236/as.2017.89072>
- Awad, A.B., Hermann, T., Fink, C.S. y Horvath, P.J., 1995. 18:1 n7 Fatty acids inhibit growth and decreased inositol phosphate release in HT-29 cells compared to n-9 fatty acids. En: *Cancer Lett.*, 91, pp.55-61.

- Banni, S., Angioni, E., Murru, E., Carta, G., Melis, M.P., Bauman, D., Dong, Y. y Ip, C., 2001. Vaccenic acid feeding increases tissue levels of conjugated linoleic acid and suppresses development of premalignant lesions in rat mammary gland. En: *Nutrition and Cancer*, 41, pp.91-97. <https://doi.org/10.1080/01635581.2001.9680617>
- Bargo, F., Muller, L.D., Kolver, E.S. y Delahoy, J.E., 2003. Invited review: production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. En: *Journal of Dairy Science*, 86, pp.1-42.
- Bhattacharyaa, A., Banua,J., Rahmana, M., Causeyb J. y Fernandes, G., 2006. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. En: *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, pp.789-810.
- Calder, P.C., 2006. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory Diseases. En: *American Journal of Clinical Nutrition*, 83 (Suppl 1), pp.505S-19S.
- Calder, P.C., 2008. Fatty acids and inflammation from the membrane to the nucleus and from the laboratory bench to the clinic. En: *Clinical Nutrition*, 2, pp.5-12.
- Calder, P.C., 2012. Fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? En: *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75 (3), pp. 645-662.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R.M. y Doreau, M., 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. En: *Annales de Zootechnie*, 49, pp.181-205. <https://doi.org/10.1051/animres:2000117>
- Chilliard, Y. y Ferlay, A., 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. En: *Reprod. Nutr. Dev.*, 44, pp. 467-492.
- Chilliard, Y., Glasser, G., Enjalbert, F., Ferlay, A., Bocquier, F. y Schimidely, P.H., 2007. Conferencia: resultados recientes sobre los efectos de la alimentación en la composición en ácidos grasos de la leche de vaca, cabra y oveja. En: *Revista Argentina de Producción Animal*, 27(3), pp.197-213.
- Chilliard, Y., Martin, C., Rouel, J. y Doreau, M., 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. En: *Journal of Dairy Science*, 92, pp.5199-5211.
- Daviglus, M.L., Stamler, J., Orenca, A.J., Dyer, A.R., Liu, K., Greenland, P., Walsh, M.K., Morris, D. y Shekelle, R.B., 1997. Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. En: *New England Journal of Medicine*, 336, pp.1046-1053. DOI: 10.1056/NEJM19970410336150.
- Dhiman, T.R., Nam, S.H., Ure, A.L., 2005. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. En: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45, pp.463-82.
- Gagliostro, G. A. y Chilliard, Y., 1992. Utilización de lípidos protegidos en la nutrición de vacas lecheras. Efectos sobre la producción y composición de leche, y sobre la ingestión de materia seca y energía. En: *Revista Argentina de Producción Animal*, 12(1), pp.1-15.
- Gagliostro, G.A., Antonacci, L., Espiñeira, M., Williner, M.R. y Bernal, C.A., 2013. Suplementación con ácidos grasos poliinsaturados y perfil de ácidos grasos en vacas lecheras. En: *Revista Argentina de Producción Animal*, 33, (Supl. 1).
- Gagliostro, G.A., Antonacci, L.E., Ballistreri, J., Bonina, E., Williner, M.R. y Bernal, C.A., 2012. Effects of a solid oil supplement (Oralac) on milk fatty acid composition of grazing dairy cows. En: *Journal of Animal Science*, 90, Suppl. 3/*Journal of Dairy Science*, 95, Suppl. 2., pp.119.
- Gagliostro, G.A., Garciarena, D.A., Rodriguez, M.A. y Antonacci, L.E., 2017. Feeding polyunsaturated supplements to grazing dairy cows improve the healthy value of milk fatty acids. En: *Agricultural Sciences*, 8, pp.759-782. <https://doi.org/10.4236/as.2017.88057>.
- Gillingham, L.G., Harris-Janz, S. y Jones, P.J., 2011. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. En: *Lipids*, 46, pp.2019-228.
- Glasser, F., Ferlay, A. y Chilliard, Y., 2008. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: a Meta-Analysis. En: *Journal of Dairy Science*, 91, pp.4687-4703.
- Griinari, J.M. y Bauman, D.E., 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. En: M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza and G. J. Nelson, ed. *Advances in conjugated linoleic acid research*. Champaign: AOCS Press, Champaign. pp.180-200.
- Grummer, R.R., 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. En: *Journal of Dairy Science*, 74, pp.3244-3257.
- Ha, Y.L., Storkson J. y Pariza, M.W., 1990. Inhibition of benzo(a) pyreneinduced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. En: *Cancer Research*, 50, pp.1097-1101.
- Hodgson, J.M., Wahlqvist, M.L., Boxall, J.A. y Balazs, N.D., 1996. Platelet trans fatty acids in relation to angiographically assessed coronary artery disease. En: *Atherosclerosis*, 120, pp.147-154.
- Houseknecht, K.L., Vanden Heuvel, J.P, Moya-Camarena, S.Y., et al., 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. En: *Biochemical and Biophysical Research Commun*, 244, pp.678-682.
- Huang, Y., Schoonmaker, J.P., Bradford, B.J. y Beitz, D.C., 2008. Response of milk fatty acid composition to dietary supplementation of soy oil, conjugated linoleic acid, or both. En: *Journal of Dairy Science*, 91, pp.260-270.
- Ip, C., Banni, S., Angioni, E., Carta, G., McGinley, J., Thompson, H.J., Barbano, D. y Bauman, D., 1999. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. En: *J. Nutr.*, 129, pp.2135-2142.
- Larson, S.C, Bergkvist, L. y Wolk, A., 2005. High-fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish Mammography cohort. En: *American Journal of Clinical Nutrition*, 82, pp.894-900.
- Lee, K.N., Kritchevsky, D. y Pariza, M.W., 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. En: *Atherosclerosis*, 108, pp.19-25.
- Livingstone, K.M., Lovegrove, J.A. y Givens, D.I., 2012. The impact of substituting SFA in dairy products with MUFA or PUFA on CVD risk: evidence from human intervention studies. En: *Nutrition Research Reviews*, 25(2), pp.193-206. doi:10.1017/S095442241200011X.
- Masson, L.T., Alfaro, C., Camilo, A., Carvalho, P., Illesca, R., Torres, M., Tavares do Carmo, J. Mancini-Filho y Bernal, C.A., 2015. Fatty acid composition of soybean/sunflower mix oil, fish oil and butterfat applying the AOCS Ce 1j-07 method with a modified temperature program. En: *Grasas y Aceites*, 66, pp.e064. ISSN-L: 0017-3495. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.0692141>).

- Mensink, R.P., Zock, P.L., Kester, A. D. y Katan, M.B., 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta analysis of 60 controlled trials. En: *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, pp.1146-1155.
- Miller, C.C., Park, Y., Pariza, M.W. y Cook, M.E., 1994. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. En: *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 198, pp.1107-1112.
- Palmquist, D. L., Beaulieu, A. D. y Barbano, D. M., 1993. ADSA foundation symposium: Milk fat synthesis and modification. Feed and animal factors influencing milk fat composition. En: *Journal of Dairy Science*, 76, pp.1753-1771.
- Palmquist, D. y Griinari, M., 2006. Milk fatty acid composition in response to reciprocal combinations of sunflower and fish oils in the diet. En: *Animal Feed Science and Technology*, 131, pp.358-369.
- Parodi, P.W., 2003. Conjugated linoleic acid in food. En: Sébédio, J.L., Christie, W.W., Adloff, R., eds. *Advances in conjugated linoleic acid in food*. Vol. 2. Illinois: AOCS Press. pp.101-122.
- Piperova, L.L., Teter, B.B., Bruckental, I., Sampugna, J. Mills S., E., Yurawecz, M.P., Fritsche, J., Ju, K. y Erdman, R.A., 2000. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated fatty acids are altered in lactating dairy cows fed a milk-fat depressing diet. En: *Journal of Nutrition*, 130, pp.2568-2574.
- Roy, A., Chardigny, J.M., Bauchart, D., Ferlay, A., Lorenz, S., Durand, D., Gruffat, D., Faulconnier, Y., Sébédio, J.M. y Chilliard, Y. 2007. Butters rich either in *trans*-10-C18:1 or in *trans*-11-C18:1 plus *cis*-9, *trans*-11 CLA differentially affect plasma lipids and aortic fatty streak in experimental atherosclerosis in rabbits. En: *Animal*, 1, pp.467-476.
- Ryder, J.W., Portocarrero, C.P., Song, X.M, et al., 2001. Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid. Improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. En: *Diabetes*, 50, pp.1149-1157.
- Schrezenmeir, J. y Jagla, A., 2000. Milk and diabetes. En: *Journal of the Animal College of Nutrition*, 19(2), pp.176:190.
- Schroeder, G.F., Gagliostro, G.A., Bargo, F., Delahoy, J.E. y Muller, L.D., 2004. Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. En: *Livestock Production Science*, 86(1-3), pp.1-18.
- Siurana, A. y Calsamiglia, S., 2016. A metaanalysis of feeding strategies to increase the content of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy cattle milk and the impact on daily human consumption. En: *Animal Feed Science and Technology*, 217, pp.13-26.
- Smit, L.A., Baylin, A. y Campos, H., 2010. Conjugated linoleic acid in adipose tissue and risk of myocardial infarction. En: *American Journal of Clinical Nutrition*, 92(1), pp.34-40.
- Stanton, C., Murphy, J., McGrath, E. y Devery, R., 2003. Animal feeding strategies for conjugates linoleic acid enrichment of milk. En: Sébédio, J.L., Christie, W.W., Adloff, R., eds. *Advances in Conjugated Linoleic Acid in Food*. Vol 2. Illinois: AOCS Press. pp.123-145.
- Turpeinen, A.M., Mutanen, M., Aro, A., Salminen, I., Basu, S., Palmquist, D.L. y Griinari, J.M., 2002. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. En: *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, pp.504-510.
- Ulbricht, T. L. V. y Southgate, D. A.T., 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. En: *Lancet*, 338, pp.985-992.
- Watkins, B.A. y Li, Y., 2003. CLA in functional food: enrichment of animal products. En: Sébédio, J.L, Christie, W.W., Adloff, R., eds. En: *Advances in conjugated linoleic acid in food*. Vol 2. Illinois: AOCS Press. pp.174-188.
- Wu Z. y Huber, J.T., 1994. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: A review. En: *Livestock Production Science*, 39, pp.141-155.
- Yang M. y Cook, M.E., 2003. Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  production, and modifies splenocyte cytokines production. En: *Experimental Biological Medicine*, (Maywood), 228, pp.51-58.
- Zheng, H.C., Liu, J.X., Yao, J.H., Yuan, Q., Ye, H.W., Ye, J.A. y Wu, Y.M., 2005. Effects of dietary sources of vegetable oils on performance of high- yielding lactating cows and conjugated linoleic acids in milk. En: *J. Dairy Sci.*, 88, pp.2037-2042.

# Complejos vitamina E- $\beta$ -lactoglobulina incluidos en películas biopoliméricas de alginato de sodio

## Vitamin E- $\beta$ -lactoglobulin complexes included in sodium alginate biopolymeric films

Berino, Romina, P. (2); Pezzelatto, Diego A. F. (2); Báez, Germán, D. (1, 2); Llopart, Emilce E. (1); Ballerini, Griselda, A. (2, 3); Moro, Andrea (2); Delorenzi, Néstor, J. (2); Busti, Pablo, A. (2).

(1) Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina.

(2) Área Tecnología de los Alimentos, Departamento de Tecnología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina.

(3) Centro de Investigaciones y Desarrollo en Tecnología de los Alimentos, Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Rosario, Rosario, Argentina.

Contacto: pbusti@fbiof.unr.edu.ar

RECIBIDO: 22/3/2018 APROBADO: 22/6/2018

### Resumen

Se optimizaron las condiciones para la preparación de películas biopoliméricas capaces de encapsular los valores diarios máximos recomendados de la vitamina liposoluble E ( $\alpha$ -tc), incorporando nanocomplejos formados por la proteína láctea beta lactoglobulina ( $\beta$ -lg) y la vitamina en soluciones alginato de sodio (AS), a una relación  $\beta$ -lg/AS determinada previamente. En primer término, se estudió por turbidimetría la interacción entre  $\beta$ -lg (nativa y desnaturalizada por calor) con  $\alpha$ -tc, a diferentes pHs, y se comprobó la eficacia de  $\beta$ -lg nativa a pH 6,80 para solubilizar la  $\alpha$ -tc en soluciones acuosas. Se realizaron ensayos de opacidad y color de las películas y no se encontraron diferencias por la incorporación del  $\alpha$ -tc. Se evaluó por HPLC la integridad de la estructura de  $\alpha$ -tc en los nanocomplejos formados en soluciones acuosas y en las películas de alginato a lo largo de un período de tiempo. La película seca mejoró la protección de la estructura del  $\alpha$ -tc al ser expuesta al oxígeno del aire y luz controlada, efecto atribuible a la barrera al oxígeno y luz ultravioleta (UV) que ofrecen las películas secas de polisacáridos.

**Palabras clave:** Beta lactoglobulina, nano complejos, películas, alginato de sodio.

### Abstract

In order to obtain dried films capable of encapsulating the maximum recommended daily values of fat-soluble vitamin E ( $\alpha$ -tc), nanocomplexes between beta-lactoglobulin ( $\beta$ -lg), the major whey protein, and the vitamin were incorporated into sodium alginate (AS) solutions, to previously determined  $\beta$ -lg / AS ratio. The interaction between native and heat-treated protein with vitamin was studied by turbidimetry at different pH values. Native  $\beta$ -lg increased solubility  $\alpha$ -tc in aqueous solutions at pH 6.80. Opacity and color tests to all films were carried out and no differences were found due to the incorporation of  $\alpha$ -tc. Dry films improved the protection of  $\alpha$ -tc structure when exposed to oxygen from the air and controlled light (measured by HPLC). This effect was attributable to the oxygen and ultraviolet light (UV) barrier exerted by the polysaccharide matrix.

**Keywords:** Beta lactoglobulin, Nanocomplexes, films, sodium alginate.

## Introducción

Algunos desafíos de la industria alimentaria son: prolongar la vida útil de los alimentos, lograr incorporar en el alimento nutrientes o sustancias bioactivas y controlar su posterior liberación en sitios específicos del organismo (Tavares, et al., 2014). Los complejos formados por la interacción de proteínas con polisacáridos, como pectina o alginato, son capaces de incorporar vitaminas (Jones, et al., 2009; Zimet y Livney, 2009; Ron, et al., 2010; Fioramonti, et al., 2014). Así, el estudio y caracterización

de la interacción de vitaminas hidrofóbicas con proteínas como la  $\beta$ -lg y su posterior incorporación en matrices biopoliméricas sólidas de alginato formaría un sistema capaz de proteger la estructura de la vitamina por un período de tiempo razonable y, a su vez, brindaría importante información sobre un modo de incorporación, en un futuro, de vitaminas a alimentos.

La  $\beta$ -lg es la proteína mayoritaria del lactosuero. Ha sido ampliamente estudiada por su capacidad de ligar compuestos hidrofóbicos y anfífilos como saborizantes, vitaminas, ácidos grasos y polifenoles (Livney, 2010). En su estado nativo

presenta diferentes sitios capaces de fijar ligandos hidrofóbicos (ácidos grasos, vitaminas liposolubles), al tiempo que, bajo determinadas condiciones, es capaz de autoensamblarse para formar superestructuras oligoméricas (Báez, et al., 2011) que permiten la encapsulación y el transporte de una diversidad de pequeñas moléculas (Livney, 2010) como  $\alpha$ -tocoferol (Relkin y Shukat, 2012), aromatizantes (Giroux y Britten, 2011), entre otros. La exposición de mayor número de sitios hidrofóbicos se relaciona con su grado de desnaturalización (Busti, et al., 2000; Moro, et al., 2001; Delorenzi, 2005).

El calentamiento a temperaturas superiores a 80 °C provoca cambios en la estructura secundaria y terciaria de la proteína, ocasionando la pérdida de la cavidad interna aunque conserva parte de su actividad encapsulante. Esto último sugiere que se crean nuevos sitios de unión tras exponer al solvente otros residuos hidrofóbicos (Mousavi, et al., 2008).

La interacción de la proteína con vitaminas hidrofóbicas para incorporarlas en alimentos ha sido estudiada por otros autores (Liang, et al., 2011; Liang y Subirade, 2012; Relkin, et al., 2012; Relkin, et al., 2014), quienes analizaron las características de la fijación, la influencia de las condiciones del medio y la estabilidad de los complejos.

La vitamina E pertenece a una familia de compuestos poliprenoides. En su estado natural presenta ocho isómeros, de los cuales el  $\alpha$ -tc es el más abundante, biodisponible y ópticamente activo. Dentro de la amplia variedad de beneficios que aporta su ingesta, se destaca su poder antioxidante, que previene la propagación de radicales libres cuyo rol es fundamental en enfermedades crónicas y cardiovasculares. Se acepta que 20 mg/día sería el máximo valor de ingesta que podría ser administrado como suplemento (National Institute of Health, 2016). En los suplementos dietarios, el  $\alpha$ -tc se encuentra como acetato y succinato de  $\alpha$ -Tocoferol. Bajo estas formas aumenta su estabilidad, pero se reduce, aproximadamente al 30%, su absorción a nivel del intestino humano en comparación con la administración del  $\alpha$ -tc en forma pura. Esta última opción es prácticamente inviable a causa de su hidrofobicidad y alta sensibilidad al calor, al oxígeno y a la luz.

La unión del  $\alpha$ -tc con la  $\beta$ -lg produce, en el medio, distintas especies: monómeros de vitaminas hidrofóbicas, moléculas autoasociadas de vitaminas (nanopartículas) y complejos de proteínas y vitaminas (Liang, et al., 2011). Los complejos formados son estructuras capaces de solubilizar la vitamina en soluciones acuosas estables e incrementar su vida media, protegiéndola de factores adversos como la luz, el oxígeno y la temperatura. El enriquecimiento de alimentos con sustancias nutricionales hidrofóbicas presenta un especial desafío, debido a la dificultad de incorporar estos compuestos a sistemas acuosos. El vehículo ideal para este fin debe ser de origen natural, económico y capaz de solubilizar y proteger al bioactivo.

Los alginatos son una familia de polisacáridos binarios lineales cuya estructura consta de "m" uniones (1 $\rightarrow$ 4)  $\beta$ -D-manurónico y "n" ácido  $\alpha$ -L-Gulurónico. Este polímero debe su carácter polianiónico a los grupos carboxilo (pKa = 3,5) que aparecen a lo largo de la cadena. La composición y extensión de las secuencias manurónico/gulurónico y el peso molecular determinan las propiedades físicas de los alginatos (Romero, et al., 2013).

La forma en la que interaccionan los alginatos y la  $\beta$ -lg varía de acuerdo al pH del medio en que se encuentren. A pH neutro, tanto el polisacárido como la proteína presentan carga negativa y ambos permanecen solubles en medio acuoso. Cerca del punto isoeléctrico de la proteína (pH 4,7 - 5,2)

se forman complejos solubles sobre la base de interacciones electrostáticas y, a pH inferior a 4,7 las interacciones se ven notablemente incrementadas dando lugar a la agregación de partículas (de Kruif, et al., 2004; Qomarudin, et al., 2015).

En la actualidad se busca incorporar los beneficios provistos por los alginatos en los micro encapsulados para protegerlos de factores adversos como el oxígeno, el calor, la humedad (Ron, et al., 2010) o la radiación UV (Draget, 2009; Rhim, 2004; Pereira, et al., 2013).

## Materiales y métodos

### Reactivos

Se prepararon soluciones reguladoras de fosfato de sodio (Pi) 20 mM de pH 3,00 y 6,80 y los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Se utilizó  $\beta$ -lg Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA) de origen bovino. Las soluciones se prepararon disolviendo, sin ningún otro tipo de purificación, 25 mg de la droga por pesado directo en 1 mL de las soluciones reguladoras, a ambos pHs, y conservadas a -20 °C hasta su utilización. Se preparó una solución madre 10 mM,  $\alpha$ -Tocoferol Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA) en etanol absoluto Cicarelli (Rosario, Argentina) y se la mantuvo conservada en frasco color caramelo en atmósfera de nitrógeno y al abrigo de la luz. Se elaboraron soluciones madre 2% peso en volumen (% p/V) de AS Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA) PM: 100.000 de viscosidad media, disolviendo 4 g por pesado directo de la droga sólida en 200 mL de las soluciones reguladoras de pH 3,00 y 6,80. Las soluciones obtenidas se calentaron por 5 minutos a 60 °C y se eliminaron los gases por aplicación de vacío.

### Desnaturalización por tratamiento térmico de la $\beta$ -lg

Soluciones de  $\beta$ -lg 20  $\mu$ M en buffer Pi 20 mM pH 3,00 y pH 6,80 se calentaron a 85 °C durante 5 minutos en baño termostático. Concluido el procedimiento, las muestras fueron llevadas a temperatura ambiente y congeladas a -20 °C.

### Turbidimetría

La turbidez se determinó por medio de medidas de absorbancia (Abs) a 500 nm en un espectrofotómetro Jasco V-500 (Jasco International Co., Ltd., Tokyo Japan). Cada una de las muestras fue medida por triplicado. Para transformar los valores de absorbancia en turbidez, se utilizó la ecuación:

$$\tau = 2,303 \cdot \text{Abs}_{500\text{nm}} \quad (1)$$

### Interacción de la $\beta$ -lg con $\alpha$ -tc

#### Medidas de la turbidez de la $\alpha$ -tc

Se midieron las turbideces iniciales de soluciones de  $\beta$ -lg 20  $\mu$ M pH 3,00 y 6,80, a las que se le fueron agregando alícuotas de una solución madre de  $\alpha$ -tc 10 mM, en un rango de 0 - 500  $\mu$ M, a 25 °C. Se realizaron los blancos de proteína correspondientes para cada pH. De igual manera se trabajó con la  $\beta$ -lg 20  $\mu$ M a pH 3,00 y 6,80 desnaturalizadas por calor. La solución de  $\beta$ -lg a pH 3,00 gelificó y fue descartada. Para cada tipo de muestra las medidas se realizaron por triplicado.

## Obtención de películas de AS- $\beta$ -lg / $\alpha$ -tc

### Películas de AS- $\beta$ -lg y AS- $\beta$ -lg / $\alpha$ -tc

Se prepararon películas con distintas relaciones proteína-alginato. 5 mL de solución de AS 2% p/V en buffer Pi 20 mM pH 6,80 se mezclaron con 5 mL de soluciones formadas por buffer Pi 20 mM pH 6,80 y distintas cantidades de  $\beta$ -lg. Se probaron cantidades de 1 g, 0,5 g, 0,25 g y 0,125 g de  $\beta$ -lg.

Para obtener las películas con la vitamina adicionada se disolvieron 20 mg de  $\alpha$ -tc en 0,5 mL de alcohol absoluto, luego se llevó a volumen de 5 mL con buffer Pi 20 mM pH 6,80 conteniendo disueltos 0,125 g de  $\beta$ -lg, y se completaron los 10 mL de sistema añadiendo un volumen de 5 mL de solución de AS 2 % p/V en buffer Pi 20 mM pH 6,80 (Soazo, et al., 2015a), homogeneizando por agitación manual suave.

Las mezclas obtenidas se vertieron en placas de Petri de 5 cm de diámetro y, para evitar la acción del aire y la luz, estas se introdujeron dentro de una caja plástica cerrada con conductos de entrada y salida por los que se aplicó un flujo de nitrógeno. Por último, la caja plástica se colocó dentro de una estufa, donde se secaron las muestras durante 6 h a 40 °C. Las películas obtenidas se guardaron en bolsas de polietileno cerradas al vacío y al abrigo de la luz en una cámara de control de humedad (Pharma SCT, Buenos Aires, Argentina) a 55% de humedad y 25 °C de temperatura hasta su utilización.

### Opacidad y color

Se determinó la opacidad de las distintas películas siguiendo la metodología propuesta por (Siripatrawan y Harte, 2010). Se tomaron cinco muestras rectangulares (10 mm  $\times$  30 mm) de diferentes partes de una película y se ubicaron en el lado interno de una celda de espectrofotómetro Jasco V-500 (Jasco International Co., Ltd., Tokyo, Japan). La absorbancia de luz de las muestras de películas fue medida a una longitud de onda de 600 nm ( $Abs_{600}$ ). La opacidad se calculó usando la ecuación:

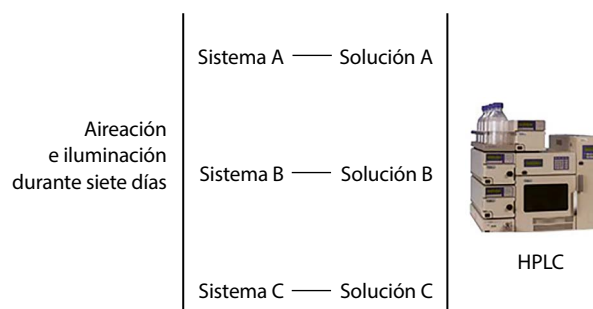
$$\text{Opacidad} = Abs_{600} / l$$

Donde  $l$  es el espesor de la película en mm. Esta operación se repitió con tres películas diferentes de cada tipo. Para el estudio del color se determinaron los parámetros  $L^*$  (claridad),  $a^*$  (rojo-verde),  $b^*$  (amarillo-azul) siguiendo el diseño descrito por Mendoza y Aguilera (2004) con algunas modificaciones (Soazo, et al., 2015b).

Los valores de  $\Delta E$  (diferencia de color total), definido como las diferencias entre los parámetros de color de la muestra y un blanco estándar, se calcularon siguiendo los trabajos de Yam y Papadakis (2004) y Soazo et al. (2015a). Todas las medidas se realizaron por quintuplicado.

### Estudio de la degradación de $\alpha$ -tc como función del tiempo de exposición al oxígeno del aire y radiación UV mediante HPLC

Para estudiar la degradación del  $\alpha$ -tc por efecto de la acción del oxígeno y de la radiación luminica en función del tiempo de exposición las distintas muestras fueron divididas en tres sistemas diferentes: A, B y C.



**Figura 1.** Representación esquemática de la experiencia realizada en el estudio de la degradación del  $\alpha$ -tc.

Sistema A: Solución de  $\alpha$ -tc 20mg/100mL en etanol absoluto (Solución A).

Sistema B: Solución de nanocomplejo  $\alpha$ -tc 20mg/100mL,  $\beta$ -lg 1,25% p/V en Pi 20 mM pH 6,80 (Solución B).

Ambos sistemas fueron conservados en atmósfera de nitrógeno y oscuridad (para evitar la acción del oxígeno y la fotólisis) hasta su utilización.

Sistema C: Película de AS- $\beta$ -lg/ $\alpha$ -tc. Se utilizaron siete películas diferentes.

Para el estudio del sistema C cada día se preparó una solución disolviendo una película en 100 mL de una mezcla 1:1 de buffer fosfato 20 mM pH 6,80: etanol absoluto (Solución C).

El protocolo de trabajo se presenta en la Figura 1.

Los tres sistemas fueron expuestos durante siete días a la acción del oxígeno del aire ambiental y de una radiación luminica (fluorescente blanco de 36 Vatios con un flujo luminoso ( $F$ ) de 3000 lm) a una iluminancia ( $E_v$ ) de 200 lx, medida con luxómetro Amprobe LM-100 (Amprobe Test Tools, Glottertel, Germany) resolución 0,1 lx. La temperatura se fijó en 25 °C.

### Cromatografía líquida de alta resolución

Diariamente y durante siete días se le extrajo a cada una de las tres soluciones formadas el  $\alpha$ -tc, según el método propuesto por Liang et al. (2011). Cada muestra obtenida fue luego inyectada en un cromatógrafo HPLC Shimadzu LC-10 (Kyoto, Japan), anexado a una columna LC-18 (25cm  $\times$  4,6mm) SUPELCOSIL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): tamaño de partícula 5  $\mu$ m, tamaño de poro 100 Å. Las condiciones cromatográficas fueron: detector UV,  $\lambda = 292$  nm; fase móvil isocrática, metanol absoluto; velocidad de flujo 1 mL/min; temperatura de la columna 45 °C. Las mediciones se realizaron por triplicado.

## Resultados y Discusión

### Interacción de la $\beta$ -lg con $\alpha$ -tc

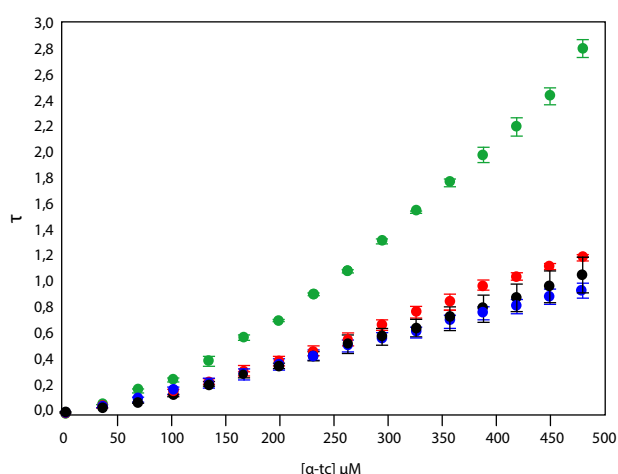
#### Medidas de turbidez de $\alpha$ -tc a distintos valores de pH

En el Gráfico 1 se representan los valores de turbidez para los sistemas  $\beta$ -lg (nativa y desnaturalizada)/ $\alpha$ -tc comparados con  $\alpha$ -tc sola (los resultados a pH 3,00 y 6,80 fueron similares, razón por la cual se graficó la curva obtenida a pH 6,80). La turbidez de estos sistemas es menor que la observada en las respectivas dispersiones sin proteína. Esto se debe a que

en medio acuoso el α-tc se uniría a la proteína formando un complejo soluble, hecho que podría tomarse como un indicador de la eficiencia de la proteína para vehicular un compuesto lipofílico.

A pH 3,00 el sistema formado presenta mayor turbidez que a pH 6,80. Este comportamiento podría adjudicarse a la menor cantidad de sitios de fijación que expondría la proteína al estar principalmente como monómero. La proteína a pH 6,80 presenta una estructura compuesta por un 11% de monómeros y un 89% de dímeros, motivo por el cual expondría mayor cantidad de sitios de fijación (Moro, et al., 2011), e incluso también pueden aparecer otros sitios hidrofóbicos inespecíficos ubicados en la superficie proteica (Liang, et al., 2012).

Los complejos β-Ig (desnaturalizada)/α-tc presentaron mayor turbidez que β-Ig (nativa)/α-tc. Este hecho se debería a la pérdida de sitios de fijación cuando es desnaturalizada por calentamiento (Busti, et al., 2005), por lo cual se puede descartar al complejo β-Ig (desnaturalizada)/α-tc a pH 6,80 como sistema de estudio.

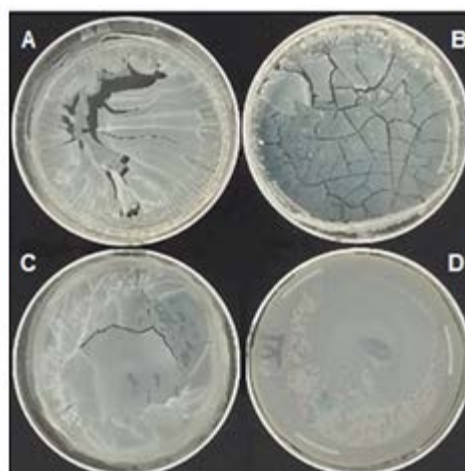


**Gráfico 1.** Turbidez ( $\tau$ ) de soluciones de  $\alpha$ -tc (●),  $\alpha$ -tc con  $\beta$ -Ilg (desnaturalizada) en buffer Pi 20 mM pH 6,80 (●),  $\alpha$ -tc con  $\beta$ -Ilg en buffer Pi 20 mM pH 6,80 (●),  $\alpha$ -tc con  $\beta$ -Ilg en buffer Pi 20 mM pH 3,0 (●). Concentración de la proteína 20  $\mu$ M.

### Obtención de películas de AS~β-Ilg/α-tc

La Figura 2 muestra las películas obtenidas para distintas relaciones proteína-alginato. Para valores de 1 g, 0,5 g, y 0,25 g de β-Ilg resultaron quebradizas, mientras que la de 0,125 g de β-Ilg se mostró homogénea, maleable y translúcida, características deseables para su posterior uso como vehículo de α-tc. Esto puede deberse a que, si bien a pH 6,8 ambas especies tienen cargas netas negativas y entre ellas se generan fuerzas repulsivas electrostáticas que las mantienen en solución (Qomarudin, et al., 2015), la calidad de las películas

formadas al secar dichas soluciones es dependiente de la masa de proteína utilizada para una determinada cantidad de AS.



**Figura 2.** Películas de alginato 1% p/V en solución reguladora fosfato 20 mM a pH 6,8 con: A: 10% p/V g, B: 5%(p/v), C: 2,5%(p/v), D: 1,25%(p/v)

Las películas AS~β-Ilg/α-tc, con 20 mg (por película) de α-tc, correspondiente con la ingesta diaria máxima recomendada, no variaron su calidad, fueron homogéneas y maleables, y presentaron un espesor de entre 30 y 60  $\mu$ m (Figura 3).



**Figura 3.** Película AS~β-Ilg/α-tc, en solución reguladora fosfato 20 mM a pH 6,8. Cantidad de alginato: 0,100 g. Cantidad de β-Ilg: 0,125 g. Cantidad de α-tc: 20 mg.

### Opacidad y color

El estudio de opacidad y color de las películas se ve reflejado en la Tabla 1, donde se evidencia que el agregado de la

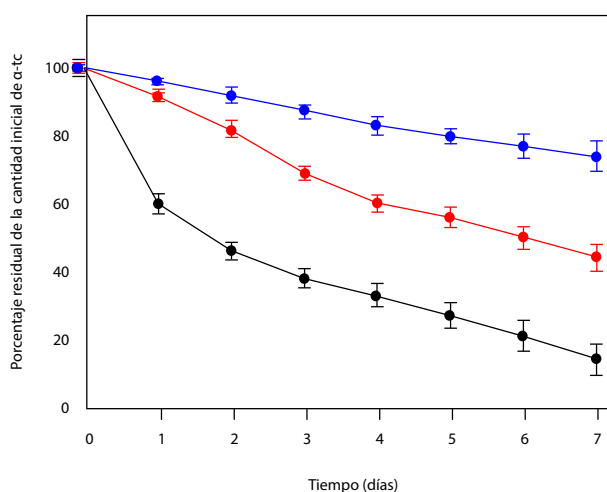
Membrana	Opacidad	L*	a*	b*	ΔE
AS~β-Ilg	4,4 ± 0,5	64,6 ± 1,5	10,2 ± 1,6	38,6 ± 2,2	33,6 ± 2,5
AS~β-Ilg/α-tc	4,3 ± 0,5	63,4 ± 1,8	10,3 ± 1,3	38,0 ± 1,7	34,1 ± 3,0

**Tabla 1.** Propiedades ópticas de las películas.

vitamina, en forma de complejo con la proteína, no altera sus características ópticas.

## Estudio de la degradación de $\alpha$ -tocoferol

En el Gráfico 2 se presentan las curvas de degradación de  $\alpha$ -tc por efecto de la acción del oxígeno del aire e intensa radiación lumínica en función del tiempo de exposición.



**Gráfico 2.** Degradación de  $\alpha$ -tc a distintos tiempos de almacenaje, solución de etanol (●), solución de  $\beta$ -Ig/ $\alpha$ -tc (●) y películas de AS~ $\beta$ -Ig/ $\alpha$ -tc (●).

El análisis del Gráfico 2 muestra que al someter el  $\alpha$ -tc a condiciones oxidantes su estructura se va degradando.

Al séptimo día, la vitamina disuelta en alcohol mantiene intacto solamente un  $14 \pm 4,6\%$  de su estructura (curva en color negro).

La  $\beta$ -Ig la protege, manteniendo intacto un  $44 \pm 4,0\%$  de su estructura, por la formación de los nanocomplejos solubles (curva en color rojo).

La muestra proveniente de la película mantiene un  $74,5 \pm 4,5\%$  de su estructura original intacta (curva color azul). Esto indica que la presencia de AS en la película aumenta el efecto protector que la  $\beta$ -Ig ya ejerce al formar el complejo, posiblemente por una acción sinérgica con la proteína.

No se realizaron estudios de absorción de agua debido a que las películas no mostraron cambios macroscópicos en su calidad luego de estar expuestas al aire ambiental durante el tiempo de estudio.

## Conclusión

Se formaron nanocomplejos por fijación de  $\alpha$ -tc a  $\beta$ -Ig en sitios específicos e inespecíficos de su superficie a pH 6,80. Las películas obtenidas permitieron incorporar el complejo  $\beta$ -Ig/ $\alpha$ -tc (respetando la concentración de  $\alpha$ -tc correspondiente a la ingesta máxima diaria), y se lograron estructuras homogéneas, traslúcidas y maleables, sin que el agregado de vitamina afecte sus propiedades. En cuanto a la estabilidad del  $\alpha$ -tc, las películas demostraron proteger su integridad ante la acción de agentes oxidantes. La aplicación de estas películas puede resultar útil para mantener la estructura de

la vitamina conservada en el tiempo hasta su incorporación en alimentos o preparaciones farmacéuticas.

## Referencias

- Báez, G. D., Moro, A., Ballerini, G. A., Busti, P. A. y Delorenzi, N. J., 2011. Comparison between structural changes of heat-treated and transglutaminase cross-linked beta-lactoglobulin and their effects on foaming properties. En: *Food Hydrocolloids*, 25(7), pp.1758-1765.
- Busti, P., Gatti, C. A. y Delorenzi, N. J., 2000. Some aspects of  $\beta$ -lactoglobulin structural properties in solution studied by fluorescence quenching. En: *International Journal of Biological Macromolecules*, 23(1998), pp.143-148.
- Busti, P., Gatti, C. A. y Delorenzi, N. J., 2005. Thermal unfolding of bovine  $\beta$ -lactoglobulin studied by UV spectroscopy and fluorescence quenching. En: *Food Research International*, 38(5), pp.543-550.
- de Kruif, C. G., Weinbreck, F. y de Vries, R., 2004. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. En: *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(5), pp.340-349.
- Delorenzi, N. J., 2005. Beta-lactoglobulin conformational changes studied by fluorescence quenching. En: Riley, Arthur, P., ed., 2005. *Food research, safety and policies*. New York: Nova Science Publishers. pp.169-183
- Draget, K. I., 2009. Alginates. En: Glyn, O. Phillips, Williams, P. A. *Handbook of hydrocolloids*. 2a ed. London: Woodhead Publishing. pp.807-828
- Fioramonti, S. A., Pérez, A. A., Aringoli, E. E., Rubiolo, A. C. y Santiago, L. G., 2014. Food hydrocolloids design and characterization of soluble biopolymer complexes produced by electrostatic self-assembly of a whey protein isolate and sodium alginate. En: *Food Hydrocolloids*, 35, pp.129-136.
- Giroux, H. J. y Britten, M., 2011. Encapsulation of hydrophobic aroma in whey protein nanoparticles. En: *Journal of Microencapsulation*, 28(5), pp.337-343.
- Jones, O. G., Decker, E. A. y McClements, D. J., 2009. Formation of biopolymer particles by thermal treatment of  $\beta$ -lactoglobulin-pectin complexes. En: *Food Hydrocolloids*, 23(5), pp.1312-1321.
- Liang, L. y Subirade, M., 2012. Study of the acid and thermal stability of  $\beta$ -lactoglobulin-ligand complexes using fluorescence quenching. En: *Food Chemistry*, 132(4), pp.2023-2029.
- Liang, L., Tremblay-Hébert, V. y Subirade, M., 2011. Characterisation of the  $\beta$ -lactoglobulin/ $\alpha$ -tocopherol complex and its impact on  $\alpha$ -tocopherol stability. En: *Food Chemistry*, 126(3), pp.821-826.
- Livney, Y. D., 2010. Milk proteins as vehicles for bioactives. En: *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1), pp.73-83.
- Mendoza, F. y Aguilera, J. M., 2004. Application of image analysis for classification of ripening bananas. En: *Journal of Food Science*, 69(9), pp.474-477.
- Moro, A., Báez, G. D., Busti, P. A., Ballerini, G. A. y Delorenzi, N. J., 2011. Effects of heat-treated  $\beta$ -lactoglobulin and its aggregates on foaming properties. En: *Food Hydrocolloids*, 25(5), pp.1009-1015.
- Moro, A., Gatti, C. y Delorenzi, N., 2001. Hydrophobicity of whey protein concentrates measured by fluorescence quenching and its relation with surface functional





- properties. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), pp.4784–4789.
- Mousavi, S. H.-A., Bordbar, A.-K. y Haertlé, T., 2008. Changes in structure and in interactions of heat-treated bovine beta-lactoglobulin. En: *Protein and Peptide Letters*, 15(8), pp.818–825.
- National Institute of Health, Office of Dietary Supplements, 2016. Vitamina E: hoja informativa para consumidores [En línea]. Bethesda: NIH. [Consulta: 13/2/2017]. Disponible en: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminE-DatosEnEspañol/>
- Pereira, R., Carvalho, A., Vaz, D. C., Gil, M. H., Mendes, A. y Bártolo, P., 2013. Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications. En: *International Journal of Biological Macromolecules*, 52, pp.221–230.
- Qomarudin, Q., Orbell, J., Ramchandran, L., Gray, S. R., Stewart, M. B. y Vasiljevic, T., 2015. Properties of beta-lactoglobulin / alginate mixtures as a function of component ratio , pH and applied shear. En: *Food Research International*, 71, pp.23–31.
- Relkin, P. y Shukat, R., 2012. Food protein aggregates as vitamin-matrix carriers: Impact of processing conditions. En: *Food Chemistry*, 134(4), pp.2141–2148.
- Relkin, P., Shukat, R. y Moulin, G., 2014. Encapsulation of labile compounds in heat- and high-pressure treated protein and lipid nanoparticles. En: *Food Research International*, 63, pp.9–15.
- Rhim, J.-W., 2004. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. En: *LWT - Food Science and Technology*, 37(3), pp.323–330.
- Romero, G. C. A., Malo, A. L. y Palou, E., 2013. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. En: *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), pp.87–96.
- Ron, N., Zimet, P., Bargarum, J. y Livney, Y. D., 2010. Beta-lactoglobulin-polysaccharide complexes as nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals in non-fat foods and clear beverages. En: *International Dairy Journal*, 20(10), pp.686–693.
- Siripatrawan, U. y Harte, B. R., 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. En: *Food Hydrocolloids*, 24, pp.770-775.
- Soazo, M., Báez, G., Barboza, A., Busti, P., Rubiolo, A., Verdini, R. y Delorenzi, N., 2015a. Heat treatment of calcium alginate films obtained by ultrasonic atomizing: physicochemical characterization. En: *Food Research International*, 51, pp.193-199.
- Soazo, M., Pérez, L., Rubiolo, A. y Verdini, R., 2015b. Prefreezing application of whey proteinbased edible coating to maintain quality attributes of strawberries. En: *Intl J Food Sci Tech*, 50(3), pp.605–611.
- Tavares, G. M., Croguennec, T., Carvalho, A. F. y Bouhallab, S., 2014. Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. En: *Trends in Food Science & Technology*, 37(1), pp.5–20.
- Yam, K. L. y Papadakis, S. E., 2004. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. En: *Journal of Food Engineering*, 61, pp.137-142.
- Zimet, P. y Livney, Y. D., 2009. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω-3 polyunsaturated fatty acids. En: *Food Hydrocolloids*, 23(4), pp.1120–1126.

# Efecto de la alta presión hidrostática en la exposición del contenido de sulfhidrilos libres en amilasa fúngica

## Effect of high hydrostatic pressure on free sulfhydryl content from fungal $\alpha$ -amylase

Ormando, Paula (1, 2); Vranic, María L. (1, 3); Guidi, Silvina (1, 4), Ambrosi, Vanina (1, 5).

(1) Instituto Tecnología de Alimentos (ITA), CIA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina.

(2) Instituto de Tecnología, Fundación UADE. Universidad Argentina de la Empresa, Buenos Aires, Argentina.

(3) Departamento de Tecnología. Universidad de Luján (UNLu). Luján, Buenos Aires, Argentina.

(4) Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias. Universidad de Morón (UM). Morón, Buenos Aires, Argentina.

(5) Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB). Universidad de Buenos Aires (UBA). CABA, Buenos Aires, Argentina.

Contacto: paulaormando@gmail.com

RECIBIDO: 16/3/2018 – APROBADO: 15/6/2018

### Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto térmico residual generado luego del uso en ciclos consecutivos del equipo de Alta Presión Hidrostática (APH) en tres posiciones internas (superior, central e inferior) mediante la cuantificación del contenido de sulfhidrilos libres [SH-L] de  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae* expresado en  $\mu\text{mol}$  de SH/g de proteína. La potencial utilización de la cuantificación de [SH-L] de la enzima como indicador de tratamiento de APH permite medir en forma indirecta el efecto térmico durante el proceso.

En el ensayo se utilizó un equipo de APH de 2L con alimentación inferior del fluido de presurización (agua:propilenglicol-70:30v/v). En cada ciclo, el fluido a temperatura ambiente fue comprimido hasta alcanzar la presión deseada (605 MPa), y el nivel de presión se mantuvo durante cinco minutos con posterior despresurización. El ciclo fue repetido tres veces en forma consecutiva.

Se realizó un ANOVA ( $\alpha=0,05$ ) correspondiente a un diseño factorial de dos factores: posiciones y ciclos consecutivos, con tres niveles cada uno, y con cuatro repeticiones para el diseño completo. Se obtuvieron diferencias significativas en la interacción ciclo\*posición (p valor=0,001) y el ciclo (p valor=0,021). Estos resultados evidencian el efecto del calor generado durante la compresión adiabática, afectando la historia térmica de la  $\alpha$ -amilasa. Dada su sensibilidad, esta enzima podría ser considerada a futuro como un indicador de procesos de APH que permite evaluar la diferencia entre las muestras procesadas durante los ciclos, y que evidencia el perfil térmico generado dentro del equipo.

**Palabras clave:** Altas Presiones, contenido de sulfhidrilos libres, amilasa.

### Abstract

We evaluated the residual thermal effect generated by the consecutive High Hydrostatic Pressure (HHP) cycles relative to the position (upper, central and lower) inside a high pressure vessel determining the free sulfhydryl groups [F-SH] from pressurized  $\alpha$ -amylase *Aspergillus oryzae* expressed in  $\mu\text{mol}$  SH/g protein. This methodology could represent a potential indicator of HHP treatment, allowing to measure in an indirect way the thermal effect during the process. Assays were carried out using a 2L stabilized lab scale equipment, where pressurizing medium (water-propilenglycol:70-30%) was injected at room temperature from the bottom of the vessel.

For each cycle, the fluid at room temperature was compressed until reaching the desired pressure (605 MPa), maintained for five minutes, followed by depressurization. The cycle was repeated three consecutive times.

The free sulfhydryl content was assayed statistically using one-way ANOVA ( $\alpha=0,05$ ) for a factorial design of two factors: positions and consecutive cycles, with three levels, and four repetitions for the complete design. Significant differences were obtained in the interaction cycles\*position (pvalue = 0,001) and cycles (pvalue = 0,021).

These results demonstrate the effect of the heat generation during adiabatic compression, affecting the thermal history of the  $\alpha$ -amylase. Due to its sensitivity to pressure, this enzyme could be considered as a potential indicator of high pressure processing in the future, evaluating the difference between processed samples during cycles, and confirming the thermal profile generated within the equipment.

**Keywords:** High Pressure, free sulfhydryl content, amylase.

## Introducción

Entre las tecnologías no térmicas, la tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas (APH) es la que mayor aplicación comercial ha alcanzado en las últimas dos décadas. Se aplica a nivel industrial para pasteurizar tanto alimentos de origen vegetal, como jugos de frutas y mermeladas, y en productos de origen animal, como el jamón cocido/curado, pescados y mariscos, además de aderezos y salsas. Cabe destacar que los componentes de bajo peso molecular, responsables de las características nutricionales y sensoriales como el aroma y el sabor, no son afectados (Welti-Chanes, et al., 2005; Hugas, et al., 2002), así como tampoco el aspecto general y la frescura.

En equipos que se utilizan en los laboratorios o en una planta piloto, durante el procesamiento por APH se aplica una presión comprendida entre 50 y 1000 MPa, mediante un líquido, generalmente agua o mezclas de alcoholes y agua, cuya temperatura se encuentra en el rango de -40 °C a 110 °C. Los alimentos son envasados en envases flexibles y herméticos, y son colocados en una cámara de presurización metálica con paredes de gran espesor. A nivel industrial, la máxima presión que se aplica es 600 a 800 MPa, a temperatura ambiente o de refrigeración. Una vez realizada la carga de los alimentos, se cierra la cámara y se eliminan los gases. Posteriormente, se mantiene bajo presión durante un período (minutos) y luego se realiza la despresurización del sistema y la descarga del producto. Sin embargo, durante la primera etapa del proceso, el fluido de presurización sufre un incremento de temperatura por compresión adiabática (efecto conjunto de presión y temperatura). Este incremento puede ser diferente según la posición dentro del equipo APH que se considere (Ormando et al., 2015, 2017).

Cuando el fluido de presurización es agua, el incremento de temperatura es de 2 a 3 °C por cada 100 MPa (Makita, 1992). No obstante, cuando se emplean mezclas con solventes orgánicos y/o aceites como fluido de presurización, el aumento de temperatura es mayor, debido a que estos poseen un mayor valor de compresibilidad, una menor conductividad térmica y capacidad calorífica con respecto al agua (Balasubramanian y Balasubramaniam, 2003; Ormando, et al., 2015, 2016).

De acuerdo al Principio de Pascal, la presión se presupone uniforme dentro de un material homogéneo y, al tratarse de un proceso tipo *batch* o por lotes, el tiempo de procesamiento o residencia es fijo. En este sentido, Hartmann y Delgado (2003) informaron que durante la compresión se desarrolla un campo de velocidades del fluido por efecto de la convección forzada, mientras que durante la fase de mantenimiento de la presión se produce el fenómeno de convección natural. El movimiento del fluido de presurización genera condiciones térmicas no uniformes, especialmente cuando el fluido es altamente viscoso, ya que disminuye el movimiento convectivo. Considerando el efecto sobre la inocuidad, los atributos de calidad sensorial, nutricional y la extensión de la vida útil de los alimentos, los parámetros de proceso más importantes en el tratamiento con APH son: el nivel de presión (P), el tiempo de mantenimiento (t) y la temperatura (T). Durante la compresión del fluido de presurización se genera calor, que produce el aumento de la temperatura del fluido y del alimento. Según estudios realizados por Rasanayagam et al. (2003), el incremento de temperatura depende: del máximo nivel presión alcanzado en el proceso, de la temperatura inicial, del tipo de fluido de presurización elegido, de la compresibilidad y de la capacidad calorífica del fluido de compresión y del alimento tratado con APH, que en ambos casos depende de la composición.

Para evaluar la distribución de temperatura en el cilindro de APH se pueden utilizar diferentes estrategias. Una manera efectiva es utilizar termocuplas (T o K), que se ubican ya sea en las diferentes posiciones del cilindro como en muestras a analizar, sin que afecten la circulación del fluido dentro del cilindro. En este sentido, Ormando et al. (2015, 2016) evaluaron en un equipo de APH de 2 L los perfiles térmicos para tres posiciones (superior, central e inferior) sometidos a presiones de 205, 405 y 605 MPa. Los resultados mostraron que la posición superior es aquella con mayor incremento de temperatura ( $12,0 \pm 5,9$  °C) para 605 MPa dentro del cilindro. En general, los incrementos de temperatura aumentan con la presión y la altura y disminuyen con el radio. Estos autores indicaron que la zona de mayor incremento térmico durante el ciclo de APH corresponde a la región central superior del equipo. El perfil heterogéneo de temperaturas registrado coincide con los resultados informados por Kitsubun et al. (2005) y Hartmann y Delgado (2003).

Otra metodología empleada es la llamada integradores dependientes de presión temperatura y tiempo (pTTI's por su sigla en inglés). Los pTTI's pueden ser definidos como pequeños dispositivos (proteínas aisladas o enzimas, coenzimas o inhibidores como integradores proteicos) que permiten medir en forma precisa e indirecta el efecto de un tratamiento de APH (Van der Plancken, et al., 2008). La selección y utilización de estos dispositivos se fundamenta en su actual disponibilidad en el mercado, en su bajo costo y en la escasa cantidad que se necesita para su análisis, por ejemplo mg/ml. Una de las ventajas de la utilización de enzimas es que tanto su actividad biológica como su nivel de desplegamiento son cuantificables mediante ensayos espectrofotométricos, en los cuales los resultados obtenidos dependerán principalmente del efecto de la aplicación de un tratamiento determinado. El efecto de la presión sobre la estructura y las propiedades funcionales de las proteínas se debe a cambios en las interacciones intra e intermoleculares entre los grupos funcionales de los aminoácidos. La presurización promueve la formación de enlaces entre las cadenas laterales (Hoover, et al., 1989), causando la modificación estructural reversible o irreversible en las proteínas, que conduce a su desnaturalización, agregación o gelatinización (Mills, et al., 2009).

A presiones de 300 y 400 MPa se destacan efectos como el aumento de las interacciones hidrofóbicas, debido a la alta compresibilidad del agua libre comparada con la de los puentes hidrógeno. Por otra parte, los grupos sulfhidrilos pueden oxidarse dando lugar a puentes disulfuro en presencia de oxígeno (Funtenberger, et al., 1995). La aplicación de presión superior a 100-200 MPa a temperatura ambiente produce la disociación de macroestructuras en subunidades, así como el despliegue y la desnaturalización de las estructuras monoméricas, debido al debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas y a la separación de puentes salinos inter o intramoleculares. Si la presión y la concentración de la proteína son elevadas, puede causar que las proteínas adopten una estructura más compacta, aunque la pérdida de su estructura secundaria es un fenómeno que solamente se manifiesta a presiones extremas (Cheftel, 1995). La alta presión induce la gelificación a baja temperatura, y en esas condiciones se obtienen geles de características distintas de las de los obtenidos por calor. En general, los efectos que sufren las estructuras terciarias y cuaternarias pueden ser reversibles, aunque dependen de factores como la temperatura y el pH del medio (Cheftel, 1995).

Denys et al. (2000) fueron los primeros en utilizar pTTT's para la detección de los gradientes de temperatura dentro de la cámara de APH. En este sentido, Grauwet et al. (2010) evaluaron la distribución de temperaturas en un equipo APH horizontal (400-600 MPa; 10-40 °C; 1-15 min) utilizando enzimas  $\alpha$ -amilasas bacterianas, cuya desnaturalización térmica ocurre por encima de los 80 °C. En este trabajo se utilizó  $\alpha$ -amilasa fúngica, ya que posee una susceptibilidad térmica mayor que la  $\alpha$ -amilasa bacteriana y se desnaturaliza por encima de los 60 °C, y tiene un costo comercial inferior. Se trata de una proteína monomérica que consta de una sola cadena polipeptídica de 478 aminoácidos con cuatro puentes disulfuro intracatenarios y un peso molecular de 51-53 kDa. La molécula está compuesta por un dominio mayor que contiene el sitio activo y un dominio C-terminal de menor tamaño (Fogarty y Kelly, 1983).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto térmico residual generado luego del uso en ciclos consecutivos del equipo de Alta Presión Hidrostática (APH), en tres posiciones internas (superior, central e inferior), mediante la cuantificación del contenido de sulfhidrilos libres [SH-L] de  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae* expresado en  $\mu\text{mol}$  de SH/g de proteína.

## Materiales y Métodos

### Preparación del extracto enzimático

Se preparó una solución de una concentración 10 mg/mL de la enzima  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae* (A-9857, Sigma Aldrich, Alemania) en buffer 0,01M Tris-HCL, pH 8,6. Las muestras se envasaron en bolsas termoselladas (Cryovac (CN-640); 2 cm x 2,5 cm) con un volumen final de 1 mL, y posteriormente fueron colocadas en una segunda bolsa termosellada (Cryovac (CN-640); 5 cm x 6 cm) y envasadas al vacío (Maximax 800, Rapivac, Argentina).

### Tratamiento de Altas Presiones Hidrostáticas (APH)

Se utilizó un equipo APH escala laboratorio (Stansted Fluid Power Ltd., modelo Iso-Lab-S-IL-070-550-09-W, Stansted, Reino Unido) de configuración vertical que opera en forma

discontinua. Este equipo cuenta con un cilindro de alta presión de 2 L de capacidad, encamisado por una cámara de intercambio de calor (Figura 1<sup>a</sup>), en la cual se ubica una canasta cilíndrica de 500 mm de altura x 70 mm de diámetro interno, donde el fluido de presurización (agua:propilenglicol-70:30v/v) es alimentado inferiormente, y una termocupla tipo (K) que monitorea la temperatura de proceso y permite trabajar en un rango de temperatura de entre -20 a 130 °C. La velocidad de compresión utilizada fue de 300 MPa/min. En este ensayo se monitorearon mediante termocuplas tipo K tanto las temperaturas del fluido de presurización, como las temperaturas en las tres diferentes posiciones donde se ubicaron las muestras enzimáticas (superior, central e inferior).

Se monitorearon y registraron las evoluciones de temperatura vs. tiempo durante las diferentes etapas del proceso operativo: compresión – incremento de la presión hasta 605 MPa – mantenimiento isobárico (5 minutos a presión constante) – descompresión hasta alcanzar la presión atmosférica (0,1 MPa).

### Procesamiento de muestras de enzimas mediante APH

Las muestras de enzimas sin procesar, envasadas en bolsas al vacío, fueron ingresadas a la canasta del equipo mediante un dispositivo centrado y conectado en su cabezal superior, ubicadas en sus respectivas posiciones (superior, central e inferior). La Figura 1b indica las posiciones evaluadas dentro de la canasta del equipo de APH.

Para el ciclo I, una vez ingresadas las muestras se procedió a la presurización del fluido hasta alcanzar 605 MPa; este nivel de presión se mantuvo por cinco minutos y luego se despresurizó hasta alcanzar la presión atmosférica. Una vez finalizado el ciclo I, las muestras fueron retiradas del dispositivo dentro de la canasta y se reservaron en frío para su posterior análisis. Los ciclos II y III se llevaron a cabo de manera análoga y consecutiva.

### Determinación de sulfhidrilos libres

Se tomaron 0,5 mL de cada una de las muestras tratadas (posiciones (superior, central e inferior) para los ciclos I, II y III), y



(a)



(b)

Figura 1. Equipo de APH a escala laboratorio (a) y posiciones de la canasta interna del equipo (b).

se les adicionó 1,5 mL de buffer Tris-Glicina (1 M Tris, 0,1 M Glicina y 4 mM EDTA; pH 8,0) y 15 µl del Reactivo de Ellman (4 mg/mL DTNB en Buffer Tris-Glicina). Seguidamente, se incubó la mezcla durante 30 minutos. El contenido de [SH-L] se midió a 412 nm en un espectrofotómetro UV-visible (SpectroStar Nano, BMG Labtech GmbH, Alemania).

El coeficiente de extinción molar utilizado fue 13.600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. La concentración de SH-L fue expresada como µmol de SH/g de proteína (Ellman, 1959).

La obtención del valor de la concentración se obtuvo a partir de la siguiente expresión:

$$[\text{SH-L}] = (75,53 (D_{01} - D_{02})1000)/VC$$

[SH-L]: concentración de sulfhidrilos libres en la muestra expresada como µmol de SH/g de proteína.

D<sub>01</sub>: Absorbancia a 412 nm de la muestra

D<sub>02</sub>: Absorbancia a 412 nm del blanco de reactivos

V: volumen de la muestra

C: concentración de la proteína en la muestra

## Diseño experimental

Se evaluó indirectamente el efecto térmico en las distintas posiciones (superior, central e inferior) de las muestras de las enzimas ubicadas dentro de la canasta, y los cambios producidos durante ciclos consecutivos. La variable respuesta evaluada fue la concentración de SH libres [SH-L], expresada como µmol de SH/g de proteína. Se realizaron cuatro repeticiones del diseño. Para la evaluación de los resultados se consideró un diseño factorial de dos factores: posiciones (superior, central e inferior) y ciclo (I, II, III). El modelo estadístico utilizado fue expresado como:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

con  $i = 1, 2, 3$ ;  $j = 1, 2, 3$ ;  $k = 1, 2$

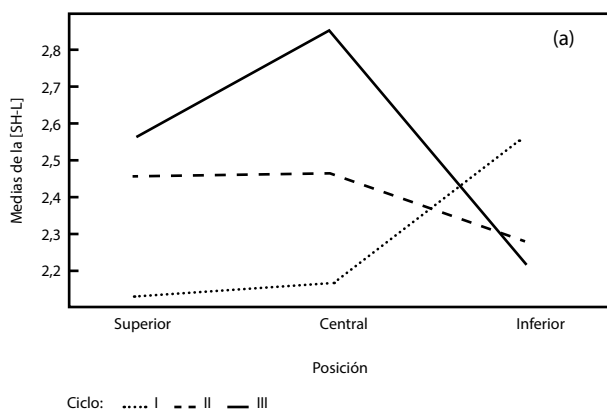
$\mu$ : media general

$\alpha_i$ : efecto debido al  $i$ ésimo nivel del factor posición

$\beta_j$ : efecto debido al  $j$ ésimo nivel del factor ciclo

$(\alpha\beta)_{ij}$ : efecto de interacción en la combinación  $ij$

$e_{ijk}$ : error experimental



## Resultados

Los resultados de las medias de la concentración de SH libres [SH-L] para cada ciclo y posición son presentados en el Gráfico 1. Como puede observarse, las posiciones superior y central son las que sufrieron un mayor aumento de la temperatura durante el procesamiento; esto se vería reflejado en el nivel de incremento de la [SH-L].

Se utilizó el software R Core Team (2013) para el análisis estadístico de los resultados. Se realizó un ANOVA con un diseño factorial de dos factores: posiciones y ciclos consecutivos, con tres niveles cada uno, y con cuatro repeticiones para el diseño completo (Tabla 1).

Se encontraron diferencias significativas en la interacción posición\*ciclo ( $p \geq 0,001$ ) y en el ciclo ( $p \geq 0,021$ ).

Fuentes de variables	gl	SC	CM	F	p-valor
Posición	2	0,112	0,056	1,539	0,233
Ciclo	2	0,325	0,163	4,481	0,021
Posición:Ciclo	4	0,906	0,226	6,243	0,001
Residuos	27	0,979	0,036		

**Tabla 1.** Análisis de Varianza.

gl: grados de libertad

SC: suma de cuadrados

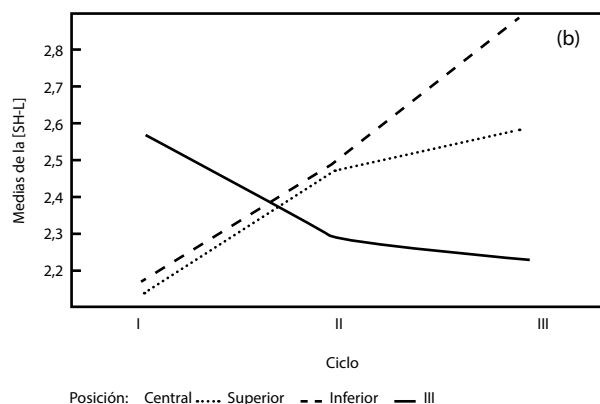
CM: Cuadrados medios

F: Estadístico F

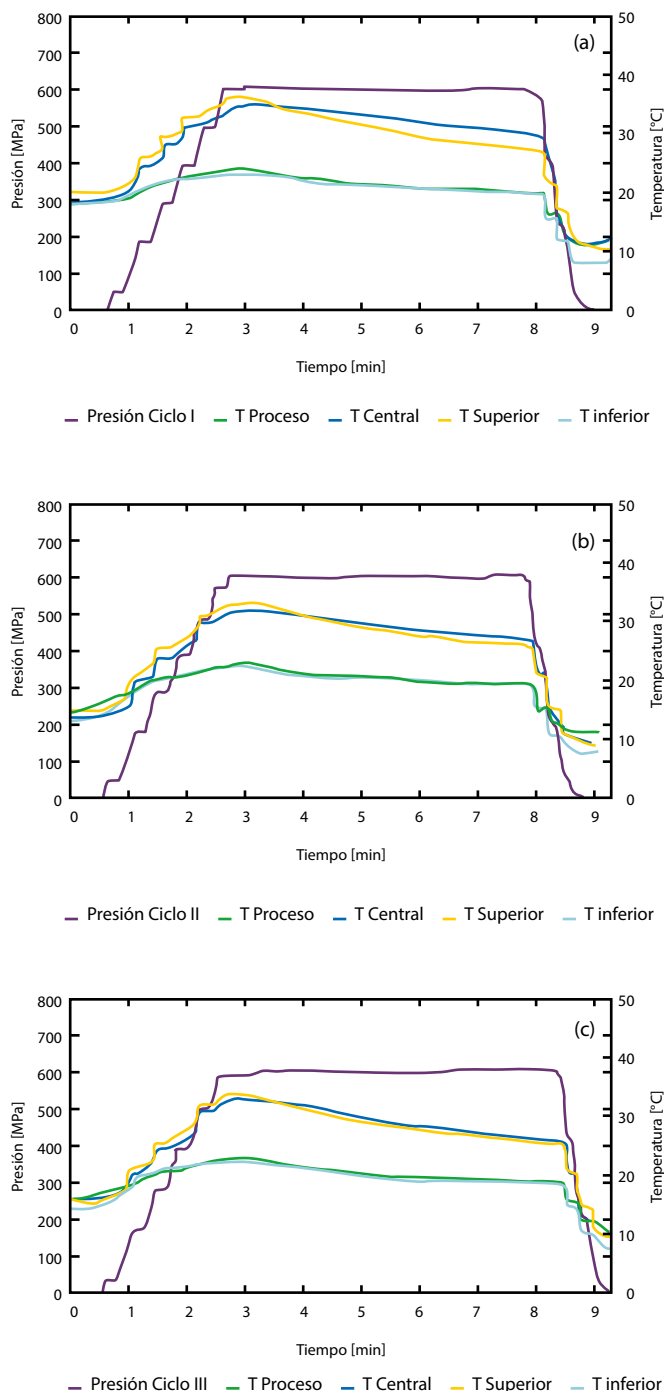
En el Gráfico 2 se representan las curvas experimentales de presión y de temperatura en las diferentes posiciones evaluadas, y la del fluido de presurización (proceso) para los ciclos I (a), II (b) y III (c).

Se observó que el comportamiento térmico del ciclo I resultó diferente que el de los ciclos II y III, y en estos dos últimos no difirió entre sí.

En particular, en los tres ciclos de APH ensayados, las posiciones superior y central de la canasta presentaron un



**Gráfico 1.** Valores de medias de [SH-L] obtenidos para cada posición (a) y ciclo (b).



**Gráfico 2.** Evolución de la presión y temperatura en diferentes posiciones dentro del equipo de APH, para el ciclo I (a), II (b) y III (c).

mayor incremento de temperatura respecto de la posición inferior. Asimismo, se observó que el comportamiento térmico de esta última resultó ser similar al del proceso. En este sentido, Hartmann y Delgado (2003) informaron que durante la compresión se desarrolla un campo de velocidades del fluido por efecto de la convección forzada, mientras que durante la fase de mantenimiento de la presión se produce el fenómeno de convección natural. El movimiento del fluido de presurización genera condiciones térmicas no uniformes, especialmente cuando el fluido es altamente viscoso, ya que

disminuye el movimiento convectivo. Si bien en la bibliografía consultada no se encontraron referencias al uso consecutivo de ciclos de APH, en este trabajo se observó que el equipo utilizado requiere como mínimo un ciclo de uso para su puesta en régimen.

En cuanto a las determinaciones de la concentración de sulfhidrilos libres [SH-L] en las posiciones superior y central, la [SH-L] aumentó con los ciclos consecutivos del equipo de APH, mientras que para la posición inferior el comportamiento es opuesto, es decir, el valor medio de [SH-L] disminuyó con los ciclos consecutivos. Esta disminución en [SH-L] puede atribuirse a que el efecto térmico residual generado luego de los usos consecutivos del equipo provoca un menor impacto en la estructura de la molécula. Respecto a las posiciones, la más afectada fue la central, donde el valor medido de sulfhidrilos se incrementó con el aumento de los ciclos. Para el ciclo I el valor medio de [SH-L] resultó mayor en la posición inferior, luego le sucedió en orden la posición central y, por último, la posición superior. En el caso del ciclo II, la [SH-L] fue mayor en la posición central que la posición superior y ambas resultaron mayores que la posición inferior. En el ciclo III se repitió este mismo perfil, de forma aún más pronunciada. Este comportamiento es coherente con el observado en los perfiles térmicos discutidos previamente. El aumento de la temperatura del medio de presurización provoca el desplegamiento proteico, lo que se ve reflejado en el aumento de la [SH-L]. Este incremento puede ser diferente según la posición de la canasta del equipo de APH que se considere. Por su parte, Grauwet et al. (2010) evaluaron la no uniformidad térmica en equipos verticales con solo un ciclo de procesamiento de APH (400-600 MPa; 10-40 °C; 1-15 min) utilizando la medición de la actividad de enzimas  $\alpha$ -amilasas bacterianas (*Bacillus subtilis*), post tratamiento. Estos autores indicaron que las actividades residuales más altas (por lo tanto, los impactos del proceso más bajos) se observaron en el fondo del recipiente, donde las temperaturas son más bajas, en comparación a otras posiciones, como las centrales. El comportamiento respecto de las temperaturas concuerda con las mediciones realizadas en este trabajo. Esto puede ser atribuido a los fenómenos de convección por el flujo dirigido hacia la parte inferior del cilindro de APH. Cabe mencionar que como parámetro de evaluación del procesamiento por APH no se realizó la medición de la actividad enzimática, sino que se determinó la concentración de sulfhidrilos libres como una medida indirecta del desplegamiento proteico. En las proteínas, la presión actúa principalmente en los enlaces hidrofóbicos y electrostáticos de la molécula. La APH causa la desprotonación de los grupos cargados, la rotura de los puentes iónicos y de los enlaces hidrofóbicos, de este modo se producen cambios conformacionales y estructurales (Téllez, et al., 2001).

La metodología utilizada (pTTI's y determinación de [SH-L]) demostró ser suficientemente sensible para detectar las diferencias entre los perfiles térmicos en el equipo, permitiendo determinar un subprocesamiento de muestras, y entre los ciclos consecutivos, para monitorear la puesta en régimen.

## Conclusiones

La utilización de la metodología (pTTI's y determinación de [SH-L]) no solo permitió evaluar diferencias entre las muestras procesadas en cada posición, sino también variaciones del perfil térmico generado dentro del equipo y sus diferencias

entre los ciclos ensayados. Se demostró que es necesario al menos dos ciclos consecutivos para que el equipo de APH entre en régimen. Los resultados obtenidos son muy prometedores y se espera continuar las investigaciones para optimizar la sensibilidad de la metodología propuesta.

## Referencias

- Balasubramanian, S. y Balasubramaniam, V., 2003. Compression heating influence of pressure transmitting fluids on bacteria inactivation during high pressure processing. En: *Food Research International*, 36, pp.661-668.
- Cheftel, J., 1995. High pressure microbial inactivation and food preservation. En: *Food Science Technology International*, 1, pp.75-90.
- Denys, S., Van Loey, A. y Hendrickx, M., 2000. A modeling approach for evaluating process uniformity during batch high hydrostatic pressure processing: combination of a numerical heat transfer model and enzyme inactivation kinetics. En: *Innovative Food Science. Emerging & Technologies*, 1, pp.5-19.
- Ellman, G., 1959. Tissue sulfhydryl groups. En: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), pp.70-77.
- Fogarty, W. y Kelly, C., 1983. Enzymic developments in the production of maltose and glucose. En: Lafferty, R.M., ed. *Enzyme technology*. Berlín: Springer.
- Funtenberger, S., Dumay, E. y Cheftel J., 1995. Pressure-induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin in pH 7.0 buffers. En: *LWT - Food Science and Technology*, 28(4), pp.410-418.
- Grauwet, T., Van der Plancken, I., Vervoort, L., Hendrickx, M., y Van Loey, A., 2010. Mapping temperature uniformity in industrial scale HP equipment using enzymatic pressure-temperature-time indicators. En: *Journal of Food Engineering*, 98, pp.93-102.
- Hartmann, Chr. y Delgado, A., 2003. The influence of transport phenomena during high-pressure processing of packed food on the uniformity of enzyme inactivation. En: *Biotechnology and Bioengineering*, 82(6), pp.725-35.
- Hoover D G, Metrick C, Papineau A M, Farkas D F y Knorr D (1989) Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. En: *Food Technology*, 43, pp.99-107.
- Hugas, M., Garriga, M. y Monfort, J., 2002. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. En: *Meat Science*, 62, pp.359-371.
- Kitsubun, P., Hartmann, C. y Delgado, A., 2005. Numerical Investigations of Process Heterogeneities during High Hydrostatic Pressure Treatment with Turbulent Inflow Conditions. En: *Proc. Appl. Math. Mech.*, 5, pp.573-574.
- Makita, T., 1992. Application of high pressure and thermophysical properties of water to biotechnology. En: *Fluid Phase Equilibria*, 76, pp.87-95.
- Mills, E. N. C., Sancho, A. I., Rigby, N. M., Jenkins, J. A. y Mackie, A. R., 2009. Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. En: *Mol Nutr Food Res*, 53, pp.963-9.
- Ormando, P., Caron, P. y Larreteguy, A., 2017. Simulación hidrodinámica y térmica de un proceso a altas presiones hidrostáticas mediante OpenFOAM. En: *XI Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, (CIBIA XI)*. Valparaíso, Chile, (22-25 de octubre de 2017). Valparaíso: CIBIA.
- Ormando, P., Sanow, C., Vranic, M. y Vaudagna, S., 2016. Mapeo térmico durante el procesamiento por altas presiones hidrostáticas En: *AIALU. II Congreso Iberoamericano de Ingeniería en Alimentos, (CIIAL 2016)*. Punta del Este, Uruguay, (13-14 de octubre de 2016). Punta del Este: AIALU.
- Ormando, P., Sanow, C., Vranic, M., Larreteguy, A. y Vaudagna, S., 2015. Procesamiento con Altas Presiones Hidrostáticas: evaluación del incremento de temperatura del fluido en función del uso, nivel de presión y distribución dentro del equipo. En: *ALACCTA. XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, (CyTAL 2015)*. Buenos Aires, Argentina (3-5 de noviembre de 2015). Buenos Aires: ALACCTA.
- R Core Team, 2013. *R: A language and environment for statistical computing*. Viena: R Foundation for Statistical Computing.
- Rasanayagam, V., Balasubramaniam, V.M., Ting, E., Sizer, C.E., Bush, C. y Anderson, C., 2003. Compression Heating of Selected Fatty Food Materials during High-pressure Processing. En: *Journal of Food Science*, 68, pp.254-259.
- Téllez, Luis, S. J., Ramírez, J. A., Pérez Lamela, C., Vázquez, M. y Simal Gándara, J., 2001. Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. En: *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3(2). pp.66-80.
- Van der Plancken, I., Grauwet, T., Oey, I., Van Loey, A. y Hendrickx, M., 2008. Impact evaluation of high pressure treatment on foods: considerations on the development of pressure-temperature-time integrators (pTTI's). En: *Trends in Food Science & Technology*, 19, pp.337-348.
- Welti-Chanes, J., López-Malo, A., Palou, E., Bermúdez, D., Guerrero-Beltrán, J. A. y Barbosa Cánovas, G. V., 2005. Fundamentals and applications of high pressure processing of foods, En: Barbosa-Cánovas G.V., Tapia M.S. y Cano M.P., eds. *Novel food process technology*. New York: CRC Press. pp.152-157.