Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Caracterización, procesamiento y optimización del aprovechamiento industrial de la calabacita Cucurbita moschata Duchesne ex Poiret

de Escalada Pla, Marina Francisca

2006

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
de Escalada Pla, Marina Francisca. (2006). Caracterización, procesamiento y optimización del aprovechamiento industrial de la calabacita Cucurbita moschata Duchesne ex Poiret. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
de Escalada Pla, Marina Francisca. "Caracterización, procesamiento y optimización del aprovechamiento industrial de la calabacita Cucurbita moschata Duchesne ex Poiret". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2006.

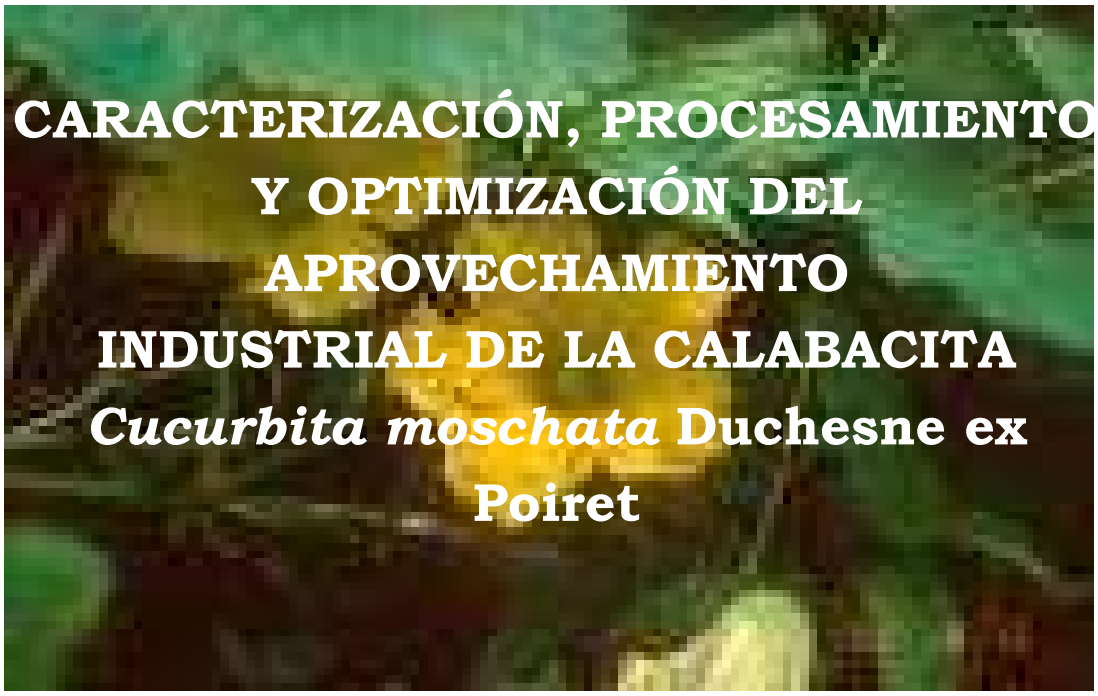
EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Industrias



CARACTERIZACIÓN, PROCESAMIENTO Y OPTIMIZACIÓN DEL APROVECHAMIENTO INDUSTRIAL DE LA CALABACITA *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret

Ing. Marina Francisca de Escalada Pla

Directora de Tesis: Dra. Lía Noemí Gerschenson
Directora asistente: Dra. Ana María Rojas

2006

A Darío

Y a mis hijos Montserrat y Juan Francisco,

A mi madre

A la memoria de mi padre

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Fundación Antorchas por la ayuda financiera brindada para la realización de esta tesis.

A la Dra. Lía Noemí Gerschenson, consejera de estudios, directora de tesis y directora de beca por la dedicación y empuje que me ha transmitido durante todo este tiempo.

A la Dra. Ana María Rojas, directora asistente, por la gran ayuda brindada y los valiosos aportes durante el desarrollo de mi tesis.

Al Sr. Juan, tornero del Departamento de Industrias, por la colaboración brindada para el corte de los frutos.

A la escuela de panadería de la empresa Taxonera S:A.; al Lic. Vivas y al Maestro pastelero J.C. Rodríguez por brindar las instalaciones, valiosa ayuda y experiencia durante el proceso de panificación.

Al maravilloso grupo de personas que día a día compartimos, laboratorio, equipamiento, momentos de estudio y también de festejos; ayudas y consejos.

A mi familia, por comprender y acompañar.

Muchas gracias Sr. Juan por la paciencia y precisión
para cortar varios centenares de discos de calabacita
con el torno de su taller.

Muchas Gracias Lic. Vivas y Maestro Pastelero
Rodríguez de la Escuela de Panadería y Pastelería de
Taxonera S.A. por su valiosa colaboración durante
el proceso de panificación.

Muchas gracias panelistas:
Silvia Flores, Karina Martínez, Paula León,
Eliana Fissore, Fernanda Gliemmo, Melisa Lamanna,
Ana María Rojas, Karen Sanjurjo, Lucía Famá,
por el valioso aporte de sus sentidos, de su tiempo
y de sus comentarios durante la evaluación sensorial.

Resumen

Se llevó a cabo el estudio del tejido de calabacita (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) que permitió ver las características de este tejido tanto desde el punto de vista reológico, como así también químico (importante composición en pectinas solubles, ausencia de grupos fenólicos) como matriz para el desarrollo de productos funcionales.

Se desarrolló un alimento funcional rico en fibra y fortificado con Fe, a partir de *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret, listo para consumir. El producto presentó buena estabilidad microbiológica, como así también organoléptica (textura, color y sabor). La incorporación de Fe, aún en dosis altas no presentó diferencias significativas desde el punto de vista microbiológico y organoléptico, en las condiciones ensayadas, con un producto análogo pero sin fortificar con hierro. Se observó una biodisponibilidad 100 % del hierro incorporado.

De la cáscara (exocarpio) y recortes de la pulpa (mesocarpio) habitualmente remanentes del procesamiento de la calabacita se obtuvieron fracciones enriquecidas en fibra por deshidratación (S) o por tratamiento con alcohol de la pulpa (AIR) o cáscara (C). Estas fracciones de fibra aisladas presentaron buenas propiedades de hidratación e interesantes propiedades hipoglucémicas que las hacen adecuadas en relación a su aplicación como ingrediente en la formulación de alimentos funcionales.

Se utilizaron estas fracciones ricas en fibra como aditivo de masas farináceas. Todas ellas aumentaron la tenacidad de las masas al ser incorporadas a un nivel de 0,5% (p/p), pero sin reducir el trabajo de deformación significativamente lo que mostraría que no afectan profundamente la matriz gluten-almidón. En cuanto a la calidad del pan obtenido, se observó que las fracciones S y C mejoraron la terneza de la miga y colaboraron a su mantenimiento durante el almacenamiento.

Palabras Clave: Calabacita. Fibra. Hierro. Masa. Pan.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS…….1

CAPÍTULO I……..9

CAPÍTULO II…… …..59

CAPÍTULO III……...117

CAPÍTULO IV……154

CONCLUSIONES GENERALES……...…205

APENDICE……208

Cucurbitaceae

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

Introducción General

Las cucúrbitas están presentes en todos los continentes y se encuentran entre las familias de plantas más importantes que proveen al hombre de productos alimenticios y de fibra de alta utilidad (Bisognin, 2002). Las cucúrbitas pertenecen a la familia ***Cucurbitaceae*** que consiste en alrededor de 118 géneros y 825 especies, de acuerdo al último tratamiento taxonómico de Jeffrey (1990). Algunas de las más importantes especies en el género ***Cucurbita*** son los zapallos y calabazas: *C. máxima* Duch; *C moschata* Duch ex Lam.; *C. pepo* L., entre otros (Bisognin, 2002).

Las cucúrbitas están asociadas al origen de la agricultura y las civilizaciones y también se encuentran entre las primeras especies de plantas en ser domesticadas. Las mezclas de cucúrbitas-maíz-habas constituían la base nutricional de las civilizaciones pre-colombinas (Whitaker & Bemis, 1975). Una de las primeras especies en ser domesticadas fue *C. pepo*. Su cultivo data de hace 10000 a 8000 años, siendo anterior al cultivo del maíz y al de las habas por más de 4000 años (Smith, 1997). El origen y la temprana diseminación de todas las especies de *Cucurbita* ocurrieron en América. *Cucurbita ficifolia* fue la especie más ampliamente cultivada siendo oriunda de las montañas desde México hasta el norte de Chile y Argentina. *Cucurbita máxima* fue la única especie cultivada con su origen restringido a América del Sur, en áreas de temperaturas tibias de Uruguay y Argentina. *Cucurbita moschata* es oriunda de zonas bajas de América tropical y sub-tropical (México y América del sur), *C. argyrosperma,* de la costa del Pacífico desde México a Nicaragua, y *C. pepo,* de las altas elevaciones de México y del norte de América Central. *C.moschata* fue la única en diseminarse desde dos áreas de origen distintas: una mayor en México y una menor en el norte de América del Sur (Bisognin, 2002; Whitaker, Bemis, 1975). Gwanama y col. (2000) informaron que la *Cucurbita moschata* Duchesne ex. Poiret, también conocida como zapallo tropical, es uno de los cultivos vegetales más importantes en África, habiéndose adaptado a un amplio rango de condiciones climáticas y de suelos y, sin embargo, es una especie científicamente abandonada.

La C*ucurbita* o cucúrbita de flores amarillas está considerada como uno de los géneros más variados morfológicamente en el reino vegetal (Robinson et al, 1976; Bisognin, 2002). Se dice que existen 22 especies silvestres y cinco especies cultivadas, las cuales son extremadamente diversas en color de la fruta, tamaño y forma. Las plantas de este género tienen una alta diversidad genética para la forma y otras características de sus frutos, resultando en una gran variedad de aplicaciones (Bisognin, 2002).

En la selección para la domesticación de los cultivos se buscó la forma, la pulpa menos amarga, menos semillas y éstas más largas, y tamaños de fruto mayores, resultando en una alta diversidad genética entre especies cultivadas. Esta variación se puede asociar con un amplio rango de aplicaciones que requieren diferentes formas, tamaños y relaciones constantes de largo y diámetro de fruto.

Los cruces interespecíficos se han utilizado ampliamente en las cucúrbitas para transferir características deseables de los progenitores silvestres o especies relacionadas a los genotipos cultivables, más que en cualquier otra familia. Los híbridos interespecíficos se han producido en los géneros de *Cucurbita, Cucumis, Citrullus*, y *Luffa.* Sin embargo la hibridización interespecífica se ha utilizado exitosamente sólo para el mejoramiento de la producción de *Cucurbita* (Robinson, Decker-Walters, 1997; Bisognin, 2002), que incluye el desarrollo de los cultivares híbridos *C. maxima* y *C. moschata*. *Cucurbita moschata* también fue utilizada como un puente para transferir resistencia a las enfermedades, buenas cualidades de fruto y resistencia a los insectos de la *C. martinezii* a la *C. pepo.*

En un artículo (Becker, 2006) publicado en "La Revista" del diario La Nación del 4 de Junio del 2006 podía leerse: "Los zapallos irrumpieron en el mercado con formas y colores que más le van a la decoración de ambientes que a las recetas. A pesar de esto, el consumidor que observa estas formas extrañas –que responden a nombres poco difundidos, como hongo, japonés, kuki, marmolado, silver, tasty, budín, plomo– debería dejarse llevar por la atracción que ejercen productos tan llamativos: todos ellos son de cáscara dura, pero dulzones y ricos. Además, baratos y rendidores. Encabezan la carrera el anco o anquito o calabacita o coreanito; el angola –insustituible para hacer zapallo en almíbar–; el plomo o criollo, que se vende en trozos, listo para consumir; el

tetsukabuto, de color verde oscuro, rugoso y de cáscara dura, que puede pesar hasta dos kilos y medio. Todos van ganando un lugar en el recetario invernal." Vemos así su popularidad en la Argentina.

En la Argentina, el zapallo anco (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret) y sinónimos anquito, calabacita, etc. multiplicó su producción a partir de la década del 70, desplazando por sabor y facilidad de manipulación a los zapallos tradicionales. En la actualidad, su importancia es tal que el volumen de producción es dos veces superior a la suma de todas las otras variedades de zapallos (Becker, 2006).

Datos suministrados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA), división frutihortícolas, se muestran a continuación y confirman esta tendencia.

Tabla1: Producción a campo por provincia de zapallo durante el año 2002 en Toneladas.

PROVINCIA	Zapallo anco	Otros zapallos
BUENOS AIRES	35302	
CATAMARCA	2434	25106
CHACO	34568	11902
CHUBUT	210	672
CORDOBA	10936	
CORRIENTES	3490	6150
ENTRE RIOS	1292	
FORMOSA	43222	17030
JUJUY	3164	7186
LA PAMPA	72	
LA RIOJA	322	616
MENDOZA	58942	
MISIONES	1200	4426
NEUQUEN	1882	888
RIO NEGRO	26336	2866
SALTA	4364	16698
SAN JUAN	2738	
SAN LUIS	192	
SANTA FE	2124	
SANTIAGO DEL ESTERO	45678	8648
TUCUMAN	2434	25106
TOTAL ESPECIE	280902	127294

Fuente: DMA S/Datos Indec

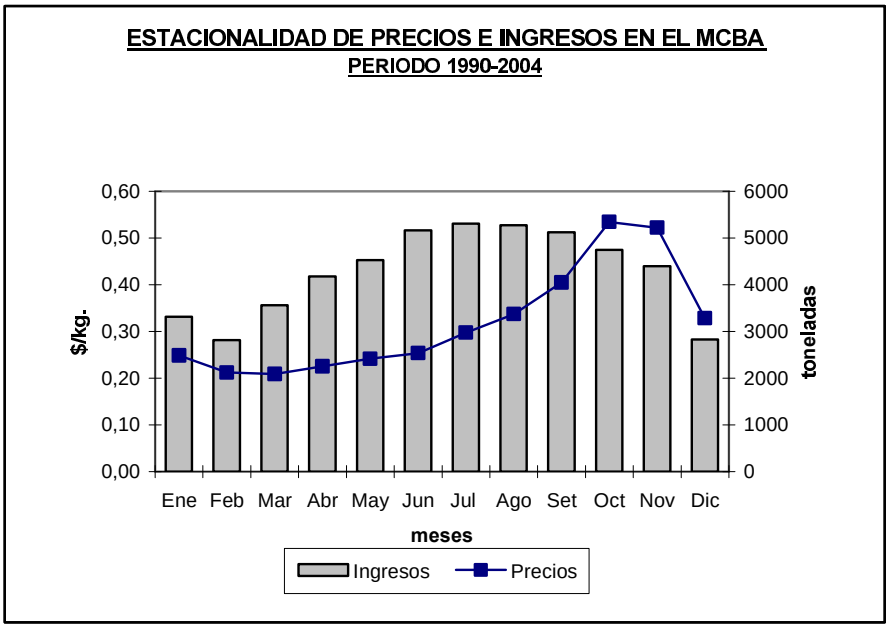


Figura 1: Estacionalidad de precios e ingresos de zapallo anco al Mercado Central de Buenos Aires (MCBA). Fuente: Dirección de Mercados Agroalimentarios Area Mercados de Hortalizas sobre datos del MCBA.

Las principales provincias productoras son Santiago del Estero, Mendoza, Santa Fé, Chaco, Formosa, Salta y Buenos Aires (Becker, 2006).

Si bien no todo el zapallo producido en el país se comercializa a través del Mercado Central de Buenos Aires (MCBA), la Figura 1 es útil para dar una idea de precios y mostrar la estacionalidad de los mismos debido a que es un cultivo ampliamente desarrollado en todo el país teniendo disponibilidad de frutos durante casi todo el año. Durante los meses de Octubre, Noviembre y Diciembre, hubo una menor oferta debido a problemas de producción lo que provocó un aumento en el precio. Gran parte de la producción se comercializa a través de las cadenas de supermercados, otra proporción va a los mercados como el MCBA y, por último, una proporción muy baja va para la industrialización. Uno de los problemas que afronta la SAGPyA, en este aspecto, es que cuando disminuye la demanda, fundamentalmente del supermercadismo, no existe aún un canal alternativo para la calabacita tal como la fabricación de nuevos productos y de mayor valor agregado que utilicen a este fruto como materia prima (Información provista por Carlos J. Larocca).

La calabacita, es uno de los primeros alimentos que sugieren los pediatras incorporar en la alimentación de los bebés luego del sexto mes y, también es recomendado por parte de los gerontólogos, para personas de avanzada edad. Como se ve, es un alimento que se consume a lo largo de toda nuestra vida y ampliamente aceptado y adoptado por gran parte de nuestra población. Por otro lado, como ya se mencionó, la calabacita es un cultivo ampliamente producido en todo el país, encontrando materia prima fresca durante casi todo el año. Esto determina que el producto tenga un precio relativamente estable y no alto.

Resulta pues, un desafío interesante, un estudio detallado de este tejido vegetal a fin de poder desarrollar, a partir de él, productos de mayor valor agregado y con adecuadas propiedades nutricionales y funcionales.

Referencias

Bisognin D.L. 2002. Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Ciência Rural* 32 (5): 715-723.

Becker M. 2006. Tiempo de zapallos. *La Revista, diario La Nación del 4 de Junio*.

Jeffrey D. 1990. Appendix: An outline classification of the *Cucurbitaceae*. En: Bates D.M., Robinson R.W., Jeffrey C. *Biology and utilization of the Cucurbitaceae*. Ithaca and London: Cornell University.

Whitaker T.W., Bemis W.P. 1975. Origin and evolution of the cultivated *Cucurbita. Bull Torrey Bot Club 102: 362-368.*

Smith B.D. 1997. The initial domestication of *C. pepo* in the Anerucas 10000 years ago. *Science* 276: 932-934.

Robinson R.W., Munger H.M., Whitaker T.W. 1976. Genes of *Cucurbitaceae. HortScience* 11 (6): 554-568.

Robinson R.W., Decker-Walters D.S. 1997. *Cucurbits*. New York Cab International. 226p.

Gwanama C., Labuschagne MT, Botha A.M. 2000. Análisis of genetic variation in *Cucurbita moschata* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphyrica* 113: 19-24.

Agradecimientos

Muchas gracias al Sr. Carlos J. Larocca de la Dirección de Mercados Agroalimentarios división Mercados Hortícolas, de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos por la amabilidad durante la entrevista y los datos suministrados que se publican en esta introducción.

Objetivos

- ☑ Llevar a cabo la caracterización del tejido de *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret, conocida en Argentina como calabacita, analizando el efecto en esas características de los cambios en la presión de turgor de sus células provocados por la inmersión del tejido en medios osmotizantes de distinta concentración de un polímero osmo-activo. Evaluar los cambios en la textura, determinar la composición química de la pared celular y medir la actividad de las enzimas involucradas en los cambios, de modo tal de tener una completa caracterización del tejido para su utilización en la industria de la alimentación, con distintos fines.
- ☑ Desarrollar un producto funcional y listo para consumir a partir de la calabacita utilizando su tejido como matriz para la incorporación de micronutrientes de los cuales no es fuente, tales como el hierro. Se desarrollaría así un producto fortificado a partir de un cultivo económico y ampliamente consumido y aceptado por la población. De este modo se satisfacería la expectativa nutricional del consumidor y, por otro lado, se agregaría valor al cultivo. Es fundamental evaluar la estabilidad del producto desde el punto de vista microbiológico, como así también evaluar los cambios organolépticos del producto desarrollado, sin perder de vista el aspecto nutricional atendiendo a la biodisponibilidad del micronutriente incorporado.
- ☑ Evaluar distintos modos de obtención de fibra dietaria a partir de los residuos de la industrialización de calabacita, midiendo rendimientos y calidad de los productos obtenidos por distintos métodos. Determinar la composición química de estos y sus propiedades, entre ellas las de hidratación, las cuales están relacionadas con la funcionalidad de estas fibras en el tracto digestivo.
- ☑ Estudiar la aplicación de los productos ricos en fibra que fueran obtenidos a partir de los residuos de la industrialización, en la elaboración de masas farináceas y en productos panificados.

CAPITULO I

CARACTERIZACIÓN DEL TEJIDO DE LA CALABACITA. CAMBIOS QUÍMICOS, BIOQUÍMICOS Y ESTRUCTURALES EN EL TEJIDO, DEBIDO AL CAMBIO DE LA PRESIÓN DE TURGOR.

Índice Capítulo I

I-1-Introducción.....- 12 -

I-2-Materiales Y Métodos.....- 14 -

I-2-1-Materiales.....- 14 -

I-2-2-Métodos.....- 15 -

I-2-2-1-Medición Del Volumen Del Tejido.....- 15 -

I-2-2-2-Ensayos De Compresión Y De Relajación.....- 16 -

I-2-2-3-Ensayos Reológicos Dinámicos.....- 17 -

I-2-2-4-Microscopía Óptica (LM).....- 17 -

I-2-2-5-Microscopía Electrónica De Transmisión (MET).....- 18 -

I-2-2-6-Actividad Enzimática.....- 18 -

I-2-2-7-Lignina.....- 20 -

I-2-2-8-Compuestos Fenólicos.....- 20 -

I-2-2-9-Obtención Del Residuo Insoluble En Alcohol (AIR).....- 20 -

I-2-2-10-Extracción Secuencial De AIR Y Análisis.....- 21 -

I-2-2-11-Determinación De Ácido Galacturónico En AIR.....- 21 -

I-2-2-12-Determinación De Hidratos De Carbono Totales En El AIR.....- 22 -

I-2-2-13-Análisis De Azúcares Neutros En El AIR.....- 22 -

I-2-3-Análisis Estadístico.....- 22 -

I-3-Resultados y Discusión.....- 24 -

I-3-1-Presión De Turgor Del Tejido.....- 24 -

I-3-2-Comportamiento Reológico Del Tejido De La Calabacita.....- 28 -

I-3-2-1-Fuerza-Deformación.....- 28 -

I-3-2-2-Relajación.....- 33 -

I-3-2-3-Ensayos Dinámicos.....- 35 -

I-3-3-Análisis Enzimático. .....- 38 -

I-3-4-Análisis Químico De Las Paredes Celulares. .....- 41 -

I-3-4-1-Residuo Insoluble En Alcohol (AIR). .....- 41 -

I-3-4-2-Fracciones Extractables. .....- 43 -

I-3-4-2-1-Fracción Soluble En Agua (WSF). .....- 44 -

I-3-4-2-2-Fracción Soluble En Sal (SS) Y En CDTA……- 46 -

I-3-5-Influencia De La Inmersión Y De Los Cambios En La Presión De Turgor Sobre La Composición Química Del Tejido De Calabacita. .....- 48 -

I-4-Conclusiones. .....- 51 -

I-5-Referencias .....- 53 -

I-1-Introducción

Los tejidos comestibles de los vegetales constituyen una importante fuente de nutrientes. La textura es una característica decisiva para su aceptación y está regida por su estructura histológica y composición química. La célula es la unidad estructural más pequeña que, junto con otras células, constituye una organización mayor: el tejido vegetal. La calidad textural de los vegetales descansa entonces en la "unidad mecánica" cuyos componentes son la pared celular (PC), la laminilla media (LM) y la membrana celular o plasmalema (MC) (Lin y Pitt, 1986; Schur, 1987; Jackman y col., 1992).

La presión de turgor es la presión hidrostática que ejerce el líquido intracelular sobre la MC. La turgencia existe debido a la propiedad "semipermeable" que caracteriza las MCs. Esta presión tiene efectos importantes sobre las propiedades reológicas de las frutas y de los vegetales (Lin y Pitt, 1986; Jackman y col., 1992; Falk y col., 1958; Nilsson y col., 1958; Philip, 1958; Murase y col., 1980). Como la MC tiene poca resistencia mecánica, la PC soporta la presión de turgor gracias a su elasticidad. Esta propiedad de la pared celular se debe al efecto combinado de la red celulosa-xyloglucanos/extensina y de la matriz de pectina (gel). La laminilla media (LM) es la capa enriquecida en pectina que adhiere entre sí las paredes de células adyacentes. Es la responsable por la adhesión célula-célula. Se ha sugerido que la relación entre la resistencia mecánica de la PC y la de la LM determina la percepción sensorial de textura jugosa, o bien seca o pastosa durante la masticación (Ilker y Szczesniak, 1990). En consecuencia, la estructura y propiedades texturales de las frutas y tejidos vegetales depende en gran medida de la unidad PC-LM y el efecto del procesado sobre ésta afectará la textura del producto final. Como un ejemplo, el ablandamiento inducido por la cocción en las zanahorias se debe a una pérdida inicial de la turgencia seguida por un incremento en la facilidad de separación de las células (Greve y col., 1994; Ng y Waldron, 1997). Ng y Waldron (1997) informaron que la precocción, previa a la cocción, aumentaba la adhesión célula-célula y reducía el ablandamiento en las zanahorias. Se atribuyó este efecto a la demetilación de la pectina seguida por un entrecruzamiento de las cadenas poliméricas mediante iones Ca^{2+}, eventos ocurridos durante la precocción.

Sajnín y col. (2003) observaron que la actividad de la peroxidasa (POX) y de la poligalacturonasa (PG) aumentaba luego del cambio de la presión de turgor en el tejido del melón y se atribuyó esta tendencia a la respuesta del tejido al daño provocado.

Por lo tanto, es importante investigar sobre los aspectos químicos y bioquímicos que involucran a los polímeros de la PC y de la LM para comprender mejor la modificación de la textura después del procesamiento. Hay escasa bibliografía que contenga información sobre las respuestas organolépticas y nutricionales de la calabacita (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) con el procesamiento. Existen algunos trabajos acerca de la aplicación del polvo de zapallo para el mejoramiento del volumen y de la aceptabilidad organoléptica del pan de harina de trigo (Ptitchkina y col., 1998). Ptitchkina y col. (1994) estudiaron las características de la pectina del zapallo. Chun y Youn (1998) estudiaron la composición química y la calidad del zapallo nativo maduro e inmaduro y las correspondientes características morfológicas. Lee y Joon (1998) estudiaron el efecto del procesado a bajas temperaturas y atmósferas controladas sobre el daño durante el almacenamiento. Mosha y col. (1997) y Xu y Siegenthaler (1997) estudiaron el efecto del procesamiento sobre la calidad nutricional de la calabaza.

Por lo tanto, en esta primera etapa del trabajo, se caracterizó el comportamiento reológico del tejido de la calabacita (*Cucurbita moschata* Duchesne ex. Poiret.) a través de estudios en condiciones de viscoelasticidad no lineal (fuerza-deformación y relajación), y en condiciones de viscoelasticidad lineal (estudios dinámicos), evaluándose la contribución relativa de la presión de turgor, de la PC y de la LM a este comportamiento. Luego, se buscó caracterizar los polímeros de la PC-LM de la calabacita y la actividad de enzimas relacionadas con la PC, con el propósito de comprender los cambios que había sufrido el tejido cuando la presión de turgor se modificaba, afectando el comportamiento textural. Para tal fin la calabacita fue equilibrada en soluciones buffer de pH fisiológico que contenían concentraciones gradualmente crecientes de polietilenglicol 400 (PEG), con el objeto de lograr un incremento escalonado y controlado de la presión osmótica debido exclusivamente al flujo de agua.

I-2-Materiales y Métodos

I-2-1-Materiales

Cucurbita moschata, Duchesne ex. Poiret, cultivada en Argentina y popularmente conocida como "calabacita" o "zapallo anco". Tiene una composición aproximada en su mesocarpio de 97,4% (p/p) de de humedad, 1,27% (p/p) de fibra total, 0,81% (p/p) de azúcares, 0,3% (p/p) de almidón, 0,18% (p/p) de proteínas, 0,06% (p/p) de cenizas (McCance & Widdowson's, 1993). La calabacita adquirida en un supermercado local fue cuidadosamente lavada con detergente y agua potable y, finalmente, enjuagada con agua destilada.

Las soluciones para la inmersión fueron preparadas en buffer (20 mol m^{-3} KH_2PO_4 y 20 mol m^{-3} K_2HPO_4; pH: 6,8) con polietilenglicol 400 (PEG), en un rango de concentraciones de 0,00 – 1200 mol m^{-3}. Los reactivos utilizados fueron de grado analítico y el agua, desionizada (Milli-Q®).

➔ *Preparación de la muestra*

Calabacita: una vez lavada se cortó, con la ayuda de un torno, en discos perpendiculares a su eje longitudinal de 10 mm o de 3 mm de espesor. Luego, de cada disco, se obtuvieron cilindros de 20 mm o 35 mm de diámetro, utilizando un sacabocados (fotos 1 y 2).

Doce cilindros de 20 mm y seis cilindros de 35 mm de diámetro se equilibraron en las distintas soluciones de PEG durante 36 h a 12ºC. La relación entre el peso de cada solución de PEG y el peso de los cilindros sumergidos fue suficientemente alta (por lo menos 10:1) de modo tal de mantener constante el valor de actividad de agua (a_w) inicial de las soluciones a lo largo del ensayo. Los sistemas fueron agitados periódicamente.

Foto 1 y 2: Rodajas de calabacita cortadas con el torno, y los cilindros del mesocarpio cortados con sacabocado.

I-2-2-Métodos

I-2-2-1-Medición del volumen del tejido

El volumen del tejido (V) y el peso (m_f) luego de alcanzar el equilibrio a las 36 horas, se midieron por desplazamiento de vaselina líquida en una probeta de vidrio calibrada, con una precisión de 0,1 ml. Los volúmenes (V_i) y pesos (m_i) iniciales se determinaron a partir de los cilindros de calabaza fresca (sin inmersión). El cambio relativo de volumen $[(V-V_i)/V_i]$ y la pérdida relativa de peso $[\Delta m = (m_f-m_i)/m_i]$ fueron calculados considerando el volumen (V) y la masa (m_f) correspondiente al estado final de equilibrio de cada solución.

La presión de turgor se calculó, para cada muestra, a partir de los cambios de volumen ensayados al equilibrarse en las diferentes soluciones de PEG y según la descripción de Sajnin y col., (1999), buscando la mínima concentración de soluto donde ocurría la plasmólisis incipiente. El polímero utilizado (PEG) no es absorbido a través de la MC debido a su tamaño, por lo cual el cambio de la presión de turgor se debe exclusivamente al flujo de agua. Además, como sí atraviesa la PC, se observaría el fenómeno de plasmólisis en el caso de pérdidas de agua extremas (Carpita y col., 1987).

En el equilibrio, el potencial de agua celular (ψ) se puede estimar a partir del potencial de agua de las soluciones de inmersión de PEG, a través de la ecuación de Van't Hoff.:

$$\psi = M\ i\ R\ T \qquad (1)$$

Donde M es la molaridad de la solución de inmersión, i corresponde al número de partículas que resultan de la disociación de la molécula de soluto involucrada (i = 1 para PEG en medio acuoso), T es la temperatura absoluta (K) y R es la constante universal de los gases (0,008315 MPa dm^3 / mol K).

El potencial osmótico del contenido celular (ψ_s) se relaciona al potencial de agua de la respectiva solución mediante la siguiente ecuación:

$$\psi = \psi_s + W \qquad (2)$$

Donde W es la presión que siente la pared celular y,

$$W = -\boldsymbol{T}$$

Siendo T, la presión de turgor celular (Stadelmann, 1966). La primera concentración de PEG donde ocurrió la plasmólisis incipiente ($\boldsymbol{T}$=0), permitió calcular ψ_s^o (el correspondiente potencial osmótico) de la ecuación (1) y (2).

Finalmente el potencial osmótico de las muestras de tejido en cada solución (ψ_s) de inmersión se puede determinar de la relación:

$$\psi_s = \psi_s^o (V_0 / V) \qquad (3)$$

Donde V_0 y V son el volumen de muestra en la plasmólisis incipiente y en una dada solución de inmersión luego del equilibro, respectivamente. En las soluciones de PEG, las células tratan de igualar el potencial de agua a ambos lados de la membrana sólo por el movimiento de agua desde las células hacia la solución externa o en la dirección contraria, dependiendo del caso. Este movimiento de agua produce un cambio en el volumen del tejido, luego del equilibrio de la célula con la solución externa. La condición isotónica corresponde a la concentración de soluto (PEG) en el cual el cambio relativo de volumen ((V-Vi) /Vi) es igual a cero. La presión de turgor del tejido fresco se estimó de las ecuaciones (2) y (3) como:

$$\boldsymbol{T} = [\psi_s^o (V_0/V)] - (M \text{ i } R \text{ } T)$$

I-2-2-2-Ensayos de compresión y de relajación

Ambos ensayos se llevaron a cabo en una prensa Instron modelo 1011 (Instron Corp, Canton, MA, USA) provisto con un transductor de 5000 N y una punta de medición plana paralela de 30 mm de diámetro. La velocidad usada para la etapa de compresión fue de 5 mm/min. En cada ensayo, se evaluaron seis cilindros de 20 mm de diámetro y 10 mm de alto para cada tipo de sistema.

En el ensayo de compresión, se registraron las curvas de fuerza-deformación hasta un 80% de deformación de la muestra. La fuerza (F_f) y la deformación (L_f) al primer pico de fractura fueron determinadas de las curvas y la firmeza (F_m) se calculó como la relación F_f/L_f.

Para el ensayo de relajación, los especímenes se comprimieron hasta el 14% o 25% de deformación. Se eligió la menor deformación posible que permitiese al texturómetro Instron registrar una fuerza sin ocasionar fractura macroscópica al tejido, tanto en el tejido fresco como en los cilindros tratados. Al nivel de deformación pre-seleccionada, se detuvo el cabezal y se registró, entonces, la fuerza de relajación [F(t)] a lo largo de, al menos, 10 minutos. Las fuerzas de relajación obtenidas se normalizaron dividiendo por el valor de la fuerza inicial de relajación (F_o): $F = F(t)/F_o$. Las curvas de F en función del

tiempo se ajustaron según el modelo generalizado de Maxwell (Peleg y Calzada, 1976; Nussinovitch y col., 1989):

$$F(t) = F\infty + \sum_{i=1}^{n} Fi \cdot \exp(-t/\tau i)$$

Siendo los parámetros normalizados obtenidos:

$F\infty$: fuerza de relajación a tiempo infinito.

Fi: fuerza de relajación inicial.

τ_i: el tiempo de relajación para cada cuerpo de Maxwell.

I-2-2-3-Ensayos reológicos dinámicos

Seis discos de 35 mm de diámetro y 3 mm de altura del tejido del mesocarpio se utilizaron para realizar los barridos de frecuencia para cada tratamiento. Se utilizaron platos paralelos de 30 mm de diámetro, en un reómetro dinámico Paar Physica MC 300 (Alemania). Discos de tejido de, exactamente, 30 mm de diámetro se cortaron con un sacabocado de los cilindros equilibrados en cada solución de PEG. Inicialmente, se llevó a cabo un barrido de amplitud del esfuerzo entre 0,5 y 1000 Pa, a frecuencia constante de 1 o de 10 Hz, en el tejido fresco y equilibrado, con el objeto de determinar el rango de viscoelasticidad lineal (LVR), es decir, el rango de deformaciones donde los valores de G', G'' y la relación deformación/esfuerzo aplicado fueron constantes para las muestras estudiadas. Un valor de deformación de 0,01% se eligió entonces para hacer los barridos de frecuencia (espectro mecánico), estando este valor dentro del LVR para todas las muestras. Los módulos elástico o de almacenamiento (G') y el viscoso o de pérdida (G''), como así también la tangente del ángulo de desfasaje δ ($\tan\delta$ = G''/G'), se evaluaron a 20ºC barriendo frecuencias entre 0,1 y 10 Hz. Como los parámetros dinámicos mencionados mostraron ser independientes de la frecuencia, sus respectivos valores a 5 Hz fueron elegidos para la comparación del comportamiento dinámico entre los tejidos con diferente grado de turgencia.

I-2-2-4-Microscopía Óptica (LM)

Las secciones de tejido fresco y de tejido equilibrado en soluciones de PEG de concentraciones 80, 250 y 540 mol m^{-3}, se fijaron por inmersión,

durante 24 horas a temperatura ambiente, en glutaraldehído (30g kg^{-1}) en 100 mol m^{-3} de buffer de fosfato de potasio (pH: 7,4); luego se enjuagaron tres veces con agua destilada, se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio (OsO_4) a temperatura ambiente y fueron deshidratadas en acetona antes de ser embebidos en una resina Spurr de baja viscosidad. Para la microscopía óptica, secciones (1 o 2 μm de espesor) del tejido embebido en Spurr se cortaron en un Sorvall MT2-B Ultracut microtome y se tiñeron con azul de metileno.

Las observaciones de realizaron con un microscopio óptico de fluorescencia Nikon (AFX II, Japón).

I-2-2-5-Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Se cortaron secciones ultra finas del tejido embebido en Spurr, se tiñeron con acetato de uranilo-Reynolds y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión EM 109T Zeiss TEM (Alemania).

I-2-2-6-Actividad enzimática

Las mediciones se realizaron por duplicado. Se utilizó agua deionizada (Milli-Q™) para la preparación de todos los reactivos utilizados para el dosage de enzimas.

Concentración de proteínas

Las proteínas se determinaron en cada extracto enzimático por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) utilizando sero albúmina bovina (BSA) como proteína Standard (Sigma, USA).

Actividad de Peroxidasa (POX)

Se siguió el procedimiento de Fúster y col. (1994) modificado para extraer con buffer fosfato 50mM (pH 7,2) la POX soluble y total del tejido. Los cilindros de tejido se trituraron con el buffer en un Sorvall Omni Mixer (USA) enfriado con hielo a 4ºC, durante 5 minutos para extraer la fracción soluble de esta enzima. Inmediatamente, se dividió el homogenato en dos fracciones: una se utilizó para evaluar la POX soluble, y a la otra se le agregó NaCl sólido hasta

alcanzar una concentración final en la suspensión de 1 M en NaCl. Esta última fracción se sometió una vez más a homogenización durante 7 minutos a 4ºC, obteniendo la completa disolución del NaCl y, consecuentemente, la extracción de la POX iónicamente unida a la PC. El sobrenadante obtenido luego de la centrifugación (4ºC) se utilizó para determinar la actividad de POX total. La actividad de la enzima se midió a 25ºC como describieron Marangoni y col. (1995), usando guayacol como sustrato y expresando la actividad como el cambio en la absorbancia (470nm) o UAb min^{-1} mg^{-1} proteína. La actividad de POX iónicamente unida se halló por diferencia entre la total y la soluble.

Actividad de Pectinmetilesterasa (PME)

La extracción de PME y la evaluación de la actividad de la misma se llevaron a cabo de acuerdo al método de Hagerman y Austin (1986). Cada muestra de tejido (4,5g) se extrajo con 8,8% (p/v) de solución de NaCl (15 ml) conteniendo 2% (p/p) de polivinilpirrolidona (PVP) como ligante de compuestos fenólicos, en un homogeinizador enfriado exteriormente con hielo a 4ºC. El homogenato se centrifugó durante 10 minutos a 20000g (4ºC). Se separó el sobrenadante, se le ajustó el pH a 7,5 y, finalmente, se utilizaron de 30 a 100 µl en el procedimiento colorimétrico. Este ensayo utiliza 0,01 (p/v) de solución de azul de bromotimol (preparada en buffer de fosfato de potasio 0,003M, pH 7,5) como indicador colorimétrico del descenso del pH que ocurre debido a la actividad hidrolítica de la PME, que involucra la de-metoxilación del ácido galacturónico de las pectinas. La actividad de la enzima se midió a 25ºC como el cambio en la absorbancia (620nm) o UAb min^{-1} mg^{-1} proteína.

Actividad de poligalacturonasa (PG)

Los cilindros de tejido (10g) se trataron con una solución de NaCl 5% (p/p) (60g) que contenía 5 mM de tetrationato de sodio como inhibidor de proteasas y 2% (p/p) de polivinilpirrolidona (PVP) como ligante de compuestos fenólicos, en un homogeinizador enfriado exteriormente con hielo a 4ºC durante 10 min. La actividad de la enzima se midió de acuerdo con Nelson (1944) mediante la técnica que involucra la incubación de enzima-sustrato durante 2 h a 37ºC, seguida por una reacción colorimétrica con el reactivo de Nelson (arseno-molibdato). Se utilizó como sustrato ácido poligalacturónico disuelto en buffer

acético/acetato de sodio (pH 5,5). La absorbancia se determinó espectrofotométricamente en el sobrenadante de la centrifugación, a una longitud de onda de 540 nm. La actividad de PG se expresó como mg de ácido galacturónico por mg de proteína.

I-2-2-7-Lignina

Se determinó por la reacción de una sección delgada de la muestra de tejido con (a) floroglucinol HCl: 2-3 gotas de 1% (p/v) de floroglucinol en etanol 95%, seguida por la adición de una gota de HCl 25% (p/v), o (b) safranina-Fast Green, después del tratamiento de fijación principal (10:50:5, formaldehído: alcohol: ácido acético, en agua) a lo largo de 12 horas. La tinción fue seguida de una deshidratación en alcohol e inclusión en parafina para el corte (secciones de 1 a 2 μm de espesor) con un micrótomo Sorval MT2-B Ultracut (Dupont, USA).

Todas las muestras de tejido se examinaron con un microscopio Nikon (AFX II, Japón).

I-2-2-8-Compuestos fenólicos

La presencia de compuestos fenólicos simples se estudió en secciones delgadas del tejido de la calabaza cortadas con un bisturí y tratadas con 0,1M de acetato de sodio (pH 4,5) o bien con amoníaco 20mM (pH 10) para permitir la auto fluorescencia de las paredes celulares (Parker y col., 1995). Una mezcla 9:1 de glicerol y buffer fosfato (pH 10) se agregó, en ambos casos, para demorar la autofluorescencia y poder tomar las imágenes fotográficas. Las observaciones se realizaron con un microscopio Nikon (AFX II, Japón) bajo modo fluorescencia y utilizando los filtros apropiados.

I-2-2-9-Obtención del residuo insoluble en alcohol (AIR)

El AIR se obtuvo luego de tratar el tejido en etanol 85% en ebullición como fuese descrito por Martin-Cabrejas y col. (1994). El producto obtenido fue secado al aire, a temperatura ambiente, congelado con N_2 líquido, liofilizado y molido. El polvo obtenido fue envasado en bolsas de Cryovac™ (copolímero del cloruro de polivinilo-cloruro de polivilideno) al vacío y almacenado a -80ºC hasta las posteriores determinaciones.

El AIR fue: (a) sometido a extracciones secuenciales para análisis posteriores o (b) utilizado tal cual para la determinación de ácido galacturónico, hidratos de carbono totales y azúcares neutros.

I-2-2-10-Extracción secuencial de AIR y análisis

Se realizó de acuerdo a Ng y Waldron (1997). 0,5g de AIR se suspendieron en agua deionizada (50ml) y el sistema se mantuvo en agitación durante 2 h, a 18-20ºC. El residuo insoluble en agua fue luego extraído en NaCl (50ml, 0,136M, pH 6,5) durante 2 h a 18-20ºC. El residuo se extrajo luego en CDTA (55ml, 50mM, pH 6,8) durante 5h a 18-20ºC. Los respectivos sobrenadantes se aislaron por centrifugación y filtración posterior a través de filtro Whatman GF/F (Alemania). Luego se dializaron a través de membrana de "cut off" 1000 a 4ºC previo a la liofilización. Se utilizó agua deionizada (Milli-Q™) para las extracciones secuenciales de AIR.

Los siguientes análisis se realizaron en las muestras de solución extractiva obtenida: ácido galacturónico a través del método espectofotométrico reportado por Filisetti-Cozzi y Carpita (1991), glucosa libre por la reacción colorimetría del fenol y 4-aminofenazona con una previa oxidación enzimática especifica de glucosa con glucosa-oxidasa y peroxidasa (Kit enzimático de Wierner Lab., Argentina); hidratos de carbono totales por el método colorimétrico de Dubois y col. (1956), utilizando glucosa para la curva estándar; contenido de metanol, usando el método espectofotométrico de Wood y Siddiqui (1971). El grado de metilacion (DM) se calculó como la relación molar entre el contenido de metanol y el de ácido galacturónico determinado en las fracciones correspondientes. El análisis de los azúcares neutros se realizó de acuerdo a Albersheim y col. (1967).

I-2-2-11-Determinación de ácido galacturónico en AIR

Una cantidad de 0,3 g de cada muestra se dispersó en el volumen necesario de ácido sulfúrico 72% (p/p) y agua deionizada para alcanzar una concentración 1M de ácido sulfúrico. La suspensión se hidrolizó mediante calentamiento a 100ºC durante 1 hora, homogeneizando periódicamente y agregando agua en ebullición para mantener el volumen total. Los productos,

finalmente, se enfriaron, neutralizaron con NaOH y diluyeron adecuadamente con agua deionizada. El ácido galacturónico se determinó como se mencionó previamente.

I-2-2-12-Determinación de Hidratos de Carbono totales en el AIR

Se aplicó el mismo procedimiento seguido para la extracción de ácido galacturónico de las muestras, pero la suspensión se hidrolizó mediante calentamiento a 100ºC durante 2,5 horas. El contenido de glucosa y la cantidad total de hidratos de carbono se determinó como se mencionó previamente.

I-2-2-13-Análisis de azúcares neutros en el AIR

La proporción de monosacáridos que constituyen los polisacáridos de la pared celular se determinó luego de una hidrólisis con ácido trifluoracético (TFA) 2 M, durante 90 minutos a 120ºC. Los hidrolizados se derivatizaron a los acetatos de alditol (Albershein y col., 1967) y se analizaron mediante cromatografía gas-líquida (GCL) utilizando una columna capilar (30m x 0,25 mm) rellena con SP-2330 (0,20μm) en un cromatógrafo gaseoso HP-5890 (Hewlett Packard, USA) equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se utilizó gas nitrógeno como carrier, con una velocidad de flujo de 1 ml/min. La corrida cromatográfica fue isotérmica 220ºC, mientras que el inyector y detector se fijaron en 235ºC. A fin de detectar la presencia posible de material celulósico, se llevó a cabo el procedimiento de hidrólisis de Morrison (1988), con TFA puro sobre el residuo de la primera hidrólisis. La respuesta del FID se consideró siempre proporcional al peso de los derivatizados. Cada paso de hidrólisis se llevó a cabo por duplicado.

I-2-3-Análisis Estadístico.

Las regresiones no-lineales y el análisis estadístico de los resultados a través de ANOVA (α: 0.05) seguida por comparaciones múltiples apareadas realizadas por un test de diferencias estadísticas de Tukey, se llevó a cabo utilizando el programa Statgraphics (versión 3.0, SRSC, 1994, Rockville, Md., USA).

La significancia de las regresiones se determinó evaluando el parámetro F de Fischer y el coeficiente r^2 así como el de Durbin Watson en el caso de regresiones no-lineales (Sokal y Rohlf 1980).

I-3-Resultados y Discusión

I-3-1-Presión de turgor del tejido

Cuando se coloca un trozo de tejido vegetal en un medio con una presión osmótica particular, se contraerá o bien se hinchará o permanecerá sin cambio. Si la presión osmótica del medio que rodea al tejido es más alta que el potencial osmótico celular, difundirá agua al exterior y el material se retraerá. Si la presión osmótica del medio que rodea al tejido es más baja que el potencial osmótico celular, ingresará agua al tejido y el material se hinchará. Si la presión osmótica del medio coincide con la del tejido, entonces el volumen del material no cambiará. Colocando entonces trozos del tejido vegetal en medios de diferente presión osmótica y midiendo el cambio relativo de volumen, es posible determinar claramente el punto para el cual la presión de turgor es cero (plasmólisis incipiente), el punto para el cual el potencial osmótico celular del tejido intacto equivale al del medio que lo rodea (isotonicidad), como así también el punto para el cual las células estallan (plasmoptisis) o bien se hinchan en el grado máximo permitido por las características de su PC-LM (Rojas y col., 2002). Este tipo de ensayo permite determinar, entonces, la respuesta del tejido vegetal vivo bajo condiciones de cambio osmótico, su comportamiento textural y evaluar su posible respuesta en un futuro procesamiento, esto es, el comportamiento y/o resistencia de su estructura mecánica PC-LM bajo el estrés provocado por el proceso.

La presión de turgor del tejido del mesocarpio de la calabacita fresca se modificó por la inmersión de cilindros de tejido, hasta llegar al equilibrio, en soluciones de buffer fosfato a pH 6,8 con un aumento discreto de la concentración de PEG. Los cambios en el volumen relativo $[(V-V_i)/V_i]$ y en el peso (Δm) de los cilindros de tejido en función de la concentración de PEG, se muestran en las Figuras 1A y B, respectivamente. Los cambios relativos en el volumen de tejido fueron afectados significativamente ($p<0,05$) por la concentración de PEG de las soluciones mostrando una relación lineal en el rango de concentraciones de PEG de 130-380 mol m^{-3} (pendiente: -0,52; F: 338; r^2: 0,988).

El estado de plasmólisis incipiente para el tejido es aquél donde la presión de la pared celular (y el turgor del tejido) es cero. En general, se determina el punto para el cual la pendiente del cambio del volumen relativo en función de la concentración de PEG (mol m^{-3}) adopta un valor nulo o casi nulo ya que no puede ocurrir una reducción significativa en el volumen cuando el tejido está ya plasmolizado (Lin y Pitt, 1986). Como se puede observar en la figura 1A, la ocurrencia de la plasmólisis incipiente no fue evidente como una cesación de una retracción adicional de la muestra cuando se equilibró en concentraciones elevadas de PEG, para el tejido de la calabacita. De todos modos, los cambios de firmeza, de fuerza residual de relajación (F_∞) y de G' (Figura 5; ver mas detalles en "comportamiento reológico del tejido de calabaza") con concentraciones crecientes de PEG, revelaron un cambio en la pendiente para tejidos equilibrados en soluciones de PEG de concentración ≈380 mol m^{-3}, tendencia que se atribuyó a la plasmolisis incipiente. Lin y Pitt (1986) determinaron el comienzo de la plasmólisis incipiente para el tejido de manzana utilizando un ensayo de compresión a gran deformación y Rojas y col. (2002), usaron ensayos con grandes y pequeñas deformaciones para kiwi ya que a ellos también les resultó dificultoso determinar aquel estado a través de los cambios relativos de volumen como una función de la concentración de la solución osmótica. Como consecuencia y teniendo en cuenta aquel valor de concentración de PEG así como el cambio relativo de volumen con la concentración de PEG para la calabacita (Fig 1.), fue posible calcular la presión de turgor del tejido para todas las condiciones ensayadas (Lin y Pitt, 1986; Jackman y col., 1992; Sajnín y col., 1999) y los resultados se muestran en la Tabla 1.

La condición isotónica para el tejido corresponde a la solución que produce un valor nulo en el cambio relativo de volumen para los cilindros equilibrados (Lin y Pitt, 1986). Una concentración isotónica de PEG de casi 250 mol m^{-3} y una presión de turgor de 0,267 MPa se estimaron entonces para el tejido comestible fresco (crudo), a partir de la regresión lineal. Por lo tanto, la ganancia de agua ocurre en el tejido equilibrado a concentraciones de PEG por debajo de 250 mol m^{-3}. Como se puede observar en la Figura 1A, el tejido se hinchó cuando se equilibró con concentraciones de PEG entre 250 y 130 mol m^{-3} y no se detectó un incremento significativo del cambio relativo del volumen entre 0 y 130 mol m^{-3} de concentraciones de PEG. Sin embargo, un incremento

significativo en la ganancia de agua ocurrió tal como se pudo determinar a partir del continuo incremento del peso del tejido entre 0 y 250 mol m^{-3} (Figura 1B). Los tejidos equilibrados en 0-130 mol m^{-3} de soluciones de PEG se hincharon pero, probablemente, no lo suficiente como para producir un incremento significativo en el volumen, o al menos, una variación del volumen del tejido detectable bajo nuestro error experimental. En consecuencia, la plasmoptisis o estallido de células parece no ocurrir a bajas presiones osmóticas externas (0-130 mol m^{-3} de solución de PEG) ya que no se observa caída del volumen relativo ni del peso relativo, y la MC parece prevalecer intacta en las células de dichos tejidos.

En la Figura 1C se puede observar la representación de la presión de turgor en función de $[(V/V_0)-1]$ o deformación volumétrica, donde V_0 es el volumen de los cilindros de tejido al momento de la plasmólisis incipiente y V, el volumen del tejido equilibrado a una dada concentración de PEG. La pendiente de esta recta corresponde al coeficiente de permeabilidad del tejido (Philip, 1958) o más precisamente, al módulo elástico volumétrico como estableciera Cosgrove (1988). Como se ve en la Figura 1C, dicho módulo depende del grado de estiramiento de la pared celular y, por otro lado, la resistencia de la PC dependió del grado de deformación producido por la presión de turgor.

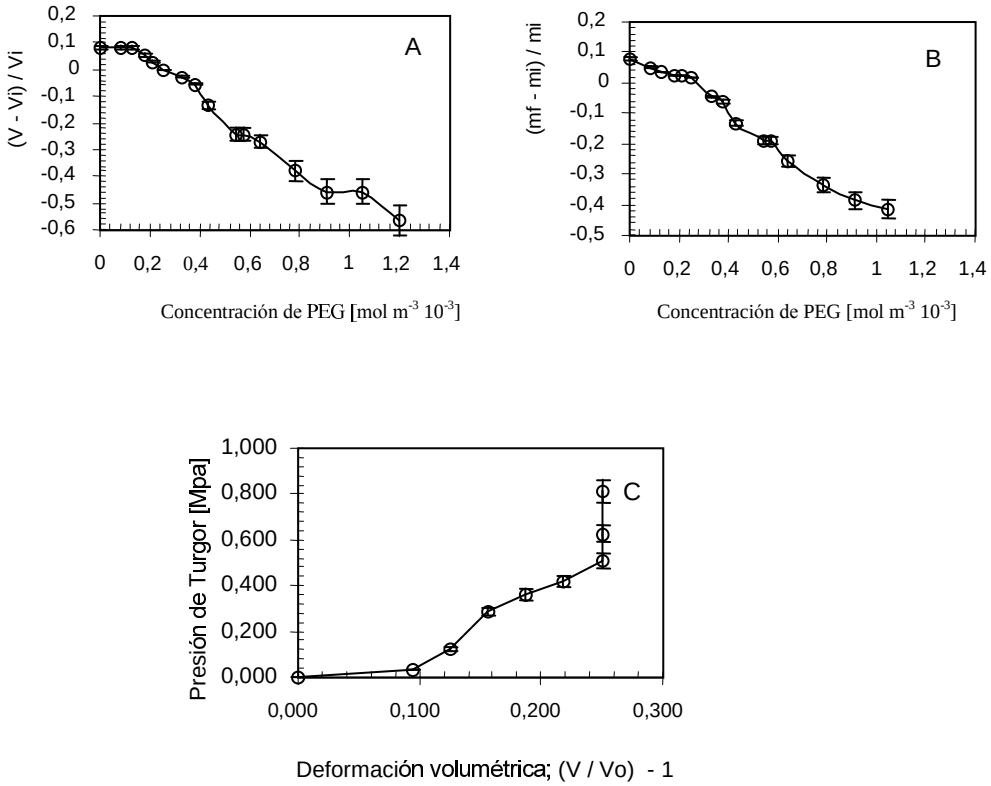


Figura 1. Cambio relativo del volumen (A) y pérdida de peso (B) del tejido de los cilindros del mesocarpio de la calabacita en función de la concentración de polietilenglicol 400 (PEG) luego del equilibrio durante 36 h a 12ºC. Presión de turgor del tejido (C) con $[(V/V_O) - 1]$, donde V_O, volumen de los cilindros de tejido en la plasmólisis incipiente y V es el volumen del tejido a una dada concentración de PEG.

Tabla 1. Parámetros reológicos [a] obtenidos a partir de ensayos con grandes deformaciones de compresión[b] y relajación[c] y de ensayos dinámicos[d] para el tejidos de calabacita equilibrado en soluciones de polietilenglicol 400 (PEG).

PEG[e] (mol m^{-3})	Presión de tugor[f] (MPa)	Firmeza[b] x 10^{-3} (N/m)	F_1[c]	τ_1[c] (s)	F_2[c]	τ_2[c] (s)	F_∞[c]	G^{*l} (MPa)	tan δ[d]
Fresco	0,267	300 ± 20	0,10 ± 0,01	195 ± 36	0,11 ± 0,01	13 ± 4	0,78 ± 0,02	1,49 ± 0,23	0,080 ±
0	NC	312 ± 23	0,093 ± 0,006	200 ± 8	0,10 ± 0,01	9 ± 1	0,789 ± 0,007	1,50 ± 0,20	0,07±0,02
80	NC	314 ± 19	0,09 ± 0,03	209 ± 53	0,12 ± 0,06	14 ± 6	0,77 ± 0,09	2,01 ± 0,28	0,070±0,008
130	0,487	322 ± 58	0,123 ± 0,007	215 ± 20	0,12 ± 0,01	12 ± 3	0,74 ± 0,02	ND	ND
180	0,400	342 ± 59	0,12 ± 0,03	239 ± 53	0,11 ± 0,01	11 ± 3	0,76 ± 0,04	1,66 ± 0,36	0,080±0,004
210	0,339	352 ± 20	0,13 ± 0,03	242 ± 2	0,10 ± 0,02	11 ± 7	0,771 ± 0,006	1,86 ± 0,56	0,07±0,02
250	0,267 [g]	298 ± 22	0,15 ± 0,02	266 ± 38	0,18 ± 0,02	15 ± 2	0,65 ± 0,04	1,74 ± 0,41	0,072±0,005
330	0,101	186 ± 29	0,28 ± 0,02	171 ± 10	0,41 ± 0,07	12 ± 2	0,3 ± 0,1	0,51 ± 0,02	0,093±0,005
380	0,008 [h]	167 ± 25	ND	ND	ND	ND	ND	0,42 ± 0,08	0,094±0,005
430		153 ± 10	0,23 ± 0,04	106 ± 14	0,712 ± 0,003	10 ± 2	0,08 ± 0,02	0,35 ± 0,09	0,102±0,005
540		149 ± 14	0,18 ± 0,04	98 ± 11	0,73 ± 0,09	6,3 ± 0,9	0,08 ± 0,02	0,40 ± 0,08	0,097±0,006
570		148 ± 6	0,22 ± 0,04	114 ± 17	0,66 ± 0,06	10 ± 5	0,08 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,10±0,02
640		138 ± 28						0,24 ± 0,05	0,121±0,007
780		154 ± 21						0,22 ± 0,04	0,14±0,04
910		154 ± 19						0,26 ± 0,08	0,145±0,002
1050		173 ± 5						0,17 ± 0,03	0,144±0,006
1200		182 ± 31						0,21 ± 0,01	0,145±0,005

[a] Promedios y desvíos estándard para n = 6 ($p < 0,05$).
[e] Concentración de soluciones de polietilenglicol 400 (PEG).
[f] Presión de Turgor calculada como se indicó previamente (Sajnin *et al, 1999)*.
[g] Isotonicidad.
[h] Plasmólisis Incipiente.
ND, "No determinado": las muestras no fueron ensayadas; NC, no calculado.

I-3-2-Comportamiento reológico del tejido de la calabacita

I-3-2-1-Fuerza-deformación

Como se indica en la Figura 2, se observaron picos de fractura en las curvas de Fuerza-deformación de la calabacita equilibrada en las diferentes soluciones ensayadas (0 mol m^{-3}-1200 mol m^{-3} de concentraciones de PEG). La presencia de picos de fractura indicaría que la PC se mantuvo íntegra a pesar del diferente grado de estiramiento provocado por la presión del contenido celular o de la presión hidrostática que la MC y el tonoplasto ejercen sobre la PC (Stadelmann, 1966; Pitt, 1982). De acuerdo a diferentes autores (Pitt, 1982; Sajnín y col., 2003), la existencia de fuerzas de fractura en las curvas de compresión del tejido revelan que la laminilla media (LM) es más resistente que la pared celular (PC), hecho que evita que las células se despeguen bajo la compresión.

La integridad de la PC y de la MC fue confirmada además por la microscopia óptica (Figura 3) y de transmisión electrónica (Figura 4) para tejido de calabacita equilibrado con PEG en concentraciones de 80 mol m^{-3} (Fig.4a y 5a) y 380 mol m^{-3} (Fig. 3c y 4c). Se puede ver en las Figuras 3a y 4a que la vacuola tiene un volumen especialmente grande debido a la máxima ganancia de agua, empujando al citoplasma y sus organelas contra la MB y PC cuando el tejido se equilibró en solución hipotónica. La retracción de la membrana celular respecto de la PC, llevándose al citoplasma con sus organelas a ubicarse alrededor de la vacuola centrada en el interior de la célula, se puede observar claramente en el tejido plasmolizado (Fig.3c). La microscopía TEM muestra la LM con una baja densidad electrónica para el tejido de calabacita equilibrado (Fig. 4a, c) y fresco (Fig. 4b), como así también una densidad electrónica regular para la PC en todos los casos.

La firmeza en el momento de la fractura se calculó para el tejido equilibrado con todas las diferentes soluciones ensayadas y se muestra en la Tabla 1. No hubo diferencias entre la firmeza del tejido de calabacita fresco (sin inmersión) y el equilibrado isotónicamente. En consecuencia, no habría daño tisular debido a la inmersión. Las muestras de tejido equilibradas con concentraciones de PEG mayores a 250 mol m^{-3} mostraron los valores más bajos de firmeza y aquellos equilibrados en el intervalo de concentraciones de PEG de 0-210mol m^{-3}, generalmente mostraron los valores más altos. A partir de estos resultados se podría decir que existe una relación entre la presión de turgor y la firmeza.

Como se puede ver en la Figura 2, se registró la misma forma de curva de fuerza-deformación para el tejido fresco, isotónico, y para el equilibrado en 0 mol m^{-3} de PEG, pero el tejido plasmolizado mostró una deformación más alta en la fractura inicial con un valor constante de fuerza de fractura (≈ 400 N). El valor de firmeza calculado para el tejido plasmolizado estuvo por debajo de ≈ 155 N/m debido al retraso inicial observado durante el incremento de la fuerza de compresión. Probablemente se hayan desarrollado espacios “vacíos” (sin contención mecánica) en la célula luego que la MC se retrajo de la PC debido a la pérdida de agua durante la plasmólisis, determinando un incremento inicial de la deformación, acompañado por valores de fuerza insignificantes durante la compresión. Como consecuencia, el tejido plasmolizado mostró un

comportamiento más plástico, con el característico pie inicial (Fig. 2D). Finalmente, la fuerza aumentó rápidamente mientras tuvo lugar la compresión de las PCs presentes hasta alcanzar su fractura final a altos valores de fuerza y deformación.

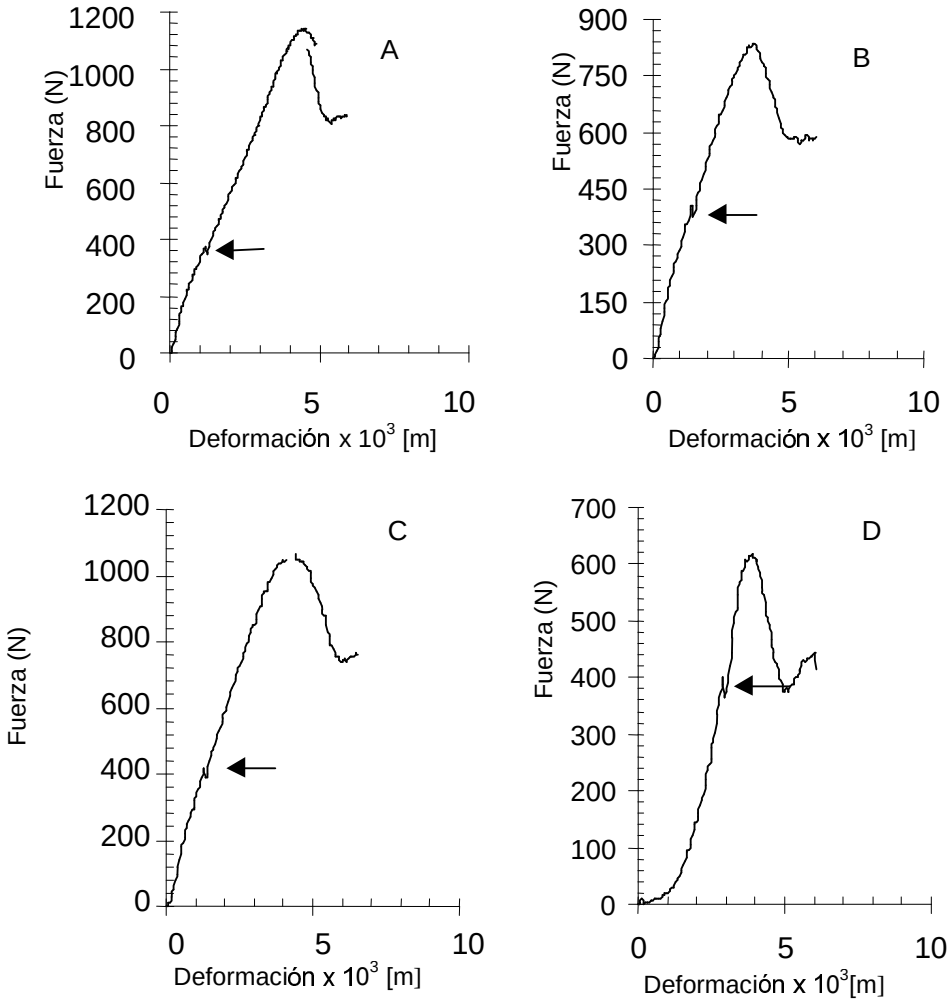


Figura 2. Curvas obtenidas luego de la compresión uniaxial (5 mm/min.) de los tejidos de calabacita fresco (A), isotónico (B), hinchado (C) y plasmolizado (D). Las flechas indican el punto de la fractura tisular.

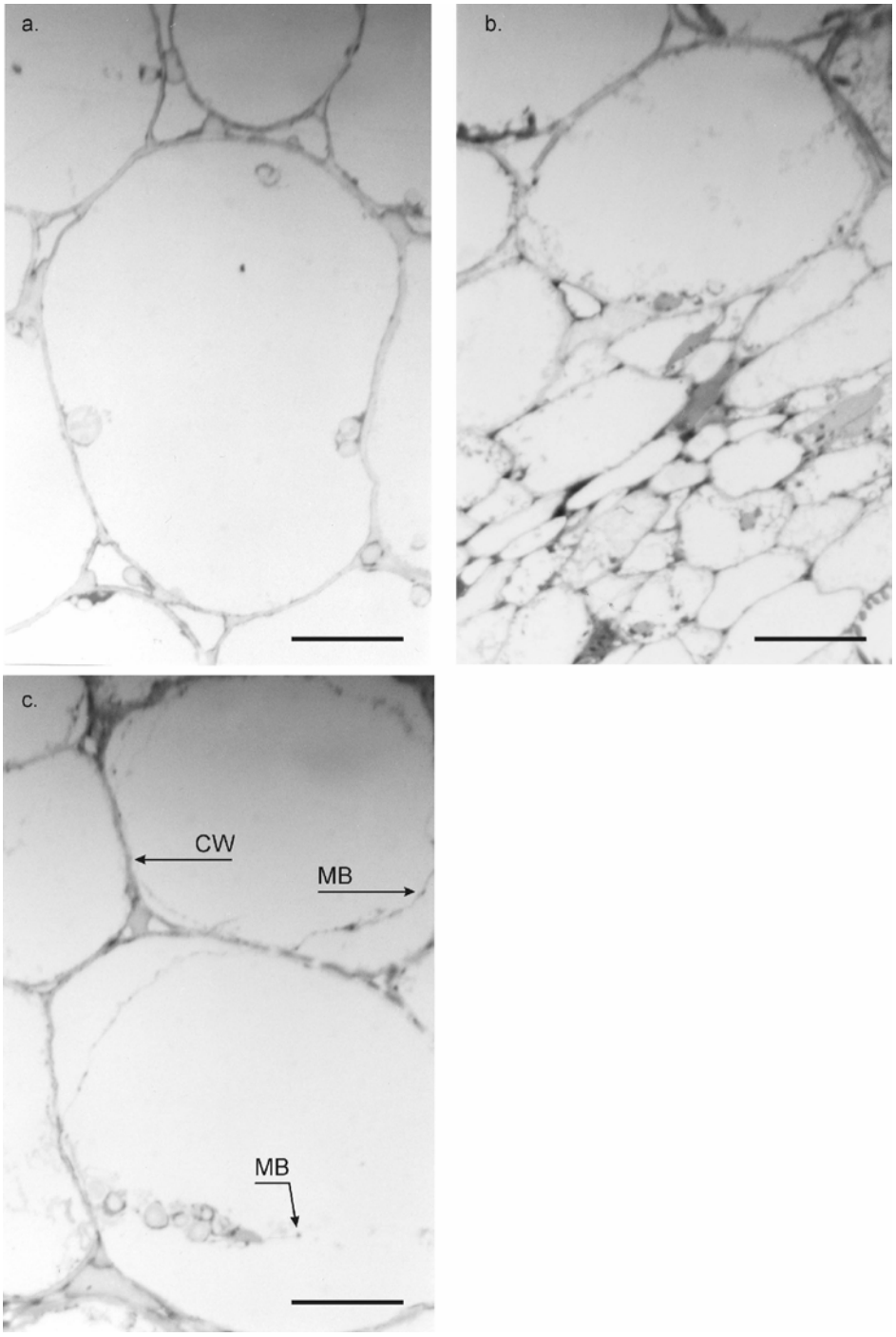


Figura 3: Observación al microscopio óptico del tejido del mesocarpio de la calabacita luego del equilibrio en soluciones de 80 mol m^{-3}(a) y 380 mol m^{-3} (c) de PEG 400. Los tejidos equilibrados se pueden comparar con el tejido fresco (sin inmersión) (b).

Barra = 100 μm.

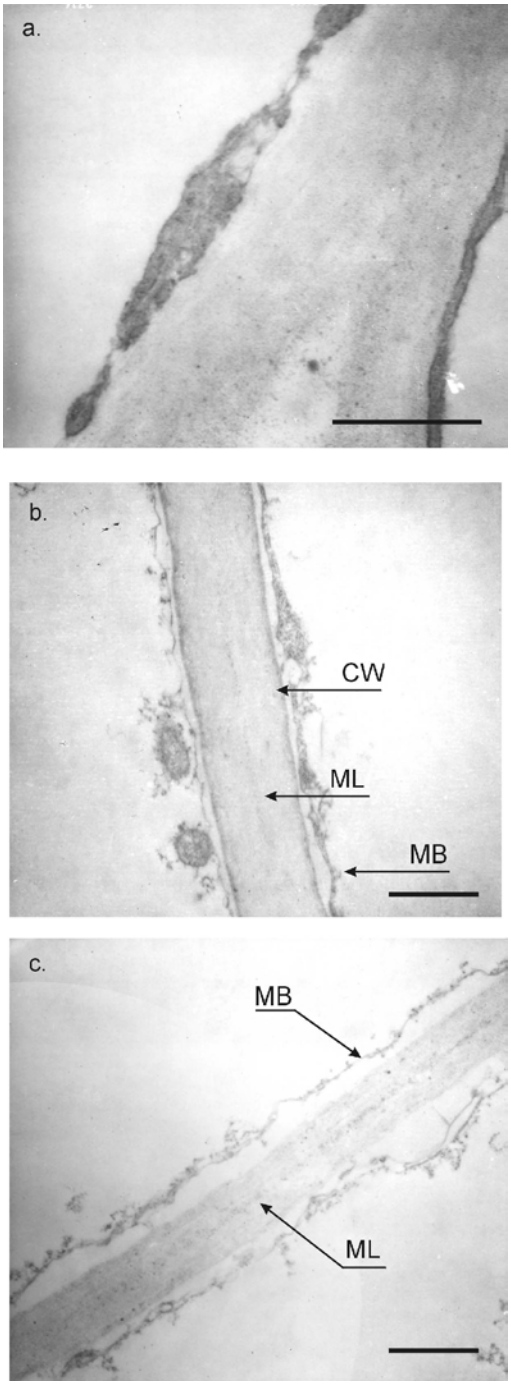


Figura 4: Microscopía de Transmisión Electrónica del tejido del mesocarpio de la calabacita luego del equilibrio en soluciones de PEG 400 de 80 mol m^{-3} (a) y 380 mol m^{-3} (c). Los tejidos equilibrados se pueden comparar con un tejido fresco (sin inmersión) (b). Barra = 1μm.

I-3-2-2-Relajación

El ensayo de relajación permitió evaluar la respuesta mecánica del tejido luego de una compresión inicial a un valor de deformación constante, sin provocar daños estructurales a nivel macroscópico (Peleg y Calzada, 1976). Se registró la fuerza de relajación, en función del tiempo, en general a una deformación constante del 14%. Para el tejido plasmolizado se tuvo que aplicar una deformación constante mayor (25%) a fin de obtener fuerzas detectables, como consecuencia del daño sufrido por el tejido durante el equilibrio con las soluciones de PEG. La relajación es un ensayo que, como fuera mencionado, se llevó a cabo fuera del rango de viscoelasticidad lineal por usarse una prensa Instron y, en consecuencia, la magnitud de los parámetros de relajación dependieron de la historia previa de deformación del espécimen y de la magnitud de la deformación constante aplicada (Ferry, 1980). Con el objeto de poder comparar los resultados obtenidos, se normalizaron las fuerzas observadas. Las variaciones de la fuerza con el tiempo se pudieron ajustar significativamente ($p<0,05$) al modelo generalizado de Maxwell (dos elementos de Maxwell y un resorte aislado) y se obtuvieron los parámetros normalizados de relajación: la fuerza residual de relajación después de un tiempo infinito (F_∞), las fuerzas pre-exponenciales (F_i) correspondientes a la relajación de cada cuerpo *viscoelástico* de Maxwell y los tiempos de relajación característicos (τ_i) de ellos (Tabla 1). El primero de estos parámetros, F_∞, describe la relajación del resorte aislado que se halla conectado en paralelo a los cuerpos de Maxwell en el esquema mecánico del sistema bajo estudio y representa el comportamiento sólido. Como se puede ver en la Tabla 1, los valores más altos de F_∞ estuvieron asociados a los tejidos con una importante turgencia o presión de turgor (rango de concentraciones de PEG entre 0-250 mol m^{-3}), y este parámetro representó el 78,9-65% del total de la fuerza relajada. La fuerza restante (19-24%), para el tejido de calabacita con presión de turgor alta e incluyendo al isotónico, representa las componentes *visco elásticas* o cuerpos de Maxwell.

La respuesta elástica de los tejidos vegetales se ha atribuido tradicionalmente a la celulosa, macromolécula que provee al tejido de alta resistencia a la tensión y que tiene características cristalinas que confieren a las células individuales de gran rigidez y resistencia al desgarro y/o ruptura

(Jackman y Stanley, 1995). El comportamiento elástico (valor de F_∞) del tejido de la calabacita es la manifestación de la contribución sólida del estiramiento que la PC desarrolla bajo la tensión ejercida por la presión hidrostática del contenido de la célula. Las fuerzas residuales de relajación (F_∞) mostraron, en general, una tendencia similar a la observada para la firmeza: altos valores para tejidos equilibrados en condiciones hipotónicas y valores más bajos, cerca de la plasmólisis incipiente.

Para el tejido equilibrado a concentraciones de PEG más altas que aquéllas correspondientes a la isotonicidad, el comportamiento mecánico se debe atribuir a las componentes visco-elásticas, mostrando los valores más altos de *Fi* (40-70% del total de la fuerza relajada) asociado al cuerpo de Maxwell que muestra los tiempos de relajación más bajos (τ_2). La necesidad de dos elementos visco-elásticos sugiere la contribución de diferentes elementos estructurales. Sakurai y Nevins (1993), en sus estudios de relajación del estrés, atribuyeron las propiedades de viscoelasticidad del tejido de tomate, principalmente, a los polímeros de poliurónidos y celulosa. Los tiempos de retardo más cortos reflejan una menor estabilidad de los elementos estructurales o bien la mayor velocidad de relajación que muestran los biopolímeros asociados a ellos, a los cuales se pueden atribuir estas propiedades visco-elásticas. Los poliurónidos de la laminilla media amorfa son flexibles, altamente plásticos y facilitan rápidamente la transmisión de los esfuerzos tangenciales en contraste con la hemicelulosa que está considerada como una macromolécula relativamente estable que tiene una interacción importante con las microfibrillas de celulosa (Jackman y Stanley, 1995). De esta manera, los elementos viscoelásticos 1 y 2 deben reflejar las propiedades de relajación de las hemicelulosas y poliurónidos, respectivamente.

El valor de F_∞ del tejido fresco (sin inmersión) fue mayor que el del tejido equilibrado isotónicamente el que también mostró valores más altos de *Fi*. De modo que la inmersión *per se* produjo, efectivamente, daño tisular que afectó la estructura relacionada al resorte aislado, F_∞ (Tabla 1). Este efecto no se detectó a través del parámetro de firmeza, como se estableció previamente. La firmeza del tejido, calculada a partir de la fuerza de fractura, da diferente información en relación al comportamiento textural, probablemente porque involucra la ocurrencia de daño tisular bajo compresión. La firmeza estaría más

bien asociada a la resistencia del material bajo una carga de compresión, como la que se ejerce cuando el tejido vegetal se comprime en la boca, entre los molares.

I-3-2-3-Ensayos dinámicos

También se evaluó el comportamiento reológico del tejido de la calabacita mediante estudios estructurales o "at-rest" (sin alteración) usando un reómetro que aplica esfuerzos y deformaciones en modo cizalla dentro del rango de viscoelasticidad lineal (LVR). Se realizó el ensayo a una deformación constante de 0,01%. De esta manera, los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') medidos proveen información fundamental: ellos sólo dependen del material y se relacionan con su estructura, trabajando bajo condiciones de un tejido sin fractura. Se determinó que el tejido de calabaza se comportaba predominantemente como un sólido porque los módulos de almacenamiento (G') estaban por encima de los módulos de pérdida (G'') en por lo menos un ciclo log y ambos fueron independientes de la frecuencia, en el rango de 0,1-10 Hz, dentro del LVR. Una tendencia similar fue observada por Gerschenson y col. (2001) para el tejido de kiwi.

Comparando valores de $tan\ \delta$ (G''/G') informados en la Tabla 1, observamos que el tejido equilibrado con soluciones en el rango de 0-250 mol m^{-3} de PEG, como así también el tejido fresco, mostraron un comportamiento predominantemente sólido o elástico ($tan\ \delta \approx 0{,}070$) mientras que el tejido equilibrado con soluciones hipertónicas presentó, en general, una elasticidad significantemente menor (o un comportamiento viscoso mayor), estando la $tan\ \delta$ en el rango 0,1-0,145. Esto significa que se observó una reducción en la relación G''/G'para el tejido equilibrado en soluciones de PEG más concentradas que las correspondientes a la isotonicidad. La tan δ indicó el cambio del comportamiento mecánico de la PC-LM. Las observaciones realizadas a través de microscopia óptica LM (Figura 3c) y TEM (Figura 4c) de los tejidos equilibrados en solución conteniendo 380 mol m^{-3} de PEG permitieron observar la plasmólisis: se pudo observar separación de MC o retracción desde la PC. Se pudo detectar la plasmólisis incipiente, en este ensayo, por un cambio en la pendiente del módulo de almacenamiento en

función de la concentración de PEG para los tejidos equilibrados a partir de 380 mol m-3 de PEG (Figura 5).

Los parámetros dinámicos y los parámetros normalizados obtenidos luego de modelar la relajación mostraron una tendencia similar en relación a la presión de turgor (Tabla 1) para los tejidos estudiados. Se obtuvo una correlación significativa para F_∞ y G' o $tan\ \delta$: F_∞ y G' mostraron un coeficiente de correlación (r^2) de 0.93 (nivel de significación de 0,00001) y un F de Fisher de 114 (ANOVA de la regresión lineal; n=11 tratamientos). F_∞ y $tan\ \delta$ mostraron un r^2 de 0,93 y un F de 116 (n=11). Esta correlación muestra que la información provista por los parámetros de relajación se relaciona con la provista por estudios dinámicos. De cualquier modo, se debe recordar que la fuerza residual de relajación depende de la historia de deformación experimentada por la muestra de tejido y, en consecuencia, no provee información fundamental como los ensayos dinámicos. Rojas y col. (2002), estudiaron el comportamiento reológico del kiwi (*Actinidia deliciosa*, A. Chev.) y observaron que los esfuerzos de relajación inicial y residual determinados bajo una deformación constante del 14% correlacionaban significativamente con el módulo complejo (G*). También establecieron que la firmeza no correlacionaba con el G* debido a que la evaluación de la fuerza de fractura requiere de la ocurrencia de daño tisular. Como se puede ver en la Tabla 1, el resorte aislado representado por el valor de F_∞ está fuertemente asociado con la existencia de presión de turgor en las muestras de tejido estudiadas. Como se sabe, cuando el tejido está plasmolizado, pierde su presión de turgor. En consecuencia, el valor de G', F_∞ y firmeza determinado para el tejido plasmolizado sólo puede ser atribuido a la contribución de la unidad mecánica PC+LM. En la Tabla 2, los valores de estos parámetros obtenidos para tejidos equilibrados en 380-910 mol m^{-3} de concentración de PEG se promediaron e informaron como contribución de (PC+LM) al comportamiento reológico. Para el mesocarpio del tejido fresco, la firmeza (300000 N/m) se pudo descomponer en dos contribuciones: una de la PC+LM (152000 N/m) y la otra la presión de turgor (148000 N/m). Un cálculo similar permitió obtener la contribución del turgor al F_∞ y al G'. Se pudo establecer que el 79% de G', 100% de F_∞ y 50% de la firmeza pueden atribuirse a las manifestaciones de la presión de turgor en el tejido de calabacita fresco.

Rojas y col., (2001, 2002), estudiaron la contribución relativa de la presión de turgor, PC y LM a la reología del kiwi (*Actinidia deliciosa*, A. Chev.) utilizando ensayos de grandes deformaciones y ensayos dinámicos; observaron que la contribución relativa de la presión de turgor a los esfuerzos de relajación fue ≈ 75 a 69% y la contribución al modulo dinámico fue ≈ 67% ó 48% para el tejido inmaduro y maduro, respectivamente.

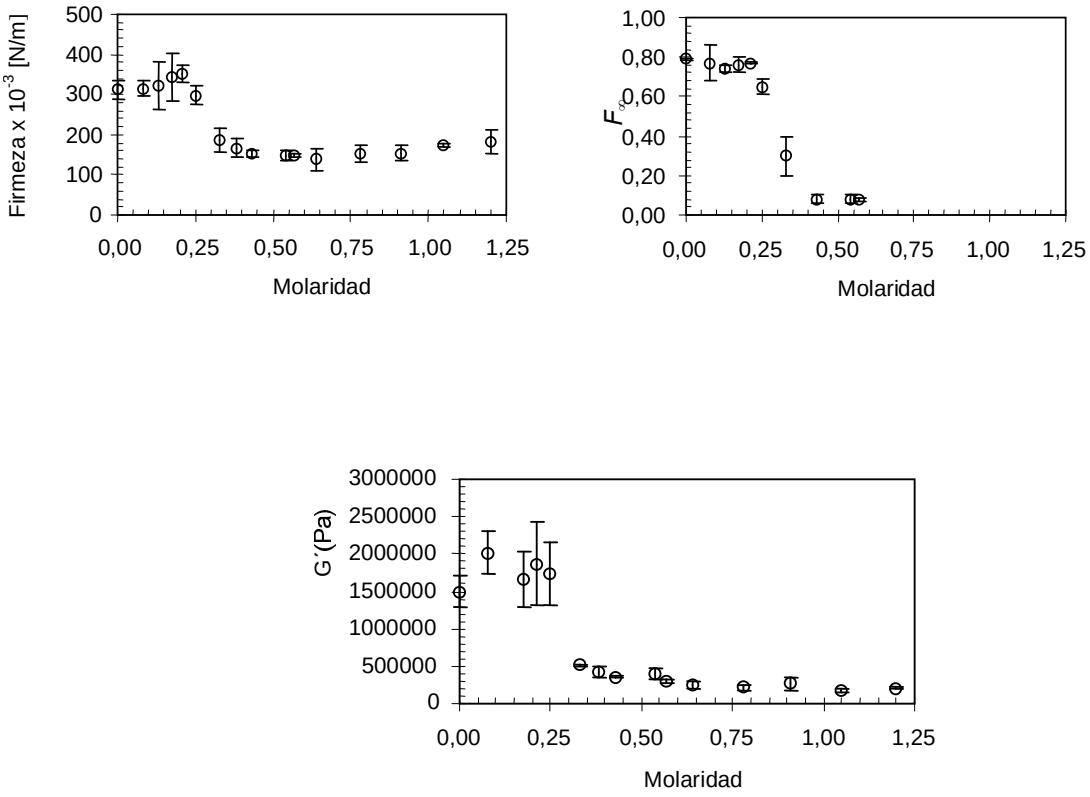


Figure 5. Firmeza, fuerza de relajación a tiempo infinito (F_∞) y modulo de almacenamiento (G') en función de concentraciones de polyethylene glycol 400 (PEG) para los tejidos de calabacita equilibrados.

Tabla 2. Contribución de los componentes estructurales del tejido a los parámetros reológicos del mesocarpio del tejido de la calabacita. [a]

	Firmeza x 10^{-3} (N/m)	F_∞ [b]	G' [c] (MPa)
Mesocarpio del tejido fresco	300 ± 20	0,78 ± 0,02	1,49 ± 0,23
Pared Celular + laminilla media[d]	152[e]	0,00	0,31[e]
Efecto del Turgor	148	0,78	1,17

[a] Los valores representan los promedios y desvíos standard ($p < 0,05$) de n = 6 muestras.
[b] Fuerza normalizada a tiempo infinito de relajación (F_∞) determinada al 14% de deformación constante.
[c] Módulo de almacenamiento (0,01%, deformación constante).
[d] Corresponde a la plasmólisis incipiente (presión de turgor del tejido = 0).
[e] Corresponde a la firmeza o módulo de almacenamiento calculado como el promedio de los correspondientes valores texturales obtenidos para los tejidos equilibrados en el rango de concentraciones de 380-910 PEG.

I-3-3-Análisis enzimático

Se estudió la actividad de las enzimas relacionadas a la pared celular en las muestras de tejido sometidas a estrés osmótico. La enzima PME remueve los grupos metilo que esterifican al carbonilo generándose bloques de residuos de galacturonato ionizado en las cadenas de pectina. Estos bloques acídicos están involucrados en la formación de zonas de unión puente Ca entre los polímeros (Fry, 1986; Carpita y Gibeaut, 1993). Esta enzima se detectó solamente en el tejido de calabacita fresco, sin inmersión (Tabla 3).

La enzima PG exhibe una alta afinidad por las moléculas largas, a las cuales corta rápidamente, produciendo hidrólisis específica de las uniones terminales. Se ha informado que la PG aumenta en grado importante su actividad en el tejido del melón (*Cucumis melo*, L.) como respuesta al estrés del tejido (Sajnín y col., 2003). Actividades de PG similares se detectaron en los tejidos de calabacita frescos y equilibrados con 0,00 PEG pero una reducción significativa se observó para los tejidos isotónicos y plasmolizados (Tabla 3). Consecuentemente, no se encontró activación o *de novo* síntesis de la PME y la PG luego de 36 horas de inmersión del tejido a 12ºC y, en general, se observó una tendencia a la reducción de la actividad de PME y la PG con la inmersión y/o cambio de la presión de turgor.

La POX total se incrementó al doble luego de la inmersión del tejido de calabacita. Probablemente, el equilibrar las muestras de tejido cortado en solución de buffer con PEG promueve cambios en las células y/o en la estructura de PC-LM relacionados al incremento de la POX. Sin bien la actividad total de POX no difirió entre los diferentes tejidos tratados, se encontraron importantes diferencias cuando se distinguió entre fracción de POX soluble y fracción de POX iónicamente unida. Se sabe que las formas solubles son citoplásmicas y están involucradas en el control metabólico de la maduración y senescencia de las frutas mientras que la POX iónicamente unida se encuentra, generalmente, en la PC y LM (Ingham y col., 1998; Lichtenthaler y Schweiger, 1998). Cuando la presión de turgor determinó un máximo estiramiento (turgor ≥0,487 MPa) como ocurre en el tejido equilibrado con 0,00 M de PEG, la POX iónicamente unida mostró la actividad más alta (Tabla 3). La POX estuvo probablemente catalizando reacciones específicas en la PC-LM relacionadas al estiramiento de la PC. La POX puede producir entrecruzamientos de compuestos fenólicos (lignificación) o entrecruzamiento con glicoproteínas de pared ricas en hidroxiprolina (HRGPs). En este tejido no se encontró lignina al observarse las láminas de tejido teñidas con floroglucinol a través de un microscopio óptico (resultados no mostrados). Tampoco detectamos ácido ferúlico (compuestos fenólicos) en este tejido cuando se lo observó al microscopio por medio de una fluorescencia ácido-básica (Martin-Cabrejas y col., 1994). Resultados similares fueron obtenidos por Lichtenthaler y Schweiger (1989). Como fue sugerido en el caso de la pared celular del tejido de la manzana (Ingham y col., 1998; Lichtenthaler y Schweiger, 1998), la localización de la POX iónicamente unida probablemente refleje otros roles mas allá de la lignificación. Se cree que la POX actuaría produciendo entrecruzamiento de la extensina, una HRGPs localizada en la pared celular del tejido vegetal, en este caso, de la calabacita madura. La extensina usualmente se relaciona con las cadenas de homogalacturonanos de las pectinas mediante uniones iónicas distintas de los puentes Ca o desarrolla entrelazamientos de pectinas-en-extensina que involucra cadenas de ramnogalacturonanos, RGI (Fry, 1986). Esta proteína aparece entrelazada en la matriz celulosa-xiloglucanos, reemplazando en parte la función de los xiloglucanos en la maduración, cuando las células han finalizado el crecimiento y no hay más necesidad de una elongación continúa de la PC. La

formación de la red de extensina mediante un entrecruzamiento oxidativo también se ha reportado como ocurriendo en respuesta al daño del tejido, proveyendo a la PC de una estructura fuerte (Iraki y col., 1989). Bradley y col. (1992) informaron que este entrecruzamiento oxidativo de la extensina comienza pocos minutos después del estrés del tejido vegetal. En consecuencia, el incremento de la POX iónicamente unida podría también reflejar, en nuestro caso, la respuesta del tejido equilibrado al estrés impuesto por el corte y la inmersión.

Como se puede ver en la Tabla 3, la POX iónicamente unida y la POX soluble mostraron un incremento de la actividad con respecto al tejido fresco para las muestras equilibradas en una solución isotónica. En el tejido plasmolizado, la vacuola y todo el protoplasto se han retraído debido a la pérdida de agua, y el incremento de la actividad de la POX ocurrió solamente a expensas de la fracción soluble. El incremento de las fracciones solubles en los tejidos equilibrados isotónicamente y plasmolizados con respecto al tejido fresco puede ser un indicador bioquímico de la alteración metabólica debido al corte e inmersión del tejido como así también a la plasmólisis, cuando corresponda. No se observó este incremento en los tejidos hinchados; probablemente en este caso, el exceso de POX sintetizada en el citoplasma fue llevado a la pared celular para ayudar al estiramiento.

Se puede decir que, en general, equilibrar los cilindros cortados de calabacita en soluciones de PEG produjo un incremento total en la POX. Ésta es una respuesta metabólica al estrés del tejido que incrementa la fracción de POX iónicamente unida para los tejidos isotónico e hinchados. Como se determinó previamente a través de los ensayos texturales, la pared celular del tejido de calabacita presentó una gran resistencia que evitó la plasmoptisis (o estallido de la célula) cuando el tejido estaba equilibrado en soluciones de buffer sin PEG. La resistencia del tejido de la calabacita al estallido se puede atribuir al desarrollo de entrecruzamientos oxidativos de la extensina catalizados por POX como respuesta del tejido al estrés luego del corte y la inmersión, además de la resistencia natural que ofrece la matriz de celulosa.

Tabla 3. Actividades[a] de Pectinmetilesterasa (PME), poligalacturonasa (PG) y peroxidasa (POX) en el tejido fresco o en el tejido equilibrado en soluciones de polietilenglicol 400 (PEG).

PEG concentración (mol m^{-3})	Turgor[b] x 10^{-3} (Pa)	PME[c] x 10^{2} UAb min^{-1} mg^{-1}	PG[d] x 10^{2} mg GalA mg^{-1}	POX[e] (UAb min^{-1} mg^{-1})		
				Soluble	Iónicamente unida	Total
Tejido fresco (sin inmersión)	267	4,69 ± 0.30	1,4 ± 0,1	7,0 ± 0,8	9,4 ± 0,7	16,0 ± 1,0
0,00 (Tejido hinchado)	> 487	ND	1,5 ± 0,1	7,8 ± 0,7	20,0 ± 0,2	28,0 ± 2,0
250 (Tejido isotónico)	267	ND	0,6 ± 0,0	15,9 ± 0,9	16,0 ± 1,0	32,0 ± 3,0
1050 (Tejido plasmolizado)	< 0	ND	0,5 ± 0,0	18,5 ± 0,8	10,6 ± 0,9	29,0 ± 2,0

[a]Promedios y desvíos standard; (n = 6).
ND: no detectable.
[b]Presión de Turgor calculada como se describe en Métodos.
[c]UAb min^{-1} mg^{-1}: Unidades de Absorbancia a 620 nm por minuto y por mg de BSA; BSA, albúmina de suero bovino.
[d]mg GalA mg^{-1}: mg de ácido galacturónico producido luego de 2 h de incubación a 37ºC, por mg de BSA.
[e]UAb min^{-1} mg^{-1}: Unidades de Absorbancia a 470 nm por minuto y por mg de BSA.

I-3-4-Análisis químico de las paredes celulares

I-3-4-1-Residuo Insoluble en Alcohol (AIR)

Como se observa en la Tabla 4, alrededor de 67-80% (670-800 μg/mg) del AIR obtenido estaba compuesto de carbohidratos no celulósicos como se puede observar bajo el título "Hidratos de Carbono Totales". El 30-33% restante estuvo constituido por material celulósico y proteínas. Se ha reportado que la parte comestible de la calabacita tiene 0,3% (p/p) de almidón y 95% (p/p) de agua (McCance y Widdowson, 1991). Considerando que el material de la pared celular (PCM) contenida en el AIR equivale al contenido de sólidos (5% p/p), el máximo contenido de almidón esperado en el AIR debería ser de 6%. De cualquier modo, se obtuvo 13-24% de glucosa no celulósica (Tabla 4). Probablemente otros insolubles en alcohol como las glicoproteínas, además del almidón residual, contribuyeron al alto valor de glucosa obtenida. Se puede observar también que, alrededor de 8-18,5% de los AIRs disueltos en ácido sulfúrico 1M (100ºC-1h), comprendía ácido galacturónico proveniente de los polisacáridos pécticos.

Cuando los AIRs se sometieron a una hidrólisis con solución 2 M-TFA, sólo el 13-23% permaneció insoluble (Tabla 5). Este residuo estuvo constituído

casi totalmente por glucosa (≈ 95%) de la celulosa, con sólo muy bajo contenido de manosa, galactosa y xilosa, como se determinó luego de una completa disolución del residuo en 100%-TFA (40ºC-1h). El análisis de los azúcares neutros en la fracción soluble (77-87%) obtenida del AIR del tejido fresco de la calabacita luego del tratamiento con 2 M-TFA, mostró que estaba constituído predominantemente por glucosa, arabinosa, galactosa, ramnosa y xilosa (Tabla 5).

Luego de la inmersión en solución de PEG, se afectó principalmente el contenido de arabinosa: su valor original en el fresco disminuyó 30-45% para los tejidos hinchados e isotónico, respectivamente, y 70% para el tejido plasmolizado (o PC sin estiramiento). Sin embargo, los niveles de galactosa, ramnosa y xilosa disminuyeron sólo para los tejidos plasmolizados (≈ 36%). Las cadenas cortas de arabinosa, combinadas con el monómero de ramnosa, constituyen las ramificaciones del polímero ramnogalacturonano I (RG I). Cadenas laterales de tres residuos de galactosa se pueden encontrar también combinadas con ramnosa, pero con menos frecuencia (Brett y Waldron, 1996; Fry, 1986). Estas ramificaciones de galactosa se pueden unir a las ramificaciones de arabinosa pertenecientes a otro polímero ramnogalacturonano a través de una unión pectina-pectina. Los entrecruzamientos pectina-en-extensina involucran zonas sin ramificaciones (o lineales) de cadenas de polímeros de ramnogalacturonanos. Por lo tanto, una pérdida de arabinosa de 30-45% en los tejidos equilibrados hinchados e isotónico puede haber ocurrido para evitar el impedimento espacial que ocasionarían las cadenas laterales de arabinosa, facilitando en consecuencia, la formación de redes o matrices con RGI durante el entrecruzamiento oxidativo con las subunidades de extensina (Ng y Waldron, 1997). Esta explicación es coherente con el incremento de la POX iónicamente unida para los tejidos equilibrados hinchados e isotónico.

Además de las pérdidas de arabinosa y galactosa, debió ocurrir una degradación de los polímeros de RG I en los tejidos plasmolizados, como se puede concluir de la reducción de los contenidos de ramnosa (Tabla 5) y de ácido galacturónico (Tabla 4) de estos tejidos cuando se los compara con el tejido fresco.

Una importante pérdida de xilosa también ocurrió en el AIR del tejido plasmolizado (Tabla 5). Esto se puede atribuir a la degradación de los

xiloglucanos y/o arabinoxilanos que pudo haber ocurrido luego de la pérdida del estiramiento de la PC en los tejidos plasmolizados. Se puede concluir, entonces, que la composición de la PC en la calabacita depende y se ve afectada por el grado de estiramiento de la PC y, por lo tanto, por la presión de turgor de los tejidos estresados osmóticamente (Carpita y Gibeaut, 1993).

I-3-4-2-Fracciones extractables

Para clarificar las características del tejido de la calabacita como así también el efecto del stress osmótico sobre la composición química en polisacáridos de PC-LM, se llevaron a cabo extracciones secuenciales con agua, NaCl y CDTA. Las extracciones de los AIRs se realizaron de acuerdo al procedimiento de Ng y Waldron (1997) para minimizar la degradación β-eliminativa de los polímeros pécticos.

La ausencia de compuestos fenólicos y uniones de puentes calcio junto con una importante proporción de polisacáridos extraíbles en agua fría en la estructura del tejido de calabacita fresco (Tabla 4), indicarían que el mismo es un tejido débil, tal como se ve habitualmente cuando es hervido en agua o agua y sal: se desintegra fácilmente.

Una importante fracción de los polisacáridos liberados por las extracciones secuenciales fue predominantemente de naturaleza péctica tal como se puede ver, en la Tabla 4, de la relación entre los contenidos de ácido galacturónico y de hidratos de carbono totales en las fracciones solubles en agua (WS) y solubles en sal (SS). Los hidratos de carbono totales recuperados de los extractos de CDTA coincidieron con la composición de ácido galacturónico de la misma fracción mostrando que sólo se recuperaron homogalacturonanos luego de la ruptura selectiva de los puentes calcio con CDTA. Estos homogalacturonanos extraídos deben pertenecer a la laminilla media, siendo de muy bajo grado de metilación (DM) (Carpita y Gibeaut, 1993; Brett y Waldron, 1996). Una gran proporción de los polímeros pécticos extraídos, constituidos por unidades de ácido galacturónico, se solubilizaron en agua fría, NaCl y CDTA como se puede observar cuando el contenido de sus fracciones se compara con el porcentaje total de ácido galacturónico en los AIRs (8-18,5%) (Tabla 4).

I-3-4-2-1-Fracción soluble en agua (WSF)

El contenido de hidratos de carbono totales en la WSF obtenida del tejido fresco, isotónico e hinchado (equilibrado en 0,00 M PEG) fue ≈ 55%, el cual fue significativamente más alto que el contenido de ácido galacturónico (12-15,7%). El análisis de los azúcares neutros en esta fracción (Tabla 5) mostró un alto contenido de glucosa (probablemente parte provenía del almidón) y niveles más bajos de arabinosa y galactosa.

La pérdida de arabinosa que fuera observada en el AIR del tejido hinchado y en el del isotónico no se reflejó en el contenido de arabinosa de las fracciones solubles en agua (WSF) respectivas y sólo lo hizo levemente, en las fracciones solubles en sal (SS) extraídas del AIR, como se observa en la (Tabla 5). Probablemente, estas pérdidas de arabinosa provengan principalmente de polímeros extraíbles en otras fracciones en las que se usan agentes que rompen uniones covalentes de PC, distintas a las que se extrajeron aquí.

Una pequeña cantidad de ramnosa, xilosa y manosa se pudo determinar en la WSF. Se debe mencionar que esta variedad de calabaza se caracteriza por su dulzor luego de la cocción en agua hirviendo. Probablemente, un polímero extraíble en agua como los ramnogalacturonanos especialmente ricos en glucosa en sus cadenas laterales, además de la arabinosa y la galactosa, se pueda hidrolizar a las altas temperaturas de cocción, produciendo su sabor particular. Este tipo de pectinas podrían también ser responsables, en parte, del alto nivel de glucosa encontrado entre los azúcares neutros de la WSF o ésta puede derivar de una importante presencia de uniones no covalentes PC-glicoproteínas de la pared celular que podrían haber sido parcialmente extraídas.

De acuerdo a los datos de las Tablas 4 y 5, en la WSF (Tabla 4), alrededor de 8,3-9,2% del contenido de hidratos de carbono totales corresponde a la suma de los azúcares neutros arabinosa y galactosa para todos los estados considerados. Por lo tanto, la relación molar de ácido galacturónico / (Ara+Gal) es 3,0:1,0-1,4:1,0, mientras que la relación molar de ácido galacturónico/rhamnosa es 30,0:1,0-15,5:1,0. Consecuentemente, hubo poca ramnosa con respecto al ácido galacturónico y, así, también poco RGI, en esta fracción. Al mismo tiempo, la relación entre Ara+Gal y rhamnosa es 13:1-11:1. Por lo tanto, los contenidos de arabinosa y galactosa mencionados pueden corresponder en parte a las regiones ramificadas del RG anexado a secuencias de

homogalacturonano altamente esterificado (grado de metilacion, DM≥60%) perteneciente, probablemente, a la laminilla media (Brett y Waldron, 1996) y a las cadenas laterales de arabinogalactanos removidas de los ramnogalacturonanos (RGs) de la PC por la técnica de aislamiento del AIR aplicada y, en consecuencia, en estado libre para ser extraídas en agua fría.

Debe tenerse en cuenta que 38,8%, 28,8%, 47,6% y 61,2% de los AIRs de los tejidos fresco, hinchado (equilibrado en 0,00 M PEG), isotónico (equilibrado en solución 250 moles m^{-3} de PEG) y plasmolizado (equilibrado en solución 1050 moles m^{-3} PEG), respectivamente, se solubilizaron en agua fría (Tabla 4). Se puede inferir entonces, comparando los porcentajes correspondientes a los tejidos con la misma presión de turgor (fresco e isotónico), que la inmersión *per se* incrementa la WSF extraída de los AIRs. Teniendo en cuenta el efecto de la inmersión en la estructura de la pared celular, el contenido de la WSF parece ser una función negativa del estiramiento de la PC, ya que el tejido plasmolizado contenía el porcentaje más alto de AIR soluble en agua (61,23%) y el tejido con máximo estiramiento de la PC, el porcentaje más bajo (28,76%).

Reológicamente los tejidos hinchados mostraron las más altas firmezas, fuerzas de relajación residual o infinitas y módulos de almacenamiento. Como se puede ver en la Figura 6, la fuerza de relajación infinita adimensionalizada (F_∞), se relaciona directamente con la presión de turgor, disminuyendo con el incremento en la proporción del AIR que fue soluble en agua.

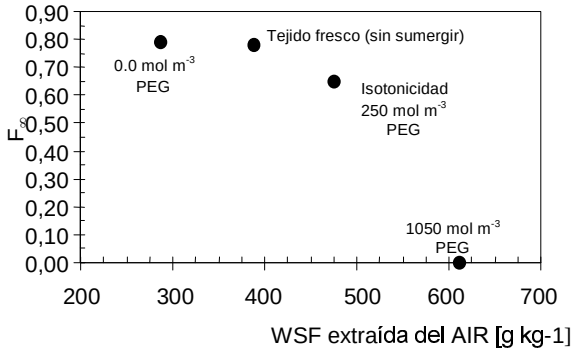


Figure 6. Fuerza de relajación residual adimensionalizada (F_∞) en función de la proporción de fracción soluble en agua (WSF) extraída del AIR del tejido de calabacita equilibrado con PEG.

I-3-4-2-2-Fracciones solubles en sal (SS) y en CDTA

Las pectinas extraíbles en sal fueron más ricas en ácido galacturónico que las pectinas solubles en agua (Tabla 4). Teniendo en cuenta la composición en azúcares neutros (Tabla 5), se puede estimar que la relación molar de ácido galacturónico a azúcares neutros que no fuesen glucosa va desde 10,8:1 hasta 4,0:1, para todos los tejidos estudiados. Una vez más, el contenido de glucosa encontrado fue el más alto entre los azúcares neutros (Tabla 5) como así también los niveles mas bajos de arabinosa y galactosa. Las pectinas extraíbles en CDTA fueron esencialmente homogalacturonanos (Tabla 4).

Como había sido reportado por Fry (1986), la solubilización de las pectinas en agua fría esta indicando poco o nada de unión a la PC y la extractabilidad en sal, indica uniones iónicas entre las pectinas aniónicas y los grupos catiónicos (aminoácidos básicos) de la extensina. Se reporta en literatura que la existencia de puentes de Ca se revela mediante el tratamiento con CDTA en frío y a pH neutro, lo que remueve selectivamente todo el Ca y sólo circunstancialmente solubiliza una proporción de las pectinas por efecto salino (Fry, 1986). Redgwell y col. (1990), informaron que el CDTA extrae polisacáridos unidos por el Ca y otras uniones iónicas y, por lo tanto, incluye a los polisacáridos pécticos de la LM. Por consiguiente, es mejor incluir una extracción previa con NaCl para evitar el aislamiento de pectinas relacionadas por uniones iónicas en la fracción de CDTA.

El DM no fue significativo para el ácido galacturónico presente en los extractos de NaCl o de CDTA (Tabla 4).

En general, la proporción de AIR solubilizada por NaCl o CDTA fue muy baja comparada con aquella extraíble en agua fría. Se obtuvo una mayor extracción (12,27%) con sal a partir del tejido equilibrado sin PEG (Tabla 4). Esto debe estar asociado con una alta densidad de uniones iónicas en las pectinas de la PC con máximo estiramiento como respuesta a la máxima turgencia. Se debe remarcar que este tejido mostró la actividad más alta de POX iónicamente unida que podría actuar produciendo uniones iónicas entre cadenas de homogalacturonanos y los aminoácidos de la extensina como respuesta a la demanda mecánica resultante del incremento de la presión de turgor (Fry, 1986).

Tabla 4. Composición de las fracciones de material de la pared celular obtenidas luego del tratamiento de etanol del tejido de calabacita (AIR) o por extracciones secuenciales de los AIRs.

Fracción	Rendimiento[a] ($g\ kg^{-1}$)	UA[b,e] ($g\ kg^{-1}$)	Methanol[b,e] ($g\ kg^{-1}$)	DM[b] ($g\ kg^{-1}$)	Glucosa[b,c,f] ($g\ kg^{-1}$)	Total HC[b,d,e] ($g\ kg^{-1}$)
WS-Fresco	**388,1**	**157 ± 1[4]**	**17,0 ± 0,9**	**720**	**38**	**520 ± 90**
WS-Isot	**475,8**	**150 ± 30**	**14,2 ± 0,4**	**630**	**43**	**580 ± 10**
WS-Hinchado	**287,6**	**124 ± 3**	**11,6 ± 0,5**	**620**	**48**	**550 ± 12**
WS-Plasm	**612,3**	**65 ± 3**	**6,26 ± 0,04**	**640**	**34**	**440 ± 20**
SS-Fresco	**44,9**	**350 ± 10**	**———**	**ND**	**tr**	**530 ± 10**
SS-Isot	**27,5**	**250 ± 10**	**———**	**ND**	**tr**	**390 ± 6**
SS- Hinchado	**122,7**	**220 ± 10**	**———**	**ND**	**tr**	**330 ± 90**
SS-Plasm	**55,1**	**136 ± 1**	**———**	**ND**	**tr**	**330 ± 10**
CDTA- Fresco	**35,6**	**186,3 ± 0,8**	**———**	**ND**	**tr**	**188 ± 7**
CDTA-Isot	**28,8**	**172,7 ± 0,6**	**———**	**ND**	**tr**	**173 ± 6**
CDTA- Hinchado	**28,1**	**179,6 ± 0,5**	**———**	**ND**	**tr**	**179 ± 2**
CDTA-Plasm	**12,6**	**177,2 ± 0,6**	**———**	**ND**	**tr**	**172 ± 4**
AIR[g]- Fresco	**452**	**163 ± 4**				
AIR[g]-Isot	**390**	**185 ± 3**				
AIR[g]- Hinchado	**396**	**160 ± 30**				
AIR[g]-Plasm	**465**	**80 ± 10**				
AIR[h]-Fresco	**564**				**185 ± 2**	**770 ± 90**
AIR[h]-Isot	**599**				**217 ± 4**	**780 ± 90**
AIR[h]- Hinchado	**643**				**134 ± 7**	**670 ± 85**
AIR[h]-Plasm	**536**				**240 ± 10**	**800 ± 90**

Fracciones de residuo insoluble en alcohol (AIR) solubilizado por agua fría (WS), 136 mol m^{-3}-Na Cl (SS) o por CDTA.

tr, trazas; ND, no detectable; UA, ácido urónico; DM: grado de metilación; HC: hidratos de carbono.

Tejidos equilibrados Isot: Isotonico (250 mol m^{-3} PEG), Hinchado (0 mol m^{-3} PEG) or Plasm: Plasmolizado (1050 mol m^{-3} PEG) .

[a]Rendimiento de las diferentes fracciones (WS, SS, CDTA) obtenidas del AIR, o del AIR obtenido de los tejidos fresco y equilibrados.

[b]g/kg^{-1} de cada fracción.

[c]Glucosa libre determinada por rección enzimática.

[d]Los valores se expresaron como g de azúcar anhidro por kg de cada fracción.

[e]Promedios y desvíos estandard (n = 9; α: 0,05).

[f]Promedios y desvíos estandard (n = 6; α: 0,05).

[g]Análisis del sobrenadante recuperado luego de la hidrólisis del residuo insolubre en alcohol (AIR) con 1000 mol m^{-3} de ácido sulfúrico durante 1 hour at 100°C.

[h]Idem (g), pero luego de 2,5 horas de hidrólisis a 100°C.

Tabla 5. Composición de azúcares neutros de las fracciones[a] de los residuos insolubles en alcohol (AIRs) solubles en: agua fría (WS) y 136 mol m^{-3}-NaCl (SS) del tejido de calabacita.

Fracción	**Rendimiento ($g\ kg^{-1}$)**	Azúcares de la pared celular (mol %)						
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
AIR[b]-Fresco	770	8	1	20	9	5	11	47
AIR[b]-Isot	790	7	1	11	8	4	10	59
AIR[b]-Hinchado	790	8	1	14	8	5	11	53
AIR[b]-Plasm	870	5	1	6	3	3	7	75
AIR[c]- Fresco	230				1	3	1	95
AIR[c]-Plasm	130				1	1	2	96
WS- Fresco		1	tr	6	-	1	7	85
WS-Isot		1	tr	6	1	1	6	85
WS- Hinchado		1	tr	9	1	-	4	84
WS-Plasm		1	tr	7	2	-	4	84
SS- Fresco		2	1	10	1	2	10	74
SS-Isot		3	tr	13	1	5	11	66
SS- Hinchado		1	tr	7	1	2	6	83
SS-Plasm		1	tr	8	1	1	5	84

tr, trazas.
Tejidos equilibrados Isot: Isotónico(250 mol m^{-3} PEG), Hinchado(0 mol m^{-3} PEG) or Plasm: Plasmolizado (1050 mol m^{-3} PEG).
[a]No se pudieron detectar azúcares neutros en el extracto de CDTA.
[b]Analisis del sobrenadante recuperado del residuo insoluble en alcohol (AIR) luego de la hidrólisis con 2000 mol m^{-3} TFA (ácido trifluoroacetico) durante 90 minutos a 120°C.
[c]Análisis llevado a cabo luego de la disolución total del residuo obtenido de ([b]) en TFA puro con 1 hora de calentamiento a 40°C y posterior dilución de acuerdo con Morrison, 1988

I-3-5-Influencia de la inmersión y de los cambios en la presión de turgor sobre la composición química del tejido de calabacita

Se ha observado que la inmersión y la modificación de la presión de turgor de los cilindros de mesocarpio de calabacita por tratamiento con soluciones de buffer (fosfato, pH 6,8) con PEG, a 12ºC, hasta el equilibrio (36 h), promovió, simultáneamente un cambio en la composición química de la PC, como así también en la proporción de fracción soluble en agua (WSF). Ello, probablemente, se relacionó con la inmersión *per se* y con el grado de estiramiento de la PC como consecuencia de la presión ejercida sobre ella por el

contenido celular bajo las distintas condiciones de turgencia. Estos acontecimientos coincidieron con la existencia de una alteración en la respuesta mecánica. La importante proporción de WSF encontrada en el tejido de la calabacita debe ser, al menos, parcialmente responsable de la debilidad mostrada por el tejido de la calabacita cuando se lo hierve en agua para su cocción.

La cantidad más baja de ácido galacturónico se encontró en las fracciones extraídas, con agua y con NaCl, a partir del AIR de los tejidos plasmolizados (Tabla 4). El contenido más bajo de pectina en los tejidos plasmolizados se puede atribuir a la degradación de la misma a través de los caminos metabólicos y también a la extracción por parte de la solución acuosa de buffer-PEG durante el tiempo en que se alcanza el equilibrio. También se encontró una pérdida de arabinosa, galactosa, ramnosa y xilosa en la fracción soluble en TFA 2 M obtenida del AIR del tejido plasmolizado (Tabla 5). Este tejido, donde la PC se relajó debido a la desaparición de la presión de turgor, mostró entonces, una pérdida significativa de material péctico de la matriz de la PC, como así también, la proporción más alta de fracción soluble en agua extraída del AIR. Al mismo tiempo, todas las muestras de tejido equilibradas en soluciones hipertónicas (concentraciones de PEG mayores que 250 moles m^{-3}) mostraron las más bajas firmezas y módulos de almacenamiento y un valor nulo de F_{∞}.

Por otro lado, el tejido de calabacita cuya PC se estiró como consecuencia de la mayor presión de turgor (tejido equilibrado en 0,00 moles m^{-3} PEG) mostró:

a) La menor proporción de WSF extraída del AIR,

b) Aproximadamente el mismo nivel de ramnosa, galactosa y ácido galacturónico en el AIR que en el tejido fresco,

c) El nivel más alto de arabinosa entre los AIRs de los tejidos sumergidos,

d) Un nivel más bajo de arabinosa respecto al observado en el AIR del tejido fresco,

e) El más alto nivel de fracción de SS extraída del AIR,

f) El más alto nivel de actividad de POX iónicamente unida, pero acompañada por el mismo nivel de actividad de POX soluble que el tejido fresco (sin inmersión),

g) Reológicamente, el tejido hinchado mostró los valores más altos de firmeza, módulo de almacenamiento y F_∞ en los estudios texturales realizados.

Se puede concluir que la composición de la PC en la calabacita depende y se vé afectada por el grado de estiramiento de la PC y, por lo tanto, por la presión de turgor del tejido tratado.

I-4-Conclusiones

No se observó que ocurriera el estallido de las células en el tejido de mesocarpio de calabacita equilibrado con soluciones altamente hipotónicas, pero la elongación de la pared celular no acompañó en una relación proporcional a la ganancia de agua. Ello condujo a concluir que la PC del tejido de calabacita fresco es especialmente resistente a mayores elongaciones bajo la presión hidrostática del contenido de la célula en condiciones de hipotonicidad severa. Esto se puede atribuir, en primer lugar, a la alta resistencia del entramado celulosa-xiloglucanos del tejido comestible de la calabacita.

La plasmólisis incipiente se pudo detectar a través de los estudios reológicos, estando asociada con el tejido equilibrado en solución conteniendo 380 mol de PEG por m^3 de solución.

La microscopía mostró integridad de la pared celular para el tejido equilibrado con las soluciones isotónica, hipotónica e hipertónica ensayadas, hecho que confirma la observación de picos de fractura cuando se somete al tejido a una fuerza de compresión uniaxial, luego del equilibrio en estas soluciones. Sin embargo, la inmersión en soluciones isotónicas produjo daño tisular que afectó el valor de la fuerza de relajación a tiempo infinito (F_∞) como así también la fuerza de relajación inicial para cada cuerpo de Maxwell.

Se obtuvieron correlaciones significativas para F_∞ con G' o con tan δ, revelando que la información acerca del comportamiento reológico provista por la relajación se relaciona a la provista por los ensayos dinámicos.

Se estableció que ≈79% del valor de G', el 100% del valor de F_∞, y el 50% de la firmeza correspondió a la manifestación de la presión de turgor, remarcando la importante contribución de la turgencia a la respuesta mecánica del tejido de calabacita fresco y explicando el daño textural observado cuando se pierde el turgor durante la preservación de los tejidos vegetales.

En general, el equilibrio por inmersión del tejido de calabacita en soluciones de PEG resultó en un incremento de la POX total. Esta fue una respuesta metabólica al estrés del tejido que surge del incremento en la fracción iónicamente unida de POX para el tejido hinchado y tejido isotónico. La resistencia del tejido equilibrado en soluciones hipotónicas al estallido de las células se puede así atribuir al desarrollo de uniones cruzadas oxidativas de

extensina, catalizadas por POX como una respuesta al estrés del tejido luego del corte y de la inmersión, en adición a la resistencia natural de la red de celulosa.

El contenido de arabinosa observado decreció en los tejidos isotónicos e hinchados facilitando, probablemente, la formación de uniones de pectina (RG I)-en –extensina durante el entrecruzamiento oxidativo catalizado por POX. Por el contrario, las pérdidas de arabinosa, galactosa y ramnosa igualaron a las de ácido galacturónico en el tejido plasmolizado, debido a la degradación de pectina, un fenómeno que ocurre cuando las pectinas ya no se necesitan para permitir el arrastre viscoso de la red celulosa-xiloglucanos durante el estiramiento de la PC como respuesta al turgor. El RG I involucrado en las uniones de pectina-en-extensina de los tejidos hinchados e isotónico no perteneció a las fracciones extraídas en agua ni en NaCl. También ocurrió una importante pérdida de xilosa en el AIR del tejido plasmolizado. Esto se puede atribuir a la degradación de xiloglucanos y/o de arabinoxilanos que debe ocurrir luego de la relajación de la PC en los tejidos plasmolizados.

La ausencia de puentes fenólicos y la baja proporción de puentes calcio, junto con una proporción sustancial de pectinas extraíbles en agua fría en la estructura de la PC-LM del tejido de calabacita fresco, da origen a un tejido débil, que se desintegra fácilmente luego de la cocción en agua, debido a la débil adhesión célula-célula.

En general, la proporción de AIR solubilizada por NaCl o CDTA fue muy baja comparada con aquélla extraída por agua fría. Las mayores extracciones con NaCl se obtuvieron a partir de los tejidos hinchados (sumergidos y equilibrados en una solución sin PEG). Esta tendencia debe estar asociada con cambios específicos en las uniones iónicas pécticas en la PC como respuesta al máximo estiramiento.

Se puede entonces concluir que la composición química de la PC en la calabacita depende y se vé afectada por el grado de estiramiento de la PC, en respuesta a los cambios de presión que sobre ella ejerce el contenido celular como consecuencia del estrés osmótico.

I-5-Referencias

Albersheim P, Nevins DJ, English PD, Karr A. 1967. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohyd Res.* 5:340-345.

Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ. 1992. Elicitor-and wound-induced oxidative cross-linking of proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 70:21-35.

Brett CT, Waldron KW. 1996. *The physiology and biochemistry of plant cell walls*. 2nd ed. London, UK: Chapman and Hall. p 26-32.

Carpita NC, Sobularse D, Montezinos D, Delmer DP. 1979. Determination of the pore size of cell walls living plant cells. *Science* 205: 1144-1147.

Carpita NC, Gibeaut DM. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant J* 3(1):1-30.

Chung, H D and Youn S J. 1998. Ecological and morphological characteristics of the Korean native squash (*Curcurbita moschata*). *J Korean Soc Hort Sci*, 39 (4): 377-384.

Chung, H D and Youn S J. 1998. Chemical composition of immature fruits and leaves, and enlargement of fruits of the Korean native squash (*Cucurbita moschata*). *J Korean Soc Hort Sci*, 39(5): 504-509.

Chung, H D and Youn S J. 1998. Chemical composition and quality evaluation of ripe fruit of the Korean native squash (*Cucurbita moschata*). *J Korean Soc Hort Sci*, 39(5): 510-516.

Cosgrove DJ. 1988. In defence of the cell volumetric elastic modulus. *Plant, Cell and Environment*, 11: 67-69.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356.

Falk S, Hertz H, Virgin H. 1958. On the relation between turgor pressure and tissue rigidity. I. Experiments on resonance frequency and and tissue rigidity. *Physiol Plant* 11:802-817.

Ferry JD. 1980. *Viscoelastic properties of polymers* (3rd. edn.), Ed by John Wiley & Sons, New York, Chapter 3, pp 56-79.

Filisetti-Cozzi TMCC, Carpita NC. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal Biochem* 197:157-162.

Fry SC. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Ann Rev Plant Physiol* 37:165-186.

Fúster C, Prestamo G, Cano MP. 1994. Drip loss, peroxidase and sensory changes in kiwi fruit slices during frozen storage. *J Sci Food Agric* 64:23-29.

Gerschenson LN, Rojas AM and Marangoni AG. 2001. Effects of processing on kiwifruit dynamic rheological behaviour and tissue structure. *Food Res Int* 34: 1-6.

Greve LC, Shakel KA, Ahmadi H, McArdle RN, Gohlke JR, Labavitch JM. 1994. Impact of heating on carrot firmness: contribution of cellular turgor. *J Agric Food Chem* 42(12):2896-2899.

Hagerman AE, Austin PJ. 1986. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methylesterase. *J Agric Food Chem* 34(3):440-444.

Ilker R, Szczesniak AS. 1990. Structural and chemical bases for texture of plant foodstuffs. *J Text Stud* 21:1-36.

Ingham LM, Parker ML, Waldron KW. 1998. Peroxidase: changes in soluble and bound forms during maturation and ripening of apples. *Plant Physiol* 102:93-100.

Iraki NM, Bressan RA, Hasegawa PM, Carpita NC. 1989. Alteration of the physical and chemical structure of the primary cell wall of growth-limited plant cells adapted to osmotic stress. *Plant Physiol* 91:39-47.

Jackman RL and Stanley DW. 1995. Creep behaviour of tomato pericarp tissue as influenced by ambient temperature ripening and chilled storage. *J. Texture Stud* 26:537-553.

Jackman RL, Marangoni AG, Stanley DW. 1992. The effects of tur, gor pressure on puncture and viscoelastic properties of tomato tissue. *J Texture Stud* 23:491-505.

Lee, K A Y. and Joon Y. 1998. Effects of low temperature and CA on quality changes and physiological characteristics of chilling injury during storage of squash (*Cucurbita moschata*). *J Korean Soc Hort Sci* 39 (4):402-407.

Lichtenthaler HK, Schweiger J. 1998. Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *J Plant Physiol* 152:272-282.

Lin Ta-Te, Pitt RE. 1986. Rheology of apple and potato tissue as affected by cell turgor pressure. *J Text Stud* 17:291-313.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

Marangoni AG, Jackman RL, Stanley EW. 1995. Chilling associated softening of tomato fruit is related to increased pectinmethylesterase activity. *J Food Sci* 60:1277-1281.

Martin-Cabrejas MAM, Waldron KW, Selvendran RR. 1994. Cell wall changes in Spanish pear during ripening. *J Plant Physiol* 144:541-548.

McCance R.A. y Widdowson E.M. 1991. *The composition of Foods*. Fifth ed. Cambridge CB4 4WF, UK: Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods, Thomas Graham House.

Miesle TJ, Proctor Am, Lagrimini LM. 1991. Peroxidase activity, isoenzymes and tissue localization in developing highbush blueberry fruit. *J Am Soc Hort Sci* 116:827-830.

Morrison IM. 1988. Hydrolysis of plant cell walls with trifluoroacetic acid. *Phytochem* 27:1097-1100.

Mort AJ, Moerschbacher BM, Pierce ML, Maness NO. 1991. Problems encountered during the extraction, purification, and chromatografy of pectic fragments, and some solutions to them. *Carbohyd Res* 215:219-227.

Mosha TC, Pace RD, Adeyeye S, Laswai HS, Mtebe K. 1997. Effect of traditional processing practices on the content of total carotenoid, beta-carotene, alpha-carotene and vitamin A activity of selected Tanzanian vegetables. *Plant Foods for Human Nutr Dordrecht* 50(3):189-201.

Murase H, Merva GE, Segerlind CJ. 1980. Variation of Young's modulus of potato as a function of water potential. Trans *Am Soc Agric Eng* 23:794-796, 800.

Nelson N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* 153:375-380.

Ng A, Waldron KW. 1997. Effect of cooking and pre-cooking on cell wall chemistry in relation to firmness of carrot tissues. *J Sci Food Agric* 73:503-512.

Nilsson SB, Hertz CH, Falk S. 1958. On the relation between turgor pressure and tissue rigidity II. Theoretical calculations on model systems. *Physiol Plant* 11:818-837.

Nussinovitch A, Peleg M and Normand MD. 1989. A modified Maxwell and a non-exponential model for the characterization of the stress-relaxation of agar and alginate gels. *J Food Sci* 54:1013-1016.

Parker ML, Waldron KW. 1995. Texture of Chinese water chesnut: involvement of cell wall phenolics. *J Sci Food Agric* 68:337-346.

Peleg M and Calzada JF. 1976. Stress relaxation of deformed fruits and vegetables. *J Food Sci* 41:1325-1329.

Philip JR. 1958. Propagation of turgor and other properties through cell aggregations. *Plant Physiol* 33: 271-274.

Philip JR. 1958. The osmotic cell, solute diffusibility, and the plant water economy. *Plant Physiol* 33:261-271.

Pitt RE. 1982. Models for the rheology and statistical strength of uniformly stressed vegetable tissue. *Trans Am Soc Agric Eng* 25(6):1776-1784.

Ptitchkina N M , Novokreschonova L V, Piskunova, G V and Morris, E R. 1998. Large enhancements in loaf volume and organoleptic acceptability of wheat bread by small additions of pumpkin powder: possible role of acetylated pectin in stabilising gas-cell structure. *Food Hydroc* 12:333-337.

Ptitchkina N M, Danilova, I A, Doxastakis, G, Kasapis, S and Morris, E R. 1994. Pumpkin pectin: gel formation at unusually low concentration. *Carbohydrate Polym* 23:265-273.

Redgwell RJ, Melton RD, Brasch DJ. 1990. Cell wall changes in kiwifruit following post harvest ethylene treatment. *Phytochem* 29 (2):399-407.

Rojas AM, Delbon M, Marangoni AG and Gerschenson LN. 2002. Contribution of cellular structure to the large and small deformation rheological behavior of kiwifruit. *J Food Sci* 67(6):2143-2148.

Rojas AM, Gerschenson, LN, Marangoni, AG. 2001. Contributions of cellular components to the rheological behaviour of kiwifruit. *Food Res Int* 34:189-195.

Sajnín C, Gamba G, Gerschenson LN, Rojas AM. 2003. Textural, histological and biochemical changes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) due to immersion and variations in turgor pressure. *J Sci Food Agric* 83:731-740.

Sajnín C, Gerschenson LN and Rojas AM. 1999. Turgor pressure in vegetable tissues: comparison of the performance of incipient plasmolysis technique using mannitol and polyethylene glycol. *Food Res Int* 32:531-537.

Sakurai N and Nevins DJ. 1993. Changes in physical properties and cell wall polysaccharides of tomato (*Lycopersicum esculentum*) pericarp tissues. *Plant Physiol* 89: 681-686.

Schur S. 1987. *Texture integrity: challenge for research and development, in Food texture: Instrumental and Sensory Measurement*, Ed by Moskowitz HR, Marcel Dekker, New York, pp. 273-292.

Sokal RR, Rohlf FJ. 1969. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research* (3rd. Edn). WH Freeman, San Francisco, USA.

Stadelmann E. 1966. *Evaluation of turgidity, plasmolysis and deplasmolysis of plant cells, in: Methods in Cell Physiology*, Vol. II, Ed by Prescott DM, Academic Press, New York, pp 143-216.

Wood PJ, Siddiqui IR. 1971. Determination of methanol and its application for measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. *Anal Biochem* 39:418-428.

Xu Y. and Siegenthaler P A. 1997. Low temperature treatments induce an increase in the relative content of both linolenic and DELTA-3-trans-hexadecenoic acids in thylakoid membrane phosphatidylglycerol of squash cotyledons. *Plant and Cell Physiol* 38(5): 611-618.

CAPITULO II
CALABACITA COMO MATRIZ DE ALIMENTOS FUNCIONALES

Índice Capítulo II

II-1-Introducción.....- 61 -

II-1-1-Nutracéuticos y/o Alimentos Funcionales.....- 61 -

II-1-2-Métodos Combinados.....- 66 -

II-2-Materiales y Métodos.....- 72 -

II-2-1-Desarrollo del producto.....- 72 -

II-2-2-Materiales.....- 75 -

II-2-3-Evaluación del producto.....- 77 -

II-2-3-1-Características microbiológicas.....- 78 -

II-2-3-2-Características Organolépticas.....- 78 -

II-2-3-3-Características nutricionales.....- 79 -

II-2-4-Análisis Estadístico.....- 82 -

II-3-Resultados y discusión.....- 83 -

II-3-1-Evolución del pH y de aw, contenido de sólidos y de agua.....- 83 -

II-3-2-Calidad microbiológica.....- 90 -

II-3-3-Características organolépticas.....- 92 -

II-3-3-1-Textura.....- 92 -

II-3-3-2-Evaluación del color.....- 96 -

III-3-3-3-Evaluación Sensorial.....- 102 -

II-3-4-Características nutricionales.....- 103 -

II-3-4-1-Determinación de ácido L-(+)-ascórbico.....- 103 -

II-3-4-2-Hierro biodisponible.....- 106 -

II-4-Conclusiones.....- 108 -

II-5-Referencias.....- 109 -

II-1-Introducción

II-1-1-Nutracéuticos y/o Alimentos Funcionales

El concepto de alimentos funcionales nació en Japón. En los años 80, las autoridades sanitarias japonesas se dieron cuenta de que, para controlar los gastos sanitarios, generados por la mayor esperanza de vida de la población, había que garantizar también una mejor calidad de vida. Se introdujo un nuevo concepto de alimentos, que se desarrollaron específicamente para mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades. Generalmente, se considera que son aquellos alimentos, que se consumen como parte de una dieta normal y contienen componentes biológicamente activos, que ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir enfermedades. Entre algunos ejemplos de alimentos funcionales, se destacan los alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra alimenticia, los alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como los fotoquímicos u otros antioxidantes, y los probióticos, que tienen cultivos vivos de microorganismos beneficiosos.

Un alimento funcional puede ser un alimento natural, un alimento al que se le ha añadido, o al que se le ha quitado un componente mediante medios tecnológicos o biológicos (Anónimo, 2006a).

Para dar una explicación de "funcionalidad", los científicos japoneses clasificaron en tres los niveles de funcionalidad de los alimentos:

- *Funcionalidad primaria.* Ayuda a mantener la vitalidad corporal en corto y largo plazo.
- *Funcionalidad secundaria.* El sabor y el aroma son funcionales en tanto otorgan satisfacción sensorial.
- *Funcionalidad terciaria.* La fortificación y la modulación del sistema fisiológico son elementos "funcionales" (Anónimo, 2006b).

El Codex Alimentarius se encuentra aún en debate con respecto al uso de alegatos de salud en los alimentos (Anónimo 2006b,c,d). Sin embargo establece, claramente, principios generales para la adición de nutrientes esenciales a los alimentos en su CAC/GL 09-1987 (enmendados en 1989,1991):

- Por *fortificación o enriquecimiento* se entiende la adición de uno o más nutrientes esenciales a un alimento, tanto si está o no originalmente contenido en el mismo, con el fin de prevenir o corregir una deficiencia demostrada de uno o más nutrientes en la población o en un grupo específico de la misma.
- Por *alimentos para fines especiales* se entienden los alimentos que se destinan a desempeñar una función especifica, como sustituir a una comida que habrá de tener un contenido de nutrientes esenciales que no pueda obtenerse sino por adición de uno o más de dichos nutrientes. Estos alimentos, aunque los incluyen, no se limitan a los alimentos para regímenes especiales.

En nuestra legislación, el Capitulo XVII del Código Alimentario Argentino regula sobre "alimentos de régimen o dietéticos". A continuación se trascriben los artículos 1339, 1363 y 1369.

Art 1339 - (Res Conj. SAGPyA 120/2003 y SPRyRS 516/2003) Se entiende por "Alimentos dietéticos" o "Alimentos para regímenes especiales" a los alimentos envasados preparados especialmente que se diferencian de los alimentos ya definidos por el presente Código por su composición y/o por sus modificaciones físicas, químicas, biológicas o de otra índole resultantes de su proceso de fabricación o de la adición, sustracción o sustitución de determinadas substancias componentes. Están destinados a satisfacer necesidades particulares de nutrición y alimentación de determinados grupos poblacionales.

Se clasifican en:

a) Alimentos para satisfacer necesidades alimentarias específicas de determinados grupos de personas sanas:

— Alimentos para lactantes y niños de corta edad.

— Alimentos fortificados.

— Alimentos que proporcionan por adición, nutrientes esenciales.

— Alimentos en los que se han restaurado nutrientes perdidos en el proceso de elaboración.

b) Alimentos para satisfacer necesidades alimentarias de personas que presentan estados fisiológicos particulares:

— Alimentos modificados en su valor energético.

— Alimentos modificados en su composición glucídica.

— Alimentos modificados en su composición proteica.

— Alimentos modificados en su composición lipídica.

— Alimentos modificados en su composición mineral.

— Alimentos de bajo contenido de sodio.

— Alimentos libres de gluten.

c) Alimentos enriquecidos.

d) Suplementos dietarios.

ALIMENTOS FORTIFICADOS

Art 1363 - (Res 1505, 10.08.88) "Se entiende por Alimentos Fortificados aquellos alimentos en los cuales la proporción de proteínas y/o aminoácidos y/o vitaminas y/o substancias minerales y/o ácidos grasos esenciales es superior a la del contenido natural medio del alimento corriente, por haber sido suplementado significativamente.

El alimento fortificado deberá aportar entre 20 y 100% de los requerimientos diarios recomendados en las Tablas 1 y 2 agregadas, según la ingesta diaria indicada en el rotulado del alimento.

TABLA 1: INGESTAS DIARIAS RECOMENDADAS (1)

Nutriente	Cantidad diaria
Acido fólico	200 μg
Acido pantoténico	10 mg
Biotina	0,3 mg
Calcio	1000 mg
Cobre	2 mg
Fósforo	1000 mg
Hierro	18 mg
Iodo (Opcional)	150 μg
Magnesio	400 mg
Niacina	21,0 mg
Proteínas	0,75 g/kg de peso corporal (2)
Vitamina A	2500 U.I.
Vitamina B1 (Tiamina)	1,3 mg
Vitamina B2 (Riboflavina)	1,9 mg
Vitamina B6	2 mg
Vitamina B12	2,0 μg
Vitamina C	40 mg
Vitamina D	100 U.I.
Vitamina E	30 U.I.
Zinc	15 mg

(1) - Ingesta diaria recomendada para adultos y niños de 4 y más años de edad, según el Octavo Congreso Argentino de Nutrición (Buenos Aires, 1983) y U.S.RDA (Ingestas Diarias Recomendadas de los Estados Unidos, Código de Regulaciones Federales § 104.20. Title 21 (1985).

(2) - Nivel de seguridad para la ingesta de proteínas de calidad y digestibilidad de la leche o huevos, para adultos. FAO/OMS/UNU. Serie de Informe Técnico Nº 724 (1985). Para lactantes, niños hasta 10 años y adolescentes tablas 48 y 49 de la misma publicación.

(Res MSyAS N° 074 del 5.02.98)

"TABLA 2: INGESTA DIARIA DE REFERENCIA PARA NIÑOS MENORES DE 4 AÑOS Y PARA MUJERES EMBARAZADAS (2° Y 3° TRIMESTRE) Y EN LACTANCIA HASTA EL 6° MES

VITAMINAS	UNIDADES	NIÑOS	MUJERES EMBARAZADAS Y EN LACTACION
A	U.I	1200	4000
C	mg	20	50
D	U.I	100	400
E	U.I	30	30
TIAMINA (B1)	mg	0.8	1.5
RIBOFLAVINA (B2)	mg	1.2	2.1
NIACINA	mg	13	18
PIRIDOXINA (B6)	mg	2	2.5
ACIDO FOLICO	µg	100	400
CIANOCOBALAMINA (B12)	µg	1.5	3
BIOTINA	µg	300	300
Ac. PANTOTENICO	mg	10	10

MINERALES	UNIDADES	NIÑOS	MUJERES EMBARAZADAS Y EN LACTACION
CALCIO	mg	1000	1700
HIERRO	mg	12	21
FOSFORO	mg	1000	1500 (*)
MAGNESIO	mg	400	450
ZINC	mg	15	15
IODO	µg	150	150
COBRE	mg	2	2

ALIMENTOS ENRIQUECIDOS

Art 1369 - (Res 1505, 10.08.88) "Se entiende por Alimentos Enriquecidos aquellos a los que se han adicionado nutrientes esenciales (Vitaminas y/o minerales y/o proteínas y/o aminoácidos esenciales y/o ácidos grasos esenciales) con el objeto de resolver deficiencias de la alimentación que se traducen en fenómenos de carencia colectiva.

La elaboración y expendio de dichos alimentos será permitida cuando:

a) La autoridad sanitaria competente determine las adiciones necesarias y sus concentraciones, los tipos de alimentos sobre los que se podrán efectuar, las exigencias de rotulación, las características del expendio y el alcance del mismo.

b) Se haya probado que las deficiencias de alimentación no pueden ser corregidas en forma económica con alimentos normales o corrientes.

c) Las carencias deberán ser establecidas por la comunidad científica que identificará el problema, los grupos poblacionales afectados y la magnitud del alcance (regional, multirregional o nacional)".

II-1-2-Métodos Combinados

La preservación de alimentos implica colocar a los microorganismos en un ambiente hostil con el objeto de inhibir su crecimiento, acortar su supervivencia o causarles la muerte. Si la homeostasis de los microorganismos, por ejemplo su equilibrio interno, se interrumpe por factores preservativos (“barreras”) presentes en el alimento, ellos no se multiplicarán y por ejemplo permanecerán en una fase lag o incluso pueden llegar a morir, antes que su homeostasis se restablezca o repare.

El concepto de “Métodos Combinados” de preservación también llamado “Hurdle Technology” en inglés o “Tecnología de Barreras”, se basa en una combinación de barreras que aseguran la estabilidad microbiológica y la inocuidad, como así también propiedades sensoriales, nutritivas, y económicas de un alimento (Leistner, 1995).

Temperatura, pH, actividad acuosa (a_w), uso de preservadores, son algunos ejemplos de barreras utilizadas. La aplicación de una barrera puede tener un efecto positivo o negativo sobre la calidad total deseada del alimento, dependiendo de su intensidad. En la práctica es más efectivo utilizar en un alimento diferentes barreras en pequeña cantidad que sólo una barrera con una intensidad mayor, porque diferentes barreras pueden alcanzar distintos objetivos dentro de la célula del microorganismo y de esta forma pueden actuar sinergísticamente.

Para los países en desarrollo, los alimentos que se almacenan sin refrigeración tienen un interés especial, debido a que la refrigeración (energía) es costosa y a menudo no disponible. Más aún, los procedimientos para la preservación de alimentos deben ser económicos y simples, pero confiables. Muchos de los alimentos que permanecen estables e inocuos durante un almacenamiento prolongado sin refrigeración, son los alimentos de humedad intermedia, con un rango de a_w de 0,9 a 0,6. Sin embargo, tales alimentos, a menudo, no son satisfactorios al paladar (demasiado dulces o demasiado salados, y/o demasiado duros). Por ello, se ha tendido al desarrollo de productos preservados por métodos combinados de alto contenido de humedad a_w (mayores a 0,92) por ejemplo, a partir de frutas como duraznos, ananá, mango, papaya, banana, etc (Leistner, 1995).

El hierro es un elemento esencial en la nutrición animal y humana. Participa de las estructuras de citocromos y de varias enzimas. Es el elemento necesario para construir el grupo "hemo" en la hemoglobina y mioglobina, en las cuales juega un papel fundamental en el transporte, almacenamiento y utilización del oxígeno (Gaucheron, 2000). La deficiencia de hierro, anemia, puede provocar en niños un retardo en el desarrollo intelectual y psicomotor y en mujeres embarazadas, parto prematuro y/o mortalidad materna y fetal. Además, la deficiencia de hierro reduce la capacidad laboral, impide la buena regulación de la temperatura en el cuerpo y reduce la respuesta inmune aumentando la incidencia de infecciones (Hurrell, 1990).

Se considera que la deficiencia de hierro es la carencia nutricional más comúnmente encontrada en el mundo, afectando aproximadamente a un 20% de

la población mundial (Martínez-Navarrete, 2002). En los países en vías de desarrollo, afecta actualmente a más de 500 millones de personas. En la Argentina, entre el 22 y el 66% de los niños menores de dos años, tienen déficit nutricional de hierro, dejando en algunos casos secuelas en el desarrollo cognitivo (Anónimo, 2004a). Las consecuencias de la deficiencia de hierro en la población representan el mayor costo a la sociedad, exceptuando el de la tuberculosis (Kosse, 2001). En aquellos países que se encuentran significativamente afectados, puede representar hasta un 5% del producto bruto interno (PBI). Sin embargo, la solución a este problema mediante la implementación de estrategias adecuadas como la fortificación de alimentos, tiene un costo económico inferior al 0,3% del PBI. La fortificación de alimentos ha demostrado ser una estrategia más efectiva que la suplementación farmacológica. La política adoptada por algunos países fue la de elegir como soporte o "carrier" aquellos alimentos ampliamente consumidos por los grupos de riesgo. Entre ellos, encontramos principalmente los cereales, los productos lácteos y, en menor proporción, la sal, el azúcar y los condimentos (Boccio, 2002). Algunos autores (Layrisse y col., 1976; Miguel y col., 1997) indicaron que la fortificación del azúcar podría resultar más útil que la de los panes y los derivados farináceos ya que la absorción a partir de estos últimos resulta muy pobre. En la República Dominicana se han utilizado para la fortificación, harinas de maíz y de trigo así como sus derivados, teniendo el gobierno la intención de ampliarla a una mayor cantidad de alimentos (Anónimo, 2004b). En la India, al igual que en otros países del mundo, la estrategia adoptada ha sido la fortificación con Fe de la harina de trigo (Nayak, 2003). En Argentina, la Ley 25630, cuya reglamentación fue aprobada en agosto del 2003, exige la fortificación de las harinas de trigo con sulfato ferroso, ácido fólico, tiamina, riboflavina y niacina con el objeto de prevenir las anemias y las malformaciones del tubo neural.

Los obstáculos principales para una fortificación exitosa son los siguientes:

1) Encontrar un compuesto de hierro que se absorba adecuadamente, sin causar cambios organolépticos en el alimento soporte.

2) Sobreponerse al efecto inhibitorio que sobre la absorción del hierro, ejercen los otros componentes de la dieta como el ácido fítico, los compuestos fenólicos y el calcio.

Estos obstáculos se han solucionado exitosamente con algunos de los alimentos pero no con otros (Hurrell, 2002). Las solicitudes de patentes para la fortificación de leche chocolatada (Sher y col., 2001) de Societe Des Produits Nestle S.A.; para la fortificación de bebidas (Henry y col. 2002; 1998) de Procter&Gamble; para el mejoramiento de la biodisponibilidad del Fe utilizando fitasa activa en las formulaciones (Streekstra, 2003) de DSM IP ASSETS B.V., son algunos de los ejemplos que muestran la tendencia hasta el momento. Los compuestos de Fe, muy solubles en agua, como el sulfato ferroso, aportan hierro de alta biodisponibilidad y, en consecuencia, serían los compuestos de elección primaria para ser utilizados en la fortificación de alimentos. Sin embargo, su alta reactividad con los compuestos de la matriz nutricional limita significativamente el uso de los mismos como fortificantes alimentarios (Boccio, 2002). Por otro lado, debería probarse fortificar con hierro otras matrices alimenticias para ampliar de este modo la variedad de alimentos que aporten a la dieta la ingesta diaria recomendada.

La utilización de matrices vegetales impregnadas con componentes biológicamente activos (vitaminas y/o Ca y Zn) ha sido ampliamente estudiada por varios autores durante mucho tiempo (Khin y col., 2006; Zhao y col., 2004; Gras y col., 2003; Abbott y col., 2000). Más recientemente, se ha comenzado a estudiar la influencia de la presencia de Fe^{2+}sobre la cinética de deshidratación osmótica en tejidos de manzana (Barrera y col., 2004) y sus efectos (Betoret y col., 2005). Sin embargo, hay poca información sobre el efecto de la incorporación de hierro sobre las características organolépticas (textura, color, sabor) y nutricionales de los tejidos vegetales preservados por métodos combinados.

Los compuestos de hierro muy solubles en agua como, por ejemplo, el sulfato ferroso, aportan hierro de alta biodisponibilidad y, en consecuencia, serían los compuestos de elección primaria para ser utilizados en la fortificación de alimentos. Sin embargo, en este tipo de compuestos, el hierro es altamente reactivo, provocando la oxidación de grasas, de algunos aminoácidos y de vitaminas en el alimento que es fortificado (Boccio, 2002; Gaucheron, 2000). En consecuencia, se producen cambios desagradables de las características sensoriales, además de disminuir el valor nutricional del alimento. En general, este tipo de compuestos no puede ser utilizado en alimentos líquidos, como agua

o gaseosas, ya que provocan sabores metálicos desagradables (Boccio, 2002). Sher y col. (2001) informaron que los principales problemas tecnológicos causados por las sales solubles de hierro en la producción de alimentos y bebidas son la alteración del color y del flavor. La adición de hierro en bebidas y alimentos que contengan polifenoles como el té, la leche chocolatada o alimentos que contengan banana puede ser muy difícil. Por ejemplo, el chocolate en polvo y otros polvos para preparar bebidas instantáneas se ven de color gris oscuro cuando se los reconstituye con leche o agua.

El ácido L-(+)-ascórbico (AAs) tiene funciones múltiples en todas las células metabólicamente activas de plantas y animales. Sin embargo, esas funciones se resumen en su comportamiento químico como reductor biológico. En este rol, la mezcla de ácido L-(+)-ascórbico y su producto de oxidación, el ácido deshidroascórbico, constituyen un verdadero buffer "redox" al actuar, entre otras cosas, destruyendo radicales libres tóxicos resultantes del metabolismo del oxígeno. El AAs es, por lo tanto, un antioxidante soluble en agua y que, química y biológicamente, actúa como dador de electrones a la sustancia principal de la vía metabólica que es la que se va a reducir, en consecuencia (Rojas, 1995).

Dado que el AAs sufre un proceso de oxido-reducción reversible y por lo tanto, es un buffer redox, es aprovechado como aditivo conveniente en alimentos con el objeto de demorar cambios resultantes de la oxidación, reducción y actividad enzimática; es así un "mejorador" del producto (Rojas, 1995).

La vitamina C debe estar presente en el intestino al mismo tiempo que el hierro no hemínico (procedente de dietas vegetarianas) para que este mineral pueda ser absorbido eficazmente (Rojas, 1995).

Como se vió en el capítulo anterior, el mesocarpio de la calabacita no mostraba lignificación ni compuestos fenólicos, considerados inhibidores importantes de la absorción de minerales. Además, el tenor lipídico es bajo ≈0,1-0,2g /100g, (Mc.Cance y Widdowson, 1991). Por otro lado, es un tejido vegetal de consumo muy difundido en Argentina. Podría resultar pues, un desafío interesante desarrollar un alimento funcional con este tejido vegetal, de manera de contribuir a reducir los niveles de anemia en la población.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un producto funcional fortificado con Fe, listo para consumir, dulce para ser atractivo a los niños (población de mayor riesgo) y económico para que pueda ser ampliamente accesible a la mayor parte de la población.

II-2-Materiales y Métodos

II-2-1-Desarrollo del producto

- **Etapas y Barreras**

Las etapas y las barreras propuestas para la elaboración de la calabacita fortificada van a contemplar:

1. Lavado y corte del fruto.
2. Cocción al vapor durante 8 min. A través de pruebas previas se determinó que es el tratamiento mínimo necesario para ablandar su textura de manera tal que sea comestible y adecuada para permitir el manipuleo posterior, durante el enfriamiento y empaquetamiento, sin desintegrarse. Esta cocción, a su vez, eliminará la mayor parte de los microorganismos nativos que hayan podido persistir a la etapa de lavado o aquéllos que se hubiesen incorporado en la etapa del corte, por lo que podría considerarse ésta como una primera "barrera" en nuestro tratamiento. A partir de aquí es muy importante implementar buenas prácticas de manufactura, con el objeto de optimizar los resultados del tratamiento de Métodos Combinados y, al mismo tiempo, implementar el control de los puntos críticos.
3. Etapa de enfriamiento. En esta etapa, donde se enfría el material luego de la cocción, se incorporan los micronutrientes, ácido ascórbico y/o sales de Fe y, además, se incorpora la segunda "barrera": sorbato de potasio como antimicrobiano.
4. Se escurren los trozos y se los envasa con un jarabe, constituído en base a glucosa y sacarosa, aplicando el resto de las barreras que se van a implementar: reducción de a_w; reducción de pH y aplicación del preservador, sorbato de potasio.

A continuación se detallarán las características de los compuestos usados

- *Sal de Hierro*

Se eligió el sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4.7H_2O$) por su alta solubilidad en agua lo que lo hace biodisponible, aunque potencialmente

reactivo con otros componentes de la formulación. Además, es la sal de hierro de menor costo, lo que colabora a desarrollar un producto económicamente accesible (Boccio, 2004).

- *Sorbato de potasio (E200)*

El ácido sórbico (CH_3-CH=CH-CH=CH-COOH) y sus sales sódicas y potásicas se emplean ampliamente como inhibidores del crecimiento de hongos y levaduras en una extensa gama de alimentos (Sofos J.N., 1989). La actividad del ácido sórbico aumenta al disminuir el pH, lo que indica que la forma no disociada es más inhibitoria de los microorganismos que la disociada. En general, el ácido sórbico es efectivo hasta pH 6,5 (Lindsay R.C., 1996). En nuestra formulación, la utilización de sorbato de potasio al pH establecido (3,50) permite mejorar la estabilidad microbiológica del producto elaborado y aumenta su vida útil. La concentración de trabajo fue elegida teniendo en cuenta la mínima concentración inhibitoria (MIC) determinada en ensayos anteriores por distintos autores (Castro y col., 2002; Gliemmo y col., 2004, Praphailong y col., 1997) para *Zygosaccharomyces bailii*, una levadura que se utiliza en estos ensayos por su resistencia al estrés ocasionado por distintas barreras. Y, además, se tuvo en cuenta que, a lo largo del almacenamiento, el sorbato se degrada, como fue previamente demostrado por Tapia y col. (1995). Ellos determinaron para mango a (a_w 0,970 y pH: 3,50) y papaya (a_w 0,98 y pH 3,50) una reducción del nivel del sorbato de potasio del 30% durante 60 días de almacenamiento.

- *Ácido L-(+)-ascórbico(E300)*

Para elegir la cantidad de AA a agregar a la formulación, se siguió la recomendación del CAA (art. 807, item 12) para la utilización del AA como agente antioxidante. Este ácido colabora a la eficaz absorción del hierro no hemínico (Rojas, 1995).

- *Vainillina*

El CAA (art.807, item 11) establece que queda permitida la incorporación de vainillina y etilvainillin en la preparación de confituras. Tiene la categoría de aditivo “GRAS” o “generalmente reconocido como inocuo” y también se lo emplea para saborizar cremas heladas, chocolates y licores (Hocking, 1997). Para establecer la cantidad óptima se realizaron ensayos

previos con el tejido fortificado con hierro, buscando disminuir, en las condiciones de pH y dulzor del jarabe elegido, la sensación metálica al paladar que producen las sales solubles de hierro, luego de tragar el bocado. La vainillina es también un inhibidor efectivo del crecimiento de hongos y levaduras (Fitzgerald y col., 2004) y de algunos microorganismos patógenos o indicadores (Rupasinghe y col., 2006). Sin embargo, las concentraciones utilizadas en la calabaza están aproximadamente un orden por debajo de las concentraciones mínimas inhibitorias reportadas por la bibliografía cuando se la utiliza como agente antimicrobiano (Rupasinghe y col., 2006; Fitzgerald y col., 2004) .

- *Glucosa.*

Se utilizó glucosa monohidratada por su capacidad depresora de la actividad de agua (a_w) y por su característica de evitar la formación indeseable de cristales de azúcar. Se tuvo en cuenta también que la glucosa es menos dulce que la sacarosa y, por lo tanto, se puede deprimir la a_w con menor saturación sensorial (Whistler y col., 1993).

- *Sacarosa*

En el caso de la sacarosa, si bien tiene un efecto depresor de la a_w menor al de la glucosa a una dada concentración, tiene mayor poder endulzante que la glucosa, confiriendo el dulzor deseado por el consumidor a la formulación (Whistler y col., 1993).

Tanto la glucosa como la sacarosa son fácilmente accesibles en el mercado local y de bajo costo. La cantidad necesaria de ambos fue calculada para obtener una a_w de 0,847 en el jarabe de envasado.

- *Ácido Cítrico*

Se eligió ácido cítrico como acidulante por sus excelentes características de "flavor" en relación con el producto vegetal obtenido (Lindsay, 1993). La cantidad de ácido cítrico agregada, fue la necesaria para lograr un pH de 3,00 en el jarabe de envasado.

La condición de pH fue elegida de modo de evitar el crecimiento de bacterias patógenas. En general, las bacterias crecen con mayor rapidez en la escala de pH comprendida entre los valores 6,0 y 8,0, las levaduras entre los

valores 4,5 y 6,0 y los hongos filamentosos entre los valores 3,5 y 4,0 (Adams y Moss, 1995). Además, a este valor de pH se logra mayor efectividad del sorbato de potasio frente a los hongos y levaduras que podrían llegar a desarrollar. Las moléculas ácidas lipofílicas (ácido cítrico, ácido sórbico) no disociadas pueden atravesar libremente la membrana celular de los microorganismos; pasan desde un medio externo de bajo pH en el que el equilibrio favorece la existencia de moléculas no-disociadas, al elevado pH del citoplasma (de un valor en torno a 7,5). Entonces, el equilibrio se desvía a favor de la molécula disociada, de modo que el ácido se ioniza produciendo protones que tenderán a acidificar el protoplasma. La célula intentará mantener su pH interno por medio de la expulsión de los protones que se producen en su interior pero esto enlentecerá el crecimiento ya que desvía la energía de las funciones relacionadas con el crecimiento (Adam y Moss, 1995).

II-2-2-Materiales

- La calabacita, calabaza o zapallo anco (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret) adquirida en un supermercado local fue cuidadosamente lavada con detergente y agua potable y finalmente enjuagada con agua destilada.
- Para el jarabe se utilizó cerelosa (glucosa monohidratada) y sacarosa, ambas de grado alimenticio.
- Los aditivos incorporados incluyeron $FeSO_4.7H_2O$ (Cicarelli, Argentina), sorbato de potasio (Sigma S-1751, St. Louis, USA), ácido L-(+)-ascórbico (Merck. Argentina), ácido cítrico anhidro (Anedra, Argentina), vainillina (Sigma V-2375 St. Louis, USA). Todos los aditivos utilizados fueron de grado analítico.
- Preparación de la muestra:

  <u>*Calabacita*</u>: una vez lavada fue cortada con un torno, en discos de 10 mm de espesor, perpendiculares a su eje longitudinal. De cada disco se cortaron, mediante sacabocados, cilindros de 20 mm de diámetro del mesocarpio, sin incluir la cáscara (fotos 1 y 2). Cada uno de estos cilindros pesaron, en promedio, ≈ 4,5 g. La selección de esta geometría estuvo determinada por los ensayos reológicos a realizarse. Otras geometrías comercialmente ya estandarizadas, como cubos o bastones, resultarían más adecuadas para el mejor aprovechamiento de la materia prima en una elaboración a mayor escala.

En cuanto a la cocción, es importante remarcar que el calentamiento al vapor evita la pérdida por difusión al medio de calentamiento de los componentes hidrosolubles del tejido tales como vitaminas y pectinas solubles (Ng y Waldron, 1997). Los cilindros de tejido fueron cocinados con vapor saturado a presión atmosférica durante 8 min y luego enfriados por inmersión durante 90 minutos en una de las siguientes soluciones:

- Solución Blanco o Control (B): agua destilada a 18°C conteniendo 500 ppm de AA y 500 ppm de sorbato de potasio.
- Solución Fortificada (F): agua destilada a 18°C conteniendo 500 ppm de ácido L-(+)-ascórbico, 500 ppm de sorbato de potasio, 2,49 g/l de $FeSO_4.7H_2O$, que equivale a 500 ppm de Fe.

En ambos casos, la relación solución de enfriamiento/ zapallo fue de 20:1.

Jarabe de ósmosis: para 440 cilindros de calabaza (aproximadamente 2 kg de material) se prepararon 4,4 kg de jarabe o almíbar, con la siguiente composición:

Cerelosa (Glucosa monohidratada)	*1,32 kg*
Sacarosa	*1,32 kg*
Agua destilada	*1,68 kg*
Sorbato de potasio	*4,4 g*
Ácido L-(+)-ascórbico	*2,2 g*
Vainillina	*0,88 g*
Ácido cítrico 50% P/P	*≈ 6 ml*

pH: 3,00; aw: 0,847

➔ *Procedimiento*

El sorbato de potasio, el AA y la vainillina fueron disueltos en 300 ml de agua destilada. Los azúcares se disolvieron en el agua restante con ayuda de un agitador y calentando mínimamente. La solución obtenida fue enfriada, agregando luego la solución conteniendo los ingredientes primeramente disueltos

➔

➔ *Envasado*

Una vez enfriados, los trozos fueron envasados en bolsitas de polietileno de baja densidad y 80 micrones de espesor provistas de cierre fácil tipo Ziploc®. Cada bolsita fue llenada con 10 cilindros de mesocarpio de calabacita (45 g) y 100 cm^3 de jarabe y luego cerrada. Fueron entonces almacenadas en una cámara, a 25ºC ± 0,5ºC.

II-2-3-Evaluación del producto

Con el objeto de analizar los cambios durante el procesado y el almacenamiento, se tomaron muestras del tejido fresco (crudo), del tejido recién cocido al vapor y del sometido a 90 minutos de inmersión en solución de enfriamiento con (F) o sin (B) agregado de Fe. Este último punto fue considerado tiempo cero. Posteriormente, se recolectaron muestras de calabacita y de jarabe a los: 1, 3, 7, 16, 23, 30, 47 y 57 días de almacenamiento. Se determinaron los siguientes parámetros:

- pH y a_w:

El pH fue determinado con un electrodo combinado de vidrio – Agº/AgCl conectado a un pH-ímetro (Cole-Parmer, USA). En el caso del tejido, los cilindros fueron reducidos a puré con la ayuda de un homogeinizador.

La a_w tanto del puré como del jarabe fue medida con un higrómetro marca Aqualab Serie 3 (Washington, USA) a 25ºC.

- Humedad y contenido de sólidos solubles en el tejido:

Cilindros de tejido fueron separados para su análisis a tiempo cero y luego de osmotizados por 1, 2, 3, 8, 10, 16 y 23 días. Estos últimos fueron escurridos, enjuagados ligeramente con agua destilada para eliminar el jarabe de la superficie, secados sobre papel "tissue", pesados en balanza analítica, para obtener la masa promedio de cada cilindro a un tiempo determinado, triturados, congelados y liofilizados durante 48 horas para determinar el contenido de humedad. De otras muestras, se tomó tejido del interior de los cilindros del cual se aislaron los líquidos por expresión sencilla para determinar el porcentaje de sólidos solubles o (ºBrix). A tal efecto se utilizó un refractómetro portátil con compensación automática de temperatura Westove® Model RHB 32 ATC (Cole-Parmer Instrument CP, China).

II-2-3-1-Características microbiológicas

Para evaluar la inocuidad así como la estabilidad microbiológica del producto, se redujeron (asépticamente) a puré los cilindros de tejido de calabacita. Se realizaron diluciones seriadas en agua peptona y se llevaron a cabo recuentos de:

- *Bacterias mesófilas aerobias totales* con agar PCA, incubando las placas a 30ºC durante 72 horas.
- *Bacterias lácticas* en agar MRS, incubando las placas a 30ºC durante 72 horas.
- *Hongos y levaduras* en agar Sabouraud, incubando las placas a 25ºC durante cinco días.

Las determinaciones se realizaron por triplicado sobre muestras de los productos envasadas en bolsas plásticas y almacenadas durante 7, 14, 21, 28, 45 y 60 días.

II-2-3-2-Características Organolépticas

- *Caracterización de la textura*

Cada cilindro de tejido de calabacita fue sometido a un ensayo de compresión hasta fractura en una prensa Universal Instron Modelo 1101 (Mass, USA) equipada con una celda de carga de 500 N y un plato paralelo de compresión de 30 mm de diámetro. Se trabajó a una velocidad de cabezal de 5 mm/min. Se utilizaron diez replicados de cada sistema para este ensayo

- *Determinación del color*

Cada cilindro fue reducido a puré mediante un homogenizador y colocado en una cubeta de 3 mm de altura, sobre fondo blanco. Se midieron los parámetros L*, a*,b* en el espacio CIEL*a*b*, utilizando un colorímetro Minolta (Japón), bajo iluminante D65 y con un ángulo de observación de 2º. El espacio CIEL*a*b* está constituido por los ejes: L* que toma valores que van desde 0, para la mínima luminosidad, hasta 100, para la máxima; a* que toma valores desde -86,183 para el verde hasta +98,233 para el rojo; b* que toma valores desde -107,857 para el azul hasta +94,478 para el amarillo. Se realizaron cinco mediciones para cada cilindro, calculándose el valor promedio. Se informa el promedio de las mediciones sobre siete cilindros de tejido reducidos a puré.

Del mismo modo se procedió con siete alícuotas de jarabe, colocándolas en cubetas de 3mm de altura y midiendo los mismos parámetros, sobre fondo blanco.

- *Evaluación Sensorial*

A partir del octavo día de envasado y hasta el día quince se tomaron muestras de los tejidos para los ensayos sensoriales:

Prueba de comparación por pares: esta prueba se llevó a cabo con el objeto de establecer la existencia de diferencias perceptibles en el sabor entre la muestra fortificada con Fe y el control. El método se basa en probar pares de muestras y establecer cuáles de los pares resultan iguales o diferentes; luego se computan la cantidad de respuestas correctas. Se utilizó un panel constituído por 9 jueces, becarios e investigadores de Tecnología de Alimentos (Departamento de Industrias, FCEyN, UBA). El orden en el cual se presentaron las muestras fue balanceado, de tal manera que para un juez una misma muestra apareciera igual número de veces en la posición izquierda que en la derecha dentro del par. Para que el análisis tuviese validez estadística, cada juez evaluó tres pares por día y se realizaron , por lo menos tres réplicas de la experiencia (Pedrero y Pangborn, 1989). Se analizaron un total de 70 respuestas.

Prueba de nivel de agrado: por otro lado, se llevó a cabo una prueba de nivel de agrado tanto para el tejido control como para el fortificado. Con el objeto de evaluar el nivel de agrado que provocaron las muestras, se utilizó una escala no estructurada, también llamada escala hedónica (Pedrero y Pangborn, 1989). Se recopilaron cincuenta respuestas. La escala hedónica se transformó en numérica sobre una escala de nueve puntos. Mediante un test t para varianzas desiguales (α:0,05), se compararon las muestras (Pedrero y Pangborn, 1989).

II-2-3-3-Características nutricionales

- *Determinación de ácido L-(+)-ascórbico*

Jarabe: aproximadamente 6 ml de jarabe de diluyeron en 25 ml de solución de ácido oxálico-1% (p/v). Se tomaron alícuotas de esta solución para la determinación espectrofotométrica de ácido ascórbico, previa reacción con

2,6-diclorofenol-indofenol y posterior extracción del colorante con xileno (Rojas y Gerschenson, 1991).

Calabacita: 20 gramos de tejido fueron desintegrados en presencia de 20 g de solución de ácido oxálico-1% (p/v) con la ayuda de un homogenizador. El homogenato fue diluído a 100 ml en un matraz aforado con solución de ácido oxálico-1% (p/v). La suspensión fue homogenizada por agitación y luego se la dejó decantar. Se tomaron alícuotas del sobrenadante para la determinación colorimétrica de AA según fuera indicado.

Las determinaciones en el tejido como así también en el jarabe fueron realizadas por triplicado. En el caso del jarabe, se determinó AA a tiempo cero (previo a la inmersión del tejido) y a 1, 3, 7, 16, 23, 30, 47, 57 días de almacenamiento, tanto para el control (B) como para el sistema fortificado con hierro (F). Para el tejido, se determinó AA en el material crudo, en el cocido, a tiempo cero (previo a la inmersión en el jarabe) y a 1, 3, 7, 16, 23 días de almacenamiento tanto para el sistema control (B) como para el fortificado con hierro (F).

- *Determinación in vitro de hierro biodisponible*

La cantidad de hierro biodisponible se analizó luego de ajustar, en principio, la muestra de tejido de zapallo a pH 2,00 e hidrolizar con pepsina a 37ºC con el objeto de simular la digestión en el estómago y, luego, a pH 7,00 con una digestión a 37ºC con solución de pancreatina-sales biliares, para simular la digestión en el duodeno, según la técnica de Cabrera y col. (2004). Para ello, se preparó un homogenato al 8 % (p/v) del tejido en solución de pepsina-HCl. Se ajustó el pH a 2,00 con HCl-6N. En dos erlenmeyers A y B se agregaron respectivamente 25 ml del homogenato y se los incubó a 37ºC con agitación constante (120 oscilaciones/min.) durante 90 minutos. Inmediatamente fueron enfriados en baño de hielo. El contenido del erlenmeyer "A" fue centrifugado a 3000 rpm durante 45 minutos, y el sobrenadante filtrado fue guardado en freezer hasta la determinación de hierro. Al contenido del erlenmeyer "B", se le agregó solución de $NaHCO_3$-0,8 M, hasta ajustar a 7,00 el pH de la suspensión. Luego, se agregó solución de pancreatina-sales biliares-$NaHCO_3$ del mismo pH. Se controló nuevamente el pH y se incubó a 37ºC durante 90 minutos con agitación constante de 120 oscilaciones/min. Luego se enfrió en baño de hielo y filtró a

través de papel de filtro Whatman Nro.40 sin cenizas. El filtrado fue guardado en freezer hasta la determinación de hierro. La determinación fue realizada por triplicado y, además, en tejidos de 16 horas y de 58 días de almacenamiento. El hierro encontrado en los productos de digestión fue comparado con el presente en el tejido fortificado.

Para la determinación de hierro elemental por espectroscopía de absorción atómica (AOAC 953.01, 1997) se utilizó un equipo marca Shimadzu modelo AA 6800, Kyoto, Japón, a λ =248,3; utilizando una llama de aire-acetileno. La determinación se llevó a cabo en los cilindros de tejido de calabacita fortificada, luego de la cocción, después de los 90 minutos de enfriamiento, y una vez alcanzado el equilibrio con el jarabe de ósmosis durante el almacenamiento a los 16, 28, 44 y 58 días. La matriz vegetal, se trató con HNO_3 (70%) y H_2O_2 (80%) en una relación 0.5 g de muestra + 8 ml sc HNO_3 + H_2O_2. Luego se mineralizó en un digestor de microondas cerrado marca CEM (modelo MDS 2000, USA.) previo al análisis por espectroscopía de absorción atómica. También se determinó Fe en los filtrados obtenidos de las digestiones enzimáticas antes mencionadas.

La biodisponibilidad se calculó como: $(Fe_f\text{-}Fe_T) \times 100/Fe_T$.

Donde Fe_f: Fe determinado en el filtrado de las digestiones enzimáticas del tejido y Fe_T: Fe determinado en el tejido correspondiente. (Cabrera y col., 2002).

➔ *Microscopia óptica*

El estado de la MC y la integridad de la PC fueron determinados usando cortes del tejido crudo de calabacita, así como del cocido al vapor y del cocido y equilibrado por ósmosis en el jarabe de a_w reducida. Para ello, se incubaron dichos cortes obtenidos con bisturí en solución 5 x 10^{-6}M de diacetato de fluoresceína (FDA; Sigma, St. Louis, Missouri) durante 25 min (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1970). El FDA fue primero disuelto en acetona en una concentración de 2 mg/ml y se usaron diluciones en buffer fosfato de pH 6,8 que fuera usado en el Capítulo I. La integridad de PC fue evaluada incubando cortes de tejido correspondientes a cada condición arriba indicada, en una mezcla de 2 ml de calcoflúor white al 0,1% en agua y 1 ml del buffer fosfato, durante 25 minutos (Hughes y Mc Culley, 1975).

Se observaron los cortes con un microscopio de fluorescencia (Nikon, Modelo AFX II, Kyoto, Japón), equipado con lentes 10X y usando filtro B (FDA) o BV (calcoflúor). Se realizaron también observaciones al óptico en el mismo microscopio, sin filtros.

II-2-4-Análisis Estadístico

Las regresiones no-lineales y el análisis estadístico de los resultados a través de ANOVA (α: 0,05) seguido por comparaciones múltiples con el test de Tukey para establecer diferencias significativas, se llevaron a cabo utilizando el programa Statgraphics (versión 3.0, SRSC, 1994, Rockville, Md., USA).

II-3-Resultados y discusión

II-3-1-Evolución del pH y de la aw, contenido de sólidos y de agua

Las Figuras 1 y 2 muestran las variaciones del pH y de la a_w del tejido de calabacita y del jarabe durante el almacenamiento y concomitante ósmosis. Inmediatamente después de la cocción los trozos tenían un pH de 5,77. Luego de los 90 minutos de enfriamiento, en solución con vitamina C (B) mostraron un pH de 5,45; mientras que los enfriados en solución conteniendo vitamina C y Fe (F) llegaron a un pH de 5,14. El jarabe de envasado tenía un pH inicial de 3,00. Vale decir que, en las primeras 24 horas de inmersión en el jarabe, la máxima fuerza impulsora másica permitió la rápida transferencia de protones (H_3O^+) al interior del tejido vegetal, produciéndose el mayor salto (una reducción de ≈ 15%). Luego, la fuerza impulsora másica entre el jarabe y los trozos se redujo considerablemente tardando 48 horas en reducir el pH de los trozos de 4,60 a 4,00. Lo mismo se deduce de la observación de la curva de a_w (Fig. 2). Inicialmente los trozos recién cocidos presentaron una a_w de ≈ 1, mientras que el jarabe preparado tenía una a_w inicial de 0,847. Nuevamente, la mayor fuerza impulsora másica se encontró dentro de las primeras 24 horas de inmersión, logrando una reducción de la a_w de los cilindros de calabacita del ≈ 4%.

De las figuras 1 y 2 puede concluirse que un pH de ≈ 4,00 y una a_w ≈ 0,940 fueron alcanzados en los cilindros control (B) siendo la a_w alcanzada coincidente con la calculada de acuerdo con Welti , Vergara (1997) en el Apéndice 1. Los cilindros fortificados con Fe (F) alcanzaron un pH de ≈ 3,60 y una a_w ≈ 0,930. Evidentemente, la hidrólisis ácida de los iones Fe^{2+} contribuyó al descenso adicional del pH, así como al de la a_w, como consecuencia de la fuerte hidratación de los complejos que forma el Fe cuando se disuelve en agua.

$$Fe(H_2O)_6^{2+} + H_2O \rightleftharpoons Fe(H_2O)_5(OH)^+ + H_3O^+$$

$$K_H = 3{,}16 \times 10^4 \text{ (Burriel Martí y col., 1992)}$$

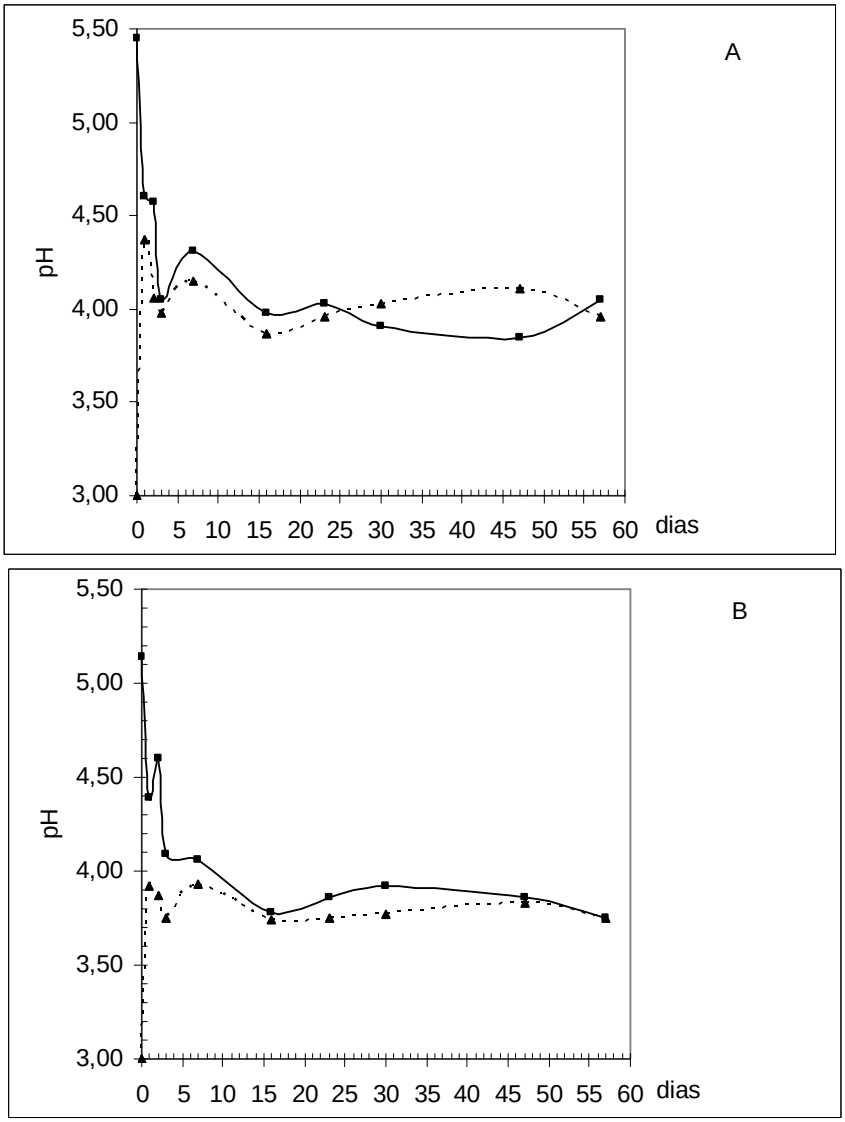


Figura 1. Evolución del pH en el alimento Control (A) y Fortificado con Fe (B); **—■—:** Trozos; ---▲---: Jarabe.

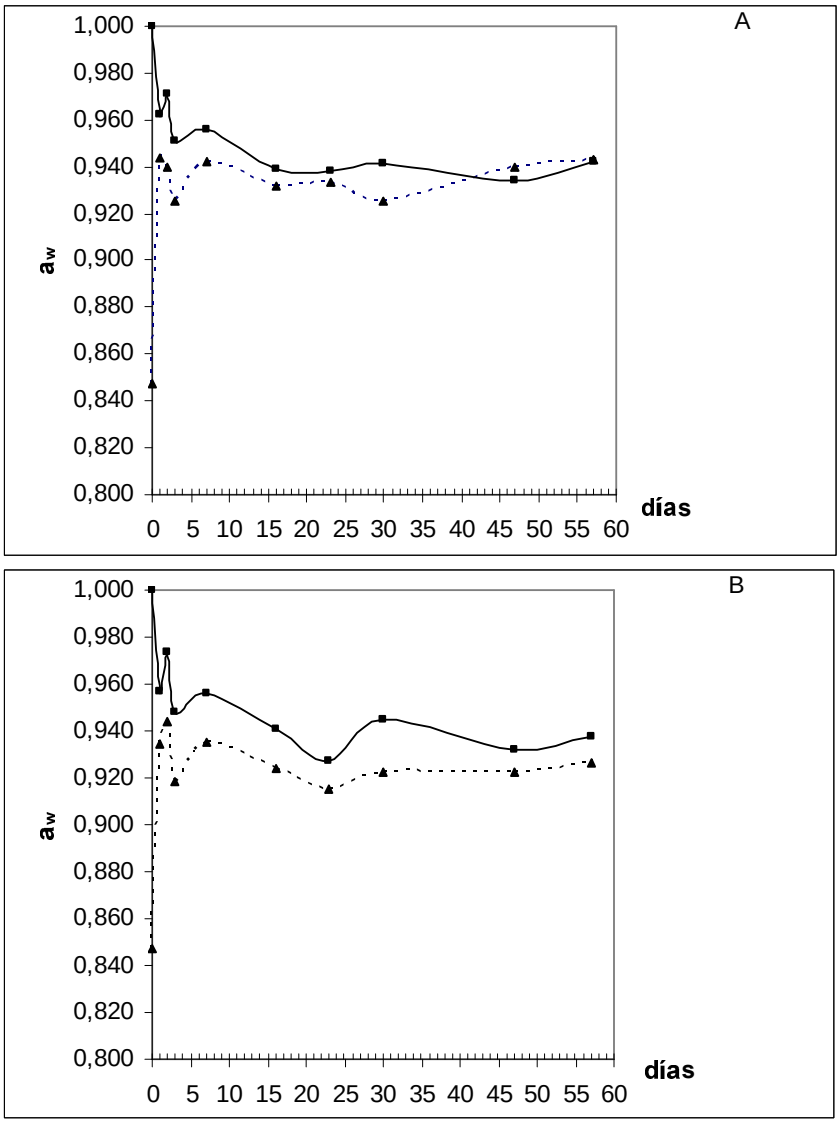


Figura 2. Evolución de la a_w en el alimento Control (A) y Fortificado con Fe (B); —■—: Trozos; ---▲---: Jarabe.

Se llevó a cabo la determinación del contenido de agua y la determinación de los sólidos solubles en el tejido a lo largo de la ósmosis para evaluar el alcance del equilibrio de una manera más acabada.

1) Pérdida de agua:

$$WL = \frac{M^t \times m^t - M^o \times m^o}{M^o}$$

Donde M^t: masa promedio del cilindro a tiempo t; m^t: contenido de agua del tejido a tiempo t [gramos de agua/100g de calabacita, base húmeda]; M^o: masa promedio inicial del cilindro, previo a la osmosis; m^o: contenido de agua inicial del tejido [gramos de agua/100g de calabacita, base húmeda].

2) Ganancia de Sólidos:

$$SG = \frac{M^t \times ss^t - M^o \times ss^o}{M^o}$$

Donde ss^t y ss^o: sólidos solubles en el cilindro del tejido a tiempo t e inicial respectivamente; medidos en ºBrix, es decir, g se sólidos solubles/100 gramos de calabacita base húmeda.

3) Cambio másico neto:

$$\Delta M = WL + SG$$

Con el objeto de validar los datos experimentales obtenidos, el cambio másico neto ($WL+ SG$) fue graficado contra el obtenido mediante la determinación gravimétrica. Del ajuste se obtuvo una recta con pendiente prácticamente 1 y que pasa por el origen, indicando la coherencia de los datos experimentales (Barrera y col., 2004). Luego, se ajustaron los datos mediante un modelado fenomenológico tratando de relacionar valores experimentales de WL y SG en las condiciones operativas para los que fueron determinados (Mascheroni, 2005), de manera tal, de poder evaluar en qué momento se alcanzó el equilibrio y, si la presencia de Fe^{2+} en la matriz del tejido, tuvo algún efecto en esta etapa.

Se probaron varios de los modelos cinéticos reportados en la bibliografía: Modelo de penetración (Silveira y col., 1996; Singh, 2006), de Azuara y de Magee (Singh y col., 2006); modelo de Peleg redefinido por Palou y Barat (Sacchetti, 2001). El mejor ajuste fue obtenido mediante un modelo de primer

orden propuesto por Panagiotou y col. (1998). Ellos estudiaron la deshidratación osmótica de manzana, banana y kiwi en solución de sacarosa y modelaron tanto la cinética de la *WL* como así también la de *SG* como variaciones de "primer orden", independientes entre sí.

$$\frac{d(WL)}{dt} = k_{WL} \times (WL - WL_e)$$

$$\frac{d(SG)}{dt} = k_{SG} \times (SG - SG_e)$$

$$WL = WL_e \times [1 - e^{(-k_{WL} \times t)}]$$

$$SG = SG_e \times [1 - e^{(-k_{SG} \times t)}]$$

Donde: t: tiempo de ósmosis; WL_e: pérdida de agua a tiempo de ósmosis ∞; SG_e: ganancia de sólidos a tiempo de ósmosis ∞; k_{WL}: constante de velocidad de pérdida de agua; k_{SG}: constante de velocidad de ganancia de sólidos. Estos parámetros dependen de las variables operativas (temperatura; ºBrix, etc) y, por lo tanto, son válidos sólo para las condiciones en que fueron determinados.

En las figuras 3A y 3B pueden verse graficadas las curvas obtenidas mediante el ajuste como así también los datos experimentales, para el tratamiento control y para el fortificado con Fe^{2+}. La Tabla 1 muestra la bondad de los ajustes. Los mejores ajustes fueron obtenidos para los valores de ganancia de sólidos. Los datos experimentales permitieron observar que los sólidos se equilibraron en el tejido control, a partir de las 72 horas de envasados, mientras que en el tejido fortificado con Fe^{2+}, el equilibrio se alcanzó entre los 8 y 10 días de envasado. El tejido fortificado presentó una *WL* sorprendentemente alta alejándose de los valores predichos por el modelo durante las primeras 72 horas. Singh y col. (2006) reportaron un incremento de la *WL* y de la *SG* cuando se aumentaba la concentración de NaCl de 5% a 15% en una solución de sacarosa de 50ºBrix. Amami y col. (2006) informaron que el efecto de los pulsos eléctricos sobre tejido de manzana fresco previo a la deshidratación osmótica, fue más pronunciado para la *WL* que para la *SG*. Es preciso señalar, que en nuestro caso, el $FeSO_4$ se incorporó al tejido previamente a la inmersión de éste en el jarabe. Su presencia promovió la pérdida instantánea de agua, hecho que provocaría la compactación masiva de la matriz vegetal, obstaculizando la

entrada de solutos. Para tiempos mayores a tres días, se observa una disminución de la WL.

El tejido de calabaza fue cocido durante 8 minutos, dañando la membrana celular y, de esta manera, la resistencia a la transferencia másica que ella ejerce a la deshidratación osmótica; debiéndose acelerar la transferencia másica (Amami y col., 2006). Las velocidades k_{SG} y k_{WL} tanto para el control como para el fortificado con Fe fueron, aproximadamente, de un orden menor comparadas con las reportadas por Panagiotou y col. (1998) para tejidos de manzana frescos. Esto también puede explicarse por la baja relación jarabe/tejido aquí utilizada y por la ausencia de agitación. Además, es posible que la disposición del alimento dentro de bolsitas no permita una distribución homogénea y, en consecuencia, presente un impedimento cinético adicional. En otro sentido, la manzana presenta un tejido de elevada porosidad y que no contiene almidón. El zapallo, aunque en bajo porcentaje, presenta gránulos de almidón dentro de su citoplasma, fácilmente visibles al microscopio óptico (Fig. 7D). Los mismos gelatinizan al cocinar el tejido al vapor y esto determinaría, también en parte, las menores velocidades k_{SG} y k_{WL} observadas en el presente trabajo, con respecto a aquéllas reportadas por Panagiotou y col. (1998).

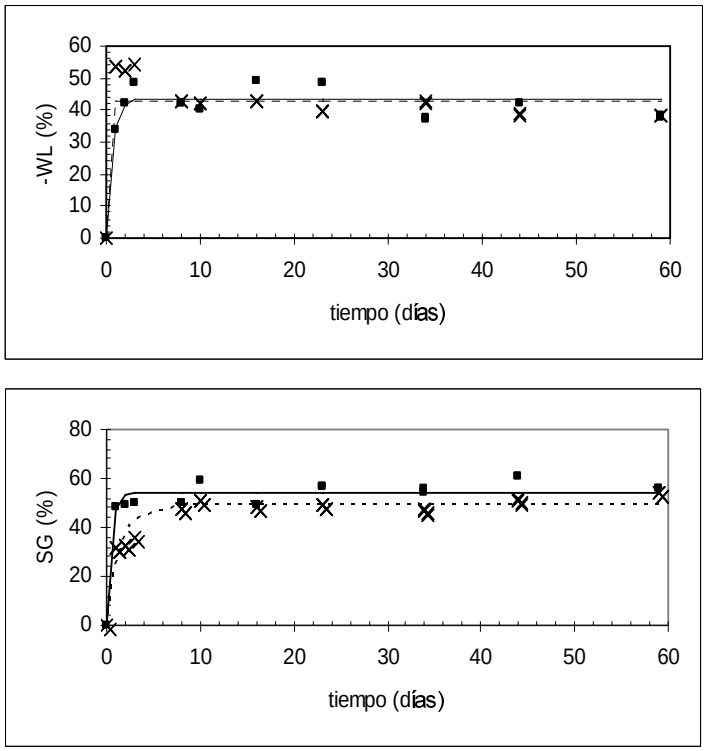


Figura 3: Módulo de la pérdida de agua (WL) y ganancia de sólidos (SG) experimentada por el tejido y ajustada mediante ecuación de primer orden (Panagiotou y col., 1998). —▪— (Control); --x--Fortificado)

Tabla 1: Parámetros y bondad de ajuste de las ecuaciones cinéticas

	Blanco		Fortificado	
k_{WL} [día^{-1}]	1,6 ± 0,3	r^2: 84,3;	44,9283 ± 0,0001	r^2: 73,15;
WL_e [%]	-43,5 ± 0,9	DW: 0,9	-43 ± 1	DW: 0,42
k_{SG} [día^{-1}]	2,0 ± 0,4	r^2: 90,08;	0,68 ± 0,07	r^2: 91,57;
SG_e [%]	54,2 ± 0,9	DW: 0,86	49 ± 1	DW: 1,02

Figura 4: Foto de los cilindros de calabacita procesada y envasada

II-3-2-Calidad microbiológica

Durante el proceso propuesto, se aplicaron buenas prácticas de manufactura, en particular, durante la etapa de envasado, higienizando y sanitizando el área de trabajo y utilizando barbijo y guantes durante el manipuleo de las muestras. Un procesado higiénico, como el que se llevó a cabo, junto con las barreras incorporadas en la formulación del producto (pH reducido; a_w reducido; agregado de sorbato de potasio), contribuyen a la estabilidad del producto desde el punto de vista microbiológico.

El recuento de bacterias aerobias mesófilas totales es un indicador de la calidad higiénica del producto, mientras que los recuentos respectivos de bacterias lácticas, de hongos y de levaduras indican la estabilidad del producto desde el punto de vista del deterioro microbiológico al que pudiera verse sometido durante el almacenamiento.

Los resultados obtenidos se muestran en las Figura 5. Se puede observar que el recuento de aerobios mesófilos a lo largo del almacenamiento no supera los 6×10^2 UFC/g para ambas formulaciones.

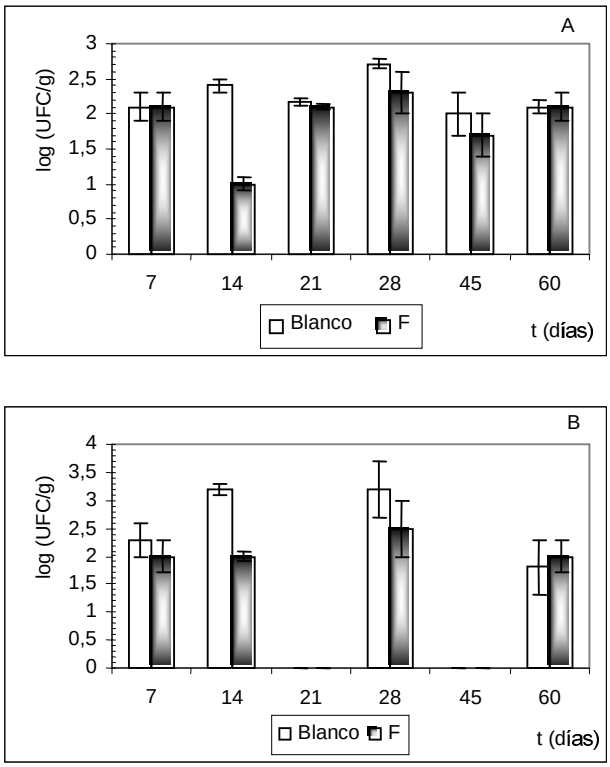


Figura 5: Recuento de: (A) Bacterias aerobias mesófilas totales en agar PCA; (B) Bacterias Lácticas en agar MRS

Si bien, hasta el día 45 de ósmosis, se observó un menor recuento de bacterias mesófilas aerobias en las formulaciones que contenían Fe, esta diferencia no fue significativa, con excepción del valor obtenido para el día 14, donde el recuento fue un orden menor.

En cuanto a las bacterias lácticas, nuevamente se observó una reducción significativa de las UFC/g el día 14, cuando el producto se encontraba fortificado con hierro. Para el resto de los días, las diferencias encontradas no fueron significativas.

En cuanto a la evolución de los recuentos durante el almacenamiento se observó que:

- Para la formulación sin Fe, no hay diferencias significativas en el logaritmo de los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales a lo largo del tiempo de almacenamiento. Mientras que la formulación con Fe muestra, a los 14 días, un recuento significativamente menor en comparación con el resto de los días.

- El recuento de bacterias lácticas en la formulación control, dio valores significativamente más altos a los 14 y 28 días de almacenamiento, mientras que en la formulación conteniendo Fe no se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo de almacenamiento. En estas conclusiones no se tuvieron en cuenta los días 21 y 45, donde ninguna de las placas incubadas mostró crecimiento de colonias.

Comparando los recuentos de bacterias aerobias mesófilas totales del producto con aquellos que figuran como valores máximos permitidos en el CAA art. 1340 item D y E: para Alimentos Dietéticos o Alimentos para Regímenes Especiales (Item D: Productos listos para consumo y E: Productos para lactantes y niños de corta edad), los cuales son de 3 $x10^4$ -5 $x10^5$ UFC/g, los valores obtenidos se encuentran muy por debajo de lo establecido, garantizando así la inocuidad de este producto. Cabe recordar que el objetivo del presente trabajo fue desarrollar un producto funcional (matriz nutricional), que además fuera apto para ser consumido directamente (sin preparación previa) y que fuera económico garantizando, en primera instancia, la calidad del mismo desde el punto de vista microbiológico.

El máximo recuento de hongos y levaduras se observó a los 45 días de almacenamiento, siendo éste menor a las 100 UFC/g, vale decir que, a lo largo del almacenamiento, el recuento de hongos y levaduras del producto se encontró siempre muy por debajo del valor máximo permitido por el CAA (art 1340) de 10^3 UFC/g.

II-3-3-Características organolépticas

II-3-3-1-Textura

En la Figura 6 se muestra una curva característica de la compresión de un cilindro de mesocarpio de calabaza cocido al vapor durante 8 minutos. Si se la compara con aquéllas mostradas para el tejido fresco en el Capítulo 1 (Figura 2), claramente puede verse que se ha roto la integridad tisular durante la cocción al vapor, al no mostrar el punto de fractura característico que se señala en los gráficos del tejido fresco. Llano y col., 2003 reportaron que la rotura de membrana celular en kiwi escaldado al vapor durante 5 minutos estaba estrechamente relacionada a la pérdida de fuerza de relajación residual y de

firmeza del tejido. Ng y Waldron, (1997) informaron que cuando se cocía la papa al vapor durante 20 minutos, la firmeza del tejido se reducía aproximadamente en un orden respecto a la de la papa fresca e involucraba una pérdida del turgor y/o cambios químicos complejos en los polisacáridos de la matriz de la pared celular. Greve y col. (1994) demostraron que la pérdida de textura en zanahorias cocinadas estaba acompañada por y/o, tal vez, ocasionada por una disolución sustancial, depolimerización y aparentemente, destrucción de las pectinas de la pared celular. Un factor en esta rotura es la β-eliminación que sufren las cadenas poliméricas. Lecain y col. (1999) encontraron que el ablandamiento térmico del tejido de cebolla involucraba separación de las células y estaba acompañado por una disolución y depolimerizacion de los polímeros pécticos de la pared celular.

En nuestro caso, el tejido presentó una fuerza de fractura de ≈ 1 orden de magnitud menor a la correspondiente fuerza de fractura del tejido fresco. Se calculó la firmeza, en todos los casos, como el cociente entre la fuerza de fractura y la deformación sufrida por el tejido hasta alcanzar dicha fuerza.

En la Figura 6 se muestra la evolución de las curvas de fuerza-deformación a lo largo del almacenamiento para los cilindros fortificados con hierro. El cilindro recién cocido y enfriado tiene un contenido de sólidos de ≈ 9 % (base húmeda), de los cuales 3% (base húmeda) son sólidos solubles y una a_w ≈ 1. Al entrar en contacto con el jarabe de a_w 0,847, se produce el gradiente máximo para la transferencia de materia, obteniéndose durante las primeras 24 horas, para el sistema B y 72 horas para el sistema F los valores más altos de WL como así también de SG, como ya se destacó en una sección anterior. Así, el tejido del cilindro ganó sólidos y perdió gran cantidad de agua lo que hizo que los trozos se retrajeran (Fig. 6C). Asimismo, ocurrió un deterioro tisular. Todo ello hizo que, entre el primero y tercer día, se observaran firmezas significativamente menores a la registrada para el tejido recién cocido, aún cuando las fuerzas registradas fueron mayores y debido a que las deformaciones aumentaron (Tabla 2). Un fenómeno similar se había analizado en el Capitulo 1, en el caso del tejido plasmolizado, donde si bien había integridad de PC y MC, ésta última estaba tan retraída que disminuía la firmeza a la mitad respecto a la del tejido isotónico, observándose la existencia de un pie inicial, lo que se tradujo en un aumento considerable de la deformación.

Después del tercer día de almacenamiento, las fuerzas impulsoras para la transferencia de materia disminuyeron y ésta siguió ocurriendo pero en forma más lenta. Ello determinó que el tejido recuperara su firmeza a casi los valores previos a la inmersión en jarabe (Tabla 2).

La Figura 7 A muestran las células del tejido recién cocido, mientras que las Figuras 7 C y D muestran las células de tejido fresco. Puede verse claramente, que la cocción aumentó la separación entre las células por degradación significativa de la laminilla media, habiendo pérdida de turgor. La Figura 7B muestra el tejido cocido pero ya equilibrado en ≈ 50º Brix; en este caso, la *WL* hizo que el tejido se retrajera mostrando un acercamiento entre las células.

La misma evolución de textura se observó para el tejido no fortificado (B). Cuando se compararon ambos tratamientos, se notó una reducción significativa de la firmeza para el tejido fortificado con Fe a tiempo cero. Lo que significa que el enfriamiento en solución conteniendo 500 ppm de Fe durante 90 min. no produjo un aumento en la firmeza, como podría ocurrir con la incorporación de otros cationes divalentes, como el Ca^{2+} (Ng y Waldron, 1997; Ng y col., 1999) y Sr^{2+}(Ng y col.,1999). Betoret y col., 2005 demostraron que en el caso del tejido de manzana impregnada con solución acuosa conteniendo Ca^{2+} y Fe^{2+} , el incremento en la elasticidad de la matriz debía ser atribuida exclusivamente al Ca^{2+}.

Luego, la inmersión en el jarabe hizo que las diferencias en textura entre ambos tratamientos no fueran significativas excepto para un tiempo de 58 días, donde el tejido fortificado (F) mostró una firmeza significativamente menor al control (B) como se observa en la Tabla 2.

Cabe destacar que la cocción al vapor del tejido es favorable en el sentido que no se arrastra el importante contenido de pectinas solubles en agua que presentaría la calabacita, especialmente al estar plasmolizado como consecuencia de la cocción, tal como se observara en el Capítulo I.

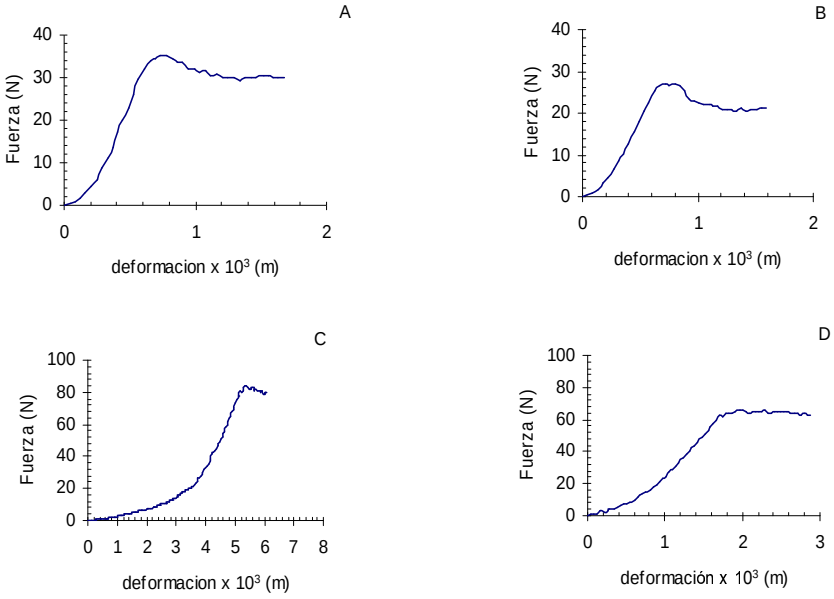


Figura 6: Evolución de la curva fuerza-deformación a lo largo de la ósmosis. A) Cilindro de mesocarpio de calabaza cocido al vapor durante 8 minutos; B) tejido enfriado en solución conteniendo Fe (tiempo 0); C) Idem (B) pero a las 24 horas de ósmosis; D) Idem (A) pero con 23 días de ósmosis .

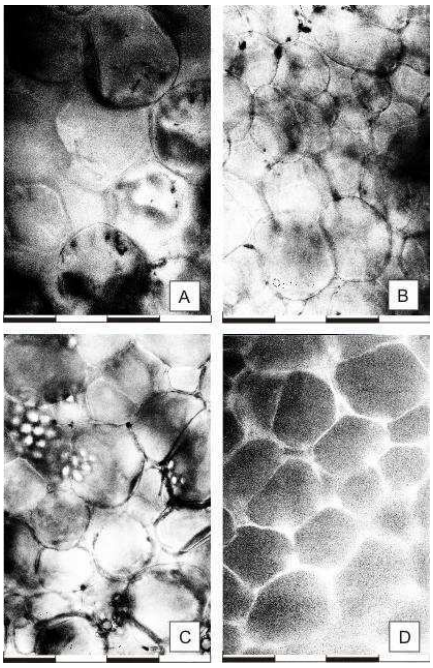


Figura 7: A) Tejido de calabaza cocido; B) tejido de calabaza cocido y equilibrado en jarabe; C) tejido crudo mostrando gránulos de almidón; D) tejido crudo mostrando fluorescencia de pared celular con calcofluor.
Barra: 100 μm.

Tabla 2: Fuerza y Firmezas para los cilindros de tejidos fortificados (F) y controles (B) a lo largo del proceso.

Tiempo [días]	Fuerza [N]		Firmeza x 10^{-3}[N/m]	
	F	B	F	B
Crudo	410 ± 20	410 ± 20	300 ± 20	300 ± 20
Recién cocido	30 ± 10	30 ± 10	40 ± 10^{a}	40 ± $10^{a,b}$
0	25 ± 6	32 ± 4	45 ± 8^{a}*	52 ± $7^{a,b}$*
1	80 ± 30	90 ± 30	21 ± 9^{c}	23 ± 6^{c}
3	80 ± 20	70 ± 10	20 ± 7^{c}	18 ± 4^{c}
7	60 ± 30	60 ± 30	30 ± 10^{b}	40 ± 20^{b}
16	80 ± 40	70 ± 30	50 ± 10^{a}	50 ± 20^{b}
23	50 ± 20	50 ± 20	30 ± $10^{b,c}$	40 ± 20^{b}
30	60 ± 30	70 ± 20	50 ± 20^{a}	60 ± $20^{a,b}$
48	40 ± 10	40 ± 20	50 ± 10^{a}	40 ± 20^{b}
58	27 ± 9	50 ± 30	30 ± $20^{b,c}$*	50 ± 10^{a}*

Los resultados se expresan como (x±d), siendo x el promedio y d, el desvío estándar (n=7).
Letras iguales muestran valores no significativamente diferentes entre diferentes tiempos para cada tratamiento.
*Muestra diferencias significativas entre tratamientos

II-3-3-2-Evaluación del color

Jarabe

En la Figura 8 se muestra la diferencia de color producida en el jarabe almacenado con cilindros de calabacita con (F) y sin (B) agregado de hierro. La diferencia de color registrada durante la primera semana se debe fundamentalmente a cambios en los parámetros de a* y b*: el jarabe F es significativamente más verdoso (valores de a* más negativos) y amarillento (valores de b* mas altos) que B; posiblemente la mayor *WL* registrada para los cilindros fortificados con Fe, durante los primeros días, haya sido acompañada de iones Fe^{2+} y otros pigmentos. No se vieron diferencias significativas en la luminosidad (L*). A partir del día 16, el jarabe F comienza a ser significativamente más oscuro (menor valor de L*) que el jarabe B; esto podría deberse, en parte, a la degradación del ácido L-(+)-ascórbico, como se discutirá más adelante. El día 23 se observa la máxima diferencia de color debido a que

los tres parámetros difieren significativamente. A los 30 y 48 días de almacenamiento ambos jarabes son igualmente oscuros pero F sigue siendo más verdoso y amarillento que B. Por último, a los 58 días no hay diferencias significativas en ninguno de los tres parámetros a*, b* y L*.

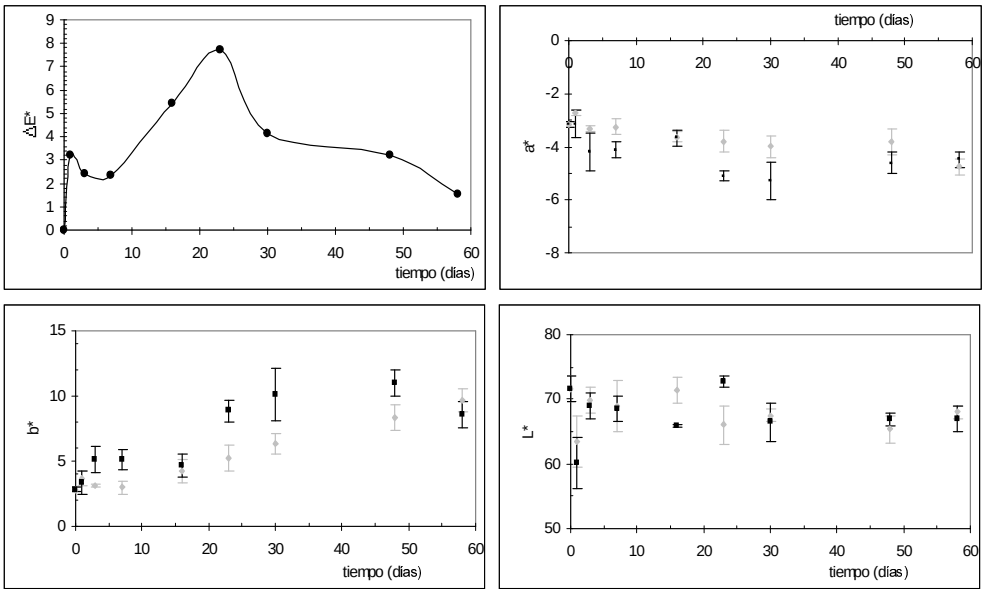


Figura 8: Diferencia de color del jarabe (ΔE*) entre tratamientos B y F, ocurridos a lo largo del tiempo. Variaciones en las coordenadas cromáticas a* y b*; y en la luminosidad (L*) a lo largo del almacenamiento para B (♦) y para F(■).

Trozos:

La evaluación del color obedece a dos cuestiones fundamentales:

- la aceptabilidad organoléptica: la apariencia visual es la primera cualidad considerada por el consumidor a la hora de abastecerse de un producto (Dutta y col., 2006);
- el aspecto nutricional: se ha encontrado que los cambios en el color son una manifestación directa de los cambios en la concentración de carotenoides (Ahmed, 2002) y, en particular, de β-carotenos (Dutta y col., 2006).

Los carotenoides son un grupo de pigmentos con colores que varían del rojo al amarillo, los cuales están ampliamente distribuidos a lo largo del reino vegetal. Además, tienen la ventaja adicional de tener un alto valor biológico, no sólo porque algunos de ellos tienen actividad de provitamina A sino, también,

porque ayudan a prevenir úlceras, procesos degenerativos y cáncer. Todos estos beneficios posiblemente se deban a sus propiedades antioxidantes (Mingués, 1995). La medición del color por colorimetría triestímulo ha sido aceptada como un método simple y preciso de detección de color comparado con los sistemas espectrofotométricos.

La Tabla 3 muestra la variación de la luminosidad L*, y de las coordenadas cromáticas a* y b* en el tejido de calabacita. En este análisis se ha considerado como tiempo cero al momento final de la cocción, siendo 0,0625 días el tiempo que le corresponde al punto después del enfriamiento de 90 minutos en la solución fortificada con Fe y adicionada con ácido L-(+)-ascórbico y con sorbato de potasio.

El enfriamiento en una solución fortificada no dio una variación de color apreciable respecto al cilindro recién cocido, ya que ninguno de los tres parámetros presentó diferencias significativas. Luego de la inmersión en el jarabe y durante las primeras 24 horas donde ocurrieron las mayores *WL* y *SG*, acompañadas de cambios drásticos en el pH y en la a_w, se observó un cambio importante en el color ocasionado, fundamentalmente, por una pérdida del color amarillo notándose un cambio en el parámetro b* de más del 40%, mientras que el parámetro a* no mostró diferencias significativas como así tampoco, en esta primera etapa, se oscureció el material. Posiblemente la *WL* haya estado acompañada de pigmentos que pasaron al medio externo, como se propuso al analizar los cambios de color en el jarabe. Luego y hasta el día 7, se restablece parcialmente el color amarillo al aumentar b* pero comienza a oscurecerse el material (disminuye L*) y a perder significativamente su color rojo (disminuye a*). A partir del día 16 comienza un oscurecimiento progresivo y significativo hasta el día 30. Y nuevamente una pérdida del color amarillo progresiva y significativa que continúa hasta el final del almacenamiento. Mientras que el parámetro a* solo muestra un cambio significativo a partir del día 48, donde vuelve a mostrar una pérdida del color rojo.

Tabla 3: Variación en la luminosidad L*, y en los parámetros a* y b* a lo largo del proceso y del almacenamiento del tejido fortificado con Fe.

Tiempo [dias]	L*	a*	b*
0	55±3[a]	25±4[a,b]	92±4[a]
0,0625	53±1[a]	26±4[a]	89±2[a]
1	56±4[a]	22±4[b,c]	54±5[e]
3	44±3[b,c]	20±3[c,d]	74±5[b]
7	47±3[b]	20±2[c,d]	77±3[b]
16	40±5[d]	20±2[c,d]	67±7[c]
23	34±2[e]	20±2[d]	59±3[d]
30	33±2[e]	18±3[d]	57±2[d,e]
48	42±3[c,d]	14±2[e]	33±5[f]
58	40±2[d]	13±1[e]	30±2[f]

Dutta y col. (2006) atribuyeron la pérdida de luminosidad del puré del zapallo (reducción de L*) a la formación de compuestos oscuros como resultado de la degradación de los pigmentos, mientras que la pérdida del color anaranjado, que se traducía en una reducción de las coordenadas cromáticas (a*, b*) fue atribuída a la isomerización geométrica del β-caroteno. Por último, ellos propusieron que también pudo causar degradación del color el pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard). En nuestro caso, la degradación de ácido L-(+)-ascórbico incorporado, puede generar pardeamiento y contribuir, de este modo, a la pérdida de luminosidad L* (Rojas, 1995).

La cinética de degradación tanto de los pigmentos como del color sigue una cinética de reacción de 1er orden (Dutta y col., 2006; Ahmed y col., 2002 a,b). Un modelo cinético de 1er. orden se puede representar como:

$$\ln \frac{C}{C_0} = -k \times t$$

Donde: C_0: concentración inicial de β-carotenos o valores medidos de color (L*, a*, b*) o una combinación de estos a tiempo cero (adimensional); C: concentración de β-carotenos o valores medidos de color (L*, a*, b*) o una combinación de estos a tiempo t (adimensional); k: constante de velocidad de

reacción [1/día] a 25ºC; *t*: tiempo de almacenamiento. La conversión fraccional (*f*) es una variable conveniente a menudo utilizada en lugar de la concentración:

$$f = \frac{(C_0 - C)}{(C_0 - C_\infty)}$$

Donde C_∞: es la medición del pigmento o valor de color a tiempo infinito, cuando se espera que la reacción se haya completado. En nuestro caso serían los valores tomados a los 60 días de almacenamiento. Entonces resulta:

$$\ln \frac{C}{C_0} = \ln(1 - f) = -k \times t$$

Ya que el color mayoritario del zapallo es una mezcla de amarillo y rojo, los valores CIE a* y b* se consideraron como parámetros físicos para describir la degradación visual del color a lo largo de la ósmosis y almacenamiento. Se utilizó el producto a*b* (Ahmed y col., 2002) y entonces se define *f* como:

$$f = \frac{a^*_0 \times b^*_0 - a^* \times b^*}{a^*_0 \times b^*_0 - a^*_\infty \times b^*_\infty}$$

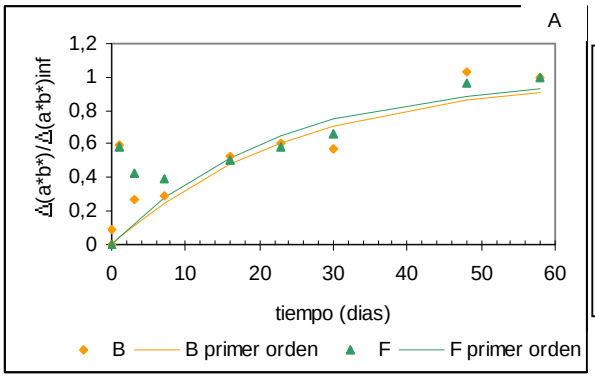
Igualmente, se ajustó la diferencia total de color ΔE*, calculada a partir de la ecuación:

$$\Delta E^* = \sqrt{(a^* - a^*_0)^2 + (b^* - b^*_0)^2 + (L^* - L^*_0)^2}$$

La cinética de conversión factorial también se utilizó para modelar los parámetros ΔE*. Entonces:

$$f = \frac{\Delta E^*}{\Delta E^*_\infty}$$

En la Figura 9 A y B se pueden observar tanto los valores medidos como aquellos predichos por la reacción de primer orden. Es preciso aclarar que tanto los valores del día 1 para el tejido B como aquellos correspondientes a los días 1 y 3 del tejido F no fueron tenidos en cuenta, ya que el cambio de color observado fue fundamentalmente debido a un fenómeno de transferencia másica de pigmentos desde la matriz del tejido al jarabe, más que debido a un fenómeno de degradación, que si bien pudo haber acontecido, éste se vio ampliamente distorsionado por el primero. La constante de velocidad *k* [día^{-1}], y la bondad del ajuste de cada caso se muestran en los recuadros respectivos.

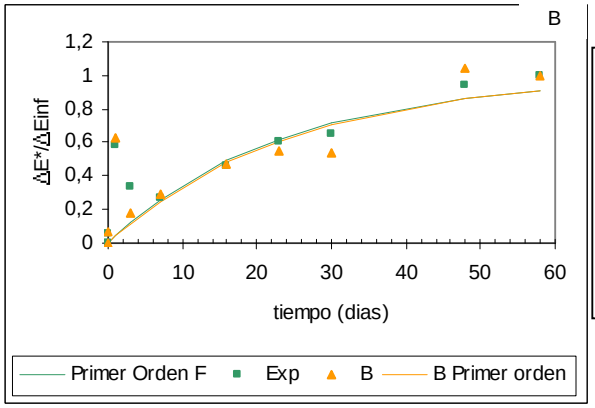


k_B: (0,045±0,006) día^{-1}

r^2: 91,88, DW: 1,76

k_F: (0,046±0,005) día^{-1};

r^2: 96,40, DW: 1,74



k_B: (0,040±0,006) día^{-1};

r^2: 92,45, DW: 1,86

k_F: (0,042±0,003) día^{-1};

r^2: 97,60, DW: 1,43

Figura 9 A y B: Cambios de color observados en los cilindros de calabacita a lo largo del proceso y almacenamiento. Ajuste de los valores de acuerdo a una cinética de conversión factorial de primer orden.

De acuerdo a lo observado se puede concluir que, en las condiciones de este ensayo, la presencia de Fe^{2+} en la preparación no afectó significativamente la velocidad de degradación del color y, por lo tanto, la de los carotenoides, principalmente β-carotenos, asociados. Las velocidades de reacción *k* obtenidas, fueron de, aproximadamente, un orden menor a aquellas reportadas por Dutta y col. (2006) para el puré de zapallo, o a las obtenidas por Ahmed y col. (2002) para puré de papaya, ambos tratados térmicamente. Sin embargo, los valores obtenidos en nuestro ensayo son semejantes a los encontrados por Mingués-Mosquera y col (1995). Ellos informaron una velocidad de decoloración del β-caroteno a 25ºC de 0,003 h^{-1} cuando la reacción transcurría en la oscuridad. Los resultados obtenidos pueden deberse a la presencia de ácido L-(+)-ascórbico en el jarabe de nuestra formulación, el cual pudo haber ejercido algún efecto protector del color, debido a su capacidad reductora, además, a que el ensayo se realizó en una cámara al abrigo de la luz.

A pesar de los cambios comprobados con el colorímetro, ninguno de los cilindros de calabacita presentó, visualmente hablando, un aspecto desagradable. En todo momento, éstos mantuvieron un color más claro y cercano al original de la calabacita, que el que presenta el tradicional "zapallo en almíbar", ampliamente conocido y aceptado por el consumidor.

II-3-3-3-Evaluación Sensorial

Los compuestos de hierro muy solubles en agua, como el sulfato ferroso, aportan hierro de alta biodisponibilidad. Sin embargo, este tipo de compuestos son altamente reactivos pudiendo provocar cambios desagradables de las características sensoriales del alimento. En general, este tipo de compuestos no pueden ser utilizados en alimentos líquidos, como agua o gaseosas, ya que provocan sabores metálicos desagradables (Salgueiro y col., 2002). En nuestro caso, el hierro incorporado a nuestro producto no provocó cambios de textura ni de color significativos.

Con el objeto de analizar cambios en el sabor, se llevó a cabo una prueba de comparación por pares. Este método es fácil y sencillo de realizar; es el más preciso de todos los métodos de diferencia, ya que cada muestra sirve a su vez como estímulo y como patrón. El método de comparación por pares, en una de sus aplicaciones, permite determinar diferencias *per se*, sin la necesidad de definir un parámetro (Pedrero y col., 1989). En aquellas pruebas de comparación por pares que soliciten simplemente diferencias (sin dirección), vale decir se pregunta al evaluador si son iguales o distintas, como en nuestro análisis, los resultados se compararan con los valores de tablas estadísticas de *dos colas*.

Se analizaron los resultados de 70 respuestas. De la tabla estadística (Pedrero y col., 1989), el número mínimo de juicios correctos para establecer significatividad al analizar 70 pares de muestras, es de 44 para un nivel de probabilidad de α: 0.05; 47 para un nivel de probabilidad de α: 0.01 y de 48 para un nivel de α: 0.005. En nuestro ensayo, se obtuvieron 41 respuestas correctas, con lo que se puede concluir que el panel evaluador no logró identificar diferencias en el sabor, incluso dentro del nivel más bajo de significancia (α: 0,05).

Por otro lado, se realizó una prueba de agrado hedónica. La escala utilizada se convirtió en numérica, transformando a centímetros la distancia

entre los dos extremos del continuo, y midiendo el punto de respuesta indicado por el juez consumidor (Pedrero y Pangborn, 1989). Los valores promedio obtenidos fueron de 5,8 y de 5,6 para el producto fortificado (F) y para el control (B) respectivamente, sobre una escala de 9 puntos. Una prueba t para dos muestras con varianzas desiguales permitió concluir que ambas muestras son igualmente aceptables frente a un consumidor (Pedrero y Pangborn, 1989).

II-3-4-Características nutricionales

II-3-4-1-Determinación de ácido L-(+)-ascórbico

La cantidad de ácido L-(+)-ascórbico encontrada en el tejido crudo de *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret (≈ 2 mg %) está por debajo de los valores tabulados en bibliografía para tejidos de zapallo (McCance y Widdowson, 1991). Éste, al igual que otros micronutrientes, puede variar de modo significativo dependiendo de la variedad, lugar y momento de cosecha, tratamiento, etc. La fortificación con vitamina busca no sólo aumentar sino, además, estandarizar este valor en el producto elaborado. Luego de la cocción de 8 minutos al vapor, no logró detectarse ácido L-(+)-ascórbico en los trozos dentro de la sensibilidad de nuestra determinación.

Luego de la cocción, los cilindros de calabacita fueron enfriados durante 90 minutos en soluciones que contenían 500 ppm de ácido L-(+)-ascórbico. La primera incorporación del mismo, ocurrió durante esta etapa pasando a registrarse (9,2±0,6) y (10,6±0,2) mg de ácido L-(+)-ascórbico por 100g de calabacita para los tejidos B y F, respectivamente. A posteriori, los cilindros de tejido fueron cubiertos por un jarabe que contenía 500 ppm de ácido L-(+)-ascórbico y envasados. Durante las primeras 24-72 hs ocurrió la mayor transferencia de ácido L-(+)-ascórbico desde el jarabe al tejido. En la Tabla 4 puede verse que el tejido fortificado con Fe^{2+} presenta menos ácido L-(+)-ascórbico que el control (B). El mismo impedimento cinético que introdujo el Fe^{2+} a la *SG* podría, tal vez, explicar la menor penetración del ácido L-(+)-ascórbico al interior del tejido. Luego se mantuvo sin variaciones hasta el día 16 donde se vió que comenzaba una reducción significativa del contenido de ácido L-(+)-ascórbico en el tejido tanto fortificado con Fe (F) como el control (B). Para tiempos mayores a los 16 días de almacenamiento, se observan valores de

ácido L-(+)-ascórbico iguales o por debajo de los del producto original. La destrucción del ácido L-(+)-ascórbico podría explicar el oscurecimiento de los cilindros observada al día 23, según se informó previamente.

Tabla 4: Determinación de ácido L-(+)-ascórbico en el tejido a lo largo del tratamiento y almacenamiento.

Tiempo [días]	Vitamina C [mg %] base húmeda	
	B	**F**
Crudo	2	2
0	9,2±0,6	10,6±0,2
1	21±1	13,7±0,6*
3	27±4	21±3
7	22±3	21±8
16	28±9	21±2
23	5±2	4,60±0,01

*Indica diferencias significativas entre tratamiento

Conociendo la cantidad de vitamina en los cilindros y en el jarabe y, además, la relación jarabe/cilindros (≈ 0,698/0,302) informada en la sección de Materiales y Métodos, se puede calcular la cantidad total de ácido L-(+)-ascórbico en el sistema. Teniendo en cuenta que la cinética de degradación del ácido L-(+)-ascórbico es de orden 1, se pudo calcular la velocidad de degradación (k) para el sistema fortificado con Fe (F).

$$\frac{C}{C_0} = e^{-k_F \cdot t}$$ Ecuación para sistema fortificado con Fe (F).

El sistema control (B) mantuvo constante el contenido de ácido L-(+)-ascórbico durante la primera semana de almacenamiento. En este caso el modelo elegido para el ajuste de los datos experimentales tuvo en cuenta la existencia de un valor constante $C/C_0 \approx 1$ para $t \leq 7$ días. Si se consideran $t > 7$ días y se nomencla este valor constante como "S" y el tiempo al que comienza la disminución de C/C_0 como "t_0", se puede proponer el siguiente modelo:

$$\frac{C}{C_0} = S \cdot e^{-k_B \cdot (t - t_0)}$$ Ecuación para sistema control (B).

En la Figura 10 se muestran las predicciones de pérdida de ácido L-(+)-ascórbico con los valores de *k* calculados a partir de las regresiones y los valores obtenidos experimentalmente tanto para el producto fortificado con Fe (F) como para el control (B).

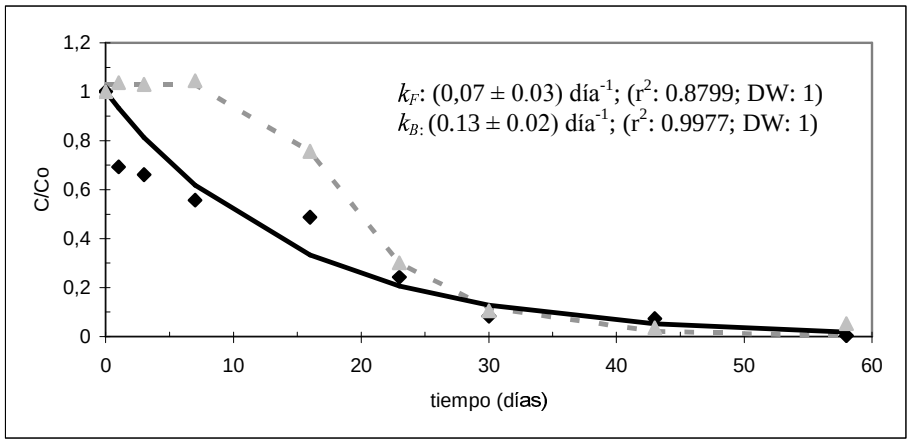


Figura 10: Predicción de la pérdida de ácido L-(+)-ascórbico y valores experimentales determinados para los sistemas fortificado (F) —♦— y control (B) --▲--

Los valores de *k* obtenidos mediante las regresiones no mostraron diferencias significativas entre ambas formulaciones con (F) y sin (B) hierro. Durante la primera semana de almacenamiento el sistema B mantuvo constante la cantidad de ácido L-(+)-ascórbico, siendo recién la pérdida más significativa a partir del día 16. En cambio para F, la pérdida de vitamina C para todo el sistema pudo observarse ya dentro de las primeras 24 horas posteriores al envasado.

La vida media, la cual se define como el tiempo que transcurre hasta alcanzar una relación de C/Co = 0,5 puede evaluarse a partir del gráfico, siendo de 12 días para el sistema F y de 20 días para el sistema B.

La reducción del contenido de ácido L-(+)-ascórbico de los sistemas está determinada fundamentalmente por la reducción de la cantidad de ácido L-(+)-ascórbico en el jarabe ya que, como se observó en la Tabla 4, el tejido mantiene constante la cantidad de ácido L-(+)-ascórbico prácticamente hasta el día 16 posterior al envasado. Por otro lado, el jarabe es la parte del producto en contacto con el envase y, por lo tanto, más expuesto al efecto del oxígeno. Probablemente la destrucción de ácido L-(+)-ascórbico procede desde un

principio (Fig. 10) en el sistema fortificado F porque el ácido ascórbico está siendo consumido como buffer redox del Fe^{3+}/ Fe^{2+}.

II-3-4-2-Hierro biodisponible

Por espectroscopía de absorción atómica se determinó el Fe retenido por el tejido que fuera enfriado en la solución conteniendo la sal ferrosa. También se determinó la cantidad de Fe tanto en el tejido como en el jarabe del producto almacenado en bolsitas de polietileno, luego del equilibrio a los 16, 28, 44 y 58 días.

Durante el enfriamiento de los cilindros de calabacita por 90 minutos en la solución fortificada con 500 ppm de Fe, el tejido llegó a retener Fe en una concentración de ≈ 200 ppm. Luego del equilibrio el ≈ 25% había pasado al jarabe, encontrándose en el tejido un contenido de hierro de 110±50 ppm y en el jarabe 54±8 ppm.

La ingesta diaria recomendada para niños mayores de 4 años y adultos es de 18 mg, mientras que para mujeres embarazadas y en períodos de lactancia, es de 21 mg y para niños menores a 4 años, de 12 mg, según lo establecido en el CAA art.1363, 1363 bis y de acuerdo a datos del 8vo. Congreso Argentino de Nutrición (Buenos Aires, 1983). Datos más actualizados indican la recomendación discriminada por sexo y por edad (Anónimo, 2001). Vale decir pues, que la porción de ≈ 45g de calabacita de cada envase de polietileno estaría cubriendo el ≈ 30% de la ingesta diaria recomendada (IDR) por el CAA de 18 mg.; valor que se incrementa al ≈ 55% si, además, se ingiere el almíbar. Cabe destacar en este punto que, la misma legislación, pero en el capítulo de Aditivos Alimentarios, establece que cuando el Fe es considerado como aditivo o parte de éste, se recomienda que no contenga más de 50 mg de Fe por kg global (Art 1398). Sería conveniente, entonces, reducir la cantidad de hierro incorporada a la cuarta parte y por otro lado aumentar la porción de 45 g a 180 g para cubrir el ≈ 30% de la IDR. Vale decir, que los efectos de la incorporación de Fe en las condiciones aquí ensayadas, están analizadas en un caso extremo.

Con el objeto de evaluar la biodisponibilidad del hierro, una alícuota de los cilindros escurridos se sometió a digestión con pepsina a pH 2,00. Sobre el sobrenadante filtrado se determinó Fe detectándose valores de (90±2) ppm, que

representa la cantidad de hierro biodisponible al pH estomacal. Luego con una digestión adicional con pancreatina y sales biliares a pH 8, se determinó el contenido de Fe en el sobrenadante filtrado dando, en este caso, un valor de (120±20) ppm, que representa la cantidad de hierro biodisponible al pH intestinal. Comparando este último valor con aquél que contenían los cilindros previo a la digestión se puede concluir que el 100% del Fe presente estuvo biodisponible de acuerdo a ensayos *in vitro* del material.

Una relación molar de Vitamina C: Fe de 4:1 es la recomendada por algunos autores (Pellegrino y col., 1996) en la fortificación de productos lácteos como el óptimo para la biodisponibilidad. En nuestro caso, la relación fue casi de 2:1 hasta el día 16, ya que luego la degradación de vitamina redujo su contenido, como se vió durante el análisis del sistema. Binaghi y col. (2005) encontraron que la biodisponibilidad del Fe en el pan elaborado a partir de harinas fortificadas se veía mejorada cuando se lo consumía acompañado de puré de zapallo mientras que era seriamente afectada cuando se lo consumía con puré de papas o de bananas. Los autores informaron que la presencia de grupos fenólicos en estos tejidos eran los responsables de la reducción de la biodisponibilidad. Como se informó en el Capítulo I, no se pudo observar lignificación ni ácido ferúlico (compuestos fenólicos) en el tejido de calabacita, siendo ésta, posiblemente, una de las razones que explica la biodisponibilidad del Fe y la elección de este tejido como matriz portadora del micronutriente. Otra explicación puede ser la presencia de β-carotenos que le confieren el color característico. En los últimos años diversos estudios han demostrado que la vitamina A y más aún los beta-carotenos, aumentan significativamente la biodisponibilidad. No está completamente dilucidado el mecanismo, pero se cree que se forman complejos que mantienen soluble al hierro en el lumen intestinal, previniendo de esta forma, efectos inhibitorios de otros componentes de la dieta tales como taninos y polifenoles (Boccio, 2004).

II-4-Conclusiones.

Se desarrolló un alimento funcional en base a una matriz rica en fibra y fortificado con Fe, a partir de calabacita (*Cucurbita moschata,* Duchesne ex. Poiret). Este alimento tiene características de listo para consumir.

La incorporación del hierro, aún en dosis extremas no presentó diferencias significativas desde el punto de vista microbiológico y organoléptico, en las condiciones aquí ensayadas, con respecto al tejido sin fortificar con Fe. El hierro presenté mostró alta biodisponibilidad. Para un desarrollo comercial del producto hay que considerar una fortificación cuatro veces menor para respetar la recomendación de la legislación.

El tejido presentó una textura firme luego de 8 minutos de cocción al vapor (no se desintegró).

Si bien durante las primeras 24-72 horas posteriores a la inmersión en jarabe, se observan cambios significativos en la textura y el color, luego de ese lapso y alcanzado el equilibrio con el jarabe de envasado el producto presentó buena estabilidad microbiológica, como así también organoléptica (textura, color y sabor).

Tanto el oscurecimiento del tejido de los cilindros como el del jarabe, podría deberse a la degradación de vitamina C en el medio. Aún con estos cambios, este producto sigue teniendo un color más claro y natural que el color del tradicional "zapallo en almíbar" ampliamente conocido y aceptado por el consumidor.

Desde el punto de vista nutricional, se debería sugerir al consumidor ingerir junto con los trozos, el jarabe ya que un 25% del Fe que contenían los cilindros difunde al mismo.

El alimento fue microbiológicamente estable durante los 60 días de ensayo. Sin embargo, el contenido de ácido L-(+)-ascórbico, se redujo drásticamente aproximadamente a los 23 días, se alcanzaron valores cercanos a los de la materia prima original.

Como ya se mencionó anteriormente, la calabacita se produce ampliamente en todo el país, teniendo disponibilidad de materia prima fresca casi durante todo el año, lo que permite pensar en un alimento económico y accesible a una amplia franja de la población.

II-5-Referencias

Abbott J.A., Klein J.D., Campbell T.A., Conway W.S., Sams C.E. 2000. Sensory and firmness measurements of calcium and heat treated apples. *Journal of Textural Studies* 31 (1): 109-121.

Adams M.R., Moss M.O. 1997. *Microbiología de los Alimentos.* Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Ahmed J., Shivhare U.S., Raghavan G.S.V. 2000a.Rheological characteristics and kinetics of color degradation of green chilli puree. *J Food Eng* 44: 239-244.

Ahmed J., Shivhare U.S., Sandhu K.S. 2002. Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. *Food Engineering and Physical Properties*. 67 (7): 2692-2695.

Ahmed J., Shivhare U.S., Singh G. 2000b. Chlorophyll and color of green chilli puree as affected by mesh size and temperature. *Intern J Food Properties* 4: 305-316.

Amami E., Vorobiev E., Kechaou N. 2006. Modelling of mass transfer during osmotic dehydration of apple tissue pre-treated by pulsed electric field. *LWT* 39: 1014-1021.

Anónimo. 2001. Fuente: The National Academic Press. Disponible de http://www.nap.edu/catalog11537.html.

Anónimo. 2004a. Intentan evitar la anemia infantil. Fuente: Diario *La Nación.* Disponible desde http://www.nutrar.com/imp.asp?ID=5303.

Anónimo. 2004b. República Dominicana: hay 80000 embarazadas con anemia. 2004. Disponible de: http://www.nutrar.com/imp.asp?ID=6409.

Anónimo. 2006a. Sobre alimentos Funcionales. Disponible de http://www.eufic.org/sp/quickfacts/alimentos funcionales.htm.

Anónimo. 2006b. Qué son los alimentos funcionales o nutraceúticos?. Disponible de: http://www.chocolates.com.co/nut_que.htm.

Anónimo. 2006c. New foods for new lifestyles-Where are we getting our vitamins and minerals from?. Disponible de http://www.eufic.org/sp/quickfacts/alimentos

Anónimo. 2006d. Producción alimentaria**:** Cuál es el siguiente paso?. Disponible de http://www.eufic.org/sp/tech/tech04.htm.

AOAC (1990). *Oficial methods of analysis of Association of official analytical chemists (15th ed.).*

Barrera C., Betoret N., Fito P. 2004. Ca^{2+} and Fe^{2+} influence on the osmotic dehydration kinetics of apple slices (var. Granny Smith). *J of Food Eng* 65: 9-14.

Betoret N., Martinez-Monzó J., Fito P.J., Fito P. 2005. Calcium and iron distribution in fortified vacuum-impregnated fruits determined by electron dispersion X-ray microanalysis. *J Food Sci* 70 (1): E26-30.

Binaghi M.J., Greco C.B., López L.B., Ronayne P.A., Valencia M.E. 2005. Influencia de distintos componentes de la dieta sobre la biodisponibilidad potencial de hierro. *Actas del X Congreso de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CyTAL). Mar del Plata, Argentina.*

Boccio J. 2004. Fortificación de alimentos como estrategia para prevenir la deficiencia de hierro y zinc. Ventajas y desventajas desde el punto de vista nutricional y tecnológico. Disponible desde http://www.nutrar.com/files/4907.pdf.

Boletín Oficial. 2002. Ley Nro. 25630 Establécense normas para la prevención de las anemias y las malformaciones del tubo neural. Organismo de control. B.O. Nro. 29968.

Boletín Oficial. 2003. Decreto 597/2003 Apruébase la reglamentación de la Ley Nro. 25630 de prevención de las anemias y las malformaciones del tubo neural. B.O. Nro. 30213.

Burriel Martí F., Lucena Conde F, Arribas Jimeno S., Hernández Méndez J. 1992. *Química analítica cualitativa*. Editorial Paraninfo, Madrid, España.

Código Alimentario Argentino. De la Canal y Asociados SRL.

Cabrera M.C., del Puerto M., Ramos A., Saadoun A., Marchesoni A. (2002). Evaluación de la biodiponibilidad del P orgánico e inorgánico a través de la solubilidad "*in vitro"* y utilización "*in vivo*". *Agrociencia* VI (1): 69-78.

Castro M.P., Garro O., Campos C..A., Gerschenson L.N. 2002. Interactions between additives: its effect on sorbate stability and *Z. bailii* minimum inhibitory concentration in model aqueous systems resembling salad dressings. *Food Sci and Technol Int* 8 (1): 33-39.

de Escalada Pla M. Rojas A.M. Gerschenson L.N. 2004. Caracterización funcional de la fibra de calabaza (C*ucumis moschata*, Duch.). *XIII Seminario Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, Montevideo, URUGUAY.

Dutta D., Dutta A., Raychaudhuri U., Chakraborty Runu. 2006. Rheological characteristics and thermal degradation kinetics of beta-carotene in pumpkin puree. *J Food Eng* 76: 538-546.

Fitzgerald D.J., Stratford M., Narbad A. 2003. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *Int J Food Microbiology* 86: 113-122.

Gaucheron F. 2000. Iron fortification in dairy industry. *Trends in Food Science & Technology* 11: 403-409.

Gliemmo MF, Campos CA, Gerschenson LN. 2004. Effect of sweet humectants on stability and antimicrobial action of sorbates. *J Food Sci* 69(2): 39-44.

Gras M.L., Vidal D., Betoret N., Chiralt A., Fito P. 2003. Calcium fortification of vegetables by vacuum impregnation. Interactions with cellular matrix. *J Food Eng* 56: 279-284.

Greve L.C., McArdle R.N., Gohlke J.R., Labavitch J.M. 1994. Impact of heating on carrot firmness: changes in cell wall components. *J Agric Food Chem* 42: 2900-2906.

Henry W.J., Xi X., Favre M.L.H.L., Mehansho H., Mellican R.I., Li J.J. 2002. Color stable iron fortified compositions. Patent № US 2002061347. *Applicant: Procter & Gamble.*

Henry W.J., Xi X., Favre M.L.H.L., Mehansho H., Mellican R.I., Li J.J. 1998. Color stable iron fortified dry drink mixes, ready-to-drink beverages and foods other than beverages that optionally contain zinc. Patent № WO 9848648. *Applicant: Procter & Gamble, Henry W.J., Xi X., Favre M.L.H.L., Mehansho H., Mellican R.I., Li J.J.*

Heslop-Harrison J., Heslop-Harrison Y. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technology* 45: 115-120.

Hocking M.B. 1997. Vainillin: Synthetic flavoring from spent sulfite liquor. *J Chem Educ* 74: 1055-1059.

Hughes Y.,Mc Culley M.E. 1975. The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain Technology* 50:319-329.

Hurrell R.F. 2002. Fortification: overcoming technical and practical barriers. *J. Nutr.* 132 (4): 806S-12S.

Hurrell R.F., Cook J.D. 1990. Strategies for iron fortification of foods. *Trends in Food Science & Technology* 1: 56-61.

Khin M.M., Zhou W., Perera C.O. 2006. A study of the mass transfer in osmotic dehydration of coated potato cubes. *J Food Eng* 77:84-95.

Kosse J.S., Yeung A.C., Gil A.I., Miller D.D. 2001. A rapid method for iron determination in fortified foods. *Food Chem* 75: 371-376.

Layrisse M., Martínez-Torres C., Renzi M., Velez F., Gonzalez M. 1976. Sugar as a vehicle for iron fortification. *Am J Clin Nutr.* 29 (1): 8-18.

Lecain S., Ng A., Parker M.L., Smith A.C., Waldron K.W. 1999. Modification of cell-wall polymers of onion waste-Part I. Effect of pressure-cooking. *Carbohydrate Polymers* 38:59-67.

Leistner L. 1995. Use of hurdle technology in food processing: recent advances. In: *Food Preservation by moisture control fundamentals and applications*. Edited by Barbosa-Cánovas G., Welti-Chanes, J. Technomic Publication, Pennsylvania, USA.pp 377-397.

Lindsay R.C. 1993. Aditivos Alimentarios. En: Q*uímica de los Alimentos*. 2da. Edición. Editado por Fennema O.R. Marcel Dekker, New Cork, USA. pp. 709-775.

Llano K.M., Haedo A.S., Gerschenson L.N., Rojas A.M. 2003. Mechanical and biochemical response of kiwifruit tissue tos team blanching. *Food Res Int* 36: 767-775.

Martínez-Navarrete N., Camacho M.M., Martínez-Lahuerta J., Martínez-Monzó J., Fito P. 2002. Iron deficiency and iron fortified foods- a review. *Food Res Int* 35 (2-3): 225-231.

Mascheroni. R.H. 2005. Curso de Actualización en algunas tecnologías de preservación de alimentos: Refrigeración, congelación y conservación por deshidratación parcial. *UTN.-FRBA*.

McCance R.A. y Widdowson E.M. 1993. *The composition of foods*. 5th. Edition. United Kingdom.

Miguel J.C., Bowen W.H., Pearson S.K. 1997. Effects of iron salts in sucrose on dental caries and plaque in rats. *Archives of Oral Biology* 42 (5): 377-383.

Minguez-Mosquera M.I., Jaren-Galan M. 1995. Kinetics of decolouring of carotenoid pigments. *J Sci Food Agric* 67: 153-161.

Nayak B., Nair M. 2003. In vitro bioavailability of iron from wheat flour fortified with ascorbic acid, EDTA and sodium hexametaphosphate, with or without iron. *Food Chem* 80: 545-550.

Ng A., Parker M.L., Smith A.C., Waldron K.W. 1999. Modification of cell-wall polymers of onion waste-Part II. Effect of divalent cations. *Carbohydrate Polymers* 38:69-76.

Ng A., Waldron K.W. 1997.Effect of steaming on cell wall chemistry of potatoes (*Solanum tuberosum* Cv. Bintje) in relation to firmness. *J Agric Food Chem* 45: 3411-3418.

Panagiotou N.M., Karathanos V.T., Maroulis Z.B. 1998. Mass transfer modeling of the osmotic dehydration of some fruits. *Int J Food Sci Technol* 33: 267-284.

Pedrero D.L., Pangborn R.M. 1989. *Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos analíticos*. Editorial Alambra Mexicana S.A., México D.F., México.

Pellegrino N., Wolfgor R., Rodríguez V., Valencia M. 1996. Biodisponibilidad del hierro agregado como fortificante en leche y derivados. Influencia de los procesos tecnológicos y de la formulación. *La Alimentación Latinoamericana* 215: 77-80.

Praphailong W. y Fleet G.H. 1997. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiology* 14: 459-468.

Rojas A.M., Gerschenson, L.N. 1991. Determinación de vitamina C en productos frutihortícolas. *An. Asoc. Quim. Argent.* 79: 97-106.

Rojas A.M.L. 1995. Destrucción de vitamina C en sistemas modelo de actividad acuosa reducida. *Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.*

Sacchetti G., Gianotti A., Dalla Rosa M. 2001. Sucrose-salt combined effects on mass transfer kinetics and product acceptability. Study on apple osmotic treatments. *J Food Eng* 49: 163-173.

Salgueiro M., Zubillaga M., Lysionek A., Caro R., Weill R., Boccio J. 2002. Strategies to combat zinc and iron deficiency. *Nutr. Rew*. 60: 52-58.

Sher A., Vadehra, D.V., Wedral, E.R., Rekhif, N. 2000. Food fortified with iron. Patent № WO 01/67897. *Applicant: Sociétè des Produits Nestle S.A.*

Silveira E.T.F., Rahman M.S., Buckle K.A. 1996. Osmotic dehydration of pineapple: kinetics and product quality. *Food Res Int* 29 (3-4): 227-233.

Singh B., Kumar A., Gupta A.K. 2006. Study of mass transfer kinetics and effective diffusivity during osmotic dehydration of carrot cubes. *J Food Eng.* Artículo en prensa. Disponible on line en www.sciencedirect.com.

Sofos J.N. 1989. *Sorbate Food Preservatives.* Academic Press, Florida, USA.

Streekstra H. 2003. Preparation and food product comprising an active phytase. Patent № WO 2004/071218. *Applicant: DSM IP Assets B.V.*

Tapia De Daza M.S., Argaiz A., López-Malo A., Díaz R.V. 1995. Microbial stability assessment in high and intermediate moisture foods: special emphasis on fruti products. En *Food Preservation by moisture control fundamentals and applications.* Editado por Barbosa-Cánovas G., Welti-Chanes, J. Technomic Publication, Pennsylvania, USA.pp 575-601.

Vasantha Rupasinghe H.P., Boulter-Bitzer J., Ahn T., Odumeru J.A. 2006. *Food Res Int* 39: 575-580.

Welti-Chanes J, Vergara F.B. 1997. Actividad de agua. Concepto y aplicación en alimentos con alto contenido de humedad. En: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Temas en tecnología de los alimentos. Volumen 1. México: Instituto Politécnico Nacional pp 11-43.

Whistler R.L., Daniel J.R. 1993. Carbohidratos. En: Q*uímica de los Alimentos*. 2da. Edición. Editado por Fennema O.R. Marcel Dekker, New Cork, USA. pp. 81-157.

Zhao Y., Xie J. 2004. Practical applications of vacuum impregnation in fruit and vegetable processing. *Trends in Food Science & Technology* 15: 434-451.

CAPITULO III

PRODUCTOS ENRIQUECIDOS CON FIBRA OBTENIDOS A PARTIR DE LOS RESIDUOS DE INDUSTRIALIZACION DE LA CALABACITA

Índice Capítulo III

III-1-Introducción ..... - 119 -

III-2-Materiales y Métodos ..... - 122 -

III-2-1-Obtención de fracciones enriquecidas en fibra ..... - 122 -

III-2-2 Análisis Químico ..... - 123 -

III-2-3-Caracterización funcional del material ..... - 127 -

III-2-3-1-Volumen específico ..... - 127 -

III-2-3-2-Propiedades de hidratación ..... - 127 -

III-2-3-3-Propiedades hipoglucémicas ..... - 129 -

III-2-4-Análisis estadístico ..... - 129 -

III-3-Resultados y Discusión ..... - 132-

III-3-1-Composición Química ..... - 130 -

III-3-2-Propiedades de hidratación ..... - 135 -

III-3-3-Propiedades hipoglucémicas ..... - 145 -

III-4-Conclusiones ..... - 147 -

III-5-Referencias ..... - 148 -

III-1-Introducción

Un gran número de enfermedades que ocurren frecuentemente en los países desarrollados llamadas enfermedades del "tipo occidentales"tales como varios desórdenes gastrointestinales (hernia, úlcera duodenal, cálculos biliares, enfermedad de Crohn, apendicitis, constipación, hemorroides, carcinoma del colon), diabetes mellitus, obesidad y enfermedades cardiovasculares, tienen muy poca incidencia entre las personas que consumen grandes cantidades de fibra (Oguido y col., 1998).

Hoy día la ingesta recomendada de fibra dietaria es de 25 a 30 g/día. En los países latinoamericanos, el valor promedio ingerido esta en el orden de 15 g/día, si bien en las ciudades de mayor crecimiento la ingesta está por debajo de los 10 g/día. En las grandes economías como EU y USA, las autoridades están trabajando sobre legislaciones más estrictas sobre los alimentos procesados para prevenir o reducir la obesidad (Cardona Velásquez, 2004), que puede llevar finalmente a diabetes, o a enfermedades cardio-cerebro-vasculares secundarias. El agregado de fibra a los alimentos es una alternativa para compensar la deficiencia existente en la dieta. Aparte del propósito nutricional, se puede utilizar la fibra con propósitos económicos y tecnológicos. Como agente tecnológico tiene un amplio rango de aplicación pudiendo actuar como modificador de textura o como substituto de materia grasa (Guillon y Champ, 2000).

Históricamente, el énfasis en la investigación sobre fibra se había concentrado en el efecto de la fibra en relación a la cantidad agregada más que en el efecto en relación al tipo de fibra presente en la dieta. Se han llevado a cabo cada vez más y más ensayos *in vivo* sobre animales y humanos, midiendo los efectos a corto y largo plazo, a nivel celular y globalmente en el organismo (Robertson, 1988). Las propiedades físicas y químicas y el destino de la fibra dietaria a lo largo del tracto digestivo y su fermentación han demostrado ser determinantes de los efectos fisiológicos e impacto metabólico cuando se la consume (Guillon y Champ, 2000).

Los beneficios de la fibra durante la digestión son ampliamente reconocidos, hecho que ha determinado el ser considerada como un nutriente

(FDA 1993). Las fibras de origen vegetal se han utilizado para fortificar diferentes productos alimenticios como yogurt endulzado (Fernandez García y Mc Gregor, 1997). Sin embargo algunas investigaciones han reportado su efecto reductor de la acción antioxidante de los carotenoides y tocoferoles en humanos (Hofman y col., 1999).

El incremento de la participación de la mujer en el mercado laboral y el cambio en los paradigmas domésticos, como así también el deseo del consumidor de comer "productos naturales" ha determinado el desarrollo de nuevas formas de preservación de frutas y vegetales. De este modo, hoy día es común la oferta en el mercado de vegetales limpios y cortados, listos para la preparación de sopas y ensaladas. Éstas y otras formas de industrialización más tradicionales, dan origen a la existencia de residuos vegetales.

Por otro lado, los residuos o sobras del procesamiento de los vegetales representan un gran problema desde el punto de vista medioambiental para la industria (Schieber, 2001). La transformación de los residuos vegetales de la industria de alimentos en productos de mayor valor, como lo son las fibras, pueden contribuir a disminuir la polución y a recuperar biomateria y nutrientes valiosos agregando valor a la materia prima e incrementando la disponibilidad de sustancias de importancia nutricional. El desarrollo de ingredientes multifuncionales a partir de residuos vegetales y su aplicación en diferentes productos alimenticios es un desafío. La obtención de fibras de nuevos orígenes, la posibilidad de modificar las fibras por tratamientos químicos enzimáticos y/o físicos y su uso combinado con otros componentes probablemente ampliarán los campos de aplicación de las fibras dietarias (Laufenberg y col., 2003).

Las frutas y los vegetales son fuentes importantes de fibras dietarias aunque su contenido es menor que en los cereales. Se sabe que estas fibras son ricas en pectinas y ejercen un efecto importante en el organismo. La matriz de la pared celular (PC) es la mayor fuente de fibra en este tipo de alimentos (Carpita y col., 1993; Redwell y col., 1990).

El cultivo de calabaza ha sufrido un cambio varietal en la Argentina al tipo "Butternut", que se conoce comercialmente como "calabacita ", porque el sabor de esta calabaza (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) es preferida por los consumidores. También es interesante por su versatilidad ya que se puede utilizar para desarrollar productos alimenticios tanto dulces como salados. No

hay suficiente literatura con respecto al valor nutricional y a las propiedades funcionales de las fibras de la calabacita. Estudios recientes investigaron acerca de la aplicación del polvo de zapallo para mejorar el volumen de las piezas y la aceptabilidad organoléptica de los panes de trigo (Ptitchkina y col., 1998). Ptitchkina y col. (1994) también estudiaron las características de las pectinas del zapallo. Chun y Youn (1998 a, b, c) estudiaron la composición química y la calidad del zapallo nativo inmaduro y maduro y las características morfológicas de este zapallo. Xu y Siegenthaler (1997) estudiaron los efectos del procesamiento sobre la calidad nutricional del zapallo

La técnica de aislamiento y separación de las fibras puede influir en su composición y características funcionales (Jona y Froda, 1997) y/o estas propiedades se pueden modificar con tratamientos tecnológicos después de su separación, aumentando las posibilidades de su uso en relación a las propiedades finales obtenidas.

El objetivo en esta parte del trabajo de investigación fue estudiar la composición y propiedades funcionales de la fibra aislada de la calabacita (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret) y analizar el rendimiento de su extracción a partir de los residuos de industrialización de alimentos vegetales en vista a aumentar el valor agregado de los residuos de la calabacita al aplicarlas con fines nutricionales y/o con fines tecnológicos.

III-2-Materiales y Métodos

III-2-1-Obtención de fracciones enriquecidas en fibra

Se separaron cáscara y tejido del mesocarpio de la calabacita (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret). La proporción más alta del contenido de agua se eliminó a través del procesamiento en un extractor de jugos doméstico. Luego, se obtuvieron tres tipos diferentes de productos de fibra:

a) Fracción de Pulpa (S): el residuo remanente de la extracción del jugo, lavado una vez con agua destilada y secado en una cámara con convección forzada de aire, a 50ºC, durante cuatro horas.

b) Fracción insoluble en alcohol (AIR): parte del residuo de pulpa que se obtuvo, como se indicó antes después de la extracción de jugo, se trató con etanol a ebullición para separar su residuo insoluble en alcohol (AIR) de acuerdo con Femenia y col. (1998). Cien gramos de pulpa se mezclaron con 350 ml de solución de etanol al 95% v/v y se homogenizó con un agitador mecánico, hirviendo durante 30 min bajo agitación constante. El residuo obtenido se siguió extrayendo:

a. Con 350 ml de solución de etanol al 80% v/v, hirviendo durante 15 min.

b. Dos veces con 250 ml de solución de etanol 80% v/v, hirviendo durante 15 min.

El residuo insoluble se separó y se lavó con 100 ml de solución de etanol 80% v/v y con 100 ml de etanol al 95 % v/v. Entre cada tratamiento con etanol, la suspensión se filtró y se descartó el solvente. El lavado final con acetona no se implementó si bien otros autores (Femenia y col., 1998) lo han llevado a cabo, con el fin de asegurar que el producto obtenido fuese adecuado para su consumo. El material fue dejado bajo campana durante toda la noche para la eliminación del etanol y, finalmente, secado en cámara con convección forzada, a 50ºC, durante 4 horas.

c) Fracción C: la cáscara de la calabacita se molió primero y luego se la sometió a la extracción de su residuo insoluble en alcohol, siguiendo el mismo procedimiento que se indicó previamente para la pulpa (b).

Luego, las fracciones S, AIR y C se molieron y tamizaron (tamiz ASTM USA, malla 40) y se las almacenó a -18ºC, envasadas al vacío, en bolsas de

Cryovac™ (Sealed Air Corporation; polímero del polivinil cloruro de polivinilideno) hasta los posteriores usos.

III-2-2 Análisis Químico

Contenido de agua

El contenido de agua se determinó en tres muestras de cada fracción secando a 70ºC bajo vacío hasta constancia de peso.

Fibra dietaria total

La fibra dietaria total se analizó de acuerdo al método enzimático gravimétrico de la AOAC (Método 985.29, AOAC 1990). El método se basa en tomar la muestra y gelatinizarla con una α-amilasa termoestable a pH: 6,0 y durante 30 min a 95-100ºC en baño de agua a ebullición, y luego digerirla enzimáticamente con proteasa (pH: 7,5 y 30 min a 60ºC) y amiloglucoxidasa (pH: 4,0-4,6 y 30 min a 60ºC) para remover la proteína y el almidón. Luego se precipita la fibra dietaria agregando 4 volúmenes de alcohol. El residuo total se filtra, se lava con etanol 78% v/v, 95% v/v y acetona. Finalmente se pesa y se seca. La digestión se realiza por duplicado y luego sobre uno de los duplicados se determina contenido proteico y sobre el otro se incinera a 525ºC y se determinan cenizas. La cantidad de fibra dietaria total se calcula como:

Fibra dietaria Total = Peso del residuo- peso (proteínas +cenizas).

Proteínas

El contenido de proteína se determinó por el método de Kjeldahl (Método 920.152, AOAC 1990). El mismo se basa en calentar la muestra en ácido sulfúrico concentrado y digerirla hasta que la materia orgánica se oxida y el nitrógeno proteíco es reducido y retenido en forma amoniacal. Luego se agrega NaOH concentrado y se calienta para liberar el amoníaco que es recogido en un volumen conocido de una solución ácida estándar (Gómez R. y col., 2001).

-Etapa de digestión: $(H\text{-}\underset{\text{(proteína)}}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}\text{-}NH_2) + H_2SO_4 \longrightarrow CO_2 + (NH_4)_2SO_4 + SO_2$

En esta etapa se pueden utilizar catalizadores, como el sulfato de cobre y compuestos para elevar el punto de ebullición, como el sulfato de potasio.

-Etapa de destilación: $(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \longrightarrow Na_2SO_4 + 2NH_4OH$

El hidróxido de sodio concentrado, libera el NH_3 retenido. Se destila un volumen de agua de acuerdo a normas establecidas para asegurar que el amoníaco sea arrastrado en su totalidad. Se recoge en un volumen en exceso exactamente medido de ácido valorado (H_2SO_4 0,1 N) y se titula por retorno con NaOH 0,1N valorado, utilizando rojo de metilo como indicador.

-Expresión de resultados: el porcentaje de nitrógeno obtenido (gramos de N total por cada 100 gramos de muestra) se convierte en porcentaje de proteína multiplicando por un factor de 6,25. Este factor surge de considerar que una mezcla de proteínas puras contiene 16% de nitrógeno. Entonces para alimentos que contengan una composición de proteínas desconocidas es ampliamente aceptado el uso del factor 6,25 (100÷6) (Gómez R. y col., 2001).

Aminoácidos

El perfil de aminoácidos (AA) se determinó sobre la fracción de fibra C. El método básicamente consiste en la hidrólisis del total de las proteínas y acondicionamiento adecuado del extracto por dilución y/o evaporación, la transformación de los aminoácidos presentes en derivados fluorescentes y la posterior separación y determinación de los mismos utilizando Cromatografía Líquida de alta Performance (HPLC). El tratamiento consiste en una hidrólisis ácida con HCl 6N (Método 994.12, AOAC 2000), de esta manera cuantitativamente se solubilizan la mayoría de los AA presentes. Para los AA azufrados (metionina y cisteína) se debe realizar una oxidación de la muestra con ácido perfórmico (Métodos 994.12 y 985.25, AOAC 2000) para obtener así ácido cisteico y metionina sulfonada. Posteriormente la hidrólisis con HCl libera al ácido cisteico y a la metionina sulfonada de las proteínas y se contínua con el análisis. El triptofano se degrada con la hidrólisis ácida, por lo que para su preparación se realiza una hidrólisis alcalina con NaOH 4,2 N (Método 988.15, AOAC 2000). Para el análisis cromatográfico de los AA primarios se lleva a cabo una derivatización de los hidrolizados usando en ello 2-mercaptoetanol (J T Baker) y o-phtalaldehído (Sigma-Aldrich), mientras que para la determinación de AA secundarios (Hidroxiprolina y Prolina) se utiliza como agente

derivatizante 9-fluorenilmetil-cloroformato (Alfa Aesar) y ácido 3-mercaptopropiónico (J T Baker) (Herber y col., 2000; Henderson y col., 2000). La separación y análisis se llevó a cabo con un cromatógrafo líquido de alta performance Serie 1100 (Agilent, California, USA) equipado con un detector de fluorescencia. Se utilizó una columna cromatográfica de C_{18} de 15 x 4,6 cm, con diámetro de partículas de 5μm , Hypersil BDS Gold (Agilent, California, USA). La fase móvil utilizada fue una mezcla de 40mM Na_2HPO_4, pH 7,8 (A) y metanol (B) con un gradiente lineal comenzando en un 50:50 (v/v) y finalizando, luego de 10 minutos, en una mezcla 10:90 (v/v) de A en B.

Cenizas

El contenido de cenizas se determinó por ignición a 550ºC en una mufla hasta constancia de peso de acuerdo al método 923.03, AOAC (1990).

Fracción soluble en agua y en cloruro de sodio

La fracción soluble en agua se extrajo de la muestra (0,5 g) agitando con un agitador magnético en agua (50 ml) a 20ºC durante 2 horas como indicaron Waldron y col. (1997), seguido por la extracción de la fracción soluble en sal agitando el residuo de la primera extracción, con solución de NaCl 2% (50 ml) a la misma temperatura durante una hora y media.

Glucosa Libre

La glucosa libre se determinó por el método de la glucosa-oxidasa utilizando un kit enzimático (Boehringer™ Weiner LAB, Argentina).

Hidratos de Carbono

El contenido de hidratos de carbono totales (no celulósicos), de celulosa y de lignina se determinaron solamente en los productos constituidos por el material aislado de la pared celular: AIR y C. Ya que AIR es el material de la pared celular extraído de la pulpa, su composición de fibras esencialmente es compartida por el producto P.

La hidrólisis de la celulosa y de los hidratos de carbono no celulósicos de la PC se realizó de acuerdo a Ng y col. (1998) dispersando 0,3g de muestra del producto en 2,08 ml de solución de ácido sulfúrico 72% durante 3 horas a temperatura ambiente. Se ajustó la concentración de esta dispersión a 1 M en ácido sulfúrico, agregando el volumen necesario de agua deionizada (≈ 25 ml), y

cada muestra fue calentada a 100ºC durante 2,5 horas en un baño de agua. Cada dispersión fue enfriada, centrifugada durante 10 min a 12000 g y, finalmente, se separó el sobrenadante. El sobrenadante se neutralizó cuidadosamente y el contenido de hidratos de carbono totales (celulosa y no-celulósicos) se determinó por el método del fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956). El residuo se lavó tres veces con agua deionizada, se centrifugó durante 10 min a 12000g y finalmente se liofilizó. El residuo obtenido se pesó e informó como lignina.

Se llevó a cabo un segundo procedimiento con otra porción de 0,3g de cada muestra a las cuales se agregó 2,08 ml de solución 72% de ácido sulfúrico; se dispersó el material y se agregó agua inmediatamente para alcanzar una dilución 1M seguida de calentamiento por 2,5 horas a 100ºC. El residuo final obtenido y pesado corresponde a celulosa + lignina, por lo tanto los hidratos de carbono totales contenidos en el sobrenadante estaban constituidos por polisacáridos no-celulósicos.

El tercer procedimiento de hidrólisis se llevó a cabo con una nueva porción de cada muestra, seguida por la técnica aplicada durante el segundo procedimiento, pero en este caso se aplicó una hora de calentamiento a 100ºC en un baño de agua. Solo se separó el sobrenadante para la cuantificación como se indicó previamente, determinándose el contenido de ácidos urónicos por el método espectrofotométrico reportado por Filisetti-Cozzi y Carpita (1991). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Las proporciones de monosacáridos neutros (análisis de azúcares neutros) que constituyen los componentes de los polisacáridos de la PC de la fracción C fueron determinados después de su hidrólisis con 2 M CF_3COOH (TFA, ácido trifluoracético) durante 90 min a 120ºC. Los hidrolizados se derivatizaron a los acetatos de alditoles (Albersheim y col., 1967) y se analizaron por cromatografía gas-liquido (GLC) utilizando una columna capilar (30m x 0,25mm) rellena con SP-2330 (0,20μm) en un cromatógrafo gaseoso HP-5890™ (Agilent, California, USA) equipado con un detector de ionización de llama. Se utilizó nitrógeno como gas de elusión, con una velocidad de flujo de 1,7 x 10^{-8} m^3/s y un split de 100:1. Las corridas cromatográficas fueron isotérmicas a 220ºC, mientras que la inyección y la detección se establecieron a 235ºC. A fin de detectar la posible presencia de materiales celulósicos, se llevó a cabo el procedimiento de hidrólisis de Morrison (Morrison, 1988) con TFA puro

sobre la muestra de fracción C. La respuesta de la FID se consideró siempre proporcional al peso de los derivatizados. Cada paso de hidrólisis se llevó a cabo por duplicado.

III-2-3-Caracterización funcional del material

III-2-3-1-Volumen específico

Se determinó midiendo el volumen de una muestra pesada (5,0000 g), en una probeta graduada de 50 ml para AIR y 25 ml para C y P. La determinación se realizó tres veces para cada fracción.

III-2-3-2-Propiedades de hidratación

- *Capacidad de hinchamiento (SC).*

Una muestra seca exactamente pesada (≈0,2000 g) se colocó en un tubo graduado de fondo cónico. Se agregaron 10 ml de agua y se lo dejó hidratar durante 18 horas a una temperatura constante de 25ºC. Después de este lapso, se midió el volumen total alcanzado por la fibra hidratada (Robertson, 2000; Rhagavendra y col., 2004). Este ensayo se realizó por triplicado para cada fracción.

SC (ml/g) = Volumen ocupado por la muestra hidratada/peso de la muestra original

- *Capacidad de atrapamiento de agua (WHC).*

Una muestra seca, exactamente pesada (≈ 1,0000 g), fue hidratada en un tubo graduado de fondo cónico con 30 ml de agua, a lo largo de 18 horas, a 25ºC. Se decantó el sobrenadante y la muestra fue transferida a un filtro de vidrio fritado (G4 IVA), previamente pesado, dejándola escurrir a presión atmosférica. Se registró el peso del residuo hidratado y se lo liofilizó para obtener, finalmente, el peso del residuo seco. WHC se determinó por triplicado para cada fracción.

WHC(g/g)=(Peso del residuo hidratado-peso del residuo seco)/peso del residuo seco.

➔ *Capacidad de retención de agua (WRC) y agua retenida (RW).*

La capacidad de retención de agua y el agua retenida se determinó por hidratación a 25ºC, con 30 ml de agua, en un tubo graduado de fondo cónico durante 30 minutos, de una muestra seca pesada exactamente (≈ 1,0000 g). Se centrifugó durante 30 min a 2000 x g. Se separó el sobrenadante y se transfirió el residuo a un filtro de vidrio fritado (G4 IVA) para escurrir el líquido restante. Se pesó la fibra húmeda retenida en el filtro ($R+W_2$) y se la sometió luego a liofilización. Luego, se pesó el residuo seco R (Pilosof, 2000). De este modo:

$$WRC \text{ (g de agua/g residuo seco)} = W_2/R$$

$$RW \text{ (\% de agua retenida)} = (W_2 / \text{agua total agregada}) \times 100$$

El ensayo se llevó a cabo por triplicado para cada fracción.

➔ *Cinética de la absorción de agua.*

La cinética de absorción de agua y también la capacidad de unión de agua, WBC, se determinaron midiendo la absorción espontánea de agua a través del hinchamiento, por capilaridad, de una pequeña cantidad exactamente pesada (≈ 0,0200-0,0400 g) de la muestra en polvo, utilizando un aparato modificado de Baumann (Robertson y col., 2000). El volumen de agua tomada por la muestra se midió a diferentes intervalos de tiempo, durante cuatro horas.

Los ensayos cinéticos se llevaron a cabo por triplicado para cada fracción.

Los datos se ajustaron utilizando la ecuación

$$q = \frac{Q \times t}{(B + t)} \qquad (1)$$

donde q corresponde al agua absorbida a tiempo t, Q es la máxima capacidad de absorción de agua también llamada capacidad de unión de agua (WBC) y B es el tiempo necesario para absorber la mitad de la máxima absorción de agua ($Q/2$). De acuerdo con Pilosof y col. (1985), a partir de la ecuación (1) es posible calcular la constante de velocidad específica $(B.Q)^{-1}$.

También se evaluó el ajuste a la ecuación:

$$q = k \times t^n \qquad (2)$$

donde *k* es una constante que depende de las características cinéticas y de las condiciones experimentales, y n es el exponente de hinchamiento. Esta es una relación de la ley de potencia para el hinchamiento (Ritger y Peppas, 1987).

III-2-3-3-Propiedades hipoglucémicas

La capacidad de absorción de glucosa (GAC) se determinó por duplicado de acuerdo a Ou y col. (2001). Para ello, una muestra de cada fracción (AIR y C) fue puesta en contacto en una relación 1:100 con soluciones de glucosa (5-300 mmol/l) y se la equilibró, a 37ºC, durante seis horas para luego centrifugarla (Costar™ Mini centrifuge Ser.Nº10M-08513, USA) a 3500 x g durante 15 min. La cantidad de glucosa retenida por la muestra de fibra se determinó a través de la medición del contenido de glucosa en el sobrenadante, utilizando un kit de glucosa-enzimático (Boehringer™ Weiner LAB, Argentina). El kit provee una solución de glucosaoxidasa (GOD) de 1000 U/ml y de peroxidasa (POD) de 120 U/ml, así como los reactivos fenol (solución 55 mmol/l) y 4-aminofenazona (4-AF) de 25 mmol/l de concentración. El esquema de reacción es el siguiente:

$$\text{Glucosa} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{GOD}} \text{ácido glucónico} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{4-AF} + \text{fenol} \xrightarrow{\text{POD}} \text{quinona coloreada} + 4H_2O$$

La lectura se realiza a una λ: 505nm.

La GAC se informó como μmol de glucosa retenida por gramo de fibra.

III-2-4-Análisis estadístico

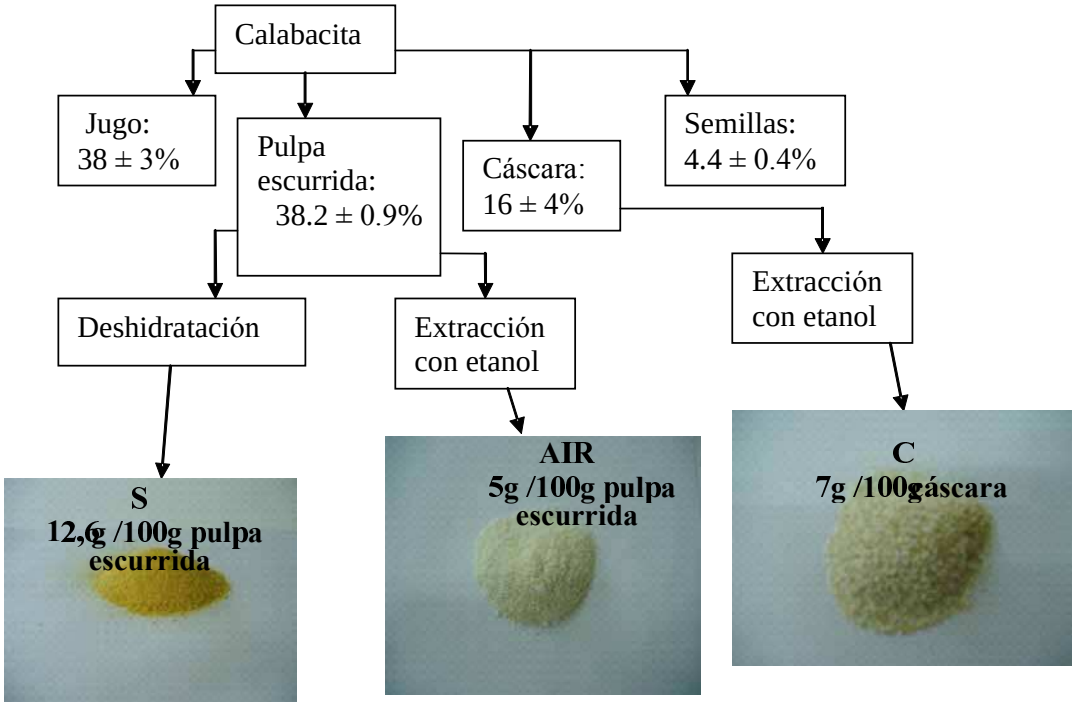
Las regresiones no-lineales y el análisis estadístico de los resultados a través de ANOVA (α:0,05) seguido por un análisis de diferencias significativas por el test de comparaciones múltiples de Tukey, se realizaron utilizando el paquete Statgraphics (versión 3.0, SRSC, 1994, Rockville, Md., USA).

III-3-Resultados y Discusión

III-3-1-Composición Química

Los resultados concernientes al balance de materia de los procesos de recuperación, en relación a la extracción a partir de la calabacita (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) se resumen en el Esquema 1.

En una primera etapa, se obtuvieron, por cada 100 g de calabacita, aproximadamente, 38,0 g de jugo, 38,2 g de pulpa prensada (escurrida), 16,0 g de cáscara y 4,4 g de semillas. En la segunda etapa del proceso, a partir de 100 g de pulpa prensada (o escurrida), se obtuvieron aproximadamente, 12,6 g de S ó 5 g de AIR como así también 7 g de C, a partir de 100 g de cáscara. La pulpa prensada (o escurrida) es, esencialmente, el componente celular del tejido del mesocarpio remanente luego de la extracción del jugo de la calabacita fresca. Fue un procedimiento útil para eliminar gran parte del agua presente en el mesocarpio, volviendo económica y viable la posterior extracción del residuo insoluble en alcohol a partir del material de la pulpa. La pulpa obtenida antes del secado fue sometida a un paso previo de lavado con agua que tiende a eliminar el almidón, el cual de acuerdo a Mc Cance y Widdowson (1991) es 0,3% en base al peso de calabacita fresca, aunque la mayor parte del almidón se arrastra en el jugo, el que está esencialmente constituído por el líquido intracelular. Sin embargo, muchos de los componentes solubles en agua pertenecientes al medio citoplasmático, como proteínas globulares, aminoácidos, mono y di/oligosacáridos, sales y ácidos orgánicos pueden permanecer en pequeña proporción en la fracción S finalmente obtenida. Por lo tanto, estas sustancias residuales junto con los componentes de la pared celular (fibra) contribuyen a las propiedades de esta fracción.



Esquema 1: Balance de Materia del proceso extractivo con respecto a la pulpa o cáscara escurrida de los residuos de la calabacita.

Se puede ver en la Tabla 1 que 32,3% p/p de la fracción S fue soluble en agua luego de la extracción a 20ºC durante 2 horas (Ng and Waldron, 1997), siendo 3,14% p/p su contenido en glucosa libre, que representó en realidad, 1% p/p de glucosa libre en la fracción S obtenida.

Tabla 1. Fracción soluble en agua (WSF) y fracción soluble en NaCl (SSF) y su contenido de glucosa libre determinada para cada producto extraído de la calabacita (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret)[1].

	AIR	C	S
WSF[1,2]	10.0 ± 4.0	10.0 ± 2.0	32.3 ± 3.0
Glucosa[1,3] (libre)	ND	ND	3.1 ± 0.2
SSF[1,2]	4.49 ± 0.04[4]	13.0 ± 1.0	---

[1]Se indican desvíos standard (n = 3).
[2] % p/p sobre masa de muestra seca.
[3]% p/p sobre WSF seco.
[4]Determinado en el Capítulo I.
ND: no detectable.

Al mismo tiempo, la fracción S mostró el contenido de fibra total más bajo (44,6% p/p, Tabla 2). Se puede concluir entonces que su parte soluble en agua (Tabla 1) fue un componente importante de la fracción S. Inversamente, C y AIR mostraron los contenidos de fibra total más altos (≈ 80% p/p, Tabla 2) como así también los porcentajes más bajos de fracción soluble en agua (Tabla 1). Los polisacáridos de la pared celular (contenido de fibra) del mesocarpio fueron los componentes químicos de la fracción AIR, mientras que los polisacáridos pertenecientes a las paredes celulares de la células de la cáscara constituyeron principalmente, la fracción C. En el caso del AIR y, de acuerdo a lo visto en el Capítulo I, la fracción soluble en agua está constituida principalmente por pectinas.

La extracción secuencial de la fracción C con agua (≈ 10% p/p, Tabla 1) y posteriormente con 2% de NaCl a 20ºC, mostró una mayor proporción de material de la PC extraíble en sal para C que para AIR (Tabla 1).

Tabla 2: Composición química de las diferentes fracciones de fibra de calabacita.

	AIR %	C %	S %
Humedad	13,0 ± 0,1	8,74 ± 0,03	8,32 ± 0,03
Cenizas[a]	4,6 ± 0,2	4,5 ± 0,1	2,1 ± 0,4
Proteína	9,1 ± 0,3	19,3 ± 0,9	6,2 ± 0,2
Fibra Dietaria Total[a]	78,4 ± 0,8	79,6 ± 0,8	44,6 ± 0,5
• Lignina[a,b]	0,2 ± 0,1	6 ± 3	
• Celulosa[a,b]	46 ± 1	45 ± 4	
• Hidratos de Carbono Totales[a,b]	62 ± 3	47 ± 2	
• Acido Galacturonico[a,b]	10 ± 2	11,8 ± 0,2	

[a]% en base seca
[b]Componentes de la fibra total

Tabla 3: Azúcares neutros de la fracción C

	Rha	Fuc	2-Xyl	Ara	Xyl	Man	Gal	Gluc
AIR[1]-(2N-TFA)	8	1		20	9	5	11	47
AIR[1]-(100% TFA)-Morrison-					1	3	1	95
C-(2N-TFA)	8	2	-	25	14	5	15	30
C-(100% TFA)-Morrison-	3	1	-	9	7	5	8	68

[1]del Capítulo I.

La Tabla 3 muestra la composición de azúcares neutros de las fracciones obtenidas. Los resultados permitieron concluir que AIR y C contenían

ramnogalacturonano I (RG I). La fracción C mostró un contenido mayor de xilosa que AIR cuando se compararon los azúcares neutros de sus fracciones solubles en TFA 2M. Esta tendencia sugiere un mayor contenido de arabinoxilanos solubles para C. Adicionalmente, se puede observar que solamente la fracción de C soluble en TFA 100% contenía cantidades significativas de arabinosa y xilosa, azúcares que se pueden adscribir a los arabinoxilanos insolubles. Courtin y Delcour (2002) informaron que los arabinoxilanos podían presentar diferentes relaciones de arabinosa/xilosa y que estas relaciones determinaban las diferentes propiedades funcionales de estos polímeros. La fracción de C soluble en TFA puro (Tabla 3) también incluyó celulosa, y probablemente, xiloglucanos (XG) y galactoglucomananos (GGM) altamente ligados a la red de celulosa (Schröder y col., 2001).

También es remarcable el alto contenido de proteína encontrada en la fracción C (Tabla 2) que se puede asociar probablemente a una función particular, relacionada con el hecho de que la cáscara se ve sometida a considerable elongación durante el crecimiento del fruto, por lo que sería esperable que dicha proteína fuese del tipo extensina (Bradley y col., 1992). Por tal motivo se llevó a cabo un perfil de aminoácidos de esta fracción para establecer qué tipo de proteína de PC se tenía. En la Tabla 4 se muestra el contenido de los aminoácidos analizados, confirmándose la presencia de OH-Prolina, asociada a las proteínas de PC del tipo extensina (Bradley y col., 1992). Por otro lado, es importante destacar la concentración detectada de lisina. En la Figura 1 se muestra, a nivel orientativo, las necesidades de AA esenciales de un hombre adulto y a fines comparativos se agrega la composición de algunas proteínas alimentarias. En la figura se muestran los valores relativos calculados a partir de Trp=1 (Patrón). En general, el valor biológico de las proteínas vegetales y de los cereales viene limitada por el déficit de lisina (Belitz y Grosch, 1992) mientras que en la fracción C- supera a los valores recomendados como necesarios, estando, además, por encima de los mostrados por la soja y la harina de trigo.

Tabla 4: Perfil de aminoácido de la fracción C-en comparación con la necesidad de aminoácidos esenciales del hombre adulto.

AAsS	Contenido en C mg/kg de C	Contenido en C % mol	Necesidad diaria[1] mg/kg peso corporal
Asp+Asn	18086	8,61	
Glu+Gln	19820	8,53	
Gly	11800	9,92	
Ser	13750	8,26	
Treo	9770	5,18	6-7
His	6460	2,63	
Tyr	9190	3,20	
Arg	15500	5,62	
Ala	6800	4,82	
Met	3450	1,46	
Val	11500	6,20	11-14
Trp	5300	1,64	3
Phe	11500	4,40	
Ile	7900	3,80	10-11
Leu	11900	5,73	11-14
Lys	24500	10,59	9-12
Pro	400	0,22	
OHPro	700	0,34	
Om	950	0,45	
Tau	0	0	
Cis+Cisteína	16100	8,39	

[1]de Belitz y Grosch, 1992

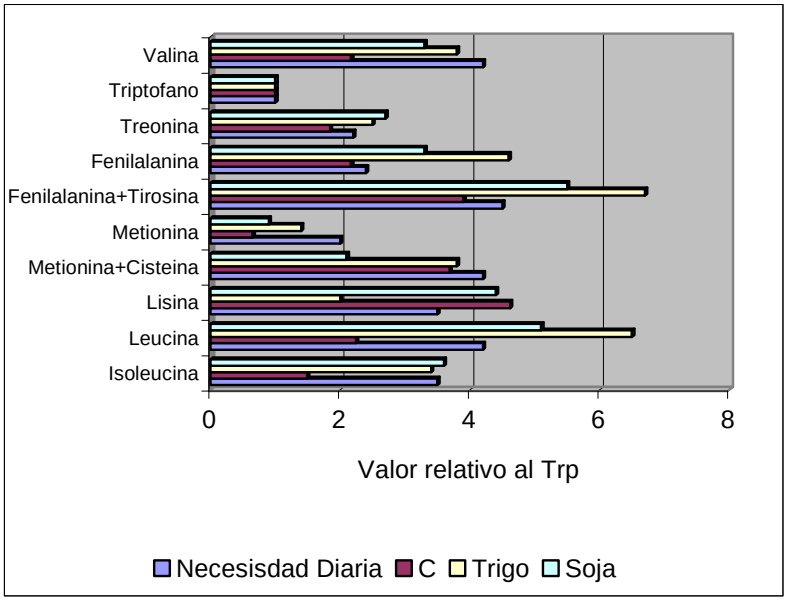


Figura 1: Comparación del contenido de AAs esenciales de la proteína de C- en relación a la necesidad diaria de un hombre adulto y al contenido de las proteínas de otros vegetales.

III-3-2-Propiedades de hidratación

Las propiedades de hidratación de las fracciones de la calabacita se investigaron debido a su importancia en relación a la funcionalidad y calidad nutricional de las fibras alimentarias.

La propiedad de absorción de agua de la fibra dietaria es un determinante fisiológico importante del tamaño de las deposiciones, que está más relacionado a la manera en la cual el agua se liga o retiene, que a la cantidad absoluta retenida. Se ha encontrado que el agua fuertemente unida no tiene ningún efecto sobre la masa de las deposiciones, mientras que el agua levemente asociada incrementa rápidamente el peso de las mismas (Caddem, 1987). La cantidad máxima de agua que la fibra puede absorber es una función de sus características químicas, físicas, y estructurales y/o micro-estructurales (Raghavendra y col., 2004; Brett y Waldron 1996). Estas consideraciones serían también importantes para la utilidad de las fibras como agente de relleno, hinchamiento y/o espesante en los alimentos de relativamente alta actividad de agua.

La capacidad de hinchamiento (SC) se define como la relación de volumen ocupado por la muestra luego de la inmersión en exceso de agua y

alcanzado el equilibrio (Raghavendra y col., 2004). Por lo tanto, este parámetro indica cuánto se hincha la matriz de la fibra a medida que se absorbe el agua. El agua pobremente (o levemente) asociada también se está considerando en este ensayo. El hinchamiento es entonces otro parámetro muy importante para describir mejor la funcionalidad del material. La fracción de AIR mostró la más alta SC (41,8 ml/g de muestra seca), seguida por S (25 ml/g de muestra seca) y la fracción C (22 ml/g de muestra seca) después de 18 horas de hidratación de la muestra (Tabla 5).

La capacidad de absorción de agua (WHC) se define como la cantidad de agua retenida por las fibras sin la aplicación de ninguna fuerza externa, excepto la gravitacional y la presión atmosférica (Raghavendra y col., 2004). De esta manera, este parámetro indica la proporción de agua levemente asociada a la matriz de la fibra. La fracción de AIR mostró el más alto WHC (43 g/g de muestra seca) mientras que C y S no presentaron diferencias significativas entre sus valores de WHC (27-24 g/g de muestra seca) después de 18 horas de hidratación de la muestra (Tabla 5).

La capacidad de retención de agua (WRC) se define como la cantidad de agua que permanece en la fibra hidratada luego de la aplicación de una fuerza externa, sea presión o centrifugación (Raghavendra y col., 2004). Del mismo modo se definió RW, pero con referencia a la cantidad de agua absorbida (g) con respecto a 100 g de agua añadida. El agua que se absorbió fuertemente, la cual no tiene ningún efecto sobre el volumen de las deposiciones, podría considerarse que está hidratando, principalmente, las matrices de fibra. Estos parámetros son interesantes porque podrían relacionarse a la cantidad de agua que puede persistir o estar retenida por las partículas de la matriz de fibra a pesar del esfuerzo de cizalla aplicado, por ejemplo, durante el amasado donde las fracciones de calabacita participaran como ingrediente en la masa o durante el movimiento intestinal. Además, la RW da información acerca de la cantidad de agua requerida por la fibra para poder hidratarse, que es un factor importante a ser tenido en cuenta durante la formulación. La fracción AIR presentó el valor más alto de WRC (44 g/g de muestra seca) y RW (36 g de agua absorbida/ 100g de agua agregada), mientras que la WRC para las fracciones S y C mostró una leve pero significativa diferencia entre ambas, obteniéndose valores de 23 y 26 g/g de muestra seca, respectivamente (Tabla 5). No se encontraron diferencias al

comparar los valores respectivos de WHC y de WRC entre sí determinados para cada fracción de calabacita. Por lo tanto, se puede concluir que toda el agua que hidrata a las fracciones AIR, C y S es fuertemente absorbida por las matrices de estas fibras.

Tabla 5. Propiedades de hidratación de las fracciones ricas en fibra obtenidas de *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret[1].

Muestra	Capacidad de absorción de agua (WHC)	Capacidad de hinchamiento (SC) (ml/g) [3]	Capacidad de retención de agua (WRC)	Agua retenida (RW) (g/100 g) [4]
AIR	43 ± 7	41,8 ± 0,2	44 ± 8	36 ± 3
C	27 ± 2	22,0 ± 0,4	26 ± 2	28 ± 2
S	24 ± 6	25,0 ± 0,2	23 ± 6	22 ± 2

[1]Desvíos Standard (α: 0.05; n = 3).
[2]Gramos de agua/gramos de muestra seca.
[3]ml de agua/gramos de muestra seca.
[4]Gramos de agua retenida/100 g de agua agregada.

Los SC, WHC, WRC, RW son parámetros que dan información acerca de la capacidad máxima de absorción de agua de la matriz ya que se miden una vez alcanzado el equilibrio.

Para una completa caracterización de las propiedades de hidratación de las fibras, es importante conocer su cinética de absorción de agua. El conocimiento de la cinética permite, por ejemplo, determinar el tiempo que las fibras necesitan para absorber la cantidad de agua necesaria al realizar el mezclado de los ingredientes en una dada formulación, o si éstas necesitan ser hidratadas previamente durante un tiempo conocido, antes de agregarlas a la formulación. Además, es muy importante conocer la cinética de absorción de agua de las fibras para la aplicación en sistemas secos o semisecos. Como se puede ver en la Tabla 6, la WBC determinada por la absorción espontánea de agua de la fracción AIR duplicó la determinada para las fracciones de S y C (≈ 13 ml de agua/ g de muestra seca). De todos modos, el tiempo B necesario para absorber la mitad del valor de máxima absorción de agua (WBC/2) estuvo en el mismo orden de magnitud para la fracción AIR (6 s) y para la fracción S (19 s),

mientras que este parámetro fue 100 veces más alto para la fracción C (780 s). Las constantes de velocidad específica estuvieron en el mismo orden de magnitud para la fracción AIR y para la fracción S pero fue 63 a 40 veces más baja para la fracción C (Tabla 6). Las diferencias encontradas cuando comparamos los parámetros B y WBC se pueden comprender mejor observando las formas de las curvas de la cinética (Figura 2). Las WBCs alcanzadas por las curvas S y C son similares (10-15 ml/g) pero la última llega lentamente al equilibrio. Por consiguiente, las curvas de AIR y de S tuvieron esencialmente la misma forma pero diferente a la de la curva de C. Las fibras de S y especialmente las de AIR absorben agua instantáneamente pero la fracción C se equilibra recién después de 150 minutos.

Tabla 6. Parámetros determinados del ajuste de los datos experimentales con la ecuación cinéticas de absorción[1] de agua y de hinchamiento[2]como así también volumen específico de cada producto.

Producto	WBC [1,2] (ml/g) [5]	B [1] (min)	Constante de velocidad específica[1,2] $(ml\ min/g)^{-1}$	k [1,2] $(ml/g\ min^n)$	n [1]	Volumen Específico[1,2] (cm^3/g)
AIR	25,5 ± 0,2	0,10 ± 0,01	0,39 ± 0,02	20,8 ± 0,3	0,057 ± 0,004	6,6 ± 0,1
C	12,5 ± 0,3	13 ± 1	0,00615 ± 0,00003	2,6 ± 0,1	0,32 ± 0,01	2,50 ± 0,01
S	13,7 ± 0,1	0,31 ± 0,02	0,23 ± 0,01	9,5 ± 0,2	0,099 ± 0,008	1,10 ± 0,02

[1]Desvíos Standard (α: 0.05; n = 3).
[2]Base seca.
WBC, capacidad de absorción de agua.
B, tiempo necesario para absorber WBC/2.
k, constante de la cinética de hinchamiento.
n, exponente de hinchamiento.

Cuando los datos graficados en la Figura 2 se ajustaron con la relación propuesta en la ecuación (2) se determinaron los parámetros cinéticos *k* y *n.* Esta ecuación generalmente se aplica para determinar la potencia de hinchamiento de hidrogeles; el exponente *n* explica el mecanismo por el cual el agua difunde para producir el hinchamiento de las muestras (Jabbari y Nozari, 2000). Para muestras en forma de discos planos, *n* es 0,5 para una difusión de agua del tipo Fickiana, *n* entre 0,5 y 1,0 representa una difusión no-Fickiana o anómala. El mecanismo de hinchamiento Fickiano (n=0,5) indica que la relajación de las

cadenas de los polímeros absorbentes tiene poco efecto sobre la velocidad de hinchamiento. La relajación de las cadenas contribuye a la velocidad de hinchamiento cuando el valor de *n* se aproxima a 1,0.

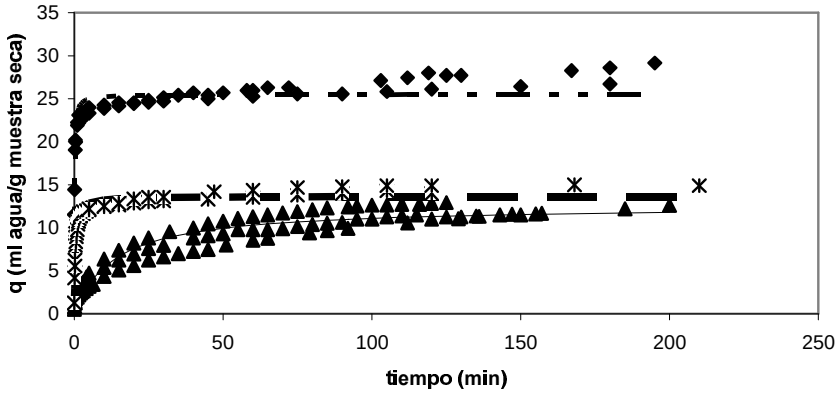


Figura 2: Datos experimentales y curvas de ajuste de la cinética de sorción de agua de la fibra obtenida de la calabacita (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret): ♦ AIR; **x** S; ▲ C.

Ecuación usada: $Q \times t / (B+t)$; donde Q = WBC o capacidad máxima de absorción de agua; B: tiempo necesario para absorber WBC/2.

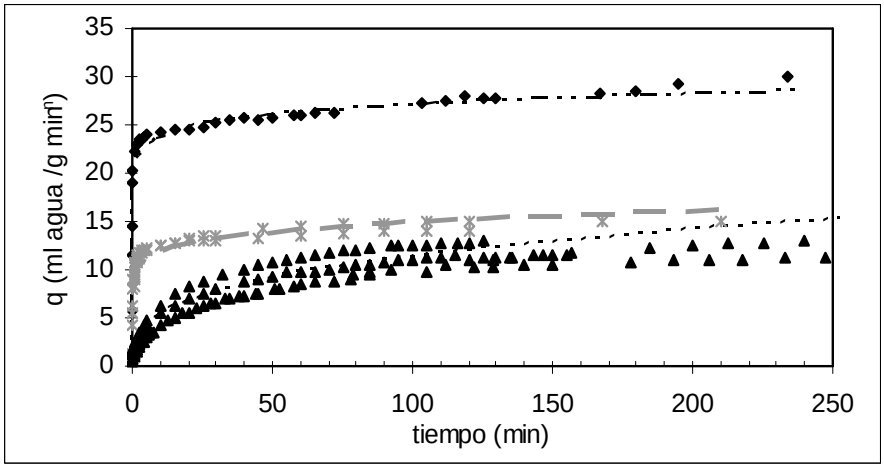


Figura 3: Datos experimentales y curvas de ajuste de la cinética de sorción de agua de la fibra obtenida de la calabacita (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret): ♦ AIR; x S; ▲ C. Ecuación usada: $q = k\ t^n$; donde: k: constante; n: exponente de hinchamiento.

Cuando un hidrogel seco entra en contacto con el agua, la misma difunde dentro del hidrogel y éste se hincha. La difusión implica migración de agua dentro de espacios pre-existentes o formados dinámicamente entre las cadenas de hidrogeles. El hinchamiento de los hidrogeles es el resultado del movimiento y división de grandes segmentos, resultando en el incremento de la distancia de separación entre las cadenas de hidrogeles (Karadağ y col., 2002). Consecuentemente, la existencia de un hinchamiento significativo necesariamente involucra la existencia de puntos hidrofílicos a lo largo del polímero (polisacáridos) de modo tal que una molécula pequeña como el agua pueda formar puentes hidrógeno para ubicarse. La permanencia de las moléculas de agua entre las cadenas de los polímeros seguida por la difusión y agregación de más moléculas de agua produce más hinchamiento de la matriz. Un mayor grado de hinchamiento se puede alcanzar si la hidratación de la matriz permite, al mismo tiempo, la ionización de cabezas polares a lo largo de las cadenas del polímero. Así, la repulsión de grupos polares entre las cadenas de polímero producirá un hinchamiento adicional y, desde el punto de vista del flujo, un incremento en la viscosidad (Da Silva y Rao, 1992). Una difusión más rápida del agua en la muestra necesita, al mismo tiempo, la existencia de un adecuado grado de porosidad en la misma, o sea, un área activa mayor. Cuando todos estos requisitos se satisfacen adecuadamente, ocurre entonces más absorción de agua acompañada por más y más hinchamiento de la matriz.

En el presente trabajo, la constante cinética k de hinchamiento más grande fue determinada para el AIR (20,8 ml/g $min^{0.057}$; Tabla 6) como se puede ver cuando se comparan las curvas de la Figura 3. Con la salvedad del diferente valor del exponente n, la fracción S mostró una constante k mayor (9,5 ml/g $min^{0,099}$) que la determinada para C (2,6 ml/g $min^{0,32}$) en las mismas condiciones experimentales. En la Figura 3 pueden verse las curvas correspondientes a la cinética de absorción de las fracciones estudiadas. Se puede concluir que una velocidad de absorción de agua muy alta e hinchamiento elevado, caracterizaron el producto AIR, mientras que estos parámetros tomaron menores valores para los polisacáridos extraídos de la pared celular de la cáscara de la calabacita (C). Simultáneo a la disminución del valor del exponente n, resulta un incremento del valor de k. Las muestras de AIR y S mostraron muy bajos exponentes (≈ 0,06-0,1) y ambos fueron muy distintos de los valores n=0,5 y n=1,0. Analizando la

ecuación 2, un orden cero en la velocidad de hinchamiento indicaría que $q=k$, o sea, independiente del tiempo. Las curvas obtenidas del hinchamiento de AIR y S son coherentes con un exponente n cercano a cero (Fig.3), lo que estaría indicando que estas matrices no representan un obstáculo a la difusión del agua y todas las moléculas de agua que alcanzan estas muestras inmediatamente son retenidas por los polímeros constitutivos de la fibra produciendo el hinchamiento y saturación instantáneos (valor de WBC) en la medida que encuentren puntos sorbentes disponibles. De todos modos, WBC de la fracción S fue la mitad que para la observada para la fracción AIR, mostrando un número más bajo de sitios activos para la absorción de agua, acorde con su contenido más bajo de fibra (≈ 44%).

Analizando los datos para la difusión de agua se observa que la matriz C presenta valores de n de 0,37, más cercanos a 0,5 y, consecuentemente, es posible hablar acerca de "un mecanismo" para la difusión de agua e hinchamiento. La matriz C se convierte, entonces, en una barrera para la absorción de agua y el hinchamiento, como también se puede concluir a partir de los resultados de SC, WHC y WBC. El obstáculo que constituye la matriz C a la difusión de agua también podría coincidir con una mejor retención de agua después de lograda la saturación de las cadenas poliméricas de la matriz de la fibra. Los polisacáridos de las paredes celulares extraídos de la cáscara de la calabacita no absorbieron agua instantáneamente. Esto puede deberse a: 1) ellos son de naturaleza menos hidrofílica o 2) las cadenas de polímeros, aunque hidrofílicas, son menos móviles y entonces se restringe el hinchamiento.

La absorción instantánea de agua líquida por materiales higroscópicos en polvo en el aparato de Baumann sigue un mecanismo de succión capilar de líquido con el correspondiente hinchamiento (Chen y col., 1984). Tan pronto como la muestra se coloca en el filtro de fibra de vidrio sobre el contenedor de agua, el agua comienza a penetrar en las estructuras capilares de la muestra debido a la presión de "succión" y como resultado de la tensión superficial del sistema. Aunque la distribución global de las estructuras capilares para los cuerpos porosos se puede evaluar utilizando un porosímetro de mercurio, como la mayor parte de las estructuras alimenticias colapsan bajo las altas presiones necesarias para realizar este ensayo, la verdadera distribución capilar es imposible de evaluar para estos materiales. Un indicador tal como el volumen

específico (cm^3/g) se podría utilizar como una aproximación a la estimación de las diferentes estructuras capilares. Teóricamente, el sistema más poroso, o sea, el de mayor volumen específico, es el que debería tomar mayor cantidad de agua, asumiendo que las composiciones químicas permanecieran iguales. Como se puede ver en la Tabla 6, la fracción C presentó mayor volumen específico que S. Si bien C fue más poroso que S y, por lo tanto, se podría esperar una más rápida difusión de agua, C mostró la más baja constante *k* para el hinchamiento (Fig.3, Tabla 6), aún cuando el valor de equilibrio (WBC) alcanzado fue el mismo que para S. De esta manera, la difusión no fue un limitante para el agua en la matriz C pero sí la característica de los polímeros presentes en la fracción C. La fracción S absorbió agua y se hinchó más rápidamente que C porque sus polímeros son más hidrofílicos. S mostró el mismo valor de saturación (WBC) que C probablemente, debido, en parte, al colapso ocurrido durante la obtención y deshidratación en estufa de S, como lo indicaría su menor volumen específico. Probablemente, el contenido de glucosa libre de S y de otros polisacáridos solubles, contribuyó al colapso de la matriz durante la deshidratación a 50ºC durante 4 horas (Gerschenson y col., 1981).

De acuerdo a Chen y col. (1984), las fibras de fruta, que contenían más pectina, mostraban un valor más alto de WBC que las fibras de cereales y legumbres. La fracción S mostró la mitad del contenido de fibra de las fracciones AIR y C y mostró la mitad del valor de WBC del AIR (Tabla 2). A pesar de que el contenido de fibra total de C es más alto que el de S, ello no compensó la menor naturaleza hidrofílica de C. Probablemente, el contenido significantemente mayor de pectinas encontrado en la fibra total del AIR fue el responsable de los valores más altos en SC, WHC, WBC, WRC y cinética de absorción de agua que mostró este producto. Aunque AIR y C mostraron los mismos porcentajes de celulosa y de ácidos urónicos (galacturónicos) en la composición de sus fibras, el primero presentó una cantidad mayor de hidratos de carbono totales no celulósicos (62% p/p) y, entonces, mayor contenido de pectina que C. De los datos observados en la Tabla 3 como así también el contenido de ácido galacturónico de la Tabla 2, se pudo calcular que la relación de ácido galacturónico/ramnosa tomaba valores de 3 para AIR y 6 para C, mostrando una mayor relación de ramnogalacturonano I/homogalacturonano para el AIR. Se puede concluir que el ramnogalacturonano I es un importante

componente de la pectina de AIR y que sus ramificaciones, constituidas por galactosa y arabinosa, podrían ser la causa de las excelentes propiedades de hidratación observadas para AIR.

Además, la fracción C presentó un contenido significativo de lignina (6% p/p del total del contenido de fibra). La lignina reemplaza al agua en la red tridimensional polimérica que constituye la pared celular, afectando al gel hidratado hidrofílico de la pared y creando un entorno hidrofóbico (Brett y Waldron, 1996). Este fenómeno incrementa la fuerza de los puentes hidrógeno entre los polisacáridos lo que, a su vez, incrementa la fuerza de la red de celulosa-hemicelulosa. En otras palabras, la presencia de lignina promueve las interacciones entre los polisacáridos de la pared celular debido a la pérdida del efecto plastificante del agua dentro del gel (hidrofílico) matriz de la pared celular. La lignina crea una pared celular más rígida e impermeable. Es así que, luego del tratamiento con etanol para la obtención de la fracción C, la lignina persiste alrededor de las microfibrillas de celulosa y, por lo tanto, entre las partículas de fibra luego del secado y la molienda, promoviendo un entorno más rígido e hidrofóbico. Es importante destacar que, la fracción C mostró un menor grado de presencia de cadenas laterales (zonas ramificadas) en sus polímero pécticos ya que la relación molar entre azúcares neutros/ácido urónico (galacturónico) fue de ≈ 3,8 a 1, mientras que esta relación para el AIR fue de ≈ 6,12/1,0, como se pudo calcular a partir de la composición química reportada en la Tabla 2. Probablemente la presencia de lignina y/o la menor presencia de ramificaciones en sus pectinas determinaron los valores más bajos no sólo para la absorción de agua sino también para la capacidad de hinchamiento de la fracción C.

La fibra dietaria incluye todos los polisacáridos y la lignina en la dieta que no son digeridas por las secreciones endógenas del tracto digestivo del ser humano (o huésped), incluyendo aquellos polisacáridos presentes en algunos aditivos alimentarios, por ej. gomas y agentes espesantes (Selvendran, 1991). Los componentes de la fibra soluble, que incluyen a los polisacáridos pécticos, deben, a través de sus propiedades de aumento de viscosidad y formación de gel, demorar el vaciamiento gástrico y posiblemente reducir las velocidades de absorción en el intestino delgado, una característica que es particularmente importante para la diabetes (Brett y Waldron, 1996). Se ha sugerido que algunos

de los polisacáridos pécticos de pared celular que se solubilizan durante la cocción y procesamiento de frutas y vegetales deben tener significancia fisiológica en la digestión posterior. El RG I solubilizado en el intestino puede operar como un polisacárido péctico "antitumoral". Las frutas que son ricas en paredes celulares primarias las cuales tienen bajo contenido de lignina serán altamente degradadas (≥ 90%) por las bacterias del colon. Esto se debe a la difusión de los componentes solubles de la fibra fácilmente fermentables, fuera de los residuos de las paredes celulares. Esto facilita la penetración de la matriz de la fibra por las bacterias del colon, que pueden entonces degradar las microfibrillas de celulosa no-lignificadas. Por consiguiente, tales fibras dietarias estimulan el crecimiento y la proliferación de la flora bacteriana y permiten un moderado incremento en la masa fecal. En contraste, la fibra rica en células de tipo lignificadas serán menos fermentables. De acuerdo con Hartley (1978), sólo alrededor del 35% de la fibra dietaria del salvado de trigo se degrada debido a su baja solubilidad y alto grado de lignificación. La fibra de salvado parcialmente degradada tiene una gran WHC: el complejo de fibra-bacterias y asociado al agua contribuyen a una gran masa fecal, que es aproximadamente el doble que el de la fibra vegetal. Las estructuras tubulares lignificadas retienen fase acuosa sólo a través de capilaridad.

Las fracciones de AIR, S y C obtenidas en el presente trabajo podrían entonces tener importantes efectos fisiológicos. Todos estos materiales de fibras extraídos de los residuos de la calabacita mostraron WHCs y WRCs generalmente más altos que los reportados por Raghavendra y col. (2004) para una serie de productos de fibra, incluyendo fibras de manzana y cítricos. El comportamiento de la fracción de AIR en relación a la absorción de agua e hinchamiento (SC) es especialmente considerable. Mostró SC y WRC cuatro veces más altas como así también WHC cinco veces más alta que las fibras dietarias de manzana y cítricos reportadas. Además, S y C también mostraron valores de WRC y WHC más altos que aquellos de los productos antes mencionados. Estas características sugieren que estas fibras tendrían interesantes efectos fisiológicos.

III-3-3-Propiedades hipoglucémicas

Muchos investigadores han estudiado las propiedades hipoglucémicas de la fibra dietaria *in vivo* con animales (Oguido y col., 1998) y en paciente diabéticos (Biolley y col., 1998). También, se desarrollaron ensayos *in vitro* (Ou y col., 2001). Se ha encontrado que la fibra dietaria tiene la capacidad de unirse a diferentes sustancias como sales biliares y glucosa que tienen implicaciones en el metabolismo del colesterol y en el control de la diabetes, respectivamente. En este sentido, se determinó la capacidad de absorción de glucosa (GAC) para las fracciones de AIR y de C del presente trabajo utilizando soluciones de diferentes concentraciones de glucosa. Los datos obtenidos se encuentran representados en la Figura 4. No se utilizó la fracción S debido a su importante contenido de glucosa (Tabla 1) que podría interferir en este ensayo. Se detectaron valores significativos en la GAC para concentraciones 50mM de glucosa. La GAC aumentó con la concentración de glucosa (en el rango 5-300 mM) en forma cuadrática para ambas fracciones de fibra:

$$\text{AIR:}\quad GAC\ [\mu mol/g] = 0{,}018\ x^2 + 4{,}4\ x$$

$$\text{C:}\quad GAC\ [\mu mol/g] = 0{,}009\ x^2 + 1{,}8\ x$$

Donde x es la concentración de glucosa en mM. Así, se debe esperar mayor retención de glucosa por parte de las matrices de fibra cuando la concentración de glucosa aumenta en la luz intestinal debido a la ingesta. Se observó que el AIR mostró mejores valores de GACs que C. Los valores de GAC determinados a concentraciones de glucosa de 100mM para AIR (660±70 μmol/g; SD para n=3) y para C (340±10 μmol/g; SD para n=3) estuvieron en el mismo orden que aquellos reportados por Ou y col. (2001) para las gomas guar (538,4 μmol/g) y xántica (431 μmol/g) y para carboximetil celulosa (418,3 μmol/g), así como para las fracciones de fibra obtenidas del salvado de trigo (555 y 454 μmol/g).

La gran afinidad de la fibra de la calabacita (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) por las moléculas de agua actuaría como un obstáculo para una mayor retención de glucosa. Las moléculas de β-D-glucosa adoptan una

conformación silla termodinámicamente favorecida cuando se encuentran solvatadas con agua (Kabayama y Patterson, 1958). Al mismo tiempo, esta conformación de la glucosa favorece la permanencia de las moléculas de agua cerca de cada molécula de glucosa, como lo indican las propiedades termodinámicas de solvatación, considerándose a este soluto entonces un "formador" de la estructura del agua como solvente (Suggett, 1975). Por lo tanto, la retención de moléculas de β-D-glucosa por los polisacáridos que constituyen las fracciones de fibra de la calabacita debe involucrar la unión o atrapamiento termodinámicamente favorecido de moléculas de D-glucosa hidratadas por parte de los grupos hidrofílicos de los polisacáridos. De todos modos estos grupos han mostrado ser particularmente hidrofílicos y deben entonces preferir la hidratación de sus estructuras por las moléculas de agua. Mas aún, la retención de moléculas de D-glucosa osmóticamente activas por los productos de fibra derivados de la calabacita puede en realidad deberse a la retención primaria de agua por dichas matrices.

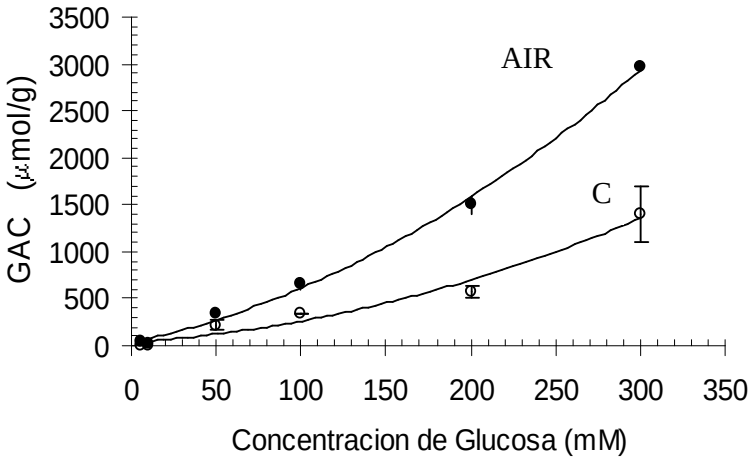


Figura 4: Propiedades hipoglucémicas de las fracciones de fibra. GAC: capacidad de absorción de glucosa.

III-4-Conclusiones

Los productos enriquecidos con fibra obtenidos a partir de la calabacita (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) mostraron importantes propiedades de hidratación, habiéndose observado que toda el agua que hidrató a AIR, S o C se absorbió fuertemente por las matrices de la fibra y, por lo tanto, no tendría ningún efecto sobre el peso de las deposiciones. Las propiedades de hidratación fueron dependientes de la composición química. La presencia de RG I y otras pectinas con cadenas laterales determinarían la mayor absorción de agua e hinchamiento del AIR, mientras que la presencia de lignina determinaría la impermeabilización y rigidización de las partículas de fibra con la consiguiente disminución de los parámetros de hidratación observados para C.

Las fracciones AIR y C ensayadas mostraron valores adecuados para la retención de glucosa, los cuales estuvieron en concordancia con otros valores informados en bibliografía para fibras de otros tejidos vegetales. Probablemente la gran afinidad de la fibra de la calabacita por las moléculas de agua actúa como un obstáculo para una aún mayor retención de glucosa.

El interesante comportamiento mostrado por las fracciones de fibra aisladas de la calabacita en relación a la retención de agua y de glucosa es prometedor en vista de su aplicación como ingrediente alimentario. El aislamiento de fibra con estas características funcionales es un camino viable y con potencialidad económica de agregar valor a los residuos de la industrialización de calabacita.

III-5-Referencias

AACC. 1984. Approved methods of the AACC. St Paul Mnn: *American Association of Cereal Chemist*. Method 88-04.

Albersheim P, Nevins DJ, English PD and Karr A, A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Cabohydr Res* 5:340-345 (1967).

AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th ed. Volume 2. USA: AOAC, Inc. Method 920.152. p 917.

AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th ed. Volume 2. USA: AOAC, Inc. Method 923.03. p 777

AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th ed. Volume 2. USA: AOAC, Inc. Method 985.29. p 1105

Bradley DJ, Kjelbom and Lamb CJ. 1992. Elicitor-and wound-induced oxidative cross-linking of proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 70:21-35.

Brett CT and Waldron. 1996. *The physiology and biochemistry of plant cell walls*. 2nd ed. London: Chapman and Hall. p 89.

Brett CT and Waldron. 1996. *The physiology and biochemistry of plant cell walls*. 2nd ed. London: Chapman and Hall. p 231-237.

Cadden AM. 1987. Comparative effects of particle size reduction on physical structure and water binding properties of several plant fibers. *J Food Sci* 52(6):1595-1599.

Cardona Velásquez. 2004. La nueva tendencia en nutrición. *Enfásis Alimentación* 4:86-90.

Carpita NC and Gibeaut DM. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3:1-30.

Chen JY, Piva M, Labuza TP. 1984. Evaluation of water binding capacity (WBC) of food fiber sources. *J Food Sci* 49:59-63.

Chung HD and Youn SJ. 1998. Chemical composition and quality evaluation of ripe fruit of the Korean native squash (*Cucurbita moschata*). *J Korean Soc Hort Sci* 39(5): 510-516.

Chung HD and Youn SJ. 1998. Chemical composition of immature fruits and leaves, and enlargement of fruits of Korean native squash (*Cucurbita moschata*). *J Korean Soc Hort Sci* 39(5): 504-509.

Chung HD and Youn SJ. 1998. Ecological and morphological characteristics of the Korean native squash (*Cucurbita moschata*). *J Korean Soc Hort Sci* 39(4): 377-384.

Courtin CM and Delcour JA. 2002. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *J Cereal Sci* 35: 225-243.

Da Silva YAL, Rao MA. 1992. Chapter 11: *Viscoelastic properties of foods*. Essex, England: Elsevier Science Publishers Ltd.

de Escalada Pla MF, Ponce NM, Wider ME, Stortz CA, Rojas AM, Gerschenson LN. 2005. *J Sci Food Agric* 85 (11): 1852-1860.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F.1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356.

FDA. 1993. Code of Federal Regulations. Title 21: Food and Drugs. Chapter I: Food and Drug Administration, Department of Health Claims. Part 101: Food Labeling.

Subpart E: Specific requirements for health claims. Sec 101.78 Health claims: fruits and vegetables and cancer. Available from: USA Accessed 2005 June.

Femenia A, Robertson JA, Waldron KW and Selvendran RR. 1998. Cauliflower (*Brassica oleracea* L), globe artichoke (*Cynara scolymus*) and chicory witloof (*Cichorium intybus*) processing by-products as sources of dietary fibre. *J Sci Food Agric* 77:511-518.

Fernández García E, Mc Gregor JU. 1997. Fortification of sweetened plain yogurt with insoluble dietary fiber. *Eur Food Res Technol* 204(6): 433-437.

Filisetti-Cozzi TMCC and Carpita NC. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal Biochem* 197:157-162.

Gerschenson LN, Bartholomai GB, Chirife J. 1981. Structural collapse and volatile retention during heating and rehumidification of freeze dried tomato juice. *J.Food Sci* 46(5): 1552-1556.

Gómez R, Malec L, Vigo M, Buera P. 2001. *Fundamentos de métodos para el análisis de alimentos*. Editado por CCC Educando. Ciudad Universitaria, Buenos Aires.

Guillon F, Champ M. 2000. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Res Int* 33:233-245.

Hartley RD. 1978. The lignin fraction of plant cell walls. *Am J Ciln Nutr* 31: 90-93.

Hoffman J, Linseisen J, Riedl J and Wolfram G. 1999. Dietary fiber reduces the antioxidative effect of a carotenoid and α-tocopherol mixture on LDL oxidation ex vivo in humans. *Eur J of Nutri.* 38(6):278-285.

Jabbari E, Nozari S. 2000. Swelling behavior of acrylic acid hydrogels prepared by □-radiation crosslinking of polyacrylic acid in aqueous solution. *Eur Polymer J* 36:2685-2692.

Jona R, Fronda A. 1997. Comparative histochemical analysis of cell wall polysaccharides by enzymatic and chemical extractions of two fruits. *Biotechnic and Histochemistry*. 72(1):22-27.

Kabayama MA and Patterson D. 1958. The thermodynamics of mutarotation of some sugars. II: Theoretical considerations. *Can J Chem* 36: 563-573.

Karadağ E, Üzüm Ö, Saraydin D. 2002. Swelling equilibria and dye adsorption studies of chemically crosslinked superabsorbent acrylamide/maleic acid hydrogels. *Eur Polymer J* 38: 2133-2141.

Laufenberg G, Kunz B, Nystroem M. 2003. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology* 87: 167-198.

Mc Cance and Winddowson's. 1991. *The composition of foods*. 5th ed. London: Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.p 264-265.

Morrison IM, Hydrolysis of plant cell walls with trifluoroacetic acid. *Phytochemistry* 27:1097-1100 (1988).

Ng A and Waldron KW. 1997. Effect of cooking and pre-cooking on cell wall chemistry in relation to firmness of carrot tissues. *J Sci Food Agric* 73: 503-512.

Ng A, Parr AJ, Ingham LM, Rigby NM, Waldron KM. 1998. Cell wall chemistry of carrots (*Daucus carota* CV. Amstrong) during maturation and storage. *J Agric Food Chem* 46: 2933-2939.

NOVIS. Industry & Science News 2003. Pectins expansion for Danisco. Available from: Montpellier. France. Europe. Accessed 2005 June.

Oguido AK, Takamatsu EE, Kikuchi F. 1998. Metabolic balance of fibers from cereal bran in the diabetic rats. En: CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y

Tecnología para el Desarrollo). *Temas en tecnología de los alimentos*. Volume.2. México: Instituto Politécnico Nacional pp 199-205.

Ou S, Kwok K, Li Y and Fu L. 2001. In vitro study of possible role of dietary fibre in lowering postprandial serum glucose. *J Agric Food Chem* 49:1026-1029.

Pellerin P and O'Neill MA. 1998. The interaction of the pectic polysaccharide Rhamnogalacturonan II with heavy metals and lanthanides in wines and fruit juices. *Analusis Magazine* 26(6):32-36.

Pilosof AM. 2000. Propiedades de hidratación. En: Pilosof AM and Bartholomai GB. *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Buenos Aires. EUDEBA Editorial Universitaria de Buenos Aires pp 17-29.

Ptitchkina NM, Danilova IA, Doxastakis G, Kasapis S and Morris E. 1994. Pumpkin pectin: gel formation at unusually low concentration. *Carbohydrate Polymers* 23: 265-273.

Ptitchkina NM, Novokreschonova LV, Piskunova GV, Morris ER. 1998. Large enhancements in loaf volume and organoleptic acceptability of wheat bread by small additions of pumpkin powder: possible role of acetylated pectin in stabilising gas-cell structure. *Food Hydrocolloids* 12:333-337.

Raghavendra SN, Rastogi NK, Raghavarao KSMS, Tharanathan RN. 2004. Dietary fibre from coconut residue: effects of different treatments and particle size on the hydration properties. *Eur Food Res Technol* 218:563-567.

Redgwell RJ, Melton RD and Brasch DJ. 1990. Cell wall changes in kiwifruit following post harvest ethylene treatment. *Phytochemistry* 29:399-407.

Ritger PL, Peppas NA. 1987. A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J.Cont. Release* 5: 23-36.

Ritger PL, Peppas NA. 1987. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J.Cont. Release* 5: 37-42.

Robertson JA, Monredon FD, Dysseler P, Guillon F, Amado R, Thibault JF. 2000. *Lebensm Wiss Technol* 33:72-79.

Robertson JA. 1988. Physicochemical characteristics of food and the digestion of starch and dietary fibre during gut transit. *Proceedings of the Nutrition Society* 47:143-152.

Schieber A, Stintzing FC, Carle R. 2001. By-products of plant food processing as source of funtional componds, recent developments. *Trends in Food Science & Technology* 12:401-413.

Selvendran RR. 1991. Dietary fibre, chemistry and properties. In: Yelles M. *Encyclopedia of Human Biology*. Vol 3. London: Academic Press. pp 35-45.

Sugget A. 1975. *Water: A comprehensive treatise*. Vol 4. New York: Plenum. pp. 531.

Xu Y and Siegenthaler PA.. 1997. Low temperature treatments induce an increase in the relative content of both linolenic and DELTA-3-trans-hexadecenoic acids in thylakoid membrane phosphatidylglycerol of squash cotyledons. *Plant and Cell Physiol*. 38(5): 611-618.

CAPITULO IV
FIBRA DE CALABACITA COMO ADITIVO ALIMENTARIO EN LA INDUSTRIA DE PANIFICADOS

Índice Capítulo IV

IV- 1- Introducción ..... - 156 -
IV-2-Materiales y Métodos ..... - 159 -
IV-2-1-Materiales ..... - 159 -
IV-2-2-Métodos ..... - 160 -
IV-2-2-1-*Características reológicas de la masa* ..... - 160 -
IV-2-2-2-Panificación y calidad del pan elaborado ..... - 161 -
IV-3-Resultados y Discusión ..... - 165 -
IV-3-1-Características reológicas de la masa ..... - 165 -
VI-3-1-1-Farinógrafo Brabender ..... - 165 -
IV-3-1-2-Alveógrafo ..... - 173 -
IV-3-1-3-Zimotaquígrafo ..... - 177 -
IV-3-2-Efecto del agregado de la fibra de calabacita sobre el proceso de panificación y las características finales del pan. ..... - 179 -
IV-3-2-1-Parámetros de calidad del pan. ..... - 179 -
IV-3-2-2-Efecto de la fibra de la calabacita sobre el mecanismo de envejecimiento del pan ..... - 188 -
IV-4-Conclusiones ..... - 196 -
IV-5-Referencias ..... - 199 -

IV- 1- Introducción

Hoy en día existe una creciente demanda por una nueva generación de productos alimenticios más saludables que, al mismo tiempo, tengan excelentes cualidades sensoriales. La fibra dietaria es un ingrediente común e importante de esta nueva generación de productos alimenticios (Gómez y col., 2003).

Por otro lado, los métodos modernos de procesamiento de alimentos frecuentemente reducen el contenido de fibra dietaria. La harina de trigo blanca, por ejemplo, tiene menos fibra que la harina que proviene del grano entero de trigo (Obregón, 2002). El agregado de fibras a los alimentos es una alternativa para compensar la deficiencia existente en la dieta. Aparte de los propósitos nutricionales, la fibra se puede utilizar con otros propósitos tecnológicos. Los residuos del procesamiento de los vegetales generalmente contienen cantidades considerables de compuestos potencialmente interesantes. El desarrollo de ingredientes multifuncionales a partir de residuos vegetales y su aplicación a diferentes productos alimenticios es un desafío en este sentido (Laufenberg y col., 2003). Asimismo, es de destacar que el uso de los residuos de la industrialización de vegetales agregará valor a la materia prima y reducirá los residuos generados.

Muchos investigadores han buscado aumentar el contenido de fibras en productos panificados. Witting de Penna y colaboradores (1998) utilizaron fibra de lupino en "muffins". Salvado de trigo, de maíz, de avena y de soja fueron utilizados por Jeltema y Zabic (1979) en bizcochuelos. Siete tipos diferentes de celulosa, cuatro tipos de salvado de trigo, y dos de cáscara de avena fueron estudiadas durante el amasado por Pomeranz y colaboradores (1977). Otros trabajos tienen como principal objetivo aprovechar las fibras de los residuos de procesamiento industrial de las frutas, utilizando la cáscara de manzana remanente luego de la extracción del jugo, en recetas de panificación (Protzek y col., 1998). También panes conteniendo polvo de celulosa de las semillas de algodón (Forand, 1990), vegetales en polvo (Ree, 2004), puré de calabaza (Pashchenko y col., 2002), etc, se pueden encontrar entre algunos de los recientes desarrollos al respecto; mostrando el gran esfuerzo realizado por investigadores y empresas, en este campo.

La fibra dietaria incrementa el valor nutricional del pan pero generalmente, al mismo tiempo, altera las propiedades reológicas de la masa y, finalmente, la calidad y propiedades sensoriales del pan. Se ha reportado (Gómez y col., 2003) que altos porcentajes de diferentes tipos de fibra dietaria en panificación han producido importantes detrimentos en la manipulación de la masa y en la calidad del pan, a menos que se agreguen algunos aditivos. El principal problema del agregado de fibra dietaria en panadería es la reducción importante en el volumen de la pieza y la diferente textura de los panes obtenidos (Gómez y col., 2003). Los resultados reportados son dependientes del tipo de fibra utilizada. Gómez y colaboradores (2003) estudiaron el efecto de la adición de celulosa, y fibras de cacao, café, arvejas, naranja y trigo, hasta un 5% en base al peso de la harina, y encontraron que las fibras de cacao y de café dieron los panes de peor calidad sensorial, mientras que el resto de las fibras ensayadas dieron panes de una aceptabilidad bastante buena. Algunos aditivos, como gluten o agentes oxidantes y emulsificantes, deben agregarse para contrarrestar el efecto indeseable del agregado de fibra sobre las características de manipuleo de la masa y la reducción del volumen del pan, cuando la adición alcanza el 5% (Gómez et col., 2003). Ptitchkina y colaboradores (1998) obtuvieron un gran mejoramiento del volumen de las piezas y de la aceptabilidad organoléptica del pan de trigo cuando se utilizaron pequeños agregados de polvo de zapallo. Otros investigadores estudiaron las propiedades de la pasta de diferentes sistemas harina de trigo-hidrocoloides, y hallaron que la goma xántica y las pectinas incrementaban la estabilidad al horneado (Rojas y col., 1999). Goesaert y colaboradores (2005) resumieron la funcionalidad de los arabinoxilanos en panificación como el resultado de dos acciones que provienen de diferentes fracciones: una extraíble en agua (WE-AX) y la otra constituída por arabinoxilanos insolubles en agua (WU-AX).

En el Capitulo III, propusimos diferentes métodos para obtener productos enriquecidos en fibra a partir de los residuos de la calabacita (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret). Se analizó la composición y las propiedades funcionales, en cada caso. La composición química reveló un importante contenido de pectinas, mientras que las propiedades de absorción de agua fueron altas, augurando un buen comportamiento de estos productos como ingredientes multifuncionales en el desarrollo de alimentos.

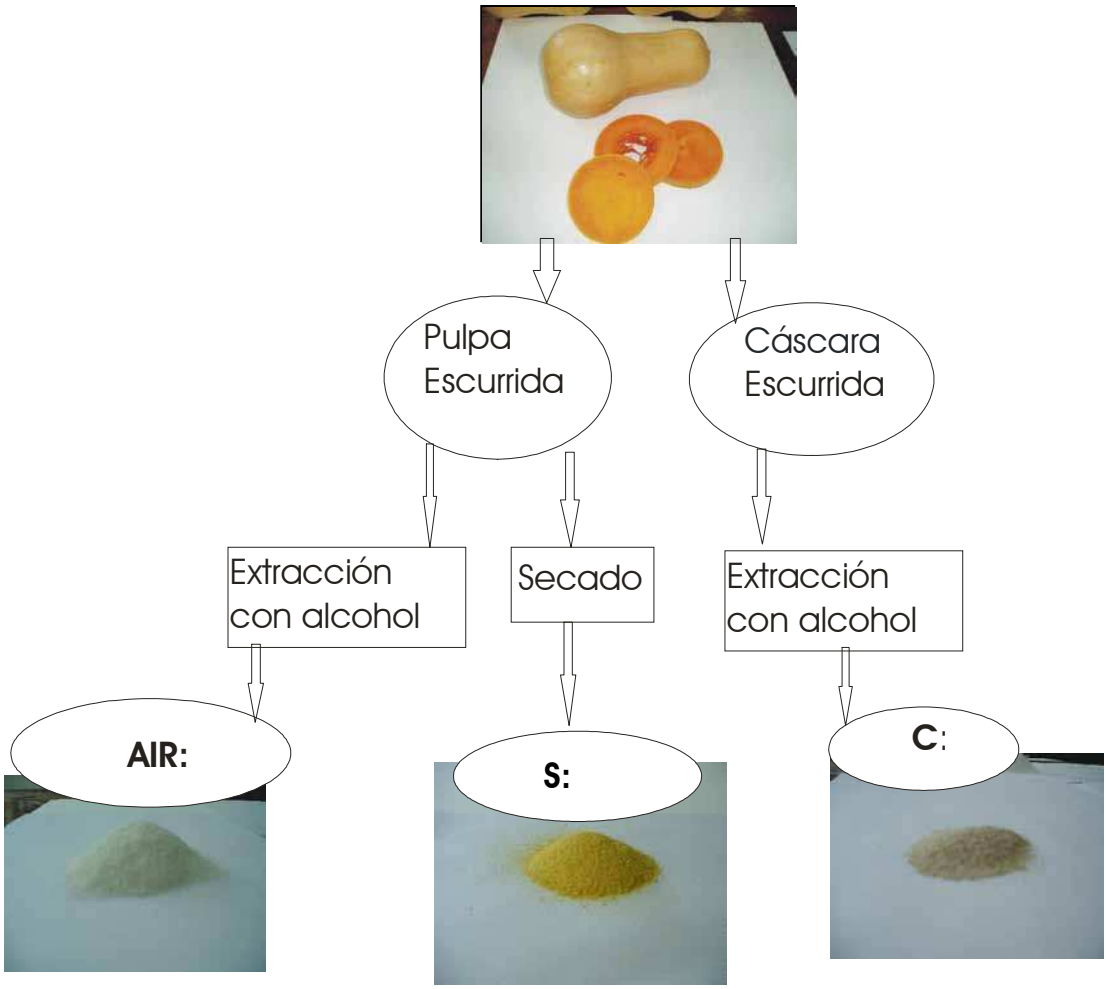
El objetivo del presente capítulo fue estudiar el comportamiento de las fibras extraídas de la calabacita en las masas, en los procesos de panificación y en la calidad del pan. De este modo, se llevó a cabo primero, una caracterización reológica de las masas con las distintas fracciones incorporadas a la harina, a través de estudios con farinógrafo, alveógrafo y zimotaquígrafo. Luego de esto, también se evaluó el comportamiento durante la panificación y durante el envejecimiento del pan fabricado con dichas masas.

IV-2-Materiales y Métodos

IV-2-1-Materiales

La diferentes fracciones de fibra de calabacita se prepararon como se describió en forma completa en el Capitulo III y se resume en el Esquema 1.

Esquema 1. Obtención de las fracciones de fibra a partir de la calabacita



En los ensayos de caracterización así como en el proceso de panificación se utilizó harina de trigo (Molino Central Norte™, Buenos Aires, Argentina), con un contenido de cenizas de 0,65%, de acuerdo a la declaración del proveedor y contenido de humedad de 13,3% determinada de acuerdo a la técnica AOAC 925.10 (AOAC, 1995).

Cuando fue necesario, se utilizó levadura prensada (*Saccharomyces cerevisiae*, CALSA™, Buenos Aires, Argentina).

Se utilizó además, NaCl y propionato de sodio (Saporiti™, Buenos Aires, Argentina) en el proceso de panificación, ambos de grado alimenticio.

Cada determinación se llevó a cabo con harina proveniente de la misma bolsa de 50 kg, previamente homogenizada y lo mismo puede decirse de la levadura prensada utilizada.

Los ensayos reológicos de la masa, se realizaron con harina adicionada con 5 g/kg de cada fracción y los resultados se compararon con aquellos obtenidos sin agregados (control). En los ensayos de panificación, una fórmula de pan base, sin agregado de fibra (control) y otras con, 5, 10 o 15 g de fracción de fibra por kg de harina, se preparó con cada tipo de fracción de fibra estudiada (S, AIR o C).

IV-2-2-Métodos

IV-2-2-1-*Características reológicas de la masa*

Se realizó un ensayo farinográfico utilizando un Farinógrafo (Brabender Modelo 8101, Duisberg, Alemania) y siguiendo la norma ISO 5530-1:1991. La masa de harina a utilizar se calculó considerando que se usan 300 g cuando su contenido de humedad es de 14 g /100g y usando la siguiente ecuación:

Masa de harina de (14g/100g) = (100-14)/(100-M) x peso de harina

Donde M es el contenido de humedad de la harina (g/100g).

La harina se colocó en la amasadora y se agregaron 1,5 g de fracción de fibra. Los ingredientes secos se mezclaron durante 30 segundos antes de agregar el agua. Luego, se agregó el agua de la bureta graduada hasta que la curva alcanzó las 500 unidades Farinográficas (FU). Una descripción detallada de los siguientes pasos se puede encontrar en ISO 5530-1, 1991 o en Zaidul y col., 2004.

El ensayo alveográfico, se realizó usando un alveógrafo MA 95 (Tripette et Renaud, France) siguiendo el método Standard (ISO 5530-4:1991). Doscientos cincuenta gramos de harina y 1,25 gramos de fracción de fibra

fueron colocados en la amasadora del alveógrafo. Los ingredientes secos se mezclaron durante 30 segundos y entonces, 133,9 ml de solución acuosa de NaCl (*c*: 0,349 mol/kg) fueron agregados de la bureta. Una descripción detallada de los siguientes pasos se puede encontrar en ISO 5530-4 (1991).

La reología de la masa durante la fermentación se determinó usando un zimotaquígrafo (Tripette et Renaud, France), siguiendo las especificaciones del proveedor. Doscientos cincuenta gramos de harina, 1,25 gramos de fracción de fibra, 5 g de NaCl y 5 g de levadura prensada se mezclaron en la amasadora de un farinógrafo durante 8 minutos y se agregó agua de la bureta hasta alcanzar una consistencia de masa de 500 FU. Luego se registró tanto la producción como así también la retención de gas durante la fermentación a 27ºC.

Todas las determinaciones reológicas se hicieron, por lo menos, por duplicado y se informan los valores promedio.

IV-2-2-2-Panificación y calidad del pan elaborado

La fibra se ensayó en una receta de pan, en la escuela de panadería de la empresa Taxonera S.A., quienes generosamente prestaron equipamiento, materiales y la ayuda de panaderos entrenados en el proceso de panificación. Se usó una receta básica de pan: 1000g de harina (13,3% de humedad), agua hasta alcanzar el mismo tiempo de desarrollo de la masa (8 min total) para todos los sistemas estudiados, 40 g de levadura prensada, 20 g de sal y 3,2 g de propionato de sodio. Se amasaron la fórmula básica (control) y la fórmula con 5, 10 y 15 gramos de cada fracción de fibra de calabacita durante 2 min a velocidad lenta y 6 minutos a alta velocidad en una amasadora espiral (Indupan™, Rosario, Argentina). En todos los casos, la fibra fue hidratada previamente con 100 ml de agua a 30ºC durante 15 minutos y entonces incorporada a la amasadora con los ingredientes secos: harina, NaCl y propionato de sodio. Finalmente, se agregó la levadura y el resto del agua.

Después del amasado, la masa se dividió en piezas de 350 g, se armaron bollos que se dejaron descansar durante 1 hora a 22ºC (primera fermentación). Luego se estiraron los bollos, se desgasificaron y armaron los panes, se colocaron en moldes y se dejaron fermentar. Scanlon y Zghal, 2001 reportaron que en un proceso de panificación real, el panadero golpea la masa para

optimizar la estructura de la miga en la pieza final. Por lo tanto, se lleva a cabo un punzado, laminado y moldeado de la masa para redistribuir los agentes de levado y las células de gas y, de este modo, mejorar el aspecto de la miga; esto es lo que se denomina desgasificado. Se hornearon las piezas en un horno rotativo con convección de aire durante 30 minutos a 200ºC. Luego del horneado, los panes se enfriaron durante dos horas a una temperatura de ≈ 23ºC.

El procedimiento de panificación se realizó por duplicado y el pan control, sin agregado de fibra, se preparó cada vez que se amasaron y hornearon los panes.

Se determinó el contenido de humedad de los diferentes panes en una cámara de convección a 110ºC durante una hora.

El rendimiento de pan se calculó evaluando, por cada kilogramo de harina utilizada, el peso del pan obtenido después de descontar la fibra agregada.

Evaluación de la calidad del pan

Una vez enfriados los panes se determinó el peso y el volumen por la técnica de desplazamiento de semillas (Ptitchkina et col., 1998). Se calculó el volumen específico a partir de estos datos. Luego de esto, los panes fueron cortados en rebanadas de 25 mm de espesor y envasados en bolsas plásticas (polietileno de baja densidad) para simular una panificación industrial y almacenada a temperatura ambiente de ≈ 23ºC. Se llevaron a cabo las siguientes mediciones:

- *Firmeza de la miga*

Veinticuatro horas más tarde, se registraron curvas de Fuerza-deformación de acuerdo al método AACC 74.09 (Ponte & Ovadia, 1996). Los ensayos de compresión se realizaron con una prensa Universal Instron modelo 1011 (Instron Corp, Canton, MA, USA), con una punta de medición de platos paralelos de 30 mm de diámetro. La velocidad del cabezal durante el ensayo fue de 100 mm/min. Para cada composición se midieron, cuatro rebanadas diferentes, provenientes de distintos panes. La firmeza de las rebanadas (F) se calculó como la relación entre la fuerza y la deformación al 25% de compresión de la miga (Ponte y Ovadia, 1996).

Las curvas de Fuerza-deformación también fueron registradas a lo largo del almacenamiento a temperatura ambiente (≈ 23ºC), para los intervalos de

tiempo de 2, 3, 5, 6, 8 y 9 días posteriores al horneado, a fin de establecer la cinética de envejecimiento en los panes control y en aquellos suplementados con fibra. Se usó la ecuación de Avrami (Ponte y Ovadia, 1996; Willhoft, 1971) para ajustar los datos experimentales en cada caso, y se determinaron los parámetros.

- *Color de la miga y de la corteza*

El color se determinó utilizando un espectrofotómetro Minolta CM-508d (Minolta, Japón) como describieron Gómez y col. (2003). Los valores triestímulo fueron calculados automáticamente a partir del espectro mediante un programa de computación. Los resultados se expresaron en el espacio de color CIE L*a*b*y fueron obtenidos usando un iluminante standard D65 y un observador standard de 2º (CIE, 1931). Todas las determinaciones de color se hicieron 2x3x5 veces ya que el color de la corteza y de la miga fue chequeado en dos puntos diferentes de 3 rebanadas diferentes de pan y cada punto fue medido cinco veces.

- *Análisis Térmico*

Se analizaron el pan control y el pan con 10 g de la fracción C por kg de harina.

Las muestras fueron tomadas del centro de una rebanada de pan luego de 7 días de envejecimiento. Muestras de ≈ 10 mg se pesaron en cápsulas de aluminio de 40 µl y se agregó agua destilada con una micropipeta para obtener una relación de agua:miga de 3:1. La cantidad de agua agregada fue en exceso para permitir la completa gelatinización del almidón retrogradado durante la posterior corrida térmica (Haros y col., 2002). El agua se agregó tres horas antes de realizar el ensayo térmico.

Las mediciones se realizaron con un calorímetro diferencial de barrido (DSC) 822^e Mettler Toledo (Schwerzenbach, Switzerland). El sistema fue calibrado, previo al análisis, con indio (156,6ºC), plomo (327,5ºC) y zinc (419,6ºC). Las muestras fueron calentadas de 0ºC a 120ºC a una velocidad de calentamiento de 10ºC/min.

La temperatura y la entalpía correspondientes a la gelatinización del almidón cristalizado durante el envejecimiento fue evaluado a partir de los termogramas usando el programa Mettler Star^e. El contenido exacto de materia seca se determinó para cada cápsula individual después de la corrida de DSC,

pinchando la cápsula y secándola a 105ºC durante 16 horas. La entalpía fue expresada en J/g de muestra.

- *Análisis de la imagen digitalizada*

Se analizaron el pan control y el pan con 10 g de fracción C por cada kg de harina. Las células de la miga (alveolos) se analizaron adquiriendo primero la imagen de una rebanada de pan mediante un scanner Cannon Modelo CanoScan N640P ex (New Cork, USA), y luego midiendo sus áreas y contándolas como partículas u objetos en una imagen binaria o mejorada usando el programa Scion Image (Release Beta-3b, Scion Corporation 1998, Maryland, USA). Se registró el área total, área total de las partículas y número total de partículas. Las determinaciones se realizaron en tres rebanadas de diferentes panes de cada composición.

IV-2-3-Análisis estadístico

Los resultados se informan sobre la base de sus promedios y desvíos estándar (α: 0,05).

Las diferencias significativas entre tratamientos fueron determinadas a través de un ANOVA (α: 0,05) seguido por comparaciones múltiples realizadas con un test de diferencias significativas de Tukey. El ANOVA así como las regresiones no lineales y correlaciones fueron realizadas usando el programa Statgraphic (V. 3.0, 1994, Rockville, Md, USA).

IV-3-Resultados y Discusión

IV-3-1-Características reológicas de la masa

Se estudió el efecto de los productos enriquecidos en fibra (AIR, C y S) obtenidos a partir de la calabacita (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) sobre el comportamiento visco-elástico de una masa desarrollada con 5 g de cada fibra aislada por kg de harina de trigo.

La harina de trigo es el ingrediente mayoritario del pan y está constituída, principalmente, por almidón (≈70-75% p/p), agua (≈ 14% p/p) y proteínas (≈ 10-12% p/p). Además, los polisacáridos no almidonosos (≈ 2-3% p/p), particularmente arabinoxilanos (pentosanos) y lípidos (≈ 2% p/p) son importantes constituyentes minoritarios de la harina relevantes, para la producción y calidad del pan (Goesaert y col., 2005).

Las características reológicas de las masas preparadas con la harina de trigo control y con las mezclas de harina con AIR, C o S fueron determinadas mediante un farinógrafo Brabender, un alveógrafo y un zimotaquígrafo.

VI-3-1-1-Farinógrafo Brabender

Este ensayo evalúa las propiedades reológicas de la masa durante su formación, a una consistencia constante de 500 FU.

El farinógrafo es un instrumento de medición físico y dinámico de la masa que realiza la medición del torque. La resistencia ofrecida por la masa durante el amasado prolongado y suave a una temperatura constante, se transmite a un dinamómetro, a un sistema de palanca, a un sistema de escala y a un mecanismo de registro gráfico (quimógrafo), (Zaidul et al., 2004). Una unidad farinográfica (FU) corresponde a un torque de 10^{-3} kgf.m (ISO 5530-1, 1991).

Las curvas y los valores de los parámetros obtenidos para el control y para la harina de trigo adicionada con AIR, C o S se muestran en la Figura 1 y la Tabla 1, respectivamente.

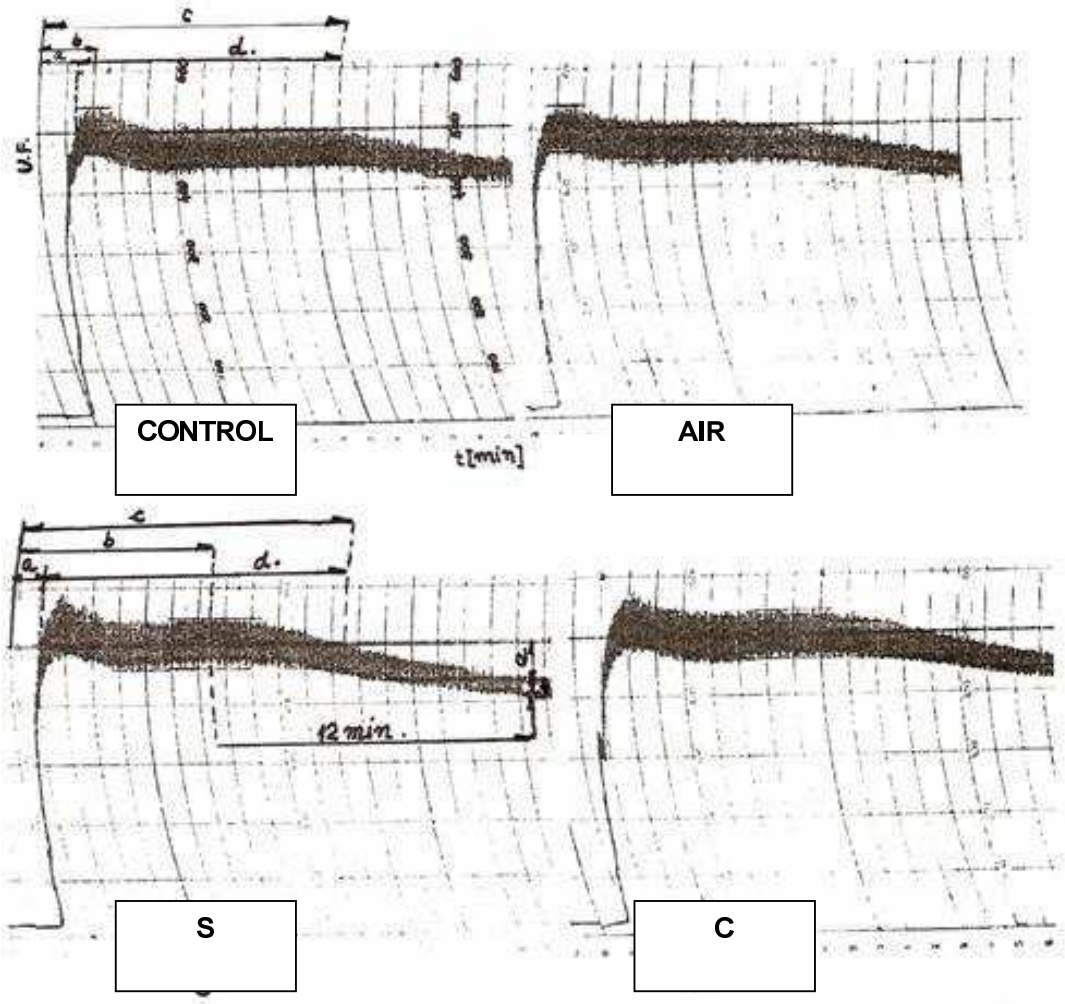


Figura 1: Comportamiento reológico de las masas de harina de trigo ensayadas a través del farinógrafo de Brabender: masa control, y masas con el agregado de 5 g/kg de AIR-, S- y C-. El eje de las Y corresponde a la consistencia de la masa medida en unidades Farinográficas (UF), mientras que el eje de las X indica tiempo en minutos (cada división mayor = 1min).

Parámetros:

a. Tiempo de Arribo (min)

b. Tiempo de desarrollo o "pico" (min)

c. Tiempo de partida (min)

d. Tiempo de estabilidad (min)

e. Índice de tolerancia al amasado (UF)

Tabla 1. Características de desarrollo de la masa determinadas a través del farinógrafo de Brabender.

	Control	5 g/kg C	5 g/kg AIR	5 g/kg S
Absorción de Agua[1,2] (ml/100g harina)	59,0 ± 0,3[a*]	59,0 ± 0,3[a]	60,4 ± 0,3[b]	58,3 ± 0,3[a*]
Tiempo de Arribo[1,2] (min)	1,4 ± 0,2[h]	1,5 ± 0,2[h]	1,5 ± 0,2[h]	1,1 ± 0,2[h]
Tiempo Pico[1,2] (min)	2,0 ± 0,3[c]*	8 ± 1[d]	2,5 ± 0,4[c]	7,5 ± 1[d]
Tiempo de partida[1,2] (min)	11 ± 2[e]	13 ± 2[e]	11 ± 2[e]	13 ± 2[e]
Tiempo de estabilidad[1,2] (min)	10 ± 2[f]	12 ± 2[f]	10 ± 2[f]	11 ± 2[f]
Indice de Tolerancia[1,2,3] a 12 min (FU)	60 ± 10[g]	80 ± 20[g]	60 ± 10[g]	80 ± 20[g]

[1]Letras iguales, dentro de la misma fila, muestran valores no significativamente diferentes entre sistemas de distintas fracciones de fibra agregada (p>0,05).
[2] Se presentan promedios y desvíos estándar (n=3).
*P<0,01
[2] MTI.

A continuación se reseñan los parámetros evaluados y los resultados obtenidos.

Absorción de Agua:

Es la cantidad de agua, expresada en ml/ 100 g de harina con un contenido de humedad del 14 g/ 100 g, necesaria para centrar la curva del farinograma en la línea de 500 FU (ISO 5530-1, 1991). La absorción de agua para alcanzar el desarrollo de la masa en el farinógrafo es el agua necesaria para conseguir un cierto grado de hidratación del gluten o un cierto grado de desarrollo de gluten bajo cizalla y este ensayo ayuda a evaluar las propiedades panificables de una harina a consistencia constante. Se sabe que los aditivos pueden afectar el desarrollo del gluten que una harina de trigo puede alcanzar bajo esfuerzo de corte.

El agua absorbida por la harina de trigo y por la harina suplementada con fibra fue similar para todos los tratamientos, a excepción de aquella suplementada con AIR, la que presentó una leve pero significativamente mayor cantidad de agua absorbida. El agua agregada en la amasadora del farinógrafo

fue, en parte, absorbida por los gránulos de almidón de la harina, pero el continuo incremento en la consistencia (medida como FU) que acompaña la energía de cizalla entregada durante el agregado del agua mientras se amasa, está indicando directamente que el agua está siendo usada para la hidratación del gluten, responsable éste del desarrollo de la masa.

La capacidad de absorción de agua (WBC) de los gránulos de almidón, que están presentes en una gran proporción en la harina, se ha postulado que tiene un gran efecto en la reología de las masas (Zaidul y col., 2004). Berton y col. (2002) determinaron las capacidades de hidratación de diferentes harinas de trigo usando tres métodos diferentes basados en la centrifugación y en la succión capilar y concluyeron que el contenido de almidón dañado era el factor principal de la variación de la capacidad de absorción de una harina, seguido por los contenidos de proteína y de pentosanos. Bombara y col. (1997) determinaron una WBC de 1,04 ml de agua/g de harina seca para una harina de trigo del mismo origen que la utilizada en nuestro trabajo, usando el método capilar de Baumann. En el capítulo antertior determinamos, a través del mismo método, una WBC de 25,5 ml de agua/g de muestra seca y una absorción casi instantánea de agua (0,1 min, 6s) para el AIR. La fracción S absorbió agua también rápidamente (0,31min, 19 s) pero mostró el mismo valor bajo de WBC que la fracción C (13,7 ml y 12,5 ml de agua/g de muestra seca, respectivamente). La fracción C mostró la absorción de agua más lenta mediante el método capilar (13 min, 780 s). Las altas WBCs que caracterizaron las fracciones de fibra de la calabacita están ligadas a muy altas capacidades de hinchamiento mostradas durante la absorción del agua (41,8; 22 y 25 ml/g para AIR, C y P, respectivamente).

De los resultados obtenidos se puede concluir que la incorporación de las distintas fracciones de fibra de calabacita al 0,5%, sólo AIR afectó el agua requerida para alcanzar las 500 FU ya que la absorción de agua de la harina o de la harina más la fibra fue muy similar en todos los casos mientras que en AIR fue levemente mayor (Tabla 1). Esta tendencia se podría atribuir al hecho de que el agua absorbida por el gluten y el almidón no fue afectada por la presencia de fibra o al hecho de que la fibra contribuye a la consistencia de la masa de 500 FU debido a su efecto viscosante, compensando el menor desarrollo del gluten por una menor disponibilidad de agua ocasionada por la absorción de agua por

parte de la fibra. Wang y col. (2004) determinaron que no logra formarse la masa con contenidos de agua por debajo de 35g por cada 100g de masa (o 56 g / 100 g de harina) y que las masas son excesivamente fluidas y difíciles de manipular cuando los contenidos de agua están por encima de 46 g/100 g de masa (u 80 g/100 g de harina). Román-Gutiérrez y col. (2003) establecieron que la humectabilidad de la harina de trigo es el resultado de las contribuciones relativas de sus componentes (gluten, almidón, pentosanos solubles e insolubles). Ellos determinaron que la absorción de agua fue la más rápida para el almidón de trigo sin dañar y más baja para la harina de trigo midiendo el ángulo de contacto de una gota de agua depositada sobre cada polvo compactado ensayado. Sin embargo, ellos encontraron las velocidades mas lentas de absorción de agua como así también una pobre humectabilidad superficial (por el mayor ángulo de contacto inicial mostrado) para el gluten, lo cual es coherente con la presencia de regiones hidrofóbicas en sus macromoléculas. Al mismo tiempo, los pentosanos insolubles y solubles mostraron resultados similares al gluten respecto a las velocidades de absorción de agua pero sus ángulos de contacto iniciales correspondían a aquellos observados para los polímeros totalmente hidrofílicos como el almidón. Stauffer (1994) reportó a partir de trabajos de investigación del período 1968-1985 que los pentosanos de la harina cuentan por casi un cuarto del requerimiento de absorción de agua de una masa de harina de trigo. Esta hidrofilicidad significaría que los pentosanos, el contenido natural de fibra de la harina de trigo, contribuyen marcadamente a la consistencia (viscosidad) de las masas, por ejemplo, como se mide en el farinógrafo. De acuerdo a los resultados previamente citados, se puede pensar que el agua agregada a la harina en el ensayo farinográfico fue distintamente absorbida por cada componente de las mezclas de polvos aquí ensayadas: la harina de trigo y las fracciones de fibra obtenidas de la calabacita.

Otros parámetros

Además de la absorción de agua, la forma de la curva del farinograma es una característica de la harina y diferentes parámetros se pueden tomar de las curvas registradas. De acuerdo con Sivaramakrishnan y col. (2004), el ancho de la curva del farinograma es una medida de la cohesividad y elasticidad de la masa. Al pico de consistencia, las mezclas de harina de trigo con S y C mostraron las curvas más anchas que también permanecieron más o menos

constantes hasta que abandonaban la línea de 500 FU. Collar y col. (1999) informaron que una masa más cohesiva dió como resultado panes de mayores volúmenes específicos y más blandos.

-*Tiempo de arribo*: (Fig. 1A y 1C) es el tiempo requerido por la parte superior de la curva para alcanzar la línea de 500FU después de que se ha iniciado el mezclado e incorporado el agua. Este valor es una medida de la velocidad a la cual el agua es absorbida por la masa. Generalmente se encontró para una dada variedad de trigo que, a medida que incrementa el contenido de proteína, el tiempo de arribo también aumenta (Zaidul y col., 2004). Los tiempos de arribo para la harina de trigo después de la adición de AIR, C o S tomaron valores de 1,5; 1,5 y 1,1 min, respectivamente (Tabla 1). Estos valores son muy similares al tiempo de arribo mostrado por el control, (1,4 min).

-*Tiempo de desarrollo de la masa*: es el tiempo (con una aproximación de 0,5 min) medido desde la primera adición de agua hasta el desarrollo de la máxima consistencia de la masa y mínima movilidad de ella, inmediatamente antes de los primeros indicios de aflojamiento. A este valor también se lo denomina "pico" o "tiempo pico". Ocasionalmente se pueden observar dos picos; en dichos casos, el segundo pico debe tomarse como tiempo de desarrollo de la masa (Zaidul y col., 2004). El tiempo pico o tiempo de desarrollo de la masa da una idea del tiempo de amasado óptimo en la panadería. En el caso de las masas con S o C se pueden observar dos picos (Figura 1). El tiempo pico aumenta ≈4 veces con el agregado de las fracciones C o S en la harina de trigo.

-*Tiempo de partida*: es el tiempo (con una aproximación de 0,5 min) medido desde la primera adición de agua hasta que la parte superior de la curva abandona la línea de las 500 FU. A mayor duración, mayor fuerza de harina (Zaidul y col., 2004). Se observaron tiempos de partida similares para todas las masas.

-*Tiempo de estabilidad de la masa*: se define como el intervalo entre el tiempo de arribo y el tiempo de partida (ISO 5530-1, 1991). Este valor, en general, da indicación de la "tolerancia" de la masa al sobreamasado. Es obvio que harinas con alto contenido de gluten dan los valores de estabilidad más altos. El agregado de 0,5% de fracciones de fibra de calabacita no presentó alteración

sobre este parámetro (Tabla 1). Normalmente, una harina con buenas características panificables tiene absorción de agua mayor, lleva más tiempo de amasado y es más tolerante a un sobre-amasado que una harina de pobre calidad panadera (Zaidul y col., 2004).

-*El índice de tolerancia al amasado (MTI)* es definido como la diferencia en FUs desde el centro de la curva en el pico al centro de la curva 12 minutos después de que fue alcanzado el pico (ISO 5530-1, 1991). El agregado de 0,5% de fracciones de fibra de calabacita no afectó este parámetro (Tabla 1).

Teniendo en cuenta sus picos, se puede concluir que las fracciones C y S produjeron mezclas harina-aditivo más fuertes, esto es que requieren mayor tiempo de amasado, pero esto no afectó ni a la estabilidad ni a la tolerancia de las masas.

Se determinó en el capítulo anterior que la capacidad de absorción de agua (Q o WBC) y la capacidad de retención de agua (WRC) eran las mismas para C y para S mientras que estas capacidades fueron mayores para AIR (Tabla 2). Los resultados del farinograma obtenidos, como ya se comentó, mostraron que el AIR no interfirió en el desarrollo normal del gluten de la harina de trigo respecto a la consistencia de la masa. Se puede observar en la Tabla 1 y Figura 1 que la mezcla AIR-harina de trigo mostró casi el mismo perfil farinográfico que el control porque la fibra de AIR no es limitante en la distribución de agua entre los componentes de la mezcla debido a la alta hidrofilicidad de los componentes de sus cadenas de pectinas ramificadas, que determinaron una gran capacidad de hinchamiento y velocidad de absorción de agua. Sin embargo, las fracciones de fibra caracterizadas por su menor absorción de agua como así también menores capacidades de retención y/o velocidades de absorción (fracciones C y S) con respecto a aquellas de la fracción de AIR, dieron origen a mayores tiempos de desarrollo de masas. Las fracciones C y S pueden retardar la compleja hidratación del gluten promoviendo los tiempos picos más largos observados (Fig. 1C y 1 D).

Al comienzo del amasado en el farinógrafo, más y más agua se utiliza en la hidratación de la harina y la resistencia a la extensión incrementa gradualmente. Esta respuesta inicial registrada, indica que el amasado induce la

construcción de una estructura conectada tridimensional de subunidades de glutenina unidas por los extremos mediante puentes disulfuro. En esta etapa, ocurren escisiones aleatorias dentro de las cadenas debido a la energía elástica acumulada durante el amasado, prevaleciendo la formación de puentes disulfuro entre cadenas a expensas de las uniones disulfuro dentro de la cadena (Morel y col., 2002). La presencia de las fracciones C o S pareciera retrasar esta respuesta de formación de la estructura tridimensional (red de gluten). Luego de la demora, que aumentará con la densidad de las conexiones entre cadenas, las unidades monoméricas o pequeños fragmentos poliméricos se liberarán a la solución o al medio de la matriz desde la red de gluten desarrollada. Este hecho reduce la resistencia a la extensión de la masa, resultando en la formación de un pico en la curva de amasado, cuya aparición se vio demorada por la adición de las fracciones de C o S a la harina de trigo, debido al retardo aparente de las escisiones mediadas por el esfuerzo de corte de las uniones disulfuro entre cadenas (Bombara y col., 1997). Consecuentemente, los productos C y S probablemente estabilizan la construcción inicial de la red de gluten, al retardar las escisiones o continua ruptura de uniones disulfuro entre cadenas, hecho que ocurre vía reacciones de radicales libres promovidas por la energía mecánica aplicada (Morel y col., 2002). Este efecto de la fibra se debe atribuir a: 1) a la conformación macromolecular de los componentes polisacáridos constitutivos de C y S en relación al medio acuoso, que determina valores intermedios de los parámetros cinéticos del hinchamiento y/o 2) a una mejor disipación viscosa de la energía mecánica a través de la matriz amorfa en la cual la red de gluten está embebida en la presencia de los polisacáridos de C o S, evitando las escisiones tempranas por radicales libres de las uniones disulfuro entre las cadenas. Más aún, la fracción C contiene lignina, 6 g / 100 g, que podría ser responsable del atrapamiento de los radicales libres (Boeriu et col., 2004), contribuyendo a los resultados reportados previamente sobre el efecto de C (Tabla 2).

Tabla 2. Composición química y propiedades de hidratación de los productos extraídos de la calabacita.[1]

	AIR (g/100g) [a]	C (g/100g) [a]	S (g/100g) [a]
Agua	13,0 ± 0,1	8,74 ± 0,03	8,32 ± 0,03
Cenizas	4,6 ± 0,2	4,5 ± 0,1	2,1 ± 0,4
Proteina	9,1 ± 0,3	19,3 ± 0,9	6,2 ± 0,2
Contenido Total de Fibra	78,4 ± 0,8	79,6 ± 0,8	44,6 ± 0,5
• Lignina[b]	0,2 ± 0,1	6,0 ± 0,3	nd
• Celulosa[b]	46 ± 1	45 ± 4	nd
• Carbohidratos Totales (no-celulosicos) [b]	62 ± 3	47 ± 2	nd
• Ácidos urónicos[b]	10 ± 2	11,8 ± 0,2	nd
Propiedades de Hidratación			
• Q[c]	25,5 ± 0,2	12,5 ± 0,3	13,7 ± 0,1
• B[d]	0,1 ± 0,01	13 ± 1	0,31 ± 0,02
• WRC [e]	58 ± 6	18,8 ± 0,9	21,2 ± 0,7

[1]Los resultados se reportan como valores medios y desvíos estándard (n = 3). Información proveniente del Capítulo III
[a]en base seca.
[b] Componentes de la fibra total.
[c] Capacidad de absorción de agua calculada por el ensayo de Bauman (WBC) [ml de agua/g de muestra seca]
[d] Tiempo [min] para absorber Q/2 ml de agua.
[e] Capacidad de retención de agua [g de agua/ g de muestra seca]
nd: no determinado.

IV-3-1-2-Alveógrafo

En este ensayo se simula la deformación de la masa por la producción de gas durante la fermentación mediante el inflado hasta ruptura de un trozo de masa laminada. La muestra de masa se somete a una extensión biaxial, radial y tangencial a la superficie de la burbuja inflada. Este ensayo trabaja a un nivel de hidratación constante de la harina, permitiendo comparar la calidad del gluten (British Cereal Exports), independientemente de la consistencia alcanzada.

El alveógrafo mide la resistencia de la masa a la extensión y se registraron los siguientes parámetros alveográficos:

-*Máxima sobrepresión (P)*: que representa la tenacidad o resistencia de la masa a la extensión y da información acerca de la resistencia de la masa durante la deformación.

-*Extensibilidad de la masa (L)*: que es proporcional al tamaño de la burbuja en el momento de la ruptura y corresponde al tiempo que le insume a la burbuja el reventar. Es un indicador de la extensibilidad (deformación) de la masa durante la manipulación o formación de las burbujas de aire. Es una medida de la habilidad de la masa para levar.

-*Trabajo de deformación (W)*: que es la energía necesaria para deformar la burbuja de masa hasta la ruptura y es un indicador de la performance general de la harina para la panificación.

La relación *P/L* provee un índice global de la característica viscoelástica de la masa. Los parámetros tales como *W* y *P/L* son indicadores de la calidad de la harina, permitiendo la verificación de la acción de los aditivos sobre el comportamiento de la misma.

Los resultados obtenidos en este trabajo se muestran en la Tabla 3. Se puede observar que la tenacidad de la masa (*P)* tiende a aumentar luego del agregado de fibra, pero lo hace sólo significativamente con AIR. Contrariamente, la extensibilidad (*L*) de la masa decreció con la fibra, principalmente con AIR. Consecuentemente, las relaciones *P/L* fueron mayores para las masas que contenían fibras, mostrando las masas con el agregado de AIR el valor más alto de *P/L* (2,02), siendo esta la masa más tenaz. Estos resultados están indicando una respuesta elástica mayor con una menor deformación plástica. Wang y col. (2003) reportaron que el agregado de sólidos no extraíbles en agua (que principalmente contienen arabinoxilanos) a la harina de trigo llevan a un menor desarrollo del gluten y formación de gluten-almidón, lo que se manifiesta por un valor más alto de la resistencia máxima a la deformación y una menor extensibilidad. Gómez y col. (2003) también observaron un incremento en los valores de *P/*L cuando 20 g o 50g de fibra eran

agregados a un kg de harina. Rosell y col. (2001) determinaron que *P* aumentaba cuando se agregaban hidrocoloides purificados (alginato de sodio, κ-carragenato, goma xántica e hidroxipropilmetilcelulosa) a una receta básica de masa; ellos establecieron que este efecto podría deberse a las interacciones entre los hidrocoloides y las proteínas de la harina de trigo.

No se pudieron observar (Tabla 3) diferencias significativas en el trabajo de deformación (*W*) luego de la incorporación de 5 g de fibra por kg de harina. Además todos los valores obtenidos estuvieron por encima de 200, mostrando que los productos de fibra no afectaron la matriz-red de gluten-almidón, de la harina de trigo. Es importante remarcar que la bibliografía (British Cereal Exports) informa que harinas de trigo típicas potencialmente panificables tienen valores de W mayores a 200. Teniendo en cuenta los valores de *P/L* informados en la Tabla 3, se puede concluir que la adición de AIR, C, o S a la harina de trigo produjo masas cuyas redes de gluten fueron tenaces (menor desarrollo del gluten) pero mantienen un valor de *W* mayor a 200.

Tabla 3. Parámetros reológicos obtenidos durante el ensayo alveográfico de Chopin.

	Control	5 g/kg C	5 g/kg AIR	5 g/kg S
Tenacidad (P) [1] (mm water)	98 ± 8^{a}	$106 \pm 8^{a, b}$	113 ± 9^{b}	$106 \pm 8^{a, b}$
Extensibilidad (L) [1] (mm)	71 ± 6^{c}	61 ± 5^{d}	$56 \pm 4^{d*}$	$59 \pm 5^{d*}$
P/L	$1,4 \pm 0,1^{e}$	$1,7 \pm 0,1^{f*}$	$2,0 \pm 0,2^{g**}$	$1,8 \pm 0,1^{f, g**}$
Trabajo de Deformación[1] (W).10^4 (J)	250 ± 20^{h}	240 ± 20^{h}	240 ± 20^{h}	240 ± 20^{h}

[1]Letras iguales, en la misma fila, muestran valores no significativamente diferentes entre sistemas de distintas fracciones de fibra agregada (p>0,05).
*P<0,01
**P<0,001

La pérdida de deformabilidad (incremento en el valor P/L) observada a través del alveógrafo, para la harina con el agregado C o S, es coherente con los resultados obtenidos en el farinógrafo. Previamente hemos reportado que las fracciones C y S interfirieron con la hidratación del gluten y, consecuentemente,

afectaron el desarrollo del gluten de la harina de trigo, durante el amasado en el farinógrafo. Si bien, el estudio farinográfico no mostró una interferencia del AIR con el desarrollo del gluten cuando se amasó hasta una consistencia de 500 FU, la alteración de la red de gluten debido al AIR fue detectada en el alveógrafo cuando la masa (y la red de gluten) alcanzaron menor desarrollo debido a la cantidad de agua más limitada que se agrega en este ensayo. Se debe remarcar que, en el ensayo alveográfico, se agregaron 53 g de solución acuosa de NaCl (0,349 mol/kg) por cada 100 g de harina-AIR, mientras que 60,4 g de agua pura se necesitaron para 100 g de harina-AIR en el ensayo farinográfico. Por lo tanto, la harina de trigo (control) y las mezclas de fibra-harina, en realidad se hidrataron con 51,9% de agua para alcanzar el desarrollo de la masa durante el ensayo alveográfico. La presencia de NaCl en el medio acuoso de la red de gluten desarrollada podría parcialmente abrir la red de gluten y, por lo tanto, permitir que más agua fuese absorbida (Laaksonen y Roos, 2003). En otras palabras, el desarrollo del gluten demanda más agua en presencia de NaCl.

Asimismo y como ya se mencionó, la cantidad "efectiva" de agua presente para alcanzar el desarrollo del gluten durante el ensayo alveográfico fue realmente menor que la que habría de esperarse si se hubiera usado agua pura (53 g /100 g) para hacer la masa. Este hecho lleva a un menor efecto plastificante del agua respecto al que involucraba el farinógrafo y, por lo tanto, a un mayor grado de uniones entre cadenas (uniones de puente disulfuro) dentro de la parcialmente desarrollada red de gluten, donde las escisiones no son predominantes o, directamente, no han procedido. En esta etapa de hidratación probablemente se evidencia la competencia entre los dos componentes considerados, el gluten y el AIR altamente hidrofílico, para disponer del agua, la cual se encuentra en cantidad limitada. Jones y Erlander (1967) explicaron el efecto de los hidrocoloides en la masa como una competencia por el agua entre diferentes componentes.

La relación más alta de *P/L* (mayor resistencia, menor extensibilidad) se obtuvo para las masas con AIR parcialmente desarrolladas como consecuencia del menor efecto plastificante del agua que existió en las condiciones de este ensayo alveográfico. Este efecto también explica la respuesta observada con el agregado de S o C. El comportamiento diferente mostrado por las masas con AIR en el alveógrafo se debe esencialmente a un incremento en la viscosidad de

la fase amorfa o continua donde la red de gluten esta embebida, un efecto viscosante. Las cadenas "ramificadas" hidrofílicas de los polisacáridos del AIR serían las responsables del incremento en la viscosidad con la menor disponibilidad de agua correspondiente a la solución acuosa de NaCl. De hecho, un incremento en la viscosidad de la fase continua puede ser visto, al menos en parte, como una respuesta visco-elástica mayor cuando la masa es caracterizada en el alveógrafo.

IV-3-1-3-Zimotaquígrafo

Las características de la masa durante la fermentación también fueron evaluadas en el presente trabajo utilizando un zimotaquígrafo, que provee información acerca del desarrollo de la masa como así también de la producción de gas (CO_2) derivada de la actividad de la levadura dentro de la masa y la retención de gas. Se registraron los siguientes parámetros:

- A (cm^3) representa el volumen máximo de gas antes de que comiencen las pérdidas desde la superficie de la masa.
- X-1 representa el tiempo de fermentación requerido para alcanzar el volumen A.
- B (cm^3) es el volumen de gas retenido y representa la estabilidad de la masa a la fermentación.
- C (cm^3) es el volumen de gas perdido.
- S (cm^3) es el volumen total de gas producido por la levadura: S= A+B+C.
- Porcentaje de retención: (S-C)/S x 100.
- Porcentaje de pérdidas: C/S x 100.

Tabla 4. Características de la masa cruda durante la fermentación.

	Control	5 g/kg C	5 g/kg AIR	5 g/kg S
Retención de Gas (%)	65,8	65,1	62	64,9
Pérdida de Gas (%)	34	34,9	38	35

Las fracciones AIR, C y S son ricas en polisacáridos (Tabla 2). Como se puede ver en la Tabla 4, en general, no se observaron cambios significativos en la retención de gas ni en las pérdidas, con el agregado de 5 g de C o S por kg de harina a través de este ensayo. Probablemente con este nivel de agregado, no se pudieron detectar efectos. De cualquier modo, una tendencia hacia una menor retención (62%) y mayor pérdida de gas (38%) se pudo observar para las masas conteniendo AIR. El balance entre la retención y la pérdida de gas en una red de gluten bien desarrollada está en relación con su particular comportamiento elástico que fue caracterizado, en este estudio, a través del ensayo alveográfico. Una tenacidad mayor (*P*) mostrada por las masas con AIR, que significa resistencia a la extensión, es coherente con una menor retención y mayor pérdida de gas. El reacomodamiento de componentes individuales de la fase líquida y de la interfase gas-líquido afectará la tensión superficial alrededor de las células de gas. Se conoce que ciertos ingredientes ejercen una influencia estabilizante y retardan la coalescencia, mientras que los componentes no-almidonosos del endospermo pueden iniciar huecos en la masa (Scanlon y Zghal, 2001). En realidad, la estabilización de las células de gas debe ser evaluada no solo en relación a la reología de la red de gluten, sino también a la distribución molecular de los componentes de la masa extraíbles en agua, en la interfase gas-líquido.

Goesaert y col. (2005) informaron que los arabinoxilanos extraíbles en agua (WE-AX) actúan como el gluten durante la fermentación ya que ellos reducen la velocidad de difusión del dióxido de carbono hacia fuera de la masa; de este modo, contribuyen a la retención del gas. Sin embargo, ellos carecen de propiedades elásticas. Cuando se adicionó arabinoxilanos no extraíbles en agua

(WU-AX), se observó que la retención de gas y la evolución de la masa eran similares a aquélla de la masa control.

IV-3-2-Efecto del agregado de la fibra de calabacita sobre el proceso de panificación y las características finales del pan

Se estudió el efecto de los productos enriquecidos en fibra (AIR, C y S) obtenidos de la calabacita (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) en la panificación de la harina de trigo, analizando la calidad del pan obtenido cuando se agregaron 5, 10 o 15 g de fibra por kg de harina de trigo y su efecto en el envejecimiento del pan durante el almacenamiento.

IV-3-2-1-Parámetros de calidad del pan

La absorción de agua por la formulación del pan, durante el amasado en una amasadora de panadería del tipo espiral, aumentó con la presencia de todas las fracciones de fibra (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros del proceso de panificación.

	Absorción de agua[A] (g/100 g harina)	Pérdida de agua luego del horneado(g/100 g harina)	Humedad del pan[B,C] (g/100 g materia seca)
Control	61,8	22,0	$86,2 \pm 0,6^{b}$
5 g/kg C	64,6	23,3	$88,63 \pm 0,03^{c}$
10 g/kg C	67,7	25,3	$92,9 \pm 0,5^{d}$
15 g/kg C	67,6	24,6	$91,2 \pm 0,3^{d}$
Control	60,0	19,1	$83,6 \pm 0,4^{e}$
5 g/kg AIR	68,75	20,7	$89,4 \pm 0,5^{f}$
10 g/kg AIR	68,75	21,3	$91 \pm 1^{f,g}$
15 g/kg AIR	71,4	20,1	$92,8 \pm 0,6^{g}$
Control	63,4	25,8	$84,9 \pm 0,4^{h}$
5 g/kg S	67,2	25,0	$85,9 \pm 0,5^{h}$
10 g/kg S	68,8	27,3	$91,2 \pm 0,4^{i}$
15 g/kg S	70,0	25,9	$89,5 \pm 0,5^{i}$

Las formulaciones de pan se desarrollaron en una amasadora de espiral.
[A]Absorción requerida para el desarrollo de las masas.
[B]Dentro de cada sistema (C, AIR o S), los resultados con las mismas letras indican diferencias no-significativas ($p>0.05$).
[C]Los resultados se expresan en base al promedio y al desvío estándar (n=3).

Se debe mencionar que todas las fibras de calabacita agregadas a la amasadora se hidrataron previamente con suficiente cantidad de agua; de este modo, el agua agregada para fabricar la masa en la panadería fue absorbida por la harina para alcanzar la consistencia deseada. Un error relativo de 0,025 fue determinado para la cantidad de agua agregada para lograr la consistencia deseada, a través de la evaluación de los resultados obtenidos para seis muestras testigos distribuidas entre las diferentes corridas de amasado.

Las pérdidas de agua después de la cocción en el horno y el enfriamiento a temperatura ambiente fue, en general, levemente mayor con el agregado de fibra (Tabla 5). El rendimiento del pan aumentó con la concentración de fibra (Fig.2A); la tendencia fue lineal con las fibras C o S y curva en presencia de AIR. En general, la presencia de AIR produjo mayores rendimientos de pan con respecto a los panes con C- o S-. Esta tendencia se podría explicar mediante la mayor absorción de agua mostrada por esta fracción lo cual permitía obtener panes con la mejor relación absorción de agua/pérdida de agua después del horneado, hecho que llevó al contenido de humedad más alto (Tabla 5).

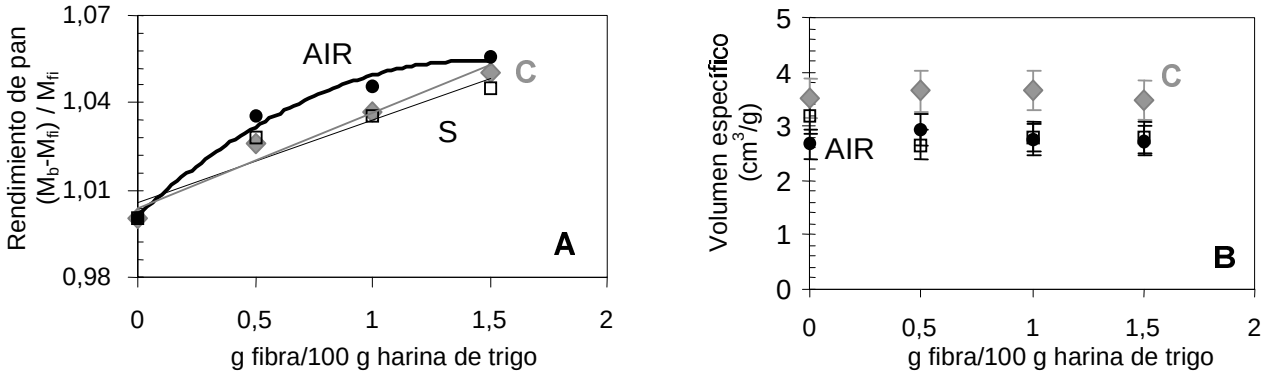


Figura 2: Rendimiento de pan (A), volumen específico medido (B), como así también firmeza del pan (C) determinada 24 horas luego del horneado (F_{24}) en función de la concentración de fibra. ♦-C; ●-AIR; □-S.

M_b: peso del pan; Mfi: peso de la fibra; M_{fi}: peso de la harina

Los volúmenes específicos de los panes no fueron significativamente diferentes ($p>0,05$) del control con ninguna de las concentraciones de AIR, C o

S ensayadas (Fig.2B). Esto significa que el agregado de las fracciones de fibra de calabacita a las fórmulas de pan a concentraciones que van desde 5 a 15 g/kg de harina no produjo una disminución indeseable en el volumen de las piezas. Rosell y col. (2001) informaron que el volumen específico mejoró con la presencia de hidrocoloides (κ-carragenato, goma xántica e hidroxipropilmetilcelulosa, HPMC) a una concentración de 5 g/kg de harina. Se encontró que los mayores volúmenes específicos fueron promovidos por el κ-carragenato seguido por la HPMC, que como se mostró en el análisis de la fermentación realizado en un reofermentómetro, mejoraron el desarrollo de la masa y la retención del gas. Pomeranz y col. (1977) quienes usaron celulosa, salvado de trigo y cáscara de avena, informaron que ninguno de los componentes de estas fibras disminuyeron la formación de gas en la masa; consecuentemente, los efectos de reducción del volumen de las masas con fibras agregadas parecían ser el resultado de la reducción en la retención más que de la reducción en la formación del gas. Gómez y col. (2003), quienes usaron siete tipos diferentes de fibras en concentraciones entre 2 y 5%, informaron que el volumen específico se redujo como consecuencia del agregado de las fibras. Este efecto se atribuyó a la interacción entre la fibra y el gluten, que llevó a una reducción en la capacidad de retención del gas. Ptitchkina y col. (1998) observaron un valor máximo de volumen específico con el agregado de 8 g de polvo de zapallo por kg de harina, en la producción de pan. Ellos sugirieron que el polvo de zapallo actúa mejorando la estabilidad de las células de gas más que aumentando la fuerza de la matriz que las rodea, efecto que proviene de la actividad superficial de las pectinas del zapallo. Goesaert y col. (2005) informaron que durante la fase inicial del horneado, los arabinoxilanos naturales de la harina de trigo (AX) afectaban el proceso de panificación por el mismo mecanismo que se había observado durante la fermentación. La estabilización de las células de gas por los arabinoxilanos extraíbles en agua (WE-AX) prolongaban la elevación en el horno y mejoraban las características del pan (firmeza de la miga, textura, estructura, volumen de pieza), mientras que los arabinoxilanos no-extraíble en agua (WU-AX) aumentaban la coalescencia de las células de gas y reducían la retención de gas, resultando un pan de calidad más pobre.

Durante nuestro ensayo con el zimotaquígrafo, también se observó que la masa suplementada con 5 g de AIR por kg de harina mostró una leve tendencia a

la reducción en la retención de gas cuando se comparó con la masa suplementada con 5 g/kg de C. Esto coincidió con la menor extensibilidad mostrada por la masa con AIR en el alveógrafo con respecto a la de C-. Ambos efectos fueron atribuidos a las diferentes composiciones de las fracciones de fibras, que podrían también llevar a diferentes mecanismos de absorción de agua. AIR posee mayor cantidad de pectinas ramificadas e hidrofílicas que C (Tabla 2 y 3, Capítulo III). Por otro lado, C contiene pectinas más lineales, además de mayor contenido proteico y presencia de lignina.

La firmeza de las rebanadas de pan (*F*) se determinó siguiendo la recomendación del método 74-09 de la AACC (Ponte y Ovadia, 1996). Las curvas de fuerza-deformación obtenidas por la compresión de las fetas de pan se caracterizan por presentar dos fases: una primera fase donde la fuerza aumenta rápidamente con la deformación y una segunda fase donde la pendiente es menor. Como ejemplo de lo dicho, las curvas obtenidas con pan preparado con harina suplementada con 10 g de C por kg de harina luego de 24 hs de horneado (panel A) y a los 7 días de almacenamiento (panel B), se pueden observar en la Figura 3. Puede verse un punto de inflexión en la zona donde la pendiente de la curva de compresión cambia. La firmeza se midió extrapolando la pendiente constante de la primera fase de la compresión hasta el eje de las X y desde este punto inicial (X=0), a los fines del cálculo se determinó la fuerza desarrollada a una deformación del 25% (6,25 mm) como está ejemplificado en la Figura 3 B. Típicamente, una compresión del 25% de muestras de miga de 25 mm de espesor producirá un valor de fuerza de compresión posterior al punto de inflexión de la curva (Ponte y Ovadia, 1996). De este modo el parámetro de firmeza (*F*) está evaluando la resistencia de la miga más allá de la primera fase de compresión apenas deformada, que le sigue a la primera fase de compresión.

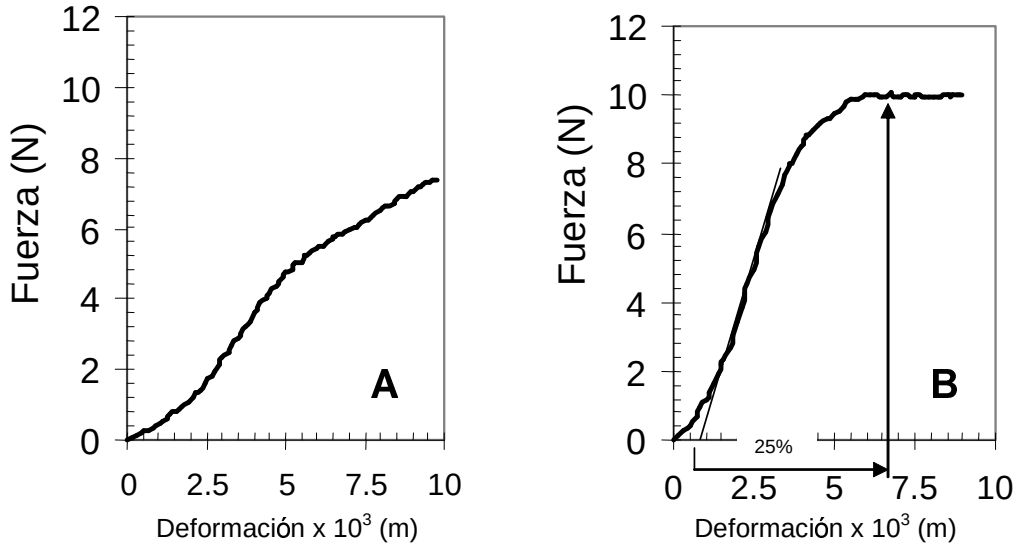


Figura 3: Curvas de Fuerza –deformación registradas al comprimir las rebanadas de pan con 24 hs de horneado (A) y con 7 días de almacenamiento (B) pan conteniendo 10 g de C por kg de harina.

La firmeza calculada de las curvas fuerza-deformación registradas por la compresión de las rebanadas de los panes cortadas a las 24 horas después del horneado (F_{24}) se graficaron en función de la concentración de fibra en la receta (Figura 4).

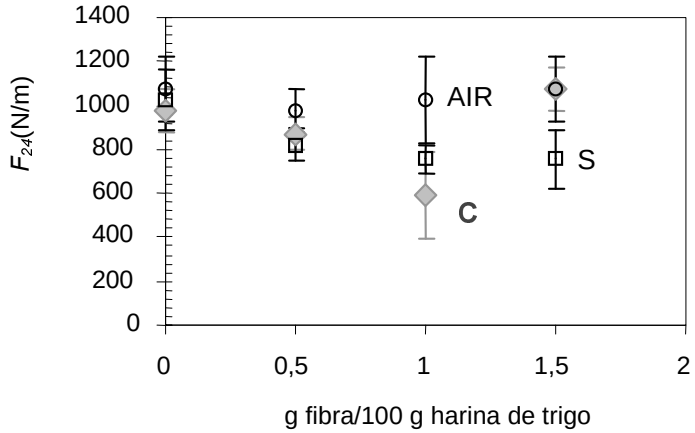


Figura 4: Firmeza de pan 24 horas luego del horneado (F_{24}) en función de la concentración de fibra ◊-C; ○-AIR; □-S.

Se determinó que el AIR no modificó la firmeza control en ninguna de las concentraciones, mientras que la presencia de S dio origen a panes con F_{24} menores que el control, a concentraciones de 10 y 15 g/kg. La adición de C a un nivel de 10 g/kg produjo piezas de panes que mostraron la firmeza más baja F_{24} de todas las fórmulas de panes ensayadas en este trabajo. De acuerdo a la bibliografía, el ablandamiento del pan está relacionado a un incremento en el volumen específico de las piezas (Cornford y col., 1964) y/o a una mayor cohesividad de la masa (Collar y col., 1999). En nuestro estudio, no se observaron diferencias significativas entre los volúmenes específicos de las piezas cuando se incluyó fibra en las formulaciones (Fig 2B). De todos modos, se notó un incremento en la cohesividad de las masas cuando la harina fue suplementada con S o C, mediante el ensayo farinográfico. Gómez y col. (2003) encontraron que los panes frescos suplementados con 20 g/kg de fibras tenían una textura de miga significativamente más firme que la del pan control y sugirieron que el espesor de las paredes que rodean las burbujas de aire en la miga eran responsables de estos resultados. Una diferencia notable se observó entre el efecto de dos tipos de fibra de trigo utilizadas como suplementos dietarios; solamente los panes con 20 g/kg de fibra de trigo-L mostraron una leve reducción en la dureza. Rosell y col. (2001) encontraron que la firmeza de la miga se redujo con el κ-carragenato y con la HPMC. Inversamente, la goma xántica provocó un gran aumento de la firmeza de la miga probablemente debido al aumento del espesor de las paredes de los alveolos que rodean los espacios de aire.

Jeltema y Zabic (1979) estudiaron la relación entre los componentes de la fibra y la calidad del bizcochuelo y encontraron que los componentes de pectina correlacionaban con mayores células y paredes de células de mayor espesor; mientras que el cuadrado de la concentración de componentes celulósicos correlacionaba sólo con células más grandes. También informaron que la lignina mostró una correlación positiva con el incremento de la terneza, efecto que también fue mostrado por las hemicelulosas insolubles en agua. Sin embargo ellos cuestionaron este efecto ablandador de la lignina en el pan, ya que la lignina generalmente se asocia a la dureza en las paredes celulares de los vegetales. Es destacado en cuanto a la composición química de las fracciones de fibra de calabacita (Tabla 2), que la fracción C presentó un contenido

significativo de lignina (6 g/100g de la fibra total) en adición a las pectinas (contenidos de ácido urónico y polisacáridos no-celulósicos).

El pan es un compuesto sólido; éste comprende en un nivel macroscópico, una miga con células llenas de aire en una matriz que es sólida, comportándose como un sólido visco-elástico. Se sabe que el comportamiento mecánico de la miga alveolada del pan es complejo. Este comportamiento se ha descripto como visco-elástico no-lineal (Scanlon y Zghal, 2001). Pyler (1998) destacó que la manera en que se siente la miga al tacto o en la boca está fuertemente influenciada por el grano o estructura de las células; más finas, paredes-delgadas, tamaños de células uniformes dan panes más blandos (suaves) y de textura más elástica que aquellos con miga más gruesa, abierta y de estructuras de paredes de mayor espesor. Scanlon y Zghal (2001) mostraron que ambos: módulo de Young y fuerza de compresión se reducían sustancialmente con el incremento de número de paredes de células pérdidas. Los resultados obtenidos a través del análisis de la imagen (Figura 5) muestran que los panes con 10 g/kg de la fracción C mostraron 55% más aire ocluido (área de las celdas x 100 / área total) que el pan control. Al mismo tiempo, mostraron igual cantidad de partículas (alveolos o celdas de gas) por cm^2 que el control y un tamaño promedio de 4,0 mm^2/partícula, mientras que en el pan control el tamaño promedio de las células fue de 2,0 mm^2/partícula (Tabla 6). De este modo, la distribución de las células de aire podría ser responsable de la menor F_{24} en los panes con 10 g/kg de C.

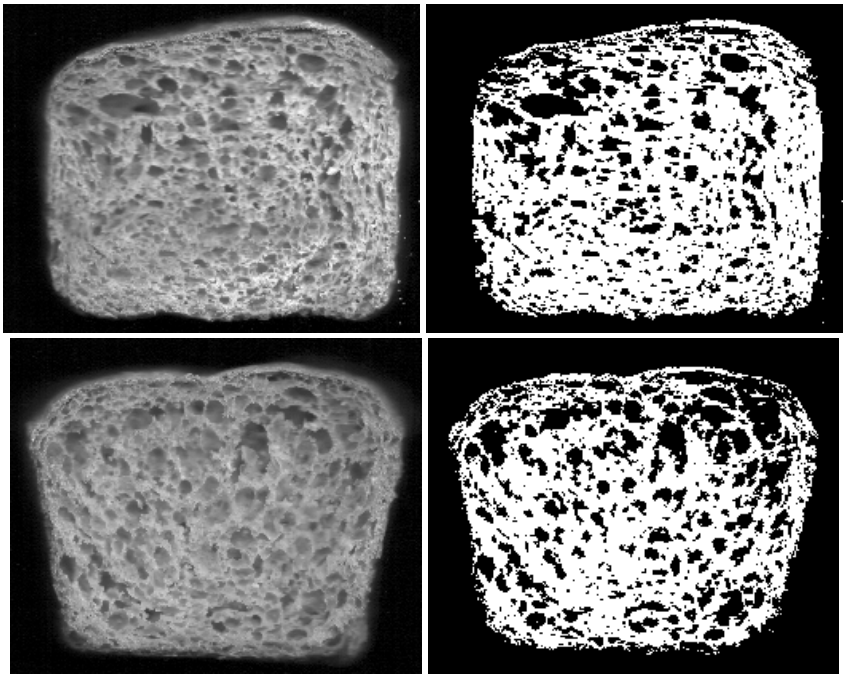


Figura 5: Imágenes de la miga. A1: scaneo del pan control; A2: pan control imagen binaria; B1: scaneo de pan con 10 g/kg de C-; B2: Pan con 10 g/kg de C- imagen binaria.

Table 6. Características de la miga de pan control y de pan con 10 g/kg de C- determinado por análisis de imagen.

	Aire ocluido[a] (%)	Número de partículas/cm^{2a}	Area promedio de partícula[a] (mm^2)
Pan Control	20 ± 4	9,6 ± 0.2	2,0 ± 0.4
Pan con 10 g/kg-C	31 ± 6	9 ± 1	4 ± 1

[a] Los resultados se expresan en base al promedio y la desviación estándard (n=3).

Se sabe que la lignina reemplaza al agua dentro de las matrices de las paredes celulares de los vegetales transformando el gel hidratado e hidrofílico de la matriz de la pared celular en un ambiente hidrofóbico (Brett y Waldron, 1996). Estos acontecimientos aumentan la fuerza de las uniones de puente hidrógeno entre los polisacáridos, incrementando la fuerza de la red de celulosa-hemicelulosa. En otras palabras, la presencia de lignina promueve las interacciones polímero-polímero entre los polisacáridos de las paredes celulares debido a la pérdida del efecto plastificante del agua dentro del gel matriz de la

pared celular. Durante la panificación, la lignina pudo desarrollar diferentes acciones: pudo evitar la distribución de agua entre la fase amorfa y la red de gluten produciendo más interacciones hidrofóbicas y/o pudo evitar la acción de los radicales libres (Boeriu y col., 2004).Todo esto podría también llevar a una mayor estabilización de las paredes de las células de gas producidas durante la fermentación dentro de la masa y a una mejor retención de gas durante el horneado, resultando en mayores tamaños de partículas. Sin embargo, este efecto de la lignina sobre la firmeza fue sólo detectada a una concentración específica de C de 10 g/kg en relación al peso de la harina de trigo. Por lo tanto, se debe requerir un balance exacto entre el grado natural de hidrofobicidad de las proteínas del gluten y la hidrofobicidad aportada por la fracción C, a través de su contenido de lignina, para alcanzar este bajo nivel de F_{24} observado.

También se puede proponer que una menor capacidad de hinchamiento luego de la hidratación y una absorción de agua más lenta mostrada a través del ensayo capilar de Baumann (Capítulo III) se relacionan con el efecto ablandador producido por la adición de C o S al pan. En particular, el contenido de fibra dietaria de la fracción S es la mitad (44% p/p) que el contenido de fibra del AIR (80%), siendo la composición química de los componentes de la fracción S la misma que la mostrada para el AIR. Esto es coherente con el hecho de que la WBC y la capacidad de hinchamiento para S fueron la mitad que las correspondientes capacidades para el AIR. Asimismo es de destacar que la velocidad de absorción de agua de la fracción S- fue tres veces más baja que la del AIR (Capítulo III). Probablemente, todas estas características, hicieron que la fracción S-presentara un comportamiento similar en la panificación al de la fracción C-.

Una de las propiedades organolépticas que más se modifica con el agregado de fibras es el color tanto de la miga como el de la corteza (Gómez y col., 2003; Pomeranz y col., 1977). El efecto del agregado de fibra de calabacita en el color del pan se resume en la Tabla 7. La luminosidad (L*), y las coordenadas cromáticas (a* y b*) evaluadas en la miga y la corteza no mostraron diferencias significativas entre los panes suplementados y los panes control. Este efecto se explica por las bajas concentraciones de fibras utilizadas y considerando que, en el caso del AIR y de C, el proceso llevado a cabo para

producir estas fracciones, dió origen a fibras de color blanco que, por ello, no han modificado el color del pan.

Table 7. Parámetros de color del pan.

	Miga[A]			Corteza[A]		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Control	66 ± 2	-0,9 ± 0,2	15 ± 1	56 ± 2	13 ± 1	33 ± 1
5 g/kg C	63 ± 3	-0,6 ± 0,4	16 ± 1	57 ± 3	13 ± 2	33 ± 1
10 g/kg C	63 ± 2	-0,8 ± 0,2	16 ± 1	61 ± 4	9 ± 2	30 ± 2
15 g/kg C	65 ± 2	-0,5 ± 0,2	17 ± 2	60 ± 2	11 ± 1	32 ± 1
Control	68 ± 2	-0,8 ± 0,1	17,6 ± 0,7	55 ± 3	15 ± 2	33,1 ± 0,8
5 g/kg AIR	67 ± 2	-0,9 ± 0,3	15 ± 1	58 ± 4	12 ± 2	33 ± 1
10 g/kg AIR	65 ± 2	-0,6 ± 0,3	16,8 ± 0,3	57 ± 1	13 ± 1	34 ± 1
15 g/kg AIR	64 ± 5	-0,6 ± 0,8	15 ± 1	61 ± 6	10 ± 4	32 ± 2
Control	68 ± 3	-0,9 ± 0,3	17 ± 1	54 ± 2	13,4 ± 0,9	31,4 ± 0,8
5 g/kg S	64 ± 4	-0,8 ± 0,3	17 ± 1	58 ± 2	11,3 ± 0,8	31,8 ± 0,8
10 g/kg S	66 ± 2	-1,0 ± 0,3	18 ± 4	54 ± 3	13 ± 1	32 ± 1
15 g/kg S	64 ± 5	-1,2 ± 0,1	19 ± 1	54 ± 2	14 ± 1	32,1 ± 0,8

[A] Los resultados se expresan en base al promedio y la desviación estándar (n=6).

IV-3-2-2-Efecto de la fibra de la calabacita sobre el mecanismo de envejecimiento del pan

Las rebanadas obtenidas de los panes se almacenaron durante diez días para evaluar su envejecimiento mediante un ensayo de compresión como se indicó previamente. La Figura 3 muestra las curvas características de fuerza-deformación obtenidas para los panes frescos (A) y envejecidos (B) preparados con 10 g/kg de C, como ejemplo. Durante el almacenamiento, los panes sufren cambios texturales atribuídos fundamentalmente a la retrogradación del almidón (Cornford y col., 1964; Willhoft , 1971; Del Nobile y col., 2003; Goesaert y col., 2005). Los módulos de Young aumentan con los días de almacenamiento como fue tempranamente demostrado por Cornford y col. (1964). Puede verse en la Figura 3 (A) la curva fuerza-deformación para el pan con 24 horas de horneado mostrando la respuesta de una espuma sólida suave, con paredes alveolares

flexibles, donde la fuerza aumenta con la deformación en una forma casi continua lo cual es coherente con un importante comportamiento fluido o plástico. La curva del pan envejecido (Figura 3B), presentó una pendiente mayor en la primera fase de compresión lo cual indica un incremento en el módulo de Young con el almacenamiento. Por otro lado, a mayores deformaciones se observa un punto de inflexión y, finalmente, la pendiente de la curva fuerza-deformación tiende a cero para el pan envejecido. Esto es coherente con el comportamiento de un sólido que proviene de la rigidificación de la espuma original como resultado del envejecimiento del pan. Los módulos de Young (E) se determinaron a partir de la pendiente constante de la primera etapa de compresión, a bajas deformaciones, mientras que la firmeza (F) se determinó siguiendo las recomendaciones de la American Association of Cereal Chemists (Ponte y Ovadia, 1996), como se indicó previamente.

Durante la fabricación del pan, se produce la hidratación completa de los gránulos del almidón de trigo ya que se agrega suficiente cantidad de agua a fin de conseguir un desarrollo completo del gluten. Los gránulos de almidón se hinchan debido a la hidratación, siendo el contenido de humedad local en las regiones amorfas de los gránulos de almidón la que determina la temperatura que debe alcanzarse para poder luego fundir las regiones cristalinas lo cual ocurre durante el horneado. Los gránulos de almidón hinchados gelatinizan, lo que involucra disrupción de gránulos, movimiento de la amilosa fuera de los mismos, generando una matriz continua que incluye los gránulos remanentes. La gelatinización de los gránulos de almidón completamente hidratados implica la completa fusión de los cristales de amilopectina durante el horneado del pan. El envejecimiento de la miga, que ocurre inmediatamente después del horneado y a lo largo del almacenamiento a temperatura ambiente, se debe a la recristalización del almidón (retrogradación). En este proceso cristaliza la amilosa y recristaliza la amilopectina. Ello ocurre durante el almacenamiento del pan y se refleja en el módulo elástico el cual mide la rigidez de la estructura global del gel (Zobel y Kulp, 1996) y, por lo tanto, incluye la desnaturalización de la red de gluten. Siendo el módulo de Young (E) un parámetro que mostró una gran dispersión en nuestras muestras, se decidió evaluar la firmeza (F) a diferentes días de almacenamiento del pan y ajustar los resultados con la ecuación de Avrami (Avrami, 1933 a,b,c; Cornford y col., 1964; Mclver y col., 1968):

$$\varphi = (F_\infty - F_t)/(F_\infty - F_0) = \exp(-kt^n)$$

donde φ es la fracción de material no-cristalino remanente a tiempo *t*; *k* es la constante de velocidad y es función de las constantes de nucleación y de velocidad de crecimiento; *n* indica el mecanismo de nucleación y de crecimiento y es una función combinada del número de dimensiones para el cual el crecimiento tiene lugar, y el orden de dependencia del proceso de nucleación con el tiempo (0 o 1); F_∞ es la firmeza límite; F_t es la firmeza de la miga a tiempo *t* y F_0 es la firmeza de la miga a tiempo cero o firmeza inicial (Mclver y col., 1968). Por lo tanto, la función $(F_\infty - F_t)/(F_\infty - F_0)$ indica el alcance de los cambios del almidón, prescindiendo del nivel de firmeza de la miga inicial, proveyendo un parámetro para evaluar los cambios del almidón o el envejecimiento (Cornford y col., 1964).

Se realizó el ajuste de los datos experimentales con la ecuación de Avrami considerando n=1. Este valor del exponente *n* es habitualmente usado en este tipo de estudios y supone que el modo de nucleación en la cristalización del almidón es instantáneo y que el crecimiento de los cristales es en una sola dirección (Mclver y col., 1968; Haros y col., 2002). Es de destacar que Mclver y col. (1968) mencionaron que debe esperarse nucleación instantánea, ya que cuando se calienta una pasta concentrada de almidón hasta su temperatura de gelatinización, el sistema obtenido no es homogéneo y probablemente queden regiones ordenadas.

Table 8. Parámetros obtenidos luego del ajuste de los datos experimentales de firmeza a la ecuación de Avrami, con n (exponente) = 1.

	F_∞ [A] (N/m)	F_O [A] (N/m)	k [A] (d^{-1})
Control	2700 ± 200	400 ± 200	0,27 ± 0,08
5 g/kg C	2300 ± 200	400 ± 200	0,28 ± 0,09
10 g/kg C	1700 ± 300	300 ± 200	0,2 ± 0,1
15 g/kg C	2600 ± 300	700 ± 300	0,2 ± 0,1
Control	2550 ± 250	800 ± 200	0,21 ± 0,08
5 g/kg AIR	2200 ± 200	650 ± 150	0,21 ± 0,07
10 g/kg AIR	2250 ± 100	700 ± 100	0,25 ± 0,05
15 g/kg AIR	2350 ± 350	800 ± 150	0,17 ± 0,09
Control	3010 ± 210	350 ± 210	0,27 ± 0,07
5 g/kg S	2590 ± 210	280 ± 280	0,28 ± 0,09
10 g/kg S	2450 ± 280	350 ± 210	0,24 ± 0,09
15 g/kg S	2660 ± 350	490 ± 140	0,16 ± 0,05

[A] Los resultados se expresan en base al promedio y la desviación estándar (n=8).

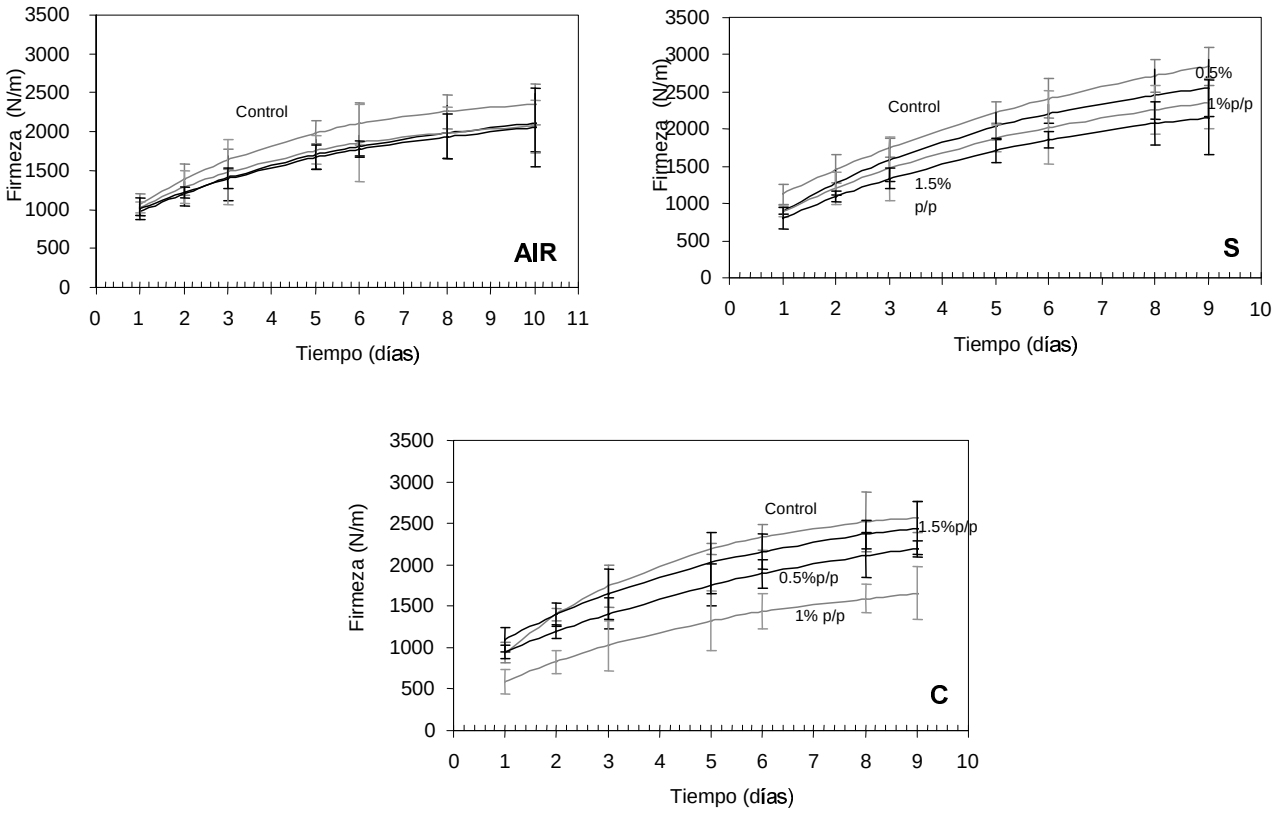


Figura 6: Proceso de endurecimiento de los panes control y con agregado de AIR-; S- y C-

Los datos experimentales de Firmeza como una función del tiempo ajustaron con la ecuación de Avrami (Tabla 8). Este procedimiento general de evaluación del envejecimiento en panes considera que una propiedad macroscópica (firmeza, modulo elástico) es indicadora de cambios microscópicos tales como la cristalización de parte de la estructura del pan. Se puede ver en la Figura 6 una clara tendencia a la disminución de F durante un almacenamiento de 10 días, luego del agregado de cualquiera de las fibras aisladas de la calabacita. Esta tendencia es más evidente a rangos de concentración de 5-15 g/kg para S y 5-10 g/kg para C, lo cual coincide con lo observado para F_{24} en las rebanadas de pan. Sin embargo, la comparación de las constantes de velocidad (k) y los parámetros F_∞ y F_0 calculados por la ecuación de Avrami no mostraron esta tendencia como significativa ($p>0,05$), excepto para el agregado de 10 g/kg de C, que mostró un significativamente menor valor de F_∞. Los valores de k aquí obtenidos ($\approx 0,25$ d^{-1}) coinciden con las constantes de velocidades de envejecimiento informados por otros autores (Cornford y col., 1964; Mcvler y col., 1968). Cornford y col. (1964) informaron que la constante de velocidad, k, disminuía con el incremento de la temperatura de almacenamiento del pan en el rango de -1ºC a 32ºC lo cual corresponde a una disminución del grado de sobreenfriamiento para la cristalización. El valor de E_∞ (módulo elástico límite) no se modificó con la temperatura. De este modo, ellos concluyeron que independientemente de cuál era la temperatura de almacenamiento considerada, siempre por arriba del punto de congelamiento, el pan tendía al mismo valor de modulo elástico, aunque las velocidades disminuyeran con el incremento de la temperatura. Ellos también observaron que el agregado de compuestos grasos disminuía el valor de E_∞ sin afectar significativamente el valor de k a una dada temperatura. De este modo, ellos concluyeron que el efecto de la materia grasa en realidad no era un efecto de antienvejecimiento ya que k no cambiaba. Justificaron la reducción observada en el valor del E_∞ a través del mayor volumen específico del pan observado luego del agregado de la materia grasa. En el presente trabajo, la presencia de 10 g/kg de C no produjo cambios en k. Además, el volumen específico del pan no cambió con el agregado de fibra (Figura 2B). En consecuencia, los cambios en la firmeza a lo largo del almacenamiento cuando se agregó fibra, se pueden atribuir

al mismo mecanismo que llevó a los panes a tener una menor firmeza (F_{24}) después del horneado y enfriado. La presencia de las fracciones de fibra C o S en la matriz de la miga podía interferir en la distribución de agua en la matriz gluten-almidón dando panes más blandos (menor F_{24}) y menores valores de F_{∞} en los panes almacenados. Considerando que aquí utilizamos el packaging adecuado para prevenir la pérdida de humedad que hubiese resultado en deshidratación durante el almacenaje y endurecimiento, el mecanismo predominante de envejecimiento en la miga del pan fue la cristalización de la amilosa y recristalización de la amilopectina desde el estado amorfo del producto recién horneado al estado parcialmente cristalino de un producto envejecido, con la formación de una red de zonas de conexión, redistribución de humedad e incremento de la firmeza textural. Inmediatamente luego del horneado, en los panes con contenidos de humedad por encima de 25-27% (Slade y Levine, 1984; Davidou y col., 1996), la red de almidón gelatinizado en el pan blanco comienza a recristalizar hacia una estructura parcialmente cristalina durante el enfriamiento a temperatura ambiente (25ºC). El pan recién horneado, comienza un proceso de endurecimiento y de redistribución de la humedad. Asimismo, se forman redes o cristales de cadenas enlazadas por complejos de amilosa de menor peso molecular-lípidos nativos. La cristalización de amilosa-lípidos se favorece más allá de la retrogradación. Este fenómeno que ocurre durante las primeras 24 horas después del horneado, contribuye al establecimiento del pan fresco, en parte, por cementación junto a los gránulos hinchados (Zobel y Kulp, 1996). La nucleación homogénea de los nuevos cristales de amilosa-lípido ocurrirían algo por arriba de la temperatura ambiente, mientras que la nucleación de los cristales de amilosa retrogradados en un medio de alta humedad se darían mas rápidamente a temperaturas cercanas a -5ºC. Las etapas posteriores a estos procesos concurrentes y el envejecimiento global del pan, están dominadas por la recristalización de amilopectina a una estructura parcialmente cristalina conteniendo regiones cristalinas dispersas de tipo B. Este polimorfo es un cristal más hidratado que el almidón tipo A. Su recristalización requiere de la incorporación de moléculas de agua dentro del reticulado del cristal, lo cual debe ocurrir mientras los segmentos de las cadenas de almidón se están alineando. De este modo, esta recristalización necesita migración de humedad dentro de la estructura de la miga, por medio del cual, el agua

previamente distribuida homogéneamente, debe difundir de la matriz amorfa y se incorpora, como componente estructural, en regiones cristalinas (Slade y Levine, 1994). Se puede suponer que las fracciones de fibras C y S debían restringir esta difusión de agua del gluten y/o a través de la matriz amorfa, obstruyendo la incorporación del agua en los polimorfos de tipo B y, por lo tanto, afectando la recristalización de la amilopectina. Este efecto de restricción de la disponibilidad del agua también fue evidente durante el desarrollo de la red de gluten en el ensayo farinográfico.

Los diferentes perfiles de cristalización mostrados por los panes control y con 10 g de C por kg de harina se determinaron por DSC. Como se puede ver en la Figura 7, se observó una endoterma a 84ºC (77ºC-103ºC) correspondiente a la gelatinización de la amilopectina recristalizada cuando se estudió el pan control, almacenado durante 7 días. La variación entálpica (ΔH) fue de 102,49 J/g. Un valor de ΔH de sólo 8,83 J/g se obtuvo en el estudio de la muestra de panes con 10 g de C por kg de harina, indicando que la retrogradación durante el almacenamiento del pan fue fuertemente afectada por la presencia de fibra C. Simultáneamente, se detectaron dos picos adicionales a 91ºC y 97,58ºC (88-103ºC) con un valor de ΔH de solo 3,22 J/g. Estos se pueden asociar a la disociación de los complejos amilosa-lípidos nativos formados durante el horneado y que cristalizaron en las primeras etapas después del horneado (Davidou y col.,1996) los cuales en el pan control no se pudieron visualizar.

Kim y D'Appolonia (1977) encontraron que los pentosanos tienen un fuerte efecto sobre el retardo de la retrogradación del almidón en los geles de almidón de trigo, siendo más pronunciado el efecto de los pentosanos insolubles en agua. Ellos informaron que los pentosanos solubles en agua reducían la retrogradación al actuar sobre la amilopectina, mientras que los pentosanos insolubles reducían el grado de retrogradación de amilosa y amilopectina. Resultados similares se encontraron cuando se estudió el efecto de los pentosanos sobre el envejecimiento en un sistema panificado (Gray y Bemiller, 2003). Gómez y col. (2003) reportaron un efecto importante de la adición de la fibra sobre la vida útil del pan. Rojas y col. (1999) determinaron que la presencia de HMPC y pectinas, incrementaba la viscosidad máxima y disminuía la tendencia a la retrogradación. Algunos autores (Xie y col., 2004; Kim y

D'Appolonia, 1977 a,b) han informado que la proteína retarda el envejecimiento del pan por dilución del almidón y retardando sus cambios, independientemente de la calidad de proteína. Es importante remarcar que la fracción de fibra C contenía lignina y su pectina era menos ramificada que la de AIR (menos grupos hidrofílicos); adicionalmente C duplicaba el contenido proteico de AIR, como ya fue discutido previamente. Por ello, la composición de C y su interacción con los componentes de la harina en una fórmula de pan puede ser la causa no sólo de la obtención de panes más blandos luego del horneado sino también del efecto del agregado de C sobre el envejecimiento del pan.

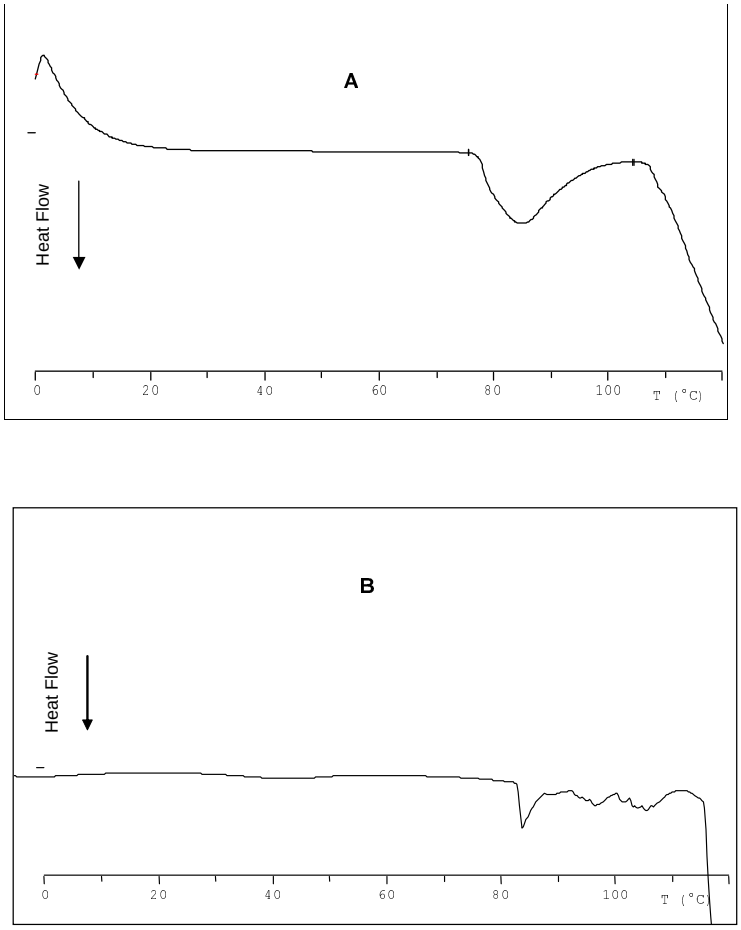


Figura 7: Transición térmica de las muestras de panes recogidas a los 7 días de almacenamiento de (A) Control, (B) Pan con 10 g/kg –C.

IV-4-Conclusiones

En este trabajo, se evaluó el efecto de distintos productos ricos en fibra (AIR, C y S) obtenidos de la calabacita (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) en el comportamiento de harina de trigo. En primer lugar se analizó el efecto del agregado de estos productos sobre la reología de las masas y, luego, se analizó el efecto sobre la calidad final del pan obtenido y su vida útil.

La fracción AIR tuvo una influencia no significativa sobre el desarrollo de la red de gluten de acuerdo a los resultados obtenidos durante el ensayo farinográfico.

Cuando se realizaron estudios a través del alveógrafo y zimotaquígrafo, las mezclas de AIR-harina mostraron extensibilidad reducida, reflejando un desarrollo de gluten incompleto. Probablemente, el alcance de 500 FU en el farinógrafo, no significó que se hubiese obtenido un desarrollo completo de la red de gluten, sino que mostró un efecto viscosante de los polisacáridos de las fracciones de fibras incorporadas, compensando la falta de desarrollo en el gluten. La tenacidad (P) y la relación (P/L) más altas mostradas por las masas adicionadas con AIR en el ensayo alveográfico podrían atribuirse a la falta de suficiente cantidad de agua para alcanzar un completo desarrollo de la masa a lo largo de este ensayo. El agregado de fibra, en general, no afectó la retención ni la pérdida de gas de la masa. De todas maneras, la adición de AIR mostró una tendencia hacia una retención levemente menor y una mayor pérdida, lo cual se puede atribuir a un desarrollo incompleto del gluten.

Es importante remarcar que los resultados obtenidos muestran la necesidad, para lograr una completa caracterización de la masa, de usar no sólo el farinógrafo sino también el alveógrafo y el zimotaquígrafo, a fin de establecer el efecto de las diferentes fracciones en el comportamiento de la harina.

En cuanto a la calidad del pan, se observó una menor firmeza del mismo con respecto al control, 24 hs después del horneado, cuando la harina se suplementó con 10 g/kg de –C- y 10 a 15 g/kg de –S-.

También se observó que los panes que contenían 5-15 g/kg –S- o 5-10 g/kg –C-mostraron una miga más tierna a lo largo de 10 días de almacenamiento. De todos modos, este efecto de ablandamiento en el pan sólo fue significativo cuando la harina se mezcló con 10 g/kg de fracción de fibra C-. La distribución de agua a través de la matriz amorfa y entre el gluten y el almidón es un factor clave para la retrogradación del almidón y, probablemente, los productos C- y S-pudieron restringir esta difusión de agua, obstruyendo la incorporación del agua a los polimorfos de tipo B que se generan en la retrogradación del almidón, viéndose a la vez favorecida la formación temprana de complejos amilosa-lípidos nativos, cuya cristalización predomina sobre la retrogradación.

El producto AIR, que mostró la mayor WBC como así también la más rápida velocidad de hidratación y capacidad de hinchamiento en conexión con la composición química de sus polímeros, no tuvo influencia significativa sobre el desarrollo de la red de gluten en el farinógrafo ni se encontró efecto significativo sobre el volumen específico del pan ni sobre la firmeza del pan luego del horneado (F_{24}) y almacenamiento (F_{∞}), respecto a las muestras control. Parece ser de importancia primaria conocer, a través del método capilar de Baumann, la cinética de absorción de agua y de hinchamiento de las matrices de las fibras, a través del cual es posible no sólo determinar la WBC, sino también el comportamiento de la matriz durante la absorción. Cuando la velocidad de absorción de agua es baja, como es el caso del producto C, un control más difusivo de la absorción de agua parecería ejercer un efecto significativo sobre la distribución de agua a través de la matriz amorfa, afectando el desarrollo de la red de gluten durante el ensayo farinográfico como así también, retardando el envejecimiento del pan inmediatamente después del horneado y a lo largo del almacenamiento. Probablemente el efecto de la fracción C- a 10 g/kg respecto a la harina se pueda atribuir a su composición química: presencia de lignina, cadenas de pectina menos ramificadas y un contenido significantemente alto de proteínas.

Se puede concluir que la utilización de las fracciones de fibra de calabacita S- y C-, en un rango de concentración de 5-15 g/kg es prometedora no

sólo para propósitos nutricionales sino también como mejoradores de la panificación.

IV-5-Referencias

AOAC. (1995). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Volume 2. USA: AOAC, Inc. Method 925.10.

Avrami, M. (1939). Kinetics of phase change. I. *J Chem Physics* 7, 1103-1112.

Avrami, M. (1940). Kinetics of phase change. II. *J Chem Physics* 8, 212-224.

Avrami, M. (1941). Granulation, phase change, and microstructure. Kinetics of phase change. III. *J Chem Physics* 9, 177-184.

Berton, B., Scher, J., Villieras, F., & Hardy, J. (2002). Measurement of hydration capacity of wheat flour: influence of composition and physical characteristics. *Powder Technology,* 128, 326-331.

Boeriu, C.G., Bravo, D., Gosselink, R.J.A., & van Dam, J.E.G. (2004). Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *Industrial Crops and Products,* 20, 205-218.

Bombara, N., Añón, M.C., & Pilosof, A.M,R. (1997). Functional properties of protease modified wheat flours. *LWT* 30, 441-447.

Brett, C.T., & Waldron, K.W. (1996). *The physiology and biochemistry of plant cell walls*. (2nd ed., pp. 39-40). Chapman & Hall, London.

British Cereal Exports. Chopin Alveograph Guide. Available from: http://www.hgca.com/document.aspx?fn=load&media_id=471

Collar, C., Andreu, P., Martínez, J.C., Armero, E. (1999). Optimization of hydrocolloid addition to improve wheat bread dough functionality: a response surface methodology study. *Food Hydrocolloids,* 13, 467-475.

Cornford, S.J., Axford, D.W.E., & Elton, G.A.H. (1964). The elastic modulus of bread crumb in linear compression in relation to staling. *Cereal Chem* 41, 216-229.

Davidou, S., Le Meste, M., Debever, E., & Bekaert, D. (1996). A contribution to the study of staling of white bread: effect of water and hydrocolloid. *Food Hydrocolloids*, 10(4), 375-383.

de Escalada Pla, M.F., Rojas, A.M., & Gerschenson, L.N. (2004). Caracterización funcional de la fibra de calabaza (*Cucumis Moschata*, Duch.). In *XIII Seminario Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, Montevideo, URUGUAY.

Del Nobile, M.A., Martoriello, T., Mocci, G., & La Notte, E. (2003). Modeling the starch retrogradation kinetic of durum wheat bread. *J Food Eng* 59, 123-128.

Forand, K.M. (1990). Cotton fibre particles for use in baked goods. *CA 19902007950.*

García Obregón, O.P. (2003). Introspectiva de la fibra. *Énfasis Alimentación*, 6, 74-78.

Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W.S., Courtin, C.M., Gebruers K., & Delcour, J.A. (2005). Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 12-30.

Gómez, M., Ronda, F., Blanco, C.A., Caballero P.A., & Apesteguía A. (2003). Effect of dietary fibre on dough rheology and bread quality. *Eur Food Res Technol* 216, 51-56.

Gray, J.A., & Bemiller, J.N. (2003). Bread staling: molecular basis and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 1-21.

Haros, M., Rosell, C. M., Benedito, C. (2002). Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. *Eur Food Res Technol* 215, 425-430.

ISO 5530-1. (1991). Wheat flour -- Physical characteristics of doughs -- Part 1: Determination of water absorption and rheological properties using a farinograph.

ISO 5530-4. (1991). Wheat flour (Triticum aestivum L.) -- Physical characteristics of doughs -- Part 4: Determination of rheological properties using an alveograph.

Jeltema, M.S., & Zabic, M.E. (1979). Fibre components-quantitation and relationship to cake quality. *J Food Sci* 44, 1732-1735.

Jones, R.W., & Erlander, S.R. (1967). Interaction between wheat proteins and dextrans. *Cereal Chem* 44, 447-456.

Kim, S.K., & D'Appolonia, B.L. (1977a). Effect of pentosans on the retrogradation of wheat starch gels. *Cereal Chem* 54(1), 150-160.

Kim, S.K., & D'Appolonia, B.L. (1977b). Bread staling studies. III. Effect of pentosans on dough, bread, and bread staling rate. *Cereal Chem* 54(2), 225-229.

Kim, S.K., & D'Appolonia, B.L. (1977c). Bread staling studies. I. Effect of protein content on staling rate and bread crumb pasting properties. *Cereal Chem* 54, 207-215.

Kim, S.K., & D'Appolonia, B.L. (1977d). Bread staling studies. II. Effect of protein content and storage temperature on the role of starch. *Cereal Chem* 54, 216-224.

Laaksonen, T.J., & Roos, Y.H. (2003). Water sorption and dielectric relaxations of wheat dough (containing sucrose, NaCl, and their mixtures). *J Cereal Sci* 37, 319-326.

Laufenberg, G., Kunz, B., & Nystroem, M. (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Biores Technol* 87, 167-198.

McIver, R. G., Axford D.W.E., Colwell, K.H., & Elton, G.A.H. (1968). Kinetic study of the retrogradation of gelatinised starch. *J Sci Food Agric* 19, 560-563.

Morel, M. H., Redl, A., & Guilbert, S. (2002). Mechanism of heat and shear mediated aggregation of wheat gluten protein upon mixing. *Biomacromolecules* 3, 488-497.

Pashchenko, L..P., Magomedov, G.O., Tareeva, I.M., Pashchenko, L.J., & Strygin,V.V. (2002). Method of bread production. Applicant: Voronezhskaja gosudarstvennaja tekhnologicheskaja akademija. *RU 2182772*.

Pomeranz Y., Shogren M.D., Finney K.F., & Bechtel, D.B. (1977). Fibre in breadmaking-effects on functional properties. *Cereal Chem* 54(1), 25-41.

Ponte, J.G.Jr., & Ovadia, D.Z. (1996). Instrumental Methods. In R.E. Hebeda, H.F. Zobel (Eds.), *Baked goods freshness. Technology, evaluation, and inhibition of staling* (pp. 151-170). Marcel Dekker, Inc., New York.

Protzeck, E.C., Sossela Freitas, R.J. & Waszczynsky, J. (1998). Incorporação de fibras do bagaço de maçc em pcs de forma. In Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo, (CYTED) (Eds.), *Temas en Tecnología de Alimentos. Vol.2. Fibra Dietética* (pp. 245-257). Alfaomega Grupo Editor, México DF.

Ptitchkina, N.M., Novokreschonova L.V., Piskunova G.V., & Morris, E.R. (1998). Large enhancements in loaf volume and organoleptic acceptability of wheat bread by small additions of pumpkin powder: possible role of acetylated pectin in stabilizing gas-cell structure. *Food Hydrocolloids,* 12, 333-337.

Pyler, E.J. (1988). *Baking Science and Technology, volume II* (pp. 850-910). Sosland, Merriam, KS.

Ree, S.H. (2004). Bread utilizing vegetables for their nutritional value and method for making. Applicant: Ree, S.H. *WO 2004023880.*

Rojas, J.A., Rosell, C.M., & Benedito de Barber, C. (1999). Pasting properties of different wheat flour-hydrocolloid systems. *Food Hydrocolloids,* 13, 27-33.

Roman-Gutierrez, A., Sabathier, J., Guilbert, S., Galet, L., & Cuq, B. (2003). Characterization of the surface hydration properties of wheat flours and flour components by the measurement of contact angle. *Powder Technology,* 129, 37-45.

Rosell, C.M., Rojas, J.A., & Benedito de Barber, C. (2001). Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloids,* 15, 75-81.

Russell, P. L. (1983). A kinetic study of bread staling by differential scanning calorimetry and compressibility measurements. The effect of added monoglyceride. *J Cereal Sci* 1, 297-303.

Scanlon, M.G., & Zghal, M.C. (2001). Bread properties and crumb structure. *Food Res Int* 34, 841-864.

Sivaramakrishnan, H.P., Senge, B., & Chattopadhyay, P.K. (2004). Rheological properties of rice dough for making rice bread. *J Food Eng* 62, 37-45.

Slade, L., & Levine, H. (1994). Structure-function relationships of cookie and cracker ingredients. In H. Faridi (Eds.), *The science of cookie and cracker production*, (23-141). Chapman & Hall, New York.

Stauffer, C.E. (1994). Chapter 6: Redox Systems in cookie and cracker dough. In Hamed Faridi. Nabisco Foods Group (Eds.), *The science of cookie and cracker production* (pp.227-251). Chapman & Hall, New York.

Wang, M., Hamer, R.J., van Vliet, T., Gruppen, H., Marseille, H., & Weegels, P.L. (2003). Effect of water unextractable solids on gluten formation and properties: mechanistic considerations. *J Cereal Sci* 37, 55-64.

Wang, X., Choi Sung-Gil, & Kerr, W.L. (2004). Water dynamics in white bread and starch gels as affected by water and gluten content. *LWT* 37, 377-384.

Willhoft, E.M.A. (1971). Bread staling II.-Theoretical study. *J Sci Food Agric* 22, 180-183.

Wittig de Penna, E., Bunger, A., Ibieta, A., Soto, D., Hernández, N. & López, L. (1998). Alimentos para el adulto mayor: muffins enriquecidos con fibra de lupino. In Programa

Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo, (CYTED) (Eds.), *Temas en Tecnología de Alimentos. Vol.2. Fibra Dietética* (pp. 259-277). Alfaomega Grupo Editor, México DF.

Xie, F., Dowell, F.E., & Sun, X.S. (2004). Using visible and near-infrared reflectance spectroscopy and differential scanning calorimetry to study starch, protein, and temperature effects on bread staling. *Cereal Chem* 81(2), 249-254.

Zaidul, I.S. Md., Karim, A.A., Manan, D.M.A., Ariffin, A., Norulaini, N.A., & Omar Mohd, A.K. (2004). A farinograph study on the viscoelastic properties of sago/wheat flour dough systems. *J Sci Food Agric* 84, 616-622.

Zobel, H.F., & Kulp, K. (1996). The staling mechanism. In R.E. Hebeda, H.F. Zobel (Eds.), *Baked goods freshness. Technology, evaluation, and inhibition of staling* (pp. 1-64). Marcel Dekker, Inc., New York.

CONCLUSIONES

GENERALES

Conclusiones Generales

La caracterización del tejido de calabacita (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) permitió concluir que la pared celular (PC) del tejido fresco es especialmente resistente a elongaciones en condiciones de hipotonicidad severa. Esto se pudo atribuir, en primer lugar, a la alta resistencia del entramado celulosa-xiloglucanos del mesocarpio (tejido comestible de la calabacita) y, por otro lado, al incremento de la actividad de la enzima polifenoloxidasa que surge como respuesta metabólica al estrés del tejido.

Desde el punto de vista químico, la ausencia de puentes fenólicos y puentes calcio, junto con una proporción sustancial de pectinas extraíbles en agua fría en la estructura de la PC-laminilla media (LM) del tejido de calabacita fresco, explican la característica del tejido débil, que se desintegra fácilmente luego de la cocción en agua, debido a la débil adhesión célula-célula.

Se desarrolló un alimento funcional en base al tejido de calabacita (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret), rico en fibra, el cual se fortificó con hierro (Fe). Este producto desarrollado es un alimento listo para consumir, de económica fabricación y, por lo tanto, accesible a una amplia franja de la población.

El producto presentó buena estabilidad microbiológica, como así también organoléptica (textura, color y sabor). La incorporación de Fe, aún en dosis altas no presentó diferencias significativas desde el punto de vista microbiológico y organoléptico, en las condiciones ensayadas, cuando se comparó con un producto alternativo desarrollado sin fortificación con Fe. Se observó la total biodisponibilidad del Fe incorporado.

El procesamiento de la calabacita produjo gran cantidad de residuos, entre ellos, cáscara (exocarpio) y recortes de pulpa (mesocarpio) que fueron

utilizados para obtener productos enriquecidos en fibra por medio de deshidratación (S) o por tratamiento alcohólico y secado de pulpa (AIR) o cáscara (C). Estas fracciones de fibra aisladas presentaron un interesante comportamiento en relación a la retención de agua y de glucosa hecho que las caracteriza como muy adecuadas en vista a su aplicación como ingrediente en la formulación de alimentos funcionales.

Por último, se utilizaron estas fracciones ricas en fibra en mezclas con harina, en pequeñas dosis, para estudiar su comportamiento como aditivo de masas farináceas. Todas ellas aumentaron la tenacidad de las masas al ser incorporadas al 0,5%, pero sin reducir el trabajo de deformación de manera significativa lo que mostraría que no afectan profundamente la matriz gluten-almidón. En cuanto a la calidad del pan obtenido, se observó una menor firmeza de la miga con respecto al control, 24 horas después del horneado, cuando la harina se suplementó con 10 g/kg de C ó 10 a 15 g/kg de S. También se observó que los panes que contenían 5-15 g/kg de S ó 5-10 g/kg de C mostraron una miga más tierna a lo largo de 10 días de almacenamiento. Este efecto observado en el pan fue significativo únicamente cuando la harina se mezcló con 10 g/kg de fracción de fibra C. Se puede concluir que la fibra de calabacita actuaría como mejorador en panificación ya que mejora la terneza de la miga y la mantiene por más tiempo.

El aislamiento de fibra con características funcionales es un camino viable y con potencialidad económica para agregar valor a los residuos de la industrialización de calabacita.

APENDICE

APENDICE 1

Cálculo de la a_w:

Consideramos $a_{wtrozos\ cocidos} \approx 1$, humedad = 90%.

PMagua = 18

Contribución de agua por los trozos:

440 cilindros x 4,42 g/cilindro x 0.90 = 1750 g

Contribución de agua por el jarabe: 1680 g

Contribución de agua por la glucosa monohidratada: 120 g

Agua total: (1750 + 1680 + 120) g = 3550 g que equivalen a 197 moles de agua.

Aplicando la ecuación de Norrish:

➔ *Cerelosa:*

Cerelosa: 1,32 kg representan 6,67 moles de glucosa

$X_G = 6,67 / (6,67 + 197) = 0,0327$

$X_{agua} = 197 / (6,67 + 197) = 0,9673$

$a_{wC} = 0,9673 \times \exp(-2,25 \times 0,0327^2)$

$$a_{wC} = 0,9650$$

➔ *Sacarosa:*

PMsacarosa = 342. Entonces, 1.32 kg representan 3.86 moles

$X_S = 3,86 / (3,86 + 197) = 0,0192$

$X_{agua} = 197 / (3,86 + 197) = 0,9808$

$a_{wS} = 0.9808 \times \exp(-6,47 \times 0,0192^2)$

$$a_{wS} = 0,9784$$

Aplicando la ecuación de Raoult:

➔ *Sorbato de potasio:*

PMsorbato de potasio = 150,22. Entonces, 4,4 g representan 0,0293 moles

$X_{agua} = 197 / (0,0293 + 197) = 0,9999$

$$a_{wSorb} = 0,9999$$

➔ *Ácido L-(+)-ascorbico (AA):*

PMAA = 176,1. Entonces, 2,2g representan 0,0125 moles

X_{agua} = 197 / (0,0125 + 197) = 0,9999

a_{wAAs} = 0,9999

➔ *Ácido cítrico:*

PMácido cítrico = 192. Entonces 3 g representan = 0,0156 moles

X_{agua} = 197 / (0,0156 + 197) = 0,9999

$a_{wCítri}$ = 0,9999

Aplicando la ecuación de Ross:

$a_{w\ final} = a_{wC} \cdot a_{wS} \cdot a_{wSorb} \cdot a_{wAAs} \cdot a_{w\ Cítri}$

$a_{w\ final}$ = 0.9650 . 0.9784 . 0,9999 . 0,9999 . 0,9999

$a_{w\ final}$ = 0,9439

“Fe de erratas”

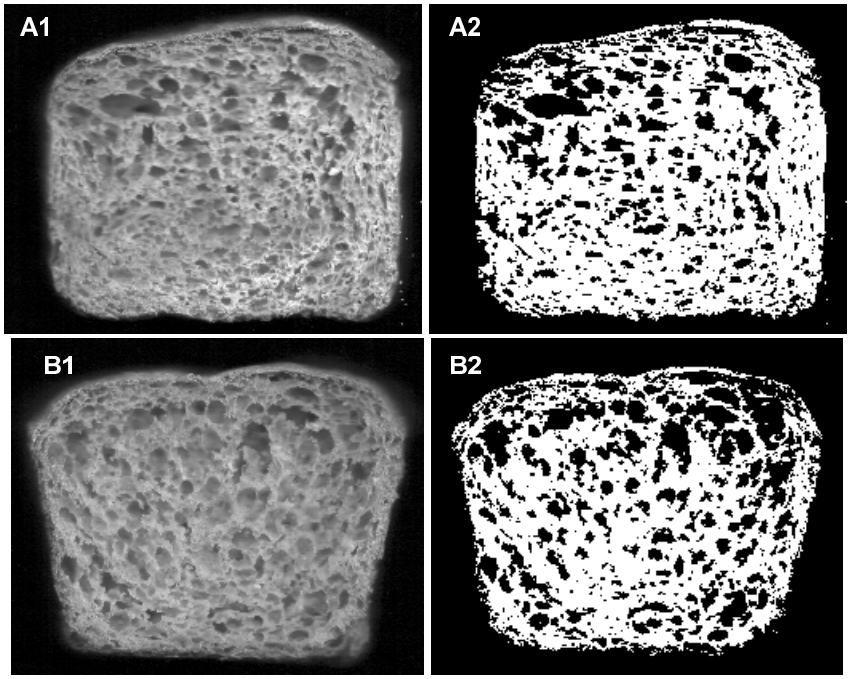
- P.12: renglón 11
  Donde dice: “MC”
  Reemplazar por: “PC”

- P.28: Tabla 1, columna: tan δ, primer renglón
  Donde dice: “0,080±”
  Reemplazar por: “0,080±0.001”

- P.35: renglón 24
  Donde dice: “reducción en la relación G’’/G’ para el tejido…”
  Reemplazar por: “aumento en la relación G’’/G’ para el tejido…”

- P.132: Tabla 2
  Donde dice: “Hidratos de Carbono Totales”
  Reemplazar por: “Hidratos de Carbono Totales no celulósicos”

- P.132: Tabla 3
  Donde dice: “Azúcares neutros de la fracción C”
  Reemplazar por: “Azúcares neutros de la fracción C (mol %)”.

- P.137: Tabla 5
  Donde dice: “(WHC)” y”(WRC)”
  Reemplazar por: “$(WHC)^2$” y “$(WRC)^2$”

- P.186: Reemplazar Figura 5 por: