

ISSN 1688-6593 [en línea]

Número 11
Febrero - julio 2016

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

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

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

Dr. Gustavo Domínguez,
Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU),
Gerencia de Investigación, Desarrollo e Innovación, Uruguay

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

Dr. Tomás López,
Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Química,
Departamento de Alimentos, Uruguay

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

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

Edición

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

MSc. Rosa Márquez
Editor asociado, Gerencia I+D+i, Laboratorio Tecnológico
del Uruguay (LATU). Dirección INNOVA CIBIA

Administración de OJS y soporte técnico

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

Diseño

Manosanta Desarrollo Editorial
<http://manosanta.com.uy>

Acerca de INNOTEC

INNOTEC es una revista científica arbitrada en modalidad doble ciego, editada anualmente en Montevideo, Uruguay, por el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) por medio de su Centro de Información Técnica, en formato digital en Open Journal Systems (<http://ojs.latu.org.uy>).

La transferencia de conocimiento y el intercambio con la comunidad son objetivos prioritarios de nuestra publicación, que reúne trabajos originales con un enfoque de rigor y calidad teórica y metodológica con el fin de contribuir a la producción sistemática de nuevo conocimiento científico tecnológico.

La revista está dirigida a investigadores, académicos, tecnólogos y estudiantes vinculados a los campos temáticos que aborda y que se corresponden a las áreas estratégicas de investigación del LATU y del país.

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>

La versión digital se distribuye bajo la modalidad de acceso abierto y los derechos autorales son protegidos por Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial 3.0 Unported.

Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos publicados y el uso que otros puedan hacer de ellos son de responsabilidad de sus autores.

INNOTEC - NÚMERO 11 - Febrero a julio 2016

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

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 para recibir instrucciones para el envío de artículos a nuestro proyecto editorial.

SUMARIO

Prólogo a esta edición	5
Instrucciones a los autores	6
Índice de autores	73
Índice temático	74

ARTÍCULOS

- 9 Estudio de la inactivación de microorganismos deteriorativos en jugos de manzana y melón tratados por luz pulsada y ultrasonido**
Ferrario, Mariana; Guerrero, Sandra.
- 18 Péptidos antioxidantes derivados de la digestión gastrointestinal de proteínas de amaranto: Una primera aproximación a la evaluación de su absorción intestinal y posterior actividad**
Orsini Delgado, María C.; Añón, María C.; Tironi, Valeria, A.
- 27 Purificación y caracterización de una lectina de , un compuesto antiproliferativo**
Mengoni, Antonieta; Quiroga, Alejandra Viviana; Añón, María Cristina.
- 36 Simulación de la convección natural en un horno eléctrico**
Goñi, Sandro M.; Salvadori, Viviana O.
- 42 Enfoque metodológico para cuantificar los efectos cognitivos en el análisis sensorial de alimentos**
Moronte, Ellen Cristina; Huet, Ana Livia; de Sousa Silva, Ana Carolina; Vieira Piza, Luciana; Marinho Muraro, Marcela; Céspedes Arce, Aldo Ivan; Bruno Tech, Adriano Rogério; Von Atzingen, Gustavo Voltani; Xavier Costa, Ernane.
- 47 Evaluación del papel del licopeno en la tolerancia a los daños por frío durante la conservación refrigerada de frutos de pomelo rojo**
Lado, Joanna; Rodrigo, María Jesús; Zacarías, Lorenzo.
- 54 Modelado matemático del secado de pastas libres de gluten en relación a la temperatura y humedad relativa del aire**
Larrosa, Virginia; Lorenzo, Gabriel; Zaritzky, Noemí; Califano, Alicia.
- 59 Evaluación de la permeabilidad al vapor de agua de películas de proteína de lactosuero/quitosano y su efecto sobre la respiración en banano recubierto**
Arce Ortiz, Kadaffi León; Ortega Villalba, Karen Johana; Ochoa Martínez, Claudia Isabel; Vélez Pasos, Carlos.
- 65 Efecto de la formulación de galletas en la secreción de hormonas de saciedad**
Martinez Saez, Nuria; Hochkogler, Christina Maria; Somoza, Veronika; del Castillo, María Dolores.

Prólogo a esta edición especial

El 7, 8 y 9 de octubre de 2015 tuvo lugar en el LATU el encuentro INNOVA CIBIA 2015.

El 7º Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, INNOVA 2015, compartió su marco y sus objetivos con la 10ª edición del Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, CIBIA. Fue la primera vez que ambos eventos científicos coincidían en el LATU, sede habitual de INNOVA, y primera edición del itinerante CIBIA en Uruguay.

El encuentro se desarrolló bajo el lema *Desafíos, avances e innovación en el procesamiento de alimentos*. A lo largo de tres jornadas de conferencias plenarias el foco se mantuvo en tres ejes temáticos: Seguridad y calidad de alimentos: ingeniería y salud, el papel del agua en la industria alimentaria y la adopción de la innovación.

Como complemento e inmejorable punto de partida de INNOVA CIBIA 2015, en los dos días previos se realizaron cursos pre-simposio, configurando así una semana completa de intensas actividades. El primero de ellos estuvo dedicado exclusivamente al procesamiento mínimo y tecnologías emergentes y fue dictado por eméritos reconocidos en esas temáticas. El segundo trató el tema del diseño higiénico de equipos para la industria alimentaria y estuvo a cargo del European Hygienic Engineering Design Group (EHEDG), de cuya oficina regional en Uruguay LATU es representante.

El simposio contó también con la presencia destacada del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, CYTED, promotor del miniforo *Adopción de la innovación*, que tuvo lugar en la última jornada.

La confluencia de científicos, empresarios, investigadores, docentes, profesionales y estudiantes de diversos países, para cosechar en conjunto las experiencias acumuladas en sus áreas específicas de actividad en el sector alimentario, fue el contexto ideal para un encuentro que busca presentar

en la voz de los más reconocidos expertos mundiales cuáles son las tendencias mundiales en materia de alimentos y las perspectivas de futuro. La sinergia que propicia este encuentro hace posible proyectar las estrategias que permitirán abordar las oportunidades y afrontar los riesgos que puedan surgir.

En su cometido de impulsar el desarrollo del país y en el marco de su compromiso de difusión del conocimiento científico, el LATU decidió dedicar esta edición temática de su revista arbitrada INNOTECH a la publicación de una selección de los mejores trabajos científicos recibidos en el marco de INNOVA CIBIA 2015. El comité científico del simposio brindó un apoyo muy significativo en la selección tanto de los resúmenes de los trabajos que serían presentados en el encuentro, como de aquellas investigaciones que fueron premiadas en la ceremonia final de INNOVA CIBIA. Este comité también es responsable de la selección de los mejores trabajos presentados en el simposio, invitados a participar en esta edición especial de INNOTECH. Vaya entonces el reconocimiento y agradecimiento del LATU al esfuerzo de este equipo de valiosos colaboradores que contribuyeron con la calidad de INNOVA CIBIA 2015 y del conjunto de revisores que trabajó para que esta edición de INNOTECH fuera posible.

En sintonía con lo logrado mediante el simposio, esperamos que la publicación de este número especial de INNOTECH contribuya a afianzar los lazos de todos quienes apostamos a la ciencia y la ingeniería de alimentos como una valiosa herramienta para la innovación, la atención de los recursos naturales y el cuidado de la salud de las personas.

Rosa Márquez

Investigadora Senior, Gerencia I+D+i, LATU
Directora INNOVA CIBIA

Instrucciones a los autores para publicar en INNOTEC

Ámbito de los artículos y proceso de revisión

INNOTEC publica artículos originales inéditos en campos temáticos que responden a las áreas estratégicas de investigación del LATU y del país.

Esta publicación anual recopila las investigaciones realizadas por técnicos del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) y equipos de investigación de otras instituciones en el marco de 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.

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 consideran 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, 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 online. La versión digital se distribuye bajo la modalidad de acceso abierto y los derechos autorales son protegidos por Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial 3.0 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 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 previstas por la organización y su Consejo editorial para cada edición y de realizar modificaciones que favorezcan la óptima presentación de los artículos 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 y que no forman parte del staff editorial. Los comentarios y recomendaciones de los árbitros 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 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.

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.

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 a las mismas. Si es necesario incluir fotos o imágenes, estas se deben designar como figuras, deben ser nítidas y enviadas en formato jpg (mínimo 300 ppp 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 mismas se numeran según el orden de aparición en el texto, incluyendo un título explicativo en la parte inferior de la tabla. 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.

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).

Por favor, evite las notas al pie en el desarrollo del artículo. Denominaciones en latín: Deben ir en cursiva.

Estilo y formato de citas y referencias

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. N° 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.

Estudio de la inactivación de microorganismos deteriorativos en jugos de manzana y melón tratados por luz pulsada y ultrasonido

Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple and melon juices by pulsed light and ultrasound

Ferrario, Mariana (1), Guerrero, Sandra (1)

(1) Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Contacto: sguerrero@di.fcen.uba.ar

RECIBIDO: 29/2/2016 – APROBADO: 13/6/2016

Resumen

En este estudio se investigó el efecto de la luz pulsada ($0-71,6 \text{ J/cm}^2$, $T < 20 \text{ }^\circ\text{C}$) en sistema estanco (LP_c) en la inactivación de esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025, células de *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 y *Escherichia coli* ATCC 35218 en jugos naturales de manzana (*Pyrus malus* L, var. Granny Smith, pH: 3,4; 11,4 °Brix) y melón (*Cucumis melo*, var. rocío de miel; pH: $5,7 \pm 0,2$; $8,4 \pm 2,5$ °Brix). Por otra parte, se estudió el efecto de LP en flujo continuo (LP_c , $0-0,73 \text{ J/cm}^2$, $0-0,0175 \text{ J/ml}$, 155 ml/min , $T: 25 \text{ }^\circ\text{C}$) combinado o no con ultrasonido (US, 20 kHz, 80%, 30 min, $T: 25 \text{ }^\circ\text{C}$) en la inactivación de *E. coli* en jugo de manzana. El tratamiento LP_c simple provocó hasta 1,9-6,2 y 1,0-2,1 reducciones logarítmicas de *A. acidoterrestris*, *S. cerevisiae* y *E. coli* en jugos de melón y manzana, respectivamente. Los tratamientos de LP_c y US provocaron una reducción de 3,1 y 2,7 ciclos logarítmicos de *E. coli* en jugo de manzana, respectivamente. La combinación US+ LP_c resultó aditiva dado que se logró una reducción de 5,7 ciclos logarítmicos. Los modelos bifásico y de Weibull brindaron mejor ajuste y estimación de los parámetros que el modelo de Coroller. El jugo de manzana resultó altamente aceptado por un grupo de consumidores que resaltaron su sabor a manzana natural.

Palabras clave: Tecnologías emergentes, tratamientos combinados, jugos frutales.

Abstract

This study was aimed to investigate the effect of pulsed light ($0-71.6 \text{ J/cm}^2$, $T < 20 \text{ }^\circ\text{C}$) in batch mode operation (PL_s) in the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025 spores, *Saccharomyces cerevisiae* KE162 and *Escherichia coli* ATCC 35218 cells in natural squeezed apple (*Pyrus malus* L, var Granny Smith, pH: 3,4; 11,4 °Brix) and melon (*Cucumis melo*, var. Honeydew, pH: $5,7 \pm 0,2$, $8,4 \pm 2.5$ °Brix) juices, and continuous flow-through pulsed light system (PL_c , $0-0,73 \text{ J/cm}^2$, $0-0,0175 \text{ J/ml}$, 155 ml/min , $T < 25 \text{ }^\circ\text{C}$) single or combined with ultrasound (US, 30 min, $T: 25 \text{ }^\circ\text{C}$) on the inactivation of *E. coli* in apple juice. PL_s led up to 1,9- 6,2 log reductions in melon juice; and 1,0-2,1 in apple juice for *A. acidoterrestris*, *S. cerevisiae* and *E. coli*, respectively. Single PL_c reduced *E. coli* population by 3,1 log cycles, while single US reduced 2,7 log cycles. The combination US+ PL_c resulted additive as a reduction of 5,7 log cycles was achieved. Biphasic and Weibull models compared to the Coroller model allowed better fit and more accurate estimation of parameters. Processed apple juice was well accepted by a group of consumers who highlighted its fresh natural apple tasting.

Keywords: Emerging technologies, hurdle technology, fruit juices.

Introducción

Los consumidores optan cada vez más por el consumo de alimentos sometidos a tratamientos menos severos, más saludables, con bajos niveles de sal, azúcares, grasas, ácidos, y con la sustitución total o parcial de conservantes químicos. El procesamiento térmico, si bien asegura la seguridad y la vida útil de los jugos frutales, provoca un detrimento en la calidad nutricional y sensorial de los productos.

Los jugos frutales, debido a su alta acidez, son deteriorados por levaduras, principalmente *Saccharomyces* spp. (Martínez,

et al., 2000), hongos como *Aspergillus ochraceus*, y bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus* y *Leuconostoc* spp. (Stratford, et al., 2000). Además, *Alicyclobacillus acidoterrestris* es una bacteria termoacidofílica, resistente al calor y capaz de sobrevivir a los procedimientos de pasteurización normalmente aplicados a los jugos frutales (Bahçeci, et al., 2005). Por lo tanto, las endoesporas pueden germinar y producir compuestos de mal sabor (Smit, et al., 2010).

En las últimas décadas se ha profundizado en la utilización de tecnologías emergentes de preservación aplicadas de modo individual o en una estrategia combinada para garantizar la

seguridad y retener o mejorar la calidad de los alimentos (Alzamora, et al., 2011). Este tipo de procesamiento reduce la carga microbiana y, al mismo tiempo, permite mejor retención de flavor, textura, color y contenido de nutrientes en relación a los tratamientos térmicos convencionales.

La implementación de luz pulsada (LP) en la inactivación de microorganismos ha ganado interés debido al corto tiempo de procesamiento involucrado (Krishnamurthy, et al., 2010) y su alta efectividad en la inactivación tanto de células vegetativas como esporas en una amplia variedad de alimentos como leche, harina de maíz, pimientos, manzana fresca cortada y carne, entre otros (Jun, et al., 2003; Gómez-López, et al., 2007; Krishnamurthy, et al., 2008; Gómez, et al., 2012; Hierro, et al., 2011). La exposición a LP promueve la formación de dímeros de pirimidina que impiden el proceso de replicación (efecto fotoquímico) (Gómez-López, et al., 2007). Asimismo, Wekhof (2000) y Ferrario et al. (2013a) han reportado disrupción de la membrana como resultado de un sobrecalentamiento momentáneo (efecto fototérmico). También se han reportado daños en la estructura de las células microbianas como encogimiento de la membrana (efecto fotofísico) (Krishnamurthy, et al., 2010). Es posible que estos mecanismos coexistan y que la importancia relativa de cada uno dependa de la fluencia, es decir, la potencia de radiación total incidente, y del microorganismo blanco (Gómez-López, et al., 2007).

Por otra parte, se ha propuesto la utilización de ultrasonido de alta intensidad (US) en la preservación de alimentos. El efecto letal de US se atribuye al fenómeno de cavitación en el que las burbujas implodían generando altas temperaturas y presiones en el punto de colisión (Knorr, et al., 2004; Guerrero, et al., 2001 y 2005). El mecanismo de inactivación se debe principalmente al adelgazamiento de la pared, el calentamiento localizado y la producción de radicales libres por la sonólisis del agua (Piyasena, et al., 2003). La aplicación de US como único factor de preservación resulta inefectiva en la inactivación de esporas bacterianas y también requiere de largos tiempos de procesamiento para la inactivación de microorganismos. Sin embargo, se ha demostrado que la aplicación de US en una estrategia combinada con otras tecnologías tradicionales o emergentes resultó altamente efectiva para la inactivación de microorganismos patogénicos o deteriorativos (Guerrero, et al., 2001 y 2005; Ferrante, et al., 2007).

El objetivo de este trabajo consistió en: i) Evaluar y caracterizar el efecto individual de LP en sistema estanco (LP_e) en la inactivación de esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025, y células de *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 y *Escherichia coli* ATCC 35218 en jugos naturales de manzana y melón; ii) evaluar y caracterizar el efecto de LP en flujo continuo (LP_c) combinado o no con US (US+LP_c) en la inactivación de *Escherichia coli* en jugo de manzana; iii) analizar la aceptabilidad global del jugo de manzana tratado con US+LP_c.

Materiales y Métodos

Obtención de esporas y preparación de los inóculos

Los ensayos se llevaron a cabo utilizando esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025 y células de *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 y *Escherichia coli* ATCC 35218. Se preparó el inóculo inicial transfiriendo dos asadas de un cultivo fresco en estría a un erlenmeyer que contenía 20

ml de caldo Tripteína Soya (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) para *E. coli* o caldo Sabouraud (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) para levaduras. Los caldos se incubaron a 37 °C durante 18 h o 27 °C durante 24 h, respectivamente. Los inóculos se centrifugaron 5 min a 5000 rpm (Labnet, EE.UU) y fueron resuspendidos en agua peptonada 0,1 % p/v.

En el caso de las esporas de *A. acidoterrestris*, el inóculo se obtuvo transfiriendo una asada de cultivo fresco a un erlenmeyer que contenía 20 ml caldo BAM y posterior incubación a 43 °C por 24 h. La producción de esporas se llevó a cabo sembrando el inóculo en botellas con medio *A. acidoterrestris* e incubándolo una semana a 43 ± 1 °C. Las esporas fueron removidas según el protocolo de Silva y Gibbs (2001) y mantenidas a -18 ± 1 °C hasta su utilización.

Materia prima

Se utilizaron jugos naturales exprimidos de manzana (*Pyrus malus* L, var, Granny Smith; pH: 3,4 ± 0,2; 12,6 ± 0,1 °Brix; 45,7 ± 2,0 NTU; tamaño partícula: 712 nm) y melón (*Cucumis melo*, var. rocío de miel; pH: 5,9 ± 0,3; 10,6 ± 0,3 °Brix; 166,5 ± 7,0 NTU; tamaño partícula: 478630 nm). Las frutas adquiridas en el mercado local se sanitizaron y se exprimieron en el laboratorio en condiciones asépticas con un extractor de jugos de tipo hogareño (Bluesky, China). El jugo se filtró utilizando gasa estéril y se centrifugó durante 10 minutos a 1000 o 5000 rpm (Eppendorf, modelo 5804 R, Alemania) con el fin de disminuir la cantidad de pulpa. Todos los jugos fueron envasados al abrigo de la luz y almacenados a -18 °C hasta su posterior utilización.

Tratamientos de luz pulsada en modo estanco (LP_e) y continuo (LP_c)

Los tratamientos por luz pulsada (LP) se llevaron a cabo en un sistema RS-3000B Steripulse-XL (Xenon Corporation, Woburn, MA, EE.UU), que produce una radiación policromática en un rango de 200 a 1100 nm. El sistema consistió de un módulo controlador RC-747, una cámara de tratamiento que aloja una lámpara de xenón y un sistema de refrigeración anexo a dicha lámpara que evita el sobrecalentamiento durante la operación. El sistema generó pulsos de luz de alta intensidad con una velocidad de 3 pulsos de 360 µs de duración por segundo. Cada pulso entregó 1,27 J/cm² con una entrada de 3800 V a 1,9 cm de la lámpara.

Se añadieron 100 µL de inóculo a 4,9 ml de jugo dentro de una placa de Petri, alineada respecto a la lámpara y a una distancia de 10 cm de la misma, sumergida en hielo en escamas para evitar el aumento de temperatura. Se irradió entre 0 y 60 s (0 a 71,64 J/cm²).

Los tratamientos LP_c se realizaron en el equipo descrito para LP_e pero con algunas modificaciones. En cada experiencia se recircularon 250 ml de jugo a 155 ml/min, empleando una bomba peristáltica (CPX-400, Cole Parmer, Illinois, EE.UU.). El sistema diseñado para tal fin consistió en dos tubos de cuarzo transparentes a la luz (d.i. 0,001 m) localizados a 0,1 m de la lámpara (ubicados en la zona donde la dosis emitida por la lámpara es constante) y conectados en serie por mangueras flexibles autoclavables (Cole-Parmer, Masterflex, L/S 15, Illinois, EE.UU.) que descargaban a un vaso de 400 ml de capacidad. El vaso se colocó en un baño de hielo, mientras que los dos tubos de cuarzo (cada tubo con una longitud total de exposición a la LP de 0,20 m y cubiertos

con papel aluminio en las zonas de no exposición) estaban insertos en un sistema de enfriamiento constituido por una unidad de aluminio sellada por la cual circulaba un refrigerante (etilenglicol, calidad industrial) para evitar incrementos en la temperatura del sistema debido al tratamiento con LP. Para cada tratamiento, 250 ml de jugo inoculado y sometido o no al tratamiento ultrasónico, fue expuesto al tratamiento por LP_c (10 min, 0,15 J/cm²). Como control, se emplearon muestras inoculadas sin tratamiento LP_c.

Previo al uso del dispositivo de LP_c, la unidad fue completamente enjuagada con agua destilada estéril, mientras que una vez finalizados los tratamientos se realizaba un lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 5 %v/v durante 10 minutos y un posterior pasaje de agua destilada.

Las diferentes dosis de LP se obtuvieron alterando el número de pulsos aplicados (Gómez, et al., 2012). Las experiencias se llevaron a cabo por triplicado para cada condición ensayada. Las medidas de fluencia se realizaron con una cabeza piroeléctrica modelo ED500 (Gentec Electro-Optics, Québec, Canadá) conectada a un osciloscopio modelo TDS 2014 (Tektronix, Beaverton, EE.UU), con una apertura de cubierta de 20,3 cm². La temperatura se monitoreó durante la irradiación empleando una termocupla tipo T conectada a un registrador de datos Digi-Sense modelo 69202-30 (Barnant Company Division, Barrington, EE.UU).

Tratamiento de ultrasonido de alta intensidad

En el caso de la aplicación de US simple el tratamiento ultrasónico tuvo lugar en un recipiente de doble camisa de 600 ml de capacidad (diámetro interno 8 cm; altura 13 cm) conectado a un baño termostático (HAAKE, modelo Rotovisco, RV12, Alemania), para alcanzar una temperatura (T_{US}) de 25 ± 1 °C en el vaso. Se colocaron 245 ml de jugo de manzana en el vaso y se inició el proceso de sonicación. La temperatura del sistema aumentó debido a la cavitación, estabilizándose luego de aproximadamente 3 min para luego mantenerse constante a lo largo de toda la experiencia, gracias a la recirculación de agua del baño termostático. A continuación, se añadieron 5 ml del inóculo (~ 1x10⁷ UFC/ml). Debido al burbujeo generado por el proceso de cavitación, los sistemas siempre se mantuvieron agitados desde el comienzo de cada experiencia. Para los estudios cinéticos, 1 ml de muestra se tomaba a intervalos regulares de tiempo hasta los 30 min de tratamiento. La temperatura de las muestras se monitoreó continuamente mediante una termocupla anexada al equipo de US. Las experiencias se evaluaron por triplicado.

Determinación de microorganismos sobrevivientes

Luego de la aplicación de los tratamientos y previo a la siembra, las esporas de *A. acidoterrestis* fueron calentadas 10 min a 80 ± 1 °C, con el objetivo de estimular su germinación e inactivar los organismos vegetativos (Vercammen, et al., 2012). Las muestras irradiadas a intervalos de tiempo seleccionados fueron apropiadamente diluidas y sembradas mediante un plaqueador orbital (Autoplate 4000, Spiral Biotech, EE.UU) por duplicado en BAM e incubadas 72 h a 43 ± 1 °C. En el caso de *E. coli* y *S. cerevisiae* se sembraron en agar Tripteína Soya o agar Papa Dextrosa (Britania, Buenos Aires, Argentina) e

incubadas a 37 °C o 27 °C, respectivamente, durante 24 a 48 h. Las curvas de supervivencia se generaron a partir de los datos experimentales, graficando Log N/N₀ (donde N es el número de UFC/ml a un tiempo dado y N₀ el número inicial de UFC/ml) versus el tiempo de tratamiento.

Modelado matemático

Uno de los modelos para estudiar la cinética de inactivación de los diferentes microorganismos por LP fue el modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull (Peleg y Cole, 1998):

$$S(t) = \log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -b \cdot t^n \quad (1)$$

donde S es la fracción de supervivientes y b y n son los parámetros de escala y de forma, respectivamente. Los valores de b y n luego fueron usados para generar las curvas de frecuencia de resistencias utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{d\phi}{dt_c} = b \cdot n \cdot t_c^{n-1} \exp(-b \cdot t_c^n) \quad (2)$$

donde t_c es una medida de la resistencia o sensibilidad del microorganismo al tratamiento aplicado y es la distribución de tipo Weibull correspondiente a t_c. Asimismo, se calcularon otros parámetros estadísticos de la distribución (moda, media, varianza y coeficiente de sesgo) (Peleg y Cole, 1998).

Las curvas de inactivación fueron también ajustadas por el modelo bifásico propuesto por Cerf (1977):

$$\log_{10}(N) = \log_{10}(N_0) + \log_{10}(f * e^{-k_{max1} * t} + (1 - f) * e^{-k_{max2} * t}) \quad (3)$$

donde α es la proporción logarítmica entre la fracción de la subpoblación sensible f y la resistente (1-f) y k_{max1} y k_{max2} son las tasas de inactivación de las dos subpoblaciones, respectivamente.

Una versión de cuatro parámetros del modelo propuesto por Coroller et al. (2006), basado en dos distribuciones Weibullianas mixtas de resistencias bacterianas, fue también aplicada:

$$\log_{10}\left(\frac{N}{N_0}\right) = \frac{1}{1+10^\alpha} \left(10^{-\left(\frac{t}{\delta_1}\right)^p} + 10^{-\left(\frac{t}{\delta_2}\right)^p}\right) \quad (4)$$

donde p es el parámetro de forma, α es la proporción logarítmica entre la fracción sensible (f) y la resistente (1-f), δ₁ y δ₂ son los tiempos para la primera reducción decimal de la subpoblación 1 y la subpoblación 2, respectivamente.

Todos los parámetros del modelo se calcularon aplicando el procedimiento de regresión no lineal de Infostat 2009 (Infostat Group, FCA-UNC, Córdoba, Argentina).

La validación interna de los modelos matemáticos utilizados se realizó calculando y analizando los siguientes parámetros estadísticos: la raíz cuadrada de los cuadrados medios del error (RMSE) (Alzamora, et al., 2005a); el criterio de Akaike (AIC) (Akaike, 1973); el criterio Bayesiano Schwarz (BIC) (Quinn y Keough, 2002), y el coeficiente de determinación ajustado por los grados de libertad del modelo (R²_{aj}).

Análisis sensorial

Se realizó un test de campo con consumidores con el objetivo de evaluar la impresión global respecto de algunas caracte-

rísticas sensoriales del jugo de manzana exprimido. En la prueba de impresión global se empleó una escala hedónica de 9 puntos balanceada, con extremos que fueron desde “me disgusta extremadamente” a “me gusta extremadamente”. Se realizaron dos preguntas abiertas direccionadas acerca del gusto o disgusto del producto para su respuesta en una determinada secuencia, según el puntaje otorgado en la prueba de impresión global. Luego, en el mismo formulario, se incluyó la evaluación de atributos particulares en escalas cortas de aceptabilidad, punto justo y/o intensidad (sabor a manzana y dulzor), mediante escalas cortas de intensidad, con extremos de “sin sabor a manzana” a “sabor a manzana muy intenso” y de “no dulce” a “muy dulce”. El sabor ácido se evaluó por medio de una escala de punto justo de cinco puntos con el fin de determinar si este atributo se encontraba en adecuada intensidad. Se realizó un análisis de conglomerados (método de agrupamiento, promedio ponderado y distancia Euclídea) para vislumbrar la existencia de segmentación en la preferencia de los consumidores por el jugo de manzana procesado mediante US+LP_e. Se aplicó un Análisis de Componentes Principales (PCA) para ilustrar la relación entre los puntajes obtenidos en el test de impresión global con los correspondientes a la evaluación de los atributos del jugo. Se consideró un adecuado ajuste del análisis de conglomerados y del PCA con un valor de coeficiente CCC cercano a 1 (Lawless, 2013).

Resultados

Efectividad del tratamiento LP_e

La Figura 1 muestra el comportamiento de células de *S. cerevisiae* y *E. coli* y esporas de *A. acidoterrestis* en jugos de manzana y melón procesados mediante LP_e. En general, las curvas de inactivación presentaron una importante concavidad hacia arriba con un marcado descenso durante los primeros 10 s de procesamiento. En ningún caso se observó presencia de un hombro inicial. Solo la curva de inactivación correspondiente a *S. cerevisiae* en jugo de manzana presentó forma sigmoidea. La exposición a 60 s LP_e provocó 1,9, 5,2 y 6,2 reducciones logarítmicas de esporas de *A. acidoterrestis*, y células de *S. cerevisiae* y *E. coli*, respectivamente, en jugo de melón. En jugo de manzana, la efectividad del tratamiento fue menor dado que se obtuvo una reducción de ~1,0 ciclo log de las esporas y las levaduras y 2,1 ciclos log para *E. coli*. Con lo cual, este último microorganismo resultó ser el más sensible al tratamiento.

Los datos de las curvas de supervivencia fueron modelados aplicando los modelos de Weibull (Peleg y Cole, 1998), bifásico y de Coroller (Figura 1), cuyos parámetros se ilustran en la Tabla 1. Los modelos de Weibull y bifásico ajustaron adecuadamente los datos experimentales con valores del coeficiente de determinación, R^2_{aj} , en el rango de 89 -99% y 84-98 %, respectivamente. Por otra parte, el modelo de Coroller (R^2_{aj} 88-99 %) solo caracterizó adecuadamente las curvas de inactivación que presentaron forma sigmoidea.

Los valores de los parámetros b y n fueron utilizados para obtener las distribuciones de frecuencia de resistencias correspondientes a los distintos microorganismos estudiados (Figura 2). Todas las distribuciones carecieron de moda y resultaron sesgadas a la derecha, es decir, la mayor parte de

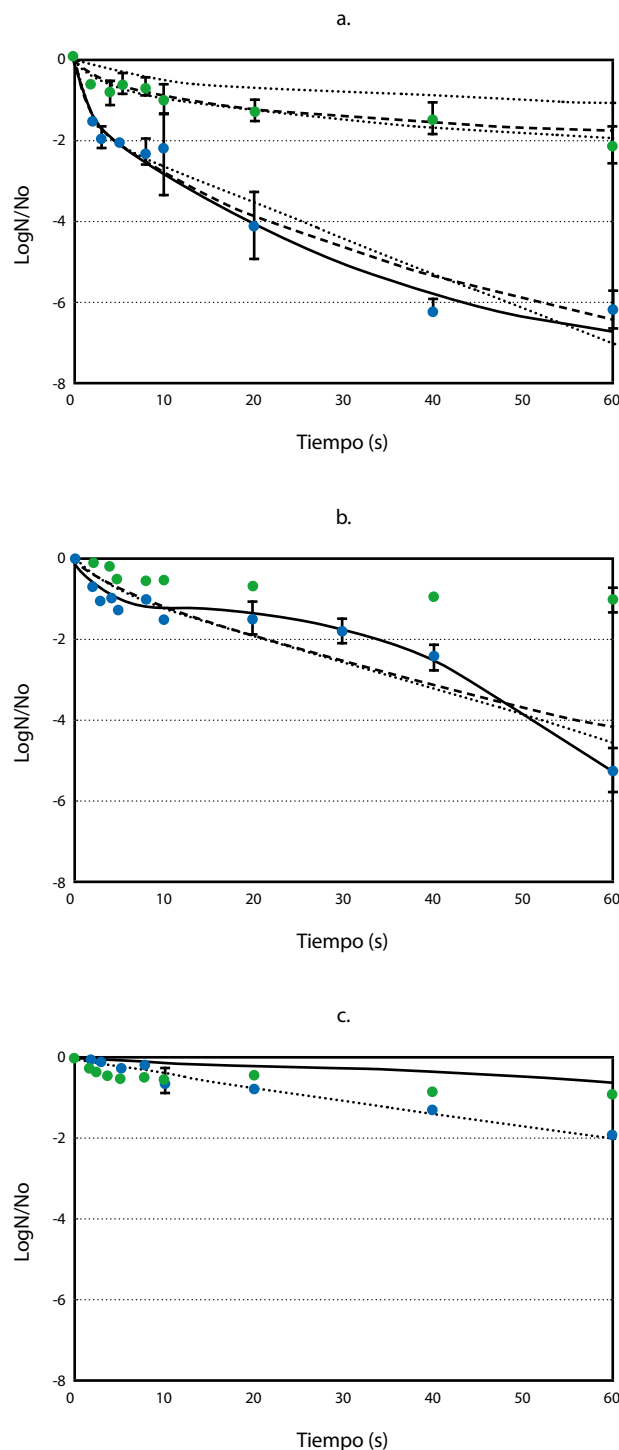


Figura 1. Curvas de supervivencia y ajuste por el modelo de Weibull (---), modelo bifásico (.....) y modelo de Coroller (—) de células de *E. coli* (a), *S. cerevisiae* (b) y esporas de *A. acidoterrestis* (c) inoculados en jugos de manzana (●) y melón (●) y tratados con LP_e. Valor experimental (punto); predicción (línea). Desvío estándar (I)

los microorganismos en la población fueron sensibles a los efectos de la LP_e a dosis muy bajas. El jugo de melón presentó menor valor de media y varianza respecto al jugo de manzana.

Jugo / Microorganismo		Weibull		Bifásico			Coroller			
		<i>b</i> (s ⁻ⁿ)	<i>n</i> (-)	<i>f</i> (-)	<i>kmax</i> ₁ (1/s)	<i>kmax</i> ₂ (1/s)	<i>α</i> (-)	<i>δ</i> ₁ (s)	<i>p</i> (-)	<i>δ</i> ₂ (s)
Manzana	<i>E. coli</i>	0,44*** (0,05)	0,37*** (0,04)	0,798*** (0,03)	1,5* (0,72)	0,05** (0,00)	1,34 ^{ns} (++)	9,55 ^{ns} (++)	0,37 ^{ns} (0,45)	9,55 ^{ns} (++)
	<i>S. cerevisiae</i>	0,17*** (0,04)	0,45*** (0,06)	0,765*** (0,07)	0,24*** (0,06)	0,02** (0,01)	0,48*** (0,09)	6,85*** (1,27)	1,51*** (0,41)	100,4*** (22,04)
Melón	<i>E. coli</i>	0,98*** (0,16)	0,47*** (0,05)	0,985*** (0,00)	1,99 ^{ns} (0,24)	0,19*** (0,05)	6,46 ^{ns} (++)	1,24** (0,45)	0,51*** (0,09)	193,89 ^{ns} (++)
	<i>S. cerevisiae</i>	0,23* (0,12)	0,71*** (0,14)	0,749*** (0,15)	2,92 ^{ns} (57,1)	0,15*** (0,14)	1,14*** (0,08)	2,17*** (0,23)	2,68*** (0,27)	35,60*** (1,91)
	<i>A. acidoterrestris</i>	0,06** (0,02)	0,86*** (0,08)	0,85** (0,21)	0,03** (0,01)	0,19 ^{ns} (0,35)	-0,23* (0,30)	11,94** (4,59)	2,64** (0,57)	82,13*** (9,07)

Tabla 1. Parámetros estimados correspondientes a los modelos de Weibull, bifásico y Coroller modificado representando las curvas de inactivación de células de *E. coli* y *S. cerevisiae*, y esporas de *A. acidoterrestris* en jugos tratados con LP_c durante 60 s. (valor) error estándar de cada parámetro, ^{ns} no significativo, *** significativo al 0,1%; ** significativo al 1%; * significativo al 5%, (++) error estándar mayor a 50.

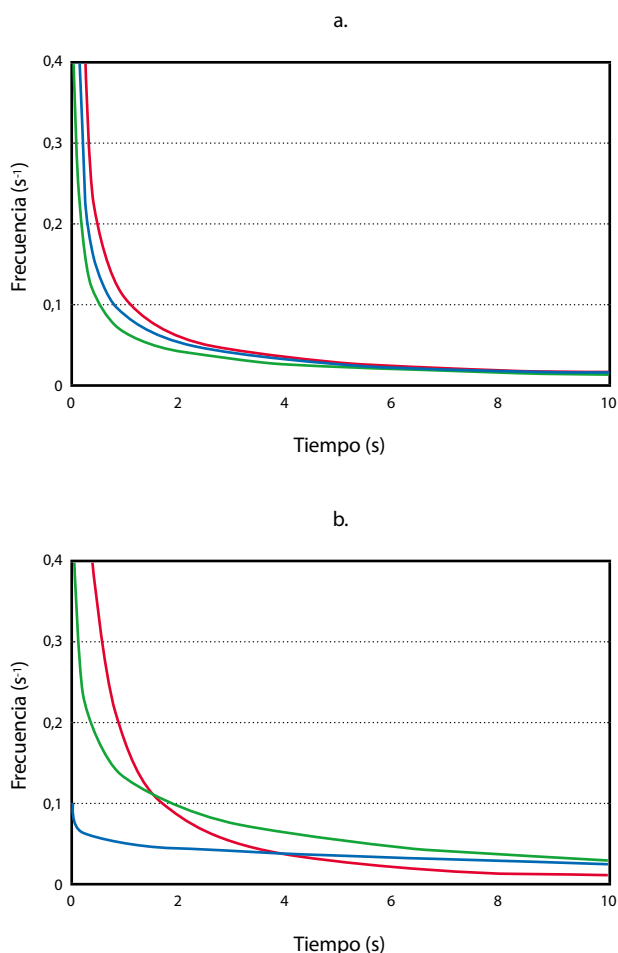


Figura 2. Distribuciones de frecuencia de resistencias correspondientes a las curvas de supervivencia de *E. coli* (—), *S. cerevisiae* (—) y esporas de *A. acidoterrestris* (—) en jugos naturales de manzana (a), y melón (b) tratadas con LP_c.

Efectividad de los tratamientos LP_c y US+LP_c en jugo de manzana

La curva de inactivación correspondiente a *E. coli* en jugo de manzana tratada con LP_c resultó lineal, alcanzando hacia el final del tratamiento 3,1 reducciones logarítmicas (Figura 3a). La aplicación de 30 min de US simple provocó una reducción de 2,7 ciclos logarítmicos de *E. coli* y de jugo de manzana, mientras que el tratamiento combinado US+LP_c provocó una reducción de 5,7 ciclos logarítmicos (Figura 3a). Por ende, la aplicación de US+LP_c mostró efecto aditivo, dado que la inactivación obtenida luego de la combinación de las tecnologías resultó ser la suma de los efectos aplicados de manera separada. La Figura 3b ilustra las distribuciones de frecuencia de resistencias correspondientes a *E. coli* inoculado en jugo de manzana y tratado por LP_c y US+LP_c. En ambos casos las distribuciones resultaron sesgadas a la derecha, con valores similares de media y varianza. En el caso del tratamiento combinado se halló presencia de moda.

Análisis sensorial

La aceptabilidad global de las muestras de jugo de manzana procesadas por US+LP_c presentaron un valor promedio de 6,1 en la escala hedónica de 9 puntos, correspondiente a la categoría de “me gusta algo”. Si bien el jugo de manzana procesado mediante US+LP_c recibió un bajo puntaje en el test de impresión global, cuando los consumidores se segmentaron de acuerdo a sus preferencias, se encontraron dos grupos: cluster 1 (C1), conformado por 22 consumidores, englobando las categorías 2 a 5 en la escala hedónica de 9 puntos, y el cluster 2 (C2), de 55 consumidores, incluyendo las categorías 6 a 9 (no se muestran los datos). El CCC obtenido resultó 0,84, lo cual indica un buen ajuste alcanzado con este análisis, según el criterio adoptado por Everitt et al. (2001). El cluster 2 mostró un fuerte interés en el producto, dado que la media de la impresión global para el producto fue de 7,0 puntos, correspondiente a la categoría “me gusta

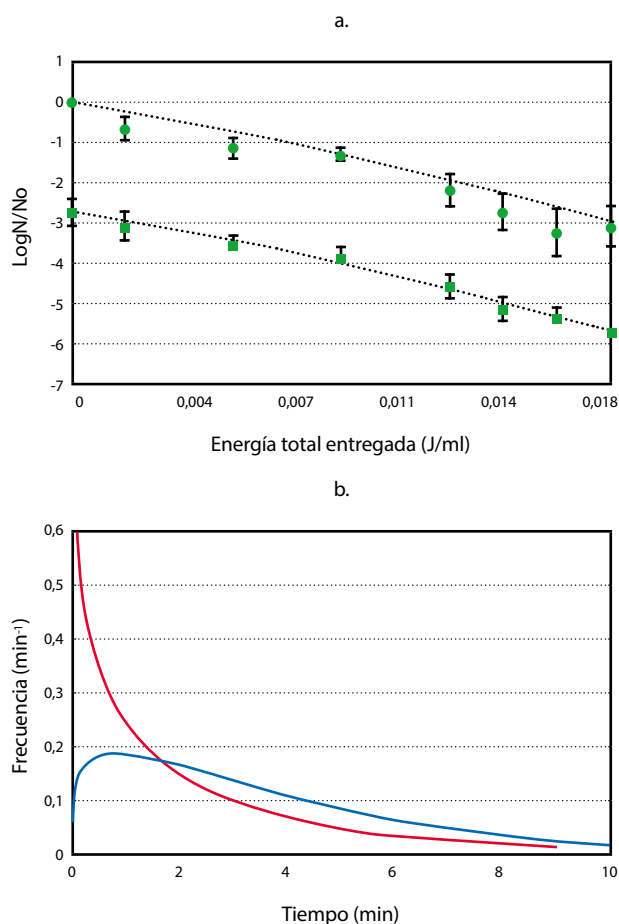


Figura 3. (a) Curvas de supervivencia y ajuste por el modelo de Weibull (-----) de *E. coli* en jugo de manzana y tratado con LP_c individual (●) o US+LP_c (■) Valor experimental (punto); predicción (línea). Desvío estándar (I). (b) Distribuciones de frecuencia de resistencias correspondientes a *E. coli* en jugo de manzana procesadas por LP_c (—) y US+LP_c (—).

moderadamente". Adicionalmente, se llevó a cabo un PCA para encontrar las relaciones entre los puntajes asignados en la escala hedónica y el porcentaje de los puntajes asignados en la escala de intensidad de sabor a manzana y de la acidez óptima del jugo de manzana natural procesado por US+LP_c (Figura 4). El CCC obtenido fue 1,0, el cual indica que se alcanzó una reducción adecuada con el análisis. Se retuvieron los dos primeros componentes principales (CP₁ y CP₂) que explicaron el 100% de la varianza. La CP₁ (Figura 4) explicó el 79,5% y se encontró asociada positivamente con la intensidad del sabor a manzana y negativamente con la acidez óptima; mientras que la CP₂ se asoció de manera positiva con ambas variables y explicó el 20,5% de la varianza. El análisis mostró que los bajos puntajes de la escala hedónica (2 a 5 puntos) estuvieron asociados a valores de acidez por encima de su punto justo y bajos valores de intensidad de sabor a manzana. Por otra parte, los altos valores asignados por los panelistas en la escala hedónica (6 a 9 puntos) estuvieron asociados con alta intensidad y valores de acidez más cercanos al óptimo. El C2 percibió significativamente la acidez más cerca del punto justo ($p < 0,0001$), exhibiendo una media de acidez de 3,6, mientras que el C1 mostró un promedio de 4,5 en la escala de punto justo.

Discusión

Las curvas de inactivación de *E. coli*, *S. cerevisiae* y esporas de *A. acidoterrestis* inoculados en jugos de manzana y melón y tratados por LP resultaron no lineales, en general con concavidad hacia arriba, a excepción de *S. cerevisiae* en jugo de manzana que resultó sigmoidea. En concordancia, numerosos estudios revelaron que las cinéticas de inactivación de diversos microorganismos inoculados en distintas matrices y tratados por LP resultaron no lineales. Se ha reportado una amplia diversidad respecto a la forma de las curvas de inactivación; en algunos casos se ha evidenciado la presencia de cola (Pataro, et al., 2011), forma sigmoidea (Izquier y Gómez-López, 2011; Lasagabaster y Martínez, 2014; Ferrario, et al., 2013b) o bifásica (Ferrario, et al., 2013b).

En este estudio se obtuvo una inactivación para *E. coli* de 1,0 reducciones log luego de 10 s (12 J/cm²) de exposición a LP en jugo de manzana natural exprimido. En particular, Sauer y Moraru (2009) obtuvieron una reducción en el rango de 2,5-2,7 ciclos log de *E. coli* ATCC 25922 y *E. O157:H7*, respectivamente, inoculados en jugo comercial clarificado y sidra de manzana tratados por LP en sistema estanco (13 J/cm²). La inactivación microbiana fue más efectiva en el jugo de melón en comparación con el jugo de manzana. Esto puede atribuirse a la menor absorptividad en el rango de 200 a 300 nm del jugo de melón (Ferrario, et al., 2013b), dado que la presencia de partículas que absorben en la región UV (lo cual se ve reflejado en el valor de absorptividad de los jugos) sería perjudicial para la eficiencia del proceso de desinfección, mientras que el tamaño de partícula y la turbidez no tuvieron un rol determinante en la efectividad del proceso. Asimismo, el pH tampoco sería un factor relevante en la efectividad del tratamiento, dado que el jugo menos ácido (jugo de melón) presentó la mayor tasa de inactivación. Estos resultados concuerdan con los reportados por Sauer y Moraru (2009), quienes observaron que el tratamiento por LP resultó más efectivo en una solución modelo de baja absorptancia en el rango UV y alto pH (pH: 7,4) que en jugo y sidra de manzana (pH: ~4).

A su vez, la efectividad del tratamiento varió según el microorganismo, siendo *E. coli* el más sensible. Anderson et al. (2000) también reportaron que *Escherichia coli* 12079 (serotipo O157:H7) resultó la cepa más sensible a LP al analizar un grupo de bacterias Gram- positivas y negativas. Sin embargo, Gómez-López et al. (2007) no encontraron un patrón de sensibilidad a LP al estudiar una amplia variedad de microorganismos.

El modelo de Weibull ajustó adecuadamente las curvas de inactivación, especialmente las de jugo de melón correspondientes a *E. coli* y a *A. acidoterrestis*. Sin embargo, los altos valores de varianza obtenidos (Tabla 2), incluso en el jugo de melón, sugieren que el modelo no ofreció un óptimo ajuste y/o la heterogeneidad de la respuesta (evidenciada en la presencia de colas en la distribución) fue alta.

El modelo bifásico, si bien no caracterizó adecuadamente todas las curvas de inactivación, brindó el mejor ajuste y resultó el más parsimonioso al obtener los menores valores de RMSE, AIC y BIC (Tabla 3), en el caso de las curvas de inactivación correspondientes a jugo de manzana. De los parámetros obtenidos se desprende nuevamente que el tratamiento por LP_c fue más efectivo en el jugo de melón, dado que presentó mayores valores de f , k_{max1} y k_{max2} (Tabla 1), que *E. coli* fue el microorganismo más sensible al tratamiento. Según este modelo, las curvas de supervivencia corres-

Tratamiento		Moda (s)	Media (s)	Varianza (s ²)	Coefficiente de Sesgo (-)
Jugo de manzana	<i>E. coli</i>	(-)	38,5	+++	13,4
	<i>S. cerevisiae</i>	(-)	127,2	+++	7,8
Jugo de melón	<i>E. coli</i>	(-)	2,3	33	7,1
	<i>S. cerevisiae</i>	(-)	9,9	203	3,2
	<i>A. acidoterrestris</i>	(-)	28,5	+++	2,5

Tabla 2. Estadísticos asociados al modelo de Weibull^{a,b} correspondientes a las curvas de inactivación de células de *E. coli*, *S. cerevisiae* y esporas de *A. acidoterrestris* en jugos frutales tratados 60 s LP_c. ^a Estadísticos del modelo de Weibull, t_c media de la distribución, σ^2_{tc} varianza, v_1 coeficiente de sesgo. ^b +++ Valor del estadístico mayor que 1000.

Jugo / Microorganismo		RMSE			AIC			BIC		
		Weibull	Coroller	Bifásico	Weibull	Coroller	Bifásico	Weibull	Coroller	Bifásico
Melón	<i>E. coli</i>	0,45	0,44	0,60	-16,74	-6,39	2,67	-15,94	-5,17	3,26
	<i>S. cerevisiae</i>	0,60	0,16	0,51	-2,39	-27,27	-4,12	-1,6	-25,68	-2,93
	<i>A. acidoterrestris</i>	0,10	0,14	0,10	-10,92	-8,40	-9,35	-10,01	-6,89	-8,14
Manzana	<i>E. coli</i>	0,13	0,15	0,10	-31,49	-24,47	-34,15	-30,88	-23,26	-33,25
	<i>S. cerevisiae</i>	0,11	0,08	0,08	-35,32	-38,08	-39,88	-34,72	-36,87	-39,98

Tabla 3. Valores de los índices de ajuste RSME, AIC y BIC^a para las curvas de inactivación de los microorganismos ensayados en los jugos frutales tratados con LP_c.

pondientes a *E. coli* y *S. cerevisiae* en los jugos evaluados presentaron una tasa de inactivación muy pronunciada en los primeros 10 s de tratamiento, seguido por una segunda porción de la curva con menor tasa de inactivación que indica que el proceso se hace menos efectivo con el tiempo de procesamiento. En el caso de las *A. acidoterrestris*, se observa un primer período con una baja tasa de inactivación seguido de una segunda fase de mayor tasa de inactivación (Tabla 1), lo que indicaría en este caso que el proceso se vuelve más efectivo con el tiempo de exposición.

El modelo de Coroller fue el que representó mejor la curva sigmoidea correspondiente a *S. cerevisiae* inoculada en jugo en melón, con valores de AIC y BIC mucho menores respecto a los otros modelos. Es probable que en los restantes casos los criterios de AIC y BIC hayan penalizado el alto número de parámetros del modelo en el balance entre el ajuste y la parsimonia.

El análisis de los criterios de AIC y BIC determinaron que, en general, los modelos de Weibull y bifásico implicaron mejor ajuste, menor número de parámetros, o ambos.

La combinación US y LP_c resultó aditiva en la inactivación de *E. coli* en jugo de manzana. En conformidad con estos resultados, Muñoz et al. (2012a) reportaron efecto aditivo en la inactivación de *Listeria innocua* en solución buffer (pH 4,0) tratada por LP (42,5 J/ml) combinada con termosonicación (TS, 500 W, 20 KHz, 48-50 °C, 100 J/ml) en sistema continuo. De la misma manera, Muñoz et al. (2011 y 2012b) estudiaron la combinación entre PL (35 °C,

4,03-5,10 J/cm²) y TS (24 KHz, 400 W, 14 ml/min, 40 °C o 8 ml/min, 53 °C) en la inactivación de *E. coli* en jugos de naranja y manzana en un sistema de flujo continuo y observaron que los tratamientos combinados presentaron efecto aditivo, alcanzando hasta ~5,0 y 3,2 reducciones log en jugos de manzana y naranja, respectivamente.

Es importante destacar que el tratamiento por LP_c fue más efectivo en la inactivación que LP_c, dado que se lograron 3,1 reducciones logarítmicas al utilizar la dosis máxima de 0,73 J/cm² de LP_c en jugo de manzana, mientras que solo se obtuvo una reducción de 0,63 ciclos logarítmicos luego de la exposición a la dosis más baja de LP_c analizada (2,4 J/cm²) (Figuras 1 y 3).

El análisis de conglomerados permitió discriminar un grupo de consumidores interesados en el fuerte sabor a manzana y en la acidez del jugo de manzana procesado por el tratamiento combinado.

Conclusiones

Este estudio demostró que se obtuvieron importantes reducciones de algunos microorganismos de relevancia en jugos de manzana y melón en tiempos muy cortos (60 s) de tratamiento con LP en modalidad estanco. La inactivación mediante LP_c dependió fuertemente del tipo de jugo empleado y del microorganismo, y el tratamiento fue más efectivo en el jugo de melón. Los modelos de Weibull y bifásico ajustaron ade-

cuadramente las curvas de inactivación de LP_e, mientras que el modelo de Coroller presentó sobreparametrización en la mayoría de los casos, a excepción de las curvas de inactivación que resultaron sigmoideas. Los parámetros obtenidos explicaron, desde distintos puntos de vista, la influencia de esta tecnología en la inactivación microbiana.

La combinación de LP_e con US en jugo de manzana resultó aditiva y alcanzó más de los 5 ciclos logarítmicos de reducción requeridos para *E. coli*. La segmentación de consumidores a través del análisis de conglomerados permitió discriminar un grupo de consumidores que presentó un fuerte interés en el jugo de manzana procesado por ultrasonido y luz pulsada en sistema continuo, quienes valoraron positivamente el intenso sabor a manzana y la acidez del producto.

Referencias

- Anderson, J.G., Rowan, N.J., MacGregor, S.J., Fouracre, R.A., y Farish, O., 2000. Inactivation of food-borne enteropathogenic bacteria and spoilage fungi using pulsed-light. En: *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28, pp.83-88.
- Akaike, H., 1973. Proceedings of the 2nd International Symposium of Information. En: B.N. Petrov, y F. Cza'ki (Eds.). En: *Information theory and extension of the maximum likelihood principle*. Akademiai Kiado: Budapest, pp.267-281.
- Alzamora, S.M., Guerrero, S., Viollaz, P., y Welti, J., 2005. Novel food processing. En: Barbosa-Cánovas G. (Ed.). *Experimental protocols for modeling the response of microbial populations exposed to emerging technologies: Some points of concern*. Nueva York, Marcel Dekker, Inc., pp.591-607.
- Alzamora, S.M., Guerrero, S., Schenk, S., Raffellini, S. y López-Malo, A., 2011. Inactivation of microorganisms. En: Feng H., Barbosa-Canovas G., Weiss J., (Eds.). *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Nueva York, Springer, pp.321-343.
- Bahçeci, K., Gökmen, V., Acar, J., 2005. Formation of guaiacol from vanillin by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice: a model study. En: *European Food Research and Technology*, 220, pp.196-199.
- Cerf, O., 1977. Tailing of survival curves of bacterial spores. En: *Journal of Applied Microbiology*, 42, pp.1-19.
- Coroller, L., Leguerinel, I., Mettler, E., Savy, N., y Mafart, P., 2006. General model, based on a two mixed Weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves. En: *Applied and Environmental Microbiology*, 72, pp.6493-6502.
- Everitt, B.S., Landau, S., y Leese, M., 2001. Cluster analysis. , Oxford, John Wiley & Sons.
- Ferrante, S., Guerrero, S., y Alzamora, S.M., 2007. Combined use of ultrasound and natural antimicrobials to inactivate *L. monocytogenes* in orange juice. En: *Journal of Food Protection*, 70, pp.1850-1857.
- Ferrario, M., Guerrero, S., y Alzamora, S.M. (2013a). Study of pulsed light-induced damage on *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice by flow cytometry and transmission electron microscopy. En: *Food and Bioprocess Technology*, 7, pp.1001-1011.
- Ferrario, M., Alzamora, S.M., y Guerrero, S., 2013b. Inactivation kinetics of some microorganisms in apple, melon, orange and strawberry juices by high intensity light pulses. En: *Journal of Food Engineering*, 118, pp.302-311.
- Gómez, P., Salvatori, D., García Loredo, A., Alzamora, S.M., 2012. Pulsed light treatment of cut apple: dose effect on color, structure and microbiological stability, En: *Food and Bioprocess Technology*, 5, pp.2311-2322.
- Gómez-López, V., Ragaert, P., Debevere, J., y Devlieghere, F., 2007. Pulsed light for food decontamination: a review. En: *Trends in Food Science and Technology*, 18, pp.464-473.
- Guerrero, S., López-Malo, A., Alzamora, S.M., 2001. Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. En: *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2, pp.31-39.
- Guerrero, S., Tognon, M., Alzamora, S.M., 2005. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan. En: *Food Control*, 16, pp.131-139.
- Hierro, E., Barroso, E., De la Hoz, L., Ordóñez, J. Manzano, S. y Fernández, M., 2011. Efficacy of pulsed light for shelf-life extension and inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat cooked meat products. En: *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, pp.275-281.
- Izquier, A., y Gómez-López, V., 2011. Modeling the pulsed light inactivation of microorganisms naturally occurring on vegetable substrates. En: *Food Microbiology*, 28, pp.1170-1174.
- Jun, S., Irudayaraj, J., Demirci, A., y Geiser, D., 2003. Pulsed UV light treatment of corn meal for inactivation of *Aspergillus niger* spores. En: *International Journal of Food Science and Technology*, 38, pp.883-888.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D., 2004. Applications and potential of ultrasonics in food processing. En: *Trends in Food Science and Technology*, 15, pp.261-266.
- Krishnamurthy, K., Tewari, J., Irudayaraj, J., y Demirci, A., 2010. Microscopic and spectroscopic evaluation of inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed light and infrared heating. En: *Food and Bioprocess Technology*, 3, pp.93-104.
- Krishnamurthy, K., Demirci, A. y Irudayaraj, J., 2008. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in milk using flow-through pulsed UV-light treatment system. En: *Food Microbiology and Safety*, 72, pp.233-239.
- Lasagabaster, A. y Martínez, I., 2014. Survival and growth of *Listeria innocua* treated by pulsed light technology: impact of posttreatment temperature and illumination. En: *Food Microbiology*, 41, pp.76-81.
- Lawless, H., 2013. Segmentation. En: H. Lawless, (Ed.), *Quantitative sensory analysis. Psychophysics, models and intelligent design*. Oxford, Wiley Blackwell, pp.323-338.
- Martínez, A., Díaz, R.V., y Tapia, M.S., 2000. Microbial ecology of spoilage and pathogenic flora associated to fruits and vegetables, En: Alzamora, S.M., Tapia, M., López-Malo, A. (Eds.), *Minimally processed fruits and vegetables. Fundamental aspects and applications*. Gaithersburg, Aspen publishers Inc., pp.43-62.
- Muñoz, A., Palgan, I., Noci, F., Morgan, D., Cronin, D., Whyte, P. y Lyng, J., 2011. Combinations of high intensity light pulses and thermosonication for the inactivation of *Escherichia coli* in orange juice. En: *Food Microbiology*, 28, pp.1200-1204.
- Muñoz, A., Palgan, I., Noci, F., Cronin, D.A., Morgan, D.J., Whyte, P. y Lyng, J., 2012a. Combinations of selected non-thermal technologies and antimicrobials for microbial inactivation in a buffer system. En: *Food Research International*, 47, pp.100-105.

- Muñoz, A., Caminiti, I., Palgan, I., Pataro, G., Noci, F., Morgan, D., Cronin, D., Whyte, P., Ferrari, G. y Lyng, J., 2012b. Effects on *Escherichia coli* inactivation and quality attributes in apple juice treated by combinations of pulsed light and thermosonication. En: *Food Research International*, 45, pp.299-305.
- Pataro, G., Muñoz, A., Palgan, I., Noci, F., Ferrari, G. y Lyng, J.G., 2011. Bacterial inactivation in fruit juices using a continuous flow pulsed light (PL) system. En: *Food Research International*, 44, pp.1642-1648.
- Peleg, M. y Cole, M. B., 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. En: *Critical Reviews in Food Science*, 38, pp.353-380.
- Piyasena, P., Mohareb, E. y McKellar, R., 2003. Inactivation of microbes using ultrasound. A review. En: *International Journal of Food Microbiology*, 87, pp.207-216.
- Quinn, G. y Keough, M., 2002. Generalized linear models and logistic Regression. En: Quinn G. y Keough M., M. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge, Cambridge University Press, pp.359-380.
- Sauer, A. y Moraru, C., 2009. Inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice and apple cider using pulsed light treatment. En: *Journal of Food Protection*, 72, pp.937-944.
- Silva, F., Gibbs, P., 2001. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. En: *Trends in Food Science and Technology*, 12, pp.68-74.
- Smit, Y., Cameron, M., Venter, P., Witthuhn, R., 2010. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation- A review. En: *Food Microbiology*, 28, pp.331-349.
- Stratford, M., Hofman, P., Cole, M., 2000. Fruit juices, fruit drinks, and soft drinks, En: Lund, B.M., Baird Parker, T.C., Gould, G.W. (Eds.). *Microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg, Aspen Publishers Inc., pp.836-850.
- Vercammen, A., Vijijs, B., Lurquin, I., Michiels, C., 2012. Germination and inactivation of *Bacillus coagulans* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high hydrostatic pressure treatment in buffer and tomato sauce. En: *International Journal of Food Microbiology*, 152, pp.162-167.
- Wekhof, A., 2000. Desinfection with flash lamps. En: *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 54, pp.264-275.

Péptidos antioxidantes derivados de la digestión gastrointestinal de proteínas de amaranto: Una primera aproximación a la evaluación de su absorción intestinal y posterior actividad

Antioxidant peptides from gastrointestinal digestion of amaranth proteins: A first approach to the evaluation of the intestinal absorption and subsequent activity

Orsini Delgado (1), María C., Añón, María C. (1), Tironi, Valeria A. (1)

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) (CCT La Plata - CONICET, UNLP).

Contacto: vtironi@quimica.unlp.edu.ar

RECIBIDO: 29/2/2016 – APROBADO: 15/6/2016

Resumen

Se evaluó la absorción intestinal de péptidos antioxidantes generados por digestión gastrointestinal simulada de proteínas de *Amaranthus mantegazzianus*. Digeridos gastrointestinales de aislado proteico (AD) y de hidrolizado con alcalasa (HD) fueron separados mediante FPLC de exclusión molecular en fracciones cuya actividad fue evaluada por los métodos ORAC y HORAC. Las fracciones más activas (0,7-1,8 kDa) fueron sometidas a ensayos de simulación de la absorción intestinal utilizando monocapas de células Caco-2/TC7 sobre insertos de poliéster (0,4 μm), colocando las muestras en la cámara apical (incubación 3 h, 37 °C). Se analizó la concentración peptídica (método de Lowry), composición molecular (RP-HPLC) y actividad antioxidante (método ORAC) de las muestras iniciales, cámaras apical y basolateral. Ciertos péptidos fueron capaces de atravesar la monocapa celular, previa modificación en algunos casos. El potencial antioxidante de todas las cámaras apicales aumentó debido probablemente a la acción de las peptidasas del borde en cepillo. Las cámaras basolaterales presentaron aumento o disminución del potencial antioxidante respecto a las cámaras apicales, dependiendo del tipo de moléculas que atravesó en cada caso la monocapa celular. Los resultados sugieren una absorción intestinal potencial de componentes peptídicos antioxidantes de amaranto posibilitando su acción en tejidos blanco internos del organismo.

Palabras clave: Amaranto, péptidos antioxidantes, digestión gastrointestinal, absorción intestinal.

Abstract

Intestinal absorption of antioxidant peptides from simulated gastrointestinal digestion of *Amaranthus mantegazzianus* proteins was evaluated. Gastrointestinal digests (AD and HD) were obtained from protein isolate (A) and its alcalase hydrolysate (H) and separated by molecular exclusion FPLC into fractions which activity was evaluated by the ORAC and HORAC methods. Active fractions (0,7-1,8 kDa) were submitted to intestinal absorption simulation using monolayers of Caco-2/TC7 cells on polyester inserts (0,4 μm). Samples were seeded in the apical compartment (incubation 3 h, 37 °C). Original, apical and basolateral samples were analysed for peptide concentration (Lowry method), molecular composition (RP-HPLC) and antioxidant activity (ORAC method). Some peptides were able to cross the cell monolayer, with previous modifications in some cases. The antioxidant potential of the apical compartments increased in all cases due probably to the action of the brush border peptidasas. Basolateral compartments presented increments or reductions of the antioxidant potentials respect to the apical ones, depending on which molecules crossed the monolayer in each case. Results suggest a potential intestinal absorption of amaranth antioxidant peptides which would be able to act inside the organism.

Keywords: Amaranth, antioxidant peptides, gastrointestinal digestion, intestinal absorption.

Introducción

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio indican que la digestión gastrointestinal simulada de las proteínas de amaranto genera péptidos con una interesante actividad antioxidante (Orsini Delgado, et al., 2011; Orsini Delgado, et al., 2015). Sin embargo, para poder ejercer su actividad *in vivo* en sistemas u órganos internos del organismo estos compuestos deben ser absorbidos a través del epitelio intestinal.

Los componentes de origen proteico que entran en contacto con el lumen intestinal son escindidos por diversas peptidasas celulares, generando desde aminoácidos libres hasta tripéptidos, los cuales pueden ser absorbidos de manera intacta hacia el citosol (Vermeirssen, et al., 2004). Sin embargo, ocurre con baja frecuencia que péptidos o hasta proteínas intactas puedan atravesar el lumen intestinal y llegar a la circulación sanguínea sin sufrir ninguna modificación. La absorción de péptidos puede ocurrir a través de diversos mecanismos tales como: 1) Transporte activo secundario con sodio; 2) transporte paracelular en el que péptidos hidrofílicos pueden ser absorbidos por medio de la unión de dos células contiguas; 3) transportador Pep-T1 localizado en la membrana apical (di y tripéptidos), y 4) difusión transcelular de péptidos hidrofóbicos. En el interior de los enterocitos, los péptidos pueden ser hidrolizados por peptidasas intracelulares. La membrana basolateral intestinal también posee un transportador que facilita la salida de pequeños péptidos resistentes a la hidrólisis (Vermeirssen, et al., 2004). Si bien existe una relación entre las características fisicoquímicas y el posible mecanismo de absorción, no se puede predecir el comportamiento de un péptido en particular. A fin de poder evitar la utilización de ensayos *in vivo* para el estudio de la absorción, los cuales demandan un elevado número de animales, grandes cantidades de la muestra en estudio, mucho tiempo y análisis complejos, además de ser muy costosos, se recurre a la evaluación *in vitro* de la permeabilidad intestinal mediante la utilización de tejido intestinal o de cultivos celulares. Frente a los ensayos con tejidos animales o ensayos *in vivo*, la utilización de cultivos celulares tiene como principal desventaja que estos provienen de sistemas cancerígenos en la mayoría de los casos y, por lo tanto, retienen ciertas características de estos sistemas (e.g. estas células pueden ser cultivadas *in vitro* y es posible realizar varios pasajes). No obstante, estos cultivos celulares imitan muchas de las propiedades metabólicas y de transporte de los sistemas intestinales. Si bien pueden presentar variaciones en la expresión de transportadores o actividades enzimáticas entre los distintos pasajes, este modelo de estudio cuenta con varias ventajas que justifican su utilización, entre ellas: fácil manipulación, posibilidad de crecimiento sobre soportes porosos, requerimiento de poca cantidad de muestra, facilidad en el control de aquellas condiciones que pueden afectar el transporte (pH, concentración de iones, temperatura, presencia de inhibidores metabólicos, etcétera). Dentro de las líneas más utilizadas se encuentran la Caco-2 proveniente de carcinoma de colon humano, debido a su capacidad de diferenciación, formación de microvellosidades, uniones ocluyentes, enzimas hidrolíticas y sistemas de transporte mediados por transportadores para azúcares, aminoácidos y otras drogas (Antunes, et al., 2013). En las últimas décadas, diversos estudios han demostrado la capacidad de ciertos péptidos de atravesar la barrera intestinal. Como ejemplos, pueden mencionarse el fragmento 193-209 de β -caseína (17 aminoácidos, 1881 Da, hidrofóbico, con

alto contenido de prolina) absorbido mediante la ruta transcelular (Regazzo, et al., 2010), o un pentapéptido derivado de β -caseína que demostró ser absorbido mediante la ruta paracelular (Quiros, et al., 2008).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad potencial de péptidos antioxidantes obtenidos por digestión gastrointestinal simulada de proteínas de amaranto de atravesar una pared intestinal simulada.

Materiales y Métodos

I. Obtención de aislado e hidrolizado proteico de *Amaranthus mantegazzianus*

I.a. Aislado (A). Se utilizaron semillas de cultivos realizados en la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa, Argentina. Se preparó harina moliendo las semillas (aproximadamente 1 kg) en un molino Udy (malla de 1 mm) y tamizando (cedazo de 0,092 mm de malla). La harina fue desgrasada con n-hexano (10 g de harina/100 ml de n-hexano, agitación 5 h a temperatura ambiente de aproximadamente 20 °C, reposo 24 h y filtración). A fue preparado por extracción de las proteínas a partir de una suspensión de harina en agua bidestilada (10 g/100 ml) a pH = 9, precipitación isoelectrica a pH = 5, neutralización y liofilización (Martinez y Añón, 1996).

I.b. Hidrolizado proteico con alcalasa (H). Se preparó una suspensión (1 g A/100 ml de NaOH 1 mM, pH = 10) y se incubó en agitación (1 h, 37 °C) manteniendo el pH constante. Se adicionó alcalasa ($\geq 2,4$ U/g, Anson Units (Sigma), 8 μ l/100 mg de muestra) incubando durante 4 h a 37 °C. Se detuvo la reacción enzimática (85 °C, 10 min) y se liofilizó la suspensión (Tironi y Añón, 2010).

II. Simulación de la digestión gastrointestinal

A y H fueron sometidos a una fase de digestión estomacal: solución de pepsina (Pepsina 1:15000 MP Biomedicals, Inc.) (Pe) en HCl 0,1 N y NaCl 0,03 M (pH = 2), relación Pe/proteína = 1/10 p/p, 60 min, 37 °C; luego de neutralizar a pH = 6 con NaOH, se continuó con una fase intestinal: solución de pancreatina (Pancreatina Porcina 4X-USP MP Biomedicals, Inc.) (Pa) en NaHCO₃ 0,1 N (pH = 6), relación Pe/proteína = 1/10 p/p, 60 min, 37 °C. Se detuvo la actividad enzimática (85 °C, 10 min) y las suspensiones fueron liofilizadas (Orsini Delgado, et al., 2011), obteniéndose los digeridos AD y HD.

III. Separación de fracciones por cromatografía FPLC de filtración en gel

Fracciones solubles en tampón fosfato 35 mM (pH = 7,8) de AD y HD fueron separadas mediante FPLC utilizando una columna de exclusión molecular Superdex 30 prep grade (GE Healthcare, rango de separación óptimo < 10 kDa), en un equipo AKTA Purifier (GE Healthcare Bioscience AB) a temperatura ambiente, empleando como fase móvil el tampón de solubilización de las muestras. La columna utilizada presentaba un volumen total (V_t) de 118 ml, el volumen de inyección fue de 2 ml y el flujo de 0,8 ml/min. La calibración previa de la columna se realizó utilizando azul dextrano para el volumen de exclusión (V_0 = 40,75 ml), ribonucleasa A (13,7 kDa), aptrotina (6,5 kDa),

vitamina B₁₂ (1,35 kDa) y tirosina (181,2 Da). Los polipéptidos y péptidos fueron detectados midiendo la absorbancia a 210 nm. Se colectaron fracciones cada 2 min a partir del V₀ y se obtuvo un total de 51 fracciones de 1,6 ml cada una.

IV. Determinación de la actividad antioxidante de las fracciones

Dada la alta cantidad de fracciones colectadas de cada una de las muestras, en una primera instancia se realizó un *screening* de la actividad antioxidante sobre muestras constituidas por tres fracciones FPLC consecutivas. En una segunda instancia se analizó la actividad de aquellas fracciones individuales originales que constituían las muestras con mayor actividad en el primer *screening*. Se utilizaron dos metodologías:

IV.a. Ensayo ORAC. Se realizó el protocolo previamente optimizado en nuestro laboratorio (Orsini Delgado, et al., 2015). Brevemente, se mezclaron 150 µl de la solución de fluoresceína 53,3 nM con 25 µl de muestra, tampón fosfato (control negativo) o Trolox (concentraciones entre 6,25 y 75 µM) y 25 µl de AAPH 160 mM en placas negras de 96 pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C con agitación continua y se realizaron lecturas de fluorescencia (λ_{exc} : 485 nm, λ_{em} : 535 nm) cada 1 min durante 45 min en un lector de microplacas (SYNERGY HT – SIAFRT, Biotek Instruments, Vermont, Estados Unidos). Se calculó el área bajo la curva (AUC) y el porcentaje de secuestro de los radicales peroxilo (ROO•) obteniéndose el valor Trolox equivalente (µM) a partir de la curva de calibración de Trolox.

IV. b. Ensayo HORAC. Se midió la capacidad de prevenir la formación de radicales hidroxilo sobre las mismas fracciones seleccionadas para el ensayo ORAC. Se utilizó el protocolo previamente optimizado (Orsini Degado, et al., 2015): se mezclaron 20 µl de las muestras o del tampón (control negativo) con 190 µl de la solución de fluoresceína 0,0603 µM, 15 µl de H₂O₂, 0,75 M y 75 µl de la solución de Co⁺² (10 mg de ácido picolínico con 11 mg de CoCl₂·6H₂O en 50 ml de agua bidestilada) en placas negras de 96 pocillos, se incubó con agitación durante 3 h en un lector de microplacas (SYNERGY HT–SIAFRT, Biotek) realizando medidas de fluorescencia (λ_{exc} : 485 nm, λ_{em} : 535 nm) cada 1 min. Se calculó el área bajo la curva (AUC) y el porcentaje de inhibición de la formación de radicales hidroxilo. Como compuesto de referencia se utilizó el ácido clorogénico en concentraciones entre 0,05 y 0,5 mg/ml. Se calculó el valor de ácido clorogénico equivalente (mg/ml) para cada una de las muestras.

V. Simulación de la absorción intestinal

Para la realización de estos ensayos se utilizaron cultivos de células Caco-2/TC7, clon de la línea Caco-2 proveniente de un carcinoma de colon humano, las cuales expresan varias enzimas intestinales y transportadores, incluyendo el transportador de péptidos Pep-T1, y permiten el transporte paracelular (Hidalgo, et al., 1989).

V.1. Ensayos de citotoxicidad

V.1.a. Ensayo del Rojo Neutro. Se sembraron 2,5 x 10⁴ células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron hasta confluencia. Se lavó dos veces con PBS y se adicionaron las muestras a estudiar, las cuales se encontraban solubilizadas en medio DMEM de adhesión. Se incubó durante 3 h a

37 °C con un 5% de CO₂. Se lavó con PBS, se agregó medio conteniendo 100 µg/ml de rojo neutro y se incubaron las células durante 2 h. Se descartó el medio con rojo neutro y se lavó 2 veces con PBS a 37 °C, para remover todo el colorante que no había sido incorporado por las células. Se fijaron las células con una solución al 5% de formaldehído, se incubó 5 min a temperatura ambiente, se lavó dos veces con PBS y se solubilizó el colorante con DMSO, dejando reposar 20 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 540 nm del sobrenadante en un lector de microplacas (SYNERGY HT–SIAFRT, Biotek). Se graficó% de viabilidad celular en función de la concentración de muestra, asumiendo un 100% de viabilidad para aquellas células en las que no se había adicionado muestra (control de viabilidad +) (Di Virgilio, et al., 2010).

V.1.b. Ensayo del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Se sembraron 2,5 x 10⁴ células/pocillo en placas de 96 pocillos, incubándolas a 37 °C (5% de CO₂) hasta llegar a confluencia. Se adicionaron las muestras y se incubó 3 h (37 °C, 5% de CO₂). Se lavó con PBS y se adicionó medio DMEM (sin color) conteniendo 0,5 mg/ml de MTT, incubando 3 h. Se lavó dos veces con PBS y se extrajo el colorante captado por las mitocondrias adicionando 100 µl/pocillo de DMSO e incubando 10 min en agitación. Se midió la absorbancia a 570 nm del sobrenadante en un lector de microplacas (SYNERGY HT–SIAFRT, Biotek). La viabilidad celular se graficó como un% del control, asumiendo un 100% de viabilidad para aquellas células a las que no se les adicionó ninguna muestra (Di Virgilio, et al., 2010).

V.2. Ensayo de absorción sobre monocapas de células Caco2-TC7

200 µl de suspensión de células Caco-2/TC7 (pasajes N° 39-40 del cultivo ATCC) provenientes de cultivos confluentes realizados en cajas de 75 cm² se sembraron sobre insertos de poliéster (Transwell (Corning), 0,4 µm, 12 mm de diámetro) en una concentración de 1 x 10⁵ células/cm², colocando 600 µl de DMEM en el pocillo (cámara basolateral). Se incubó a 37 °C (5% CO₂), realizando cada dos días cambio del medio de cultivo de ambas cámaras (apical y basolateral). Luego de cada cambio de medio se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TEER, Ω.cm²) a fin de evaluar la confluencia e integridad de las monocapas, utilizando un voltímetro Millicell®-ERS (Millipore, USA). Una vez formada la monocapa (TEER constante), se adicionaron 500 µl de PBS en las cámaras apical y basolateral del inserto y se incubó durante 20 min a 37 °C (5% de CO₂). A continuación, el PBS de ambas cámaras fue removido y en la cámara apical se sembraron 200 µl de las soluciones de péptidos en estudio, mientras que en la cámara basolateral se colocaron 600 µl de PBS, manteniéndose en incubación durante 3 h.

V.3. Análisis por RP-HPLC

Se analizaron las muestras tomadas de las cámaras apical y basolateral luego de la incubación y cada una de las muestras originales colocadas en la cámara apical. Se utilizó una columna analítica Sephasil Peptide C8, 12 µm, ST 4,6/250 (Pharmacia Biotech), con un equipo HPLC Waters (Waters Corp., Milford, MA) equipado con un detector de arreglo de diodo (DAD). Las muestras fueron eluidas con un gradiente lineal (0 a 100% en 55 min de solvente B (agua/acetronitrilo (35/65), ácido trifluoroacético (TFA) 650 µl/l) en solvente A

(agua/ acetonitrilo (98/2), TFA 650 μ l/l), flujo = 1,1 ml/min. Se colectaron fracciones cada 1 min entre los 2 y 60 min.

V.4. Determinación de la concentración peptídica

Se determinó la concentración peptídica de las distintas muestras (original, apical y basolateral) mediante el método de Lowry modificado (Stoscheck, 1990) en los casos de concentraciones menores a 0,1 mg/ml (Tironi y Añón, 2010).

V.5. Determinación de la actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante de las distintas muestras (original, apical y basolateral) mediante el método de ORAC previamente descrito.

Resultados y Discusión

I. Separación de fracciones por FPLC

Se llevó a cabo la separación de fracciones de las dos muestras obtenidas por digestión gastrointestinal simulada (AD y HD) de acuerdo a su tamaño molecular utilizando una columna de exclusión molecular preparativa Superdex 30 (rango de separación óptimo: < 10 kDa), la cual presentó la siguiente expresión para el cálculo de la masa molecular: $\log MM = 1,549 - 2,546 \times K_{av}$ ($r^2=0,978$), siendo $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_T - V_0)$, V_e = volumen de elución. En las Figuras 1 y 2 se muestran los cromatogramas obtenidos para AD y HD, respectivamente. Si bien se colectaron fracciones de 1,6 ml, inicialmente se mezclaron de a tres fracciones consecutivas y se obtuvieron 17 muestras a las que se les realizó una primera evaluación de la actividad antioxidante. Dichas muestras se señalan en los cromatogramas.

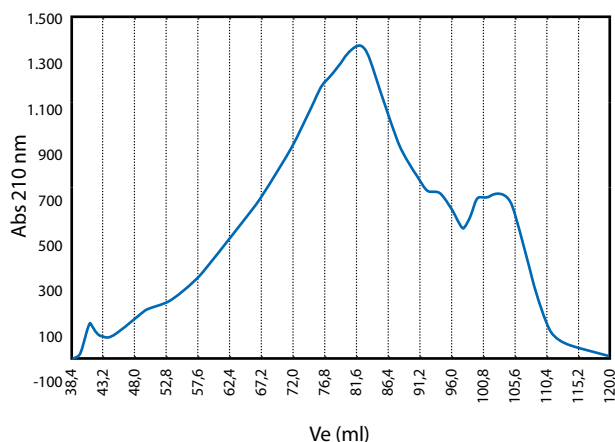


Figura 1. Cromatograma FPLC de exclusión molecular de AD señalando las muestras utilizadas para el primer *screening* de actividad antioxidante.

Al comparar los perfiles cromatográficos de ambos digeridos se pueden observar algunas similitudes. Los picos más importantes en ambas muestras aparecen en un rango de volúmenes de elución similares (muestras 6 a 14), y se encuentran constituidos, de acuerdo a la curva de calibración obtenida, por moléculas de entre 6,1 y 0,2 kDa, o sea, por

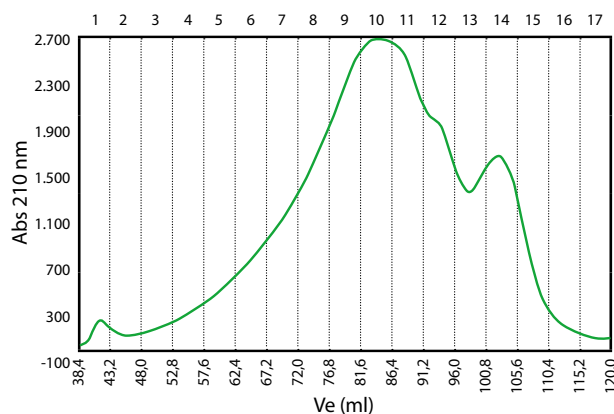


Figura 2. Cromatograma FPLC de exclusión molecular de HD señalando las muestras utilizadas para el primer *screening* de actividad antioxidante.

peptidos de entre 2 y 55 aminoácidos (considerando 110 Da como masa molecular promedio de un aminoácido). Asimismo, las máximas absorbancias a 210 nm corresponden a las fracciones 9 (en el caso de AD) o 9 y 10 (para HD), las cuales contienen péptidos con masas moleculares de entre 1 y 2 kDa, o sea, péptidos de entre 9 y 19 aminoácidos.

II. Actividad antioxidante de las fracciones

Los valores Trolox eq. (μ M) (ensayo ORAC) y Ácido clorogénico eq. (mg/ml) (ensayo HORAC) para las muestras provenientes de AD y HD se presentan en las Figuras 3 y 4, respectivamente.

Como puede observarse en las figuras, las muestras más activas estuvieron comprendidas entre la 6 y la 14 correspondientes a masas moleculares de entre 6,1 y 0,2 kDa, las cuales también abarcaron la mayor área relativa de pico, un 81% del área total en el caso del AD y un 87% para HD. Las muestras que presentaron menor actividad en todos los casos (16 y 17) corresponden a la última zona de los cromatogramas (masas moleculares menores a las de un aminoácido) donde resulta muy baja la presencia de componentes detectables a 210 nm, con áreas relativas de entre 0,4 y 1,3% solamente. A su vez, las muestras 1 a 5, correspondientes a moléculas de masas moleculares mayores a 6,1 kDa y la muestra 15 (masas moleculares menores a 0,2 kDa) presentaron actividades intermedias.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se seleccionaron aquellas muestras que demostraron poseer mayor capacidad antioxidante por ambas metodologías (muestras 6 a 14), para evaluar a través de los mismos ensayos y protocolos la actividad de sus fracciones constituyentes. En el caso de las fracciones separadas a partir de AD (Figura 5) se puede observar que si bien todas las fracciones presentaron algún nivel de actividad por el ensayo ORAC, algunas de ellas exhibieron valores mayores de Trolox eq., tales como las fracciones 64 - 66 (Trolox eq. entre 242 y 293 μ M) y las fracciones 50-52 (Trolox eq. entre 225 y 248 μ M). En el caso del ensayo HORAC se observan más diferencias entre las actividades de las distintas fracciones; las fracciones 50-52 son las más activas, con valores de ácido clorogénico eq. de entre 403 y 467 μ g/ml, seguidas de las fracciones 45 a 49 y la 53, con valores de entre 250 y 303 μ g/ml.

En el análisis de los resultados del ensayo ORAC de las fracciones provenientes de HD se observa una fracción de

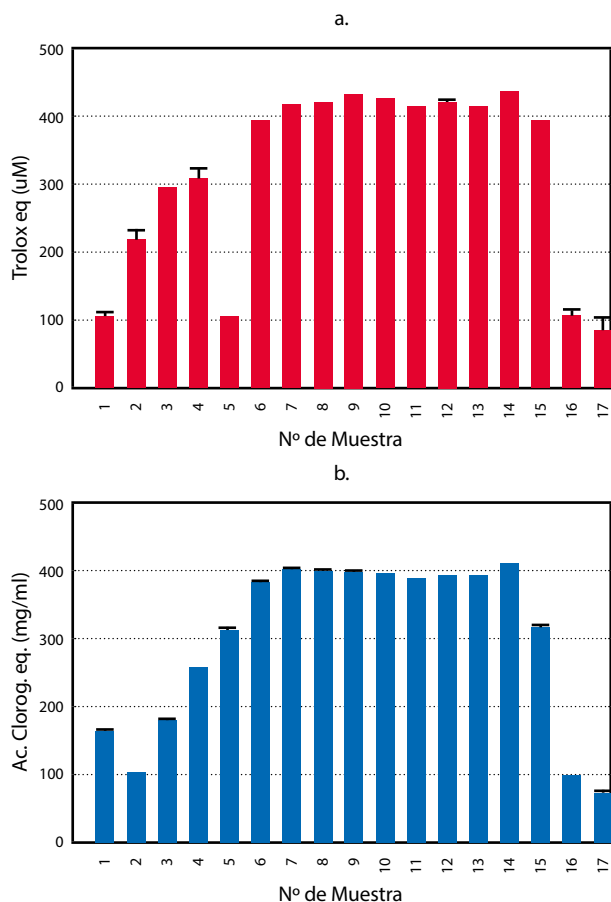


Figura 3. a. Valor Trolox eq (μM) (ORAC) de las muestras provenientes de AD. **b.** Valor Ácido clorogénico eq. (mg/ml) (HORAC) de las muestras provenientes de AD. Los resultados se expresan como el promedio \pm SD ($n = 3$).

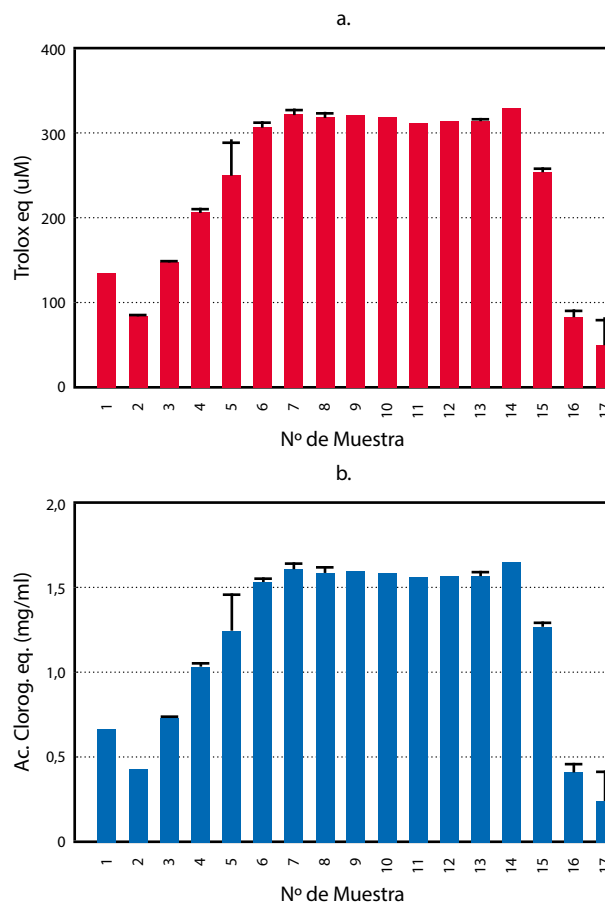


Figura 4. a. Valor Trolox eq (μM) (ORAC) de las muestras provenientes de HD. **b.** Valor Ácido clorogénico eq. (mg/ml) (HORAC) de las muestras provenientes de HD. Los resultados se expresan como el promedio \pm SD ($n = 3$).

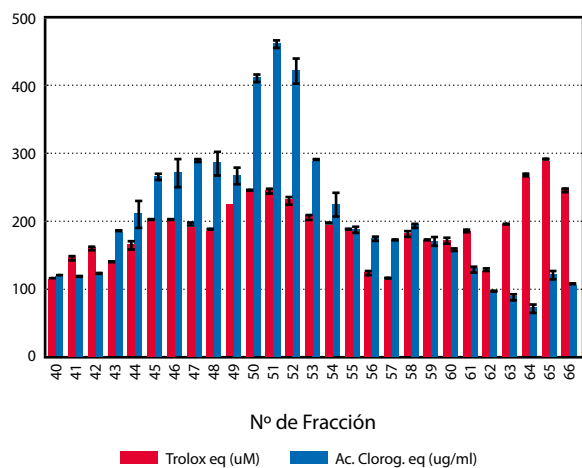


Figura 5. Valores Trolox eq (μM) (ORAC) y Ácido clorogénico eq. ($\mu\text{g/ml}$) (HORAC) de las fracciones constituyentes de las muestras 6-14 de AD. Los resultados se expresan como promedio \pm SD ($n = 3$).

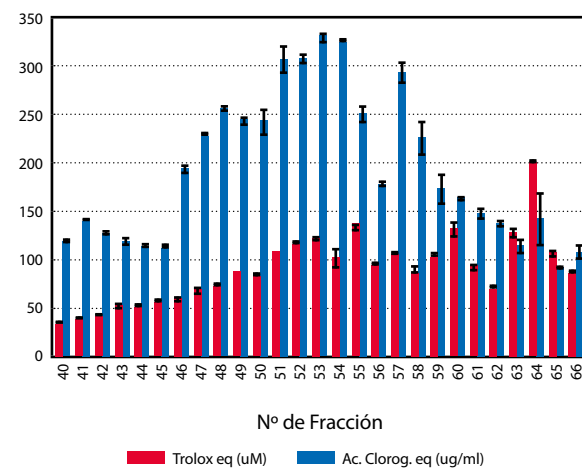


Figura 6. Valores Trolox eq (μM) (ORAC) y Ácido Clorogénico eq. ($\mu\text{g/ml}$) (HORAC) para las fracciones constituyentes de las muestras 6-14 de HD. Los resultados se expresan como promedio \pm SD ($n = 3$).

mayor actividad (64) con un valor de Trolox eq. de $202 \mu\text{M}$, seguida por varias fracciones con actividades comparables (51-53, 54, 55, 57, 59, 60 y 63) con valores de Trolox eq. de entre 100 y $139 \mu\text{M}$, y el resto presenta menores valores. En

tanto, para el ensayo HORAC las fracciones más activas fueron 51-54 y 57 con valores de ácido clorogénico eq. de entre 293 y $334 \mu\text{g/ml}$ y luego las fracciones 47-50, 55 y 58, con valores de ácido clorogénico eq. de entre 209 y $303 \mu\text{g/ml}$ (Figura 6).

III. Simulación de la absorción intestinal

Como método de evaluación de la formación e integridad de las monocapas celulares se realizaron medidas de TEER. Dicho parámetro aumentó durante la incubación hasta alcanzar un valor máximo aproximado de $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$ luego de 12 días.

Dos fracciones con alta actividad antioxidante de cada una de las muestras fueron seleccionadas para evaluar su capacidad potencial de atravesar la pared intestinal: fracciones 50 y 52 de AD, y las 52 y 57 de HD (AD50, AD52, HD52 y HD57, respectivamente), con masas moleculares en el rango de 0,7–1,9 kDa, las cuales corresponderían a péptidos de entre 6 y 17 aminoácidos.

Previamente a los ensayos de evaluación de la absorción intestinal, se realizaron dos ensayos de citotoxicidad, MTT y Rojo Neutro, a fin de asegurar que las muestras no resultaran dañinas para las células en estudio. Los resultados mostraron que las cuatro muestras ensayadas no fueron citotóxicas en las concentraciones en las que se utilizaron, dado que las células mantuvieron en todos los casos una funcionalidad mitocondrial (MTT) y lisosomal (Rojo Neutro) completas.

Posteriormente se realizaron los ensayos de absorción incubando las monocapas confluentes de células Caco-2/Tc7 crecidas sobre los insertos en presencia de las muestras colocadas en la cámara apical. Luego se tomó el contenido de las cámaras apical y basolateral para su análisis junto con la muestra original (fracción FPLC) correspondiente.

Como una primera medida de evaluación de la absorción de péptidos, se analizó la concentración de compuestos de naturaleza proteica. En la Tabla 1 se muestran los resultados expresados como la masa total de proteína en cada compartimiento.

Muestra	Original	Apical	Basolateral
AD50	64 ± 1	60 ± 2	48 ± 5
AD52	11 ± 2	6 ± 2	10 ± 3
HD52	17 ± 2	8 ± 1	19 ± 1
HD57	56 ± 1	36 ± 1	34 ± 2

Los resultados se expresan como el promedio \pm SD ($n=2$)

Tabla 1. Cuantificación de proteínas (μg) en las muestras original, apical y basolateral de los ensayos de absorción.

En todos los casos la masa de péptidos detectada en la cámara apical luego de la incubación fue menor que la detectada en la muestra original (Tabla 1), sugiriendo que algunos de los péptidos presentes en cada muestra ingresaron a las células, pudiendo o no alcanzar la cámara basolateral. Todas las cámaras basolaterales presentaron un nivel detectable de péptidos (Tabla 1), lo cual indicaría que en todos los casos ocurrió absorción de péptidos. Sin embargo, cabe aclarar que los niveles de absorción (calculados como la proporción de péptidos en la cámara basolateral respecto a la muestra original) resultaron altos (superiores al 50% en todos los casos) respecto a lo esperado según los datos de la literatura (Renukuntla, et al., 2013). Además, la suma de las masas de péptidos de las dos cámaras superó en todos los casos la masa en la muestra original (incrementos de entre 23 y 70%). Estos hechos sugieren que las cantidades de péptidos detectadas

podrían contener un aporte de componentes ajenos a las muestras, probablemente procedentes de las células. En este sentido, se ha demostrado que monocapas de células Caco-2 crecidas sobre membranas semiporosas e incubadas (4–6 h) en presencia de metionina marcada radiactivamente liberan moléculas proteicas tales como apolipoproteínas, transferrina y factor de crecimiento entre otras, preferencialmente en la cámara basolateral, sin necesidad de señales específicas (Rindler y Traber, 1988). En base a esta información, se hipotetiza que en este estudio haya ocurrido secreción de alguna proteína celular a la cámara basolateral y por eso la suma de los valores de ambas cámaras fue superior a la cantidad detectada en la muestra original.

Se analizaron mediante RP-HPLC las muestras originales, junto con los contenidos de las cámaras apical y basolateral luego de la incubación, para evidenciar el pasaje de componentes peptídicos así como su posible modificación por acción del contacto con las células. Cabe considerar para este análisis que por necesidad del sistema de ensayo el volumen de la cámara basolateral fue tres veces mayor al de la cámara apical, por lo que los componentes detectados se encuentran más diluidos en la primera.

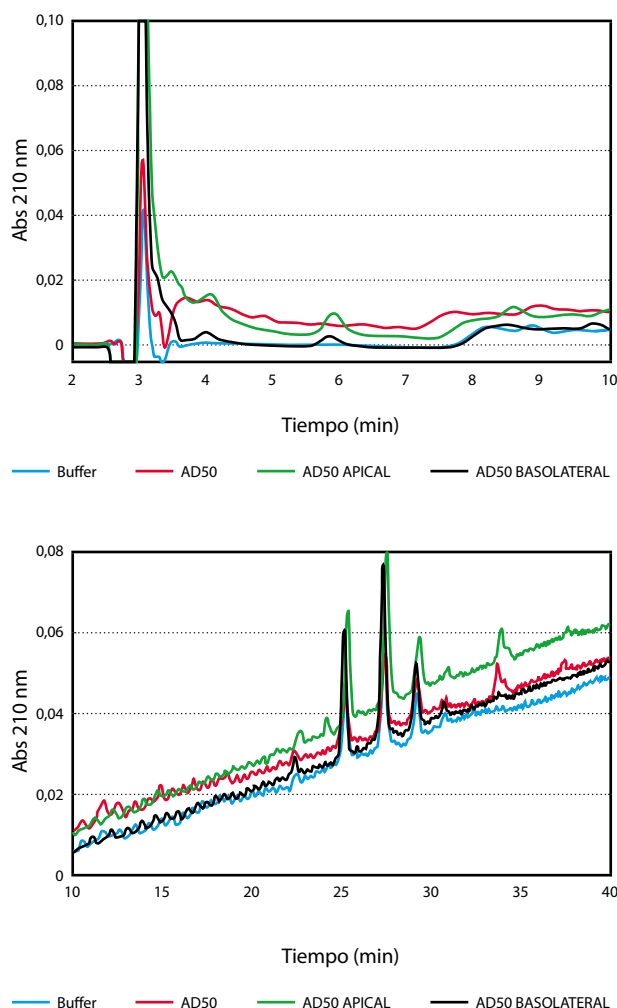
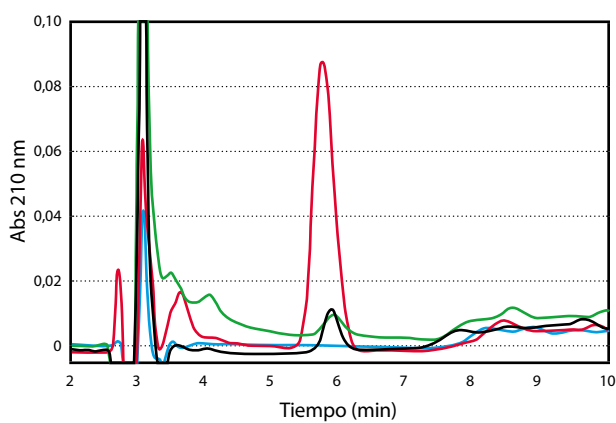
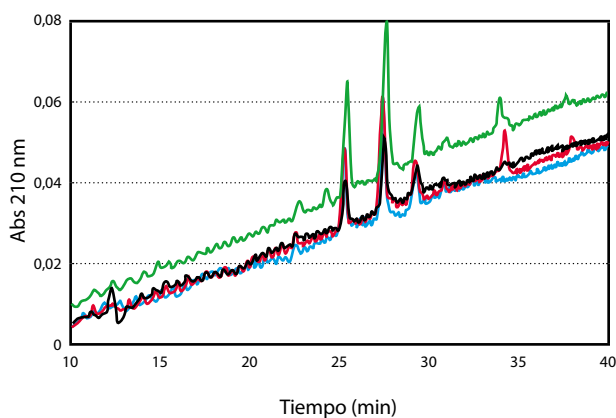


Figura 7. Cromatogramas RP-HPLC de la fracción AD50 original y las cámaras apical y basolateral luego del ensayo de simulación de la absorción intestinal.



— Buffer — AD52 — AD52 APICAL — AD52 BASOLATERAL

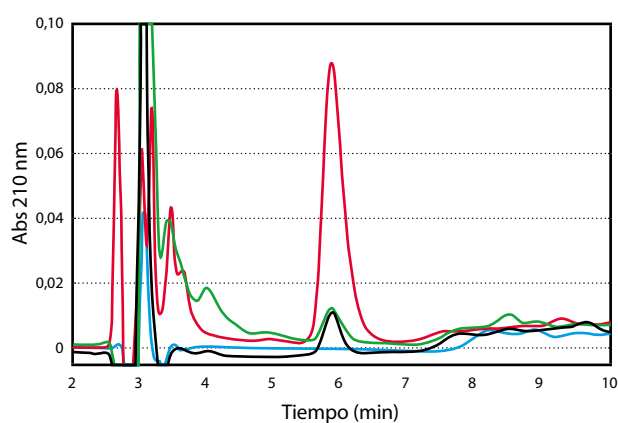


— Buffer — AD52 — AD52 APICAL — AD52 BASOLATERAL

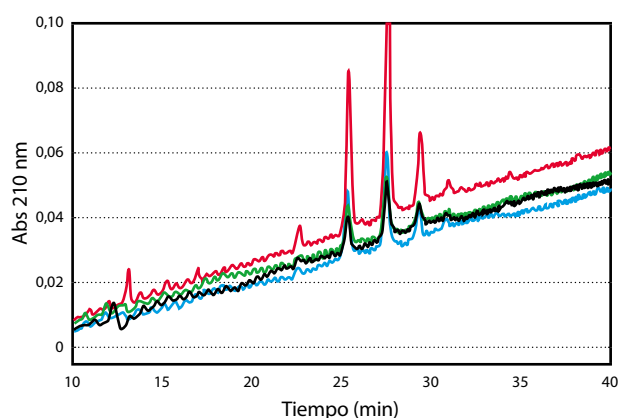
Figura 8. Cromatogramas RP-HPLC de la fracción AD52 original y las cámaras apical y basolateral luego del ensayo de simulación de la absorción intestinal.

La fracción AD50 presentó una diversidad de picos. Descartando aquellos correspondientes al tampón, pueden mencionarse tres grupos de componentes: 1) Moléculas que aparecen entre los 3,5 y 7 min (hidrofílicas); 2) moléculas que aparecen entre los 12 y 15 min (picos muy pequeños); 3) moléculas que aparecen entre los 33 y 40 min (las más hidrofóbicas). El perfil RP-HPLC de la cámara apical presentó algunos cambios respecto al de AD50, tales como modificaciones en el primer grupo al inicio del cromatograma, disminución de los picos con t_R entre 12 y 15 min, y la aparición de dos picos pequeños ($t_R = 6$ y 24 min) (Figura 7), sugiriendo que sus componentes podrían haber sido generados por acción de las peptidasas celulares sobre péptidos originalmente presentes en AD50. El perfil cromatográfico de la cámara basolateral muestra moléculas muy hidrofílicas (t_R entre 3 y 5 min) y un pico a $t_R = 34$ min (Figura 7) presentes tanto en AD50 como en AD50 apical, lo cual indicaría que dichos componentes de este pico podrían haber sido parcialmente absorbidos sin modificaciones por parte de las células, aunque no se pueda asegurar que las moléculas constituyentes sean las mismas en las diferentes muestras. También apareció el pico de $t_R = 6$ min generado en AD50 apical.

La fracción AD52 presentó picos correspondientes a moléculas hidrofílicas con t_R menores a 4 min, un pico muy



— Buffer — HD52 — HD52 APICAL — HD52 BASOLATERAL



— Buffer — HD52 — HD52 APICAL — HD52 BASOLATERAL

Figura 9. Cromatogramas RP-HPLC de la fracción HD52 original y las cámaras apical y basolateral luego del ensayo de simulación de la absorción intestinal.

importante a $t_R = 6$ min y picos correspondientes a moléculas más hidrofóbicas similares a los detectados en AD50 (34 y 38 min) (Figura 8). En la cámara apical se detectaron modificaciones en los picos al inicio del cromatograma ($t_R < 4$ min), una disminución muy importante en el pico de $t_R = 6$ min, una pequeña disminución de las especies más hidrofóbicas y la aparición de un pico con $t_R = 24$ min (Figura 8). La cámara basolateral presentó el pico correspondiente a $t_R = 6$ min y un pico con $t_R = 13$ min, el cual no fue detectado en la cámara apical ni en la muestra original (Figura 8). Una posible explicación a la aparición de estas nuevas moléculas podría ser la modificación por peptidasas de moléculas originalmente presentes en el medio y su absorción en una alta proporción.

También fueron analizadas fracciones provenientes del digerido previamente hidrolizado con alcalasa. La fracción HD52 presentó algunas similitudes con la fracción AD52, tales como picos a tiempos menores a 4 min y un pico muy importante a $t_R = 6$ min, aunque en este caso también se registraron picos a $t_R = 13$ y 17 min, sin presencia detectable de los picos correspondientes a moléculas más hidrofóbicas (Figura 9). Luego de la incubación con las células, la cámara apical presentó modificaciones en los picos al inicio del cromatograma, así como una disminución importante en la intensidad de los picos a $t_R = 6$ y 13 min, la desaparición

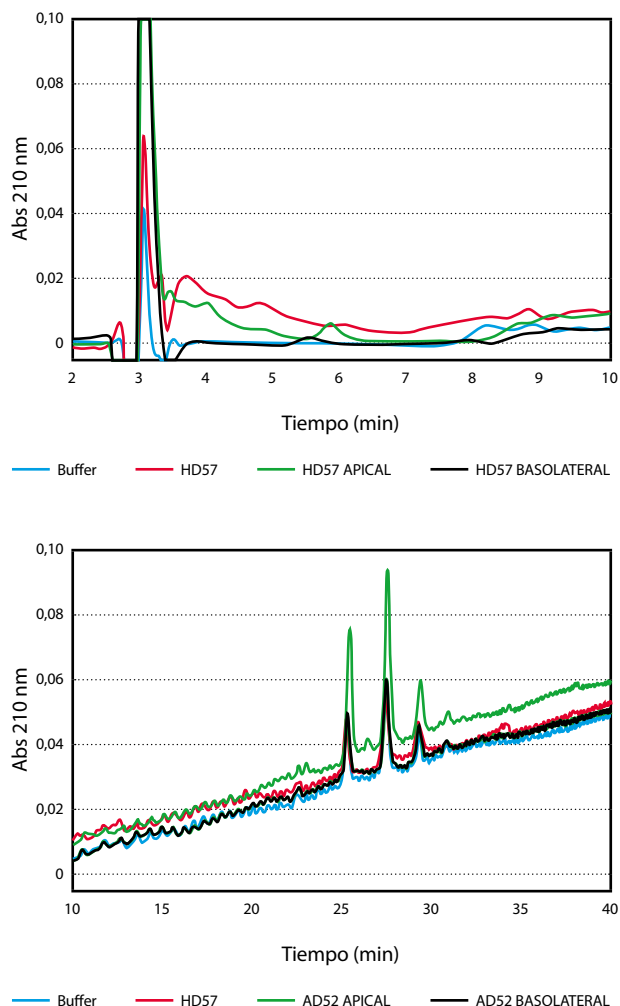


Figura 10. Cromatogramas RP-HPLC de la fracción HD57 original y las cámaras apical y basolateral luego del ensayo de simulación de la absorción intestinal.

del pico a $t_R = 17$ min y la aparición de pequeños picos entre los 8 y 12 min (Figura 9). El perfil RP-HPLC de la cámara basolateral indica que se habrían absorbido componentes correspondientes a picos de $t_R = 6, 10$ y 13 min (Figura 9).

Finalmente, la fracción HD57 presentó moléculas hidrofílicas con t_R menores a 5 min, unos picos muy pequeños con tiempos entre 8 y 13 min y un pico con $t_R = 34$ min (Figura 10). La cámara apical correspondiente presentó una disminución de todos los picos observados en la muestra original y la aparición de picos a $t_R = 6, 23$ y 26 min (Figura 10), los cuales podrían ser atribuidos a la acción de peptidasas celulares sobre péptidos originales. La cámara basolateral presentó un único pico detectable con $t_R = 6$ min (Figura 10).

Dadas las pequeñas cantidades de péptidos/proteínas con las que se está trabajando no se puede descartar en las muestras la presencia de moléculas que no pudieron ser detectadas en estos análisis de RP-HPLC. Si bien, como se describió en la sección anterior, la determinación de componentes peptídicos por el método de Lowry dio indicios de una posible secreción de proteínas celulares en la cámara basolateral, el análisis RP-HPLC de las cámaras no permite confirmar este hecho. En el caso de ocurrir esta secreción, se esperaría la aparición en todas las cámaras basolaterales de picos idénticos, los cuales

no estarían presentes en la cámara apical. Dado que esto no fue observado en los cromatogramas obtenidos, no se puede confirmar una secreción de proteínas celulares y tampoco es posible descartarla, ya que los productos de secreción podrían eluir junto con otros péptidos de amaranto o estar en concentraciones no detectables por este método.

IV. Evaluación de la actividad antioxidante

Mediante el ensayo ORAC se analizó la actividad antioxidante de las cámaras apical y basolateral en comparación con sus correspondientes muestras originales. Los resultados se expresan como actividad específica (μg de Trolox/ μg de péptidos) para poder realizar la comparación entre las distintas muestras (Tabla 2).

En primer lugar, es importante remarcar que la actividad específica de las distintas muestras originales fue diferente, dado que, si bien su actividad absoluta había presentado valores bastante cercanos (Figuras 5 y 6), la cantidad de componentes peptídicos detectados en cada caso es diferente (Tabla 1). Así, la actividad específica de las muestras AD52 y HD52 fue aproximadamente tres veces mayor que la de las muestras AD50 y HD57, indicando la presencia en las primeras de componentes más activos (Tabla 2). Como característica común de las dos primeras muestras puede resaltarse la presencia de un pico muy importante con $t_R = 6$ min no presente en las otras dos muestras (Figuras 7, 8, 9 y 10).

Muestra	μg Trolox/ μg proteína	% respecto muestra original
AD50	$0,09 \pm 0,01^a$	
AD50 apical	$0,11 \pm 0,01^a$	119
AD50 basolateral	$0,13 \pm 0,01^b$	143
AD52	$0,39 \pm 0,03^a$	
AD52 apical	$0,58 \pm 0,07^b$	151
AD52 basolateral	$0,48 \pm 0,02^c$	126
HD52	$0,32 \pm 0,01^a$	
HD52 apical	$0,60 \pm 0,03^b$	184
HD52 basolateral	$0,15 \pm 0,01^c$	47
HD57	$0,10 \pm 0,01^a$	
HD57 apical	$0,15 \pm 0,01^b$	143
HD57 basolateral	$0,23 \pm 0,08^c$	223

Los resultados se expresan como el promedio \pm SD ($n = 3$).

Tabla 2. Valor ORAC de muestras provenientes de ensayos de absorción.

Luego de la incubación en presencia de las células Caco2/TC7, la actividad de todas las muestras en la cámara apical se vio aumentada, excepto para la muestra AD50 en la que la diferencia no fue significativa ($p < 0,05$) (Tabla 2). Sin embargo, pueden describirse distintos comportamientos para cada muestra respecto a la cámara basolateral.

En el caso de AD50, la cámara basolateral presentó una mayor actividad específica en relación a la muestra original e incluso en relación a la cámara apical (Tabla 2), lo cual sugiere que las modificaciones (hidrólisis) producidas por las peptidasas celulares fueron beneficiosas, ya que generaron componentes más activos absorbiendo moléculas con alta actividad. En el caso de la muestra AD52, si bien había presentado un mayor aumento de actividad específica ORAC en la cámara apical, la cámara basolateral tuvo una actividad algo menor que esta (aunque mayor que la de la muestra original) (Tabla 2), indicando que si bien se generaron componentes más activos por acción de las células, estos no lograrían ser completamente absorbidos.

La muestra HD52 fue la menos favorable desde el punto de vista de la absorción de componentes antioxidantes, ya que si bien se produjo un importante incremento de actividad en la cámara apical, la actividad específica de la cámara basolateral fue del 47% respecto a la de la muestra original (Tabla 2). Finalmente, en el caso de la muestra HD57 el comportamiento fue similar al de la muestra AD50, ya que se observó un aumento de actividad específica de la cámara basolateral respecto a la apical, aunque en este caso mayor que en AD50 (Tabla 2). Como característica común de las fracciones AD50 y HD57 puede mencionarse la presencia en ambas de moléculas con altos t_R (más hidrofóbicas), no detectadas en las otras muestras.

Conclusiones

La evaluación de la potencial absorción intestinal de cuatro fracciones con alta actividad antioxidante derivadas de A y H demostró que ciertos péptidos podrían ser absorbidos a través de la monocapa de células Caco-2-TC7, previa modificación o no por parte de las peptidasas celulares. Con base en los resultados encontrados mediante los análisis de RP-HPLC y aunque cada una de las muestras tuvo un comportamiento particular, se pueden derivar algunas características comunes a todas ellas: 1) Aunque con diferente perfil, todas las muestras presentaron un grupo de moléculas muy hidrofílicas (inicio de los cromatogramas), las cuales sufrieron modificaciones y/o absorción luego de la incubación con la monocapa de células Caco2/TC7; 2) todas las cámaras apicales presentaron la aparición de algún/os pico/s no presente/s en las correspondientes muestras originales, posiblemente relacionados con la aparición de nuevos péptidos producto de la hidrólisis por parte de peptidasas celulares del borde en cepillo; 3) en todos los casos se observó absorción de componentes que aparecen a tiempos de elución menores a los 15 min.

Respecto a la actividad antioxidante, en los cuatro casos se observó un comportamiento diferente. Si bien en todos los casos el potencial antioxidante (expresado como actividad específica) se vio aumentado en la cámara apical respecto a las muestras originales, sugiriendo un efecto beneficioso de la acción de las peptidasas, el comportamiento luego de la absorción fue variable y dependió del tipo de moléculas que logró atravesar la monocapa en cada caso. Sin embargo, como ya se ha mencionado, no es posible descartar completamente la presencia en las cámaras basolaterales de alguna/s proteína/s secretadas/s por las células; los diferentes comportamientos frente a la actividad antioxidante de cada muestra dan un indicio de su relación con las diferentes moléculas que pudieron ser absorbidas en cada caso. Un aumento en la actividad de la cámara apical respecto a la muestra original

indica la generación potencial en la luz intestinal de moléculas más activas que podrían actuar a ese nivel por efecto directo sobre especies reactivas presentes en el contenido intestinal.

Estos estudios constituyen una primera aproximación al estudio de la absorción de péptidos con capacidad antioxidante derivados de proteínas de amaranto. Los resultados son prometedores ya que sugieren una absorción potencial de componentes antioxidantes, abriendo la posibilidad de que estos puedan ser capaces de actuar en el interior del organismo.

Referencias

- Antunes, F, Andrade, F, Araújo, F, Ferreira, D, y Sarmiento, B., 2013. Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. En: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (83), pp.427-435.
- Di Virgilio, A., Reigosa, M., Arnal, P. y Fernandez Lorenzo de Mele, M., 2010. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. En: *Journal of Hazardous Materials*, (177), pp.711-718.
- Hidalgo, I., Ruba, T. y Borchardt, R., 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. En: *Gastroenterology*, (96), pp.736-749.
- Martínez, E. y Añón, M., 1996. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (44), pp.2523-2530.
- Orsini Delgado, M., Tironi, V. y Añón, M., 2011. Antioxidant activity of amaranth proteins or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. En: *LWT-Food Science and Technology*, (44), pp.1752-1760.
- Orsini Delgado, M., Galleano, M., Añón, M. y Tironi, V., 2015. Amaranth peptides from gastrointestinal digestion: antioxidant activity against physiological reactive species. En: *Plant Foods for Human Nutrition*, (70), pp.27-34.
- Quiros, A, Davalos, A, Lasuncion, M, y Ramos, M., 2008. Bioavailability of the antihypertensive peptide LHLPLP: Transepithelial flux of HLPLP. En: *International Dairy Journal*, (18), pp.279-286.
- Regazzo, D, Molle, D, Gabai, G, Tome, G, Dupont, D, Leonil, J, y Boutrou, R., 2010. The (193-209) 17 residues peptide of bovine β -casein is transported through Caco-2 monolayer. En: *Molecular Nutrition and Food Research*, (54), pp.1-8.
- Renukuntla, J, Dutt Vadlapudib, A, Patel, A, Boddu, S, Mitra, A., 2013. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. En: *International Journal of Pharmaceutics*, (447), pp.75-93.
- Rindler, M. y Traber, M., 1988. A specific sorting signal is not required for the polarized secretion of newly synthesized proteins from cultured intestinal epithelial cells. En: *The Journal of Cell Biology*, (107), pp.471-479.
- Stoscheck, C., 1990. Quantitation of protein. En: *Methods in Enzymology*, (182), pp.50-69.
- Tironi, V. y Añón, M., 2010. Amaranth as a source of antioxidant peptides. Effect of proteolysis. En: *Food Research International*, (43), pp.315 - 322.
- Vermeirssen, V., Camp, J. y Verstraete, W., 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. En: *British Journal of Nutrition*, 92(3), pp.357-366.

Purificación y caracterización de una lectina de *Amaranthus hypochondriacus*, un compuesto antiproliferativo

Purification and Characterization of a lectin from *Amaranthus hypochondriacus*, an antiproliferative compound

Mengoni, Antonieta (1,2), Quiroga, Alejandra Viviana (1,3), Añón, María Cristina (1)

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA-CONICET-UNLP), La Plata, Buenos Aires, Argentina - (2) Comisión de Investigaciones Científicas (CIC-PBA), La Plata, Buenos Aires, Argentina - (3) Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

RECIBIDO: 29/2/2016 – APROBADO: 23/6/2016

Resumen

Los alimentos ejercen una influencia importante en el desarrollo de diversas enfermedades no transmisibles, entre las que es posible incluir el cáncer. Por otra parte, existe información que da cuenta de que algunos alimentos o algún componente alimentario pueden proteger contra el desarrollo de esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue purificar, caracterizar y analizar la potencial actividad antiproliferativa de una lectina proveniente de *Amaranthus hypochondriacus* (AH).

Para ello se purificó parcialmente la lectina a partir de harina desgrasada de AH (LPP). Se encontró una proteína con una masa molecular aproximada de 65-70 kDa, compuesta por dos subunidades de aproximadamente 35 kDa unidas por interacciones no covalentes, con actividad hemaglutinante característica de las lectinas. Se estudió la inhibición de la proliferación celular utilizando la línea celular tumoral CaCo2/TC7 mediante el ensayo del cristal violeta. Además de la lectina parcialmente purificada, se estudió el efecto antiproliferativo de los aislados de *Amaranthus hypochondriacus* y *mantegazzianus*, y una lectina comercial de *Amaranthus caudatus*. Todas las muestras ensayadas mostraron efectos citotóxicos en forma de dosis respuesta.

Palabras clave: Actividad antiproliferativa, lectina de *Amaranthus hypochondriacus*.

Abstract

Food exerts an important influence on the development of several chronic diseases, including cancer. On the other hand there is evidence indicating that some food components can protect against the development of this disease. The aim of this work was to purify, characterize and analyze the potential antiproliferative activity of a lectin from *Amaranthus hypochondriacus*.

Lectin was partially purified from defatted *Amaranthus hypochondriacus* flour. A protein with an approximate molecular mass of 65-70 kDa, composed of two subunits of about 35 kDa held together by noncovalent interactions with hemagglutinating activity characteristic of lectins was found. Inhibition of cell proliferation was studied using the tumor cell line CaCo2/TC7 by the crystal violet assay. In addition to the partially purified lectin, the antiproliferative effect of *Amaranthus hypochondriacus* and *mantegazzianus* isolates, and a commercial lectin from *Amaranthus caudatus* was studied. All samples tested showed cytotoxic effects in a dose dependent way.

Keywords: Antiproliferative activity, *Amaranth hypochondriacus* lectin.

Introducción

Las enfermedades no transmisibles (ENT) son en la actualidad la principal causa de mortalidad mundial. De acuerdo a los datos aportados por el Instituto Nacional del Cáncer (INC), de los 57 millones de defunciones que se produjeron en 2008 en todo el mundo, las dos terceras partes se debieron a ENT, principalmente enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y enfermedades pulmonares crónicas. El cáncer fue responsable de 7,6 millones de muertes.

En Argentina, las ENT causan más del 60% del total de las defunciones que se producen anualmente en el país, 20% de las cuales corresponden a tumores. Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta (172,3-242,9 x 100000 habitantes), según las estimaciones realizadas por la Agencia Internacional de Investigación de Cáncer para el año 2012 (International Agency for Research on Cancer, IARC, Globocan, 2012).

Un gran porcentaje de ENT son prevenibles y comparten los mismos factores de riesgo. Se estima que los cinco riesgos principales para la salud están relacionados con el comportamiento y la alimentación: índice alto de masa corporal, bajo consumo de frutas y hortalizas, inactividad física, consumo de tabaco e ingesta excesiva de alcohol. Estos factores causan el 30% de las muertes por cáncer (Instituto Nacional del Cáncer, 2012).

A su vez, existe evidencia creciente de que algunos componentes de diferentes alimentos pueden proteger del desarrollo de esta enfermedad (péptidos, proteínas, metabolitos secundarios) (World Cancer Research Fund, 2007).

Dentro de los componentes bioactivos presentes en distintos alimentos se han encontrado algunos péptidos y proteínas que se utilizan como medicinas alternativas en el tratamiento del cáncer (Bhutia y Maiti, 2008; González de Mejía y Dia, 2010) entre los que pueden mencionarse a lunasina (Hernández-Ledesma, et al., 2009), el inhibidor de Bowman Birk (Kobayashi, 2013) y algunas lectinas provenientes de plantas (González de Mejía y Prisecaru, 2005; Lam y Ng, 2011; Liu, et al., 2010).

El amaranto, un cultivo precolombino de alto contenido proteico (12-17% p/p), es considerado una importante fuente de compuestos bioactivos (Caselato-Sousa y Amaya Farfán, 2012; Rastogi y Shukla, 2013). Se han descrito péptidos bioactivos derivados de sus proteínas con diferentes actividades biológicas, entre ellas, antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica y antihipertensiva (Lipkin, et al., 2005; Fritz, et al., 2011; Orsini Delgado, et al., 2011; Caselato-Sousa y Amaya Farfán, 2012; Quiroga, et al., 2012; Tironi y Añón, 2014; García Fillería y Tironi, 2015; Orsini Delgado, et al., 2015; Sabbione, et al., 2015).

Silva-Sánchez et al. (2008) encontraron un péptido de ≈ 20 kDa en la fracción glutelina del *Amaranthus hypochondriacus* similar a lunasina con propiedades antitumorales potenciales. Barrio y Añón (2010) informaron actividad antiproliferativa en el aislado proteico de *Amaranthus mantegazzianus* y su mecanismo de acción en diferentes líneas tumorales y no tumorales. Quiroga et al. (2015) estudiaron la actividad antiproliferativa de las diferentes fracciones proteicas que componen el aislado y trataron de identificar la/las proteína/s y/o péptidos responsables de la actividad utilizando la línea celular UMR106 derivada de osteosarcoma de rata. En base a la evidencia experimental encontrada propusieron a la lectina de *Amaranthus mantegazzianus* como la responsable de la actividad antiproliferativa.

Si bien existen evidencias de la actividad antiproliferativa asociada a lectina de amaranto obtenida de distintas variedades de este cultivo (Yu, et al., 2001; Kaur, et al., 2006; Quiroga, et al., 2015), es necesario profundizar el conocimiento en cuanto a la purificación, las características estructurales y el estudio de sus posibles mecanismos de acción para poder aplicarla en el desarrollo de un alimento funcional. De lo que antecede, el objetivo de este trabajo fue obtener, purificar y caracterizar lectina de *Amaranthus hypochondriacus* y determinar la actividad antiproliferativa de la lectina parcialmente purificada utilizando la línea celular tumoral Caco2/TC7.

Materiales y Métodos

Obtención de las muestras

Las semillas utilizadas en los ensayos realizados pertenecen a la especie *Amaranthus hypochondriacus*, recibidas de IN-DEAR (Instituto de Agrobiotecnología Rosario), Rosario, Santa Fe, Argentina. Se obtuvo la harina a partir de las semillas

utilizando un molino UDY Cyclone Sample Mill, de 0,5 mm de malla. La harina obtenida fue desgrasada con n-hexano con una relación 10% p/v durante 5 h con agitación a temperatura ambiente y luego se mantuvo 20 h más en contacto con el solvente, en reposo. Posteriormente se filtró con vacío y se dejó secar al aire para eliminar los restos de solvente durante 24 hs antes de ser utilizada.

Lectina de *Amaranto hypochondriacus*. Obtención y purificación

La lectina parcialmente purificada se preparó según el protocolo descrito por Rinderle et al. (1989). A partir de la harina desgrasada se extrajo con buffer fosfato (PBS: 0,011 mol/L KH_2PO_4 , 0,026 mol/L Na_2HPO_4 , 0,115 mol/L NaCl, pH 7,4) durante 1 h. El extracto proteico se precipitó con una concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 1,2 mol/L - 3,2 mol/L, a una temperatura de 4 °C.

El precipitado obtenido se resuspendió en una solución de tris(hidroximetil)aminometano (Tris), 0,020 mol/L, pH 8,1 y se dializó exhaustivamente contra el mismo buffer (este extracto se denominó extracto crudo EC). Luego de la diálisis la muestra se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna MonoQ 5/50 GL (GE-Healthcare, Uppsala, Sweden) equilibrada con 0,020 mol/L Tris, pH 8,10. Se sembraron 2 ml del extracto crudo en cada corrida. Se utilizó un flujo de 0,5 ml/min. La muestra no retenida por la columna (fracción A) se eluyó con 10 volúmenes de columna del solvente de baja fuerza iónica (fase móvil A: buffer Tris 0,02 mol/L, pH 8,1). La fracción retenida (fracción B) se eluyó con buffer de alta fuerza iónica (fase móvil B: buffer Tris 0,02 mol/L, pH 8,1, NaCl 1M) utilizando un gradiente lineal de solvente entre 0-100% fase móvil B desarrollado en 5 volúmenes de columna. Ambas fracciones se dializaron contra agua y se liofilizaron.

Aislado de *Amaranto hypochondriacus* y *Amaranto mantegazzianus*

Los aislados proteicos se prepararon según lo descrito por Martínez y Añón (1996). Brevemente, las proteínas fueron extraídas a partir de harina desgrasada a pH 9 y precipitadas a pH 5. El precipitado fue resuspendido en agua, neutralizado y liofilizado.

Lectina comercial

Se utilizó como control una lectina comercial de *Amaranthus caudatus* adquirida en Vector laboratories (Burlingame, CA, USA).

Caracterización de lectina parcialmente purificada

Electroforesis

Se utilizó un equipo Bio Rad miniprotean II (Bio-Rad Hercules, California, USA), siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (1970). Se utilizaron geles de concentración constante de acrilamida 12% p/v para el gel separador y 4% p/v para el gel apilador. Se utilizaron marcadores de peso molecular en el rango (14,1-97 kDa) (GE-Healthcare, Uppsala, Suecia). Los geles fueron fijados y teñidos con Coomassie brilliant Blue R-250 al 0,192% p/v en agua/metanol/ácido acético (10:10:4)

durante 12 h, en agitación. La decoloración se realizó con una solución de etanol 25% p/v y ácido acético 10% p/v a temperatura ambiente.

Las muestras se prepararon disolviendo la proteína en buffer de muestra (hidroximetil aminometano-HCl (Tris-HCl) 0,185 M (pH 8,8), glicerol 12,5% v/v, dodecil sulfato de sodio (SDS) 2,0% p/v, y azul de bromofenol 0,05% p/v). En el caso de muestras liofilizadas las muestras se prepararon a una concentración proteica aproximada de 10 mg/ml. Las muestras en solución se prepararon mezclando 3 volúmenes de muestra con 1 volumen de buffer de muestra. Para la electroforesis en condiciones reductoras se agregó a la muestra 2-mercaptoetanol en una concentración de 5% v/v y luego se calentó a ebullición durante 1 min en baño María. Todas las muestras se centrifugaron antes de sembrar en el gel durante 10 min a 14000 g a 25 °C. Los sobrenadantes se sembraron en el gel en cierto volumen para tener entre 20-60 µg de proteína por calle.

Para la corrida de los geles se utilizó un voltaje de 200 V y una corriente de 30 A por placa, usando como buffer de electrodo (Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M (pH 8,3), SDS 0,1% p/v).

Cromatografía de exclusión molecular

Se utilizó una columna Superosa 6HR 10/300 GL (GE Healthcare), cuyo rango de separación es de 5000 Da a 5000000 Da. Las muestras fueron disueltas en 0,2 ml de buffer Tris 20 mM, NaCl 0,1 M, pH=8, y fueron eluidas con el mismo buffer con un flujo de 0,2 ml/min. Se colectaron fracciones cada 0,5 ml y se registró el perfil de elución midiendo la absorbancia a 214 nm. La columna fue calibrada con un kit de calibración HMW gel filtration calibration kit (Ge Healthcare) que contiene las siguientes proteínas: Tiroglobulina (669kDa, Ve=12,2 ml), Aldolasa (158kDa, Ve=15,7 ml), Albúmina bovina (67 kDa, Ve=16,4 ml), ovoalbúmina (43 kDa, Ve=17,1 ml), ribonucleasa A (13,7 kDa, Ve=18,8 ml). Se utilizó azul dextrano para determinar el volumen muerto de la columna (V₀=7,2 ml).

Ensayo de hemaglutinación

A partir de glóbulos rojos obtenidos de sangre humana de cualquier tipo y factor se preparó una suspensión al 4% v/v con solución fisiológica.

Con las muestras obtenidas en la cromatografía de intercambio iónico, dializadas y liofilizadas (fracción A y fracción B) se prepararon suspensiones de 5 mg liofilizado/ml en buffer PBS. A partir de ellas se realizaron diluciones utilizando como disolvente solución fisiológica. Para el extracto crudo (muestra líquida) se realizaron diluciones utilizando solución fisiológica.

Se utilizó como control positivo de hemaglutinación una lectina comercial de *Amaranthus caudatus*. Se diluyó con solución fisiológica hasta una concentración de 0,04 mg/ml y se ensayaron las siguientes concentraciones: 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml y 2 µg/ml.

Para llevar a cabo el ensayo, se colocaron 50 µL de la suspensión de glóbulos rojos y 50 µL de las diluciones preparadas en cada pocillo de fondo curvo de una placa ELISA, realizando triplicados para cada concentración. Se agregó un control negativo en el cual se colocaron 50 µL de la suspensión de eritrocitos y 50 µL de solución fisiológica. La hemaglutina-

ción se observó luego de 1 h de incubación a temperatura ambiente (Rinderle, et al., 1989).

Determinación de la actividad antiproliferativa

Cultivo de las células Caco-2/TC7

Las células provenientes de epitelio colorrectal de adenocarcinoma humano, Caco-2/TC7, fueron cultivadas en frascos de plástico de 75 cm³ a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco BRL, Argentina), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Las células se incubaron hasta su crecimiento en confluencia, de tres a cinco días. Se trataron con tripsina utilizando tripsina-EDTA en buffer fosfato (PBS) y se resuspendieron en DMEM suplementado con SFB. Se colocaron 2,4x10⁴ células por pocillo en placas de 48 pocillos, se cultivaron hasta alcanzar confluencia utilizando DMEM como medio.

Ensayo de proliferación celular

La actividad antiproliferativa se midió mediante la evaluación del desprendimiento celular por tinción con cristal violeta, según Okajima et al. (1992), con algunas modificaciones.

Se ensayó la actividad de las siguientes muestras: aislado de *Amaranthus hypochondriacus*, aislado de *Amaranthus mantegazzianus*, lectina comercial y lectina parcialmente purificada. Para la preparación de los stocks de las muestras a ensayar se solubilizaron las muestras en DMEM y se agitaron durante 90 min en Thermomixer comfort (Eppendorf) a 650 rpm y 35 °C, pasándolas por vórtex cada 10 min. Se centrifugaron las muestras a 20000 g durante 20 min y se utilizó el sobrenadante. Las muestras stock se filtraron con un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro y se realizaron diluciones con el DMEM y DMEM + SFB (10%) para tener una concentración final constante de SFB de 1% en todas las diluciones ensayadas.

En la placa con el cultivo celular se colocaron 0,5 ml de DMEM + FBS (1%) en las fosas utilizadas como control negativo de actividad. Al resto de las fosas se le agregó 0,5 ml de las diluciones de las muestras ensayadas. Se incubaron 24 h a 37 °C y se realizaron lavados con PBS. Se incorporó glutaraldehído al 5% v/v en PBS para fijar las células y se agregaron 0,5 ml de colorante (cristal violeta 5 mg/ml en agua:metanol 75:25 v/v) a cada fosa, dejándolo 10 min en contacto con las células. Se lavaron las fosas con PBS y etanol, hasta ver que en los lavados no se extraía más colorante. Se agregaron 0,5 µL de buffer de extracción (0,1 M glicina/HCl pH=3, 30% v/v de metanol) en cada fosa y se dejó en placa agitadora durante 1 h. Luego se tomaron 0,2 ml de cada fosa, y se midió absorbancia a 590 nm.

Análisis estadístico de los resultados

Los resultados fueron analizados estadísticamente empleando el programa InfoStat. Se efectuaron análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias se realizó con el test de la menor diferencia significativa (LSD). Todos los ensayos descriptos anteriormente fueron realizados por lo menos por triplicado, salvo en aquellos casos donde se indicó lo contrario.

Resultados y Discusión

Obtención y purificación de lectina de *Amaranthus hypochondriacus*

La lectina de *A. hypochondriacus* fue aislada y purificada siguiendo el protocolo descrito para lectina de *A. caudatus* por Rinderle et al. (1989). Luego de la extracción con PBS y la precipitación con sulfato de amonio, se purificó por medio de una cromatografía de intercambio iónico.

El extracto crudo se separa en dos fracciones (Fracción A y Fracción B) luego de pasarlo por la columna de intercambio iónico. La Fracción A no queda retenida en la columna y eluye con buffer de baja fuerza iónica, mientras que la Fracción B eluye con el buffer de alta fuerza iónica. En la Figura 1 se muestra la separación obtenida en el intercambio iónico.

Para comprobar la presencia de lectina tanto en el extracto crudo como en las fracciones A y B se realizaron ensayos de hemaglutinación. Esta proteína tiene la capacidad de aglutinar los glóbulos rojos, por lo que una actividad positiva indica que la muestra analizada contiene lectina. Como control positivo de la hemaglutinación se utilizó una lectina comercial de *Amaranthus caudatus*. Como control negativo se utilizó solución fisiológica. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Es posible observar la presencia de lectina tanto en el extracto crudo como en la Fracción A obtenida luego del intercambio iónico, mientras que no se evidencia la presencia de lectina en la Fracción B, al menos en las concentraciones

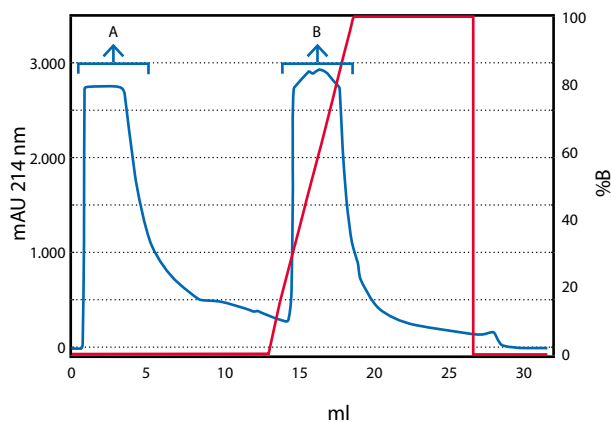


Figura 1. Cromatografía de intercambio aniónico del extracto crudo (Columna MonoQ 5/50 GL). Fracción A: fracción no retenida. Fracción B: fracción retenida que eluye con el gradiente. En línea roja se indica el gradiente salino.

ensayadas. Este resultado es acorde con lo informado por otros autores para lectinas extraídas de distintas especies de amaranto (Rinderle, et al., 1989; Singh, et al., 1993).

Tanto para la lectina comercial como para la fracción A se observa un efecto dosis respuesta, ya que al aumentar la concentración de proteína aumenta la hemaglutinación observada.

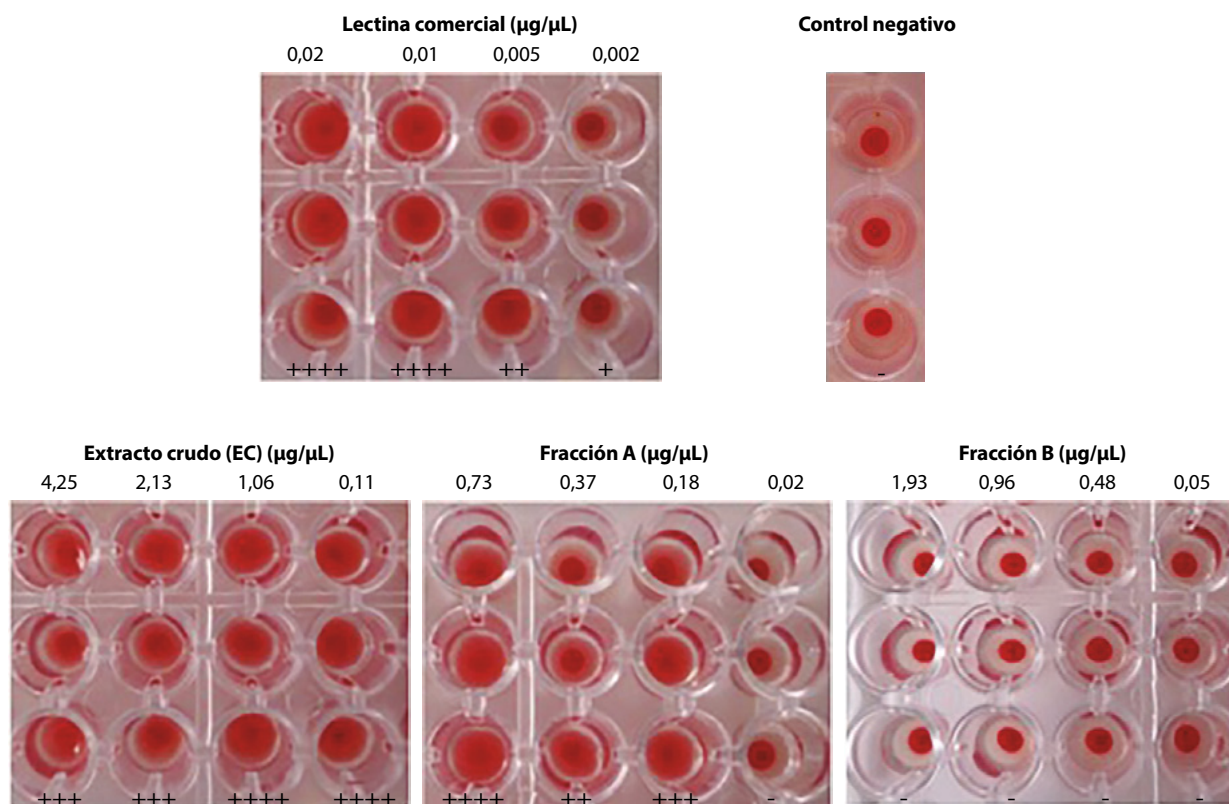


Figura 2. Ensayo de hemaglutinación. En la parte superior de las imágenes se indican las concentraciones ensayadas en µg/µl. En la parte inferior se indica cualitativamente el grado de hemaglutinación (++++ para el de mayor actividad y - para el que no posee actividad). La concentración de proteínas soluble se determinó utilizando el método de Lowry.

En el extracto crudo no se observa un comportamiento dosis-respuesta, sino una mayor actividad hemaglutinante a medida que la dilución aumenta. En esta muestra aún se encuentran presentes muchos compuestos de distinta naturaleza, lo que podría dar lugar a la presencia de algún interferente de hemaglutinación que, al diluirse, permitiría que la lectina actúe más y se exprese una mayor actividad hemaglutinante.

En base a los resultados obtenidos se puede expresar que la purificación por medio de la columna de intercambio aniónico resultó efectiva para eliminar parcialmente las impurezas que acompañaban a la lectina en el extracto crudo.

El progreso de la purificación de lectina se siguió también mediante electroforesis de las fracciones obtenidas. La Figura 3A presenta el perfil electroforético en condiciones no reductoras. Allí se puede ver la banda de lectina tanto en la muestra de lectina comercial (LC, aproximadamente 30 kDa), como en el extracto crudo (EC). La Figura 3B muestra el perfil electroforético en condiciones reductoras. En estas condiciones se observa que aumenta la intensidad de las bandas y mejoran en cuanto a su definición. La banda de lectina (de aproximadamente 30 kDa, señalada con una punta de flecha) aparece en la Fracción A y en menor medida en la Fracción B. De acuerdo a los datos informados por distintos autores, la lectina de amaranto es un homodímero formado por dos polipéptidos de entre 30 y 35 kDa unidos por interacciones no covalentes (Koeppel y Rupnow, 1988; Zenteno y Ochoa, 1988; Rinderle, et al., 1989; Rinderle, et al., 1990; Singh, et al., 1993; Singh, et al., 1994; Transue, et al., 1997). Sin embargo, en su secuencia contiene cisteínas que en presencia de un agente desnaturante y a pH alcalino en condiciones no reductoras podrían formar puentes disulfuro con otras cisteínas cercanas de otras moléculas de lectina o bien con cisteínas de polipéptidos de otras especies proteicas que se encuentren impurificando esta fracción, lo cual explicaría la variación en la intensidad de las bandas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede afirmar que la lectina eluye principalmente en la Fracción A obtenida en la cromatografía de intercambio iónico. Asimismo, es posible concluir que el paso de purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico fue efectivo, eliminando parte de las proteínas no deseadas que impurificaban la lectina.

Caracterización de lectina parcialmente purificada (LPP)

Se analizó el perfil cromatográfico de la fracción LPP mediante cromatografía de exclusión molecular; los resultados se presentan en las Figuras 4A y 4B. Se comparó el perfil cromatográfico de LPP con el de lectina comercial (LC) de *Amaranthus caudatus*.

El perfil cromatográfico de lectina comercial mostró un pico principal que se corresponde con especies de aproximadamente 59 kDa y dos picos de menor importancia de aproximadamente 7,6 y 2,7 kDa, respectivamente. La fracción LPP se separó en dos picos, uno de aproximadamente 67 kDa y el otro, más importante, de 11,5 kDa. Estos resultados se corresponden con los encontrados en bibliografía para la lectina de amaranto extraída de diferentes especies (Koeppel y Rupnow, 1988; Zenteno y Ochoa, 1988; Singh, et al., 1993; Singh, et al., 1994; Rinderle, et al., 1989; Rinderle, et al., 1990). De acuerdo a lo observado en el cromatograma correspondiente a LPP, podemos decir que en esta fracción aún hay especies diferentes a lectina contaminando la muestra. Estos contaminantes podrían ser de naturaleza proteica o no proteica, ya que para seguir la separación cromatográfica se midió la absorbancia a 214 nm, y a esta longitud de onda pueden absorber varios compuestos de distinta naturaleza.

El eluato obtenido se recolectó en fracciones (1-7) (Figura 4B) que fueron analizadas por SDS-PAGE. El gel resultante se muestra en la Figura 4C. Se puede observar cómo la banda

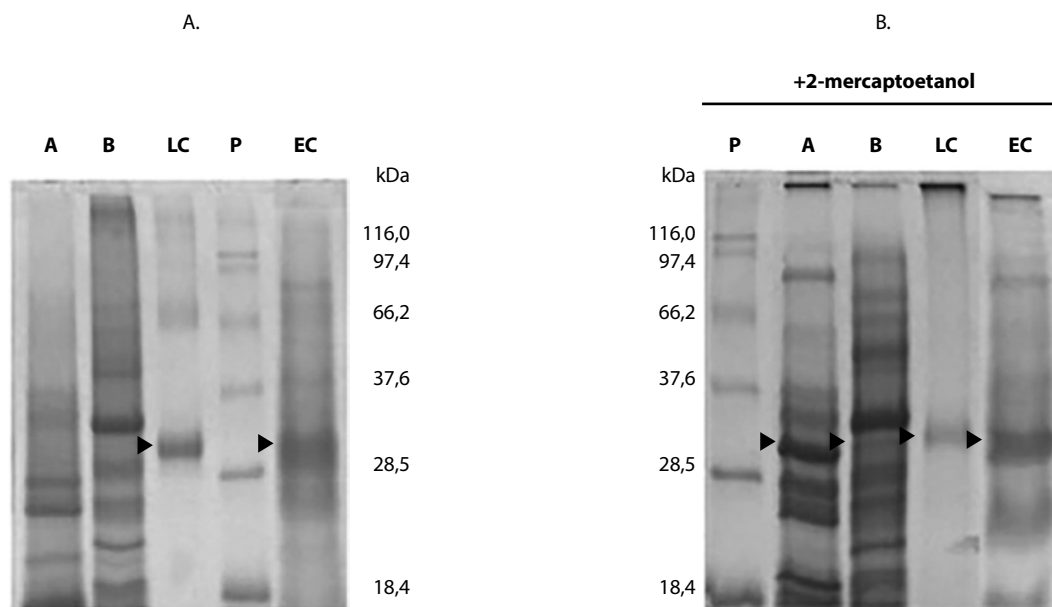


Figura 3. SDS-PAGE A) Sin 2-mercaptoetanol. B) Con 2-mercaptoetanol. P: patrón de bajo peso molecular; EC: extracto crudo; LC: lectina comercial; A: fracción A liofilizada; B: fracción B liofilizada. Las puntas de flechas indican la banda correspondiente a lectina.

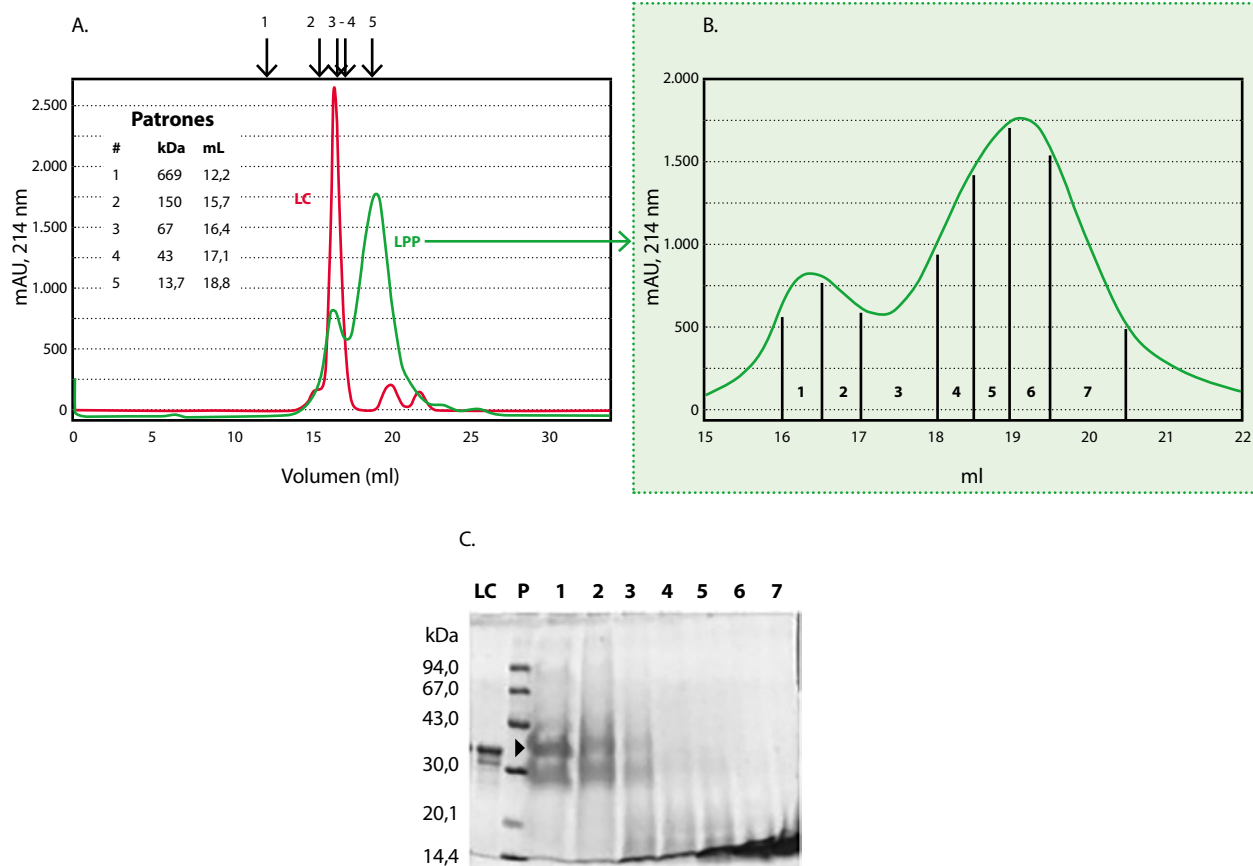


Figura 4. A. Cromatografía de exclusión molecular (Superosa 6HR 10/300 GL): LC: lectina comercial, LPP: lectina parcialmente purificada. Las flechas indican el volumen de elución (V_e , ml) de los patrones de peso molecular: 1 Tiroglobulina (669kDa, $V_e=12,2$ ml), 2 Aldolasa (158kDa, $V_e=15,7$ ml), 3 Albúmina bovina (67 kDa, $V_e=16,4$ ml), 4 ovoalbúmina (43 kDa, $V_e=17,1$ ml), 5 ribonucleasa (13,7 kDa, $V_e=18,8$ ml). B. Fracciones colectadas para LPP. C. SDS-PAGE de las fracciones colectadas. LC: lectina comercial; P: patrón de peso molecular, las masas de los patrones se indican a la izquierda de la figura.

correspondiente a lectina (señalada con una punta de flecha) va desapareciendo a medida que los volúmenes de elución aumentan. De acuerdo a estos resultados, se puede concluir que la lectina extraída de *Amaranthus hypochondriacus* es un dímero de masa aproximada 67 kDa formado por dos subunidades de aproximadamente 35 kDa, similar a la lectina comercial proveniente de *Amaranthus caudatus*. El segundo pico (11,5 kDa) presente en el perfil de LPP está compuesto por especies proteicas de baja masa molecular (señaladas con un círculo), aunque, como ya fue mencionado, pueden haber otras moléculas de origen no proteico que no son detectadas por esta técnica.

Determinación de actividad antiproliferativa

Tinción con cristal violeta

Este ensayo permite evidenciar la actividad antiproliferativa de distintos compuestos sobre diferentes líneas celulares. En este trabajo las muestras ensayadas fueron: aislado de *Amaranthus mantegazzianus* y de *Amaranthus hypochondriacus*, lectina comercial, lectina parcialmente purificada (LPP). Se utilizó la línea celular derivada de epitelio colorrectal de

adenocarcinoma humano, Caco-2/TC7. En la Figura 5 se muestra la actividad antiproliferativa, medida como porcentaje de crecimiento celular, en función de la concentración proteica (mg/ml) para las distintas muestras analizadas. Una disminución en el crecimiento celular refleja un aumento de actividad antiproliferativa. En la Tabla 1 se comparan los valores de IC_{50} obtenidos para las muestras en estudio.

Se puede observar que todas las muestras presentan un comportamiento dosis respuesta.

Tanto el aislado de *Amaranthus mantegazzianus* (Figura 5A) como el aislado de *Amaranthus hypochondriacus* (Figura 5B) presentan una actividad antiproliferativa significativa, que resulta mayor para el primer caso. Mientras que para el aislado de *Amaranthus mantegazzianus* el IC_{50} es de $0,32 \pm 0,03$ mg/ml, para el aislado de *Amaranthus hypochondriacus* su IC_{50} es de $0,77 \pm 0,09$ mg/ml.

La lectina comercial (Figura 5C) también presentó actividad antiproliferativa, llegando a aproximadamente un 40% de inhibición del crecimiento celular a los 0,25 mg/ml de concentración proteica. Esto indica que su IC_{50} es mayor que 0,25 mg/ml.

Para la lectina parcialmente purificada (LPP, Figura 5D), la actividad no es tan marcada como para los casos anteriores y la inhibición se da de una manera más gradual, llegando a un 20%

para una concentración de 3,18 mg/ml, por lo que no se pudo determinar un valor de IC₅₀. Sin embargo, se puede afirmar que este valor será superior a 3,18 mg/ml. La diferencia entre el comportamiento encontrado para el aislado y lectina parcialmente purificada de *Amaranthus hypochondriacus* podría explicarse considerando que en el aislado existen otros compuestos que podrían tener efecto antiproliferativo y de este modo ejercer un efecto sinérgico sobre las células. Por otra parte, no es posible descartar que entre los componentes que aún se encuentran impurificando la lectina exista algún compuesto proproliferativo que reduzca la acción de lectina sobre las células.

En un trabajo anterior (Quiroga, et al., 2015) se encontró que la lectina extraída de *Amaranthus mantegazzianus* tenía una actividad antiproliferativa equivalente a la encontrada para lectina comercial cuando se utilizó una línea celular de osteosarcoma de rata (UMR106). Unido a los resultados encontrados en este trabajo, donde el aislado de *A. mantegazzianus* es mucho más activo que el de *A. hypochondriacus* para la línea celular derivada de epitelio colorrectal de adenocarcinoma humano (Caco-2/TC7), se puede sugerir que las lectinas extraídas de estas variedades no serían equivalentes en cuanto a su capacidad antiproliferativa.

Ensayos preliminares que evalúan el posible mecanismo de acción de LPP y los aislados de *Amaranthus hypochondriacus* y *mantegazzianus* (resultados no mostrados) sugieren que esta proteína actuaría a nivel mitocondrial y lisosomal sobre las células tumorales, provocando efectos citotóxicos que conducirían a la muerte celular.

Muestras	IC ₅₀ (mg/ml)
AH	0,77 ^a ± 0,09
AM	0,32 ^b ± 0,03
LC	> 0,25
LPP	> 3,18

Letras diferentes en la columna IC₅₀ (mg/ml) implican diferencias significativas (p<0,05).

Tabla 1. Inhibición de la proliferación celular. IC₅₀: concentración de proteína que inhibe el 50% de la proliferación celular.

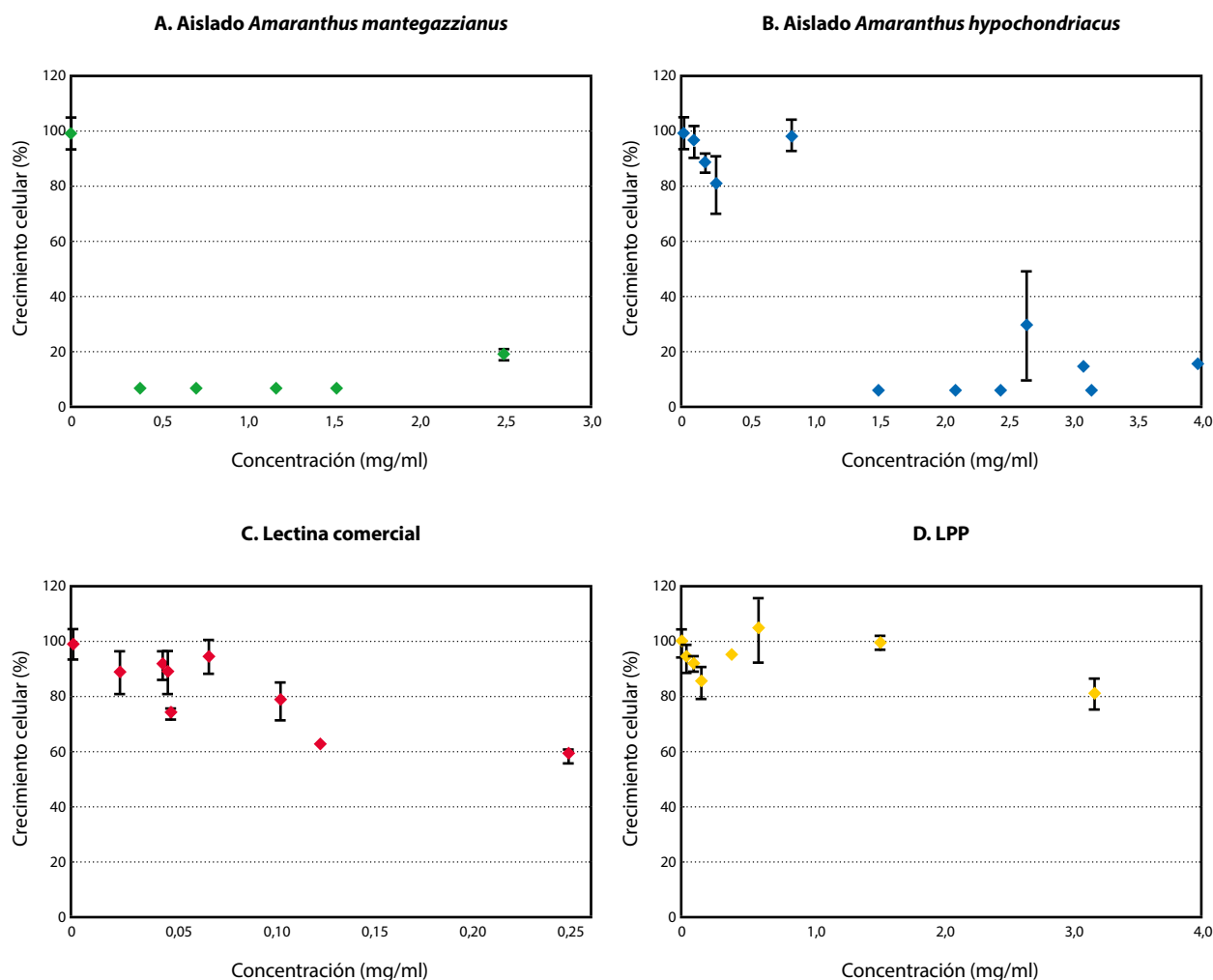


Figura 5. Actividad antiproliferativa. Tinción cristal violeta. A. Aislado de *Amaranthus mantegazzianus*. B. Aislado *Amaranthus hypochondriacus*. C. Lectina comercial. D. Lectina parcialmente purificada (LPP).

Conclusiones

De acuerdo a los objetivos propuestos, en este trabajo se logró purificar y caracterizar la lectina de *Amaranthus hypochondriacus*. Durante la caracterización de la muestra se determinó que la lectina es un dímero con peso molecular de aproximadamente 67 kDa (cada subunidad tiene una masa aproximada de 35 kDa) que se encuentra unido por interacciones no covalentes. El resultado obtenido es equivalente a lo informado en la bibliografía para la fracción lectina purificada a partir de otras especies de este cultivo (Koepe y Rupnow, 1988; Zenteno y Ochoa, 1988; Singh, et al., 1993; Singh, et al., 1994; Rinderle, et al., 1989; Rinderle, et al., 1990). El proceso de purificación realizado fue eficaz, ya que se pudo eliminar proteínas interferentes presentes en la muestra original (extracto crudo) manteniendo la actividad hemaglutinante. Sin embargo, comparando la actividad antiproliferativa del aislado de *Amaranthus hypochondriacus* con la de LPP, es posible observar que el protocolo de purificación utilizado conlleva a una pérdida de esta actividad. Esto podría deberse a la pérdida de algún compuesto que actúe sinérgicamente con la lectina en la actividad antiproliferativa.

Los resultados obtenidos para el aislado de *Amaranthus mantegazzianus*, con el que se logra obtener efectos sobre las células tumorales a menor concentración que para el aislado de *Amaranthus hypochondriacus*, sugieren profundizar en la investigación sobre cuál es el mecanismo de acción de la lectina proveniente de esta especie. Aunque existen en bibliografía datos que dan cuenta de la resistencia de algunas lectinas a la hidrólisis gastrointestinal (Wang, et al., 1998; González de Mejía y Prisco, 2005) se debe estudiar específicamente la resistencia de lectina de amaranto antes de aplicarla en la formulación de un ingrediente funcional.

Reconocimientos

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento recibido por parte de UNLP, CONICET y el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva mediante los proyectos: 11/X624 "Proteínas y lectinas de amaranto con potencial acción protectora sobre los sistemas cardiovascular y gastrointestinal", PIP 1109 "Proteínas y lectinas de amaranto con potencial acción protectora sobre los sistemas cardiovascular y gastrointestinal" y PICT 0937 "Péptidos vegetales con actividad antihipertensiva, inmunomoduladora y antiproliferativa. Acción biológica *in vivo*, mecanismos de acción y evaluación de su aplicación en alimentos funcionales".

Referencias

Barrio, D.A., y Añón, M.C., 2010. Potential antitumor properties if a protein isolate obtained from the seeds of *Amaranthus mantegazzianus*. En: *European Journal of Nutrition*, 49(2), pp.73-82.

Bhuria, S.K., y Maiti, T.K., 2008. Targeting tumors with peptides from natural sources. En: *Trends in Biotechnology*, 26(4), pp.210-217.

Caselato-Sousa, V.M. y Amaya-Farfán, J., 2012. State of knowledge on amaranth grain: a comprehensive review. En: *Journal of Food Science*, 77(4), pp.R93-R104.

Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G. y Añón, M.C., 2011.

Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. En: *Food Chemistry*, 126(3), pp.878-884.

García Fillería, S.F. y Tironi, V.A., 2015. Application of amaranth protein isolate and hydrolysate on a reduced salt fish restructured product: Antioxidant properties, textural and microbiological effects. En: *International Journal of Food Science and Technology*, 50(6), pp.1452-1460.

González de Mejía, E. y Dia, V.P., 2010. The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. En: *Cancer Metastasis Reviews*, 29, pp.511-528.

González de Mejía, E. y Prisco, V.I., 2005. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. En: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(6), pp.425-445.

Hernández-Ledesma, B., Hsieh, C.C., y de Lumen, B.O., 2009. Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. En: *Peptides*, 30(2), pp.426-430.

Instituto Nacional del Cáncer, Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación, 2012 *Estadísticas: análisis de la situación del cáncer en Argentina*. [En línea]. Buenos Aires: INC. [Consulta: 1 de Agosto de 2015]. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/inc/index.php/acerca-del-cancer/estadisticas>.

International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Globocan, 2012. *Estimated Cancer Incidence Mortality and Prevalence Worldwide*. [En línea]. Francia: IARC. [Consulta: 1 de agosto de 2015]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.

Kaur, N., Dhuna, V., Kamboj, S.S., Agrewala, J.N. y Singh, J., 2006. Lunasin, a novel antiproliferative and antifungal lectin from *Amaranthus viridis* Linn seeds. En: *Protein and Peptide Letters*, 13(9), pp.897-905.

Kobayashi, H., 2013. Prevention of cancer and inflammation by soybean protease inhibitors. En: *Frontiers in Bioscience - Elite*, 5E(3), pp.966-973.

Koepe, S.J., y Rupnow, J.H., 1988. Purification and characterization of a lectin from the seeds of amaranth (*Amaranthus cruentus*). En: *Journal of Food Science*, 53, pp.1412-1417.

Lam, S.K., y Ng, T.B., 2011. Lectins: production and practical applications. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(1), pp.45-55.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. En: *Nature*, 227(5259), pp.680-685.

Lipkin, A., Anisimova, V., Nikonorova, A., Babakov, A., Krause, E. y Bienert, M., 2005. An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. En: *Phytochemistry*, 66(20), pp.2426-2431.

Liu, B., Bian, H.J. y Bao, J.K., 2010. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. En: *Cancer Letters*, 287(1), pp.1-12.

Martínez, E.N. y Añón, M.C., 1996. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, pp.2523-2530.

Okajima, T., Nakamura, K., Zhang, H., Ling, N., Tanabe, T. y Yasuda, T., 1992. Sensitive colorimetric bioassays for insulin-like growth factor (IGF) stimulation of cell proliferation and glucose consumption: use in studies of IGF analogs. En: *Endocrinology*, 4, pp.2201-2212.

- Orsini Delgado, M.C., Galleano, M., Añón, M.C. y Tironi, V.A., 2015. Amaranth peptides from simulated gastrointestinal digestion: antioxidant activity against reactive species. En: *Plant Foods for Human Nutrition*, 70, pp.27-34.
- Orsini Delgado, M.C., Tironi, V.A., y Añón, M.C., 2011. Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. En: *LWT-Food Science and Technology*, 44(8), pp.1752-1760.
- Quiroga, A.V., Aphalo, P., Ventureira, J.L., Martínez, E.N., y Añón, M.C., 2012. Physicochemical, functional and angiotensin converting enzyme inhibitory properties of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) 7S globulin. En: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(2), pp.397-403.
- Quiroga, A.V., Barrio, D.A., y Añón, M.C., 2015. Amaranth lectin presents potential antitumour properties. En: *LWT-Food Science and Technology*, 60, pp.478-485.
- Rastogi, A. y Shukla, S., 2013. Amaranth: a new millenium crop of nutraceutical values. En: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(2), pp.109-125.
- Rinderle, S.J., Goldstein, I.J., Mattag, K.L. y Ratcliffe, R.M., 1989. Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that Recognizes the T- (or Cryptic T)-Antigen. En: *The Journal of Biological Chemistry*, 264(27), pp.16123-16131.
- Rinderle, S.J., Goldstein, I.J. y Remsed, E.E., 1990. Physicochemical Properties of Amaranthin, the Lectin from *Amaranthus caudatus* seeds. En: *Biochemistry*, 29, pp.10555-10561.
- Sabbione, A.C., Scilingo, A.A. y Añón, M.C., 2015. Potential antithrombotic activity detected in Amaranth proteins and its hydrolysates. En: *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), pp.171-177.
- Silva-Sánchez, C., Barba de la Rosa, A.P., León-Galván, M.F., De Lumen, B.O., De LeónRodríguez, A. y González de Mejía, E., 2008. Bioactive peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp.1233-1240.
- Singh, J., Kamboj, K.K., Kamboj, S.S., Sandhu, R.S. y Shangary, S., 1993. Affinity purification and characterization of lectins from two *Amaranthus* species. En: *Plant Science*, 94, pp.47-53.
- Singh, J., Kamboj, K.K., Kamboj, S.S., Shangary, S. y Sandhu, R.S., 1994. *Amaranthus hypochondriacus* and *A. tricolor* lectins: Isolation and characterization. En: *Italian Journal of Biochemistry*, 43(5), pp.207-218.
- Tironi, V.A. y Añón, M.C., 2014. Antioxidant activity of amaranth protein hydrolysate against thermal oxidation of vegetable oils. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(9), pp.1583-1594.
- Transue, T.R., Smith, A.K., Mo, H., Goldstein, I.J. y Saper, M.A., 1997. Structure of benzyl Tantigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. En: *Nature structural biology*, 4(10), pp.779-783.
- Wang, Q., Yu, L.G., Campbell, B.J., Milton, J.D. y Rhodes, J.M., 1998. Identification of intact peanut lectin in peripheral venous blood. En: *Lancet*, 352(9143), pp.1831-1832.
- World Cancer Research Fund International. American Institute for Cancer Research, 2007. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: AICR.
- Yu, L.G., Milton, J.D., Fernig, D.G. y Rhodes, J.M., 2001. Opposite effects on human colon cancer cell proliferation of two dietary Thomse-Friedenreich antigen-binding lectins. En: *Journal of Cellular Physiology*, 186(2), pp.282-287.
- Zenteno, E. y Ochoa, J.L., 1988. Purification of a lectin from *Amaranthus leucocarpus* by affinity chromatography. En: *Phytochemistry*, 27, pp.313-317. Barrio, D.A., y Añón, M.C., 2010. Potential antitumour properties if a protein isolate obtained from the seeds of *Amaranthus mantegazzianus*. En: *European Journal of Nutrition*, 49(2), pp.73-82.

Simulación de la convección natural en un horno eléctrico

Simulation of the natural convection in an electrical oven

Goñi, Sandro M., (1) Salvadori, Viviana O. (1)

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) CCT-CONICET, Universidad Nacional de La Plata, Argentina – Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Contacto: smgoni@quimica.unlp.edu.ar

RECIBIDO: 29/2/2016 – APROBADO: 4/7/2016

Resumen

Los productos cárnicos y panificados son de consumo masivo en numerosos países y suponen un consumo de energía elevado y, cada vez en mayor medida, el uso hornos eléctricos. En este sentido, es importante desarrollar hornos eficientes. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo preliminar de la fluido-dinámica por convección natural dentro de un horno eléctrico. Se utilizó un horno doméstico para los experimentos y dada la simetría del horno en las simulaciones numéricas se trabajó con un cuarto del volumen real. Para calcular el flujo de aire en el interior del horno se adoptó un modelo 3D de flujo laminar incompresible, acoplado el balance de energía, y la aproximación de Boussinesq para describir las fuerzas de flotación. En el balance de energía se impuso la temperatura en el techo y el piso, y en la pared y la puerta se estableció pérdida de energía por convección. El modelo se validó aceptablemente con determinaciones experimentales de perfiles de temperatura en diferentes posiciones del horno. Las variaciones de temperaturas observadas experimentalmente sugieren que el modelo laminar y la aproximación de Boussinesq están al límite de sus posibilidades, por lo cual se prevé en futuros trabajos usar modelos de turbulencia.

Palabras clave: Consumo energético, hornos eléctricos, fluido-dinámica.

Abstract

Meat and bakery products are widely consumed in many countries and this process presents a high energy consumption. At the same time the use of electric ovens is increasing. In this regard, the development of efficient ovens becomes more important.

The aim of this work was to develop a preliminary model of the natural convection fluid-dynamics in an electric oven. A domestic oven was employed in the experiments and for simulation purposes a model of a quarter of its actual volume was employed. The air flow inside the oven was described using a laminar incompressible 3D model coupled to the energy balance, using the Boussinesq approximation to describe buoyancy forces. In the energy balance the temperature was imposed on the roof and the floor, whilst energy loss by convection was established at the side walls and the door. The model was reasonably validated with temperature profiles measured in different positions in the oven. The measured temperature variations indicate that the laminar model and the Boussinesq approximation are hardly applicable, then turbulence models will be used in future works.

Keywords: Energy consumption, electric ovens, fluid-dynamics.

Introducción

La cocción de alimentos en hornos es un proceso ampliamente utilizado en numerosos países, tanto a nivel hogareño como a nivel industrial. El horneado se aplica principalmente a productos panificados y cárnicos, los cuales son de consumo masivo. Bajo esta forma de cocción, los productos adquieren características organolépticas únicas y deseables, entre ellas la formación de una corteza superficial deshidratada característica y el desarrollo de sabores y aromas, las cuales no pueden ser obtenidas con ninguna otra técnica de cocción. A su vez, el horneado demanda un alto consumo energético (Goñi y Salvadori, 2012), debido a las altas temperaturas de operación empleadas (por lo general entre 180 y 250 °C). La energía consumida durante el proceso se

divide en energía transferida al producto y pérdidas al ambiente. La energía transferida al producto se usa para su calentamiento, de manera tal de alcanzar algún valor de temperatura preestablecido, como una temperatura de seguridad microbiológica, o requerido por el proceso, como la temperatura de gelatinización del almidón en los productos panificados. Al mismo tiempo, una parte de la energía consumida por el producto se vincula a su deshidratación. En los alimentos panificados y cárnicos se verifica, por un lado, una elevada pérdida de peso debida a la evaporación de agua, lo que representa un alto consumo energético, pudiendo ser el calor latente mayor que el calor sensible intercambiado. Por otro lado, parte de la energía usada por el

equipo se pierde hacia el ambiente, a través de las paredes del equipo y durante la apertura-cierre de la puerta. Estas pérdidas pueden llegar a ser considerables, de más del 50% (Goñi y Salvadori, 2014). El uso de hornos eléctricos se está incrementando gradualmente, por diversos factores. En primer lugar, el gas natural o el gas licuado son combustibles no renovables, por lo cual se está tendiendo a disminuir su uso. Además, los hornos eléctricos tienen una gran variedad de tamaños (de unos 15 l a más de 100 l), características (con o sin termostato, temporizador, selector de resistencias, potencias, *spiedo*, etcétera) y precios, son portátiles y se pueden usar en diferentes lugares, las instalaciones son considerablemente más simples, y para emprendimientos comerciales son más fáciles de implementar y habilitar, entre otros factores.

La tendencia mundial de clasificación, identificación y etiquetado de equipos en función de su eficiencia energética y/o de su consumo energético no se aplica a toda la gama de hornos disponibles. Solo el segmento más alto tiene algún tipo de clasificación energética. Considerando todos estos aspectos en forma conjunta, se percibe una oportunidad y una necesidad de realizar estudios de eficiencia energética de este tipo de equipos, tendiente a promover su clasificación energética. Esta información puede usarse de diferentes formas: para informar al consumidor, para informar a los organismos energéticos y de control estatales sobre el estado de situación, y, más importante, para asistir al Estado en la formulación de políticas o regulaciones tendientes a establecer estándares mínimos de eficiencia energética a los fabricantes e importadores de equipos.

Este trabajo se focaliza en el estudio de la fluido-dinámica dentro de los hornos, la cual es una valiosa herramienta para el estudio y diseño de hornos más eficientes (Mistry, et al., 2006, 2011; Khatir, et al., 2013). Desde hace varios años, el incremento de la capacidad de cálculo de las computadoras y el surgimiento de programas comerciales o gratuitos para resolver las ecuaciones de movimiento han favorecido este estudio (Norton, et al., 2006). Este ha sido abordado por diferentes autores que consideraron tanto únicamente la fluido-dinámica del horno como la interacción con un producto (Verboven, et al., 2000; Boulet, et al., 2010; Chhanwal, et al., 2010, 2011; Marra, et al., 2010; Smolka, et al., 2010; Paton, et al., 2013; Smolka, 2013; Ateeque, et al., 2014; Tzempelikos, et al., 2015).

En este trabajo se realizó un modelo simplificado preliminar de un horno eléctrico convectivo, usando un modo de cocción por convección natural. Se realizaron pruebas experimentales para la validación del modelo y los resultados obtenidos fueron satisfactorios.

Materiales y Métodos

Determinaciones experimentales de temperatura

Se utilizó un horno eléctrico de tipo doméstico de gama alta, marca ARISTON (FM87-FC, Italia). Este horno posee una cámara de cocción con longitudes efectivas de 0,435 m de ancho, 0,39 m de profundidad y 0,36 m de altura (Figura 1) y permite seleccionar uno entre siete modos de cocción. En este trabajo las experiencias se realizaron usando el modo de cocción convencional o natural, por medio del cual diferentes resistencias eléctricas calientan el aire de la cámara del horno y el movimiento del aire se produce por convección natural, debido a diferencias de densidad causadas por el calentamiento.



Figura 1. Horno eléctrico utilizado en las determinaciones experimentales, con las termocuplas colocadas.

Se midió la temperatura en diferentes posiciones del horno cada 5 seg utilizando termocuplas J y un adquisidor de datos FieldLogger (NOVUS Automation Inc., Brasil) conectado a una PC. Las determinaciones se realizaron partiendo desde un estado de reposo durante el tiempo suficiente para que se produzcan varios ciclos de actuación del sistema de control del horno en torno al valor de temperatura deseado. Cabe aclarar que se trabajó con el horno vacío, dado que el modelo a validar solo contempla los balances en el aire sin considerar la cocción o calentamiento de un alimento. Asimismo, se seleccionaron temperaturas bajas de manera tal de disminuir los aportes de energía por radiación, los cuales no fueron considerados en el modelo.

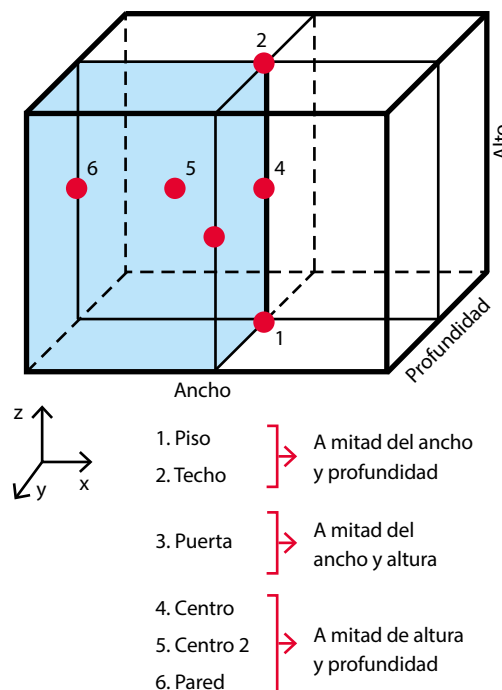


Figura 2. Representación esquemática de las posiciones de las termocuplas en la cámara del horno. Las termocuplas del piso (1) y del techo (2) se colocaron en contacto con las paredes; la termocupla de la pared (6) y de la puerta (3) se ubicaron a 5 mm de las respectivas superficies.

Las posiciones de medición de temperatura se representan esquemáticamente en la Figura 2. No se realizaron mediciones de velocidad dado que no se dispone de equipamiento que soporte las temperaturas de operación empleadas en el horno. Adicionalmente, se realizaron medidas adicionales de temperatura en diferentes superficies internas del horno usando una cámara termográfica TESTO 875 (TESTO, Alemania).

Modelado matemático

Se consideró de forma preliminar que existen dos planos de simetría: uno perpendicular a la puerta (plano yz), a la mitad del ancho del horno, y el otro paralelo a la puerta (plano xz), a la mitad de la profundidad. Con estos supuestos se representó el horno usando una cuarta parte de su volumen. La aproximación final se observa en la Figura 3. En este trabajo preliminar no se incorporaron detalles de la geometría del horno, como resistencias, soporte de rejillas y bandejas, etcétera, debido a que aumentan considerablemente el costo computacional para resolver el modelo.

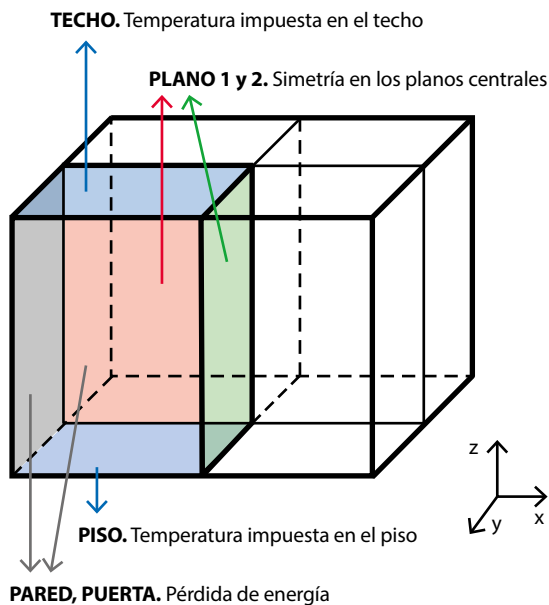


Figura 3. Aproximación tridimensional de la geometría del horno y detalles de sus fronteras y condiciones de contorno.

El movimiento del aire dentro del horno se obtiene resolviendo el balance de cantidad de movimiento, más conocido como ecuaciones de Navier-Stokes (Ec. (1)), dentro de la cámara del horno. En este trabajo se consideró que, dadas las pequeñas variaciones de presión en el interior del horno, puede considerarse al aire como un fluido incompresible; en consecuencia, no hay acumulación local de materia, lo que se describe mediante la ecuación de continuidad (Ec. (2)). En función del rango de velocidad del aire se adoptó régimen laminar. Más allá del supuesto de fluido incompresible, las variaciones de temperatura también afectan a la densidad del aire y, por ende, a las fuerzas de flotación, lo cual se puede modelar con diferentes grados de aproximación (Ferziger y Perić, 2002). Estas fuerzas, que determinan el movimiento del fluido en este sistema, se introdujeron usando la aproximación de Boussinesq (Ec. (3)), según la cual las fuerzas de flotación

son proporcionales a la diferencia de temperatura respecto de un estado de referencia.

La variación local de temperatura se obtuvo resolviendo el balance de energía (Ec. (4)) en conjunto con el balance de cantidad de movimiento.

$$\rho \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + \rho \vec{u} \cdot \nabla \vec{u} = \nabla \cdot (\mu(\nabla \vec{u} + (\nabla \vec{u})^T)) - \nabla \cdot p + \vec{F} \quad (1)$$

$$\nabla \cdot \vec{u} = 0 \quad (2)$$

$$\vec{F} = \rho_{Ref} \vec{g} (\beta(T - T_{Ref}) - 1) \quad (3)$$

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} + \rho C_p \vec{u} \cdot \nabla T = \nabla \cdot (k \nabla T) \quad (4)$$

donde ρ es la densidad del aire, μ es la viscosidad, β es el coeficiente de expansión volumétrica, C_p es la capacidad calorífica, k es la conductividad térmica, \vec{u} es el vector velocidad en las tres direcciones, $\vec{u} = (v_x, v_y, v_z)$, y la fuerza solo actúa en dirección vertical, dado $\vec{g} = (0; 0; 9,8)$. Como temperatura de referencia T_{Ref} se usó la temperatura inicial del sistema, por lo cual la fuerza de flotación es nula inicialmente, y la densidad de referencia ρ_{Ref} se calculó a dicha temperatura.

Las condiciones de contorno para el balance de cantidad de movimiento se establecieron como (ver nombres de fronteras en la Figura 3):

Velocidad nula en el TECHO, PARED, PUERTA, PISO:

$$\vec{u} = 0 \quad (5)$$

Simetría en los planos centrales (PLANO 1 y 2), donde \vec{n} es el vector normal exterior a la superficie:

$$\vec{n} \cdot \vec{u} = 0 \quad (6)$$

Las condiciones de contorno para el balance de energía se establecieron como:

Flujo de Energía en la PARED y la PUERTA. Se estableció pérdida de energía por convección al ambiente usando un coeficiente de transferencia de energía $h_{Efectivo}$ y \vec{q} es el flujo total de energía. La temperatura ambiente T_{Amb} se estableció igual a la temperatura inicial del sistema. Los valores de $h_{Efectivo}$ fueron diferentes para la puerta y la pared y el más alto fue para la puerta. Estos valores tuvieron en cuenta el material y espesor de la pared y la puerta y los coeficientes de transferencia para el exterior y el interior estimados a partir de correlaciones.

$$\vec{n} \cdot \vec{q} = h_{Efectivo}(T - T_{Amb}) \quad (7)$$

Simetría en los planos centrales (PLANO 1 y 2):

$$\vec{n} \cdot \vec{q} = 0 \quad (8)$$

Temperatura Impuesta en el TECHO y el PISO. La temperatura de estas fronteras se estableció con los valores obtenidos experimentalmente.

$$T_{Piso} = T_P(t) \quad (9)$$

$$T_{Techo} = T_T(t) \quad (10)$$

El modelo se implementó en el software COMSOL™ MultiPhysics versión 3.2, el cual utiliza el método de elementos finitos. Se realizaron numerosas pruebas de mallado y estrategias de resolución para lograr resultados aceptables en tiempos de simulación relativamente bajos.

Resultados y Discusión

Antes de realizar las pruebas experimentales orientadas a validar el modelo matemático se realizaron numerosas simulaciones con el objetivo de verificar la factibilidad del esquema numérico planteado. Así, se adoptaron diferentes combinaciones de temperaturas del techo y del piso (iguales o diferentes, constantes o variables, etcétera), resistencias prendidas/apagadas (temperatura impuesta o flujo nulo), distintos valores del coeficiente efectivo de transferencia de energía, diferentes mallados, etcétera. El modelo pudo ser resuelto, con mayor o menor dificultad, en todos los casos.

La Figura 4 muestra los perfiles de temperatura experimentales obtenidos durante una prueba fijando 100 °C en el control del horno. Como puede observarse, la temperatura en el piso del horno se incrementa rápidamente y sobrepasa los 220 °C, hasta que comienza a actuar el sistema de control del horno. Similarmente, la temperatura del techo también pasa los 100 °C, pero en menor medida. A tiempos largos la temperatura en el piso varió entre 120 y 160 °C, con periodos de aproximadamente 9 min, mientras que la temperatura en el techo lo hizo entre 110 y 130 °C. Inicialmente, el sistema de control del horno mantiene las resistencias encendidas hasta que el sensor de temperatura del equipo, ubicado en la parte central trasera, alcanza la temperatura deseada. Este retardo produce que las zonas cercanas a las resistencias estén a mucha mayor temperatura que la deseada. Con la cámara del horno vacía, la circulación de aire es más alta, por lo cual se prevé que con bandejas, etcétera, el sensor tarde más en registrar la temperatura deseada. La temperatura experimental más baja fue la registrada en las cercanías de la puerta del horno, lo cual indica que es una de las posiciones por donde se pierde mayor cantidad de energía.

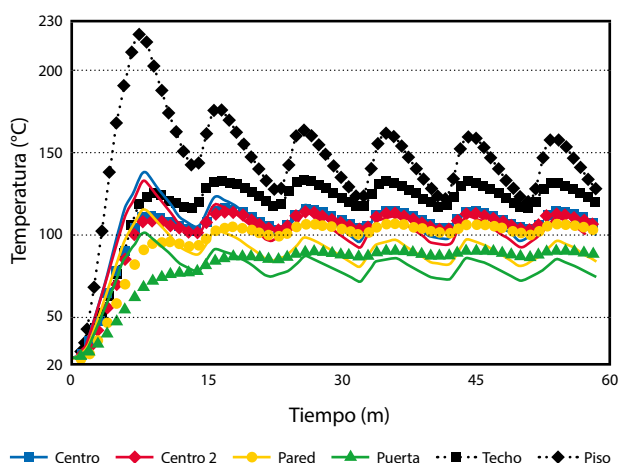


Figura 4. Variación de temperatura experimental (símbolos, cada 1 minuto) y simulada (líneas continuas) en diferentes posiciones del horno (dadas en diferentes colores). La temperatura simulada en el piso y el techo es igual que la experimental, dado que se usó condición de contorno prescripta.

El modelo final empleado para comparar con los resultados experimentales fue mallado con aproximadamente 115000 elementos tetraédricos (730000 incógnitas). El tiempo de simulación de 1 hora de proceso varió entre 2 y 3 h, usando una PC de escritorio común (INTEL i5 2,67 GHz, 10 GB RAM). La frecuencia de variación de la temperatura simulada claramente coincide con la experimental, dado que se usaron estos perfiles en las condiciones de contorno del modelo. Para representar más adecuadamente el sistema se puede modelar también el sistema de control, de manera tal de poder usar el modelo sin la necesidad de contar con los perfiles experimentales a temperaturas arbitrarias.

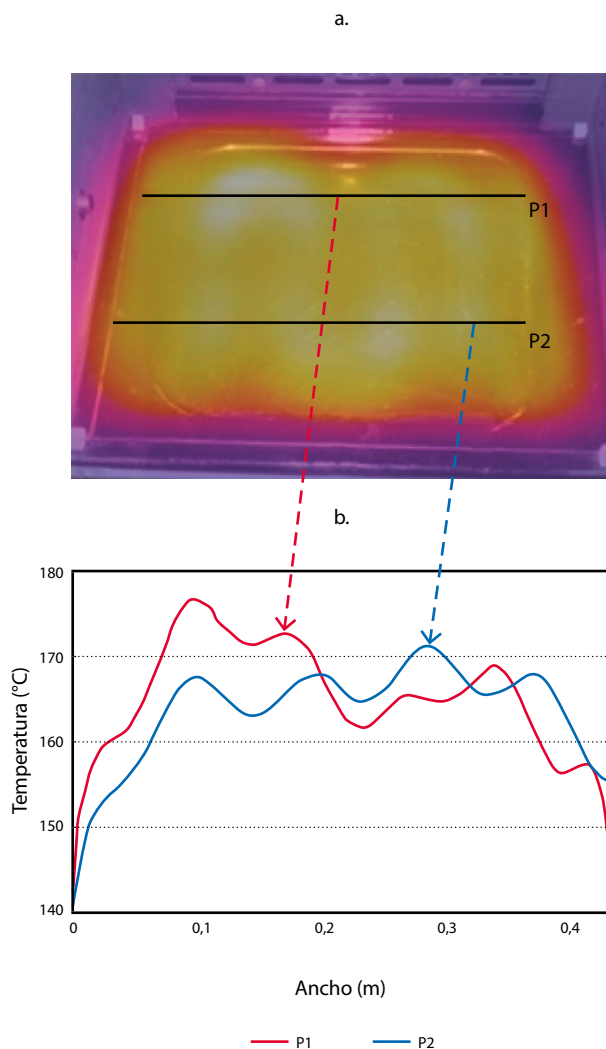


Figura 5. a) Superposición de imagen térmica y visible, mostrando la distribución de temperatura en el piso del horno. b) Variación de temperatura a lo largo del piso del horno en dos líneas arbitrarias (expresadas arriba).

Luego de que comienza a actuar el sistema de control del horno, la temperatura media experimental en el centro fue de 109,3 °C, variando entre 103,2 y 115,4 °C, y la simulada fue de 105,75 °C, variando entre 95,39 y 115,90 °C. La temperatura simulada promedio integrada en el volumen del horno varió entre ~95 y ~114 °C, lo cual es muy cercano a la temperatura medida en el centro del horno. Las diferencias

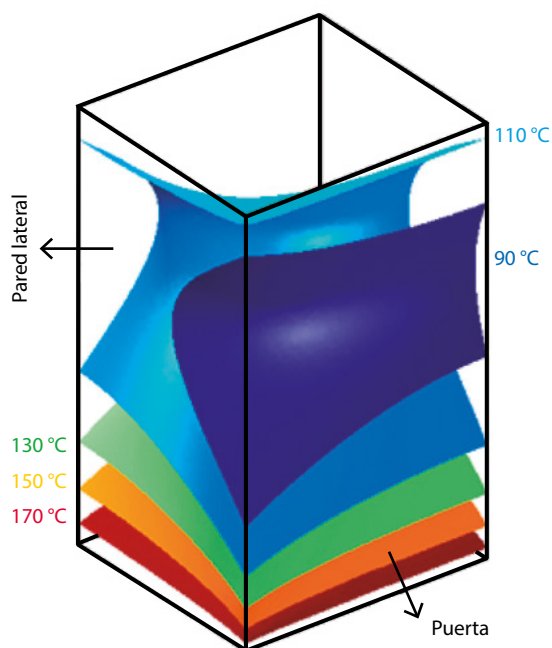


Figura 6. Perfiles de temperatura (constante) obtenidos con el modelo matemático, a 10 min de proceso.

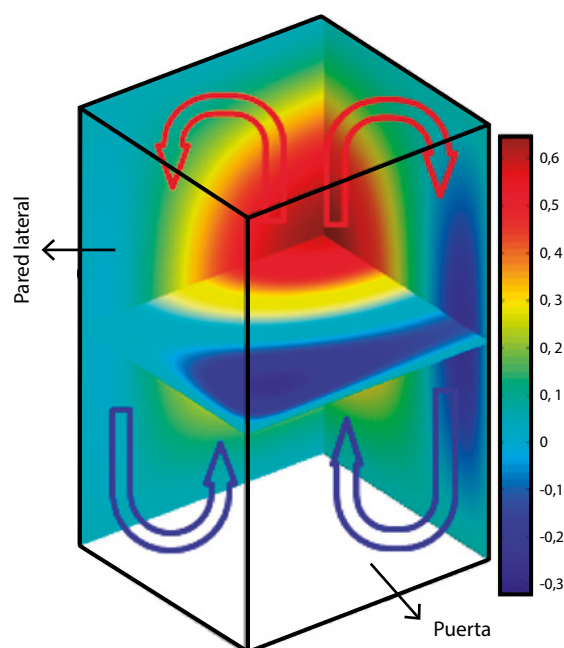


Figura 7. Perfil de velocidad vertical obtenido con el modelo, a 10 minutos de proceso.

de temperatura absoluta promedio en los distintos puntos fue de 5,8 °C para el centro, 10,1 °C en las cercanías de la puerta, 12,9 °C en las cercanías de la pared y 7,2 °C entre el centro y la pared. Las diferencias observadas entre los perfiles experimentales y simulados se deben a múltiples factores, entre ellos las propiedades térmicas y la aproximación de las fuerzas de flotación, la aproximación de las condiciones de contorno del balance de energía y la simplificación de la geometría. Se impuso la temperatura en el techo y el piso de manera uniforme, lo cual determina un flujo de energía distinto al real. Esto se debe a que no todo el piso está a la temperatura medida, sino que puede haber zonas con menor o mayor temperatura, dado que la resistencia eléctrica no es uniforme en todo el piso, como puede verse en la Figura 5. Por otro lado, en el techo se puede mejorar el modelo incorporando las resistencias a la geometría.

La Figura 6 muestra los perfiles de temperatura simulados a 10 min de proceso; el perfil de 90 °C se encuentra más cercano a la puerta, donde hay mayores pérdidas de energía, lo cual coincide con los resultados experimentales.

La Figura 7 presenta tres planos (en los planos de simetría y a la altura media del horno) de velocidad vertical a 10 min de proceso; se observa que el aire asciende por el centro y desciende por el lado de las paredes laterales y la puerta. La velocidad de ascenso es más alta, probablemente debido a que esta región ocupa menos espacio.

Conclusiones

El modelo implementado resultó efectivo y relativamente rápido, considerando la complejidad del problema, para simular el comportamiento del horno simplificado. El error relativo global, medido como la diferencia entre la

temperatura media experimental y la simulada, respecto del valor medio experimental fue menor al 10%, el cual puede considerarse un error aceptable teniendo en cuenta las suposiciones del modelo. Sin embargo, dadas las grandes variaciones de temperaturas y la variación temporal de las condiciones de contorno, el modelo laminar y la aproximación de Boussinesq están al límite de sus posibilidades para poder representar adecuadamente el perfil de velocidad y de temperatura. Asimismo, si se incorporaran más detalles del horno, como rejillas, esto puede conducir a regiones donde el modelo laminar no sea aplicable. Por este motivo se prevé en futuros trabajos incorporar el uso de modelos de turbulencia.

Reconocimientos

Este trabajo se financió con fondos provenientes del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 11220120100180), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT PICT 2013-1637) y Universidad Nacional de La Plata (UNLP, I183).

Referencias

- Ateeque, Md., Udayraj, Mishra, R. K., Chandramohan, V. P. y Talukdar, P., 2014. Numerical modeling of convective drying of food with spatially dependent transfer coefficient in a turbulent flow field. En: *International Journal of Thermal Sciences*, 78, pp.145-157.
- Boulet, M., Marcos, B., Dostie, M. y Moresoli, C., 2010. CFD modeling of heat transfer and flow field in a bakery pilot oven. En: *Journal of Food Engineering*, 97(3), pp.393-402.

- Chhanwal, N., Anishaparvin, A., Indrani, D., Raghavarao, K.S.M.S. y Anandharamakrishnan, C., 2010. Computational fluid dynamics (CFD) modeling of an electrical heating oven for bread-baking process. En: *Journal of Food Engineering*, 100(3), pp.452-460.
- Chhanwal, A., Indrani, D., Raghavarao, K.S.M.S. y Anandharamakrishnan, C., 2011. Computational fluid dynamics modeling of bread baking process. En: *Food Research International*, 44(4), pp.978-983.
- Ferziger, J. H. y Perić, M., 2002. *Computational methods for fluid dynamics*. Berlin: Springer-Verlag.
- Goñi, S. M. y Salvadori, V. O., 2012. Model-based multi-objective optimization of beef roasting. En: *Journal of Food Engineering*, 111(1), pp.92-101.
- Goñi, S.M. y Salvadori, V.O., 2014. Energy consumption estimation during oven cooking of food. En: Reiter, S., ed. *Energy consumption: impacts of human activity, current and future challenges, environmental and socio-economic effects*. New York: Nova Science Publishers. pp.99-116.
- Khatir, Z., Paton, J., Thompson H., Kapur, N. y Toropov, V., 2013. Optimisation of the energy efficiency of bread-baking ovens using a combined experimental and computational approach. En: *Applied Energy*, 112, pp.918-927.
- Marra, F., De Bonis, M.V. y Ruocco, G., 2010. Combined microwaves and convection heating: a conjugate approach. En: *Journal of Food Engineering*, 97(1), pp.31-39.
- Mistry, H., Ganapathi-subbu, Dey, S., Bishnoi, P., Castillo, J.L., 2006. Modeling of transient natural convection heat transfer in electric ovens. En: *Applied Thermal Engineering*, 26(17-18), pp.2448-2456.
- Mistry, H., Ganapathisubbu, S., Dey, S., Bishnoi, P. y Castillo, J.L., 2011. A methodology to model flow-thermals inside a domestic gas oven. En: *Applied Thermal Engineering*, 31(1), pp.103-111.
- Norton, T. y Sun, D.-W. 2006. Computational fluid dynamics (CFD) - an effective and efficient design and analysis tool for the food industry: A review. En: *Trends in Food Science & Technology*, 17(20), pp. 600-620.
- Paton, J., Khatir, Z., Thompson H., Kapur, N. y Toropov, V., 2013. Thermal energy management in the bread baking industry using a system modelling approach. En: *Applied Thermal Engineering*, 53(2), pp.340-347.
- Smolka, J., Nowak, A.J. y Rybarz, D., 2010. Improved 3-D temperature uniformity in a laboratory drying oven based on experimentally validated CFD computations. En: *Journal of Food Engineering*, 97(3), pp.373-383.
- Smolka, J. 2013. Genetic algorithm shape optimisation of a natural air circulation heating oven based on an experimentally validated 3-D CFD model. En: *International Journal of Thermal Sciences*, 71, pp.128-139.
- Tzempelikos, D.A., Mitrakos, D., Vouros, A.P., Bardakas A.V., Filios, A.E. y Margaritis, D.P., 2015. Numerical modeling of heat and mass transfer during convective drying of cylindrical quince slices. En: *Journal of Food Engineering*, 156, pp.10-21.
- Verboven, P., Scheerlinck, N., De Baerdemaeker, J. y Nicolai, B.M., 2000. Computational fluid dynamics modelling and validation of the temperature distribution in a forced convection oven. En: *Journal of Food Engineering*, 43(2), pp.61-73.

Enfoque metodológico para cuantificar los efectos cognitivos en el análisis sensorial de alimentos

A methodological approach to quantify the cognitive effects in sensorial analysis of food

Moronte, Ellen Cristina (1), Huet, Ana Livia (1), de Sousa Silva, Ana Carolina (1), Vieira Piza, Luciana (1), Marinho Muraro, Marcela (1), Céspedes Arce, Aldo Ivan (1), Bruno Tech, Adriano Rogério (1), Von Atzingen, Gustavo Voltani (2), Xavier Costa, Ernane (1)

(1) Laboratório de Física Aplicada e Computacional, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo - (2) Instituto Federal de São Paulo.

Contacto: ernane@usp.br

RECIBIDO: 25/2/2016 - APROBADO: 14/7/2016

Resumen

Este trabajo tuvo como objetivo formular un modelo de análisis sensorial que permita cuantificar la acción del estímulo gustativo en el contexto cognitivo a partir de la actividad eléctrica cerebral. Los experimentos fueron realizados en dos etapas: (a) Determinación del umbral de percepción del sabor e (b) investigación de la percepción de sabor bajo el umbral de la actividad consciente, utilizando electroencefalograma (EEG). El procesamiento digital de señales en los voluntarios fue realizado por medio del análisis tiempo-frecuencia por el método AGR (Adaptative Gaussian Representation). Este método evalúa cómo la información de la señal evoluciona en el espacio tiempo-frecuencia usando coeficientes representativos de este espacio. Se pudo verificar que el 3^{er} coeficiente de AGR se destacó por el ruido y por tanto representó mejor los resultados del EEG. Así fue posible verificar que el coeficiente presentó separación lineal de la concentración de sacarosa, es decir, se detectó en el comportamiento tiempo-frecuencia del EEG la separación entre las concentraciones de sacarosa, independientemente de la manifestación del sujeto experimental. Esos resultados sugieren que la metodología descrita en este artículo puede ser utilizada como una herramienta complementaria al análisis sensorial.

Palabras clave: Electroencefalograma (EEG), predilección alimentaria, estímulos gustativos.

Abstract

This work aims to propose a sensorial analysis method that allows quantitative evaluation of taste stimuli within a cognitive context using electroencephalogram monitoring. The experiment was conducted in two steps: (a) Determination of flavor perception threshold and (b) investigation of the flavor perception below conscious threshold using electroencephalogram (EEG). The volunteer's digital signal processing was performed using time-frequency analysis by the AGR method. This method evaluates the signal behavior in the time-frequency framework by means of representative coefficients. It could be verified that the 3rd AGR representative coefficient was noiseless and then EEG information was better characterized. Thus it was possible to verify that the coefficient provided linear separation of sucrose concentration, therefore, was able to represent the EEG behavior in the time-frequency framework by separating sucrose concentrations independent of subject response. These results suggest that the methodology described in this article can be used as a tool to complement the sensory analysis.

Keywords: Electroencephalogram (EEG), Food Choice, Taste Stimuli.

Introducción

La creciente preocupación por mantener hábitos saludables y una alimentación adecuada ha promovido avances en las ciencias de los alimentos, así como en las relaciones entre estas y el hombre.

Puesto que el análisis sensorial es la base del estudio y evolución de esa relación, se hace necesario destacar la

importancia de medir, analizar e interpretar las reacciones del ser humano frente a las características de los alimentos mediante el estudio de la percepción de sus cinco sentidos. Esto hace que resulte importante establecer modelos que permitan relacionar la actividad cerebral con estímulos gustativos (Kobayakawa, et al., 1996).

En las últimas décadas, el análisis sensorial ha sido estudiado no solo en base a la interacción del hombre con los alimentos, sino también por la comprensión de los factores subjetivos y emocionales que influyen en los consumidores. Es entonces cada vez mayor el número de investigaciones que incluyen el estado de ánimo como factor determinante en la predilección por los alimentos (Okamoto y Dan, 2007).

Esa influencia, que motiva la elección de los análisis sensoriales, amplía los estudios en el área de las ciencias psicológicas y ciencias de los alimentos (Larsson y Larsson, 1997), buscando así entender las bases neurocognitivas y analíticas del funcionamiento cerebral. Es posible afirmar que el procesamiento de sensaciones y percepciones ocurre continuamente, lo que se torna muchas veces en una interpretación no perceptible de nuestra consciencia.

El umbral para la percepción consciente de los estímulos derivados del medio no depende únicamente de la intensidad de los mismos, sino también del estado psicológico del individuo en el momento de la interacción (Myers, 1999). Todos esos aspectos del cerebro humano son difíciles de investigar debido a su gran complejidad. En ese sentido, el EEG es muy utilizado para auxiliar el monitoreo de eventos cerebrales con el fin de conocer su estructura y función. Además, permite la asociación de un comportamiento clínico o experimentalmente observado, no solo con una presunta correlatividad mental sino también con marcadores específicos de la actividad cerebral observada.

Con el avance de los sistemas informáticos, el establecimiento de conexiones entre el conocimiento funcional del cerebro y las técnicas avanzadas de procesamiento digital de señales (PDS) es posible establecer una interacción entre el cerebro y los sistemas informáticos (Hashida, et al., 2005).

Todo ello motivó la ejecución de este trabajo que tiene como objetivo general utilizar la actividad eléctrica cerebral como un canal de comunicación entre el cerebro y el sistema informático a partir del cual estudiar los diversos eventos de estímulo-respuesta que pueden ser usados en el análisis de las señales de EEG durante la estimulación gustativa.

El objetivo específico de este trabajo es demostrar que el EEG responde a una concentración de azúcar por debajo del umbral de percepción consciente utilizando el método AGR.

Materiales y Métodos

Esta investigación fue realizada en el Laboratorio de Física Aplicada y Computacional (LAFAC) de la Universidad de São Paulo (USP), Campus de Pirassununga, en el periodo de mayo de 2011 a mayo de 2013. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de investigación de la EERP (Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto)/USP en 2008 (Protocolo nº 0958/2008). Los experimentos fueron realizados en tres sesiones, cada sesión en dos etapas: (1) Determinación del umbral de percepción consciente de sabor e (2) investigación de la percepción del sabor por debajo del umbral consciente, utilizando EEG. La Figura 1 presenta la visión general del experimento.

Determinación del umbral de percepción consciente del sabor dulce

Los voluntarios fueron escogidos entre los estudiantes del campus. Esta primera etapa fue realizada con un grupo de 23 voluntarios (13 de sexo femenino y 10 de sexo masculino), con

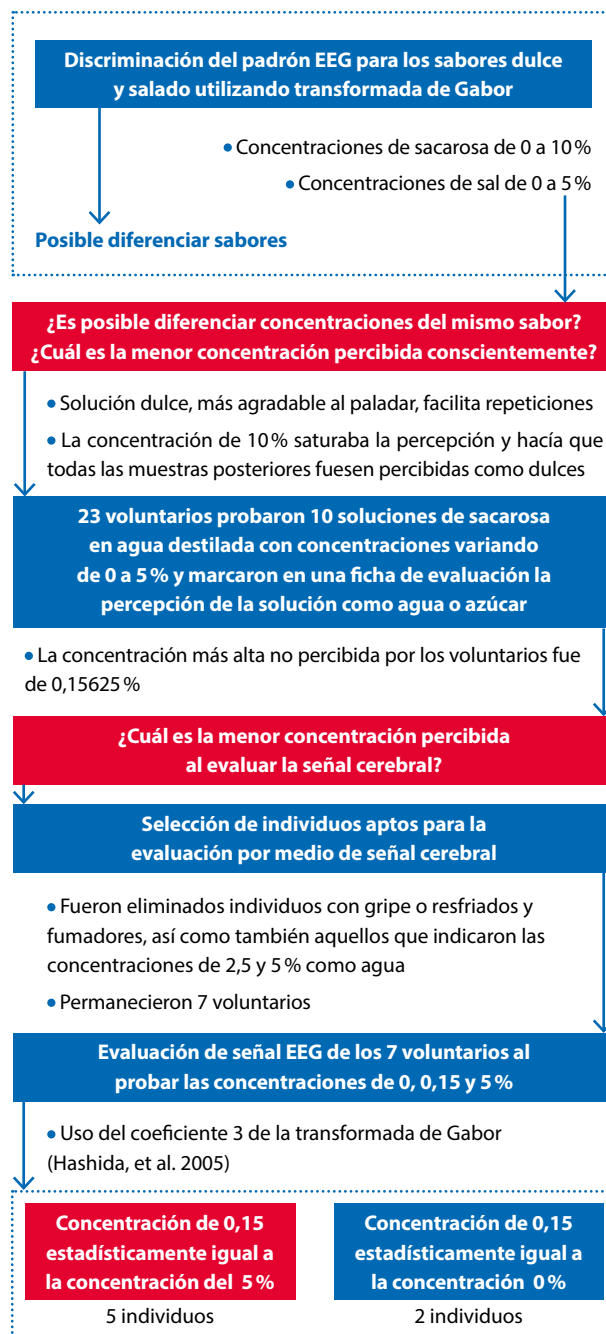


Figura 1. Visión general del experimento.

edades comprendidas entre los 19 y los 24 años. Puesto que lo importante es el número de repeticiones por cada sujeto, el número de voluntarios se puede considerar suficiente, ya que el EEG es específico para cada uno de ellos. Todos los sujetos firmaron un término de consentimiento libre y respondieron un cuestionario sobre su estado general de salud y preferencias alimentarias. Todos eran no fumadores.

Los voluntarios realizaron degustaciones de nueve muestras de sabor dulce con diferentes concentraciones de sacarosa (0,15625%; 0,3125%; 0,625%; 1,25%; 2,5%; 5% y tres muestras a 0%). Las soluciones de sacarosa de 0,15625% a 1,25% fueron preparadas con agua destilada, de acuerdo con una serie recomendada por la ISO 3972 (2011). Las concentraciones de 2,5% y 5% fueron previamente definidas por los experimentos

de Hashida (2005). Todas las muestras fueron preparadas con 24 horas de antelación y acondicionadas en recipientes de plástico claramente identificados.

Después de degustar cada muestra, los voluntarios anotaron en una hoja de registro si detectaron el sabor dulce en cada una de las soluciones (Tabla 1).

Muestra	Agua	Azúcar
A1432	X	
A2057		X
A7018	X	
A9664	X	
A8221	X	
A2453		X
A6770	X	
A9142		X
A9797		X
A4117		X

Tabla 1. Ficha de evaluación presentada por los voluntarios durante la degustación de las soluciones de sacarosa en agua destilada con concentraciones de 0 a 5%. Las marcas indican cómo clasificó la muestra cada voluntario y los códigos son números aleatorios.

Para evaluar la sensibilidad gustativa de los voluntarios fue utilizado un test de límite. En el test, series crecientes y decrecientes de concentraciones fueron presentadas a los voluntarios para determinar el umbral de percepción. El umbral de cada voluntario fue definido mediante la media geométrica de concentración más alta no detectada y la concentración siguiente.

Esta etapa permitió determinar la menor concentración de sacarosa que los voluntarios fueron capaces de percibir.

De ese grupo fueron escogidos para la próxima etapa los voluntarios que no cometieron errores muy discrepantes, es decir, aquellos que no percibieron conscientemente la diferencia entre las concentraciones de 5% y 2,5%.

Investigación de percepción de sabor debajo del umbral consciente

En esta etapa fueron registradas las señales cerebrales de siete voluntarios (cinco mujeres y dos hombres) al mismo tiempo, probando 27 muestras de sabor dulce (solución de sacarosa en agua destilada), nueve de ellas a 0% (solo agua), nueve con 0,15% de sacarosa y nueve con 5,0% de sacarosa (concentración máxima). Después del registro de los datos de EEG, los voluntarios no completaron los correspondientes cuestionarios sobre la prueba, ya que en esta parte solo fue necesario evaluar la respuesta cerebral. Las señales fueron adquiridas dentro de una jaula de Faraday, de 2,5 x 2,5 x 2,5 m de tamaño, aplicando la metodología desarrollada por Costa y Cabral (2000). La señal fue muestreada a una frecuencia de 120Hz y cuantificada con 12 bits. Los voluntarios fueron

ubicados en una silla común y los electrodos fueron fijados en la superficie de su cuero cabelludo en las posiciones C3 y C4 (el electrodo de referencia fue ubicado en la oreja), según el sistema 10-20 (Jasper, 1958), utilizando un casco diseñado para esta finalidad. Fueron usados electrodos de cloruro de plata, bañados en oro, con 1,0 mm de diámetro. Fue aplicado también gel electrolítico en la superficie de los electrodos para mejorar su conducción.

Las señales registradas fueron procesadas mediante la herramienta Matlab® usando trechos de señal libres de artefactos con duración de 5 seg. Para cada trecho fueron obtenidos: (a) La densidad espectral de potencia, estimada por el método de Welch, que permite identificar las principales frecuencias presentes en la señal y (b) la representación gaussiana adaptativa, propuesta por Mallat y Zhang (1993) y Qian y Chen (1994). Esta metodología de análisis de señales consiste en analizar las informaciones en el dominio tiempo-frecuencia por medio de los ajustes de las funciones gaussianas elementales $h_p(t)$ que representan mejor la señal muestreada (Hashida, et al., 2005). Este ajuste permite localizar la información en el EEG concomitantemente en el dominio del tiempo y de la frecuencia.

Por tanto, este ajuste fue realizado usando los coeficientes de proyección B_p , calculados por medio de las funciones gaussianas que representan mejor la relación entre la señal $s(t)$ adquirida, con sus respectivas funciones gaussianas $h_p(t)$. Los coeficientes calculados (B_p) permiten extraer informaciones de las señales de EEG registradas en los voluntarios y analizar posibles variaciones de comportamiento de la señal en relación al tiempo y la frecuencia (Maruyama, et al., 2008; Hashida, et al., 2005).

Resultados

Determinación del umbral de percepción de sabor dulce

Las respuestas registradas de los voluntarios indicaron que la mayor dilución no percibida, dentro de la serie geométrica, fue la que contenía 0,15625% de sacarosa, esto es, una dilución menor, lo que definió el umbral mínimo de percepción para los participantes del experimento. No se realizó ningún ensayo estadístico para evaluar el umbral de grupo, pues era necesario saber el valor de la serie no perceptible del 100% de los voluntarios.

Los voluntarios que no fueron capaces de detectar la sacarosa en concentraciones superiores a 2,5% no pasaron a la siguiente etapa, por lo que finalmente fueron escogidos cinco mujeres y dos hombres.

Investigación de percepción del sabor por debajo del umbral consciente

La Figura 2 muestra la media (nueve repeticiones) de la densidad espectral de potencia para cada una de las concentraciones evaluadas (0,00%; 0,15% y 5,00%) de uno de los voluntarios.

El comportamiento del gráfico de la Figura 2 fue repetido en los datos de los demás voluntarios, lo que reforzó la necesidad de utilizar otro método de procesamiento, en este caso una técnica que permita evaluar la señal obtenida en el dominio del tiempo y la frecuencia.

La Figura 3 muestra el gráfico del tercer coeficiente de AGR (B_3), que fue el coeficiente que mejor clasificó las seña-

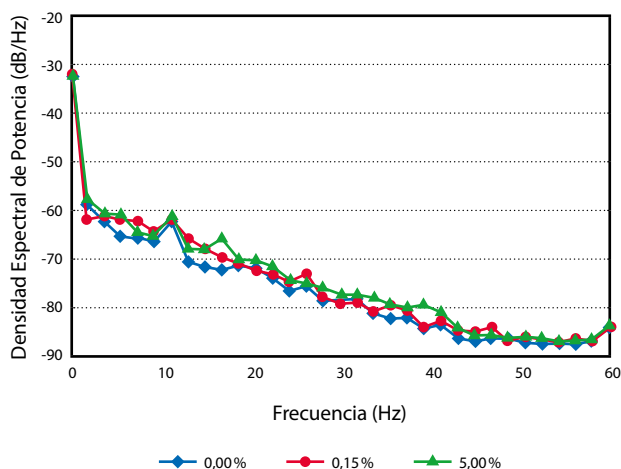


Figura 2. Media de las muestras de agua (0,0%), 0,15% y 5% de sacarosa, correspondientes a la voluntaria 1.

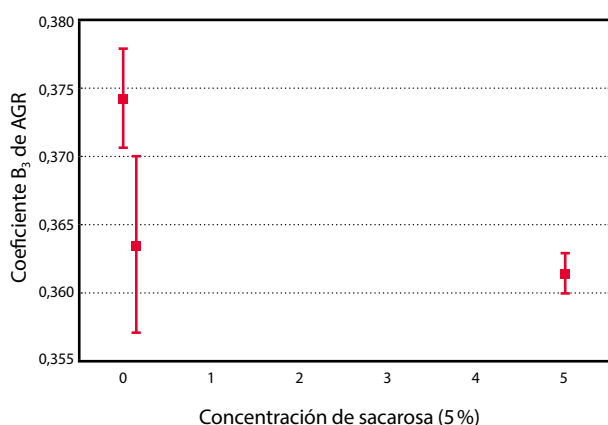


Figura 3. Valores referentes al coeficiente B_3 de AGR para la voluntaria 1.

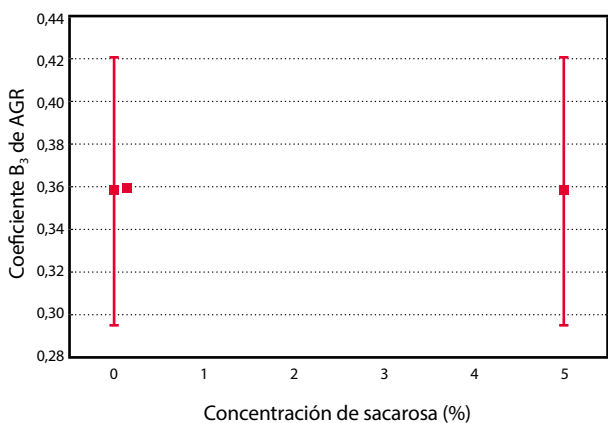


Figura 4. Valores referentes al coeficiente B_3 de AGR para la voluntaria 4.

les de la mayoría de los voluntarios y el cual corrobora los resultados obtenidos por Hashida et al. (2005).

La Figura 4 representa el mismo coeficiente B_3 para un voluntario que no presentó separación aparente.

En la Figura 5 es posible verificar que el comportamiento tiempo-frecuencia del EEG en el coeficiente número 3 no fue sensible a la diferencia de las soluciones, a pesar de que

la voluntaria percibió conscientemente la diferencia entre las soluciones de 0 y 5%. Aunque solo se trató de un único caso de todo el grupo de voluntarios, debe ser considerado, porque indica que el AGR puede no detectar ese patrón para algunos voluntarios y, por tanto, deben ser consideradas otras técnicas de procesamiento de señales de EEG.

Según los resultados del análisis del EEG utilizando AGR, de los siete voluntarios que probaron las muestras, cinco –cuatro mujeres y un hombre– presentaron separación en sus coeficientes. Esto significa que a pesar de que ellos no percibieron la dilución de 0,15625%, el patrón del EEG de esa dilución es el mismo que la dilución de 5%, o sea, el EEG responde al valor por debajo del umbral de la misma manera que responde al valor por encima del umbral, aunque el voluntario no haya percibido la dilución de forma consciente.

Discusión y Conclusiones

Este trabajo presenta únicamente un estudio inicial y, por ende, no puede ser generalizado para un grupo. Fueron seleccionados siete voluntarios a partir de la etapa inicial (cinco del sexo femenino y dos del sexo masculino) para análisis de datos. Como la actividad eléctrica cerebral sigue un estándar individual de respuestas, el número de voluntarios para este tipo de experimento (que usa el EEG) puede ser reducido.

La metodología descrita en este artículo llevó a resultados que corroboran el modelo de Esteves (2010), que propone el encefalograma como parte del sistema de adquisición de informaciones, permitiendo la postulación de una metodología en la que el foco es el hombre y los procesos mentales que determinan la elección de los alimentos, conforme a lo propuesto por Furst et al. (1996).

Los resultados presentados en este trabajo indican que los datos del análisis sensorial pueden ser analizados con base en las respuestas obtenidas por medio de la comunicación (percepción consciente) del individuo, y en su dinámica cerebral (percepción inconsciente), mediante la evaluación de datos obtenidos del EEG. Esto permite analizar y correlacionar los diversos aspectos que envuelven el factor humano durante la alimentación a partir de un concepto menos subjetivo, ya que el EEG está directamente relacionado con la actividad eléctrica del cerebro, que es parte integrante de la dinámica cerebral.

Cabe destacar que las cuestiones subjetivas que surgen del análisis sensorial no pueden ser soportadas solamente con estos ensayos, pero lo significativo es presentar a la comunidad científica el EEG como una herramienta importante que puede ser considerada en los análisis sensoriales tradicionales.

Reconocimientos

Agradecemos al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo: 311084/2013-3) por financiar este proyecto.

Referencias

Costa, E.J.X. y Cabral, E., 2000. EEG-based discrimination between imagination of left and right hand movements

- using adaptive Gaussian representation. En: *Medical Engineering & Physics*, 22(5), pp.345-348.
- Esteves, E., 2010. Statistical analysis in food science. En: Cruz, Rui M.S., ed. *Practical food and research*. Cap.16. New York: Nova Science Publishers. ISBN: 978-1-61761-057-8.
- Furst, T., Connors, M., Bissogni, C.A., Sobal, J. y Falk, L.W., 1996. Food choice: a conceptual model of the process. En: *Appetite*, 26(3), pp.247-66.
- Jasper, H. H., 1958. The ten-twenty electrode system of the international federation. En: *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, Limerick, 10(2), pp.371-375.
- Hashida, J.C., Silva, A.C.S., Souto, S. y Costa, E.J.X. , 2005. EEG pattern discrimination between salty and sweet taste using adaptive Gabor transform. En: *Neurocomputing*, 68, pp.251-257.
- International Organization for Standardization, 2011. ISO 3972: *Sensory analysis. Methodology. Method of investigation sensitivity of taste*. Ginebra: ISO.
- Kobayakawa, T., Endo, H., Ayabe-Kanamura, S., Kumagai, T., Yamaguchi, Y., Kikuchi, Y., Takeda, T., Saito, S. y Ogawa, H., 1996. The primary gustatory area in human cerebral cortex studied by magnetoencephalography. En: *Neuroscience Letter*, 212(3), pp.155-158.
- Larsson, M., Larsson, K., 1997. Neglected aspects of food flavor perception. En: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 123-124, pp.651- 655.
- Mallat, S. y Zhang, Z., 1993. Matching pursuit with time-frequency dictionaries. En: *IEEE Trans Signal Processing*, 41(12), pp.3397-415.
- Maruyama, T.T., Arce, A.I.C., Ribeiro, L.P. y Costa, E.J.X., 2008. Time-frequency analysis of acoustic noise produced by breaking of crisp biscuits. En: *Journal of Food Engineering*, 86(1), pp.100-104.
- Myers, D.G., 1999. *Introdução à psicologia geral*. 5a ed. Rio de Janeiro: LTC. ISBN 85-216-1186-2.
- Okamoto, M. y Dan, I., 2007. Functional near-infrared spectroscopy for human brain mapping of taste-related cognitive functions. En: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103(3), pp.207-215.
- Qian, S. y Chen, D., 1994. Signal representation using adaptive normalized Gaussian functions. En: *Signal Processing*, 36, pp.1-11.

Evaluación del papel del licopeno en la tolerancia a los daños por frío durante la conservación refrigerada de frutos de pomelo rojo

Evaluation of the role of lycopene in the tolerance to chilling injury during cold storage of red grapefruit

Lado, Joanna (1), Rodrigo, María Jesús (2), Zacarías, Lorenzo (2)

(1) Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Salto, Uruguay -

(2) Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Valencia, España.

Contacto: jlado@inia.org.uy

RECIBIDO: 16/2/2016 – APROBADO: 1/7/2016

Resumen

Los frutos de pomelo son sensibles a desarrollar lesiones en la piel, conocidas como daño por frío (DF), durante la conservación a bajas temperaturas. En el pomelo rojo Star Ruby los DF se restringen a las zonas amarillas de la piel, mientras que las zonas rojas, que acumulan el caroteno licopeno, permanecen intactas. El DF está asociado a la producción de especies reactivas del oxígeno y el licopeno presenta gran capacidad antioxidante, por lo que este pigmento podría estar implicado en la tolerancia frente al daño oxidativo. Para comprobar esta hipótesis se comparó el comportamiento a baja temperatura (2 °C) entre frutos de pomelo con diferencias en el contenido de licopeno (0,92 vs.45,2 µg/gPF). Los frutos con alta concentración de licopeno (50 veces superior) fueron más tolerantes al DF y tuvieron una mayor capacidad (2-3 veces) para secuestrar el oxígeno singlete (SOAC). El estudio del sistema antioxidante enzimático y no enzimático (ácido ascórbico y glutatión) no reveló un papel relevante en la protección frente al DF. Los resultados sugieren que el oxígeno singlete estaría implicado en el daño oxidativo provocado por el frío en los frutos de pomelo y que el licopeno protegería del daño celular producido por esta especie reactiva, incrementado la tolerancia.

Palabras clave: Almacenamiento refrigerado, citrus, carotenoides, licopeno, poscosecha.

Abstract

Grapefruit are sensitive to develop chilling injury (CI) symptoms during low temperature storage. In red grapefruit Star Ruby chilling damage during cold storage was restricted to yellow areas of the skin, while the red areas that accumulate lycopene remain largely unaffected. CI has been associated with the production of reactive oxygen species and lycopene has potent antioxidant capacity, thus this pigment might be responsible or be involved in the tolerance against oxidative damage. To test this hypothesis, we have compared the postharvest behavior at low temperatures between grapefruit with great differences in lycopene content (0,92 vs.45,2 µg/gPF). Fruit with high concentration of lycopene in the skin (50 times) were more tolerant to CI and at the same time had a higher capacity (2-3 times) to scavenger singlet oxygen radical (SOAC). The study of the enzymatic antioxidant and non-enzymatic (ascorbic acid and glutathione) systems did not revealed an important role in the protection against CI. Collectively, these results suggest that in grapefruits singlet oxygen would be involved in the oxidative damage caused by storage at low temperatures and that lycopene may protect against the cell damage caused by this reactive oxygen species, increasing then the tolerance to cold stress.

Keywords: Carotenoids, citrus, cold storage, lycopene, postharvest.

Introducción

Los frutos de pomelo se encuentran entre los cítricos más sensibles a desarrollar daños por frío (DF) durante la con-

servación a temperaturas inferiores a 10 °C. Estos daños se manifiestan como picados, hendiduras y ennegrecimiento en la piel, que deprecian considerablemente la calidad comercial de los frutos (Lafuente y Zacarías, 2006). En trabajos previos

se ha comprobado que los frutos de pomelo de la variedad Star Ruby, que acumulan el caroteno licopeno en la piel y la pulpa y, por lo tanto, tienen coloración roja, desarrollan severos daños en la piel cuando se almacenan a 2 °C, especialmente en las zonas con tonalidades verdes o amarillas, mientras que las zonas rojizas o más coloreadas permanecen prácticamente intactas (Lado, et al., 2015a). Este efecto podría estar relacionado con la capacidad antioxidante del licopeno, ya que existen numerosas evidencias que indican la implicación del estrés oxidativo en la inducción y desarrollo de los daños por frío en los frutos cítricos (Sala y Lafuente, 2000). El licopeno es un carotenoide lineal que posee un total de 11 dobles enlaces en la molécula, lo que le confiere una significativa actividad antioxidante (Singh y Goyal, 2008), con el doble de capacidad para secuestrar el radical 1O_2 que el β -caroteno y 10 veces respecto al α -tocoferol (Di Mascio, et al., 1989).

Durante años se han acumulado numerosos resultados en distintas especies que demuestran la activación de los diferentes procesos que conforman el sistema antioxidante en los vegetales como respuesta al estrés por bajas temperaturas (Toivonen, 2004). En los frutos cítricos se ha comprobado que la actividad de la enzima catalasa tiene un papel determinante en la protección frente a los DF (Sala y Lafuente, 2000). A su vez, se ha demostrado también que algunos frutos con mayor concentración de pigmentos (carotenoides o antocianos) son capaces de resistir más eficazmente a distintos tipos de estrés y reducir el ataque de patógenos. Tal es el caso de tomate con una elevada acumulación de antocianos (Zhang, et al., 2013), lo que conlleva un aumento de su vida postcosecha. Resultados similares se han descrito en boniato, donde un aumento del contenido de β -caroteno en plantas transgénicas provocó una mayor actividad antioxidante total y un aumento en la resistencia a estrés salino (Kim, et al., 2012). En este sentido, la tolerancia de las zonas rojas del pomelo rojo Star Ruby frente al DF podría estar relacionada también con una mayor activación del sistema antioxidante en las zonas rojas de los frutos que acumulan licopeno, frente a las zonas amarillas de estos frutos o de frutos amarillos de otras variedades de pomelo.

Con el objetivo de comprobar esta hipótesis y aprovechando que los frutos de pomelo rojo Star Ruby acumulan elevadas cantidades de carotenoides totales, y especialmente licopeno, cuando se desarrollan en condiciones de oscuridad (Lado, et al., 2015b), se evaluó la incidencia de los DF durante 8 semanas de conservación a 2 °C en frutos de coloración amarilla normal (frutos control) frente a frutos de piel de color rojo intenso desarrollados en oscuridad. Paralelamente, se analizaron las actividades del sistema antioxidante enzimático (enzimas catalasa-CAT, superóxido dismutasa-SOD, ascorbato peroxidasa-APX y glutatión reductasa-GR) y no enzimático (ácido ascórbico y glutatión) y se evaluó la capacidad del tejido para inactivar especies reactivas del oxígeno, especialmente oxígeno singlete, durante el almacenamiento refrigerado.

Materiales y Métodos

Material vegetal y diseño experimental

Se cosecharon frutos maduros de pomelo rojo (*Citrus paradisi*) de la variedad Star Ruby en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) en Moncada, Valencia (España), en diciembre de 2013. Para estimular la acumulación de licopeno y, por tanto, la coloración roja de la piel, un lote

de 50 frutos, aproximadamente a mitad del número final, se taparon con plástico negro entre finales de julio y principios de agosto, evitando la exposición a la luz hasta el momento de la cosecha (SR-rojo). Como frutos control (SR-control) se utilizaron frutos localizados en el exterior de los mismos árboles y expuestos directamente a la luz, por lo que presentaron la tonalidad amarilla característica (Figura 1). Los detalles del experimento se describen en Lado et al. (2015b). Los frutos de SR-control (no tapados) y SR-rojo (tapados) fueron cosechados en madurez fisiológica y se almacenaron durante 8 semanas a 2 °C.

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento y momento. Cada repetición estaba compuesta por 10 frutos (en el caso de la evaluación de DF y color). El resto de los frutos sometidos al tratamiento fueron utilizados para la obtención de tejido para el análisis de carotenoides. Para detectar posibles diferencias entre frutos control y frutos rojos se realizó una prueba T de comparación de medias, admitiendo una probabilidad de error de 0,05. En todos los casos se utilizó el software estadístico Infostat.

Evaluación del daño por frío

A lo largo del período de almacenamiento se determinó el daño por frío (DF) en la piel de los frutos SR-control y SR-rojo mediante la incidencia (número de frutos con síntomas/número total de frutos * 100) y el índice de daño por frío (IDF) a las 2, 4 y 8 semanas de almacenamiento, para estimar la severidad de los daños. Para ello se utilizaron tres repeticiones de 10 frutos por tratamiento, los cuales se clasificaron en diferentes categorías utilizando una escala visual, según el siguiente criterio: 0=sin daños visibles; 1= daños ligeros, abarcando hasta un 10% de la superficie del fruto; 2=daños moderados, abarcando entre 10 y 50% de la superficie del fruto; 3= daños severos, abarcando más del 50% de la superficie del fruto (Lafuente, et al., 1997). El IDF se calculó mediante la fórmula: Σ (número de frutos de cada categoría x valor de cada categoría)/ número total de frutos examinados.

Determinación del color de la piel

Para la determinación del color se utilizó un colorímetro Minolta CR-330, registrándose las coordenadas Hunter $L^* a^* y b^*$ que se representaron como la relación a/b . Un valor de a/b negativo se refiere a frutos de coloración verdosa, en torno a cero es el viraje de color y valores positivos indican coloración naranja-rojiza. Los mismos frutos que se utilizaron para la determinación del color se utilizaron para la obtención de tejido, pelando la parte externa y coloreada de la corteza (flavado), que se congeló en nitrógeno líquido, se trituró en un molinillo e inmediatamente se almacenó a -80 °C para posterior análisis.

Extracción, cuantificación e identificación de carotenoides

La extracción y cuantificación de carotenoides se llevó a cabo a partir de 0,5 g de tejido de flavado según protocolo detallado descrito por Rodrigo et al. (2003). Al finalizar la extracción, la muestra se llevó a sequedad completa mediante corriente de N_2 , se resuspendió en 1 ml de acetona y se incubó durante la noche a -20 °C. Tras centrifugar a 13000g durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un nuevo vial, se llevó a sequedad en corriente de N_2 y se almacenó en atmósfera

de N₂ a -20 °C hasta el momento de análisis. Durante todo el procedimiento se tuvo especial atención en evitar la exposición a la luz de las muestras trabajando en condiciones de baja luminosidad, con el fin de evitar la fotodegradación, la isomerización y los posibles cambios estructurales de los carotenoides. Todas las muestras se extrajeron al menos por triplicado. La identificación y cuantificación de los carotenoides individuales se realizó por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de fotodiodos (HPLC-PDA), según lo detallado en Alquezar et al. (2008).

Determinación de actividad enzimática

La extracción de proteínas se realizó a partir de 0,5 g de tejido congelado, utilizando un mortero en un baño con hielo a 4 °C y arena de mar como abrasivo. Se agregaron 2,5 ml de tampón de extracción (fosfato de potasio 100 mM y Triton X-100 0,1%, pH 7,5) y se lavó el mortero con 2,5 ml, recuperando el extracto en un tubo, previo filtrado a través de dos capas de muselina. El extracto se utilizó para la determinación de las cuatro actividades enzimáticas por espectrofotometría (Thermo-Spectronic Genesis UV10, USA), utilizando los siguientes tampones durante el proceso: para APX (EC1.11.1.11) se utilizó tampón PBS 50 mM (pH 7,1) suplementado con ascorbato de sodio 1 mM, EDTA 0,1 mM y dos gotas de Triton X-100; para la actividad SOD (EC1.15.1.1), PBS 50mM 50mM (pH 7,8) con ácido dietil-diamino-pentacético 1,33 mM; para la actividad CAT (EC1.11.1.6) y GR (EC1.6.4.2) se utilizó tampón PBS pH 6,8 y 7,5, respectivamente.

La actividad APX se determinó siguiendo la reducción de la absorbancia a 290 nm provocada por el consumo de ácido ascórbico presente. La actividad SOD se determinó siguiendo la reducción del tetrazolio nitroblue inducida por peróxido de hidrógeno, utilizando el sistema xantina-xantina oxidasa. La actividad CAT se evaluó siguiendo la cinética de la reducción del cloruro de titanio frente al peróxido de hidrógeno y la actividad GR se analizó determinado durante 2 min el aumento de la absorbancia (412 nm) generado por el aducto DTNB-GSH al reducirse el glutatión oxidado (GSSG). Todos los ensayos se desarrollaron a 25 °C. El contenido de proteína soluble total se determinó utilizando BSA como estándar según el método de Bradford (1976). Todas las actividades se expresaron como unidades arbitrarias por mg de proteína. Los procedimientos/cinéticas realizados para cada enzima se detallan en Arbona et al. (2003).

Determinación de contenido de ácido ascórbico (AsA) y dehidroascórbico (DHA)

La extracción se realizó a partir de 0,5 g de tejido congelado con 4 ml de ácido meta fosfórico 0,1%. Los detalles de la extracción de AsA y DHA se especifican en Alós et al. (2014). La cuantificación de AsA se realizó mediante un HPLC (Dionex, Barcelona, España), equipado con un detector de fotodiodos y el software Chromeleon (Dionex, Barcelona, España). Una alícuota de 10 µL de la muestra final se inyectó en el sistema cromatográfico equipado con una columna Ultrabase C18 (100 mm 4,6 mm × 2,5 µm) a 35 °C. La fase móvil consistió en metanol:agua pH 2,5 (15:85, v/v) con un flujo de 0,2 ml/min. La cuantificación de AsA se realizó a 248 nm utilizando un detector de fotodiodos. Para la cuantificación se utilizó

una curva patrón realizada en un rango de concentraciones entre 1 y 100 µg/ml, a partir de una solución del estándar de AsA disuelto en ácido metafosfórico 2%. El contenido de DHA se calculó como la diferencia entre vitamina C total y el contenido de AsA. La vitamina C total se calculó como la suma de AsA + DHA. El contenido de DHA fue mínimo en relación al ácido ascórbico (< 8,0 mg/100 gPF) en todas las muestras, por lo cual no se presentan estos resultados. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

Determinación de glutatión

La extracción se realizó a partir de 0,5 g de flavedo en mortero, utilizando 5 ml de ácido metafosfórico al 5% a 4 °C. A continuación se filtró la muestra con muselina y se centrifugó a 10000 g durante 15 min a 4 °C. Una alícuota de 400 µL se mezcló con 600 µL de tampón fosfato 0,5 M (pH 7,5). Se preparó la mezcla de reacción (RM) con NADPH 0,3 mM, DTNA 6 mM y agua destilada y se atemperó durante 1 hora a 25 °C. Para la determinación del glutatión total, tanto la forma oxidada como la reducida (GSH+GSSG), se colocaron 50 µL de agua destilada en 1 ml de muestra diluida y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora (a). Para determinar el GSSG (glutatión oxidado), a 1 ml de muestra diluida se agregaron 20 µL de 2-vinilpiridina y 30 µL de trietanolamina y se incubó durante 1 hora a 25 °C (b). Para la determinación en cada caso se colocaron 500 µL de RM en una cubeta y se añadieron 200 µL de la muestra a o b. A continuación se añadieron 136 µL de glutatión reductasa (GR), mezclando activamente para iniciar inmediatamente la lectura en espectrofotómetro a 412 nm durante 2 minutos. Se prepararon curvas estándar tanto para el GSH, a partir de una solución 100 mM, como para el GSSG, a partir de una solución 50 mM. Una vez obtenidos ambos valores, se calculó el glutatión reducido como el glutatión total (GSH+GSSG) – glutatión oxidado (GSSG). Los resultados se expresaron en nmol/g de peso fresco.

Determinación de actividad SOAC

El procedimiento detallado para la determinación de la actividad SOAC se describe en Ouchi et al. (2010) y Aizawa et al. (2011), si bien se realizaron algunas modificaciones. Se realizó una extracción en un mortero, previamente refrigerado a 4 °C, con 6 ml de etanol/cloroformo/agua (50:50:1, v/v/v), utilizando arena de mar como abrasivo. El extracto fue filtrado con una capa de muselina y se utilizó una alícuota de 200 µL en la reacción. La alícuota se mezcló con 2 ml de 2,5-diphenil-3,4-benzofurano 0,10 mM (DPBF, Sigma-Aldrich, Barcelona, España) y se agregó posteriormente 1 ml de endoperóxido 1,5 mM (EP, Invitrotech, Japón). El DPBF se utilizó como la sonda indicadora de la capacidad para secuestrar el oxígeno singlete y el EP como generador de esta especie reactiva. Se registraron los cambios en la absorbancia del DPBF a 413 nm durante 1 hora a 35 °C y se utilizó α-tocoferol (Sigma-Aldrich, Barcelona, España) como estándar. El valor relativo SOAC para cada muestra se calculó como:

$$\frac{(t_{1/2\text{muestra}} - t_{1/2\text{blanco}})}{(t_{1/2\alpha\text{Toc}} - t_{1/2\text{blank } \alpha\text{Toc}})^*} \cdot \frac{[\alpha\text{-Toc g/L}]}{[\text{muestra g/L}]}$$

donde: vida media de la muestra ($t_{1/2\text{muestra}}$); vida media del blanco ($t_{1/2\text{blanco}}$); vida media del α-Tocoferol ($t_{1/2\alpha\text{Toc}}$) y vida media del blanco utilizado con el α-Tocoferol ($t_{1/2\text{blank } \alpha\text{Toc}}$).

Resultados

Color, carotenoides e incidencia del DF

Los frutos de pomelo Star Ruby cultivados en oscuridad durante las últimas etapas del desarrollo y la maduración presentaron en el momento de la cosecha una piel de color rojo intenso, con una relación *a/b* de 0,45, mientras que los frutos expuestos a la luz desarrollaron una coloración amarilla con una relación de color *a/b* de 0,04 (Figura 1 y Tabla 1). El análisis de carotenoides en la piel de ambos frutos reveló que el contenido en carotenoides totales fue cuatro veces más elevado en la piel de los frutos rojos que en los amarillos, debido principalmente a que el contenido en el caroteno licopeno era cerca de 50 veces superior (Tabla 1).

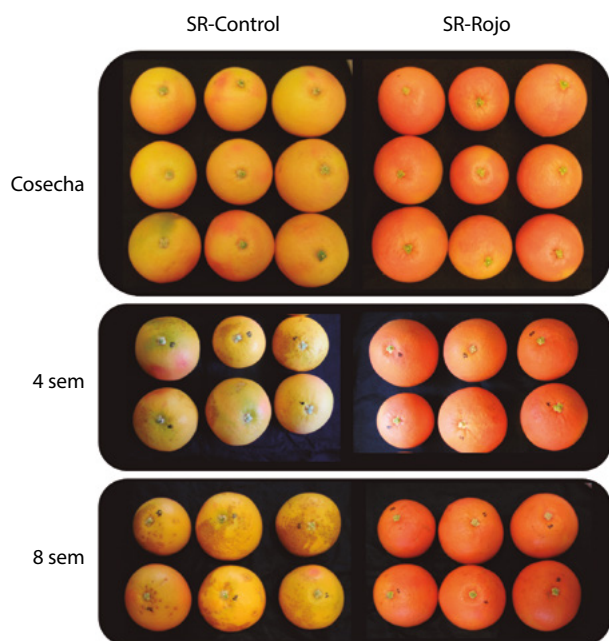


Figura 1. Síntomas de DF en la piel de frutos de pomelo SR control (SR-Control) y frutos rojos (SR-Rojo) en el momento de la cosecha y después de 4 y 8 semanas de almacenamiento a 2 °C.

Los síntomas iniciales de DF se detectaron en aproximadamente un 7% de los frutos control tras dos semanas de conservación a 2 °C en frío. Conforme avanzó el periodo

de conservación se incrementó la intensidad y el porcentaje de DF en los frutos de piel amarilla, alcanzando después de ocho semanas una incidencia severa que afectó al 93% de los frutos (Tabla 1). En estas condiciones el aspecto visual de los frutos estuvo seriamente comprometido, con una elevada severidad de los síntomas que afectó a su aceptación comercial (Figura 1). En los frutos de color rojo, sin embargo, apenas se desarrollaron síntomas de DF, el cual alcanzó solamente a un 33% de los frutos al finalizar el período de conservación y con una baja intensidad (0,5 en una escala de 0 a 3). Estos frutos todavía mantienen su apariencia y calidad comercial a pesar de la presencia de pequeñas lesiones en la piel difícilmente detectables (Figura 1), y podrían superar los períodos cuarentenarios exigidos en las exportaciones.

Evaluación de la capacidad antioxidante

La evaluación de la capacidad del tejido para inactivar las especies reactivas del oxígeno, específicamente el oxígeno singlete (SOAC), mostró un valor entre dos a tres veces superior en los frutos rojos en el momento de la cosecha, que se mantuvo o incluso aumentó durante el período de conservación (Figura 2).

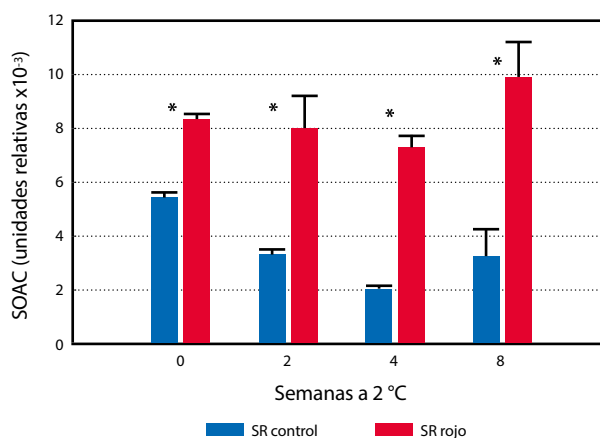


Figura 2. Capacidad para secuestrar el oxígeno singlete (SOAC-unidades relativas x10⁻³) en la piel de frutos de pomelo SR control (SR-Control) y frutos rojos (SR-Rojo) en el momento de la cosecha y después de dos, cuatro y ocho semanas de almacenamiento a 2 °C. Los asteriscos indican diferencias significativas entre frutos control y rojos (prueba T, p<0,05).

	Color (a/b)	Carotenoides (µg/g PF)	Licopeno (µg/g PF)	Incidencia de DF (%)		
				2 sem	4 sem	8 sem
SR-control	0,04±0,01b	20,9±0,80b	0,92±0,07b	6,7a	73a	93a
SR-rojo	0,45±0,01a	78,1±0,49a	45,2±0,24a	0,0b	13b	33b

Tabla 1. Color de la piel, contenido de licopeno y de carotenoides totales en la piel de frutos de pomelos Star Ruby (frutos control y frutos rojos) en cosecha y porcentaje de frutos con daño por frío después de 2, 4 y 8 semanas de almacenamiento a 2 °C. Medias seguidas de igual letra dentro de la misma columna no difieren significativamente (prueba T, p<0,05).

	GR		CAT	
	SRcontrol	SR-rojo	SRcontrol	SR-rojo
Cosecha	1,97±0,07	1,64±0,11	0,48±0,02b	2,47±0,23a
2 sem	1,55±0,05	1,65±0,12	2,71±0,28b	4,62±0,23a
4 sem	1,65±0,06	1,61±0,07	2,38±0,23b	4,76±0,28a
8 sem	1,71±0,03	1,79±0,07	1,98±0,17b	4,05±0,40a
	APX		SOD	
	SRcontrol	SR-rojo	SRcontrol	SR-rojo
Cosecha	0,01±0	0,01±0	315,8±10,5 _a	222,8±8,5 _b
2 sem	0,01±0	0,01±0	367,8±11,3	399,5±7,0
4 sem	0,01±0	0,02±0	279,1±5,6	298,2±20,6
8 sem	0,02±0	0,02±0	301,7±11,3	334,0±33,2

Tabla 2. Actividad (U /mg proteína) de las principales enzimas antioxidantes (catalasa-CAT, glutatión reductasa-GR, superóxido dismutasa-SOD y ascorbato peroxidasa-APX) en la piel de frutos de pomelo Star Ruby en el momento de la cosecha y después de dos, cuatro y ocho semanas de almacenamiento a 2 °C. Medias seguidas de igual letra dentro de la misma enzima y fila no difieren significativamente, ausencia de letras significa ausencia de diferencias (prueba T, p<0,05).

	AsA (mg/100g PF)		GSH (nmol/g PF)	
	SR-control	SR-rojo	SR-control	SR-rojo
Cosecha	307 ± 9,2 _a	122 ± 3,4 _b	109 ± 8,0	125 ± 8,0
2 sem	217 ± 6,5 _a	115 ± 1,3 _b	125 ± 3,0	110 ± 6,0
4 sem	227 ± 4,2 _a	109 ± 9,1 _b	147 ± 1,0	156 ± 2,0
8 sem	211 ± 3,3 _a	102 ± 5,2 _b	114 ± 7,0 _b	141 ± 4,0 _a

Tabla 3. Contenido de ácido ascórbico-AsA (mg/100g PF) y glutatión-GSH (nmol/g PF) en la piel de frutos de pomelo Star Ruby en el momento de la cosecha y después de dos, cuatro y ocho semanas de almacenamiento a 2 °C. Medias seguidas de igual letra no difieren significativamente, ausencia de letras significa ausencia de diferencias (prueba T, p<0,05).

La actividad de las enzimas SOD, APX y GR no se modificó sustancialmente durante el almacenamiento en frío y tampoco se observaron diferencias entre los frutos control y los frutos rojos. Sin embargo, la actividad CAT fue superior en los frutos rojos desde el momento de la cosecha y permaneció más elevada durante todo el período de almacenamiento (Tabla 2). A su vez, la actividad de esta enzima aumentó por las bajas temperaturas, se incrementó a partir de la segunda semana de almacenamiento y permaneció elevada durante todo el periodo de conservación.

En relación al sistema antioxidante no enzimático, el contenido de AsA fue superior (x2) desde el momento de la cosecha en los frutos control, más sensibles a los DF, diferencia que se mantuvo durante todo el período de conservación (Tabla 3). A su vez, en el caso del glutatión los valores permanecieron relativamente constantes durante la conservación y sin diferencias entre los dos tipos de frutos evaluados (Tabla 3).

Discusión

Los frutos de pomelo son altamente sensibles a las bajas temperaturas de conservación y desarrollan DF a temperaturas inferiores a 10 °C. Sin embargo, los resultados de este trabajo demuestran que la presencia de cantidades importantes de licopeno en la piel minimizó la aparición de síntomas de DF durante al menos ocho semanas de conservación a 2 °C (Figura 1 y Tabla 1), sugiriendo que la presencia de este caroteno puede estar relacionada con la tolerancia a las bajas temperaturas. El licopeno es uno de los carotenoides con mayor capacidad antioxidante, cuya acción se ha relacionado con la inactivación de especies reactivas del oxígeno, principalmente el radical oxígeno singlete (Di Mascio, et al., 1989; Martínez y Melendez-Martínez, 2015). En este sentido, los daños por frío que se producen en los frutos cítricos durante la exposición a bajas temperaturas se han asociado a un proceso de estrés oxidativo,

por lo que cobra sentido que este caroteno pueda vincularse a un aumento en la capacidad antioxidante del tejido resistente a desarrollar DF y, por tanto, a una mayor protección frente a las especies reactivas del oxígeno (Lado, et al., 2015a).

La capacidad para secuestrar el oxígeno singlete (SOAC) mostró un valor entre dos a tres veces superior en la piel de los frutos de pomelo rojo (Figura 2), en los que había aumentado más de 50 veces la concentración de este caroteno, lo que sugiere que esta especie reactiva de oxígeno podría potenciar el desarrollo de DF en los frutos de pomelo. Diferentes trabajos han demostrado que esta especie reactiva podría, además de provocar daño directo a nivel de las membranas celulares, actuar como una molécula señal en la activación del proceso de muerte celular programada (Apel y Hirt 2004; Wagner, et al., 2004) potenciando en este caso la aparición de los síntomas de daño. Es interesante destacar que la mayor capacidad SOAC en la piel de los frutos rojos ya se detectó en el momento de cosecha, lo que puede indicar que sería una característica inherente a la composición de la piel de estos frutos rojos. Alternativamente, también podría estar relacionado a que los frutos ya estuvieran expuestos en el campo a condiciones estresantes, posiblemente bajas temperaturas, que provocarían un aumento en estas especies tóxicas. El licopeno podría ejercer un importante papel en este proceso.

El sistema antioxidante de respuesta a diversos estreses en las plantas es muy complejo y se compone de un gran número de procesos que se activan, en este caso, en respuesta a las bajas temperaturas (Hossain, et al., 2012). Se destaca la activación de las enzimas antioxidantes CAT, SOD, APX, GR y otras (sistema enzimático) y los cambios en el contenido en los metabolitos antioxidantes como el AsA y el GSH (sistema no enzimático) (Sevillano, et al., 2009). En este sentido, se evaluó también la posible contribución de ambos sistemas en la protección frente al DF en los frutos de pomelos SR-control (sensibles) y SR-rojos (tolerantes). Entre las enzimas evaluadas, la única que incrementó su actividad en respuesta a las bajas temperaturas fue la CAT, mostrando también diferencias entre frutos sensibles y tolerantes al DF (Tabla 2). En el caso de los frutos cítricos se ha descrito que esta enzima es clave en la protección frente a las bajas temperaturas en frutos de diferentes variedades de mandarina (Sala y Lafuente, 1999; Lafuente, et al., 2004; Ghasemnezhad, et al., 2008). Sin embargo, el aumento de la actividad CAT en ambos tratamientos durante la exposición al frío (Tabla 2) sugiere que esta enzima estaría más relacionada con la respuesta a las bajas temperaturas y que los frutos rojos son capaces de mantener un nivel superior de actividad enzimática en estas condiciones. Por lo tanto, la mayor actividad CAT en frutos tolerantes podría estar contribuyendo solo parcialmente a la tolerancia al DF.

En relación a la actividad del resto de las enzimas del sistema antioxidante (APX, SOD y GR), los resultados indican que no parecen estar relacionadas con la tolerancia inducida al frío en frutos de pomelo, de forma similar a lo que se ha descrito en otros frutos sensibles al frío como el pepino (Qian, et al., 2013) o el mango (Chongchatuporn, et al., 2013). El estudio del sistema antioxidante no enzimático tampoco reveló una implicación con la tolerancia de los frutos de pomelo rojos a los DF, ya que los frutos control mostraron el doble de contenido de AsA que los frutos rojos durante todo el almacenamiento y no se encontraron diferencias en el contenido de glutatión (Tabla 3). Es así como estos metabolitos antioxidantes (AsA y GSH) pueden constituir más bien una respuesta de los frutos

frente al estrés por frío no relacionada directamente con la protección o tolerancia frente a este estrés en los frutos de pomelo.

Es importante destacar entonces que, si bien existía alguna indicación en la literatura de que las zonas rojas del pomelo podrían mostrar una mayor tolerancia a los daños por frío, hasta la fecha no se había demostrado que la presencia del licopeno era responsable de esta tolerancia, lo que constituye una primera evidencia fisiológica de la relevancia del presente trabajo. En segundo lugar, se demuestra que no es a través del sistema antioxidante general, ni mediante otros antioxidantes como la vitamina C o el glutatión, sino que es el licopeno el compuesto antioxidante al que parece estar asociada esta tolerancia. En tercer lugar, se demuestra también que la presencia de licopeno en frutos potencia la capacidad del tejido para inactivar la especie reactiva oxígeno singlete en aquellos frutos más tolerantes, sugiriendo que esta especie reactiva parece estar mediando en el desarrollo de daños por frío en los cítricos. Finalmente, y desde una perspectiva aplicada, la recolección y clasificación de frutos de pomelo en base a la coloración roja de la piel es una posibilidad interesante de manejo para evitar los daños por frío y contribuir a superar las restricciones cuarentenarias. Es así como algunos países exportadores de cítricos ya están actualmente utilizando esta estrategia en los frutos que destinan a la exportación y requieren varias semanas de exposición a baja temperatura.

Reconocimientos

Nuestro agradecimiento a Amparo Beneyto por su excelente ayuda técnica. Este trabajo ha sido financiado por los proyectos (AGL2009-11558 y AGL2012-34573) del Ministerio de Economía y Competitividad. Al proyecto PROMETEOII/2014/027 (Generalitat Valenciana). Joanna Lado fue receptora de una beca JAE-Pre CSIC (Fondo Social Europeo) y forma parte del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Los autores de este trabajo pertenecen a la Red CYTED Ibercarot y Red de Excelencia CaRed BIO2015-71703-REDT (Ministerio de Economía y Competitividad, España).

Referencias

- Aizawa, K., Iwasaki, Y., Ouchi, A., Inakuma, T., Nagaoka, S., Terao, J. y Mukai, K., 2011. Development of singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. 2. Measurements of the SOAC values for carotenoids and food extracts. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, pp.3717-3729.
- Alós, E., Rodrigo, MJ. y Zacarías, L., 2014. Differential transcriptional regulation of L-ascorbic acid content in peel and pulp of citrus fruits during development and maturation. En: *Planta*, 239, pp.1113-1128.
- Alquezar, B., Rodrigo, MJ. y Zacarías, L., 2008. Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant Cara Cara. En: *Phytochemistry*, 69, pp.1997-2007.
- Apel, K. y Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. En: *Annual Review of Plant Biology*, 55, pp.373-399.
- Arbona, V., Flors, V., Jacas, J., García-Agustín, P. y Gómez-Cadenas, A., 2003. Enzymatic and non-enzymatic

- antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. En: *Plant & Cell Physiology*, 44, pp.388–394.
- Bradford, MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. En: *Analytical Biochemistry*, 72, pp.248–254.
- Chongchatuporn, U., Ketsa, S., van Doorn, WG., 2013. Chilling injury in mango (*Mangifera indica*) fruit peel: Relationship with ascorbic acid concentrations and antioxidant enzyme activities. En: *Postharvest Biology and Technology*, 86, pp.409–417.
- Ghasemnezhad, M., Marsh, K., Shilton, R., Babalar, M. y Woolf, A., 2008. Effect of hot water treatments on chilling injury and heat damage in “satsuma” mandarins : Antioxidant enzymes and vacuolar ATPase, and pyrophosphatase. En: *Postharvest Biology and Technology*, 48, pp.364–371.
- Hossain, Z., Nouri, MZ. y Komatsu, S., 2012. Plant cell organelle proteomics in response to abiotic stress. En: *Journal of Proteome Research*, 11, pp.37–48.
- Kim, SH., Ahn, YO., Ahn, MJ., Lee, H-S. y Kwak, SS., 2012. Down-regulation of β -carotene hydroxylase increases β -carotene and total carotenoids enhancing salt stress tolerance in transgenic cultured cells of sweetpotato. En: *Phytochemistry*, 74, pp.69–78.
- Lado, J., Rodrigo, MJ., Cronje, P. y Zacarías, L., 2015a. Involvement of lycopene in the induction of tolerance to chilling injury in grapefruit. En: *Postharvest Biology and Technology*, 100, pp.176–186.
- Lado, J., Cronje, P., Alquézar, B., Page, A., Manzi, M., Gómez-Cadenas, A., Stead, AD., Zacarias, L. y Rodrigo, MJ., 2015b. Fruit shading enhances peel color, carotenes accumulation and chromoplast differentiation in red grapefruit. En: *Physiologia Plantarum*, 154, pp.469–484.
- Lafuente, MT., Martínez-Téllez, MA. y Zacarías, L., 1997. Abscisic acid in the response of “fortune” mandarins to chilling . Effect of maturity and high-temperature conditioning. En: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73, pp.494–502.
- Lafuente, MT., Sala, JM. y Zacarias, L., 2004. Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in citrus fruit. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp.3606–3611.
- Lafuente, MT. y Zacarías, L., 2006. Postharvest physiological disorders in citrus fruit. En: *Stewart Postharvest Review*, 2, pp.1–9.
- Martínez, A., Melendez-Martínez, AJ., 2015. Lycopene, oxidative cleavage derivatives and antiradical activity. En: *Computational and Theoretical Chemistry*, 1077, pp.92–98.
- Di Mascio, P., Kaiser, S. y Sies, H., 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. En: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 274, pp.532–538.
- Ouchi, A., Aizawa, K., Iwasaki, Y., Inakuma, T., Terao, J., Nagaoka, S. y Mukai, K., 2010. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by carotenoids and food extracts in solution. Development of a singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, pp.9967–9978.
- Qian, C., He, Z., Zhao, Y., Mi, H., Chen, X. y Mao, L., 2013. Maturity-dependent chilling tolerance regulated by the antioxidative capacity in postharvest cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruits. En: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, pp.626–633.
- Rodrigo, MJ., Marcos, J., Alférez, F., Mallent, D. y Zacarías, L., 2003. Characterization of Pinalate, a novel Citrus sinensis mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. En: *Journal of Experimental Botany*, 54, pp.727–738.
- Sala, JM. y Lafuente, MT., 1999. Catalase in the heat-induced chilling tolerance of cold-stored hybrid Fortune mandarin fruits. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, pp.2410–2414.
- Sala, JM. y Lafuente, MT., 2000. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. En: *Postharvest Biology and Technology*, 20, pp.81–89.
- Sevillano, L., Sanchez-Ballesta, MT., Romojaro, F. y Flores, FB., 2009. Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. En: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, pp.555–573.
- Singh, P. y Goyal, GK., 2008. Lycopene : its properties and anticarcinogenic effects. En: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, pp.255–270.
- Toivonen, PMA., 2004. Postharvest storage procedures and oxidative stress. En: *Hortscience*, 39, pp.938–942.
- Wagner, D., Przybyla, D., Op den Camp, R., Kim, C., Landgraf, F., Lee, KP., Würsch, M., Laloi, C., Nater, M., Hideg, E. y Apel, K., 2004. The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*. En: *Science*, 306, pp.1183–1185.
- Zhang, Y., Butelli, E., De Stefano, R., Schoonbeek, H-J., Magusin, A., Pagliarani, C., Wellner, N., Hill, L., Orzaez, D., Granell, A., Jones, JDG. y Martin, C., 2013. Anthocyanins double the shelf life of tomatoes by delaying overripening and reducing susceptibility to gray mold. En: *Current Biology*, 23, pp.1094–1100.

Modelado matemático del secado de pastas libres de gluten en relación a la temperatura y humedad relativa del aire

Mathematical modeling of the drying process of gluten-free pasta according to temperature and relative humidity

Larrosa, Virginia (1), Lorenzo, Gabriel (2) (3), Zaritzky, Noemí (2) (3), Califano, Alicia (2)

(1)Facultad de Bromatología, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina

(2)Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), CONICET-CICPBA, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina

(3)Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad nacional de La Plata (UNLP), Argentina.

Contacto: lorenzogabriel@gmail.com

RECIBIDO: 26/2/2016 – APROBADO: 5/7/2016

Resumen

El objetivo del trabajo fue presentar un modelo matemático que permita describir la cinética de secado de pastas libres de gluten (LG) y el efecto de variables operativas (temperatura y humedad del aire) sobre la velocidad del proceso, para lo cual se plantearon los balances de materia y energía acoplados utilizando propiedades de transporte dependientes del contenido de humedad y temperatura. Se consideraron pastas de dimensiones $200 \times 8,07 \times 1,80$ mm, de sección rectangular y transferencia bidireccional, y se adoptó un modelo difusional para el transporte de humedad en la pasta y condiciones de contorno convectivas para la transferencia de energía. Se realizaron ensayos para ajustar y validar el modelo, empleando cuatro condiciones de proceso, combinando temperaturas (30 °C y 50 °C) y humedades relativas (40% y 80%). Los resultados fueron modelados utilizando el método de elementos finitos para la resolución numérica de las ecuaciones, y se obtuvo un ajuste satisfactorio para todas las condiciones de proceso. El coeficiente de difusión promedio resultó de $3,5 \times 10^{-11}$ m²/s, similar al reportado para pastas de trigo. Se observó que las velocidades de secado obtenidas en las pastas LG fueron más altas que para pastas de trigo en iguales condiciones, lo cual puede atribuirse a la menor interacción del agua en la matriz LG.

Palabras clave: Modelado matemático, transferencia de energía, transferencia de materia.

Abstract

The aim of this work was to study the effect of operating variables (temperature and relative humidity (RH) of the air) on the drying rate of gluten-free (GF) pasta by mathematically modeling the drying process. The drying process was modeled using heat and mass coupled balances, considering bidirectional transport. A diffusional model for water transfer through pasta was assumed and heat transport was based on a conductive model. Pasta properties and transport coefficients were determined using pasta composition and process conditions. GF noodles geometry was $200 \times 8,07 \times 1,80$ mm and a bidimensional transport was considered. Experimental runs were performed to validate the model. Four combinations of temperature (30 – 50 °C) and relative humidity (40–80%) were used, maintaining pasta dough composition constant. Experimental water losses were modeled using finite element method to solve the partial differential equations. The model fitting to experimental data was good and a validation with independent data was also satisfactory. The average water diffusional coefficient was $3,5 \times 10^{-11}$ m²/s, similar to that reported for wheat pasta. GF noodles drying process was much faster than drying traditional wheat pasta under the same operating conditions.

Keywords: Mathematical modeling, heat transport, mass transport.

Introducción

El proceso de secado de las pastas supone un sistema compuesto por dos fases: el aire de secado y la masa. El equilibrio termodinámico se asume en la interfase de acuerdo con la isoterma de sorción, y la eliminación de agua se rige por un

transporte simultáneo de calor y materia. El proceso generalmente se realiza exponiendo el material en forma continua al aire húmedo, proporcionado por ventiladores. El tiempo de secado depende de las características del equipo donde se

realiza el proceso (temperatura de bulbo seco, humedad relativa (HR), velocidad del aire, etcétera) y de las características del producto (contenido de agua, relación volumen/superficie, etcétera). Durante el proceso la pasta desprende humedad con dificultad y lentitud a causa de fenómenos adsorptivos y osmóticos. Por ello el proceso requiere un régimen específico que facilite el transporte de la humedad desde el interior hasta el exterior a través de los capilares y garantice un producto de buena calidad (Tscheuschner, 2001).

El secado de pastas de trigo tradicionales comienza con un producto con una humedad de 31% b.s. hasta aproximadamente un 13% b.s. y logra una mayor consistencia estructural otorgada por el retículo proteico que genera el gluten. Actualmente, el secado de la pasta en fábricas se realiza mediante el uso de aire caliente humedecido, con temperaturas en el rango entre 40 y 105 °C y humedades relativas que varían entre el 40% y el 95% (De Temmerman, et al., 2007).

Cuando se trata de pastas aptas para celíacos, el proceso de secado se vuelve muy importante, dado que estas carecen de la red proteica que forma el gluten en las pastas tradicionales y que contiene a los gránulos de almidón dentro de la matriz. Un control inadecuado de la velocidad de secado puede conducir a pastas frágiles que se desintegran durante el proceso de cocción.

Este trabajo tiene como objetivo modelar numéricamente el proceso de transferencia simultánea de energía y materia que ocurre en la superficie de la pasta durante el secado de pastas libres de gluten aptas para celíacos, en contraposición al uso de soluciones analíticas más simples, que consideran únicamente la ley de Fick. Se estudiará el efecto de variables de proceso como la temperatura y humedad del aire de secado.

Materiales y Métodos

Materiales

Para la elaboración de la masa libre de gluten se utilizó almidón de maíz obtenido en Droguería Saporiti (Buenos Aires, Argentina); harina de maíz de Herboeste (Buenos Aires, Argentina) y huevo en polvo y clara de huevo en polvo provistas por OVOBRAND S.A. (Brandsen, Argentina). Los hidrocoloides utilizados fueron goma xántica y goma garrofin adquiridos a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Se empleó NaCl de grado analítico, aceite de girasol (Molinos Río de La Plata SACIFI, Buenos Aires), adquirido en un comercio local sin ningún tratamiento posterior, y se utilizó, además, agua destilada.

Elaboración de la pasta

Se prepararon pastas libres de gluten (LG), tipo cinta, utilizando una formulación y proceso de elaboración previamente optimizados por Larrosa et al. (2013), que contenía 51,4% de almidón y harina de maíz, 6,6% de proteínas de huevo en polvo (mezclas de huevo y clara secos, relación de 10:1), 2,5% de mezcla de xántica/garrofin (relación 2:1), 36,0% de agua, 2,5% de aceite y 1,0% de NaCl. El porcentaje de concentraciones de la formulación se expresan en gramos/100 g total. Una vez obtenida la masa fue laminada hasta 2 mm de espesor aproximadamente. Finalmente se obtuvieron fideos LG frescos tipo cintas (dimensiones promedio: 20 cm x 8,07 mm x 1,80 mm), las cuales fueron secadas en las diferentes condiciones que se describen a continuación.

Ensayos de secado

El proceso se realizó en una estufa de aire forzado a velocidad constante, diseñada y construida *ad hoc* dentro del CIDCA, con sistemas independientes de control de humedad relativa del aire (sensor HIH4000A, Honeywell, USA) y de temperatura (termocuplas tipo "T") que permiten medir la pérdida de peso *in situ* de manera continua con una balanza ARC 120 (OHAUS, NJ, USA), como se muestra en la Figura 1. Se ensayaron cuatro condiciones de proceso diferentes combinando dos temperaturas (30 °C y 50 °C) y dos humedades relativas (40 y 80%), manteniendo constante la velocidad del aire en 0,5 m/s. Antes de comenzar cada ensayo, el equipo era colocado en funcionamiento un día antes con el objetivo de estabilizar la temperatura y humedad relativa a la cual sería secado el producto. El contenido de humedad de la pasta antes de comenzar y una vez finalizado el proceso de secado se determinó según el método AOAC 926.07 B (AOAC International, 2000).

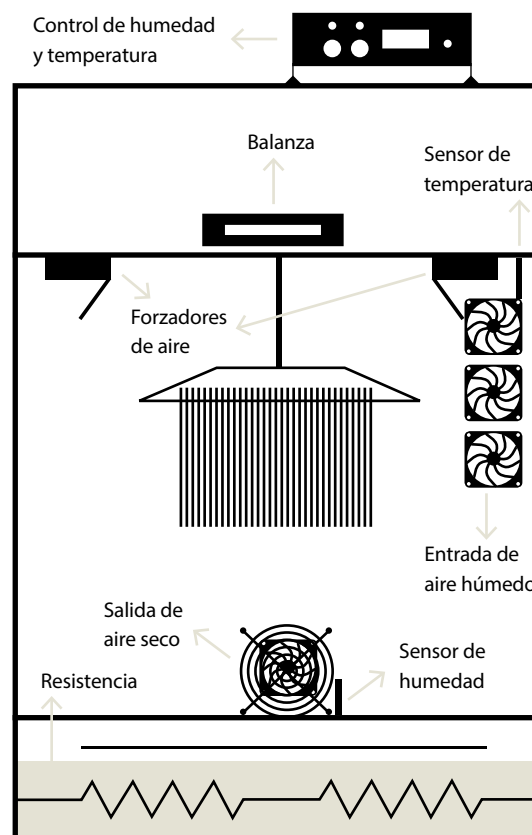


Figura 1. Esquema de la estufa de convección forzada con controles independientes de humedad y temperatura empleada en el secado de las pastas libres de gluten.

Modelado matemático del proceso de secado

El secado implica una transferencia simultánea de calor y materia. Es una operación básica donde intervienen dos factores importantes: la transmisión de calor, para suministrar

el calor latente de evaporación del agua, y la transferencia de agua, que implica su movimiento a través de los productos alimenticios y su separación de los mismos.

El proceso de secado presenta generalmente un breve período de velocidad constante y posteriormente se produce un período de velocidad decreciente, donde el factor que controla es la difusión. Asumiendo para la etapa difusional de transporte de humedad a través de la pasta un modelo basado en la segunda ley de Fick en estado no estacionario resulta:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \nabla \cdot (D \nabla C) \quad (1)$$

donde C es la concentración de agua en el sólido (mol de agua/m³ de masa) y D el coeficiente de difusión efectivo (m²/s).

Por otro lado, la transferencia de energía en el sistema está dada por:

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla \cdot (k \nabla T) \quad (2)$$

donde ρ , C_p y k son la densidad, calor específico y conductividad térmica del sólido, respectivamente.

Por medio de las condiciones de contorno descriptas en las Ecuaciones (3) y (4), las ecuaciones diferenciales no estacionarias de transferencia de materia y energía (Ecuaciones (1) y (2)) quedan acopladas, considerando además las condiciones de simetría tanto para el balance de energía como para el de materia en el centro de la pasta ($x=0$, $y=0$). La Ecuación (3) relaciona la energía transportada por convección desde el aire hasta la superficie de la pasta con el aumento de calor sensible en el sólido y el calor latente requerido para la evaporación del agua; mientras que la Ecuación (4) vincula el flujo difusivo de agua dentro del sólido con el flujo convectivo de agua en el aire.

En las interfaces pasta/aire se cumple que:

$$h(T_\infty - T_s) = -\mathbf{n} \cdot (-k \nabla T) + \lambda k_m (C'_i - C'_b) \quad (3)$$

$$-\mathbf{n} \cdot (\rho D \nabla C) = k_m (C'_i - C'_b) = \frac{k_m}{m} (C_i - C_b) \quad (4)$$

donde h es el coeficiente de transferencia calórica (W/m²°C), T_∞ es la temperatura del aire de secado, T_s la temperatura en la interfase del sólido, λ el calor latente de evaporación del agua, k_m es el coeficiente de transferencia de materia, m es la pendiente de la curva de equilibrio (isoterma de sorción), C'_i y C'_b son las concentraciones de agua en la interfase y en el seno del aire, respectivamente evaluadas por unidad de volumen de fase gaseosa, y C_i y C_b las mismas concentraciones evaluadas por volumen de sólido. En la Figura 2 se muestran esquemáticamente los perfiles de humedad y temperatura dentro de la pasta y en el aire de secado.

Se utilizó el método de elementos finitos para la resolución de las ecuaciones diferenciales a derivadas parciales mediante el software Comsol Multiphysics. Para las simulaciones se consideraron las siguientes suposiciones: 1) Un sistema de transporte bidimensional; 2) distribución inicial de agua uniforme dentro de la pasta; 3) las dimensiones de la pasta no cambiaron durante el secado; 4) se considera que el sólido es homogéneo e isotrópico. Para cada condición de proceso se alimentaron las propiedades físicas del sólido y del fluido calefactor (De Temmerman, et al., 2007; Migliori, et al., 2005; Veladat, et al., 2012).

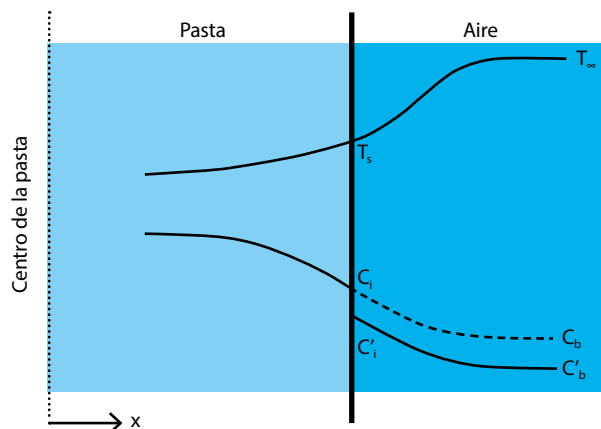


Figura 2. Esquema de la interfase aire de secado-pasta junto con los perfiles de temperatura y concentración de agua.

Resultados y Discusión

Determinación de las curvas de secado

Las curvas experimentales (Figura 3) muestran la disminución de la humedad de los fideos desde su contenido inicial promedio de 0,65 g de agua/g b.s. hasta el valor deseado de 0,13 g de agua/g b.s. que fueron determinadas por medio de la pérdida de peso durante el secado. Se consideró como punto final del proceso cuando la actividad acuosa de la pasta estaba por debajo de 0,65 (Kill y Turnbull, 2001), y a partir de las isotermas de sorción se estableció el contenido de humedad en equilibrio con dicha a_w . En todas las curvas se puede observar que inicialmente, y por un breve período, el contenido de agua disminuyó linealmente y luego comenzó a disminuir más lentamente, entrando en el período de velocidad decreciente.

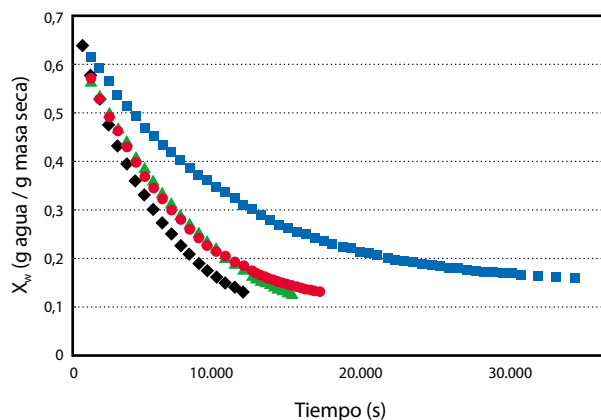


Figura 3. Curvas de secado experimentales para las distintas condiciones de Temperatura (T) y humedad relativa (HR) del aire de secado. (\blacktriangle) $T=30$ °C, HR=40%; (\blacksquare) $T=30$ °C, HR=80%; (\blacklozenge) $T=50$ °C, HR=40%; (\bullet) $T=50$ °C, HR=80%.

El tiempo de secado de las pastas libres de gluten varió entre los 190 y 560 minutos (3,2-9,3 horas); el proceso más largo fue el correspondiente a la condición de baja temperatura y alta humedad relativa (Tabla 1). Por el contrario, el tiempo

de secado se redujo significativamente cuando se utilizó la condición de alta temperatura y baja humedad relativa. Estos valores son más cortos que los tiempos de fideos de trigo secados aproximadamente a 60 °C (entre 14 y 20 horas) y similares a los tiempos de secado a más altas temperaturas (80-120 °C), con 3 a 8 horas de proceso (Kill y Turnbull, 2001).

		Temperatura de secado (°C)	
		30	50
HR (%)	40	4,00	3,17
	80	9,33	4,58

Tabla 1. Tiempos de secado promedio (en h) de pastas libres de gluten secadas en distintas condiciones de temperatura y humedad relativa (HR) del aire de secado.

Cálculo de las propiedades termofísicas y coeficientes de transferencia

Para el cálculo del calor específico (C_p) del sólido se utilizó el promedio pesado de los C_p de sus componentes mediante sus fracciones másicas, w_i (Migliori, et al., 2005):

$$C_p = \left[\frac{X}{1+X} C_{p,agua} + \frac{1}{1+X} C_{p,sol} \right] \quad (5)$$

$$C_{p,sol} = w_{almidón} C_{p,almidón} + w_{proteína} C_{p,proteína} + w_{grasa} C_{p,grasa} \quad (6)$$

$$C_{p,almidón} = 5.737(T) + 1328 \quad [J/(kg K)] \quad (7)$$

$$C_{p,proteína} = 6.329(T) + 1465 \quad [J/(kg K)] \quad (8)$$

$$C_{p,grasa} = 2000 \quad [J/(kg K)] \quad (9)$$

Para la conductividad térmica de la pasta se adoptó el modelo propuesto por Saravacos y Maroulis (2001):

$$k(X, T) = \frac{\lambda_0}{1+X} \exp \left[-\frac{E_0}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] + \frac{X\lambda_i}{1+X} \exp \left[-\frac{E_i}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (10)$$

donde R es la constante de gases ideales, λ_0 (0.273 W/mK) y λ_i (0.8 W/mK) las conductividades térmicas a $T_{ref}=60$ °C y humedades $X=0$ y $X=\infty$, respectivamente; E_0 y E_i las energías de activación para conducción de calor para $X=0$ y $X=\infty$, respectivamente.

La densidad del sólido se halló experimentalmente determinando el peso y volumen de diferentes muestras de pasta. Se tomaron al menos 10 especímenes de cada condición de secado y se determinaron sus dimensiones mediante un calibre digital (modelo SC111201, Schwyz S.A) y su peso mediante balanza analítica. En base a estos valores se estableció la densidad de cada fideo y se obtuvo su valor promedio para introducirlo en el modelo.

El coeficiente de difusión del agua en la pasta fue el único coeficiente que se ajustó utilizando los datos experimentales y se validó a través de experimentos independientes, por medio de combinaciones temperatura/humedad relativa, comparando las pérdidas de peso predichas por el modelo con las obtenidas.

El coeficiente de transferencia de energía (h) se calculó mediante correlaciones del tipo $Nu=f(Re, Pr)$ para flujo alrededor de objetos sumergidos, placa plana y en régimen laminar $Re < 3 \times 10^5$ (Geankoplis, 2003).

$$Nu = 0.648 Re^{0.5} Pr^{1/3} \quad (11)$$

donde $Nu = \frac{hL}{k}$, $Re = \frac{\rho v L}{\mu}$ y $Pr = \frac{C_p \mu}{k}$ son los números de Nusselt, Reynolds y Prandtl, respectivamente, determinados a partir de las propiedades físicas del aire en cada condición de proceso específica y L es la longitud característica (se adoptó $L=8,07$ mm para este caso).

Para el cálculo del coeficiente de transferencia de materia (k_m) se utilizó la analogía entre transferencia de energía y materia (De Temmerman, et al., 2007):

$$\frac{h}{k_m} = \rho C_p \left(\frac{\alpha}{D_{agua}} \right)^{2/3} \quad (12)$$

donde α es la difusividad térmica del aire y D_{agua} es el coeficiente de difusión de agua en aire a cada temperatura.

Resultados del modelo

En la Figura 4a se muestra, a modo de ejemplo, el satisfactorio ajuste del modelo a los datos experimentales correspondientes a pastas libres de gluten, para un secado a 50 °C y humedad relativa del aire de 80%. Las diferentes condiciones operativas presentaron un comportamiento análogo con un error porcentual promedio en el ajuste inferior al 5%. Como único parámetro de ajuste se utilizó el coeficiente de difusión, cuyo valor promedio resultó de $3,5 \times 10^{-11}$ m²/s similar al reportado por otros autores para pastas de trigo tradicionales (Mercier, et al., 2013).

El uso de soluciones analíticas más simples aborda el problema considerando únicamente la ley de Fick, sin acoplar el proceso de transferencia de energía y la evaporación que ocurre en la superficie de la pasta. Además, se considera que el secado se realiza en condiciones isotérmicas, en las cuales el sólido alcanza instantáneamente la temperatura del aire, sin tener en cuenta la existencia del coeficiente h . Sin embargo, puede observarse a partir del modelo numérico (Figura 4c) que la temperatura del centro alcanza su valor asintótico recién después de aproximadamente 30 min. Asimismo, las soluciones analíticas de difusión pura consideran que la concentración de agua en la interfase se mantiene constante, sin contemplar la resistencia a la transferencia de materia del lado del aire, expresada a partir del coeficiente de transferencia de materia.

Los resultados obtenidos se compararon con el secado de pastas tradicionales formuladas con harina de trigo, bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura. Se observó que el tiempo de proceso de las pastas libres de gluten resultó al menos un 50% inferior que en las pastas de harina de trigo, lo cual probablemente puede estar asociado a la alta capacidad de retención de agua de las proteínas del trigo.

Conclusión

El tiempo experimental de secado de las pastas libres de gluten resultó muy dependiente de las condiciones operativas, variando entre 190 y 560 minutos para llegar a una humedad final de 0,13 g/g. Los tiempos de secado fueron similares a los de pastas de trigo secadas a temperaturas mucho más altas.

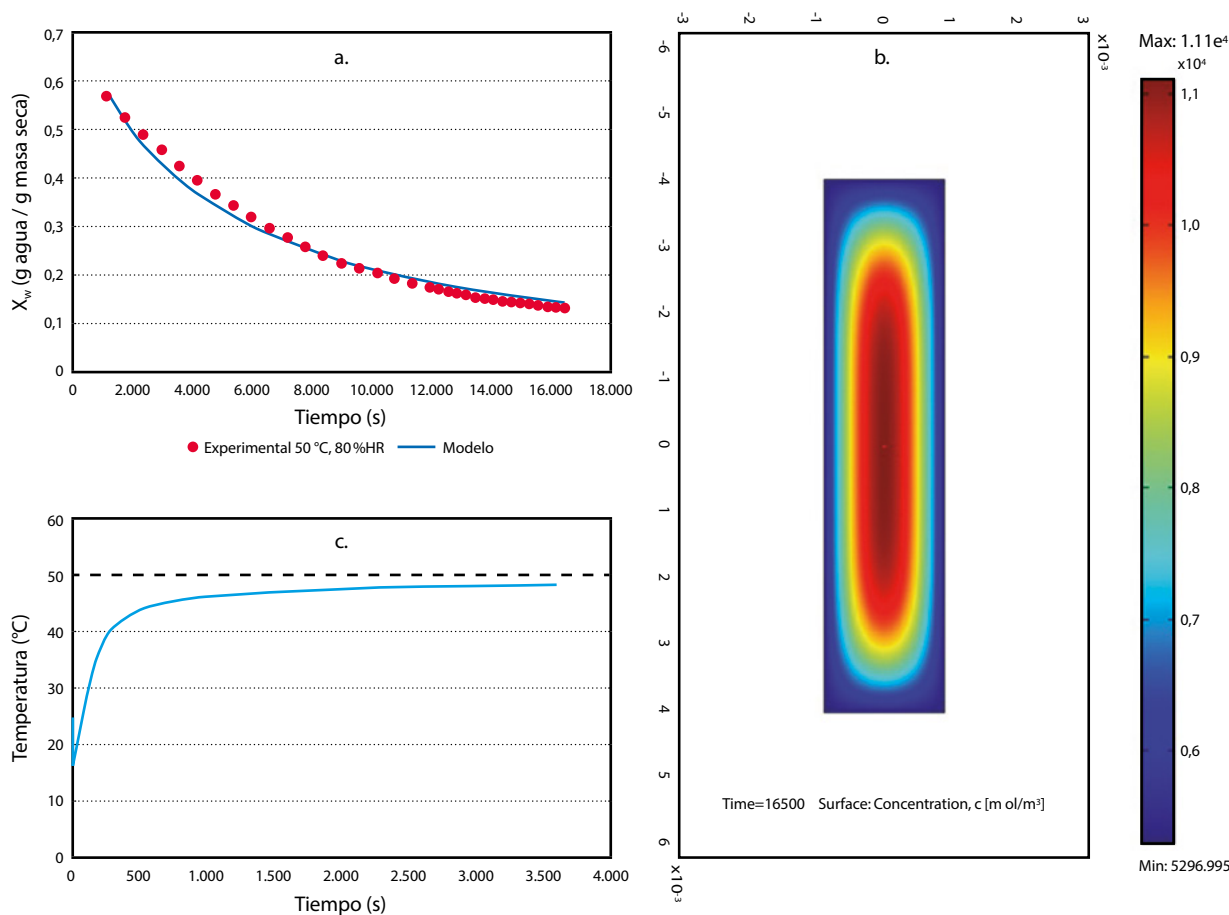


Figura 4. (a) Ajuste del modelo a los datos experimentales para las condiciones 50 °C y 80% humedad del aire (propiedades usadas: $k=0,48 \text{ W/(mK)}$; $h=29,5 \text{ W/(m}^2\text{K)}$; $k_m=2,95 \times 10^{-2} \text{ m/s}$; $C_b=5297 \text{ mol/m}^3$; $D=3,5 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$). (b) Distribución de la concentración de agua dentro de la pasta (mol/m^3) luego de 275 min de secado. (c) Historia térmica del centro de la pasta ($T_{\text{inicial}}=25 \text{ °C}$, $T_{\infty}=50 \text{ °C}$) durante los primeros 60 min de proceso.

En este trabajo se modelaron adecuadamente las curvas de secado ajustando únicamente el coeficiente de difusión, cuyo valor promedio resultó similar al observado en pastas de trigo tradicionales. El modelado matemático resulta una herramienta adecuada para predecir tiempos de proceso y analizar el efecto de parámetros como temperatura, velocidad, humedad del aire, etcétera, en los tiempos de secado.

Reconocimientos

Los autores agradecen el financiamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Los autores agradecen también la colaboración de OVOBRAND S.A., Brandsen, Argentina.

Referencias

- AOAC International, 2000. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 13a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 926.07 B.
- De Temmerman, J., Verboven, P., Nicolai, B. y Ramon, H., 2007. Modelling of transient moisture concentration of semolina pasta during air drying. En: *Journal of Food*

- Engineering*, 80(3), pp.892-903.
- Geankoplis, C., 2003. *Transport processes and separation process principles (includes unit operations)*. 3ra ed. New Jersey: Prentice Hall Press.
- Kill, R.C y Turnbull, K., 2001. *Pasta and semolina technology*. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Larrosa, V., Lorenzo, G., Zaritzky, N. y Califano, A., 2013. Optimization of rheological properties of gluten-free pasta dough using mixture design. En: *Journal of Cereal Science*, 57(3), pp.520-526.
- Mercier, S., Moresoli, C., Villeneuve, S., Mondor, M. y Marcos, B., 2013. Sensitivity analysis of parameters affecting the drying behaviour of durum wheat pasta. En: *Journal of Food Engineering*, 118(1), pp.108-116.
- Migliori, M., Gabriele, D., de Cindio, B. y Pollini, C.M., 2005. Modelling of high quality pasta drying: mathematical model and validation. En: *Journal of Food Engineering*, 69(4), pp.387-397.
- Saravacos, G. D. y Maroulis, Z. B., 2001. *Transport properties of foods*. New York: CRC Press.
- Tscheuschner, H.D., 2001. *Fundamentos de tecnología de los alimentos*. Zaragoza: Ed. Acirba S.A.
- Veladat, R., Zokaee Ashtiani, F., Rahmani, M. y Miri, T., 2012. Review of numerical modeling of pasta drying, a closer look into model parameters. En: *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 7(2), pp.159-170.

Evaluación de la permeabilidad al vapor de agua de películas de proteína de lactosuero/quitosano y su efecto sobre la respiración en banano recubierto

Evaluation of the water vapor permeability for whey protein/chitosan films and its effect on respiration of coated banana

Arce Ortiz, Kadaffi León (1), Ortega Villalba, Karen Johana (1), Ochoa-Martinez, Claudia Isabel (1), Vélez Pasos, Carlos (1)

(1) Grupo de investigación GIPAB, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Contacto: claudia.ochoa@correounivalle.edu.co

RECIBIDO: 6/3/2016 – APROBADO: 21/7/2016

Resumen

Los recubrimientos y películas elaborados lactosuero (WPI) y quitosano (CHI) son conocidos por ser antifúngicos y por ser barrera para la transferencia de vapor de agua, logrando un efecto en la conservación de frutas. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de un recubrimiento de WPI y CHI sobre la respiración del banano durante el almacenamiento en condiciones ambientales (25 ± 3 °C y 75 ± 5 % HR) y su relación con la permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas. Para la elaboración del recubrimiento se evaluaron distintas concentraciones de WPI y CHI. Se empleó CHI al 75% de desacetilación (solución de 1,2%, 1,5% y 1,8% p/v) y WPI al 96% (solución de 3% y 4% p/v). La tasa de respiración se determinó realizando mediciones durante 55 minutos para cada tratamiento empleando un respirómetro digital. El mejor recubrimiento fue CHI 1,5%-WPI 3% donde la maduración y respiración fue controlada y el pico climatérico ocurrió el día 9 de almacenamiento con 109,84 mg CO₂/kg-h (en la muestra control fue el día 7 con 172,71 mg CO₂/kg-h). La permeabilidad al vapor de agua de la película elaborada con esta formulación tuvo un valor intermedio ($7,43 \times 10^{-4}$ g-mm/Pa-h-m²) respecto a las demás formulaciones. Las películas con la mayor y la menor permeabilidad mostraron las tasas de respiración más altas.

Palabras clave: Recubrimiento, película comestible, biodegradable, permeabilidad, respiración.

Abstract

The coatings and films prepared whey (WPI) and chitosan (CHI) are known to be antifungal and also a barrier to the transference of water vapor, having an effect on the preservation of fruits. The aim of this study was to determine the effect of a coating of WPI and CHI on respiration of banana during storage at ambient conditions (25 ± 3 °C and 75 ± 5 % RH) and its relation to water vapor permeability (PVA) of the films. Different concentrations of WPI and CHI were evaluated. CHI was used at 75% of deacetylation (solution of 1,2%, 1,5% and 1,8% w/v) and WPI of 96% (solution 3% and 4% w/v). The respiration rate was determined using a digital respirometer by measuring each sample during 55 minutes. The best coating was 1,5% -WPI CHI 3%. In this treatment the maturity and respiration was controlled and the climacteric peak occurred on day 9 of storage with 109,84 mg CO₂/kg-h (in the control sample occurred on day 7 with 172,71 mg CO₂/kg-h). The water vapor permeability of the film made with this formulation had an intermediate value ($7,43 \times 10^{-4}$ g-mm / m²-h-Pa) over other formulations. Films with the highest and the lowest permeability shown the highest respiration rates.

Keywords: Coating, edible film, biodegradable, permeability, respiration.

Introducción

El banano es una de las frutas más producidas y consumidas en el mundo debido a sus características distintivas de aroma y sabor (Gol y Ramana-Rao, 2011; Wall, 2006). Además, es una fuente barata de carbohidratos, rica en potasio, calcio,

antioxidantes y otros micronutrientes. Por ser rico en azúcares y bajo en grasa, tiene diversos aprovechamientos en la industria alimentaria como alimento infantil, alimentos funcionales y postres (Mohapatra, et al., 2010). Sin embargo, esta fruta es altamente perecedera, debido a su alto contenido de agua, y es susceptible a muchas enfermedades, especialmente al ataque

del hongo *Colletotrichum musae* (Bower, et al., 1998; Gol y Ramana-Rao, 2011; Bonilla, et al., 2012). Por ser un fruto climatérico, produce suficiente etileno para inducir rápidos cambios fisicoquímicos en propiedades tales como color, textura, aroma, composición química y frecuencia respiratoria (Bonilla, et al., 2012), la degradación de la clorofila y la reubicación de los micro y macronutrientes entre la pulpa y otras partes de la planta (Mohapatra, et al., 2010). Dentro de las actuales técnicas poscosecha del banano, se incluyen el uso de agentes de biocontrol, fungicidas, irradiación y otros tratamientos físicos, sustancias antimicrobianas naturales y compuestos orgánicos e inorgánicos (Ranasinghe, et al., 2002). Las investigaciones realizadas por Maqbool et al. (2010) y Win et al. (2007) aplicando recubrimientos en la conservación poscosecha de banano han logrado buenos resultados, entre ellos la maduración controlada del banano, la reducción del crecimiento del hongo y la extensión de la vida útil del banano en refrigeración hasta 28 días, lo que indica que es una tecnología promisoría que puede aportar beneficios en el gremio bananero.

El uso de recubrimientos en alimentos es una de las formas más rentables de incrementar su vida útil durante el almacenamiento (Beverly, et al., 2008). Uno de los componentes que más se han empleado en recubrimientos es la proteína aislada de lactosuero (WPI), la cual se distingue por su facilidad de formar recubrimientos con propiedad de barrera para la transferencia de vapor de agua y de gases (Prommakool, et al., 2011; Osés, et al., 2009). Por su parte, el quitosano (CHI) es un compuesto reconocido por tener propiedades antifúngicas y antimicrobiales, aunque con alta permeabilidad al vapor de agua (Miller y Krochta, 1997; Hernández, et al., 2011; Kurek, et al., 2014; Trejo, et al., 2001). Algunos recubrimientos y películas elaborados a partir de dichos compuestos han sido empleados en fresa (Park, et al., 2005), calabaza (Ponce, et al., 2008) y banano (Maqbool, et al., 2010). El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de un recubrimiento de WPI y CHI sobre la respiración en banano durante el almacenamiento y su relación con la permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas.

Materiales y Métodos

Se realizó un diseño factorial aleatorizado con dos factores: concentración de WPI (2 niveles: 3% y 4% p/v) y concentración de CHI (3 niveles: 1,2, 1,5 y 1,8% p/v). Los niveles empleados y el tiempo de estudio se definieron de acuerdo a ensayos preliminares. Las variables de respuesta fueron la respiración de los bananos recubiertos y la permeabilidad al vapor de agua de las películas elaboradas. Se evaluó la respiración diariamente durante 14 días. Para cada prueba se emplearon cuatro bananos garantizando suficiente CO₂ en el respirómetro. Cada tratamiento se hizo por triplicado. Para la prueba de permeabilidad se elaboraron tres películas para cada tratamiento. Se realizó análisis de varianza y comparación de medias de Tukey con el programa estadístico SAS 9.2, con una confiabilidad del 95%.

Elaboración de la mezcla quitosano (CHI) - proteína de suero lácteo (WPI)

Se disolvió el WPI (Davisco food, USA: Instantized BiPRO 96%) según el diseño experimental (3 y 4% p/v) en 100 ml de agua destilada en un baño maría a 80 °C con agitación manual durante 20 minutos. Posteriormente se enfrió con

agua a temperatura ambiente y se homogenizó en un equipo Ultraturrax durante 5 min a 9000 rpm.

Para la preparación de CHI (Sigma-Adrich, USA: ≥75% desacetilado) se hizo la disolución del quitosano en las concentraciones de interés (1,2, 1,5 y 1,8% p/v) en ácido acético glacial al 1% y agitación manual durante 40 min en temperatura ambiente (25±2 °C). Posteriormente se realizó la homogenización de la solución utilizando el Ultraturrax a 9000 rpm durante 5 min.

Para realizar la mezcla, se adicionó la solución de WPI a la de CHI y se homogenizó empleando el Ultraturrax a 10000 rpm durante 25 min evitando la formación de espuma.

Selección, recubrimiento y secado de las muestras

Se seleccionaron bananos Gros Michel en escala 1 de coloración establecida por Piña et al. (2006). Se escogieron muestras de tamaño similar sin señales de ataques microbiológicos o de golpes. Se sumergió cada banano (incluyendo las puntas) durante 1 min en la solución. Para el secado, se suspendieron los bananos en una estructura metálica de tal manera que no tuvieran contacto con superficies durante 90 min. Finalmente, se almacenaron a temperatura ambiental promedio 25±2 °C y humedad relativa de 75±2%.

Medición de la respiración

Se evaluó la tasa de respiración (mg CO₂/kg-h) durante 14 días a 25±3 °C-70±5%HR en bananos con y sin recubrimiento. Para determinar la tasa de respiración se estimó la cantidad de CO₂ producida durante 55 min para cada tratamiento en un respirómetro digital construido en la Universidad del Valle (descrito en detalle por Ortega, et al., 2014). Se registró el peso de cada muestra, el tiempo de medición, el volumen del equipo, la densidad del producto y el promedio de los incrementos de los niveles de CO₂. Para determinar la tasa respiratoria (mg de CO₂ kg⁻¹ hora⁻¹) se empleó la siguiente ecuación:

$$TR = \frac{(1.8)(IC)(VR)}{(w)(IL)} \quad (1)$$

donde, *TR* es la tasa de respiración (mg kg⁻¹h⁻¹); *IC* es el incremento en la concentración de CO₂ (mg); *VR* es el volumen libre en el recipiente (m³); *w* es el peso de la fruta (kg), *IL* es el intervalo de tiempo de lectura (h) y el valor 1,8 corresponde a un factor de conversión de gases (1ppm = 1,8 mgCO₂/m³).

Elaboración de las películas

Se vertieron 7 ml de la solución CHI-WPI sobre una lámina lisa de polipropileno. La solución se esparció de tal manera que se alcanzara un diámetro de 12 cm y se dejó secar a temperatura ambiente (25±3 °C y 75±2% HR) durante dos días. El espesor de las películas fue de 0.049±0,0088 mm, medido con un calibrador en tres puntos de cada película.

Medición de permeabilidad de las películas al vapor de agua (PVA)

La permeabilidad de las películas al vapor de agua (g-mm/Pa-h-m²) se midió empleando el método de Debeaufort

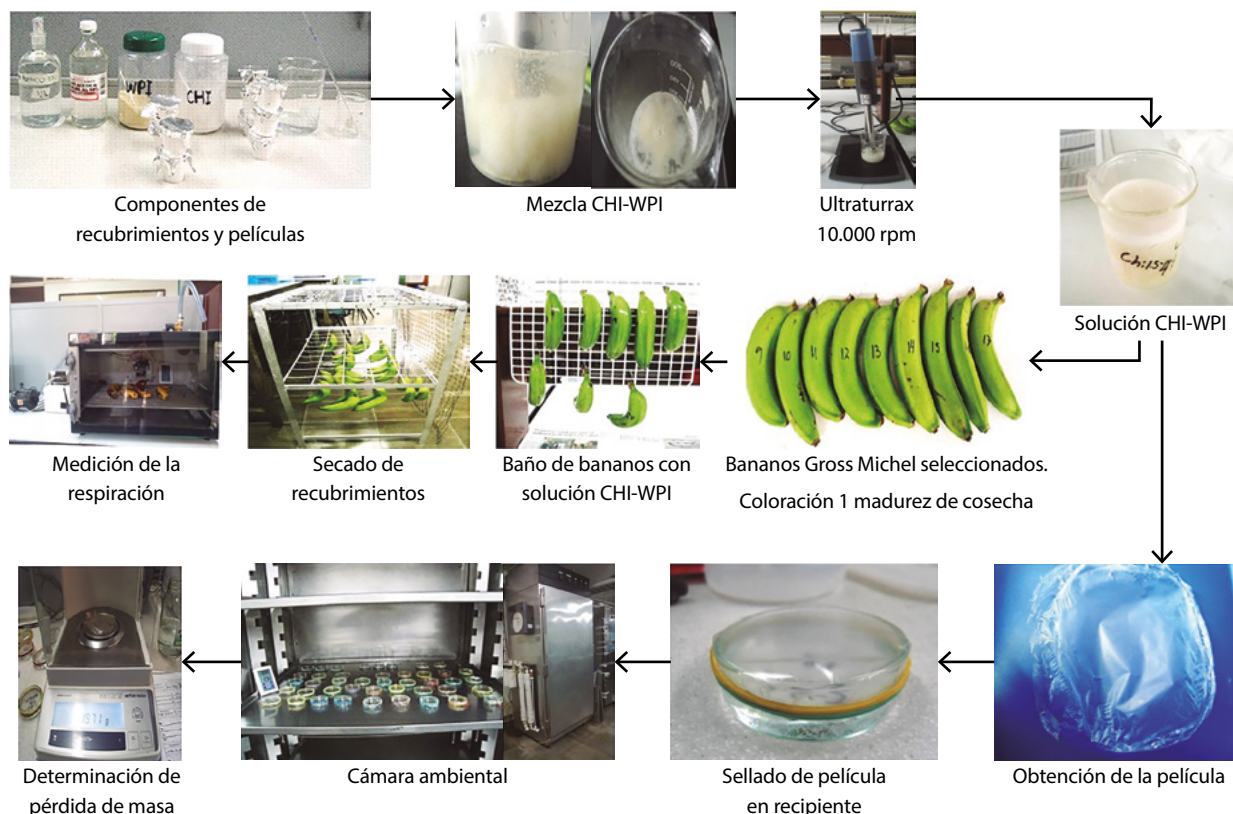


Figura 1. Metodología de formación de recubrimientos y películas de quitosano (CHI) y proteína de lactosuero (WPI).

et al. (1993). Se utilizaron cajas de petri de 4,95±1 cm y de 5,55±0,5 cm de diámetro. A cada caja de Petri se adicionaron 10 ml de solución saturada de MgCl₂·x6H₂O con a_w ajustada a 0,33 y se cubrió la parte superior de la caja con la película, fijándola con una banda de caucho. Posteriormente se pesaron y se mantuvieron durante 24 h en una cámara ambiental (marca ADE Tecnología, Bogotá, Colombia) a 25±3 °C y 70±2% HR. Pasado este tiempo, se retiraron las muestras y se pesaron nuevamente. El área de transferencia de vapor de agua a través de la película (πr²) fue 1,97x10⁻³±0,0001 m² (caja pequeña) y 2,37x10⁻³±0,0001m² (caja grande). La PVA (g/m s Pa) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$PVA = \frac{(\Delta m)(e)}{(\Delta t)(\Delta p)(A)} \quad (2)$$

Donde: Δm es la pérdida de peso (g); e es el espesor de la película (m); Δt es el tiempo de la prueba (s); Δp es la diferencia de presiones parciales (calculadas como la humedad relativa del medio multiplicada por la presión de saturación a la temperatura del medio) entre los dos lados de la película (Pa). Se supone una humedad relativa en el interior de la caja petri igual a cero y se tiene la humedad relativa en el exterior igual a 70% y la presión de saturación determinada a 25 °C (condiciones de la cámara ambiental); A es el área de la película expuesta a la transferencia de humedad (m²). En la Figura 1 se presenta la metodología utilizada.

Resultados y Discusión

Respiración de los bananos Gros Michel

En la Figura 2 se presentan las curvas de respiración. Las muestras control presentaron el pico climatérico en el día 7, incrementando el valor de la tasa de respiración desde el día 1 hasta alcanzar un valor máximo 172,71 ±10 mg CO₂/kg h. Este valor fue más alto que los picos observados en las muestras recubiertas. Según Khwaldia et al. (2004), la presencia de WPI en el recubrimiento proporciona menor intensidad en la respiración debido a que éste se encarga de regular la absorción de O₂ y, por ende, la respiración. El pico climatérico entre los días 6 y 7 de almacenamiento es típico en bananos sin recubrimientos; este comportamiento ha sido reportado por otros autores como Elitzur et al. (2010), quienes almacenaron a 20 °C y 75% HR durante 16 días, Kittur et al. (2001) a 27 °C, 65% HR y 14 días, y Biale et al. (1953) a 20 °C durante 10 días.

En las muestras recubiertas, el pico climatérico varió entre el día 4 (tratamiento CHI 1,8% - WPI 4%), y el día 9 (tratamiento CHI 1,5% - WPI 3%). El mayor pico climatérico lo tuvieron las muestras con el recubrimiento CHI 1,2%-WPI 4%, las cuales mostraron un rápido incremento en su tasa respiratoria desde el día 1 hasta alcanzar el pico climatérico en el día 5 con 161±3 mgCO₂/kg h. Por su parte, las muestras con el recubrimiento CHI 1,8%-WPI 4% fueron las que presentaron el pico climatérico más rápidamente (en el día 4). Durante todo el tiempo de estudio, las tasas de respiración más bajas con relación al control se observaron en los

tratamientos CHI 1,2%-WPI 3%, CHI 1,5%-WPI 3% y CHI 1,5%-WPI 4%. Las muestras con recubrimiento CHI 1,5%-WPI 3% tuvieron el pico climatérico con menor intensidad, el cual ocurrió en el mayor tiempo de almacenamiento.

Campuzano et al. (2010) y Barrero y Urrea (2012), quienes han investigado la variedad Gros Michel y los efectos logrados por acción de los recubrimientos, denominan este efecto como de atmósfera modificada debido a que se regula el intercambio de gases. Ese efecto de barrera puede causar menor deterioro como lo manifiesta Castellanos et al. (2011). Al comparar el número de días para llegar al pico climatérico, se observa que, en general, en los tratamientos con menor cantidad de WPI en la formulación el pico climatérico fue cercano o posterior al de la muestra control (6-9 días), mientras que en los tratamientos con mayor cantidad de WPI, tuvieron picos climatéricos entre 4 y 6 días.

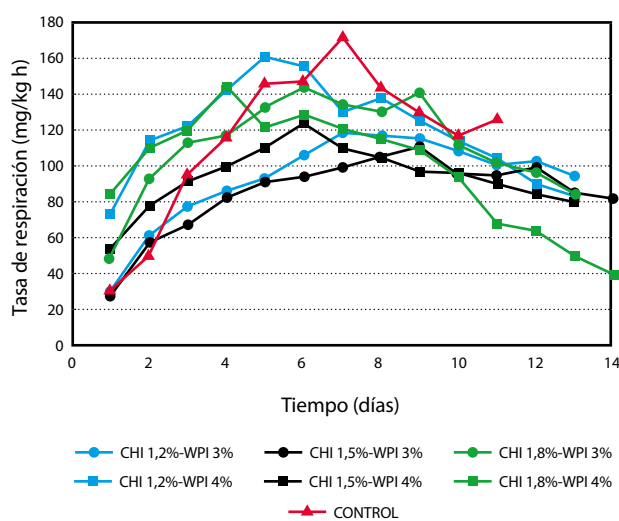


Figura 2. Efecto del recubrimiento de quitosano (CHI) y proteína de lactosuero (WPI) sobre la respiración de bananos (25 ± 3 °C y $75\pm 5\%$ HR)

Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Los resultados observados en la tasa respiratoria están posiblemente influenciados por la permeabilidad de los recubrimientos al vapor de agua y por la acción sinérgica de los componentes del recubrimiento (WPI y CHI). En la Figura 3 se presenta la permeabilidad al vapor de agua de las películas elaboradas con igual formulación que los recubrimientos.

Los valores observados se encuentran dentro de los parámetros de permeabilidad al vapor de agua reportados por otros autores para componentes similares. Embuscado y Huber (2009) determinaron la permeabilidad de un recubrimiento de CHI 1%-Almidón de maíz 5%, con un valor de $0,5E-10$ g/m s Pa; Lin y Zhao (2007) publicaron datos de permeabilidad de quitosano a 25 °C y $50-70\%$ HR con un valor de $4,9E-10$ g/m s Pa, y García et al. (2009) presentaron datos de permeabilidad de películas de quitosano 100% y en combinación con almidón de maíz al 5% con valores de $5,04E-10$ g/m s Pa y $8,76E-10$ g/m s Pa, respectivamente. Por su parte, Fakhreddin-Hosseini et al. (2013) presentaron datos de permeabilidad de películas de quitosano y gelatina de pescadero a 25 °C y 50% HR de $0,6\pm 0,034$

mm/kPa h m² ($1,67E-10$ g/m s Pa) y Prommakool et al. (2011) reportaron valores de permeabilidad de proteína de lactosuero con 25% de glicerol de $2,6$ g mm/kPa h m² ($7,22E-10$ g/m s Pa) a 23 °C y 0% HR (en este trabajo los valores de PVA están entre $1,49E-10$ y $2,50E-10$ g/m s Pa a 25 °C y 70% HR ambiente). Al observar estos resultados, se puede concluir que el CHI tiene mayor permeabilidad al vapor de agua que la WPI, por lo cual es usual combinar estos ingredientes para lograr el efecto antifúngico del CHI y reducir la permeabilidad al vapor de agua debido al WPI.

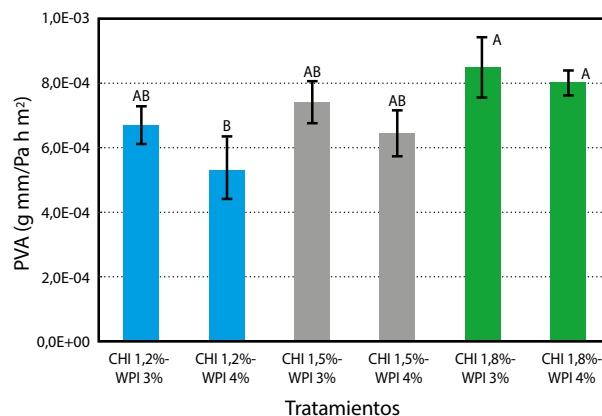


Figura 3. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas de quitosano (CHI) y proteína de lactosuero (WPI).

Según la Figura 3 y la prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0,05$) en el modelo factorial, se encontraron tres grupos (B, AB y A). El primer grupo corresponde al tratamiento con la permeabilidad más baja (CHI 1,2% - WPI 4%), el segundo grupo incluye los tratamientos con permeabilidad media (CHI 1,5% - WPI 4%, CHI 1,2% - WPI 3%, CHI 1,5% - WPI 3%) y el tercer grupo corresponde a los tratamientos con alta permeabilidad (CHI 1,8% - WPI 3%, CHI 1,8% - WPI 4%). Cuando se comparan estos grupos con los valores de tasa de respiración en el pico climatérico se observa que existe correlación entre ellos. Para el tratamiento del primer grupo se obtuvo una tasa de respiración de 161 mg CO₂/kg h; para los tratamientos del segundo grupo se obtuvieron tasas de respiración de 124 , 119 y 110 mg CO₂/kg h, respectivamente, y para el tercer grupo se obtuvo una tasa de respiración de 144 mg CO₂/kg h en ambos tratamientos. Puede verse que para recubrimientos con permeabilidad intermedia, la tasa de respiración disminuye, lo cual es un comportamiento deseado. Por el contrario, para permeabilidades bajas o altas la tasa de respiración aumenta.

En cuanto al número de días para llegar al pico climatérico, los tratamientos con PVA extremos (grupos B y A) presentaron picos climatéricos adelantados en comparación con el tratamiento control. En el primer caso se presentó una maduración acelerada con presencia de hongos (análisis visual), debida a la baja concentración de CHI, el cual tiene propiedades antifúngicas y alto contenido de agua (baja PVA), acompañada de una posible fermentación. En el segundo caso aparentemente se presentó una interrupción del proceso fisiológico evidenciado en la apariencia externa verde y en la textura blanda.

Por otra parte, de acuerdo al ANOVA se observó que los dos factores tuvieron efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) sobre la permeabilidad. La prueba de comparación de medias de Tukey en el modelo factorial mostró que el nivel

3 de WPI es estadísticamente superior al nivel 4 de WPI, lo que significa que, en general, con mayor concentración de WPI se obtiene menor permeabilidad. En cuanto al CHI, se presentó diferencia estadística entre los niveles de CHI 1,8, 1,5 y 1,2, siendo la concentración CHI 1,8 la de mayor permeabilidad en las dos concentraciones de WPI.

El tratamiento CHI 1,5% - WPI 3% tuvo el mejor comportamiento, mostró un pico climatérico tardío respecto al control y un proceso de senescencia más suave, alcanzando los 14 días de prueba en buen estado (Figura 2). Este comportamiento se debe posiblemente a una sinergia CHI-WPI en la cual una permeabilidad intermedia provoca baja tasa de respiración y retardo del pico climatérico, con efecto antifúngico suficiente del CHI y con permeabilidad controlada por la presencia del WPI.

Conclusiones

Se observó un efecto significativo de CHI y WPI sobre la permeabilidad de las películas al vapor de agua; a mayor concentración de CHI y menor concentración de WPI se incrementó la permeabilidad. Adicionalmente, los tratamientos se comportaron de manera diferente a nivel estadístico, conformando tres grupos: los grupos con más baja permeabilidad y con más alta permeabilidad coincidieron con los grupos con mayor y menor tasa de respiración, respectivamente. Se concluye que es necesario tener permeabilidad intermedia para lograr un balance en la cantidad de humedad que se transfiere a través del recubrimiento, logrando de esta forma un pico climatérico tardío y una curva de respiración con menores variaciones. El mejor recubrimiento fue CHI 1,5% - WPI 3%, el cual permitió que los bananos realizaran la maduración y la respiración de manera controlada. El pico climatérico para este tratamiento ocurrió en el día 9 de almacenamiento, con una tasa de respiración de 109,84 mg CO₂/kg-h (en la muestra control ocurrió en el día 7, con una tasa de respiración de 172,71 mg CO₂/kg-h). La permeabilidad al vapor de agua de la película elaborada con esta formulación tuvo un valor intermedio (7,4x10⁻⁴ g-mm/Pa-h-m²) respecto a las demás formulaciones, con lo que se logra un equilibrio en la transferencia de vapor de agua.

Se recomienda para futuros trabajos evaluar la permeabilidad al dióxido de carbono y al oxígeno. La transferencia de estos gases tiene un efecto importante en el proceso de respiración y la maduración.

Referencias

- Barrero, M. O. y Urrea, J. W., 2012. Modelamiento de la tasa de respiración de banano, variedad Gross Michel, basado en las ecuaciones de la cinética enzimática de Michaelis-Menten. En: *Tumbaga*, 7, pp.101-114.
- Beverly, R., Janes, M. E., Prinyawiwatkul, W., No, H. K. y Beverly, R. L., 2008. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. En: *Food Microbiology*, 25(3), pp.534-537.
- Biale, J., Young, R. y Olmstead, A., 1953. Fruit respiration and ethylene. En: *Plan Physiology*, 29(2), pp.168-174.
- Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M. y Chiralt, A., 2012. Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. En: *Journal of Food Engineering*, 110(2), pp.208-213.
- Bower, J., Jobling, J., Patterson, B. y Ryan, D., 1998. A method for measuring the respiration rate and respiratory quotient of detached plant tissues. En: *Postharvest Biology and Technology*, 13(3), pp.263-270.
- Castellanos, D. A., Algecira, N. A. y Villota, C. P., 2011. Aspectos relevantes en el almacenamiento de banano en empaques con atmósferas modificadas. En: *Revista Iberoamericana de Tecnología de Postcosecha*, 12(2), pp.114-134.
- Campuzano, A., Cornejo, F., Ruiz, O. y Peralta, E., 2010. Efecto del Tipo de Producción de Banano Cavendish en su Comportamiento Poscosecha Resumen. En: *Revista Tecnológica ESPOL-RTE*, 23(2), pp.41-48.
- Debeaufort, F., Martin-Polo, M. y Voilley, A., 1993. Polarity homogeneity and structure affect water vapor permeability of model edible films. En: *Journal of Food Science*, 58(2), pp.426-429.
- Elitzur, T., Vrebalov, J., Giovannoni, J., Goldschmidt, E. y Haya, F., 2010. The regulation of MADS-box gene expression during ripening of banana and their regulatory interaction with ethylene. En: *Journal of Experimental Botany*, 61(5), pp.1523-35.
- Embuscado M. y Huber K., 2009. *Edible films and coatings for food applications*. New York: Springer-Verlag, p.403.
- Fakhreddin-Hosseini, S., Rezaei, M., Zandi, M. y Ghavi, F.F., 2013. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. En: *Food Chemistry*, 136(3-4), pp.1490-1495.
- García, M. A., Pinotti, A., Martino, M. N. y Zaritzky, N. E., 2009. Characterization of starch and composite edible films and coatings. En: Embuscado, M., Huber, K., 2009. *Edible films and coatings for food applications*. New York: Springer-Verlag, pp.169-210.
- Gol, N. B. y Ramana Rao, T. V., 2011. Banana fruit ripening as influenced by edible coatings. En: *International Journal of Fruit Science*, 11(2), pp.119-135.
- Hernández, O. L., González, G., Gutierrez, M. N., Muñoz C, L.N. y Quintero R. A., 2011. Estudio de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especias como agentes antimicrobianos. En: *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(3), pp.455-463.
- Khwaldia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S. y Hardy, J., 2004. Milk proteins for edible films and coatings. En: *Critical Reviews in Food Sci. and Nutrition*, 44(4), pp.239-251.
- Kittur, F.S, Saroja, N., Habibunnisa y Tharanathan, R. N., 2001. Polysaccharide-based composite coating formulations for shelf-life extension of fresh banana and mango. En: *European Food Research and Technology*, 213(4-5), pp.306-311.
- Kurek, M., Guinault, A., Voilley, A., Galic, K. y Debeaufort, F., 2014. Effect of relative humidity on carvacrol release and permeation properties of chitosan based films and coatings. En: *Food Chemistry*, pp.144, 9-17.
- Lin, D. y Zhao, Y., 2007. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. En: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6(3), pp.60-75.
- Maqbool, M., Ramachandran, S., Smith, D.R., Alderson, P., Ali y A., 2010. Control of postharvest anthracnose of banana using a new edible composite coating. En: *Crop Protection*, 29 (10), pp.1136-1141.

- Miller, K. S. y Krochta, J. M., 1997. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: a review. En: *Trends in Food Science and Technology*, 8(7), pp.228–237.
- Mohapatra, D., Mishra, S. y Sutar, N., 2010. Banana post harvest practices: Current status and future prospects- A review. En: *Agricultural Reviews*, 31(1), pp.56–62.
- Ortega, K.J., Gómez, C.A., Vélez, C., Velasco, J. y Alonso, L. (2014). Desarrollo de un respirómetro para productos agrícolas. En: *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 67(2), pp.1116-1119.
- Osés, J., Fabregat-Vázquez, M., Pedroza-Islas, R., Tomás, S. A., Cruz-Orea, A. y Maté, J. I., 2009. Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum. En: *Journal of Food Engineering*, 92(1), pp.56–62.
- Park, S.I., Stan, S.D., Daeschel, M.A., Zhao, Y.Y., 2005. Antifungal Coatings on Fresh Strawberries (*Fragaria* × *ananassa*) to Control Mold Growth During Cold Storage. En: *Food Microbiology and Safety*, 70(4), pp.202–207.
- Piña, G., Laborem, G., Surga, J., Marín, C., Rangel, L., Espinoza M., Delgado, A., 2006. Atributos de calidad en frutos de híbridos FHIA (*Musa*) para tres ciclos de cosecha. En: *Revista Facultad de Agronomía de La Universidad de Zulia (LUZ)*, 23(1), pp.425–442.
- Ponce, A.G., Roura, S.I., del Valle, C.E. y Moreira, M.R., 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. En: *Postharvest Biology and Technology*, 49(2), pp.294–300.
- Prommakool, A., Sajjaanantakul, T., Janjarasskul, T. y Krochta, J. M., 2011. Whey protein – okra polysaccharide fraction blend edible films: tensile properties, water vapor permeability and oxygen permeability. En: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(2), pp.362–369.
- Ranasinghe, L., Jayawardena, B. y Abeywickrama, K., 2002. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. En: *Letters in Applied Microbiology*, 35(3), pp.208–11.
- Trejo, V., Aragon, N. y Miranda, P., 2001. Estimación de la permeabilidad al vapor de agua en películas a base de quitosán. En: *Revista de la Sociedad Química de México*, 45(1), pp.1–5.
- Wall, M. M., 2006. Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa* sp.) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. En: *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(5), pp.434–445.
- Win, N. K. K., Jitareerat, P., Kanlayanarat, S. y Sangchote, S., 2007. Effects of cinnamon extract, chitosan coating, hot water treatment and their combinations on crown rot disease and quality of banana fruit. En: *Postharvest Biology and Technology*, 45(3), pp.333–340.

Efecto de la formulación de galletas en la secreción de hormonas de saciedad

Effect of biscuit formulations in the release of satiety hormones

Martinez-Saez, Nuria (1), Hochkogler, Christina Maria (2), Somoza, Veronika (2), del Castillo, María Dolores (1)

(1) CIAL, Instituto de Investigación de Ciencias de la Alimentación (UAM-CSIC), Madrid, España

(2) Departamento de Química Nutricional y Fisiológica, Facultad de Química, Universidad de Viena, Austria.

Contacto: mdolores.delcastillo@csic.es

RECIBIDO: 13/4/2016 – APROBADO: 13/6/2016

Resumen

El objetivo de esta investigación fue desarrollar una nueva formulación de galleta con bajo índice glicémico y elevada calidad sensorial para el control efectivo de la saciedad. Se emplearon como ingredientes stevia (edulcorante hipocalórico), fructooligosacáridos (FOS), para mejorar la tolerancia a carbohidratos y calidad sensorial del alimento, y fibra dietética antioxidante de café (marros de café). Los alimentos e ingredientes individuales se digirieron in vitro simulando condiciones de digestión humana. La liberación in vitro de péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP1) y serotonina se estimuló incubando células humanas intestinales, HuTu-80 y Caco-2, con digeridos de galletas (0,5, 0,05 y 0,01 mg/ml) durante 90 min y 5 min, respectivamente. La cuantificación de las hormonas GLP1 y serotonina se realizó por ELISA. La secreción de hormonas en células tratadas con digeridos de galletas tradicional y nueva fueron del mismo orden de magnitud ($p > 0,05$). La fibra antioxidante del café estimuló la secreción de hormonas saciantes mientras que la stevia resultó inefectiva. La sustitución de sacarosa por stevia no afectó la capacidad saciante de las galletas. En conclusión, se ha logrado un nuevo alimento con alto contenido en fibra antioxidante, saludable, saciante, de buena calidad sensorial apto para individuos sanos y diabéticos.

Palabras clave: Alimento de bajo índice glicémico, fibra antioxidante de café, FOS, GLP-1, serotonina, stevia.

Abstract

This research aimed to evaluate the potential of a new biscuit formulation with low glycaemic index and high sensorial quality for an effective control of satiety. Stevia as hypocaloric sweetener, fructooligosaccharides (FOS) as enhancer of glucose tolerance and sensorial quality, and antioxidant insoluble dietary fibre (spent coffee grounds) were used as food ingredients. Food and individual ingredients were digested in vitro by mimicking human oral-gastrointestinal digestion. The in vitro release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and serotonin was stimulated by incubation of human intestinal cells, HuTu-80 and Caco-2, with digests at final concentrations of 0,5, 0,05 and 0,01 mg/ml, for 90 min and 5 min, respectively. Quantification of the hormones called as GLP1 and serotonin was carried out by ELISA. The traditional and new biscuits induced the release of hormones in the same order of magnitude ($p > 0,05$). Antioxidant coffee fibre contributed to stimulate the release of satiety hormones while stevia was ineffective. Replacement of sucrose by stevia did not affect the satiating capacity of the biscuit. In conclusion, a new healthy food containing high level of antioxidant dietary fibre, satiating, good sensorial quality for healthy people and friendly for diabetics has been obtained.

Keywords: Antioxidant coffee fibre, FOS, GLP-1, low glycaemic index, serotonin, stevia.

Introducción

La obesidad es uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI en todo el mundo. En 2014, más de 1.900 millones de adultos mayores de 18 años tenían sobrepeso, de los cuales más de 600 millones eran obesos (World Health Organization, 2014). La mayoría de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad se cobran más vidas humanas que la insuficiencia ponderal (World Health Organization, 2014). Enfermedades como diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, enfermedades cardiovasculares y varios

tipos de cáncer están asociadas con la obesidad (Nutritional Heart, Lung and Blood Institute, 2013).

Una alimentación saludable puede considerarse como estrategia sostenible para reducir el riesgo de obesidad y las enfermedades relacionadas tales como la diabetes tipo 2. Así, la búsqueda de nuevos ingredientes y alimentos con capacidad de controlar de forma efectiva los procesos de saciedad y de glicemia postprandial es hoy en día una línea de investigación prioritaria.

La stevia, en concreto los glucósidos de esteviol, poseen efectos beneficiosos en la salud como efecto hipocalórico, antioxidante y anti-diabético (Sharma, et al., 2012). Los fructooligosacáridos (FOS) presentan carácter prebiótico (Kumar, et al., 2012) y capacidad de reducir la respuesta glicémica postprandial (EFSA, 2014). Otro ingrediente esencial en la formulación de alimentos para el control del peso corporal y la diabetes es la fibra dietética. Los subproductos agroalimentarios y en particular los del café son una fuente abundante y sostenible de varios componentes bioactivos beneficiosos para la reducción de riesgo de patologías crónicas, incluyendo fibra antioxidante (del Castillo, et al., 2014).

Las hormonas serotonina y péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), secretadas en el tracto gastrointestinal, están implicadas en los procesos de saciedad. La ingesta de ciertos alimentos e ingredientes activa señales de saciedad en el intestino que implican la liberación de serotonina y GLP-1, la activación de sus receptores gastrointestinales y la señalización aferente vagal, y por lo tanto, la regulación del apetito en el ser humano (Mawe y Hoffman, 2013; Van Bloemendaal, et al., 2014). La hormona GLP-1 además de estimular la saciedad mejora la glicemia vía secreción de insulina inducida por glucosa en las células beta pancreáticas e inhibe la liberación de glucagón (Lee, 2016).

El objeto de esta investigación es lograr una nueva formulación de snack saludable apto para personas sanas interesadas en prevenir patologías crónicas metabólicas y diabéticas, sin renunciar a su calidad sensorial. El estudio tiene como objetivo además obtener información novedosa en relación al efecto de ingredientes innovadores que se emplean en la elaboración de los alimentos para personas con requerimientos nutricionales particulares (control del peso corporal) y con fines médicos (prevención y tratamiento de enfermedades crónicas metabólicas tales como diabetes) sobre la secreción de serotonina y GLP-1. En nuestro conocimiento no existen estudios previos del efecto de la fibra antioxidante de café (marros del café) y sus productos de digestión sobre la secreción de estas hormonas. Los estudios publicados hasta la fecha en relación a los efectos saciantes de stevia son muy escasos y de gran interés, teniendo en cuenta el rápido incremento de su popularidad en todo el mundo.

Materiales y Métodos

El plan de trabajo propuesto en este estudio se presenta en la Figura 1. Tal como queda reflejado en el esquema, se prepararon galletas a base de harina de trigo empleando como edulcorantes sustitutos del azúcar, maltitol y stevia, y como nueva fuente natural de fibra antioxidante de café un abundante subproducto de su procesado, marros de café (MC) (del Castillo, et al., 2014). Con el fin de obtener formulaciones de elevada calidad nutricional y sensorial, de acuerdo a las preferencias de los consumidores y con potencial para reducir el riesgo de enfermedades crónicas como la obesidad y la diabetes, se llevó a cabo en primer lugar un análisis sensorial de las galletas propuestas. Se obtuvieron fracciones bioaccesibles de estos nuevos alimentos e ingredientes digeridos mimetizando las condiciones fisiológicas humanas de la digestión oral gastrointestinal. Los efectos de estos digeridos sobre la liberación de hormonas intestinales, serotonina y GLP-1, implicadas en procesos de saciedad y de glucemia postprandial en líneas celulares intestinales (Caco-2 y HuTu-80, respectivamente), fueron evaluados. En la Figura 1 se describen los materiales y métodos empleados para la instrumentación del plan de trabajo.



Figura 1. Plan de trabajo metodológico.

Ingredientes (g)	A	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Harina de trigo	56	61,54	59,4	55,11	55,5	52,83	53,4
Agua	20	21,98	21,2	19,68	18,2	18,87	17,5
Aceite de girasol	7,75	8,52	8,2	7,63	7,1	7,31	6,8
Levadura química	0,55	0,60	0,58	0,54	0,5	0,52	0,48
Sal	0,37	0,41	0,39	0,36	0,34	0,35	0,32
Lecitina de soja	0,33	0,36	0,35	0,32	0,3	0,31	0,29
Sacarosa	15	0	0	0	0	0	0
Maltitol	0	0	0	11,81	10,8	16,04	14,9
Stevia	0	2,20	2,1	0,60	0,56	0	0
FOS	0	0	3,5	0	3	0	2,9
Marros de café	0	4,40	4,2	3,94	3,6	3,77	3,5
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100

Tabla 1. Formulaciones de las galletas: A- (control) con sacarosa; B1- stevia 100% y marros de café (MC) (>3% Fibra); B2- stevia 100%, fructooligosacáridos (FOS) y MC (>6% Fibra); B3- stevia 30%, maltitol 70% y MC (>3% fibra); B4- stevia 30%, maltitol 70%, OF y MC (>6% fibra); B5- maltitol 100% y MC (>3% Fibra); B6- maltitol 100%, OF y MC (>6% fibra).

Ingredientes alimentarios

Para la formulación de galletas, todos los ingredientes básicos se compraron en supermercados especializados y certificados. La lecitina de soja de grado alimentario se obtuvo de Manuel Riesgo S.A. (España). El maltitol fue proporcionado por Helm Iberica S.A. La stevia, con un 3% de glucósidos de esteviol, se adquirió en un supermercado local. Los FOS en formato polvo (ORAFTI®P95) fueron una donación de Beneo-Orafti.

Como fuente de fibra antioxidante de café se emplearon MC procedentes del proceso industrial de obtención del café soluble o instantáneo. Los granos de café utilizados para su elaboración fueron de especie Robusta. La materia prima fue proporcionada por Prosol S.A (España) y almacenada a -20 °C hasta su uso.

Preparación de alimentos

Se elaboraron un total de seis nuevas formulaciones de galletas sin azúcares (B1, B2, B3, B4, B5, B6) y una galleta siguiendo la formulación tradicional y utilizando como edulcorante sacarosa que se empleó como control (A). Las formulaciones de los siete alimentos se indican en la Tabla 1. Las galletas se prepararon empleando como ingredientes básicos harina de trigo y aceite de girasol. No se incluyó huevo en las formulaciones y el azúcar se sustituyó por stevia y/o maltitol como edulcorantes hipocalóricos en las formulaciones B1-B6. Los MC se añadieron como fuente insoluble de fibra antioxidante y los FOS para mejorar la tolerancia a la glucosa, aportar fibra soluble, favorecer la salud intestinal (prebiótico) y mejorar la textura y el sabor de los nuevos alimentos con elevado contenido de fibra antioxidante de café y stevia.

La masa se preparó mezclando inicialmente sal, levadura, FOS y edulcorantes, y sobre esta mezcla seca se añadió

agua mineral a temperatura ambiente, hasta conseguir una mezcla homogénea. La lecitina y el aceite de girasol se mezclaron aparte y posteriormente se añadieron a la mezcla acuosa. Finalmente, la harina junto con la fibra antioxidante de café se fue añadiendo gradualmente a la mezcla y se trabajó hasta obtener una masa homogénea, elástica y ligeramente pegajosa. La masa se dejó reposar durante 30 min y transcurrido este tiempo se moldeó en forma de galletas con guías de grosor 3-5 mm y moldes de 6,5 mm de diámetro. La superficie de las galletas se pinchó para evitar la formación de burbujas durante el horneado a 185 °C durante 16 min.

Alimentos comerciales

Dos tipos de galletas comerciales con alta adhesión a la marca por parte de los consumidores españoles (C1 y C2) se adquirieron en un supermercado local. C1 y C2 presentaban en su formulación maltitol e isomaltitol como edulcorantes y fibra dietética en un contenido del 3,6% y 8,3%, respectivamente.

Calidad sensorial

Las galletas elaboradas según las nuevas formulaciones (B1, B2, B3, B4, B5, B6) y las comerciales (C1, C2) se sometieron a un test sensorial hedónico. La evaluación sensorial se realizó con la participación de 26 catadores no entrenados. Se evaluó el nivel de aceptación global de las galletas teniendo en cuenta el color, la textura y el sabor, empleando una escala hedónica verbal de 7 puntos (1- me disgusta mucho y 7-me gusta mucho). La media de la puntuación dada a cada formulación de galletas se determinó. La nueva formulación de galleta con un grado de aceptación equivalente a las comerciales se seleccionó para estudiar su efecto en la liberación de las hormonas GLP-1 y serotonina.

Digestión oral gastrointestinal *in vitro*

Previo al estudio del efecto de liberación de hormonas *in vitro*, se llevó a cabo una digestión abiótica oral, gástrica e intestinal, según el procedimiento descrito por Hollebeeck et al. (2013), con ligeras modificaciones. Los digeridos obtenidos se centrifugaron y fueron separados en dos fracciones, sobrenadante y precipitado. Sobre la fracción bioaccesible (sobrenadante) se realizó la última etapa, eliminación de las sales biliares, con el fin de imitar la reabsorción de las mismas que tiene lugar en el intestino durante el proceso de digestión humano (Edwards y Slater, 2009). Los digeridos desalinizados se congelaron a -80°C y posteriormente fueron liofilizados. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Cultivo celular: Caco-2 y HuTu-80

Células epiteliales tumorales de colon humano, Caco-2, se cultivaron en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (10%), L-glutamina (2%) y penicilina/estreptomicina (1%) a 37°C y 5% de CO_2 . Las células se crecieron en placas de 12 pocillos hasta alcanzar confluencia aproximadamente tres días después. La diferenciación celular se obtuvo transcurridos 21 días con cambio de medio cada dos-tres días. Las células Caco-2 ya diferenciadas se emplearon para el estudio de liberación de la hormona serotonina.

Células epiteliales cancerosas de duodeno humano, HuTu-80, se cultivaron en Medio Esencial Mínimo (MEM) suplementado con suero fetal bovino (10%), L-glutamina (2%) y penicilina/estreptomicina (1%) a 37°C y 5% CO_2 . Las células se crecieron en placas de 24 pocillos hasta alcanzar confluencia en un día transcurrido. Las células HuTu-80 no se diferenciaron y 24 horas después de sembrarse estaban preparadas para utilizarse en los ensayos de liberación de la hormona GLP-1.

Ambas líneas celulares se subcultivaron tres-cuatro veces tras su descongelación antes de usarse, con el fin de recobrar el ratio normal de crecimiento.

Ensayos de liberación de serotonina y GLP-1

Las fracciones solubles recuperadas de los digeridos de la galleta tradicional (A), galleta elaborada según la nueva formulación (B2) y fibra antioxidante de café (I3) —que contienen los componentes bioaccesibles para su absorción y metabolismo— y stevia se emplearon para estimular la secreción de hormonas causantes de saciedad en los modelos celulares descritos en los párrafos anteriores, siguiendo la metodología que se describe a continuación.

Estimulación y cuantificación de serotonina

Las células Caco-2 se suplementaron con las fracciones bioaccesibles (150 μl) en tres concentraciones diferentes (0,5, 0,05, 0,01 mg/ml), por duplicado. Previamente, se llevó a cabo un lavado de las células con tampón fosfato salino (PBS). La estimulación de las células se realizó por 5 minutos con agitación orbital. Los sobrenadantes se retiraron y guardaron en congelación hasta posterior cuantificación de serotonina. Se incluyó como control positivo cinamaldehído 5mM, y como control negativo

tampón. La cuantificación de la hormona serotonina liberada por las Caco-2 fue realizada siguiendo las indicaciones del kit de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de alta sensibilidad (cat-nº EA630/96, de DLD Diagnostika GmbH). Tres subcultivos diferentes se emplearon en cada set de análisis, que se realizaron por sextuplicado ($n = 3 \times 6 = 18$). Los resultados se expresaron como % frente al control T/C [%].

Estimulación y cuantificación de GLP-1

Las células HuTu-80 se sometieron a un período de ayuno de 1 h con medio libre de suero, glucosa y glutamina, y estimulación con las fracciones bioaccesibles (300 μl) a 0,5, 0,05, 0,01 mg/ml, glutamina 40 mM (control positivo) y tampón (control negativo) durante 1 h 30 min a 37°C . El experimento se llevó a cabo por duplicado. Tras el periodo de estimulación se colectaron los sobrenadantes y se conservaron en congelación hasta su posterior análisis. La cuantificación de GLP-1 se realizó mediante ELISA sándwich siguiendo las instrucciones del kit (Cat-nº EZGLP1T-36K de EMD Millipore). Tres subcultivos diferentes se emplearon en cada set de análisis, que se realizaron por sextuplicado ($n = 3 \times 6 = 18$). Los resultados se expresaron como % frente al control T/C [%].

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el empleo de SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., California, USA). Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar (SD) para todos los análisis, excepto aquellos relativos al cultivo celular, los cuales se representaron como la media \pm error estándar de la media (SEM). Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía y las diferencias entre medias mediante el Test de Holm-Sidak a un nivel de significación de $\alpha = 0,05$.

Resultados y Discusión

Análisis sensorial

Como se muestra en la Figura 2, las formulaciones de galletas preparadas con stevia (B2), stevia y maltitol (B4) y maltitol (B6), que contienen en todos los casos fibra antioxidante de café y FOS en su formulación, obtuvieron puntuaciones significativamente mayores ($p < 0,05$) que las respectivas galletas sin FOS (B1, B3 y B5). Los compuestos bioactivos, cafeína y glucósidos de esteviol, presentes en el café y la stevia, respectivamente, aportan un sabor amargo que persiste en boca (Hellfritsch, et al., 2012), pudiendo afectar negativamente la calidad sensorial del alimento. El retrogusto de los esteviósidos en particular es muy persistente, lo que limita su uso a determinadas concentraciones en muchos alimentos. Los FOS presentan un ligero dulzor que mejora significativamente ($p < 0,05$) la calidad sensorial de los alimentos elaborados incluyendo en su formulación stevia y fibra antioxidante de café (B2, B4 y B6) como ingredientes. La incorporación de FOS en las galletas tiene un impacto positivo en la calidad nutricional del alimento. A los FOS se le atribuyen carácter prebiótico (Kumar, et al., 2012), efecto fibra (Sartori da Silva, et al., 2007) y capacidad de reducir la respuesta glicémica postprandial (EFSA, 2014). Por tanto, los FOS son un ingrediente esencial de la formulación de las

nuevas galletas, dado que su incorporación solventa simultáneamente problemas de calidad sensorial y mejora el valor nutricional del alimento. Su adición podría tener impacto no solo en el sabor sino también en la textura del producto final (Ishwarya y Prabhasankar, 2013).

El grado de aceptación global de las galletas que contienen FOS en su formulación (B2, B4 y B6) y las comerciales (C1 y C2), con alta adhesión del consumidor y similares características nutricionales en lo que se refiere al uso de edulcorantes hipocalóricos y el contenido de fibra incorporado, no difirió significativamente ($p > 0,05$) (Figura 2). A las galletas B2, B4, B6 y C2 se les puede atribuir la alegación nutricional "alto contenido de fibra", de acuerdo con lo establecido en el Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo (Unión Europea, 2006).

Los resultados del estudio indican que la combinación de los ingredientes fibra antioxidante de café, stevia y FOS resulta adecuada para la obtención de un snack saludable y destaca el interés de los FOS como ingrediente funcional, tanto desde el punto de vista tecnológico como nutricional. Teniendo en cuenta los resultados del análisis sensorial, se seleccionó la galleta B2, que contiene en su formulación fibra antioxidante de café, stevia y FOS, para realizar los estudios posteriores de liberación de hormonas (serotonina y GLP-1) implicadas en procesos de saciedad y tolerancia a la glucosa postprandial.

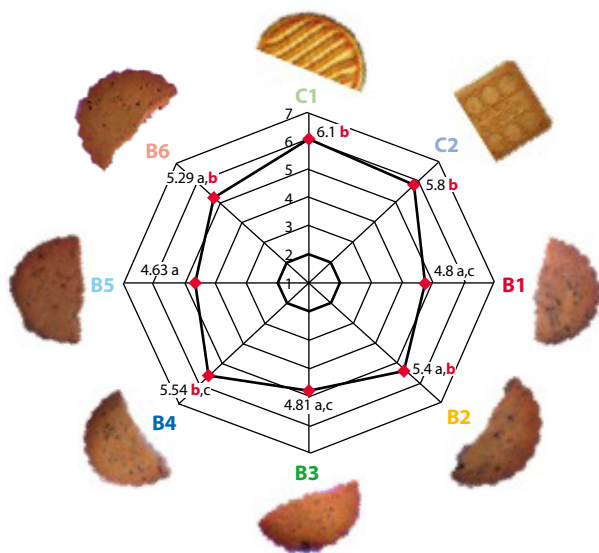


Figura 2. Diagrama de tela de araña con las puntuaciones medias ($n=26$) de la escala de 7 puntos para la aceptación global de las galletas comerciales (C1 y C2) y de las galletas reformuladas (B1, B2, B3, B4, B5 y B6) cuya composición se indica en Tabla 1. Letras diferentes denotan diferencias significativas en la calidad sensorial de los alimentos objeto de estudio ($p < 0,05$).

Liberación de serotonina

Los compuestos bioaccesibles que se recuperaron tras la digestión oral gastrointestinal *in vitro* de la galleta con alto contenido en fibra y sin edulcorante calórico (B2) en una concentración de 0,5 mg/ml estimularon la secreción de la hormona serotonina en las células Caco-2 diferenciadas (Tabla 2). Los niveles de serotonina en las células tratadas con

el nuevo alimento ($354,7 \pm 42,7\%$) fueron cuatro veces más elevados que los detectados en las muestras correspondientes a las células control (100%). No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los niveles de secreción de serotonina detectados en células tratadas con los compuestos bioaccesibles de las galletas elaboradas según la nueva formulación y la tradicional, en la que se emplea sacarosa como edulcorante (A).

Los compuestos bioaccesibles que se liberaron durante el proceso de digestión de la fibra antioxidante de café en una concentración de 0,5 mg/ml (MC, I3) indujeron un incremento significativo de la secreción de serotonina ($p < 0,05$) en las células Caco-2 diferenciadas. Los valores de serotonina inducida por el nuevo ingrediente alimentario ($762,9 \pm 81,4\%$) fueron siete veces superiores que el basal. En nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se describe el efecto de los compuestos bioaccesibles tras la digestión oral gastrointestinal de fibra antioxidante de café sobre hormonas de saciedad. Estos resultados están en concordancia con los descritos en la literatura para el café. Estudios previos asocian al consumo de café una mejora de secreción de serotonina por las células enteroendócrinas gastrointestinales (Bakuradze, et al., 2014). Por otra parte, a los extractos de café, en concreto a los ácidos gálico y cafeico, se les atribuye potencial para incrementar la biodisponibilidad de triptófano necesario para la síntesis de serotonina mediante la inhibición de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa implicada en el metabolismo del triptófano (Gostner, et al., 2015). Los resultados sugieren que la inclusión de una dosis controlada de fibra antioxidante de café en la formulación del alimento podría favorecer la sensación de plenitud postprandial.

El edulcorante natural hipocalórico stevia (I4) mostró ser inefectivo en la estimulación de la producción de serotonina en las células Caco-2 diferenciadas a las concentraciones ensayadas. En un estudio de intervención llevado a cabo por Anton et al. (2010) se halló que la ingesta de stevia provocó niveles de saciedad similares a la ingesta de sacarosa. No se han encontrado más trabajos en la literatura científica en relación al efecto de la stevia pura en la secreción de esta hormona. En consecuencia, se requieren más estudios para elucidar el papel de este edulcorante hipocalórico y sus metabolitos en la secreción de serotonina. Estos resultados y los descritos en el párrafo anterior indican claramente la necesidad de realizar estudios de intervención nutricional en humanos para conocer el grado de saciedad que causa el nuevo alimento desarrollado en esta investigación. Sin embargo, los resultados sugieren un potencial efecto saciante que podría ser igual o superior al que se logra tras la ingesta de galletas preparadas según la formulación tradicional, empleando sacarosa como edulcorante.

La mayor parte de la serotonina liberada por el organismo se encuentra en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal, que responden a los estímulos mecánicos y químicos mediante liberación de la hormona tras la ingesta de alimento (Voigt y Fink, 2015). Por tanto, es esperable que la fibra antioxidante del café, que se utiliza como ingrediente alimentario en este trabajo, pueda ejercer un mayor efecto saciante *in vivo* que el que aquí se describe. En esta investigación solo se ha evaluado el efecto de aquellos compuestos que quedan bioaccesibles tras su digestión gastrointestinal. No se tiene en cuenta el efecto físico de estimulación hormonal del material indigestible que podría también jugar un papel relevante en la secreción de serotonina.

El análisis de la composición nutricional de los digeridos de galletas obtenidos (datos no mostrados) sugieren la presencia de otros compuestos que pueden estimular la secreción de serotonina, tales como azúcares. El consumo de alimentos con elevado índice glicémico (Herrera, et al., 2011; Zekas, et al., 2015) se ha asociado a un incremento de producción de serotonina por las vesículas intestinales celulares. Los péptidos que se liberan durante el proceso de digestión del gluten que compone la harina de trigo pueden estimular principalmente la liberación de serotonina hipotalámica y cortical (Choi, et al., 2009, 2011). Por otra parte, los compuestos fenólicos presentes en la fibra dietética antioxidante podrían desempeñar un papel fundamental en la supresión del apetito también, mediante la estimulación de esta importante hormona de señalización (Huang, et al., 2013; Liu, et al., 2015). Estudios previos indican que los productos avanzados de la reacción de Maillard tales como el N ϵ -carboximetil-lisina están involucrados en el proceso de regulación de saciedad por medio de la liberación de serotonina en células SH-SY5Y (Holik, et al., 2013). La reacción de Maillard es el evento químico más importante que tiene lugar durante el procesado térmico de alimentos como las galletas (Tamanna y Mahmood, 2015). Por tanto, en el caso de las galletas elaboradas empleando sacarosa como edulcorante estos productos podrían contribuir a la estimulación de la liberación de esta hormona. Sin embargo, la sustitución de sacarosa por stevia limita el progreso de la reacción de Maillard en el alimento hacia las etapas avanzadas, afectando aspectos sensoriales del alimento como el desarrollo de color (García-Serna, et al., 2014). En consecuencia, puede que estos productos no contribuyan de manera significativa a lograr un efecto saciante postprandial en el alimento elaborado según la nueva formulación (B2). Se requiere de más estudios para identificar los componentes alimentarios individuales que contribuyen a la liberación de la hormona tanto en el alimento elaborado siguiendo la formulación tradicional como en la propuesta en este trabajo.

Liberación de GLP-1

Se observó una secreción de GLP-1 significativa ($p < 0,05$) por estimulación de las células HuTu-80 con la fracción bioaccesible de los alimentos digeridos (Tabla 2). La cantidad

de hormona GLP-1 liberada en comparación con las células control no tratadas se incrementó significativamente ($p < 0,05$) tras la incubación con las fracciones bioaccesibles (0,5 mg/ml) de la galleta con alto contenido en fibra y sin azúcares añadidos (B2) ($277,9 \pm 14,1\%$). No se detectaron diferencias ($p > 0,05$) entre la galleta control (A) y la elaborada con la nueva formulación (B2). La mínima concentración testada (0,01 mg/ml) del digerido de fibra antioxidante de café (I3) presentó valores similares de GLP-1 ($p > 0,05$) ($269,89 \pm 17,3\%$) a aquellos encontrados en las galletas elaboradas con la nueva formulación (B2, 0,05 mg/ml). Es la primera vez que se describe el efecto estimulador de la secreción de GLP-1 para la fibra antioxidante de café obtenida a partir de MC generados durante el proceso de la elaboración industrial de café instantáneo. Estos resultados concuerdan con los descritos para café en células, animales (Fujii, et al., 2015) y humanas (Jokura, et al., 2015).

En algunos casos asocian la estimulación de la producción de GLP-1 del café al compuesto fenólico mayoritario de la bebida, ácido clorogénico (McCarty, 2005; Rafferty, et al., 2011). El análisis del digerido de la fibra antioxidante de café procedente de los MC (datos no mostrados) indicó gran contribución de los compuestos fenólicos sobre la capacidad antioxidante, por lo que previsiblemente el ácido clorogénico estaría presente. La stevia (I4) resultó inefectiva a las tres concentraciones ensayadas, lo que apoya los resultados obtenidos en modelo *in vivo* animal por Fujita et al. (2009).

La fracción bioaccesible obtenida por digestión de la nueva galleta (B2) posiblemente contiene fibra soluble (FOS). Son varios los investigadores que han descrito la existencia de una relación entre estos hidratos de carbono y la secreción de la hormona GLP-1 (Delzenne, et al., 2007; Grover, et al., 2011; Habib, et al., 2011; Li, et al., 2012), destacando el potencial de estos compuestos para promover la secreción endógena de GLP-1 y conseguir así posible prevención y/o tratamiento de la obesidad y la diabetes tipo 2. La presencia de proteínas y péptidos en los digeridos analizados también exhibir estimulación de la hormona GLP-1, confirmado ya por otros autores previamente, quienes reportaron que proteínas de trigo intactas y digeridas conseguían influir fuertemente sobre la saciedad y el efecto anti-diabético a través de la estimulación de GLP-1 (Geraedts, et al., 2010, 2011).

	Serotonina T/C [%]			GLP-1 T/C [%]		
	0,5 mg/ml	0,05 mg/ml	0,01 mg/ml	0,5 mg/ml	0,05 mg/ml	0,01 mg/ml
A	468,3 \pm 52,6 ^a	118,4 \pm 15,0 ^b	128,52 \pm 15,3 ^b	31,2 \pm 2,95 ^a	311,4 \pm 11,6 ^b	157,0 \pm 9,3 ^c
B2	354,7 \pm 42,7 ^a	132,6 \pm 18,9 ^b	106,51 \pm 13,5 ^b	30,3 \pm 3,97 ^a	277,9 \pm 14,1 ^b	129,5 \pm 6,8 ^{c,d}
I3	762,9 \pm 81,4 ^c	111,9 \pm 10,6 ^b	95,11 \pm 5,5 ^b	21,27 \pm 2,84 ^a	193,3 \pm 14,2 ^e	269,9 \pm 17,2 ^b
I4	95,0 \pm 13,6 ^b	81,2 \pm 10,3 ^b	95,85 \pm 9,1 ^b	98,5 \pm 4,9 ^d	106,9 \pm 3,3 ^d	106,8 \pm 4,2 ^d

Tabla 2. Liberación de serotonina y GLP-1, [%] frente al control (células no tratadas, 100%) por estimulación de células Caco-2 y HuTu-80 con las fracciones bioaccesibles de los digeridos de galleta control a base de sacarosa (A), de galleta con stevia, fibra antioxidante de café y FOS (B2), fibra antioxidante de café (I3) y stevia pura (I4), en concentraciones de 0,5, 0,05 y 0,01 mg/ml. Los resultados se expresan como la media \pm SEM ($n = 3$ sub-cultivos \times 6 réplicas de cada uno = 18). Las letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los valores de todas las muestras analizadas para cada hormona en particular (ANOVA de una vía ($p < 0,05$)).

Asimismo, el aceite de girasol empleado en las formulaciones de galletas ha demostrado tener efecto sobre la producción de GLP-1 intestinal en ensayos clínicos (Frost, et al., 2003; Manning, et al., 2013), lo que podría estar contribuyendo también al contenido total de GLP-1 liberado por células HuTu-80 tras el tratamiento con la galleta con alto contenido en fibra y sin azúcares (B2).

Conclusiones

Por primera vez se ha descrito el efecto de la fibra antioxidante obtenida a partir de marros o posos de café (fibra antioxidante de café) en la estimulación de la secreción de las hormonas reguladoras de la saciedad, serotonina y GLP-1. Se ha logrado obtener un snack saludable con alto contenido en fibra, bajo contenido en azúcares glicemiantes, con potencial para mejorar la tolerancia a la glucosa y efecto saciante. El nuevo alimento puede ser por tanto considerado adecuado para su incorporación en una dieta destinada a la prevención y/o tratamiento de enfermedades crónicas tales como diabetes tipo 2 y obesidad. Es necesaria la realización de más estudios para elucidar la contribución de cada uno de los componentes del nuevo alimento a la secreción de serotonina y de GLP-1 y evaluar mediante estudio de intervención nutricional la magnitud de su efecto en la regulación de la saciedad, el apetito y la glucosa sanguínea postprandial en individuos sanos y enfermos. Los efectos observados de inducción de secreción de hormonas de saciedad pueden deberse a un efecto sinérgico de varios de sus ingredientes y los metabolitos que se generan durante su proceso de digestión.

Reconocimientos

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto AGL2014-57239-R y realizada en colaboración con la Universidad de Viena. Martínez-Sáez, N. agradece a la Universidad Autónoma de Madrid la beca predoc-FPI y la ayuda para estancia breve en la Universidad de Viena. Los autores agradecen a BENEORAFI la donación de los FOS, a HELM IBERICA, S. A. de maltitol, y a PROSOL por el suministro de la materia prima para obtener la fibra antioxidante de café.

Referencias

- Anton, S, Martin, C, Han, H, Coulon, S, Cefalu, W, Geiselman, P y Williamson, D, 2010. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. En: *Appetite*, 55(1), pp.37-43.
- Bakuradze, T, Parra, G, Riedel, A, Somoza, V, Lang, R, Dieminger, N y Richling, E, 2014. Four-week coffee consumption affects energy intake, satiety regulation, body fat, and protects DNA integrity. En: *Food Research International*, 63, pp.420-427.
- Choi, S, DiSilvio, B, Fernstrom, M y Fernstrom, J, 2009. Meal ingestion, amino acids and brain neurotransmitters: Effects of dietary protein source on serotonin and catecholamine synthesis rates. En: *Physiology and Behavior*, 98(1-2), pp.156-162.
- Choi, S, DiSilvio, B, Fernstrom, M y Fernstrom, J, 2011. The chronic ingestion of diets containing different proteins produces marked variations in brain tryptophan levels and serotonin synthesis in the rat. En: *Neurochemical Research*, 36(3), pp.559-565.
- del Castillo, M., Martínez-Saez, N. y Ullate, M., 2014. *Healthy bakery products with high level of dietary antioxidant fibre*. Patente española. PCT/ES2014/070062.
- Delzenne, N, Cani, P y Neyrinck, A, 2007. Modulation of Glucagon-like Peptide 1 and Energy Metabolism by Inulin and Oligofructose: Experimental Data. En: *Journal of Nutrition*, 137(11), pp.2547S-2551S.
- Edwards, A y Slater, N, 2009. Protection of live bacteria from bile acid toxicity using bile acid adsorbing resins. En: *Vaccine*, 27(29), pp.3897-3903.
- EFSA, 2014. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to non-digestible carbohydrates and a reduction of post-prandial glycaemic responses pursuant to Article 13 (5) of Regulation (EC) No 1924/2006. En: *EFSA Journal*, 12(1), pp.1-13.
- Frost, G, Brynes, A, Dhillon, W, Bloom, S y McBurney, M, 2003. The effects of fiber enrichment of pasta and fat content on gastric emptying, GLP-1, glucose, and insulin responses to a meal. En: *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, pp.293-298.
- Fujii, Y, Osaki, N, Hase, T y Shimotoyodome, A, 2015. Ingestion of coffee polyphenols increases postprandial release of the active glucagon-like peptide-1 (GLP-1(7-36)) amide in C57BL/6J mice. En: *Journal of Nutritional Science*, 4, (e9), pp.1-9.
- Fujita, Y, Wideman, R, Speck, M, Asadi, A, King, D, Webber, T y Kieffer, T, 2009. Incretin release from gut is acutely enhanced by sugar but not by sweeteners *in vivo*. En: *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 296(3), pp.E473-E479.
- García-Serna, E, Martínez-Saez, N, Mesias, M, Morales, F, y del Castillo, M, 2014. Use of coffee silverskin and stevia to improve the formulation of biscuits. En: *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(4), pp.243-251.
- Geraedts, M, Troost, F, Fischer, M, Edens, L y Saris, W, 2011. Direct induction of CCK and GLP-1 release from murine endocrine cells by intact dietary proteins. En: *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(3), pp.476-484.
- Geraedts, M., Troost, F, Tinnemans, R, Söderholm, J, Brummer, R y Saris, W, 2010. Release of satiety hormones in response to specific dietary proteins is different between human and murine small intestinal mucosa. En: *Annals of Nutrition and Metabolism*, 56(4), pp.308-313.
- Gostner, J, Schroecksnadel, S, Jenny, Klein, A, Ueberall, F, Schennach, H y Fuchs, D, 2015. Coffee Extracts Suppress Tryptophan Breakdown in Mitogen-Stimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells. En: *Journal of the American College of Nutrition*, 34(3), pp.212-223.
- Grover, G, Koetzner, L, Wicks, J, Gahler, R, Lyon, M, Reimer, R y Wood, S, 2011. Effects of the soluble fiber complex PolyGlycopleX® (PGX®) on glycemic control, insulin secretion, and GLP-1 levels in Zucker diabetic rats. En: *Life Sciences*, 88(9-10), pp.392-399.
- Habib, N, Honoré, S, Genta, S y Sánchez, S, 2011. Hypolipidemic effect of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots on diabetic rats: Biochemical approach. En: *Chemico-Biological Interactions*, 194(1), pp.31-39.
- Hellfritsch, C, Brockhoff, A, Stähler, F, Meyerhof, W y Hofmann, T, 2012. Human psychometric and taste receptor responses

- to steviol glycosides. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(27), pp.6782–6793.
- Herrera, C, Smith, K, Atkinson, F, Ruell, P, Chow, C, O'Connor, H y Brand-Miller, J, 2011. High-glycaemic index and -glycaemic load meals increase the availability of tryptophan in healthy volunteers. En: *The British Journal of Nutrition*, 105(11), pp.1601–1606.
- Holik, A, Rohm, B, Somoza, M y Somoza, V, 2013. N(ε)-Carboxymethyllysine (CML), a Maillard reaction product, stimulates serotonin release and activates the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in SH-SY5Y cells. En: *Food and Function*, 4(7), pp.1111–20.
- Hollebeek, S, Borlon, F, Schneider, Y, Larondelle, Y y Rogez, H, 2013. Development of a standardised human *in vitro* digestion protocol based on macronutrient digestion using response surface methodology. En: *Food Chemistry*, 138(2-3), pp.1936–1944.
- Huang, W, Chen, Z, Wang, Q, Lin, M, Wu, S, Yan, Q y Pan, J, 2013. Piperine potentiates the antidepressant-like effect of trans-resveratrol: Involvement of monoaminergic system. En: *Metabolic Brain Disease*, 28(4), pp.585–595.
- Ishwarya, S, y Prabhakaran, P, 2013. Fructooligosaccharide – Retention during baking and its influence on biscuit quality. En: *Food Bioscience*, 4, pp.68–80.
- Jokura, H, Watanabe, I, Umeda, M, Hase, T y Shimotoyodome, A, 2015. Coffee polyphenol consumption improves postprandial hyperglycemia associated with impaired vascular endothelial function in healthy male adults. En: *Nutrition Research*, 35(10), pp.873–881.
- Kumar, V, Sinha, A, Makkar, H, de Boeck, G y Becker, K, 2012. Dietary Roles of Non-Starch Polysaccharides in Human Nutrition: A Review. En: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(10), pp.899–935.
- Lee, C. Y, 2016. Glucagon-like Peptide-1 Formulation - the Present and Future Development in Diabetes Treatment. En: *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 118, pp.173–180.
- Li, P, Lin, W, Wang, Y, Peng, W, Cai, X y Su, W, 2012. Antidiabetic activities of oligosaccharides of *Ophiopogon japonicus* in experimental type 2 diabetic rats. En: *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), pp.749–755.
- Liu, Y, Lan, N, Ren, J, Wu, Y, Wang, S-T, Huang, X y Yu, Y, 2015. Orientin improves depression-like behavior and BDNF in chronic stressed mice. En: *Molecular Nutrition and Food Research*, 59, pp.1130–1142.
- Manning, P, Sutherland, W, Manning, A, de Jong, S y Berry, E, 2013. Ingestion of thermally oxidized sunflower oil decreases postprandial lipemia mainly in younger individuals. En: *Nutrition Research*, 33(9), pp.711–718.
- Mawe, G y Hoffman, J, 2013. Serotonin Signaling in the Gastrointestinal Tract: Functions, dysfunctions, and therapeutic targets. En: *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 10(8), pp.473–486.
- McCarty, M, 2005. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. En: *Medical Hypotheses*, 64(4), pp.848–853.
- Nutritional Heart, Lung, and Blood Institute, 2013. *Managing overweight and obesity in adults: systematic evidence review from the obesity expert panel*. Washington: U.S Department of Health and Human Services.
- Rafferty, E, Wylie, A, Elliott, C, Chevallier, O, Grieve, D y Green, B, 2011. *In vitro* and *in vivo* effects of natural putative secretagogues of Glucagon-like peptide-1 (GLP-1). En: *Scientia Pharmaceutica*, 79(3), pp.615–621.
- Unión Europea. Reglamento (CE) 1924/2006, de 20 de diciembre de 2006. *Official Journal of the European Union*, 30 de diciembre de 2006, No. L404/9.
- Sartori da Silva, A, Haas, P, Sartori, N, Anton, A y Francisco, A, 2007. Fructooligosaccharides: active dietary fibers. En: *Boletim Do Centro de Pesquisa E Processamento de Alimentos*, 25(2), pp.295–304.
- Sharma, R, Yadav, R, y Manivannan, E, 2012. Study of effect of Stevia rebaudiana bertonii on oxidative stress in type-2 diabetic rat models. En: *Biomedicine and Aging Pathology*, 2(3), pp.126–131.
- Tamanna, N y Mahmood, N, 2015. Food processing and maillard reaction products: effect on human health and nutrition. En: *International Journal of Food Science*, 2015, pp.1–6.
- Van Bloemendaal, L, IJzerman, R, Ten Kulve, J, Barkhof, F, Konrad, R, Drent, M y Diamant, M, 2014. GLP-1 receptor activation modulates appetite- and reward-related brain areas in humans. En: *Diabetes*, 63(12), pp.4186–4196.
- Voigt, J y Fink, H, 2015. Serotonin controlling feeding and satiety. En: *Behavioural Brain Research*, 277, pp.14–31.
- World Health Organization, 2014. *Global status report on noncommunicable diseases 2014* [En línea]. Geneva: WHO. [Consulta: 14 de abril de 2016] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/#>.
- Zelkas, L, Raghupathi, R, Lumsden, A., Martin, A, Sun, E, Spencer, N y Keating, D, 2015. Serotonin-secreting enteroendocrine cells respond via diverse mechanisms to acute and chronic changes in glucose availability. En: *Nutrition and Metabolism*, 12(1), pp.55.

ÍNDICE DE AUTORES

Añón, María Cristina	27
Arce Ortiz, Kadaffi León	59
Bruno Tech, Adriano Rogério	42
Califano, Alicia	54
Céspedes Arce, Aldo Ivan	42
de Sousa Silva, Ana Carolina	42
del Castillo, María Dolores	65
Ferrario, Mariana	9
Goñi, Sandro M.	36
Guerrero, Sandra	9
Hochkogler, Christina Maria	65
Huet, Ana Livia	42
Lado, Joanna	47
Larrosa, Virginia	54
Lorenzo, Gabriel	54
Marinho Muraro, Marcela	42
Martinez-Saez, Nuria	42
Mengoni, Antonieta	27
Moronte, Ellen Cristina	42
Ochoa-Martínez, Claudia Isabel	59
Orsini Delgado, María C.	18
Ortega Villalba, Karen Johana	59
Quiroga, Alejandra Viviana	27
Rodrigo, María Jesús	47
Salvadori, Viviana O.	36
Somoza, Veronika	65
Tironi, Valeria A.	18
Vélez Pasos, Carlos.	59
Vieira Piza, Luciana	42
Von Atzingen, Gustavo Voltani	42
Xavier Costa, Ernane	42
Zacarías, Lorenzo	47
Zaritzky, Noemí.	54

ÍNDICE TEMÁTICO

α -tocoferol	48, 49
β -caseína	19
A	
Absorción intestinal	18, 20, 23, 24, 25, 26
Ácido ascórbico	47, 48, 49, 51
Actividad antiproliferativa	27, 28, 29, 32, 33, 34
Actividad eléctrica cerebral	42, 43, 45
Aislado proteico	18, 28
Alimentación	28, 42, 45, 65
Alimento	9, 10, 18, 27, 28, 34, 36, 37, 42, 43, 45, 47, 54, 59, 60, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71
Alimento infantil	59
Alicyclobacillus acidoterrestris	9, 10
Amaranthus Caudatus	27, 28, 29, 30, 31, 32
Amaranthus hypochondriacus	27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35
Amaranthus mantegazzianus	18, 19, 28, 29, 31, 33, 34, 35
Amaranto	18, 19, 25, 26, 28, 30, 31, 34
Análisis sensorial	11, 13, 42, 43, 45, 66, 68, 69
Antioxidante	18, 19, 20, 21, 23, 25, 26, 28, 47, 48, 51, 52, 59, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71
Aspergillus Ochraceus	9
B	
Bacteria	9, 10, 11, 14
Balance de energía	36, 38, 40, 56
C	
Caco-2	18, 19, 20, 23, 26, 29, 32, 33, 65, 66, 68, 69, 70
Café	65, 66, 67, 68, 69, 70, 71
Calidad	9, 10, 11, 47, 50, 55, 64, 65, 66, 67, 68, 69
Calidad sensorial	65, 66, 67, 68, 69
Carcinoma	19, 20, 29, 32, 33
Caroteno	47, 48, 49, 50, 51, 52
Catalasa	48, 51
Celíacos	55
Cítricos	47, 48, 51, 52
Citrus paradisi	48
Colletotrichum Musae	60
Colon	19, 20, 68
Color	10, 20, 28, 29, 32, 33, 38, 48, 49, 50, 51, 52, 60, 61, 66, 67, 70
Conservación	47, 48, 50, 51, 59, 60
Consumidores	9, 11, 12, 13, 15, 16, 43, 66, 67
Consumo energético	36, 37
Cromatografía	19, 28, 29, 30, 31, 34, 49
Cucumis melo	9, 10
Cultivos celulares	19
D	
Daño oxidativo	47
Daño por frío	47, 48, 50
Deshidratación	36
Diabetes mellitus	65
Digestión	18, 19, 21, 65, 66, 68, 69, 70, 71
E	
Efecto hipocalórico	66
Efectos cognitivos	42
Electroencefalograma	42
Enfermedades cardiovasculares	27, 65
Espacio Tiempo-Frecuencia	42
Espectrofotometría	49
Esporas	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
Estímulo gustativo	42
Estrés oxidativo	48, 51
F	
Fibra dietética	65, 66, 67, 70
Flavado	48, 49
Fluencia	10, 11, 16, 20, 27, 29, 43, 62, 68
Fluido-dinámica	36, 37
Flujo laminar	36
Fotodiodos	49
FPLC	18, 19, 20, 21, 23
Fructooligosacáridos	65, 66, 67
G	
Galletas	65, 66, 67, 68, 69, 70, 71
Gastrointestinal	18, 19, 21, 34, 65, 66, 68, 69
Glicemia postprandial	65
Glucagón	65, 66
Glucósidos de esteviol	66, 67, 68
Glutación	47, 48, 49, 51, 52
Gluten	54, 55, 56, 57, 70
Gros Michel	60, 61, 62
H	
Hemaglutinación	29, 30
Hipertensión	65
HORAC	18, 20, 21, 22
Hormonas	65, 66, 67, 68, 69, 71
Humedad	54, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 63
HuTu-80	65, 66, 68, 70, 71
I	
Índice glicémico	65, 70

J		
Jugos9, 10, 12, 13, 14, 15	
L		
Lactobacillus	9	
Lactosuero	59, 60, 61, 62	
Lectina	27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34	
Leuconostoc spp.	9	
Ley de Fick.	55, 56, 57	
Licopeno	47, 48, 50, 51, 52	
Lumen intestinal	19	
Luz pulsada	9, 10, 16	
M		
Manzana	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	
Marros	65, 66, 67, 71	
Masa	21, 23, 27, 28, 32, 34, 54, 55, 56, 58, 61, 67	
Melón	9, 10, 12, 14, 15	
Membrana	10, 19, 23, 52	
Método AGR	42, 43	
Método de Lowry	18, 21, 25, 30	
Microorganismos9, 10, 11, 12, 14, 15	
Modelado	11, 12, 38, 54, 55, 58	
Modelo	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 45, 54, 56, 57, 58, 63, 68, 70	
Modelo de Weibull	13, 14, 15	
Modelo difusional	54	
Modelo laminar	36, 40	
Modelos de turbulencia	36, 40	
O		
Obesidad	65, 66, 70, 71	
ORAC	18, 20, 21, 22, 25, 26	
Oxígeno singlete.	47, 48, 49, 50, 51, 52	
P		
Panificados	36	
Pastas	54, 55, 56, 57, 58	
Películas	59, 60, 61, 62, 63	
Peptidasas	18, 19, 24, 25, 26	
Péptido	19, 28, 65, 66	
Péptidos	18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 34, 70	
Percepción.	42, 43, 44, 45	
Permeabilidad	19, 59, 60, 62, 63	
pH9, 10, 14, 15, 19, 28, 29, 31, 49	
Pigmento	47	
Polipéptidos.	20, 31	
Pomelo	47, 48, 50, 51, 52	
Pomelo rojo	47, 48, 52	
Poscosecha	47, 60	
Prebiótico	66, 67, 68	
Procesamiento digital de señales	42, 43	
Productos cárnicos	36	
Proliferación celular	27, 29, 33	
Propiedades antifúngicas	60, 62	
Proteínas	18, 19, 23, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 34, 49, 55, 57, 70	
Pyrus malus9, 10	
Q		
Quitosano	59, 60, 61, 62	
R		
Recubrimientos	59, 60, 61, 62	
S		
Sabor	9, 12, 14, 15, 16, 36, 42, 43, 44, 59, 66,, 68, 69	
Sacarosa	42, 43, 44, 45, 65, 66, 67, 69, 70	
Saccharomyces cerevisiae9, 10	
Saciedad	65, 66, 68, 69, 70, 71	
Salud	9, 28, 42, 43, 65, 66, 67, 69, 70	
Secado	54, 55, 56, 57, 58, 60, 61	
Serotonina.	65, 66, 67, 68, 69, 70	
Snack	66, 69, 71	
SOAC	47, 49, 50, 52	
Star Ruby.	47, 48, 50, 51	
Stevia	65, 66, 67, 68, 69, 70	
Suero lácteo.	60	
T		
Tecnologías emergentes	9	
Textura	10, 60, 62, 67, 69	
Transferencia de energía	38, 39, 54, 56, 57	
Transferencia de materia.	54, 56, 57	
Tratamientos	9, 10, 11, 13, 15, 52, 62, 63	
U		
Ultrasonido	9, 10, 16	
UMR106	28, 33	
V		
Vapor de agua	59, 60, 61, 62, 63	
Vida útil9, 60	

INNOTEC

REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY