

Tesis Doctoral

Estudio químico y funcional de pectinas y glicanos entrecruzantes de paredes celulares de prunoideas

Basanta, María Florencia

2013

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:

Basanta, María Florencia. (2013). Estudio químico y funcional de pectinas y glicanos entrecruzantes de paredes celulares de prunoideas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Basanta, María Florencia. "Estudio químico y funcional de pectinas y glicanos entrecruzantes de paredes celulares de prunoideas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Orgánica

Estudio químico y funcional de pectinas y glicanos entrecruzantes de paredes celulares de prunoideas.

Tesis presentada para optar por el Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Orgánica

María Florencia Basanta

Directores de Tesis:

Dr. Carlos Arturo Stortz

Dra. Ana María Luisa Rojas

Consejero de Estudios:

Dr. Carlos Arturo Stortz

Lugares de Trabajo:

Departamento de Química Orgánica-CIHIDECAR, FCEyN-UBA.

Departamento de Industrias, FCEyN-UBA.

Buenos Aires, 2013

Estudio químico y funcional de pectinas y glicanos entrecruzantes de paredes celulares de prunoideas.

Se han realizado estudios tanto de naturaleza química como funcional de pectinas y glicanos entrecruzantes de las paredes celulares de prunoideas, apuntando fundamentalmente a estudiar como ellos cambian según la variedad y grado de madurez.

En primer término se estudió el método extractivo de las pectinas débilmente unidas de ciruelas japonesas (*Prunus salicina* variedad 'Roysum'), analizando las variables tiempo-temperatura. Se pudo determinar que el procedimiento extractivo habitual que demora 24 h a temperatura ambiente puede acortarse a 2 h sin afectar los rendimientos ni las características del producto.

Posteriormente se realizó el fraccionamiento completo de la pared celular de cinco variedades de cerezas (*Prunus avium* L.) en el primer y último estadio de madurez. Se pudieron correlacionar la composición y características macromoleculares de las pectinas y glicanos entrecruzantes con el grado de madurez del fruto y con la diferencia de firmeza entre las variedades. No se encontró un patrón relacionado con la susceptibilidad al *cracking*. A partir de dos variedades de cereza de firmeza contrastante, se evaluó el desempeño reológico de las fracciones de polisacáridos solubles en H₂O, CDTA y Na₂CO₃ así como las propiedades de hidratación de los residuos insolubles parciales y final, identificándose patrones de composición y características macromoleculares relacionadas con la firmeza, maduración y funcionalidad biológica.

Como se determinó que las paredes celulares de prunoideas son fuente de biopolímeros útiles y que el aprovechamiento de los subproductos agrícolas permite agregar valor a las materias primas es que, finalmente, se aislaron fibras a partir de residuos de la cosecha de tres variedades de cerezas dulces, determinándose su potencial utilidad como ingrediente funcional para la formulación de alimentos.

Palabras claves: pared celular, pectinas, glicanos, prunoideas, ciruela, cereza, fibra, propiedades funcionales, ingrediente funcional.

Chemical and functional study of Prunoideae cell wall pectins and crosslinking glycans.

Cell wall pectins and crosslinking glycans of the Prunoideae were analyzed both from their chemical and functional points of view aiming mainly at understanding how they are modified according to ripeness and variety.

First, the time and temperature variables on the extractive method of the weakly bonded pectins was studied using Japanese plums (*Prunus salicina*). It has been determined that the usual 24 h procedure at room temperature can be reduced to 2 h with no major effect on the yield or product characteristics.

The next analysis was a complete fractionation of the cell wall of five different varieties of cherries (*Prunus avium* L.) at two different developmental stages, *i.e.* unripe and ripe. A correlation of the composition and the macromolecular characteristics of the pectins and matrix glycans with the stage of ripeness and the difference in firmness between varieties was encountered. However, no pattern was found regarding the cracking susceptibility. Starting from two varieties with contrasting firmness, the rheological performance of the polysaccharides extracted by H₂O, CDTA and Na₂CO₃ was evaluated as well as the hydration properties of the insoluble residues isolated at some steps of the sequential extraction, thus allowing to identify patterns relating the composition and the macromolecular characteristics with the firmness, ontogeny and biological functionality.

As the cell walls of the Prunoideae are a useful source of biopolymers, and the use of agricultural subproducts may add value to the raw material, fibers of the residue of three sweet cherries varieties were isolated, showing their potential usefulness as functional ingredients for food formulations.

Key words: cell wall, pectins, glycans, Prunoideae, plum, cherry, fiber, functional properties, functional ingredient.

A mi familia
Silvia y Horacio, Lele, Nico y Beli

A Willie

A mis abuelos

A mis amigos
Vir, Vicky, Vero, Sol, Agus, Jime, Vale, Guto

Agradezco al Dr. Carlos Stortz y la Dra Ana María Rojas quienes tuvieron la responsabilidad de dirigirme y guiarme en este trabajo, por transmitirme cada uno a su manera su experiencia en la investigación y sus conocimientos, por el esfuerzo y responsabilidad de todos los días, por la paciencia que me tuvieron, por darme libertad en las decisiones cotidianas de trabajo y en elegir cursos y congresos de mi interés, y por el afecto que me dieron durante este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, Silvia y Horacio, por el ejemplo que son, por su apoyo y sus consejos, por confiar en mí y por la libertad que siempre me dieron. A Nico y Belí, (hermanos), Lele (tía) por alentarme pese a no entender bien que hago ni para qué sirve...

A Willie, por el amor, por bancarme día a día en los buenos y malos momentos haciendo lo posible para verme bien, por tratar de entenderme y ayudarme especialmente en estos últimos momentos de este trabajo que no fueron los más relajados...

A lo más importante que me dio esta carrera... mis amigossssssssss!!! Vir, Vicky, Vero, Sol, Guto y Gaston, porque son de fierro!!! Siempre presentes en las buenas y en las malas, por todaaaa la ayuda incondicional y desinteresada en lo personal y profesional. Por los viajes, tragos, charlas, comidas y todos los buenos y otros no tan buenos momentos compartidos durante estos, ya más de 10, años.

A mis hermanas de la vida Agus, Jime y Vale por estar siempre a mi lado apoyándome aconsejándome y alentándome en todo lo que hago.

A Guille y Eve por su amistad, compañerismo.

Agradezco muuuuuy especialmente a Andrea Ponce, por su compañerismo y amistad, por escucharme cada vez que lo necesite, por su disposición continúa para ayudarme en lo personal y profesional, sus consejos, por las ideas que aportó a esta tesis, su humildad y por haber compartido tantos buenos y divertidos momentos y algunos otros no tan buenos... durante estos años.

A Vanina Cosenza, por compartir todos los días de trabajo, por ayudarme en todo lo que pudo tanto en lo profesional como personal y sobre todo por haberme bancado y ayudado tanto con los odiososssss y tediososssss seminariosssss!!!!

A Diego Navarro, por haberme convencido de hacer el doctorado... (todavía no sé si fue bueno o malo...) y por haberme ayudado desde donde pudo.

A Cecilia Rodríguez por su buena onda de todos los días sus consejos y su continuo aliento.

A todos los que son o fueron parte de este grupo de trabajo: Virginia Fernández, Mercedes Pérez Recalde y Gloria Salato, por compartir el día a día, con todo lo que eso implica, por su compañerismo y por haber estado siempre dispuestos a darme una mano.

A la Ing. Agr. Dolores Raffo del EEA INTA Alto valle y AER INTA que selecciono y envié todos los años las cerezas utilizadas en este trabajo, por su buena onda y compañerismo.

A todas las, profesoras, JTP, ayudantes de 1º y 2º del área de Química y Microbiología de Alimentos, por todos estos años compartidos en docencia y por confiar en mí.

A la Dra. Cristina Matulewicz por su gran generosidad, preocupación y cariño.

A Marina Ciancia por las palabras de aliento en momentos complicados.

Al Dr. Alberto Cerezo, por su experiencia y la ayuda brindada durante estos años.

A la Dra. Lía Gerschenson por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo.

A todas las chicas del laboratorio de industrias, Eliana, Loli, Laura, Marina, Silvia, Fernanda, por su buena onda, y estar siempre dispuestas a darme una mano y ayudarme en lo que sea.

A todas las personas (Profesoras, JTP, ayudantes de 1º y 2º) del área de Química y Microbiología de Alimentos, por todos estos años compartidos en docencia y por confiar en mí.

A los no docentes, Nancy, Maripi, Mabel, Sergio, Quintana y Hernan, por estar siempre dispuestos a resolvernos problemas, y hacernos las cosas más fáciles.

Al consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), por las becas de Postgrado que me otorgaron para realizar esta Tesis.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por darme la posibilidad de hacer este trabajo.

MIL GRACIASSS!!!!

INDICE

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Pared celular	3
1.2 Componentes de la pared celular	4
1.2.1 Polisacáridos de la pared celular	4
1.2.2 Otros componentes de la pared celular	11
1.3 Modelos de la pared celular primaria	13
1.4 Pared celular de frutos	15
1.4.1 Modificaciones de la pared celular durante el crecimiento y maduración de los frutos	15
1.4.2 Importancia de la pared celular en la textura de los frutos.	17
1.4.3 Antecedentes sobre estudios de pared celular de frutas en nuestro laboratorio	18
1.5 La pared celular como alimento y fibra	20
1.6 Objetivos	21

CAPÍTULO 2

MÉTODOS EXTRACTIVOS Y ANÁLISIS QUÍMICO-FUNCIONAL DE PECTINAS DÉBILMENTE UNIDAS DE LA PARED CELULAR

2.1 Introducción	25
2.1.1 Características químicas de las pectinas	26
2.1.2 Propiedades funcionales de las pectinas	27
2.1.3 Métodos de extracción de pectinas	28
2.1.3.1 Antecedentes de extracciones acuosas de pectinas	30
2.1.4 Características reológicas de las pectinas	30
2.2 Objetivo	32
2.3 Resultados y discusión	33
2.3.1 Extracción de pectinas solubles en agua	33
2.3.1.1 Análisis de los rendimientos	35
2.3.2 Análisis de las fracciones	36

2.3.2.1 Composición química	36
2.2.2.2 Análisis reológico de las pectinas aisladas de la pared celular	40
2.4 Conclusiones	46

CAPÍTULO 3

CAMBIOS EN LOS POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR DURANTE EL DESARROLLO DE FRUTOS DE DIFERENTES VARIEDADES DE CEREZO DULCE (*Prunus avium* L.)

3.1 Introducción	51
3.1.1 Importancia del cultivo de cerezas en Argentina	52
3.1.2 Características de los frutos	53
3.1.3 Características de las variedades de cerezo bajo estudio	55
3.2 Objetivo	3.2
3.3 Resultados	58
3.3.1 Índices fisiológicos, índices de madurez y de calidad.	58
3.3.2 Fraccionamiento de la pared celular.	59
3.3.3 Análisis de las fracciones	62
3.3.3.1 Cambios en el contenido de ácidos urónicos y azúcares neutros en la pared celular con la madurez.	62
3.3.3.2 Cambios en la composición de azúcares neutros con la madurez	69
3.3.3.3 Relaciones entre componentes poliméricos	73
3.3.4 Despolimerización de pectinas y glicanos entrecruzantes	77
3.4 Discusión	83
3.5 Conclusiones	86

CAPÍTULO 4

COMPORTAMIENTO DE LA PARED CELULAR DE CEREZAS: COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PROPIEDADES FUNCIONALES DE BIOPOLÍMEROS EXTRAÍDOS SECUENCIALMENTE DE DOS VARIEDADES DE CEREZAS EN DOS ESTADÍOS DE MADUREZ

4.1 Introducción	89
4.2 Objetivo	90
4.3 Resultados y discusión	91

4.3.1 Extracción de los diferentes biopolímeros	91
4.3.2 Análisis químico de las fracciones	92
4.3.3 Caracterización reológica de las fracciones solubles en H ₂ O, CDTA y Na ₂ CO ₃	99
4.3.4 Propiedades de hidratación de los residuos	107
4.4 Conclusiones	114

CAPÍTULO 5

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y FUNCIONAL DE LAS FIBRAS AISLADAS A PARTIR DEL DESCARTE DE LA COSECHA DE CEREZAS DULCES (PRUNUS AVIUM L.) EN VISTA DE SU APROVECHAMIENTO COMO INGREDIENTE FUNCIONAL Y/O FIBRA DIETARIA.

5.1 Introducción	119
5.1.1 Efectos de la fibra dietaria sobre la salud	122
5.1.2 Usos tecnológicos de la fibra dietaria	123
5.1.3 Fuentes de obtención de fibra dietaria	124
5.2 Objetivo	125
5.3 Resultados y discusión	126
5.3.1 Análisis químico y físico de las fibras aisladas	126
5.3.1.1 Contenido de fenoles y capacidad antioxidante	128
5.3.2 Propiedades físicas y de hidratación	132
5.3.3 Estabilización de emulsiones	137
3.4 Conclusiones	142

CAPÍTULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Consideraciones generales	147
6.2 Obtención de las frutas utilizadas	148
6.3 Índices fisiológicos, índices de madurez y calidad	149
6.3.1 Firmeza	149
6.3.2 Contenido de sólidos solubles	149
6.3.3 Acidez titulable	149
6.3.4 Color	150
6.3.5 Índice de cracking	150

6.4 Preparación de las paredes celulares	150
6.5 Fraccionamiento de polisacáridos de la pared celular	151
6.5.1 Optimización del fraccionamiento de polisacáridos de la pared celular	151
6.5.1.2 Comparación agitador magnético vs agitador orbital (shaker)	151
6.5.1.3 Optimización del tiempo de extracción acuosa	152
6.5.1.4 Extracción acuosa a ebullición	152
6.5.2 Fraccionamiento completo de los polisacáridos de pared celular de cerezas (Capítulos 3 y 4)	152
6.6 Análisis químico	153
6.6.1 Disolución de las muestras	153
6.6.2 Determinación cuantitativa de los hidratos de carbono totales	153
6.6.3 Determinación de ácidos urónicos	154
6.6.4 Determinación del grado de metilación	155
6.6.5. Determinación cuantitativa de proteínas totales	156
6.6.6. Determinación de los azúcares componentes	156
6.6.7 Determinación de lignina, celulosa y ácidos urónicos en los AIR	158
6.6.8 Determinación de compuestos fenólicos de la pared celular	159
6.6.9 Determinación de la capacidad antioxidante de los polifenoles	161
6.7 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)	161
6.8 Análisis reológico	162
6.8.1 Ensayos de flujo	162
6.8.2 Ensayos dinámicos de oscilación	163
6.9 Caracterización funcional	164
6.9.1 Densidad aparente	164
6.9.2 Volumen específico	164
6.9.3 Densidad verdadera	165
6.9.4 Propiedades de hidratación	165
6.9.4.1 Capacidad de hinchamiento (SC)	165
6.9.4.2 Capacidad de atrapamiento de agua (WHC)	165
6.9.4.3 Capacidad de retención de agua (WRC)	166
6.9.4.4 Cinética de la absorción de agua	166
6.10 Tamaño de partícula	167
6.11 Capacidad de estabilización de emulsiones	167
6.11.1 Emulsión	167
6.11.2 Fase acuosa continua	168
6.12 Análisis estadístico	168

APÉNDICE	171
RESUMEN FINAL	181
BIBLIOGRAFÍA	187

CAPÍTULO 1

Introducción general

1.1 Pared celular

La pared celular es una estructura macromolecular compleja que rodea a la membrana plasmática de las células de bacterias, hongos, algas y plantas. Por sus propiedades estructurales y funcionales es considerada como un compartimiento extracelular que posee en funciones de sostén dando rigidez a la estructura celular y a los tejidos resultantes, interviene en la regulación osmótica a través de su función de soporte elástico de la presión de turgor (Jarvis, 2011), en la interacción con el entorno como así también en procesos de diferenciación celular durante el desarrollo y el crecimiento de las plantas (Carpita & Gibeaut, 1993). Además actúa como una barrera a la difusión de macromoléculas para alcanzar la membrana plasmática desde el exterior y constituye la barrera estructural más importante a la invasión de patógenos.

La pared celular vegetal es un compartimiento dinámico que va cambiando a lo largo de la vida de la célula. Se forma inmediatamente después de la mitosis. El material necesario para la formación de la pared se sintetiza en el aparato de Golgi, que contiene diversas enzimas encargadas de la síntesis de polisacáridos, las cuales son secretados en vesículas. En la etapa de metafase de la división celular estas vesículas se ubican en el plano ecuatorial del huso, y a medida que se van acumulando se fusionan para formar la placa celular. El primer material que se deposita es el de la **laminilla media**, formada principalmente por pectinas y representando la capa exterior que actúa como elemento de unión entre las células contiguas. En segundo lugar, y ya durante el crecimiento, se forma la **pared primaria**, que en algunas ocasiones es la única que se forma. Es una estructura compleja que contiene polisacáridos, proteínas estructurales y algunos compuestos fenólicos. Está formada fundamentalmente por microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de pectinas y glicanos entrecruzantes. Por último, en algunas células se forma la **pared secundaria**, que se sitúa entre la membrana plasmática y la pared primaria. Tiene un mayor espesor y es más rígida debido a la presencia de lignina y además contiene proteínas solubles, incluyendo enzimas (Figura 1.1).

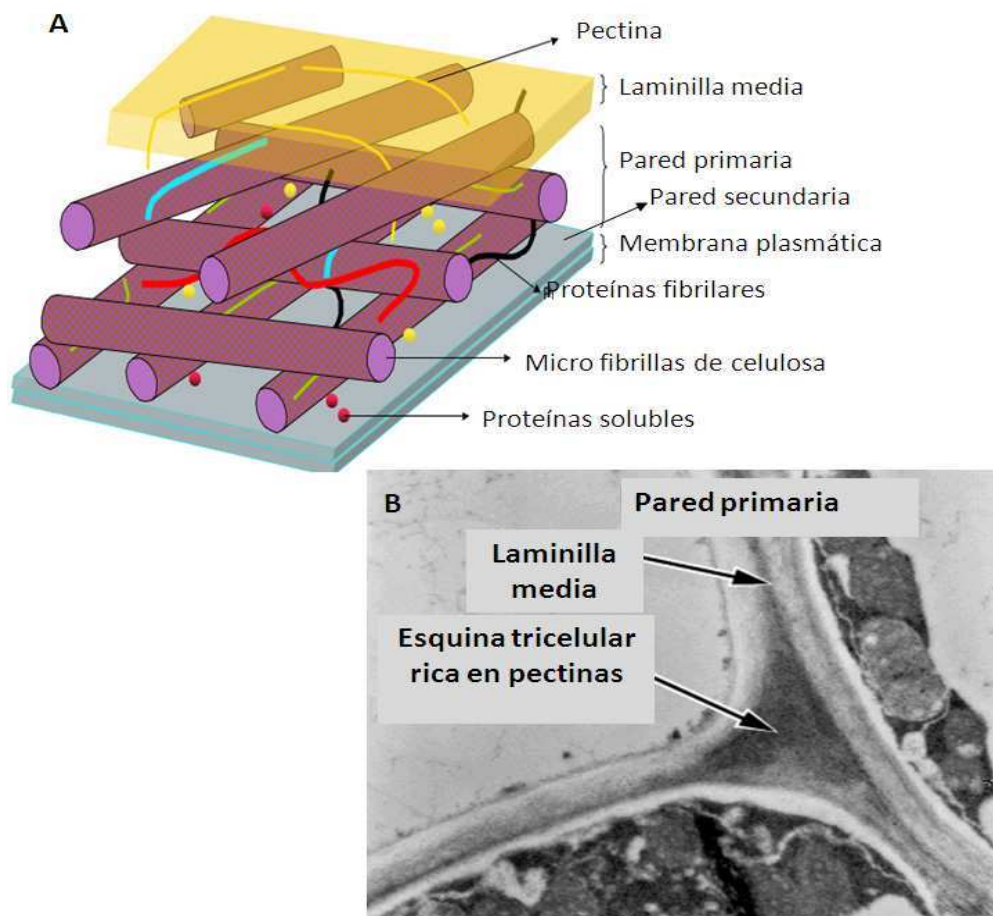


Figura 1.1. A) Esquema de la pared celular vegetal. B) Zona de unión entre células (Carpita & Mc Cann, 2000).

1.2 Componentes de la pared celular

1.2.1 Polisacáridos de la pared celular

Los polisacáridos de pared celular se suelen clasificar en celulosa, glicanos entrecruzantes (o hemicelulosas) y pectinas.

La celulosa es el polisacárido de mayor abundancia en la Tierra. Se encuentra en la naturaleza casi exclusivamente en las paredes celulares vegetales y representa el 20-30 % del peso seco de la pared celular primaria. Químicamente es un polímero relativamente simple formado por cadenas lineales de unidades de β -D-glucopiranosas unidas por enlaces

glicosídicos β (1 \rightarrow 4), con un grado de polimerización de entre 2.000 y 6.000 en las paredes celulares primarias, y llegando a más de 10.000 en las paredes secundarias (Waldron et al., 2003). Su función principal es asegurar la rigidez de la pared celular vegetal. Estas cadenas lineales se unen a otras mediante uniones hidrógeno formando de este modo estructuras cristalinas denominadas microfibrillas, las cuales contienen decenas de cadenas lineales.

En la mayoría de los casos, las fibras de celulosa están incrustadas en una matriz de otros biopolímeros estructurales, principalmente hemicelulosas y lignina, creando una estructura rígida a lo largo de la pared celular.

Los glicanos entrecruzantes fueron denominadas históricamente hemicelulosas por su parecido con la estructura de la celulosa (Carpita & Mc Cann, 2000; Scheller & Ulvskov, 2010). Están presentes a lo largo de toda la pared. Tienen en su mayoría características similares a las de la celulosa: son polisacáridos que contienen habitualmente D-glucosa, D-manosa y/o D-xilosa con enlaces β (1 \rightarrow 4) en una cadena principal relativamente larga, pero con ramificaciones cortas (Wyman et al., 2005). En general se clasifican según el azúcar principal presente en la cadena en xilanos, mananos y glucanos, siendo los xilanos y mananos los más comunes. Dependiendo de la especie vegetal, la etapa de desarrollo y el tipo de tejido, pueden encontrarse varias subclases que dependen de los monosacáridos presentes en las ramificaciones y de otros detalles estructurales: glucuronoxilanos, arabinoxilanos, mananos lineales, glucomananos, galactomananos, galactoglucomananos, β -glucanos y xiloglucanos. Dichos subtipos pueden agruparse en dos categorías generales basadas en la hidratación de las fibras. Los polisacáridos de baja hidratación (arabinoxilanos, glucuronoxilanos, xiloglucanos y mananos lineales), funcionan principalmente para estabilizar la pared celular a través de interacciones por enlaces hidrógeno con la celulosa e interacciones covalentes con la lignina. Otros glicanos entrecruzantes (galactoglucomananos, glucomananos, galactomananos y β -glucanos), son utilizados principalmente como fuente de energía extracelular y como un mecanismo de retención de agua en semillas (Wyman et al., 2005). Se ha indicado que los glicanos entrecruzantes se encontrarían asociados químicamente o entrecruzados con otros polisacáridos, proteínas o lignina (Brummell, 2006).

Por último, dentro de los polisacáridos de la pared celular se encuentran las pectinas, polímeros heterogéneos ricos en ácido D-galacturónico, generalmente unidos por enlaces α (1 \rightarrow 4). Son uno de los principales componentes de las paredes celulares vegetales, constituyendo la matriz viscosa que permite el desplazamiento o arrastre (*creep*) de las fibrillas de celulosa o de celulosa-hemicelulosa.

La mayor concentración de pectinas se encuentra en la laminilla media y disminuye gradualmente desde la pared celular primaria hacia la membrana plasmática (Ridley et al., 2001). Se depositan en las etapas iniciales de crecimiento, durante la expansión celular. Se les adjudican diversas funciones relacionadas a sus grupos funcionales cargados (carboxilo), funciones que incluyen la determinación de la porosidad de la pared celular, la modulación del pH y el balance iónico (equilibrio de Gibbs-Donnan) y la regulación de la adhesión entre células contiguas a través de la laminilla media. Además, actúan como moléculas “señal” activando la ruta de defensa de la planta ante el ataque de patógenos e insectos (Carpita & Mc Cann, 2000; Caffall & Mohnen, 2009).

Los dos constituyentes fundamentales de las pectinas son el **homogalacturonano (HG)** y el **ramnogalacturonano tipo I (RG-I)**. El **HG** (Figura 1.2) es un homopolímero lineal de ácido D-galacturónico con uniones α -(1→4), dando lugar a una estructura helicoidal, semi-flexible (Morris et al., 2010). Sus grupos carboxilo tienen distintos grados de esterificación con metanol. Los residuos no esterificados se encuentran cargados negativamente a pH fisiológico y pueden interactuar con iones Ca^{2+} dando lugar a un gel estable con otras moléculas pécticas denominado “modelo de caja de huevo” (Figura 1.3).

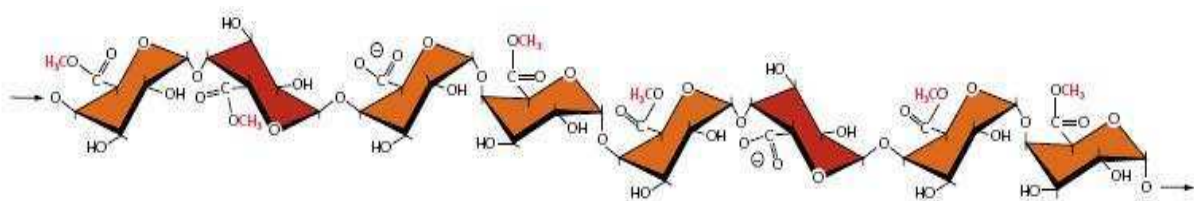
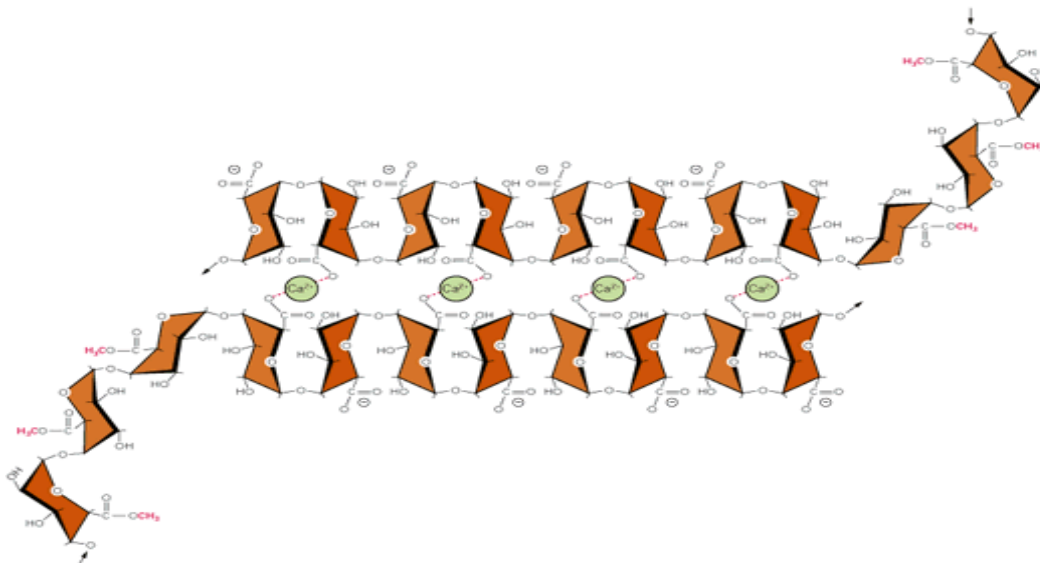


Figura 1.2. Homogalacturonano, formado por unidades de ácido D-galacturónico unidas por enlaces α -(1→4), que pueden estar esterificados con metanol en distintos grados (Carpita & Mc Cann, 2000)



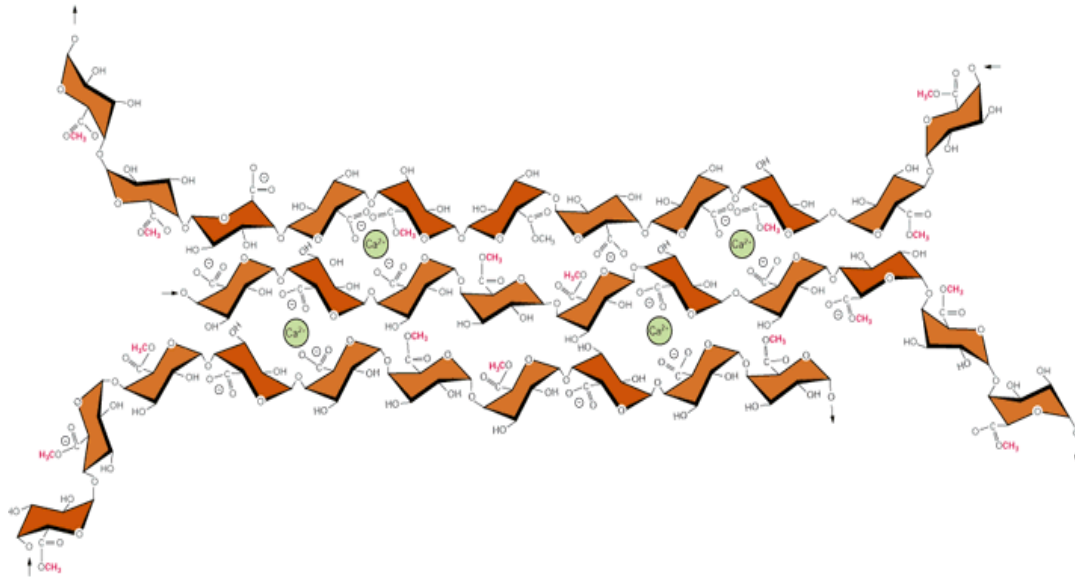


Figura 1.3. Modelo de “caja de huevo” correspondiente al entrecruzamiento mediante iones calcio entre las cadenas de homogalacturonano (Carpita & Mc Cann, 2000)

Hay dos tipos de estructuras modificadas de HG: **xilogalacturonanos (XGA)** y **ramnogalacturonanos tipo II (RG-II)**. Los XGA (Figura 1.4) tienen la misma estructura básica que los HG, pero poseen ramificaciones simples de D-xilosa sobre algunos O-3 de ácidos galacturónicos de la cadena principal.

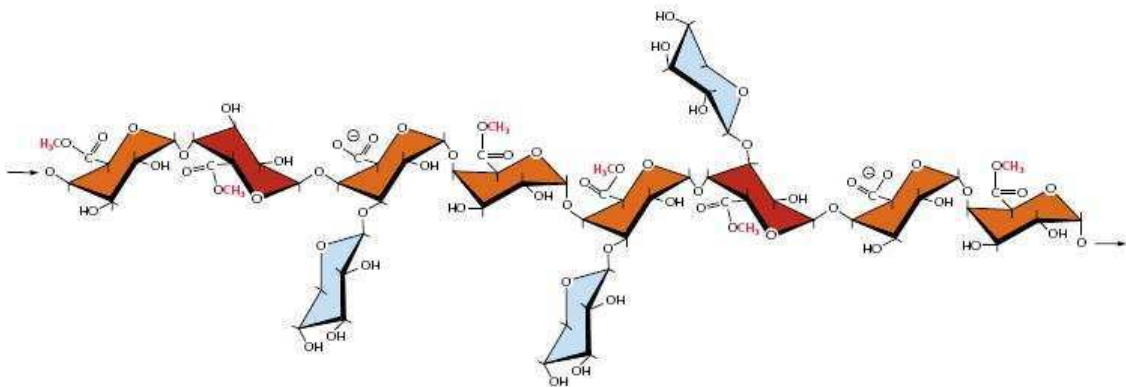


Figura 1.4. Xilogalacturonano compuesto de una estructura de ácido D-galacturónico unido por enlaces α -(1 \rightarrow 4) y ramificaciones de D-xilosa (en celeste) sobre O-3. (Carpita & Mc Cann, 2000)

Los **RG-II** se encuentran en menor abundancia en la pared. Al igual que los XGA, poseen una estructura ramificada que consta de un esqueleto de ácido D-galacturónico con enlaces α -(1 \rightarrow 4) y cuatro diferentes grupos laterales constituidos por distintos azúcares

(Figura 1.5), entre los cuales se encuentran L-ramnosa, L-fucosa, L-arabinosa, D-galactosa y ácido D-glucurónico u otros azúcares más extraños como apiosa, ácido acérico, KDO y azúcares como fucosa o xilosa O-metilados (Mohnen, 2008).

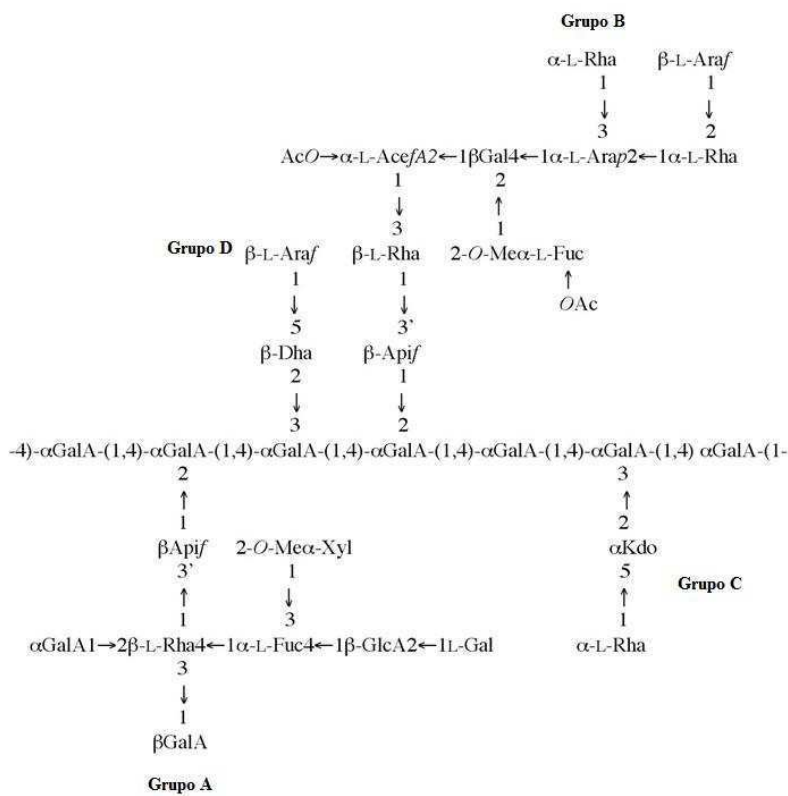


Figura 1.5. RG-II: es un polímero complejo que consta de 4 grupos de cadenas oligosacáridicas (A-D) con alrededor de 20 tipos de uniones (Mohnen, 2008).

El **RG-I** es un heteropolímero de unidades repetitivas disacáridicas de $\rightarrow 2) \text{-}\alpha\text{-L-Ram}p\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}A\text{-}(1\rightarrow$, que presenta como ramificaciones cadenas largas de otros tipos de polisacáridos tales como $(1\rightarrow 5)\text{-}\alpha\text{-L-arabinanos}$, $(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-galactanos}$ y/o arabinogalactanos tipo I (AG-I), compuesto por $(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-galactanos}$ ramificado con unidades de L-arabinosa en la posición O-3 de los residuos de galactosa, se encuentran unidos a la estructura fundamentalmente en la posición O-4 de los residuos de L-ramnosa (Figura 1.6), formándose así una cadena retorcida más flexible y globular que la de HG. Los *cores* de RG-I presentan estructuras de tipo *random coil* (Morris et al., 2010). El RG-I constituye las llamadas *hairy regions* de las macromoléculas de pectina, mientras que los HG constituyen las llamadas *smooth regions* o regiones lisas (sin sustitución lateral), siendo estructuras semi-flexibles. Este tipo de pectinas es muy abundante y a pesar de que se considera que están en una matriz independiente, hay evidencias de que presentan las cadenas laterales de arabinanos y galactanos del RG-I asociadas a xiloglucanos y a las

microfibrillas de celulosa por enlaces hidrógeno e inclusive por uniones covalentes, al menos *in vitro* (Zykwinska et al., 2005; Brummell, 2006; Coenen et al., 2007; Marcus et al., 2008; Jarvis, 2011).

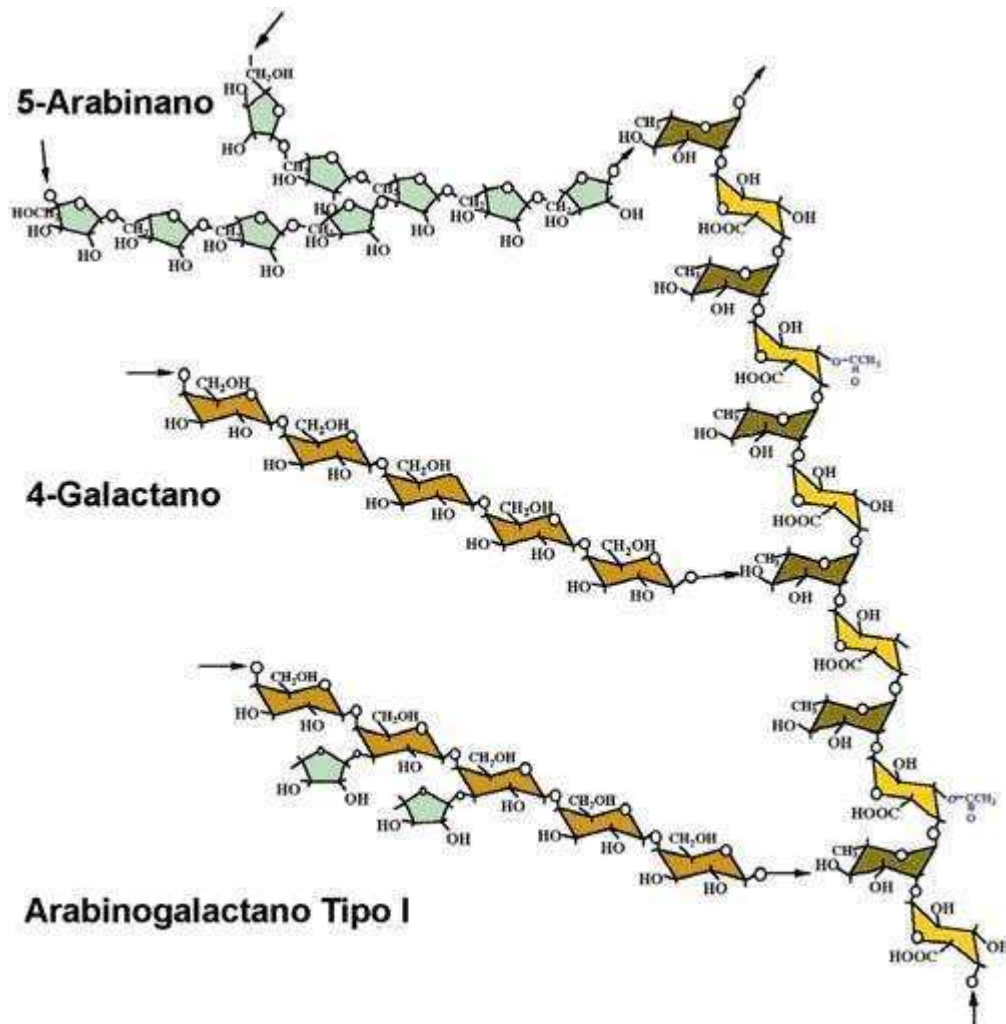


Figura 1.6. Ramnogalacturonano I (RG-I) compuesto por unidades disacáridicas repetitivas de (1→2)-α-L-Ramp-(1→4)-α-D-GalpA, presenta 3 tipos de cadenas laterales: arabinanos ramificados, galactanos y arabinogalactanos tipo I (Carpita & Mc Cann, 2000).

1.2.1.1 Estructura de las pectinas

Existen dos modelos para explicar la estructura supramolecular de las pectinas. El primero, propuesto por Schols y Voragen (1996) en el cual el cuerpo central está formado por unidades alternadas de HG y RG-I (Figura 1.7 A). El segundo, descrito por Vincken (2003) considera que las cadenas de RG-I forman el cuerpo central y tanto las cadenas de homogalacturonano como las de xilogalacturonanos se encuentran formando las ramificaciones del mismo (Figura 1.7 B). En ambos modelos se considera que las cadenas de arabinanos y galactanos están covalentemente unidas a RG-I (Coenen et al., 2007).

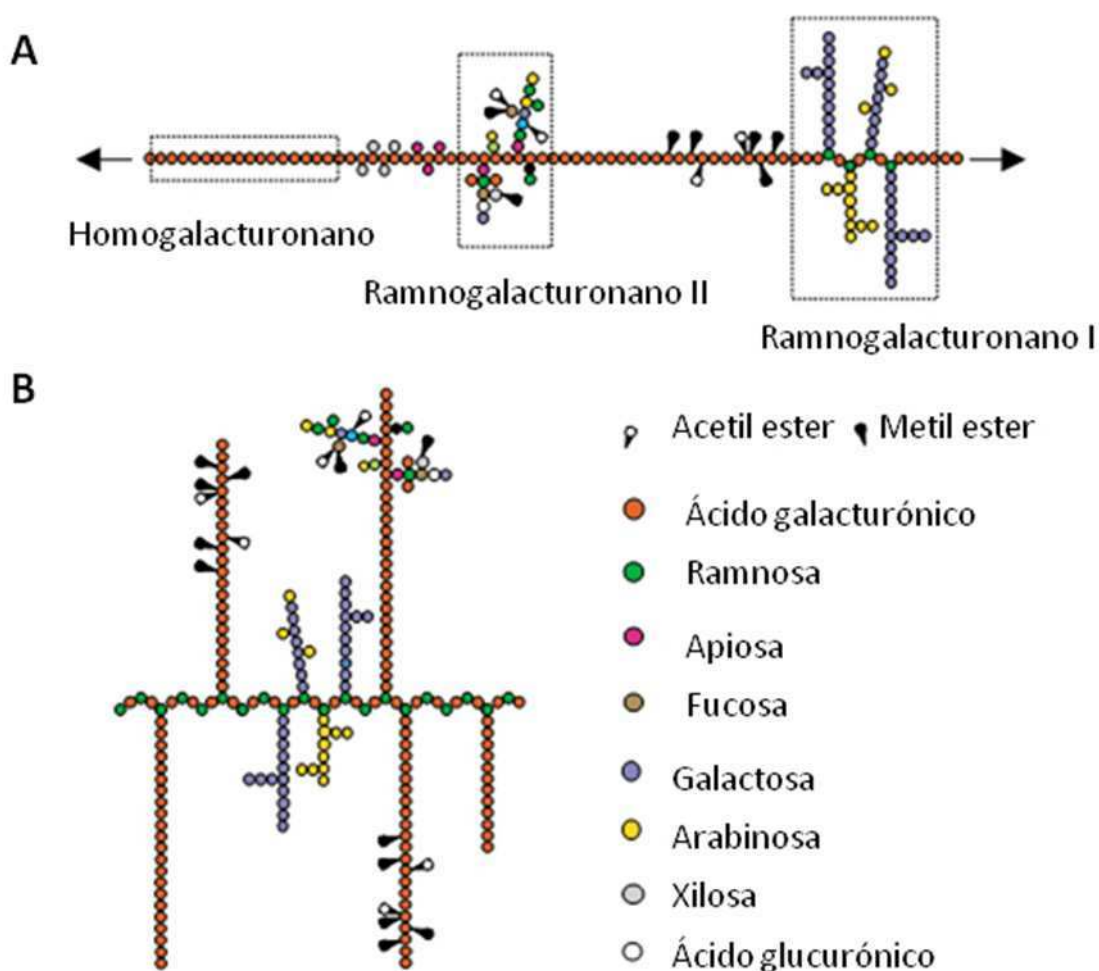


Figura 1.7. Modelos de la estructura de las pectinas: **A** modelo según Schols y Voragen, **B** modelo según Vincken (Willats, 2006).

1.2.2 Otros componentes de la pared celular

Además de estar compuesta por polisacáridos simples y otros más complejos (microfibrillas de celulosa, glicanos de matriz y pectinas), la pared celular vegetal posee otros biopolímeros complejos como proteínas estructurales, enzimas, compuestos fenólicos y lignina (Carpita & Mc Cann, 2000; Taiz & Zeiger, 2002; Goulao & Oliveira, 2008).

Los compuestos fenólicos más habituales son el ácido ferúlico y el ácido cumárico (Figura 1.8) y suelen encontrarse esterificados a la arabinosa y/o galactosa correspondientes a las cadenas laterales de las pectinas (Mc Neil et al., 1984). Se cree que el ácido ferúlico forma puentes diferulato, los cuales limitan la extensión de la pared (Hotfield et al., 1999).

Los principales tipos de proteínas identificadas en la pared celular son glicoproteínas, ricas en hidroxiprolina (extensina) y otras ricas en prolina y glicina. Además aparecen enzimas como las peroxidasas, fosfatasas, glicosilhidrolasas y deshidrogenasas (Brownleader et al, 1999). Se considera que las peroxidasas juegan un rol importante en procesos tales como los implicados en la lignificación (Egley et al., 1983) así como en la insolubilización de los complejos pectina-extensina (Jackson et al., 1999; Passardi et al., 2004). La diversidad de sustratos justifica el que la peroxidasa se encuentre involucrada en un amplio rango de procesos fisiológicos como la formación de lignina y suberina (Oudgenoeg et al., 2002), el entrecruzamiento de componentes de la pared celular, la defensa contra organismos patógenos y la elongación celular.

La lignina es la sustancia más abundante encontrada en la matriz de la pared celular **secundaria** de las plantas leñosas. Es un polímero formado por restos fenilpropanoides derivados de los alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico, unidos entre sí por enlaces éter C-O-C o C-C (Figura 1.9). Debido al carácter hidrofóbico que posee, desplaza el agua de las paredes celulares secundarias, aumentando la resistencia química y la rigidez de la pared (Brett & Waldron, 1996; Lasheras, 2004)

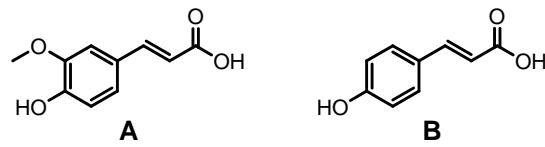


Figura 1.8. Ácido ferúlico (A) y ácido cumárico (B)

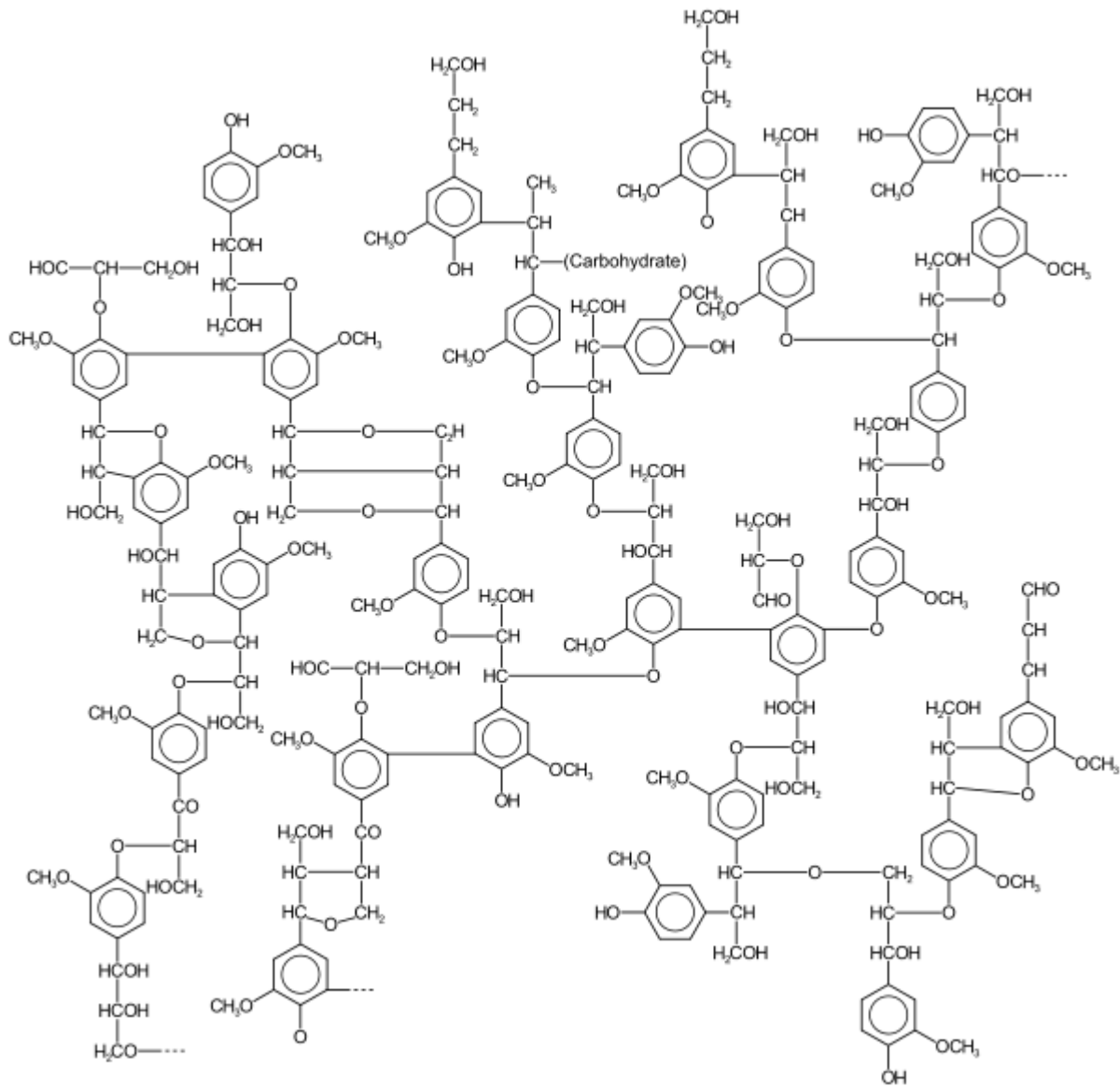


Figura 1.9. Estructura de la lignina

1.3 Modelos de la pared celular primaria

Muchas investigaciones se concentran hoy en definir la estructura de los polisacáridos individuales que representan el 90 % de la pared celular primaria. Entre los obstáculos enfrentados se cuentan la complejidad de los polisacáridos y la dificultad en el aislamiento y purificación de los polímeros individuales. Desde los años 70 se han desarrollado varios modelos para describir la estructura de la pared (Cosgrove, 2001; Brummell, 2006). En los comienzos se aceptaba la existencia de enlaces covalentes entre los componentes de la pared celular, es decir proteínas, pectinas y glicanos de matriz, y que la unión de las microfibrillas de celulosa y los xiloglucanos estaba dada por enlaces hidrógeno muy fuertes (Keegstra et al., 1973). Sin embargo, se consideraba que no se podía probar a ciencia cierta la unión covalente entre pectinas y xiloglucanos. Más tarde, Talbott y Ray (1992) presentaron el modelo multicapas (*multicoat model*) en el cual cada microfibrilla de celulosa estaría cubierta por una serie de capas de polisacáridos que hacia el exterior se encontrarían cada vez menos fuertemente unidos y el enlace entre microfibrillas se haría indirectamente por asociaciones laterales (no covalentes) entre distintas capas de polisacáridos. Otro modelo, que propusieron Ha et al. (1997), sugirió una pared estratificada donde los xiloglucanos cubrían a las microfibrillas de celulosa y a su vez las pectinas servían como espaciadores entre el complejo hemicelulosas-celulosa. En este modelo, las pectinas actuarían regulando el espesor de la pared y facilitarían el deslizamiento (*creep*) entre las capas de hemicelulosas-celulosa, controlando la extensión o elongación de la pared.

En 1993, Carpita y Gibeaut presentaron un modelo que ha sido ampliamente aceptado hasta la actualidad, el que contemplaba tanto los enlaces covalentes como los iónicos y definía tres dominios importantes que son independientes pero que interactúan entre sí en la pared primaria. Un dominio fue definido como el entramado formado por las microfibrillas de celulosa y los xiloglucanos, el cual se encuentra embebido en el segundo dominio, matriz de polisacáridos pécticos, mientras que el tercer dominio era el formado por las proteínas estructurales. Este modelo se denomina red pegajosa (*sticky network*). En este modelo, los autores diferenciaron entre dos tipos de pared celular: la de Tipo I (Figura 1.10) para dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas y la de Tipo II para poáceas y otras familias de monocotiledóneas estrechamente relacionadas.

En este caso la pared que nos va a interesar es la tipo I ya que las prunoideas que se han utilizado en este trabajo de Tesis pertenecen a la clase de las dicotiledóneas.

La pared de tipo I de Carpita y Gibeaut (1993), cuenta con diferentes estratos y está compuesta por xiloglucanos adheridos a las microfibrillas de celulosa mediante enlaces hidrógeno, los que a su vez se conectan extendiéndose hacia otros xiloglucanos produciendo así el bloqueo de las microfibrillas. Por otra parte, este arreglo de xiloglucanos y celulosa se encuentra inserto en una matriz de pectinas lo que en su conjunto controla la porosidad de la pared, dado que las cadenas helicoidales de HG pueden condensarse por entrecruzamiento con Ca^{2+} formando las **zonas de unión** (*junction zones*) entre dos cadenas antiparalelas (Braccini & Pérez, 2001). El espacio entre las zonas de unión determina la porosidad de la pared. Las unidades de ramnosa del RG-I y sus cadenas laterales interrumpen las uniones Ca^{2+} y contribuyen a la definición del poro (Caffall & Mohnen, 2009).

Cabe destacar además que las interacciones covalentes entre los componentes de la pared son un factor importante en la integridad, elasticidad y propiedades mecánicas de la pared celular. Las interacciones pueden darse entre: polisacárido-polisacárido, proteína-proteína, proteína-polisacárido, polisacárido-lignina y puentes diferulato entre las cadenas laterales del RG-I (Brownleader et al, 1999).

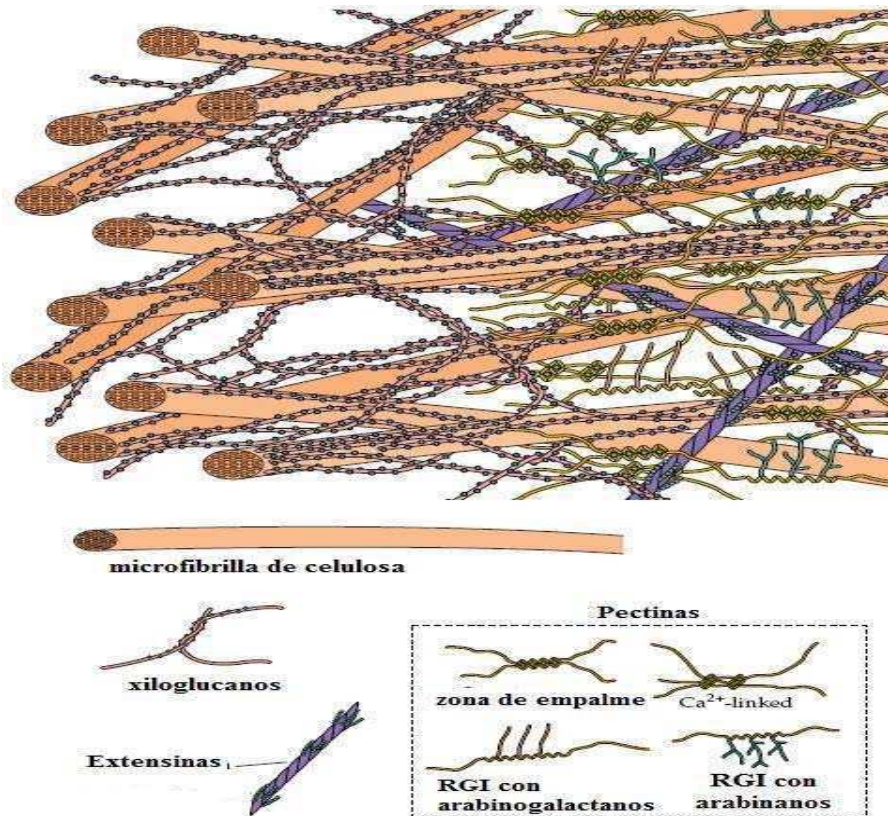


Figura 1.10. Pared celular Tipo I (Carpita & Mc Cann, 2000).

1.4 Pared celular de frutos

1.4.1 Modificaciones de la pared celular durante el crecimiento y maduración de los frutos

Numerosos cambios se producen en los tejidos de los frutos durante el proceso de maduración, entre ellos el ablandamiento debido a la desintegración de la pared celular, en tanto simultáneamente ocurre el crecimiento del fruto (Brummell, 2006).

Los polisacáridos de las paredes celulares de los frutos son generalmente hidrofílicos pero, pese a ello, muchas de estas moléculas solubles en agua forman una estructura coherente insoluble en agua dentro de la pared. Los motivos por los que esto sucede y el modo de interacción de las moléculas para acomodar los cambios necesarios para el crecimiento, maduración y senescencia de los frutos, son preguntas que hasta el presente siguen teniendo muchas respuestas no develadas.

Durante la maduración de los frutos, con el ablandamiento de la pulpa se suceden cambios en la pared celular que incluyen solubilización, despolimerización de pectinas y/o glicanos entrecruzantes, como así también la pérdida de azúcares neutros, principalmente galactosa y arabinosa (Gross & Sams, 1984; Batisse et al., 1996; Goulao & Oliveira, 2008). Estos procesos ocurren de manera diferencial en las distintas especies de frutos. Por ejemplo, las manzanas conservan su rigidez durante la maduración debido a la escasa separación entre células en comparación con el durazno, en el que el ablandamiento es mucho mayor debido al hinchamiento y pérdida de adhesión celular (Carpita & McCann, 2000). En manzanas también se ha observado que no se produce despolimerización de pectinas ni de hemicelulosas pero esto sí ocurre en duraznos (Goulao & Oliveira, 2008). En frutillas, fruto no climatérico, se ha observado la despolimerización de glicanos entrecruzantes, pero no de pectinas (Hubert et al., 1984).

Otros autores (Brummell & Harpster, 2001; Sozzi, 2004) han estudiado otros frutos como durazno, palta, caqui, tomate, melón, pimiento, frutilla, etc. y concuerdan en que es común que ocurra la despolimerización de xiloglucanos y otros glicanos de la matriz que componen junto con la celulosa la red estructural de la pared celular.

No se conoce la forma en que cada uno de los procesos contribuye a la dilatación de la pared, a la pérdida de su rigidez y a la disminución de la adherencia entre células contiguas,

aunque muchos de estos procesos se asociaron a la acción de distintas enzimas hidrolíticas de la pared celular (Brummell & Harpster, 2001; Rose et al., 2003; Sozzi & Civello, 2005). Durante la maduración, la acción combinada de diferentes enzimas hidrolíticas sobre los componentes de la pared celular produce una disminución del contenido de dichos componentes, su solubilización o despolimerización, con eventual síntesis *de novo* de componentes nuevos, posiblemente de menor peso molecular. En particular, las pectinas experimentan un aumento en su solubilidad (disolución de la laminilla media) debido a una disminución de su masa molecular o de sus interacciones covalentes y no covalentes con los demás componentes de la pared celular. La disminución y relajación de esta barrera mecánica no sólo reduce la firmeza del fruto sino que facilita la acción de los patógenos, particularmente en estadíos de madurez avanzados.

Si bien la biología molecular ha jugado un papel de importancia creciente en la investigación sobre la pared celular y el mejoramiento de la calidad textural de los frutos, los efectos de la supresión de la actividad de las enzimas de pared probaron no ser predecibles hasta el momento (Sozzi & Civello, 2005). Más aún, desde 1988, año en que se dio a conocer el fracaso de la hipótesis de la endo-poligalacturonasa como única enzima responsable del ablandamiento de los frutos, la biología molecular sólo logró avances acotados en la comprensión de la arquitectura de la pared celular y/o de los mecanismos del ablandamiento de los frutos (Redgwell & Fischer, 2002). A pesar de sus limitaciones, el análisis de los distintos componentes de la pared celular continúa siendo una de las principales herramientas de aproximación para la comprensión de la dinámica de dicha pared y para el diseño de estrategias apropiadas para la conservación de los frutos durante la postcosecha.

En la mayoría de los estudios citados anteriormente, se utilizaron cultivares que no tienen relevancia comercial en el mercado internacional. Hoy, existen variedades cultivadas de comportamiento contrastante en relación a la pérdida de firmeza, cuyo análisis permitiría verificar cuáles cambios en la pared celular se asocian más marcadamente con el ablandamiento. Asimismo, el desarrollo de nuevas técnicas para el análisis de los componentes de pared celular (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991; Brummell et al., 2004) ha abierto posibilidades para estudiar más profundamente los cambios que se producen.

1.4.2 Importancia de la pared celular en la textura de los frutos.

En las últimas décadas se prestó particular atención a los cambios texturales que ocurren en los frutos. Si bien no se considera que la firmeza sea un factor más importante que el color o el aroma para la calidad final de estos productos, un ablandamiento prematuro de los frutos virtualmente asegura que los mismos se deterioren rápidamente durante su vida en postcosecha, sucumbiendo a los daños mecánicos y a la acción de agentes patógenos, limitando sus posibilidades de transporte y almacenamiento, además afectando la comerciabilidad directa del fruto ya que el comprador puede rechazarlo.

Los factores que influyen en la firmeza de los frutos pueden clasificarse en dos grandes grupos (Harker et al., 1997): A) aquéllos relacionados con la producción (la variedad cultivada, el grado de madurez a la cosecha, las prácticas culturales como la fertilización, la aplicación de reguladores del crecimiento y la forma y régimen de riego, la exposición a la luz solar, la exposición a distintas formas de estrés, etc.); B) los factores relacionados con la estructura del tejido. Entre estos últimos se destacan particularmente la composición química de la pared celular y la actividad de enzimas hidrolíticas de la pared, si bien hay influencia de otros factores anátomo-histológicos, de la presión de turgencia e integridad de la membrana celular. Existe suficiente evidencia para asegurar que las modificaciones en la firmeza que tienen lugar en los frutos, y que con frecuencia los inhabilita para su comercialización, son provocadas principalmente por las modificaciones que se producen en los polisacáridos de la pared celular (Carpita & McCann, 2000; Brummell, 2006; Goulao & Oliveira, 2008).

La integridad de la pared celular de los frutos puede atribuirse a la adhesión entre paredes de células contiguas y a la resistencia de la pared primaria. Se considera a la adhesión entre paredes de células contiguas como uno de los factores más críticos por su influencia en la percepción de la textura de los frutos. Según una clasificación usual (Bourne, 1979), los frutos de climas templados se agrupan en: I) los que se ablandan otorgando una textura fundente (ciruela, kiwi, tomate), II) aquéllos que se ablandan sólo moderadamente, reteniendo una textura “quebradiza”, que otorga una sensación de fractura al ser cortada en la boca (manzana). En el grupo I, la adhesión entre células es pobre, y el tejido suele separarse por el desplazamiento relativo de unas respecto de otras, con mínima ruptura de las mismas. En el grupo II la adhesión entre células es relativamente fuerte y la separación

de los tejidos se produce principalmente por ruptura de las paredes celulares. La pared celular y la laminilla media trabajan juntas en el control del evento por el cual el tejido vegetal sufre deformación mecánica y fractura durante la masticación (Waldron et al., 1997). La resistencia relativa de estas dos estructuras intercelulares determina la percepción de jugosidad (cuando la laminilla media es más resistente) o de arenosidad (cuando la pared celular es la más resistente frente al esfuerzo aplicado) (Szczesniak & Ilker, 1988).

El análisis por microscopía electrónica permitió un avance significativo en la comprensión del comportamiento de la pared celular de los frutos, de la dilatación o ensanchamiento que experimentan las paredes de las distintas especies de los mismos, tanto *in vivo* como luego del aislamiento de pared celular y de su tratamiento *in vitro* (Redgwell et al., 1997a). En frutos que muestran textura fundente (grupo I), la dilatación o “hinchamiento” de la pared celular resulta pronunciada, particularmente *in vitro*. En cambio los frutos con textura quebradiza (grupo II) no muestran dilatación o hinchamiento de la pared celular con la maduración. El kiwi tiene un comportamiento inusual ya que manifiesta una dilatación marcada de la pared celular tanto *in vivo* como *in vitro*, en tanto que las ciruelas, la frutilla, el tomate y el caqui (todos pertenecientes al grupo I) muestran solamente una dilatación del material de pared celular *in vitro*. Aunque la cereza no fue incluida en ese estudio, cabe destacar que algunas variedades que tienen una textura suave en la madurez, se conservan mejor que aquéllas de textura quebradiza (Batisse et al., 1996b), lo que sugiere cambios en la estructura interna de la pared celular misma.

1.4.3 Antecedentes sobre estudios de pared celular de frutas en nuestro laboratorio

En nuestro laboratorio desde hace varios años se está trabajando en el estudio de los polisacáridos de las paredes celulares de diferentes frutas. En su trabajo post-doctoral, la Dra. N.M.Andrea Ponce estudió los cambios que sufren los polisacáridos de las paredes celulares de ciruelas japonesas (*Prunus salicina Lindl*) durante el crecimiento y desarrollo del fruto. La conclusión de su estudio fue que la pérdida de firmeza del fruto en los estadios tempranos no tiene correlación con la despolimerización de las pectinas, pero en los últimos estadios de crecimiento, sí está asociada con una fuerte despolimerización de las pectinas así como con la disminución de la relación Ara/Gal de las pectinas débilmente unidas (Ponce et al., 2010). Por otra parte, la Ing. Agr. Dolores Raffo durante su trabajo de tesis doctoral,

estudió los cambios producidos en la composición de la pared celular de peras Bartlett (*Pyrus communis L.*) en tres estadios de madurez. Ella observó que un desequilibrio en la degradación de los ácidos urónicos, una disminución de la despolimerización de las cadenas principales de pectinas junto con la pérdida de arabinosa de las cadenas de RG-I y otras modificaciones, pueden llevar a producir una textura anormal y arenosa en los frutos maduros (Raffo et al., 2012). Además analizó los cambios en la composición de la pared celular de peras en relación con su exposición a la luz. Los resultados de este trabajo mostraron que las condiciones de luz solar en precosecha afectan la textura de peras 'Bartlett' y proporcionan una idea sobre el modo en que las condiciones ambientales pueden modular la plasticidad de la pared celular (Raffo et al., 2011). Dicha tesis doctoral fue presentada para su evaluación en Octubre de 2012.

Durante su doctorado, la Dra. Paula Alayón Luaces estudió los cambios en la composición de la pared celular de callos de manzana expuestos a diferentes reguladores del crecimiento vegetal (RCV). Se demostró que los mismos son capaces de generar diferencias significativas en la composición de la pared celular en lo que respecta a la proporción relativa de los azúcares constitutivos de la pared celular primaria, así como en el tipo de estructura y distribución molecular de los polisacáridos (Alayón Luaces et al., 2012).

La Mag. Gloria Salato analizó en su Tesis de Maestría los cambios en la pared celular durante la ontogenia en dos cultivares de cerezas dulces (*Prunus avium L.*) de firmeza contrastante tales como Sweetheart (de frutos firmes) y Newstar (de frutos blandos). Se determinó que durante la ontogenia de los frutos blandos, se produjo la pérdida de ácidos urónicos (solubilización), despolimerización de glicanos entrecruzantes y pérdida de azúcares neutros, en tanto que en los frutos firmes sólo se observó la despolimerización de glicanos entrecruzantes y la pérdida de azúcares neutros. Por lo tanto, en frutos blandos la solubilización de pectinas podría ser el mayor causante del ablandamiento, mientras que los frutos firmes presentaron una estructura péctica más conservada durante la ontogenia, sin variaciones en el contenido de cadenas laterales. También se estudió la incidencia del daño mecánico en la estructura de la pared celular, observándose nuevamente variaciones significativas (Salato, 2012).

Estos trabajos permitieron demostrar que los cambios producidos en los polisacáridos de la pared celular bajo diferentes condiciones suelen ser muy sutiles y variables, por lo que es difícil poder generalizar los resultados de una especie y cultivar a otros.

1.5 La pared celular como alimento y fibra

La pared celular afecta directamente la calidad de la materia prima de los alimentos tanto para humanos como para animales así como también de textiles, madera y papel. La modificación de los constituyentes de la pared celular es un objetivo en la industria alimentaria, agrícola y biotecnológica. En el presente, la industria alimentaria utiliza arabinogalactanos y pectinas como gomas y agentes gelificantes. Las propiedades funcionales de las pectinas pueden modificarse por la actividad de pectin metilesterasas de orígenes diferentes (Cameron et al., 2011). Actualmente, la pared celular de frutas y vegetales es reconocida como un importante componente en la dieta ya que se ha demostrado que ayuda a prevenir tanto enfermedades coronarias como así también cáncer de colon y diabetes. Por ejemplo, las pectinas son una parte natural de la dieta humana que aunque no contribuyen significativamente en la nutrición, actúan como fibra dietaria soluble, reduciendo el nivel de colesterol en sangre mediante el aumento de la viscosidad en el tracto intestinal y, por lo tanto, conduciendo a una disminución de la absorción del colesterol (Srivastava & Malviya, 2011).

El avance de la biotecnología permite la investigación de enzimas (poliglucasas, polimetilesterasas e hidrolasas) involucradas en el metabolismo de la pared celular. El objetivo es producir cultivos con las características deseadas para mejorar así el valor comercial.

Los resultados de los intentos de cambiar un solo parámetro del metabolismo de la pared rara vez son los esperados debido a la complejidad de la misma y a la habilidad de las células de la plantas para adaptarse a estos cambios. Los progresos en el conocimiento del metabolismo de la pared celular seguramente permitirán que los avances biotecnológicos sean más exitosos.

1.6 Objetivos

El objetivo general de esta Tesis es el estudio de los polisacáridos de las paredes celulares de prunoideas, y su relación con diferentes factores (variedad, grado de madurez, diferentes patologías) con la intención final de estudiar la incidencia de esos factores en la proporción de diferentes pectinas y glicanos entrecruzantes, en el peso molecular de las mismas y en los distintos factores estructurales que pudieran verse afectados (grado de metoxilación de galacturonanos, grado de ramificación en arabinanos, variaciones estructurales de configuración de unión o diferencias de azúcares constituyentes, funcionalidad, etc), así como también en las propiedades reológicas y funcionales (capacidad de hidratación, de retención de agua, etc.) de los polisacáridos (solubles e insolubles) aislados en las distintas instancias de la caracterización química, en vista también de su utilidad industrial.

CAPÍTULO 2

**Métodos extractivos y análisis químico -
funcional de pectinas débilmente unidas
de la pared celular.**

2.1 Introducción

El Código Alimentario Argentino define a la pectina dentro de los aditivos como un polímero constituido esencialmente por unidades de ácido galacturónico parcialmente esterificado con metanol que se obtiene por extracción de materias primas vegetales (CAA, 2012). Según la American Chemical Society (ACS), las sustancias pécticas se clasifican en 4 grupos principales: protopectina, ácido péctico, ácido pectínico y pectina. Mientras que las protopectinas son insolubles en agua, las otras tres son parcial o totalmente solubles en agua. Alkorta et al. (1998) y Endre et al. (2005) clasificaron a las pectinas según su naturaleza química (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Clasificación y definición de pectinas

Descripción	Característica
Protopectina	Polímero de ácido galacturónico no metilado, se encuentra en frutas inmaduras.
Ácido pectínico	Polímero de ácido galacturónico metilado
Ácido péctico	Derivado desmetilado del ácido pectínico de cadena corta, se encuentra en frutas muy maduras
Pectato	Sales del ácido péctico.
Pectina	Ácido poligalacturónico parcial o completamente metilesterificado.
Pectinato	Sales del ácido poligalacturónico no completamente metilesterificado.
Sustancias Pécticas	Término colectivo de las sustancias mencionadas arriba.

Desde el punto de vista comercial, la definición exacta de la pectina como se la utiliza en las industrias de alimentos y farmacéutica ha variado a lo largo de los años. Según May (1990), la diferencia con otros polisacáridos que contienen unidades de ácido galacturónico es que las sustancias pécticas contienen cantidades importantes de diversos azúcares

neutros; por el contrario, las pectinas comerciales se caracterizan por un alto contenido de ácido galacturónico y esto se ha vuelto parte de la definición legal para pectina utilizada como aditivo o para propósitos farmacéuticos. Los requerimientos típicos son un mínimo de 65 % de ácido galacturónico calculado sobre base seca, libre de cenizas y de azúcares (CAA, 2012). Más allá del ámbito alimentario, se habla de pectinas aún con cantidades mucho menores de ácido galacturónico. De acuerdo con May (1990), una característica esencial de una pectina útil es su poder de gelificación.

2.1.1 Características químicas de las pectinas

Como se vio en el Capítulo 1, las pectinas son un grupo de polisacáridos complejos que se encuentran principalmente en la laminilla media de la pared celular de las plantas superiores.

Consisten principalmente en polímeros ricos en ácido D-galacturónico, pueden contener cantidades significativas de L-ramnosa, L-arabinosa, y D-galactosa, así como otros 13 monosacáridos diferentes en menor concentración (Vincken et al., 2003). Como fue previamente mencionado, existen cuatro tipos de estructuras pécticas diferentes: HG, RG-I y RG-II y xilogalacturonanos (XGA). Estas diferentes estructuras se encuentran covalentemente unidas formando así el complejo péctico o macromolécula completa de pectina. Sin embargo, continúa en discusión la forma en la cual los diferentes bloques constituyentes mencionados se hallan ubicados unos en relación a los otros en el complejo macromolecular (Yapo, 2011).

Como ya se indicara en el Capítulo 1, las pectinas son elementos estructurales de las paredes celulares y regiones intercelulares de las plantas superiores, donde funcionan como agentes hidratantes y materiales cementantes de células contiguas, siendo además la matriz viscosa que permite el deslizamiento de las macromoléculas de celulosa, durante la elongación celular.

2.1.2 Propiedades funcionales de las pectinas

Entre las propiedades funcionales de las pectinas se encuentran su capacidad de hidratación (Jarvis, 2011) y de relacionarse entre sí mediante interacciones físicas, esto es, no covalentes, incluyendo principalmente enlaces de hidrógeno pero también interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Estas propiedades dependen de las características macromoleculares como el peso molecular y su distribución, grado de esterificación con metanol (DM) y acetilación (DA), distribución de las cadenas de HG (también llamadas regiones lisas o *smooth regions* en el polímero, como así también de la frecuencia de las interrupciones (“kinks”) de ramnosa que constituyen las regiones desordenadas de RG-I de estos biopolímeros (Lapasin & Pricl, 1995; Willats et al., 2006; Yapo, 2011).

Se ha determinado que el tamaño y la distribución de los bloques demetilados de HG dan como resultado pectinas con diferentes propiedades reológicas y reactividad frente al calcio, incluso para pectinas con el mismo grado de metilación (Guillotín et al, 2005; Willats et al., 2006; Luzio y Cameron, 2008)

Usualmente, el grado de metilación (DM) se expresa como moles de metanol presentes por cada 100 moles de ácido galacturónico. Cuando el DM es 50 o mayor, las pectinas se llaman “de alto metoxilo” (HM), mientras que el término “bajo metoxilo” (LM) suele indicar un $DM < 50$ (Schols & Voragen, 2003). Por lo tanto, la metil-esterificación del HG ha sido sujeto de numerosas investigaciones dado que determina en grado decisivo el tipo de aplicación industrial de la pectina: las pectinas de HM gelifican a pH ácido en presencia de azúcar, mientras que las pectinas de LM gelifican a pH algo mayor y en presencia de iones calcio. A su vez, la acetilación en el O-2 y O-3 produce impedimento estérico y, en consecuencia, inhibe la habilidad de las pectinas de complejar cationes divalentes y, de ese modo, modifica sus propiedades asociativas y, por lo tanto, también las funcionales.

Aparentemente, el patrón de metil-esterificación o, más bien, el patrón de distribución de los grupos carboxilo desmetilados (aniónicos) en bloque o al azar, es también crítico en la determinación de las propiedades reológicas, lo cual impacta en las propiedades de agregación y de constitución de la red polimérica (Fernández, 2001; Schmelter et al., 2002; Willats et al., 2006). Más aún, las propiedades de gelificación de las pectinas están influenciadas por la longitud de sus ramificaciones laterales y por el grado de acetilación. Si las ramificaciones no tienen la longitud requerida para “enredarse”

(*entangle*), se observa una disminución en la viscosidad por problemas estéricos. En consecuencia, su volumen hidrodinámico es más pequeño, lo que culmina afectando a su viscosidad (Schmelter et al., 2002).

La hidrofobicidad y la interacción entre las macromoléculas mediante uniones no covalentes origina redes de pectinas que pueden ser más o menos transitorias y por lo tanto pueden comportarse como espesantes en soluciones acuosas o en emulsiones (Voragen et al., 2009), gelificar (Fissore et al., 2012) o formar películas después de la deshidratación (De'Nobili et al. 2013). Además las pectinas tienen un alto potencial como materiales poliméricos hidrofílicos para la liberación controlada de drogas (Beneke et al., 2009)

2.1.3 Métodos de extracción de pectinas

La composición, estructura y propiedades fisiológicas de las pectinas están inevitablemente influenciadas por las condiciones de extracción así como por la fuente, lugar y muchos otros factores (Fernandez, 2001; Garna et al., 2007). Por lo tanto, los materiales extraídos serán polidispersos (rango de pesos moleculares y tamaños) y polimoleculares (diversidad de estructuras químicas) (MacDougall et al., 2004). La fuente de pectina más antigua es el residuo seco (*pomace*) de manzana y la cáscara de cítricos, residuos de la extracción del jugo (Joye & Luzio, 2000). No obstante otras fuentes vegetales han sido estudiadas como potenciales fuentes de pectinas, por ejemplo, la piel del maracuya (Kulkarni & Vijayanand, 2010). Las sustancias pécticas constituyen 0,5 – 4,0 % del peso fresco del material vegetal lo cual implica aproximadamente un 35 % del peso seco (Faravash & Ashtiani, 2008).

Todas las condiciones de extracción modifican las sustancias pécticas hasta cierto punto ya que para permitir la extracción, la red de pectina debe ser perturbada (Endre et al., 2005). Las pectinas han sido extraídas del material de la pared celular con diversos agentes, como agua o soluciones buffer frías y/o calientes, enzimas, soluciones de agentes quelantes frías y/o calientes, ácidos diluidos en caliente y con hidróxido de sodio diluido frío (Garna et al., 2007).

Utilizando soluciones acuosas neutras o ligeramente ácidas, las moléculas de pectinas pueden ser parcialmente solubilizadas sin degradación a partir de los tejidos vegetales obteniendo pectinas débilmente unidas, pero algunas fracciones pécticas no son extraíbles de esta manera (Faravash & Ashtiani, 2008); en general, los tejidos vegetales poseen una

pequeña cantidad de pectina extraíble con agua (Fry, 1986). La extracción con agentes quelantes, donde se obtienen pectinas que estaban iónicamente unidas en la pared celular, tiene la desventaja de que es difícil remover los quelatos residuales. La extracción alcalina podría disminuir el DM, grado de acetilación, la ferulización y la longitud de la cadena principal de ácido galacturónico por β -eliminación, es decir generar artificios no presentes originalmente en el sistema. La mayor cantidad de pectina se obtiene generalmente mediante extracción con soluciones acuosas ácidas y calientes.

Los enlaces glicosídicos entre los ácidos urónicos son considerablemente estables frente a la hidrólisis; en cambio, las uniones arabinofuranosilo son débiles en condiciones ácidas. Esta diferencia es utilizada en la extracción ácida, que escinde algunas cadenas laterales de azúcares neutros (*hairy regions*), que son responsables de la interacción con la celulosa mediante enlaces físicos del tipo entanglements (enredos) y enlaces hidrógeno, o bien covalentes, fijando la pectina a las paredes celulares primarias (Vincken et al., 2003; Zykwincka et al., 2005). Los grupos éster (grupos acetato y galacturonatos de metilo) son parcialmente hidrolizados por el procedimiento de extracción, con lo cual se obtienen pectinas con menor grado de esterificación (Endre et al., 2005). Así, disminuyendo el pH, la liberación de las moléculas de pectina de la pulpa mejora (se rompen las interacciones de las pectinas a las fracciones de hemicelulosa). Por otra parte, este procedimiento reduce el peso molecular de las moléculas de pectina. El producto que se obtiene se compone de una mezcla de pectinas de distintos pesos moleculares y grado de esterificación (Joye & Luzio, 2000). La información sobre pesos moleculares publicada en literatura varía significativamente entre 4×10^4 hasta más de 4×10^6 Daltons. Esta variación no sólo es influenciada por la materia prima, el tipo de tejido vegetal y las condiciones de extracción sino también por el método analítico mismo (Endre et al., 2005). Los pesos moleculares promedio son típicamente del orden de $1,4 \times 10^5$ Da (Joye & Luzio, 2000).

Comercialmente las pectinas se extraen tratando al material crudo con ácido mineral diluido caliente a $\text{pH} \approx 2$. El tiempo de la extracción varía según el material crudo, el tipo de pectina deseada y de un fabricante a otro (May, 1990; May, 2000). La extracción industrial rinde 10 a 15 % de pectina con alto grado de esterificación (≈ 80 %) a partir de residuos de manzana y 30 a 35 % de pectina a partir de cáscara de limón o lima.

Hay numerosas investigaciones sobre los métodos de extracción, la mayoría se basa en variaciones en las condiciones de tiempo, temperatura, pH y tipo de ácido para la extracción. Se ha demostrado que las condiciones de extracción tienen importantes efectos en las características de las pectinas extraídas.

2.1.3.1 Antecedentes de extracciones acuosas de pectinas

Es sabido que con agua a temperatura ambiente se extraen pectinas de la pared celular débilmente unidas. En estas condiciones se preservan los enlaces covalentes, se mantienen en el residuo las pectinas unidas mediante iones Ca^{2+} y no hay β -eliminación (Fry, 1986). La literatura muestra la ejecución de este paso de extracción durante diferentes períodos de tiempo, por ejemplo. 2 h (Ng & Waldron, 1997; Femenia et al., 2000), 12 h (Manganaris et al., 2008), 16 h (Sozzi et al. 2002; Raffo et al., 2011) y 24 h (Ponce et al., 2010). En algunas ocasiones, se ha obviado el paso de la extracción acuosa, utilizando directamente agentes quelantes de calcio (Brummel et al., 2004). De esta forma se extraen conjuntamente tanto las pectinas débilmente unidas como aquellas unidas mediante puentes de iones calcio. También se han realizado extracciones acuosas a diferentes temperaturas como por ejemplo 4 h a 30 °C de la pared celular de tomates (Gross & Wallner, 1979), a 100 °C durante 5 min a partir de residuos insolubles en alcohol de zanahorias (Sila et al., 2006) y brócolis (Houben et al., 2011). Se concluyó que la mayor liberación de pectinas se logró a 37°C durante 24 h (Donaghy & McKay, 1994).

2.1.4 Características reológicas de las pectinas

Si bien resulta bastante habitual que las pectinas extraídas se caractericen químicamente, muy pocas veces se estudia su performance reológica, la cual está relacionada con la función biológica que cumplen y con su potencial aplicación, ya que son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria como ingredientes funcionales y su principal aplicación es justamente el control del comportamiento reológico de la fase acuosa. La incidencia de la estructura química de los polisacáridos es de primordial importancia en aquellas propiedades en solución.

Como se ha dicho, las pectinas constituyen la matriz de las paredes celulares, tienen la capacidad de hincharse en agua y, por lo tanto, de alterar el flujo de agua, pudiendo ser utilizadas como espesantes y gelificantes (Zsivanovits et al., 2004). Los geles de pectinas de HM se estabilizan fundamentalmente mediante puentes de hidrógeno e interacciones

hidrofóbicas (Lapasin & Pricl, 1995). Contrariamente, las pectinas de LM (que obviamente tienen más grupos carboxilos libres) pueden formar geles mediante interacciones iónicas con cationes divalentes (usualmente Ca^{2+}) formando una estructura del tipo de las denominadas “cajas de huevos” (ver Capítulo 1) que forman los alginatos con Ca^{2+} (Braccini & Perez, 2001). Estas zonas de unión (*junction zones*) son también estabilizadas por puentes de hidrógeno e incluyen moléculas de agua en la esfera de coordinación del Ca^{2+} (Braccini & Pérez, 2001), agua que se encuentra fuertemente retenida, no congelable (Ping et al., 2001).

Las pectinas generalmente presentan cadenas con uniones de escasa flexibilidad, lo que resulta en estructuras altamente extendidas, con grandes volúmenes hidrodinámicos y consecuentemente buenas propiedades viscosantes (Willats et al., 2006).

Se sabe que la viscosidad aumenta con la concentración del polímero, en este caso, de las pectinas. También aumenta la viscosidad con el peso molecular del polímero, siempre que se considere una serie químicamente homóloga del mismo (Lapasin & Pricl, 1995; Srivastava & Malviya, 2011).

En esta primera parte de la Tesis se trabajó con pectinas extraídas a partir de ciruelas japonesas (*Prunus salicina*) variedad “Roysum”.

La ciruela es la fruta del ciruelo, nombre común a varias especies arbóreas pertenecientes a la familia Rosaceae, dentro de la subfamilia Prunoideas y del género *Prunus*, al igual que los árboles que producen cerezas, damascos y duraznos. El fruto de las prunoideas se caracteriza por tener un mesocarpio carnoso que rodea al endocarpio leñoso (carozo) que posee una única semilla en su interior (Figura 2.1).

La ciruela es la fruta de carozo con mayor diversidad taxonómica (Okie, 2008). Existen alrededor de 42 especies diferentes, pero la mayoría de las ciruelas comerciales actualmente se clasifican en dos grupos: el tipo europeo hexaploide ($2n = 6x = 48$) y el tipo japonés o asiático diploide ($2n = 2x = 16$) como por ejemplo *Prunus salicina* Lindl.

Las ciruelas japonesas se cultivan principalmente para consumir frescas y son consideradas como las más comunes del mercado en Estados Unidos, siendo las más populares en Japón, de donde proceden.

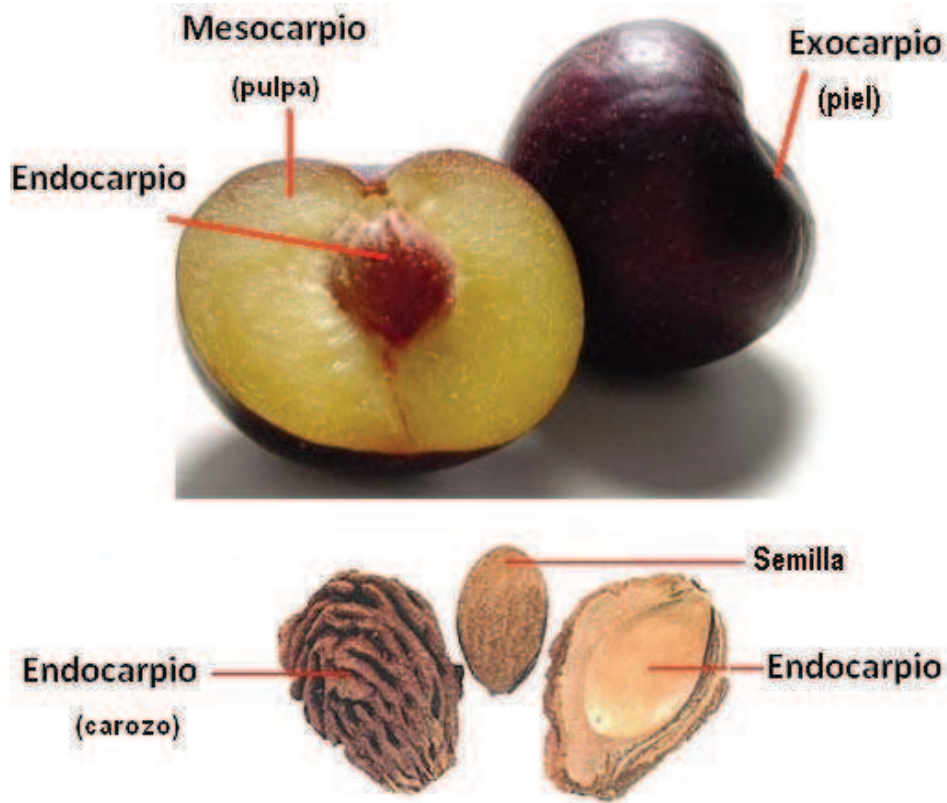


Figura 2.1. Esquema del fruto de prunoideas

2.2 Objetivo

El objetivo de esta primera parte del trabajo de investigación es estudiar y analizar la manera en que diferentes condiciones de extracción acuosa (tiempo y temperatura) de pectinas débilmente unidas afectan las características químicas y reológicas de los productos extraídos.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Extracción de pectinas solubles en agua

Se trabajó con ciruelas japonesas (*Prunus salicina* Lindl. variedad 'Roysum') maduras, eligiendo los ejemplares con una firmeza acotada entre 5 y 10 N.

Las paredes celulares obtenidas por tratamiento del material con etanol y acetona (Ver Capítulo 6), se extrajeron luego con agua a temperatura ambiente durante 24 h tanto con agitador magnético como con agitador orbital (*shaker*). Los resultados (Tabla 2.2) muestran que ni el rendimiento ni la composición de los extractos obtenidos se vieron afectados por el mecanismo de agitación utilizado.

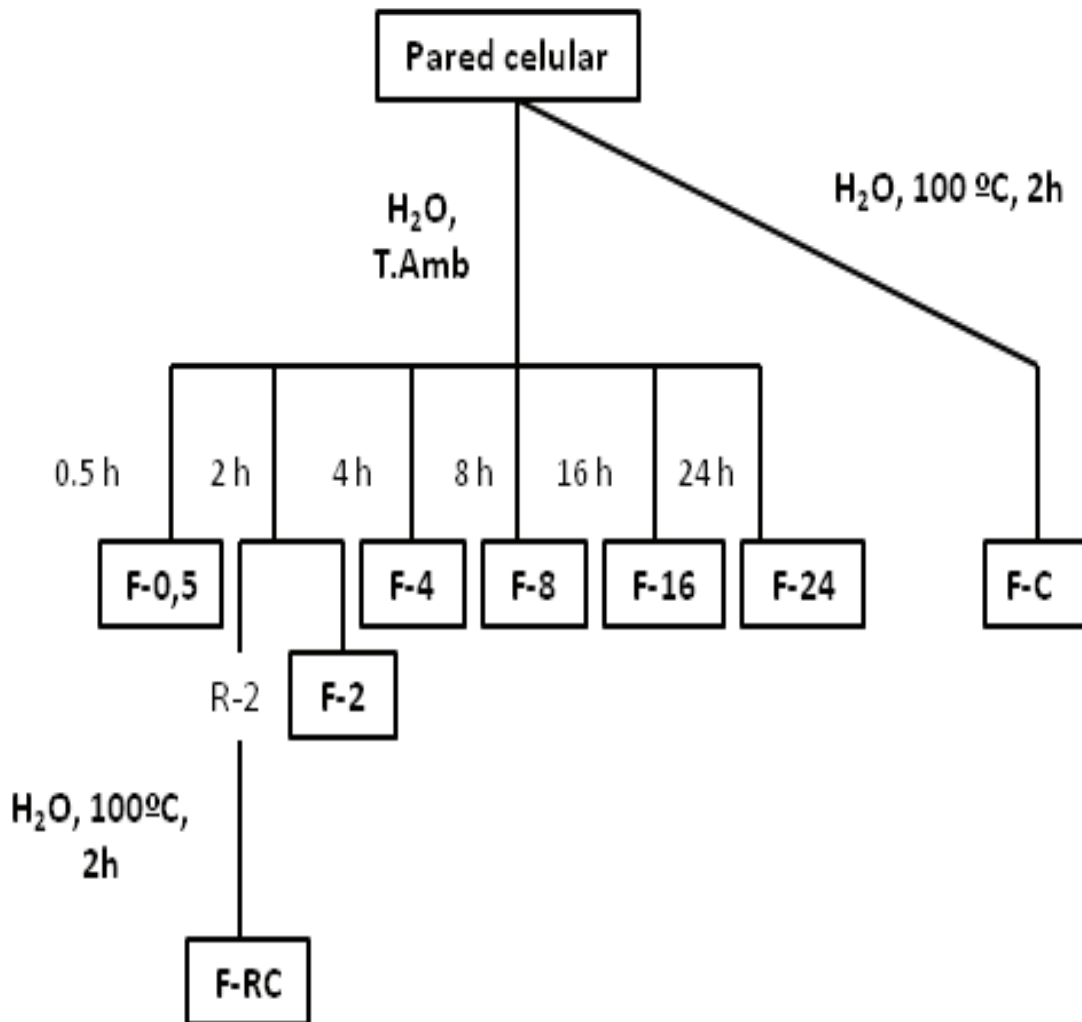
Tabla 2.2. Rendimientos y análisis de las fracciones obtenidas utilizando agitación orbital (*shaker*) y agitación magnética.*

	Agitación orbital	Agitación magnética
Rendimiento (% p/p)	11,8 ± 0,8	12 ± 1
Ácidos Urónicos (% p/p)	57 ± 3	59 ± 1
Azúcares neutros (% p/p)	27 ± 4	25 ± 2
Composición de azúcares neutros (mol / 100 moles)		
Ram	10 ± 1	7 ± 1
Fuc	---	---
Ara	37 ± 3	32 ± 3
Xil	6 ± 1	6,0 ± 0,3
Man	4,0 ± 0,3	4,0 ± 0,4
Gal	32 ± 1	45 ± 7
Glc	11 ± 3	7 ± 4

*Se informa el promedio y la desviación estándar (n=2)

Posteriormente, se realizaron por duplicado las extracciones acuosas durante 0,5; 2; 4; 8; 16 y 24 h con agitación magnética a temperatura ambiente, y a ebullición durante 2 h, obteniéndose las fracciones **F-0,5**, **F-2**, **F-4**, **F-8**, **F-16**, **F-24** y **F-C**, respectivamente. Luego se realizó la re-extracción a ebullición (durante 2 h) del residuo de la extracción por 2 h a temperatura ambiente (**R-2**) (Esquema 2.1). Al residuo final de esta re-extracción a ebullición se la denominó **F-RC**. Para todos los casos se recuperaron los sobrenadantes luego de centrifugación, obteniéndose finalmente las pectinas aisladas luego de diálisis y liofilización.

Las pectinas extraídas con agua a temperatura ambiente son las más débilmente unidas a la pared celular de los tejidos vegetales (Fry, 1986).



Esquema 2.1. Extracción de pectinas solubles en agua.

2.3.1.1 Análisis de los rendimientos

En primer lugar se analizaron los rendimientos obtenidos para los diferentes tiempos de extracción. En la Figura 2.2 se puede apreciar una pequeña disminución del rendimiento a $t=0,5$ h, pero no se advierten variaciones significativas entre los rendimientos trabajando a tiempos iguales o mayores de 2 h.

Cuando la extracción acuosa se realiza directamente a ebullición (durante 2 h), se observa un aumento marcado del rendimiento (33,6%), mientras que si la extracción a ebullición se efectúa luego de aquella a temperatura ambiente, los rendimientos sumados alcanzan el 38,3%.

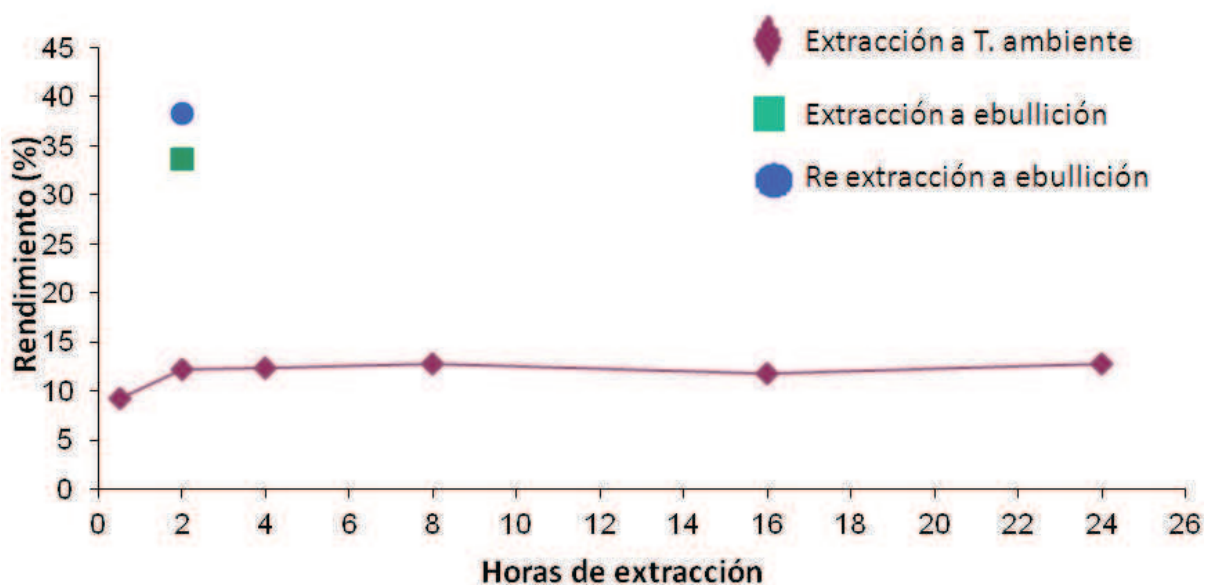


Figura 2.2. Rendimientos de los polisacáridos extraídos con agua variando tiempo y temperatura: a temperatura ambiente (◆); a ebullición por 2 h o fracción F-C (■); re-extracción de F-2 por 2 h a ebullición o fracción F-RC (●).

A partir de estos resultados se seleccionaron las fracciones **F-0,5**, **F-2**, **F-8**, **F-24**, **F-C** y **F-RC**, para realizar su análisis químico y reológico.

2.3.2 Análisis de las fracciones

2.3.2.1 Composición química

Las fracciones **F-0,5**, **F-2**, **F-8**, **F-24**, **F-C** y **F-RC** fueron caracterizadas determinando el contenido de azúcares neutros, de ácidos urónicos y de proteínas, el peso molecular, el grado de metilación (DM) y los azúcares componentes por cromatografía gaseosa luego de la hidrólisis total de los polisacáridos. Los resultados se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Rendimientos y composición química de las fracciones obtenidas **F-0,5**; **F-2**; **F-8**; **F-24**; **F-C** y **F-RC**.*

	F-0,5	F-2	F-8	F-24	F-C	F-RC
Rendimiento (g/100 g AIR)	9,2 ± 2,1	12,2 ± 0,1	12,7 ± 0,8	12,8 ± 1,3	33,6 ± 2,4	38,3 ± 0,6
Proteínas (g/100 g fracción)	11	12	13	9	7	7
Azúcares neutros (g/100 g fracción)	22 ± 2	40 ± 1	23 ± 3	27 ± 6	36 ± 4	27 ± 6
Ácidos urónicos (g/100 g fracción)	60 ± 8	56 ± 2	59 ± 1	53 ± 3	50 ± 4	73 ± 1
DM ^b (%)	35	39	34	32	54	28
Peso molecular (kDa)	75,6	71,4	59,9	42,2	89,2	143,5
Composición de azúcares neutros (mol / 100 moles)						
Ramnosa	14 ± 2	8 ± 2	7 ± 1	9 ± 2	11 ± 1	10 ± 1
Fucosa	---	---	---	---	---	1 ± 0
Arabinosa	39 ± 4	29 ± 1	45 ± 6	35 ± 3	25 ± 5	21 ± 2
Xilosa	7 ± 1	5 ± 1	7 ± 0	6 ± 1	3 ± 0	2 ± 0
Manosa	1 ± 1	4 ± 1	3 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	3 ± 2
Galactosa	33 ± 3	46 ± 2	32 ± 3	36 ± 4	51 ± 5	54 ± 1
Glucosa	6 ± 3	8 ± 1	6 ± 1	10 ± 3	6 ± 2	9 ± 3

* Se informa el promedio y la desviación estándar (n=2)

Tal como puede apreciarse en la Tabla 2.3, a temperatura ambiente se extrae el 9% de los polímeros de la pared celular mediante agitación durante 30 minutos (**F-0,5**). Los rendimientos tienden a aumentar a aproximadamente 12,5 % después de agitar ya sea durante 2, 8 ó 24 horas y aumentan significativamente (33 y 38%) para las fracciones obtenidas mediante las extracciones a ebullición (**F-C** y **F-RC**), respectivamente.

En la Tabla 2.3 se observa que las fracciones poliméricas extraídas con agua de la pared celular de las ciruelas japonesas están constituidas por una pequeña cantidad de proteínas (7-13 %) y principalmente por polisacáridos pécticos, lo que se infiere por el alto contenido de ácidos urónicos (50-73 %).

Las regiones ramificadas de las cadenas de RG-I están formadas esencialmente por arabinosa y galactosa, por lo tanto mediante la relación (Ara + Gal)/Ram se puede estimar cuán ramificado se encuentra el esqueleto de RG-I. La composición de monosacáridos revela esencialmente polímeros de pectinas con una relación (Ara + Gal)/Ram que se incrementa significativamente de 2,5 a \approx 6,5 para las pectinas extraídas a temperatura ambiente por más de 30 min (Figura 2.3 A). Este resultado indica que los ramnogalacturonanos menos sustituidos son extraídos primero lo que es consistente con investigaciones previas, las cuales sugerían que una alta sustitución en los dominios RG-I contribuye al anclaje de la pectina en la matriz de la pared celular (Vincken et al., 2003; Peña y Carpita, 2004).

Por otro lado, las pectinas extraídas en agua a ebullición muestran una relación molar (Ara+Gal)/Ram \approx 2,2 con una significativa pérdida de arabinosa (Ara/Ram \approx 2) (Figura 2.3 B) en las regiones de las vellosidades del dominio RG-I.

La presencia de xilosa en las fracciones puede atribuirse a los dominios de xilogalacturonanos en las pectinas (Pérez et al., 2003), mientras que la pequeña proporción de fucosa detectada en las fracciones de pectinas extraídas con agua a ebullición pueden ser atribuidas a vestigios de RG-II (Mazeau & Perez, 1998; Perez et. al., 2003). Por otro lado, todos los polisacáridos extraídos en agua por más de 30 minutos en cualquier condición presentan una significativa proporción de manosa, tal como ya había sido previamente determinado por Ponce et al. (2010). Pereira da Silva et al. (2009) extrajeron galactoglucomananos (GGM) de mesocarpio fresco de *Acrocomia aculeata* con agua a 80°C mediante agitación durante una hora. Por otra parte Schroder et al. (2001) caracterizaron los componentes de GGM de los polímeros de la pared celular del kiwi mediante una extracción previa con KOH 4 M, que extrae material hemicelulósico. Allí encontraron xiloglucanos y GGM, acompañados de pectinas que se insertan en la red de hemicelulosa-

celulosa. Por lo tanto, según la especie, los GGM pueden ser más o menos accesibles a la extracción con agua.

Mediante cromatografía por permeación en geles y utilizando dextranos como patrones, es posible obtener los pesos moleculares de las fracciones poliméricas aisladas. En el presente estudio, analizando los pesos moleculares de los máximos de cada fracción (Tabla 2.3) se puede ver un leve descenso del peso molecular promedio de las fracciones de pectinas aisladas al aumentar el tiempo de extracción, observándose una correlación lineal significativa entre ambos (coeficiente de correlación $r = 0.988$, Figura 2.4). De ese modo, mediante extracción acuosa a temperatura ambiente se obtuvieron pectinas con composición química muy similar pero pesos moleculares decrecientes de 75,6 a 42,2 kDa.

Para las fracciones extraídas con agua a temperatura ambiente el DM muestra una leve disminución (desde 40 % hasta 35-31 %) al aumentar el tiempo de extracción de 2 a 24 h.

La fracción de pectinas **F-C** extraídas con agua a ebullición durante 2 h muestran un peso molecular ligeramente superior (89,2 kDa) que las pectinas aisladas con agua a temperatura ambiente durante el mismo tiempo de extracción.

La fracción **F-RC** extraída con agua a ebullición a partir del residuo (**R-2**) generado luego de la extracción con agua a temperatura ambiente por 2 h, muestra aún un mayor peso molecular promedio (143 kDa), siendo una fracción muy rica en ácidos urónicos lo que sugiere que está constituida principalmente por HG (Tabla 2.3). Además **F-RC** muestra un bajo grado de metilación (28 %) mientras que **F-C** muestra el mayor grado de metilación, pudiendo ser considerada una pectina de HM.

Las pectinas extraídas en agua a ebullición sufrieron una pérdida significativa de arabinosa. Esto podría indicar un *peeling* (hidrólisis de las cadenas laterales) de las zonas de vellosidades (dominios de RG-I) debida al calentamiento, que habría producido una hidrólisis parcial de las uniones glicosídicas arabinofuranosídicas que son más lábiles, y también alguna β -eliminación. La β -eliminación es uno de los mecanismos de degradación no enzimática que pueden sufrir las cadenas de HG de las pectinas. Las uniones α -(1 \rightarrow 4) se rompen mediante una trans-eliminación formando un derivado del ácido galacturónico con una insaturación entre el C-4 y C-5. Esta reacción se ve favorecida al aumentar el DM, la temperatura y el pH (Kratchanova et al., 2004; Diaz et al., 2007; Fraeye et al., 2007).

Si las pectinas sufrieron *peeling*, desaparecen los “enredos” físicos y, entonces, su extracción se ve facilitada aumentando los rendimientos (Tabla 2.2). De acuerdo a los pesos

moleculares promedio se infiere que una parte importante de estas pectinas extraídas a ebullición son voluminosas.

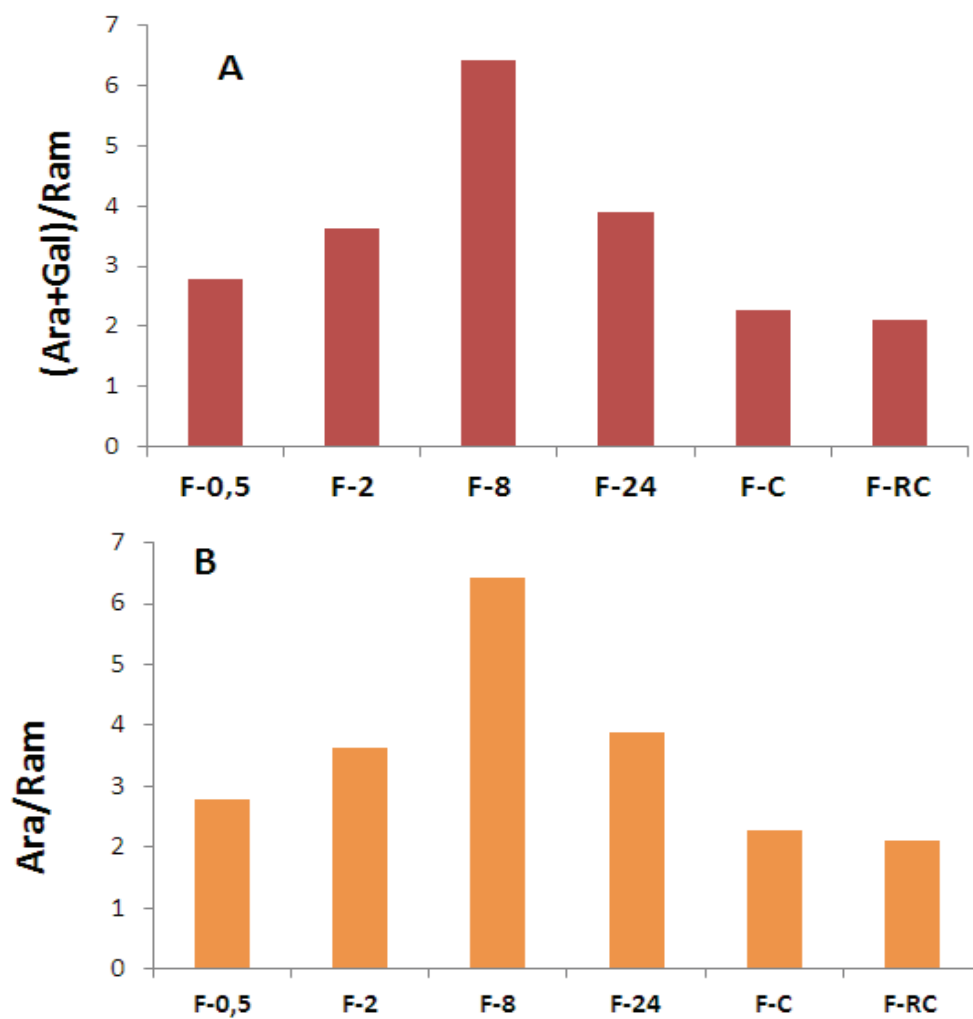


Figura 2.3. Relaciones molares: (arabinosa + galactosa)/ramnosa **(A)** arabinosa/ramnosa **(B)** de las fracciones analizadas.

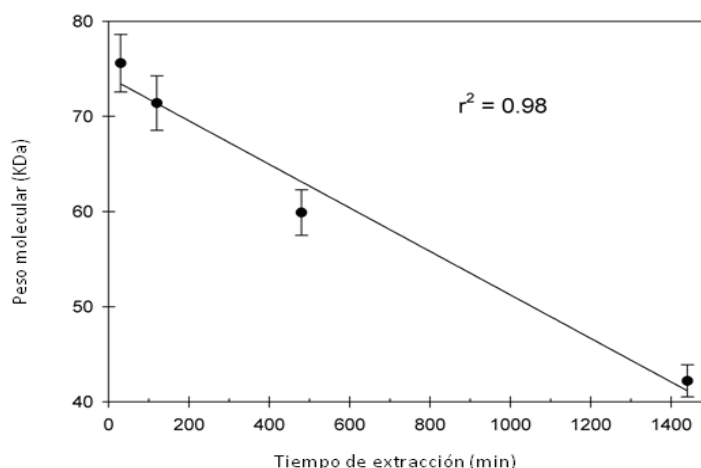


Figura 2.4. Relación entre el peso molecular promedio de las pectinas aisladas en agua a temperatura ambiente (F-0,5; F-2; F-8; F-24) y el tiempo de extracción.

2.3.2.2 Análisis reológico de las pectinas aisladas de la pared celular

Para determinar si las diferencias observadas en la composición de monosacáridos y en los pesos moleculares de las distintas fracciones (Tabla 2.3) conducen a diferencias en el comportamiento reológico, se llevaron a cabo ensayos de flujo.

Como ya se explicó, las pectinas constituyen la matriz de la pared celular, dentro de la cual se encuentran “hinchadas” en el medio acuoso intercelular, contribuyendo a determinar la porosidad de la pared. Las pectinas hidratadas presentan un determinado comportamiento de flujo. Esto es, entonces, una característica funcional de dichas macromoléculas (Zykwinska et al., 2005; Jarvis, 2011). Los polímeros de pectina interactúan en agua mediante uniones físicas o no covalentes (interacciones puente de hidrógeno, hidrofóbicas y electrostáticas). Mediante determinaciones reológicas se puede evaluar el comportamiento de flujo de estas macromoléculas y, en cierta medida, se puede inferir comportamiento fisiológico y funcional, de las fracciones de pectinas aisladas.

El comportamiento de flujo se determinó a través de las curvas de viscosidad obtenidas sobre un rango de velocidades de corte o deformación ($\dot{\gamma}$) entre 10^{-3} y 2 s^{-1} para cada solución acuosa (2 % p/v), por triplicado y a una temperatura constante de 20°C (Figura 2.5).

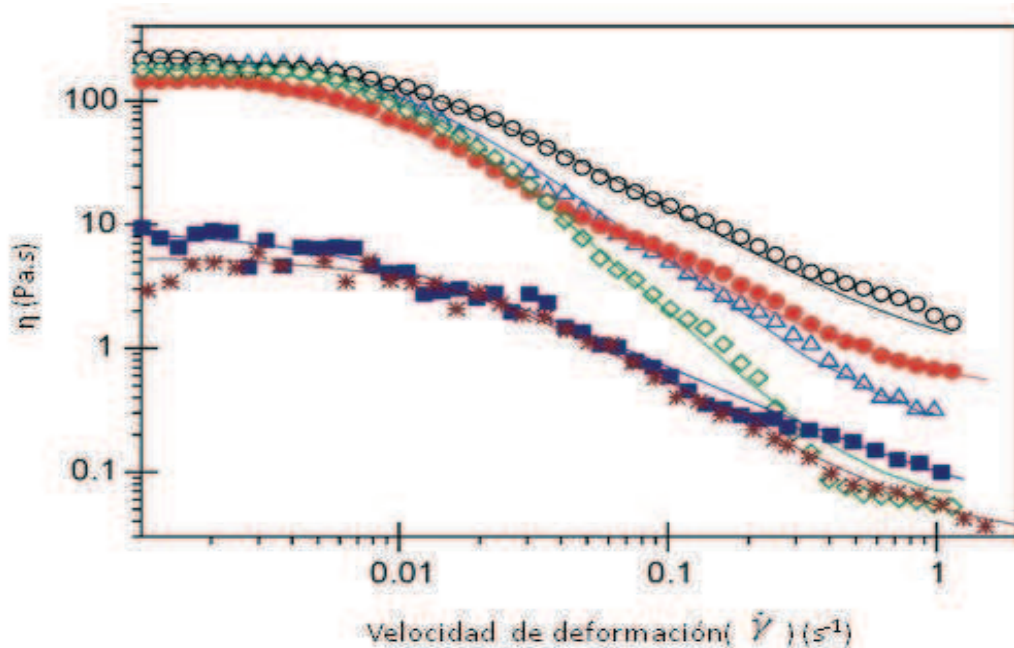


Figura 2.5. Curvas de flujo de las fracciones de pectinas (F-0,5●, F-2 ○, F-8 △, F-24 ◇, F-2C * , F-RC ■). La línea continua corresponde al ajuste del modelo de Cross.

En la Figura 2.5 se puede observar el plateau newtoniano a bajas velocidades de deformación hasta aproximadamente $2.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para todas las soluciones de pectinas, a partir del cual se puede determinar una viscosidad inicial (η_0) de $\approx 200 \text{ Pa.s}$ para las soluciones acuosas (2 % p/v) de las pectinas aisladas a temperatura ambiente (**F-0,5**, **F-2**, **F-8** y **F-24**).

Para las soluciones de pectinas aisladas con agua a ebullición (**F-2C** y **F-RC**), la viscosidad newtoniana es un orden de magnitud inferior (5,5 y 9 Pa.s respectivamente) a las de las soluciones de pectinas extraídas a temperatura ambiente. Por lo tanto, las redes físicas formadas como consecuencia de las interacciones macromoleculares en las soluciones acuosas de **F-2C** y **F-RC** son más transientes o transitorias, o sea menos estructuradas.

Luego del plateau newtoniano, la viscosidad decrece a medida que aumenta la velocidad de deformación o corte ($\dot{\gamma}$) para todos los sistemas ensayados, es decir, se observa un comportamiento pseudoplástico. Esto significa que la velocidad de deformación impuesta externamente más allá de la zona newtoniana, se hace progresivamente mayor que la velocidad con la que se re-estructuran las interacciones físicas que se ven afectadas entre las macromoléculas de pectina hidratada. Por lo tanto, la densidad de enlaces físicos o densidad de interacciones en la red macromolecular existente a bajos valores de $\dot{\gamma}$ (rango newtoniano) disminuye, y la viscosidad se va reduciendo (Morri et al., 1981). En

consecuencia, la escala de tiempo en el que ocurre el reordenamiento intermolecular de la red está relacionada con la relajación intramolecular de las macromoléculas.

El plateau newtoniano de la tercera zona (zona terminal), a altas velocidades de deformación o corte, correspondiente a la viscosidad residual o infinita (η_∞), fue experimentalmente inaccesible como ocurre usualmente (Ross-Murphy, 1994).

Con la finalidad de obtener los parámetros reológicos que permitieran comparar con precisión las curvas de flujo registradas (Tabla 2.4), se ajustaron los puntos experimentales al modelo de Cross (Ecuación 2.1). El ajuste se observa en la Figura 2.5 como la línea continua sobre cada curva.

$$\eta_{app} = \eta_\infty + \frac{(\eta_0 - \eta_\infty)}{1 + (\tau\dot{\gamma})^m}$$

Ecuación 2.1. Ecuación correspondiente al modelo de Cross, donde η_0 representa la viscosidad newtoniana, la cual es constante a velocidades de corte suficientemente bajas; η_∞ representa la viscosidad constante (newtoniana) a velocidades de corte extremas, τ es la constante de tiempo característica correspondiente al modelo de Cross, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de corte o deformación y m es una constante adimensional.

Como se ve en la Tabla 2.4 las viscosidades newtonianas η_0 obtenidas ajustando las curvas mediante el modelo de Cross revelan que todas las pectinas extraídas con agua a temperatura ambiente (η_0 entre 174 y 238 Pa·s) son capaces de interactuar por superposición y enredos, dando así una red suficientemente estructurada, siendo menos transitorias que las redes formadas por las pectinas extraídas con agua a ebullición (η_0 entre 5 y 9 Pa·s), más allá de las diferencias en sus pesos moleculares. Por otro lado, no se encontró una dependencia de η_0 con el tiempo de extracción. La mayoría de los sistemas (**F-0,5**, **F-2**, **F-8** y **F-24**) muestran valores altos para los tiempos de relajación estructural (τ) a lo largo de la zona de pseudoplasticidad (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Parámetros calculados utilizando el modelo de Cross.*

Muestra	η_{∞} (Pa s)	η_0 (Pa s)	τ (s)	m	R^2
F-0,5	0,4 ± 0,1	174 ± 32	162 ± 37	1,3	0,997
F-2	0,7 ± 0,2	238 ± 25	92 ± 6	1,3	0,998
F-8	0,15 ± 0,3	215 ± 3	98 ± 2	1,6	0,998
F-24	0,05 ± 0,1	182 ± 2	97 ± 2	1,8	0,994
F-C	0,025 ± 0,05	5,5 ± 0,3	57 ± 8	1,3	0,976
F-RC	0,035 ± 0,07	9 ± 1	116 ± 33	1,0	0,970

* Se informa el promedio y la desviación estándar (n=3)

La fracción **F-0,5** muestra una cierta velocidad de desestructuración ($1/\tau$) menor que **F-2**, **F-8** y **F-24**, mientras que no se observa una diferencia significativa entre los valores de $1/\tau$ de las pectinas extraídas a mayor tiempo (**F-8** y **F-24**) de las re extraídas con agua a ebullición **F-RC**.

La fracción **F-RC** muestra peso molecular especialmente alto (143 KDa) en relación a las pectinas que constituyen el resto de las fracciones aisladas. Además, presenta mayor contenido de ácidos urónicos y mayor relación “ácidos urónicos/Ram” (≈ 80), así como menor grado de metilación ($\approx 27\%$). Por lo tanto esta fracción de pectinas (**F-RC**) presenta una proporción predominante de HG (con forma de hélice semi-flexible) respecto de RG-I (con forma de *random coil*), lo que contribuye a la diferencia en el comportamiento reológico (Morris et al., 2010) y en el desempeño de estas pectinas en la matriz de la pared celular.

Ralet et al. (2008) determinaron que los HGs eran cuatro veces más rígidos que los RG-I. En consecuencia, la reducción de bloques de HG conduciría a un aumento en la flexibilidad de la pectina.

Los valores de la η_{∞} de las soluciones de pectinas que se obtuvieron a partir del ajuste al modelo de Cross (Tabla 2.4) fueron mayores que la viscosidad del solvente (agua, 0.01

Pa·s). El poder viscosante de los polisacáridos depende de la concentración y composición química de los mismos. En solución, la viscosidad está directamente relacionada con las propiedades fundamentales de las moléculas como, por ejemplo, la conformación molecular, el peso molecular y distribución de los mismos, las interacciones intramoleculares e intermoleculares (Lefebvre & Doublier, 2005).

Es necesaria una adecuada relación molar de HG a RG-I (HG/RG-I) y distribución de HG entre los núcleos de RG-I para interactuar con el agua y espesarla o gelificar (Lapasin & Pricl, 1995; Pérez et al., 2003; Vincken et al., 2003). Las proteínas (hasta 10%) que se co-extrajeran en las fracciones aisladas de pectinas (Tabla 2.3), también podrían contribuir a las propiedades reológicas observadas (Siew & Williams, 2008; Nuñez et al., 2009).

Redgwell et al. (1997) determinaron que la viscosidad variaba entre 0,040 y 0,725 Pa·s para soluciones acuosas al 1 % (p/v) de polímeros de pared celular aislados de kiwis y tomates inmaduros, y que los valores aumentaban a 5,07 y 5,78 Pa·s, respectivamente, cuando los frutos eran maduros. Cosgrove (1989) informó una viscosidad de 0,328 Pa·s para una solución acuosa 2% (p/p) de pectinas cítricas, de pH regulado. Boonrod et al. (2006) extrajeron pectinas de la piel de papaya a la temperatura de ebullición y utilizando diferentes concentraciones de HCl, seguidas por una precipitación con etanol, determinando viscosidades desde 0,015 hasta 0,025 Pa·s para soluciones acuosas 1 % (p/v) de pH 1.0, midiendo a una velocidad de corte entre 25 y 225 s⁻¹. En estos trabajos la viscosidad fue medida en la región de pseudoplasticidad (donde la viscosidad es dependiente de la velocidad de corte), es decir, fuera de la región newtoniana observada en el Figura 2.5. Por lo tanto, los valores de viscosidad de las soluciones de pectina al 2% (p/v) registradas a las velocidades de deformación entre 1 y 23 s⁻¹ (Tabla 2.5) son similares a las informadas por otros autores.

Tabla 2.5. Viscosidad aparente (η_{app}) determinada a una velocidad de deformación constante de 1 y 23 s⁻¹ (20°C), halladas a partir de las curvas de flujo (Figura 2.5) de las soluciones acuosas 2 % p/v de las pectinas aisladas.

Soluciones de pectinas 2% p/v	η_{app} (Pa.s)	
	1 s ⁻¹	23 s ⁻¹
F-0,5	0,770	0,397
F-2	1,471	0,682
F-8	0,617	0,105
F-24	0,106	0,071
F-C	0,082	0,026
F-RC	0,140	0,044

2.4 Conclusiones

En este Capítulo se presentaron los resultados del estudio químico y reológico de pectinas débilmente unidas, aisladas a partir de las paredes celulares de ciruelas japonesas (*Prunus salicina Lindl.*) variedad "Roysum", que fueron extraídas con agua a diferentes tiempos y temperaturas.

Los resultados demuestran que todas las fracciones extraídas de polímeros están constituidas por pectinas fisiológicamente activas, esto es, pectinas con un efecto viscosante acorde a lo que ocurre en la pared celular.

Se encontraron las siguientes características en las pectinas extraídas bajo diferentes condiciones estudiadas:

- 1) El agua a temperatura ambiente con agitación continua durante 2 h extrae de las paredes celulares, pectinas con un grado de metilación de aproximadamente 40%, con un peso molecular de ≈ 72.000 Da y un rendimiento del 12 % (**F-2**), dando soluciones acuosas de alta viscosidad ($\eta_0 = 238$ Pa.s).
- 2) Cuando las extracciones se efectuaron durante tiempos más largos no se observaron variaciones sustanciales en el rendimiento de las pectinas obtenidas, ni cambios en la composición química y viscosidad en agua, aunque sus pesos moleculares disminuyeron ligeramente (**F-8** y **F-24**).
- 3) Utilizando agua a ebullición (**F-C** y **F-RC**) se aumentó notablemente el rendimiento (33 y 38 %) y el peso molecular de las pectinas extraídas, pero éstas presentaron una viscosidad significativamente menor en agua que las extraídas a temperatura ambiente, además de presentar diferencias en las características analíticas, como una baja proporción de residuos de arabinosa en la región de vellosidades RG-I (regiones desordenadas de la macromolécula de pectina). Para interactuar con el agua y, así, espesarla (aumentar la viscosidad), se necesitarían entonces una adecuada relación molar de HG/RG-I así como un patrón de distribución adecuado del HG entre los cores de RG-I.

Estos resultados también demuestran que las pectinas extraídas con agua a temperatura ambiente presentan un comportamiento reológico útil para aplicaciones farmacéuticas y formulación de alimentos, lo que permitiría aprovechar las frutas descartadas de la comercialización y del procesamiento industrial de vegetales, para el aislamiento de biopolímeros, con la consiguiente valorización de las materias primas.

CAPÍTULO 3

Cambios en los polisacáridos de la pared celular durante el desarrollo de frutos de diferentes variedades de cerezo dulce
(Prunus avium L.)

3.1 Introducción

Entre los objetivos principales del mejoramiento de los frutos del cerezo a nivel mundial se encuentra la obtención de frutos firmes y con buenas cualidades para la exportación (Srinivasan et al., 2005). Esto ha llevado a ahondar en el tema y sobre todo a centrar los esfuerzos en comprender qué cambios ocurren en la pared celular ante diferentes condiciones (ontogenia, estrés biótico o abiótico) no sólo en cerezas sino también en otros frutos.

En cerezas, se ha observado que el ablandamiento de los frutos está ligado al genotipo y, en consecuencia, al nivel de síntesis de la pared celular, encontrándose así genotipos de fruta firme que sintetizan materiales de pared hasta estadios más tardíos del desarrollo en comparación con genotipos de frutos blandos (Choi et al., 2002a). A nivel ultraestructural, existirían diferencias entre las células de frutos de textura blanda y de textura crujiente (Batisse et al., 1996). En frutos blandos maduros, la laminilla media está mejor preservada, la pared primaria es delgada y muestra bolsas de degradación delimitadas por formaciones de membrana residuales. En cambio, los frutos firmes presentan solubilización de la laminilla media y una gran reestructuración de la pared primaria, resultando en la separación entre células.

En los primeros estudios de caracterización de las pectinas de cerezas, se asoció el ablandamiento con un incremento en las pectinas totales por fruto. Se ha observado que a medida que el fruto se ablanda y se incrementa el contenido de pectinas totales, la solubilidad de las mismas también aumenta (Fils-Lycaon & Buret, 1990). En sus investigaciones desarrolladas utilizando cerezas variedad "Satohnishiki", Kondo y Danjo (2001) sugirieron que el ablandamiento puede ser causado por la degradación de las pectinas, con posterior disolución de los azúcares neutros unidos al esqueleto del ramnogalacturonano y no sólo por la despolimerización del homogalacturonano. En cerezas variedad "Bigarreau Burlat" se ha comparado el grado de polimerización de los polisacáridos de la pared celular de frutos blandos con el de frutos crujientes, observándose que los de frutos más blandos tienen un menor grado de polimerización. Esto significa que esos polímeros presentan una menor interacción con otros polímeros de la pared., Se ha determinado que eso origina que las células aparezcan con formas irregulares (Batisse et al., 1996).

Por otra parte, Batisse et al. (1994) demostraron que durante la maduración de las cerezas, el ablandamiento no depende de la despolimerización de pectinas ni de la acción de la enzima endo-poligalacturonasa (endo-PG) aunque los estudios de ciertas glicosidasas, como la β -galactosidasa, sugieren una relación con la pérdida de azúcares neutros (Andrews & Li, 1994, 1995). Otras enzimas como la pectinmetilesterasa (PME) y la poligalacturonasa (PG) conjuntamente con la β -galactosidasa, también parecen intervenir en el ablandamiento de las cerezas (Barret & González, 1994).

3.1.1 Importancia del cultivo de cerezas en Argentina

En la Argentina, la producción de cerezas ha crecido notablemente en la última década y se encuentra en expansión. Según el Censo Nacional Agropecuario 2002, había en el país 2200 ha plantadas con cerezos, siendo Mendoza, con 1275 ha, la provincia con mayor superficie de este cultivo y responsable del 80 % de la producción del país. Siguen en orden de importancia los Valles de la Patagonia Norte (Provincias de Neuquén y Río Negro) con algo más de 500 ha y los Valles de la Región Patagonia Sur (Provincias de Chubut y Santa Cruz) con 325 ha (Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas, 2009). Actualmente se contabilizan 3000 ha plantadas, y su producción sigue en aumento. Recientemente en la Provincia de Buenos Aires, especialmente en la zona sudeste, cerca de Mar del Plata y en los alrededores de Bahía Blanca también se registraron algunas plantaciones de cerezos.

A nivel nacional se produjeron alrededor de 6800 tn de cerezas en el año 2009 (FAOSTAT, 2009), presentándose variaciones anuales según las condiciones climáticas tales como nieve y heladas, que afectan en gran medida la producción. Si bien el rendimiento es bajo (menos de 2,5 tn por ha), los factores ambientales y el hecho que las nuevas plantaciones no se encuentren en plena producción aún, dan idea del potencial productivo de este cultivo en el país.

Actualmente, buena parte de la producción argentina de cerezas es comercializada en el mercado interno, siendo “Bing” la variedad con mayor volumen ofertado (> 66%), mientras que otra parte de la producción se destina a la industrialización para la elaboración de cerezas al marrasquino y mermeladas. En cuanto al mercado externo, las cerezas se cuentan entre las once frutas más exportadas de la Argentina (Altube et al., 2007) y el volumen de exportaciones alcanza las 2500 tn (FAOSTAT, 2008), llegando a mercados como Reino Unido (33%), Estados Unidos (14%), Brasil, España, Francia y Holanda (11% cada uno),

Hong Kong, Italia (2% cada uno), Rusia y Alemania, entre otros. Uno de los factores que favorece dichas exportaciones es el hecho de producir en contraestación al hemisferio Norte (Cittadini, 2007).

3.1.2 Características de los frutos

Como ya se mencionó en el Capítulo 2, la cereza es un fruto de carozo, perteneciente a la familia Rosaceae, subfamilia Prunoideas, en la cual también se encuentran los árboles productores de duraznos, nectarinas, ciruelas y damascos. Sin embargo, la cereza está considerada dentro del grupo de las frutas finas (al igual que las frambuesas, frutillas, arándanos y otros “berries”) con las cuales comparte una característica fundamental dentro de este grupo como es su acotada vida de postcosecha, la cual está relacionada con su moderada tasa respiratoria ($10\text{-}20 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). La comercialización de ésta y otras frutas hacia países europeos debe sortear esta dificultad para que llegue a los mercados en buen estado, o sea manteniendo las características organolépticas lo mejor posible hasta llegar al consumidor final. En los últimos años, las investigaciones se están orientando hacia el estudio de los factores de precosecha y postcosecha que podrían afectar la calidad del fruto. Debido a que la vida en postcosecha no alcanza más de 4-6 semanas utilizando frío, combinado en ocasiones con atmósferas modificadas, esta fruta debe ser rápidamente transportada hasta su destino, requiriendo utilizarse a menudo el traslado aéreo por su rapidez.

El cerezo es uno de los primeros frutales caducifolios en madurar en verano y la época de cosecha es relativamente corta comparada con la de otros frutales, ya que rige desde mediados de noviembre hasta enero, según la zona de producción y la variedad. Su ontogenia se extiende entre 60 y 80 días desde la floración hasta la madurez, dependiendo del cultivar (Tukey, 1942). Presenta una curva de crecimiento sigmoidea doble como ocurre con otros frutos de carozo, pero se distingue de los demás por ser más acotado el tiempo de desarrollo. En esta curva se pueden distinguir tres etapas principales: **etapa I**, de activa división celular, **etapa II**, de endurecimiento del endocarpio o carozo y crecimiento del embrión y **etapa III** caracterizada por la elongación celular y consecuente aumento del tamaño del fruto en forma exponencial. Al final de esta etapa de maduración de la cereza dulce ocurre un rápido incremento en el tamaño y el peso de la fruta, a la vez que se registran cambios drásticos en el color, sabor y textura del mismo (Looney et al., 1996a).

A diferencia de otros frutos como las peras y manzanas, que acumulan carbohidratos de reserva como el almidón, las cerezas acumulan monosacáridos (principalmente glucosa y fructosa) durante su maduración. Estos monosacáridos contribuyen a la percepción del dulzor (que se mide como %SS o °Brix) que, conjuntamente con el nivel de acidez (dado fundamentalmente por la presencia de ácido málico), determinan el sabor característico del fruto. El ácido málico es también el ácido orgánico de mayor contribución a la acidez en otras especies de *Prunus*, como las que producen ciruelas, duraznos, damascos y nectarinas (Crisosto, 1994). En contraste con estos últimos frutos donde la acidez disminuye a través del desarrollo y maduración del fruto, en las cerezas se produce una acumulación de ácido málico aún durante la madurez (Serrano et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente, la tasa respiratoria de esta fruta es moderada. Es bien conocido que este proceso utiliza como sustrato, entre otros, a los carbohidratos y, en consecuencia, una vez cosechada, una elevada tasa respiratoria podría disminuir el contenido de azúcares, afectando el sabor característico y por ende la calidad de la misma, contrariamente a lo que ocurre en manzanas (Looney et al., 1996a). La cereza se comporta como un fruto no climatérico, es decir que, luego de cosechada, no presenta el pico climatérico o respiratorio y de producción de etileno. En consecuencia, el proceso de maduración no prosigue luego de separar al fruto de la planta, por lo que debe estar fisiológica y organolépticamente maduro al momento de su recolección. Por otra parte, se sabe que la acumulación de azúcares no continúa una vez arrancado de la planta (Campana, 2007).

Algunos autores han estudiado la evolución de la firmeza en cerezas, y observaron que la misma disminuye marcadamente desde estadíos tempranos, coincidentes con el alargamiento celular (Choi et al., 2002b; Serrano et al., 2005;). Estas observaciones, unidas al hecho de ser un producto muy perecedero, dan idea de la importancia que tiene utilizar las mejores técnicas de postcosecha para mantener su calidad.

En cerezas, al igual que en otros frutos, se utilizan índices de madurez específicos, que se relacionan directamente con el estado ontogénico del fruto en el cual es posible comenzar la cosecha. Los índices utilizados son el color (como método no destructivo), la firmeza y el contenido de sólidos solubles (%SS; o ° Brix), siendo estos dos últimos métodos destructivos (Esti et al. 2002). Todos ellos permiten determinar el momento de cosecha oportuno, aunque el valor óptimo de estos índices puede variar según el cultivar y el mercado al cual se destine.

3.1.3 Características de las variedades de cerezo bajo estudio.

Aunque existen más de 30 especies diferentes de cerezos, todas originadas en Europa y Asia, solamente 2 tienen relevancia comercial a nivel mundial. El cerezo dulce (*Prunus avium* L.), diploide ($2n = 2x = 16$), y el cerezo ácido o guindo (*Prunus cerasus* L.), tetraploide ($2n = 4x = 32$). El cerezo Duke es un híbrido natural entre las dos especies anteriores.

El mercado consumidor de cerezas es altamente exigente en cuanto a los parámetros de calidad, lo cual está directamente relacionado a la permanente producción de nuevas variedades con mejores cualidades. Actualmente existen más de una docena de programas Internacionales de mejoramiento de donde proviene una amplia oferta varietal. Sin embargo, ya que muchos de estos programas están protegidos con patentes, la oferta varietal para la producción en nuestro país es más limitada. En Argentina las variedades más plantadas son: Bing, Van, Lapins, Stella, New Star, Early Burlat, Sweetheart, Sunburst, Brooks y, en menor medida, Chelan, Sumele, Regina y Kordia.

Los dos problemas principales que suelen sufrir las cerezas son los denominados *cracking* y el *pitting*. El *cracking* proviene de la fisura de la cutícula, mientras que el *pitting* sobreviene de daño por compresión o impacto que se manifiesta como una depresión en la superficie del fruto, debida a la ruptura y colapso de las células parenquimáticas. La sensibilidad de la fruta al *pitting* depende de la variedad y del estado de madurez.

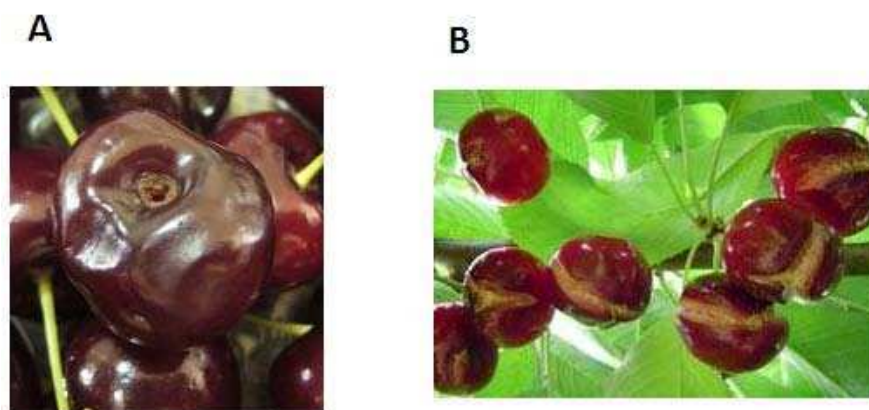


Figura 3.1 Cereza con *pitting* (A); cerezas con *cracking* (B).

A continuación se detallan las características más relevantes de las cinco variedades de cerezas utilizadas en este trabajo de Tesis.

3.1.3.1 Cerezos ‘Chelan’

El fruto es de tamaño medio (26 mm), muy firme y con jugosidad media, cordiforme y con la sutura medianamente marcada. El color de la piel y la pulpa es rojo oscuro. Es poco sensible al *cracking* y tiene muy buen sabor, levemente ácido.

3.1.3.2 Cerezos ‘Regina’

El fruto es de tamaño medio a grande (calibre de 26-28mm) de forma redonda semiachatada. El color de la piel y pulpa es rojo púrpura, de sabor dulce. Junto con Chelan son las variedades más firmes, de pulpa muy compacta y menos jugosa. Debido a su buen tamaño, sabor y firmeza es muy apreciada en los mercados.

3.1.3.3 Cerezos ‘Sumele’

El fruto es grande (calibre de 30 mm) con forma de corazón y sutura marcada. La epidermis es roja y la pulpa rosa. Es una variedad crocante y de buen sabor, sensible al *cracking*. Presenta muy buena conservación y resistencia al *pitting*.

3.1.3.4 Cerezos ‘Sunburst’

El fruto es grande (calibre de 30 mm), redondo, de color rojo intenso y de poca firmeza, es muy jugoso y de sabor dulce. Por sus características, la fruta es de muy buena calidad para la venta directa a consumidores.

3.1.3.5 Cerezos ‘Brooks’

El fruto es de tamaño medio (calibre de 26 mm) de forma redonda achatada, el color de la piel y pulpa es rojo intenso. Junto con Sunburst son las variedades de menor firmeza pero los frutos son más jugosos. Es una de las variedades más susceptibles al *cracking*.

Estas cinco variedades utilizadas en el presente trabajo fueron recolectadas de árboles localizados en el Alto Valle de Rio Negro (39° 01' 32" de Latitud Sur, 67° 44' 22" de Longitud Oeste; 240 m sobre el nivel del mar).

3.2 Objetivo

El objetivo de esta parte de la Tesis es caracterizar y comparar la composición química, el proceso de solubilización y despolimerización de los polisacáridos de la pared celular de los frutos de cerezo dulce (*Prunus avium L.*) en el primer y último estadio de madurez de las cinco variedades de cerezas mencionadas y, en base a ello, y si fuera posible, encontrar un modelo característico para las paredes celulares según las características que presentan cada una de las variedades estudiadas.

3.3 Resultados

3.3.1 Índices fisiológicos, índices de madurez y de calidad.

Las cerezas inmaduras utilizadas en el presente trabajo corresponden al primer fruto formado luego de la floración, el cual es pequeño, de color verde y con el endocarpio poco desarrollado. En la Tabla 3.1 se muestran los resultados de las mediciones de firmeza, sólidos solubles (SS), acidez titulable, color (parámetros L , a , b) e índice de *cracking* (IC) que se realizaron a los frutos maduros recién cosechados.

Tabla 3.1. Firmeza, sólidos solubles (SS), acidez titulable (AT), color (parámetros L , a , b) e índice de *cracking*.*

Variedad	Firmeza (g/mm)	SS (°Brix)	AT (% de ácido málico)	L	a	b	Índice de <i>cracking</i> (%)
Brooks	439 ± 2	20 ± 1	0,92 ± 0,01	31,92 ± 0,02	28,77 ± 0,07	9,41 ± 0,09	98 ± 5
Chelan	436 ± 1	20 ± 2	0,98 ± 0,05	29,67 ± 0,04	25,11 ± 0,02	7,8 ± 0,04	15 ± 2
Sumele	491 ± 3	19 ± 1	0,96 ± 0,04	28,57 ± 0,03	25,09 ± 0,01	7,25 ± 0,04	71 ± 4
Sunburst	414 ± 2	22 ± 3	1,29 ± 0,03	24,29 ± 0,04	9,19 ± 0,03	1,81 ± 0,03	68 ± 2
Regina	560 ± 1	20 ± 2	1,01 ± 0,06	28,85 ± 0,01	23,42 ± 0,04	7,08 ± 0,02	34 ± 3

*Se expresan los valores como L , a y b , donde L (de 0 a 100) indica la luminosidad, a (de -60 a +60) el rango de color que va del verde al rojo y b (de -60 a +60) el que va del azul al amarillo.

Como se puede observar en la Tabla 3.1, de las muestras de cerezas recibidas, la variedad Sunburst es la que presenta menor firmeza del fruto tal como es habitualmente informado, siendo Brooks y Chelan de firmeza intermedia y claramente Regina es la más

firme de todas las variedades, también coincidiendo con lo informado en literatura (Australian Cherry Production Guide, 2010). Además se puede observar que la variedad Brooks es la que presentó el mayor índice de *cracking* (98%) y Chelan fue la más resistente, con un valor de IC de 15,2%. Las variedades de cereza estudiadas presentaron el mismo grado de madurez en lo que se refiere a los °Brix y acidez titulable (Tabla 3.1). En lo que se refiere a los parámetros de color, Sunburst mostró la menor luminosidad (*L*) así como el menor valor de componente rojo (*a*) y de componente amarillo (*b*).

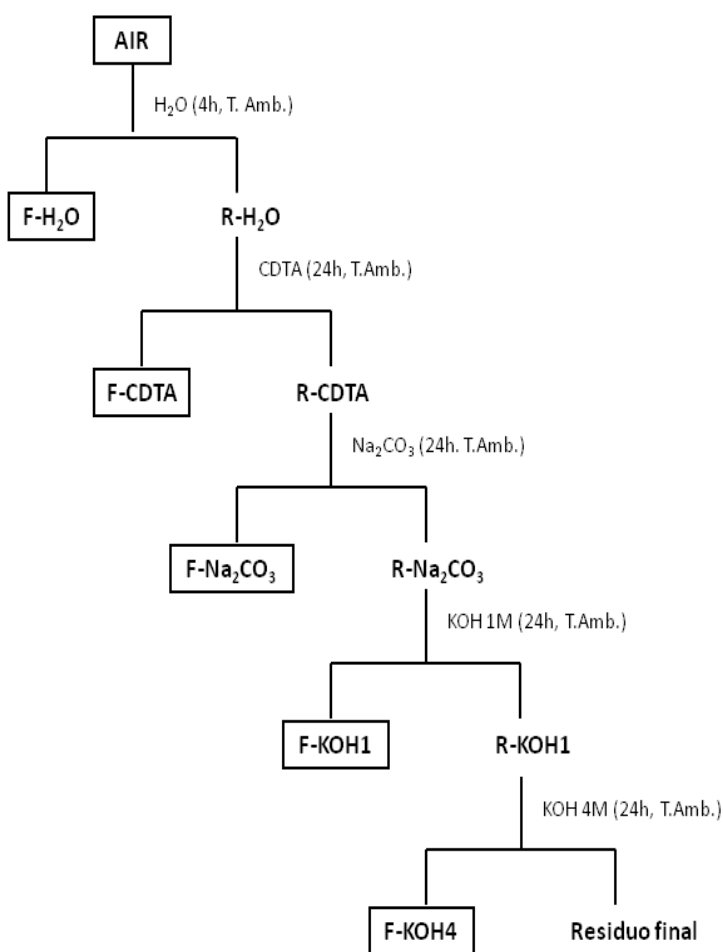
3.3.2 Fraccionamiento de la pared celular.

Usualmente, el estudio de las paredes celulares se realiza mediante el fraccionamiento por tratamiento secuencial primero con agua (extrae sólo las pectinas débilmente unidas a la pared celular), en segundo lugar con un agente quelante específico del Ca^{2+} como el CDTA (extrae pectinas que interaccionan electrostáticamente por medio de iones calcio), en tercer lugar con Na_2CO_3 (extrae pectinas covalentemente unidas), luego con un álcali (KOH) diluido (extrae los glicanos entrecruzantes más accesibles, débilmente unidos) y finalmente con un álcali (KOH) concentrado (extrae los glicanos entrecruzantes fuertemente unidos a la matriz celulósica). La base fuerte es capaz de romper los fuertes enlaces de hidrógeno por los que interactúan los polímeros más firmemente unidos, por eso puede extraer las glicanos entrecruzantes que interaccionan, por este tipo de unión, con la celulosa (Fry, 1986). De esta manera, el fraccionamiento secuencial de los polímeros constituyentes de la pared celular permite ir aislando, sucesivamente, estos componentes en función del tipo de unión física y/o química que los mantiene interaccionando dentro de la red polimérica constituyente de la pared celular.

En particular, en este trabajo se modificó el procedimiento extractivo ejecutado por Sozzi (2002), Brummell et. al. (2004) y Ponce et al. (2010) (Esquema 3.1), teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el Capítulo 2 para la extracción acuosa, en el que se pudo determinar que el procedimiento extractivo habitual que demora 24 h podía acortarse a 2 ó 4 h sin afectar en absoluto los rendimientos ni las características del producto.

Luego de remover el endocarpio y el pedúnculo de las cerezas, se obtuvieron las paredes celulares (residuo insoluble en alcohol: AIR) por extracción del tejido vegetal con EtOH, CHCl_3 : MeOH (1:1) y posterior deshidratación del residuo obtenido con acetona. El AIR (polvo seco) fue a continuación sometido a una primera etapa extractiva en la que se

utilizó H₂O, agitando durante 4 h a temperatura ambiente. Luego, al residuo se lo sometió a extracciones sucesivas con soluciones acuosas de CDTA (0,05M), Na₂CO₃ (0,1M), KOH 1M e KOH 4M, generando las fracciones **F-H₂O**, **F-CDTA**, **F-Na₂CO₃**, **F-KOH1** y **F-KOH4**, respectivamente, y un residuo final (Esquema 3.1) que, de acuerdo a lo estudiado en Regina y Sunburst (Capítulo 4), está compuesto mayoritariamente por celulosa, lo cual coincide con lo informado en literatura (Fry, 1986). Las fracciones poliméricas puras aisladas en cada etapa fueron recuperadas luego de centrifugación, diálisis y posterior liofilización. Todas las extracciones se realizaron por duplicado.



Esquema 3.1 Fraccionamiento secuencial de la pared celular (residuo, seco, insoluble en alcohol: AIR) aplicado a las cinco variedades de cerezas en el primer y último estadio de madurez. Se obtienen las fracciones (F) de polímeros solubilizados por cada tipo de reactivo usado en la etapa extractiva y el residuo insoluble (R) correspondiente, el cual será luego sometido al paso siguiente de extracción.

Analizando los rendimientos (Tabla 3.2) se observa que la fracción soluble en H₂O (pectinas débilmente unidas) aumentó significativamente ($p < 0,05$) con la madurez, salvo para la variedad Chelan, donde disminuyó ($p < 0,05$). En cambio, la fracción soluble en CDTA (pectinas entrecruzadas iónicamente por Ca²⁺) mostró una leve disminución ($p < 0,05$) con la madurez sólo para Sunburst (variedad de cereza blanda), mientras que las fracciones solubles en KOH 1M mostraron una leve disminución con la madurez para Brooks y Regina, y en KOH 4M, fue sólo para Regina. La fracción soluble en Na₂CO₃ (pectinas unidas covalentemente entre sí) fue la que presentó los mayores rendimientos en ambos estadios y una marcada disminución de los mismos (25-48%) con la maduración para todas las variedades. Considerando entonces los rendimientos obtenidos para cada fracción (Tabla 3.2), en el presente trabajo se determinó que entre el 46 y el 54% de los polímeros no celulósicos constituyentes de la pared celular de cerezas (inmaduras y maduras) corresponde a pectinas covalentemente unidas y que, con la madurez, las variedades Brooks y Sunburst son las que muestran una mayor disminución del rendimiento de estas pectinas, siendo éste del orden del 47%.

Tabla 3.2. Rendimiento de las distintas fracciones obtenidas a partir de las cinco variedades de cerezas en el primer y último estadio de madurez expresado en g/100 g AIR. *

RENDIMIENTOS (%)						
Estadio	Variedad	Fracciones				
		F-H ₂ O	F-CDTA	F-Na ₂ CO ₃	F-KOH1	F-KOH4
Inmaduras	Chelan	4,2 ± 0,1	14 ± 1	23 ± 1	7 ± 1	5 ± 1
	Sumele	3,3 ± 0,8	7 ± 1	24 ± 1	9 ± 1	6 ± 1
	Brooks	3,1 ± 0,5	11 ± 1	19 ± 2	12 ± 3	7 ± 2
	Sunburst	2,4 ± 0,2	9 ± 4	26 ± 5	10 ± 1	7 ± 1
	Regina	2,0 ± 0,2	4 ± 2	26 ± 2	11 ± 1	7 ± 1
Maduras	Chelan	2,4 ± 0,3	11 ± 2	14 ± 1	10 ± 1	3 ± 1
	Sumele	3,7 ± 0,4	10 ± 1	18 ± 7	9 ± 2	5 ± 1
	Brooks	3,4 ± 0,2	9 ± 4	10 ± 1	10 ± 2	3 ± 2
	Sunburst	3,6 ± 1,2	4 ± 1	14 ± 2	7 ± 2	6 ± 2
	Regina	3,0 ± 0,2	5 ± 1	17 ± 1	7 ± 1	4 ± 2

*Se informa el promedio y la desviación estándar (n=2)

3.3.3 Análisis de las fracciones

Todas las fracciones obtenidas fueron caracterizadas determinando su contenido de ácidos urónicos y de azúcares neutros totales, así como la composición de los azúcares neutros por cromatografía gaseosa, luego de la hidrólisis total de los polisacáridos.

3.3.3.1 Cambios en el contenido de ácidos urónicos y azúcares neutros en la pared celular con la madurez.

Se puede observar en la Tabla 3.3 que los ácidos urónicos por fracción disminuyen significativamente ($p < 0,05$) con la madurez tanto en las fracciones extraídas con H_2O (20-54%) como en las de Na_2CO_3 (17-33%), salvo para Regina en la que aumenta leve pero significativamente ($p < 0,05$), en un 12%. Cabe resaltar que Brooks y Sunburst mostraron las mayores disminuciones en el contenido de ácidos urónicos de sus fracciones **F- H_2O** (41 y 54 %, respectivamente) y **F- Na_2CO_3** ($\approx 33\%$). En cuanto a las fracciones poliméricas extraíbles en CDTA, éstas presentan el mayor contenido de ácidos urónicos (42-64 %) de todas las fracciones mostradas en la Tabla 3.3. Exhiben, además, un significativo ($p < 0,05$) aumento (19, 31 y 42%) del contenido de ácidos urónicos con la maduración para las variedades Chelan, Sumele y Regina, respectivamente, mientras que para Brooks y Sunburst no se observó variación significativa en el contenido de ácidos urónicos con la maduración. Como se puede ver, estas tres fracciones están constituidas por pectinas, lo que se infiere a partir de los altos contenidos de ácidos urónicos que presentan en todos los casos. Por otra parte y como ya se conoce, las fracciones sucesivamente extraídas con KOH 1M y 4M son ricas en glicanos entrecruzantes, asociados a la celulosa fundamentalmente por enlaces de hidrógeno (Fry, 1986). No obstante, presentan una baja pero significativa cantidad de ácidos urónicos (Tabla 3.3), sobre todo las variedades Sumele, Brooks y Sunburst. Se trataría entonces de pectinas remanentes, que por algún motivo no fueron extraídas por los reactivos usados en las etapas previas. Se podría deber a que las mismas estarían entrelazadas o enredadas física (o químicamente) a la red elástica de glicanos entrecruzantes-celulosa (Peña & Carpita, 2004). En las **F-KOH1**, el contenido de ácidos

urónicos disminuye con la madurez mientras que en las **F-KOH4** no se observan diferencias entre los estadios.

Tabla 3.3. Contenido de ácidos urónicos (anhidro) en g /100 g de fracción en las distintas fracciones obtenidas a partir de las cinco variedades de cerezas en el primer y último estadio de madurez.*

ÁCIDOS URÓNICOS (g/100 g fracción)						
		Fracciones				
Estadio	Variedad	F-H ₂ O	F-CDTA	F-Na ₂ CO ₃	F-KOH1	F-KOH4
Inmaduras	Chelan	45 ± 3	53 ± 5	41 ± 5	7,0 ± 0,6	5 ± 2
	Sumele	47,7 ± 0,9	42 ± 4	55 ± 1	11,0 ± 0,4	1,0 ± 0,5
	Brooks	58 ± 1	57 ± 9	51 ± 5	11,5 ± 0,4	5,0 ± 0,8
	Sunburst	59,0 ± 0,2	61,7 ± 0,7	55 ± 3	12 ± 3	5 ± 2
	Regina	40 ± 2	45 ± 2	42 ± 3	5 ± 1	2,9 ± 0,7
Maduras	Chelan	33 ± 3	63 ± 8	34 ± 6	7 ± 1	3,4 ± 0,8
	Sumele	38 ± 1	55 ± 5	39,0 ± 0,8	8 ± 1	1 ± 2
	Brooks	34 ± 9	52 ± 4	34 ± 3	6 ± 1	5 ± 1
	Sunburst	26,9 ± 0,7	63 ± 7	38 ± 2	8 ± 1	4 ± 2
	Regina	45 ± 2	64 ± 4	47 ± 2	5,0 ± 0,6	3 ± 2

* Se informa el promedio y la desviación estándar (n=2).

El análisis del contenido de ácidos urónicos por gramo de AIR (Tabla 3.4) tiene en cuenta en su cálculo el rendimiento de cada fracción. Así permite ver que los ácidos urónicos se concentran mayoritariamente en las **F-Na₂CO₃** para todas las variedades, especialmente en el estadio inmaduro, ya que se observa que disminuyen considerablemente con la madurez. Las **F-CDTA** están en segundo lugar en cuanto a la proporción de ácidos urónicos en el AIR (pared celular). En estas fracciones se observa que Brooks y Sunburst ven disminuida su proporción de ácidos urónicos al madurar, mientras que Sumele y Regina ven aumentado dicho contenido, no observándose cambios significativos ($p < 0,05$) para Chelan. En las fracciones extraídas con KOH se observan contenidos muy bajos de ácidos urónicos, en especial, en la **F-KOH4** (Tabla 3.4) los cuales, en general, disminuyen significativamente con la maduración del fruto. La proporción de ácidos urónicos del AIR extraídos con agua puede aumentar, disminuir o ser no significativamente diferente al madurar la cereza, ya que se compensa con el aumento del rendimiento extractivo (Tabla 3.2).

Tabla 3.4. Contenido de ácidos urónicos (anhidro) en mg /g de AIR en las fracciones obtenidas a partir de las cinco variedades de cerezas en el primer y último estadio de madurez.

		ÁCIDOS URÓNICOS (mg/g AIR)				
Estadio	Variedad	Fracciones				
		F-H ₂ O	F-CDTA	F-Na ₂ CO ₃	F-KOH1	F-KOH4
Inmaduras	Chelan	19	74	94	5	3
	Sumele	16	29	132	10	< 1
	Brooks	16	63	97	14	4
	Sunburst	13	56	142	10	3
	Regina	8	18	109	13	2
Maduras	Chelan	8	69	48	7	1
	Sumele	14	55	70	7	< 1
	Brooks	11	46	34	6	1
	Sunburst	10	25	53	3	3
	Regina	13	32	81	4	1

En la Tabla 3.5 se observa que el contenido de azúcares neutros en la fracción péctica extraída con H₂O aumenta con la madurez en todas las variedades en más de un 35%. En cambio, la fracción péctica soluble en CDTA presenta una disminución en el contenido de azúcares neutros en las variedades firmes con la maduración y un aumento en las variedades habitualmente conocidas como más blandas (Brooks y Sunburst). Por otro lado, se muestra una disminución del contenido de azúcares neutros con la madurez para las fracciones **F-KOH1** de Chelan, Brooks y Sunburst, fracciones predominantemente constituidas por glicanos entrecruzantes (hemicelulosas). El contenido de azúcares neutros de la fracción soluble en Na₂CO₃ se mantuvo, en general, constante con la madurez para todas las variedades. Ocurrió lo mismo en el caso de las fracciones solubles en KOH 4M. Como es de esperar, las fracciones extraídas en KOH 4M presentan la mayor proporción de azúcares neutros (Tabla 3.5) debido a que está constituida fundamentalmente por glicanos entrecruzantes.

Tabla 3.5. Contenido de azúcares neutros (anhídros) en g /100 g de fracción de las distintas fracciones obtenidas a partir de las cinco variedades de cerezas en el primer y último estadio de madurez.*

AZÚCARES NEUTROS (%)						
Estadio	Variedad	Fracciones				
		F-H ₂ O	F-CDTA	F-Na ₂ CO ₃	F-KOH1	F-KOH4
Inmaduras	Chelan	20 ± 6	20 ± 1	33 ± 3	35 ± 2	55 ± 4
	Sumele	20 ± 5	16 ± 4	25 ± 8	26 ± 1	74 ± 3
	Brooks	20 ± 1	12 ± 6	30 ± 2	31 ± 3	77 ± 4
	Sunburst	21 ± 4	15 ± 1	31 ± 1	36 ± 4	60 ± 8
	Regina	24 ± 2	17 ± 2	28 ± 2	30 ± 3	64 ± 7
Maduras	Chelan	31 ± 7	11 ± 7	32 ± 2	26 ± 1	50 ± 6
	Sumele	32 ± 1	12 ± 1	33 ± 1	28 ± 1	77 ± 1
	Brooks	27 ± 4	19 ± 2	30 ± 3	24 ± 2	66 ± 5
	Sunburst	36 ± 1	19 ± 1	36 ± 1	21 ± 1	49 ± 5
	Regina	33 ± 1	13 ± 3	29 ± 4	25 ± 2	56 ± 6

* Se informa el promedio y la desviación estándar (n=2)

El contenido de azúcares neutros expresado en mg / g de AIR se muestra en la Tabla 3.6. En ella puede verse que la mayor proporción de azúcares neutros de la pared celular (AIR) de las cerezas es extraíble en Na₂CO₃, tanto en el fruto inmaduro como en el maduro. Lo mismo había ocurrido con los ácidos urónicos (Tabla 3.4), habiendo mayor proporción de éstos que de azúcares neutros en esta fracción péctica para el fruto inmaduro. Estos datos indican que la mayor proporción de la pared celular de las cerezas está entonces constituida por pectinas covalentemente unidas, tal como lo adelantaron los rendimientos obtenidos al aislar las fracciones (Tabla 3.2). Excepto para la variedad Sumele, el contenido de azúcares neutros de la fracción extraída en Na₂CO₃ disminuye al madurar la cereza (Tabla 3.6).

La fracción péctica extraíble con CDTA presenta menor cantidad de azúcares neutros. Con la maduración, el contenido de azúcares neutros en **F-CDTA** cambia en un sentido u otro según la variedad.

Las **F-H₂O** son las que tiene la menor cantidad de azúcares neutros de todas las fracciones presentadas en la Tabla 3.6. Según la variedad, su contenido aumenta o se mantiene constante con la maduración. El contenido de azúcares neutros extraídos en KOH 1M es, en general, similar en ambos estadios de la ontogenia. La cantidad de ellos supera ampliamente el contenido de ácidos urónicos de esta fracción (Tabla 3.4), lo cual es coherente con el hecho de que está constituida principalmente por glicanos entrecruzantes (hemicelulosas). Lo mismo se observa para las **F-KOH4** la cual mostró en general mayor

proporción de azúcares neutros que la **F-KOH1**. Además, su contenido en azúcares neutros disminuyó significativamente ($p < 0,05$) al madurar el fruto, excepto para la variedad Sumele (Tabla 3.6). La maduración de las cerezas parecería, entonces, producir también una pérdida de las hemicelulosas que interactúan con las microfibrillas de celulosa, lo cual significaría una pérdida de elasticidad de la pared celular con la maduración.

Tabla 3.6. Contenido de azúcares neutros (anhídros) expresados en mg /g de AIR, de las distintas fracciones obtenidas.

		AZÚCARES NEUTROS (mg/g AIR)				
		Fracciones				
Estadio	Variedad	F-H₂O	F-CDTA	F-Na₂CO₃	F-KOH1	F-KOH4
Inmaduras	Chelan	8	28	77	25	27
	Sumele	7	11	59	23	44
	Brooks	8	8	56	37	54
	Sunburst	5	13	83	17	42
	Regina	5	7	72	22	45
Maduras	Chelan	7	12	45	26	15
	Sumele	12	12	60	25	39
	Brooks	8	17	30	24	20
	Sunburst	13	8	51	15	29
	Regina	10	7	50	18	22

Se puede observar que en la pared celular (AIR) de las cerezas, el contenido de ácidos urónicos totales (sumados los de las cinco fracciones) disminuye con la madurez en todas las variedades (Tabla 3.7). Esta disminución es mucho más importante para Brooks y Sunburst ($\approx 55\%$) y mínima (13%) para Regina, la variedad más firme. Por lo tanto, las variedades Brooks y Sunburst, informadas por los productores como las más blandas, sufren una pérdida importante de pectinas con la maduración, la cual, según lo previamente comentado, involucraría especialmente a las pectinas covalentemente unidas, aquellas extraíbles en Na₂CO₃. En cambio, la variedad Regina, la más firme, retuvo la máxima cantidad de pectinas en la matriz de su pared celular al madurar.

Con respecto al contenido de azúcares neutros totales, éstos disminuyen para todas las variedades, excepto Sumele (Tabla 3.7). La disminución es mayor para Chelan y Brooks (37%) y menor para Regina y Sunburst (28%). Por lo previamente comentado (Tabla 3.6) la disminución de los azúcares neutros totales estaría principalmente vinculada a la pérdida de ramificaciones pécticas (**F-Na₂CO₃**) y a la pérdida de glicanos entrecruzantes fuertemente unidos (**F-KOH4**) con la maduración.

Tabla 3.7. Contenido total de ácidos urónicos y de azúcares neutros en mg /g de AIR encontrados para ambos estadios de madurez.

Variedad	Ácidos urónicos totales (mg/g de AIR)		Azúcares neutros totales (mg/g de AIR)	
	Inmaduras	Maduras	Inmaduras	Maduras
Chelan	195	133	165	105
Sumele	188	146	144	148
Brooks	194	98	163	99
Sunburst	224	94	160	116
Regina	150	131	151	107

Analizando las relaciones molares de azúcares neutros a ácidos urónicos (AN/AU), las cuales dan idea de la proporción de cadenas laterales sustituyentes del RG-I por cadena de HG presente en las pectinas (Figura 3.2 A), o bien la relación de hemicelulosas a pectinas (Figura 3.2 B). Como es de esperar, las fracciones H₂O, CDTA y Na₂CO₃ estar enriquecidas en cadenas de HG presentando los valores más bajos de esta relación (entre 0,1 y 1,4) (Figura 3.2 A). En cambio, los valores oscilan entre 12 y 80 para las fracciones extraídas con KOH 4M y es menor a 10 en las fracciones poliméricas extraídas con KOH 1M, debido a la pequeña cantidad de ácidos urónicos que contienen. Se puede entonces observar que en este último caso, la proporción de pectinas remanentes asociadas al complejo hemicelulosa-celulosa es considerablemente mayor que en las fracciones poliméricas extraídas con KOH 4 M, en las que casi no hay restos de pectinas (Tabla 3.4). Tanto para **F-KOH1** y **F-KOH4** la relación AN/AU se mantiene en general constante con la madurez (Figura 3.2 B).

Para la fracción soluble en agua, la relación AN/AU aumenta al madurar la cereza, observándose el mayor incremento para la variedad Sunburst y el menor de todos para Regina. Además la fracción péctica soluble en agua que mostró la mayor proporción de AN/AU corresponde a Sunburst madura (Figura 3.2 A). Aunque menor, también se observa en general un aumento de la relación en la **F-Na₂CO₃**, excepto para Regina, donde no varía significativamente ($p < 0,05$). La menor relación AN/AU corresponde a Sumele inmadura (Figura 3.2 A). De estos resultados obtenidos tanto en agua como en Na₂CO₃ podría inferirse que la maduración va efectivamente acompañada por una mayor disminución de la proporción de HG que de azúcares neutros (sustituyentes laterales del RG-I) en las macromoléculas de pectina, tanto en las pectinas débilmente unidas a la pared (F-H₂O) como en aquellas pectinas entrecruzadas covalentemente (**F-Na₂CO₃**).

En cuanto a la relación AN/AU calculada para las **F-CDTA**, ésta resulta ser la menor de todas las mostradas por las fracciones pécticas (Figura 3.2 A), lo cual indica que se trata de pectinas ricas en HG, como es de esperar de aquellas entrecruzadas por Ca²⁺, a nivel de los grupos carboxilato de macromoléculas vecinas. Además, esta relación disminuye con la

madurez salvo para Brooks y Sunburst, para las cuales aumenta. En consecuencia, en Brooks y Sunburst disminuye la proporción de entrecruzamiento mediado por Ca^{2+} al madurar (Tabla 3.4). Esto explicaría la menor firmeza de sus tejidos, ya que las pectinas entrecruzadas por Ca^{2+} se concentran normalmente en la laminilla media (que cementa células contiguas) y en las juntas o *corners* tricelulares, que soportan el esfuerzo de cizalla ejercido por la presión de turgor intracelular (Marry et al., 2006). A la inversa, la disminución de la relación AN/AU para las demás variedades de cerezas parecería compensar, con el aumento de entrecruzamientos por Ca^{2+} , la disminución en la proporción de HG sufrida por las pectinas covalentemente entrecruzadas (**F- Na_2CO_3**) al madurar el fruto de estas variedades más firmes.

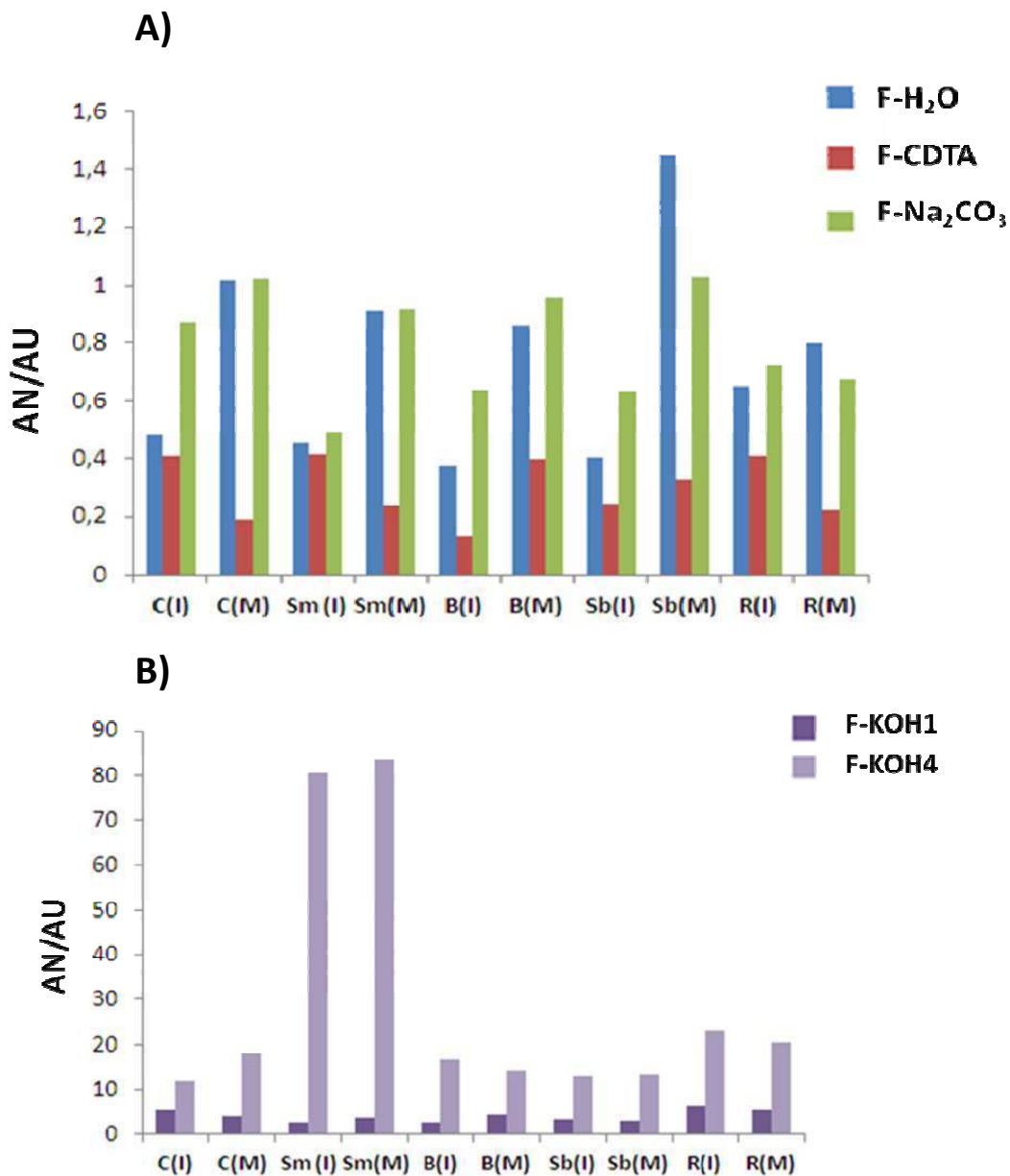


Figura 3.2. Relación molar azúcares neutros/ácidos urónicos de las fracciones **F- H_2O** , **F-CDTA** y **F- Na_2CO_3** (A), y de las fracciones de **F-KOH1** y **FKOH4** ricas en glicanos entrecruzantes (B) extraídas de las cinco variedades de cerezas: Chelan (C), Sumele (Sm), Brooks (B), Sunburst (Sb) y Regina (R), inmaduras (I) y maduras (M).

3.3.3.2 Cambios en la composición de azúcares neutros con la madurez.

3.3.3.2.1 Fracciones pécticas

Al igual que lo observado para las pectinas extraídas en agua de las ciruelas japonesas (Capítulo 2), los azúcares neutros predominantes en las fracciones pécticas de las cerezas (**F-H₂O**, **F-CDTA** y **F-Na₂CO₃**) son la arabinosa y la galactosa, seguidos por la ramnosa, todos ellos componentes del RG-I (Tabla 3.8). En mucha menor medida aparecen la xilosa, manosa, fucosa y glucosa, excepto en las fracciones extraídas con H₂O en las que estos monosacáridos (salvo fucosa) están en mayores cantidades, en el mismo orden que la ramnosa (Tabla 3.8). El contenido de manosa el cual podría atribuirse a la presencia de galactoglucomanos (GGM) solubles en agua, no se modificó significativamente con la maduración de la cereza (Tabla 3.8). Por el contrario, el contenido de xilosa disminuyó en las fracciones **F-H₂O** de las variedades Sunburst y Regina (Tabla 3.8). Los residuos de xilosa hallados en cereza seguramente son aquellos unidos a los residuos de ácido D-galacturónico, constituyendo así las porciones de xilogalacturonano en las macromoléculas de pectina solubilizadas en agua (Vincken et al., 2003). Por el contrario, el contenido de glucosa en general aumentó con la maduración (Tabla 3.8). En las fracciones **F-H₂O** se observa, en algún caso, cierta tendencia de la arabinosa a disminuir con la maduración. La galactosa, en cambio, se mantiene prácticamente constante al igual que la ramnosa (Tabla 3.8).

En las **F-CDTA**, la proporción de arabinosa es considerablemente elevada en relación al resto de los azúcares y no se ve modificada por efecto de la maduración. La proporción de galactosa, en cambio, disminuye respecto a lo observado en la **F-H₂O**, viéndose su contenido algo disminuido con la maduración para las variedades Chelan, Sumele y Brooks (Tabla 3.8). El contenido de ramnosa pasa a ganar importancia en ambos estadios ($\approx 12\%$), siendo del mismo orden que el de la galactosa, y no variando con la madurez.

En las **F-Na₂CO₃** también aumenta la arabinosa respecto de lo observado en las fracciones **F-H₂O**, siendo las fracciones que presentan mayor proporción molar de la misma ($\approx 80\%$). La cantidad de arabinosa no depende del grado de madurez del fruto. Los contenidos de galactosa y de ramnosa son semejantes a los observados en la fracción polimérica extraída con CDTA. Además en las **F-Na₂CO₃** se observa que la composición en galactosa (proveniente de las ramificaciones laterales del RG-I de las pectinas), disminuye con la maduración, especialmente en Sunburst (Tabla 3.8). Es evidente que la arabinosa es

el principal componente de las *hairy regions* de los RG-I de las pectinas de las cerezas. Serían entonces, fundamentalmente, cadenas de arabinanos sustituyentes más que de arabinogalactano-I, no viéndose afectados por la maduración.

Tabla 3.8. Composición de azúcares neutros, en moles %, de las fracciones pécticas (F-H₂O, F-CDTA y F-Na₂CO₃).*

Fracción	Estadio	Variedad	Monosacáridos (mol%)						
			Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glc
F-H ₂ O	Inmaduras	Chelan	9 ± 1	0	44 ± 1	8 ± 1	10 ± 1	20 ± 2	9 ± 1
		Sumele	8,6 ± 0,1	1,4	44 ± 8	5 ± 2	10 ± 2	24 ± 8	7 ± 3
		Brooks	8,0 ± 0,1	0	40 ± 9	6 ± 1	9,0 ± 0,6	27 ± 1	10 ± 1
		Sunburst	8 ± 1	0	31 ± 1	11 ± 1	12 ± 1	26 ± 3	12 ± 1
		Regina	6,0 ± 0,1	0,6	31 ± 5	11,6	12 ± 0,3	23 ± 1	13 ± 1
	Maduras	Chelan	10 ± 2	1 ± 1	30 ± 3	8 ± 1	11 ± 1	23 ± 1	17 ± 1
		Sumele	8,1 ± 0,1	1 ± 1	35 ± 10	7,4 ± 0,3	10,9 ± 0,7	24 ± 1	14,6 ± 0,5
		Brooks	7 ± 2	1 ± 0,3	40 ± 3	7,0 ± 0,5	10 ± 2	20 ± 4	15 ± 2
		Sunburst	10,1 ± 0,8	0,7 ± 0,2	40 ± 5	7,0 ± 0,2	9,2 ± 0,5	18 ± 1	15 ± 2
		Regina	8,7 ± 0,1	1,0 ± 0,2	36,3 ± 0,6	4,5 ± 0,1	11,7 ± 0,1	22 ± 1	15,8 ± 0,7
F-CDTA	Inmaduras	Chelan	11,0 ± 0,1	1,2 ± 0,8	73 ± 1	1,0 ± 0,1	0,3 ± 0,4	13 ± 1	0,5 ± 0,6
		Sumele	10 ± 1	0,9 ± 0,7	53 ± 3	5,8 ± 0,2	7,8 ± 0,1	19 ± 1	3,5 ± 0,2
		Brooks	11,6 ± 0,6	1,2 ± 0,2	59	2,9 ± 0,4	3,9 ± 0,3	16,7 ± 0,2	4,7 ± 0,1
		Sunburst	13,4 ± 0,4	3 ± 2	64 ± 1	5 ± 3	2,6 ± 0,6	10 ± 1	2 ± 1
		Regina	9 ± 2	0,7 ± 0,7	63,5 ± 0,9	3,8 ± 0,9	6 ± 4	11 ± 7	6 ± 4
	Maduras	Chelan	12,4 ± 0,5	1,0 ± 0,1	70 ± 1	1,9 ± 0,6	1 ± 0,3	9,9 ± 0,1	3,8 ± 0,7
		Sumele	13,7 ± 0,9	1,7 ± 0,4	70 ± 7	2,6 ± 0,6	1 ± 1	9 ± 5	2 ± 1
		Brooks	11,3 ± 0,5	1,4 ± 0,8	80 ± 0,8	0,9 ± 0,8	0,7 ± 0,7	4 ± 3	1,7 ± 0,7
		Sunburst	12 ± 1	1,3 ± 0,4	66 ± 5	3,5 ± 0,3	3 ± 1	11 ± 5	3,2 ± 0,7
		Regina	12 ± 1	1,4 ± 0,3	67 ± 3	3,7 ± 0,1	1,7 ± 0,4	10 ± 5	4,2 ± 0,1

* Se informa el promedio y la desviación estándar (n=2)

Continuación Tabla 3.8.

Fracción	Estadio	Variedad	Monosacáridos (mol%)						
			Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glc
F-Na ₂ CO ₃	Inmaduras	Chelan	10 ± 1	0,3 ± 0,3	76 ± 2	1,1 ± 0,5	0,1 ± 0,2	12 ± 1	0,5 ± 0,3
		Sumele	10,5 ± 0,7	0,8 ± 0,1	70 ± 5	2,1 ± 0,9	0,2 ± 0,3	15,8 ± 0,4	0,6 ± 0,8
		Brooks	10,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	75 ± 1	0,8 ± 0,1	0	13 ± 0,9	0,3 ± 0,1
		Sunburst	7,5 ± 0,8	0,3 ± 0,4	69,4 ± 0,1	0	0	22,8 ± 0,8	0
		Regina	10 ± 2	0,4 ± 0,1	66 ± 4	1,1 ± 0,3	0,5 ± 0,2	19 ± 1	3 ± 1
	Maduras	Chelan	7 ± 6	1,3 ± 0,4	83 ± 5	1,6 ± 1	0,1 ± 0,1	5 ± 2	2 ± 2
		Sumele	8 ± 1	0,8 ± 0,1	77 ± 1	3,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1	9,3 ± 0,7	1 ± 1
		Brooks	8 ± 2	0,5 ± 0,1	81,2 ± 0,8	1,4 ± 0,3	0,3 ± 0,1	6,6 ± 0,2	2 ± 1
		Sunburst	7,7 ± 0,8	0,3 ± 0,4	84 ± 5	2 ± 2	0,3 ± 0,2	5 ± 2	0,7 ± 0,9
		Regina	8,2 ± 0,2	0,4	78 ± 3	1,9 ± 0,9	0,5 ± 0,1	8,0 ± 0,3	3 ± 1

* Se informa el promedio y la desviación estándar (n=2)

3.3.3.2.2 Fracciones de glicanos

En las **F-KOH 1M**, que contienen habitualmente a los glicanos más débilmente unidos por enlaces de hidrógeno a la celulosa (Tabla 3.9), se siguen encontrando altas proporciones molares de arabinosa (55%) que aumentan con la madurez, seguida por la xilosa que disminuye levemente con la madurez. La xilosa pasa a ganar importancia frente a la galactosa, cuyo contenido es $\approx 10\%$, mientras que el de ramnosa es más bajo ($\approx 4\%$) y ambos no cambian significativamente ($p < 0,05$) con el grado de madurez. En los glicanos fuertemente unidos (**F-KOH 4M**) se observa que la proporción de arabinosa es menor y, como es de esperar, hay una alta proporción de glucosa, más consistente con la presencia de xiloglucanos. En ambas fracciones también se detectan cantidades pequeñas de fucosa y manosa (Tabla 3.9). Es interesante observar un nivel bajo pero significativo de ramnosa, lo cual pone en evidencia la presencia de pectina residual. Como se encuentra acompañada de muy bajos niveles de ácido galacturónico (Tabla 3.3), se trataría entonces de RG-I remanentes, físicamente asociados por enredos a la red de xiloglucanos-celulosa y/o de

arabinos. Por lo tanto, parte de la proporción de arabinosa, así como casi toda la galactosa de las fracciones **F-KOH1** y **F-KOH4** constituirían los restos de arabinogalactano-I y arabinanos, es decir, las *hairy regions* de los RG-I, responsables de los enredos de las pectinas a la red de glicanos-celulosa.

Tabla 3.9. Composición de azúcares neutros, en moles %, de las fracciones de glicanos (**F-KOH1** y **F-KOH4**).*

Fracción	Estadio	Variedad	Monosacáridos (mol%)						
			Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glc
F-KOH1	Inmaduras	Chelan	4,9 ± 0,4	1,2 ± 0,2	45,6 ± 0,9	23 ± 1	3,5 ± 0,3	10,8 ± 0,8	11,0 ± 0,6
		Sumele	2,8 ± 0,7	0,6 ± 0,1	57 ± 5	22 ± 4	2,5 ± 0,4	8,5 ± 0,1	6,6 ± 0,7
		Brooks	5,2 ± 0,3	1,3 ± 0,1	50 ± 1	16,7 ± 0,6	3,7 ± 0,4	12 ± 1	11,1 ± 0,1
		Sunburst	4,6 ± 0,8	1,3 ± 0,3	52 ± 4	21 ± 3	2,3 ± 0,3	10,9 ± 0,9	7,9 ± 0,6
		Regina	3 ± 0,8	0,4 ± 0,6	56 ± 3	24 ± 2	0,6 ± 0,8	9 ± 1	7 ± 2
	Maduras	Chelan	4 ± 2	1,0 ± 0,5	57 ± 9	15 ± 1	4,3 ± 0,8	9 ± 2	9,7 ± 0,6
		Sumele	4 ± 1	1,4 ± 0,5	59 ± 2	16 ± 1	4,0 ± 0,4	8 ± 1	7,6 ± 0,7
		Brooks	4,4 ± 0,1	1,5 ± 0,2	60 ± 2	12 ± 1	4 ± 1	7 ± 1	11,1 ± 0,1
		Sunburst	3,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1	55 ± 5	16 ± 2	1,4 ± 0,1	11,2 ± 0,9	11,3 ± 0,6
		Regina	4,1 ± 0,5	1,2 ± 0,3	56 ± 1	13 ± 1	4,7 ± 0,1	12 ± 1	9 ± 2
F-KOH4	Inmaduras	Chelan	3,7 ± 0,6	2,0 ± 0,1	28,8 ± 0,7	23 ± 1	7 ± 1	10,9 ± 0,4	25 ± 1
		Sumele	3,4 ± 0,1	1,9 ± 0,6	37 ± 5	23,3 ± 0,1	5,4 ± 0,3	10 ± 1	19 ± 1
		Brooks	3 ± 1	2,3 ± 0,1	36 ± 3	21 ± 1	4,8 ± 0,2	12,9 ± 0,9	20 ± 1
		Sunburst	4,1 ± 0,1	2,9 ± 0,5	34 ± 2	24 ± 3	6 ± 1	15 ± 3	14 ± 5
		Regina	3,6 ± 0,6	2,4 ± 0,6	27 ± 6	26 ± 1	5,0 ± 0,4	10 ± 4	26 ± 2
	Maduras	Chelan	4,7 ± 0,4	1,1 ± 0,9	30 ± 1	19,5 ± 0,7	7,7 ± 0,3	13 ± 1	24 ± 1
		Sumele	5,9 ± 0,8	1,7 ± 0,1	37 ± 1	17 ± 1	4 ± 3	8,8 ± 0,5	24 ± 3
		Brooks	4,5 ± 0,3	2,1 ± 0,1	32,6 ± 0,5	22 ± 2	4 ± 1	11 ± 2	23,8 ± 0,4
		Sunburst	5 ± 2	2,0 ± 0,4	36 ± 9	18 ± 2	5 ± 3	20 ± 8	14 ± 2
		Regina	5,8 ± 0,8	1,8 ± 0,6	38 ± 2	13,8 ± 0,4	9 ± 3	13,5 ± 0,8	18,1 ± 0,5

* Se informa el promedio y la desviación estándar (n=2)

3.3.3.3 Relaciones entre componentes poliméricos

Ya que el ácido D-galacturónico es el único componente de las cadenas de HG y la ramnosa se encuentra formando el *core* de las cadenas de RG-I, a partir de la relación de ácido urónico / ramnosa (AU/Ram) se puede tener una idea de cuál de estas dos cadenas poliméricas es la que predomina en las fracciones pécticas. La Figura 3.3 A permite observar que las fracciones extraídas en H₂O y CDTA están compuestas principalmente por pectinas ricas en HG, siendo la relación de AU/Ram siempre > 20 para las cerezas inmaduras. Previamente, se había mostrado que la proporción de AN/AU estaba, en general, entre 0,4 y 0,7 para estas fracciones (Figura 3.2 A). Tras la maduración, las pectinas extraídas en agua pierden cadenas de HG en todos los casos, mientras que las de CDTA las ganan, salvo en las dos variedades más blandas, Brooks y Sunburst, en las cuales disminuyen los HG, especialmente para Brooks (Figura 3.3 A).

La relación AU/Ram de las pectinas extraídas con Na₂CO₃ varía entre 10 y 20, siendo menor que para **F-H₂O** y **F-CDTA**, para todas las variedades y ambos grados de madurez (Figura 3.3 A). Se puede entonces concluir que estas pectinas tienen sus cadenas de HG alternadas con mayor frecuencia por ramnosa y, por lo tanto, hay mayor proporción de RG-I en estas macromoléculas de pectinas. Sólo para Chelan y Regina, las variedades más firmes y/o resistentes, la relación AU/Ram tiende a aumentar con la maduración en **F-Na₂CO₃** (Figura 3.3 A), mientras que para el resto de las variedades, esta relación disminuye al madurar el fruto. Comparando las relaciones AU/Ram (Figura 3.3 A) y AN/AU (Figura 3.2 A) se puede decir que, al madurar, las *hairy regions* de estos RG-I presentan una cantidad de azúcares neutros comparable a la longitud de los HGs presentes.

En la Figura 3.3 B se observa que las pectinas residuales que se coextraen con la fracción de glicanos entrecruzantes (**F-KOH1**) muestran mayor proporción de ácidos urónicos (D-galacturónico) que de ramnosa (AU/Ram > 4), mientras que esta relación disminuye significativamente (AU/Ram < 2) para la fracción de glicanos entrecruzantes más fuertemente unidos. Esto permite concluir que estas pectinas residuales son más ricas en RG-I que en HG.

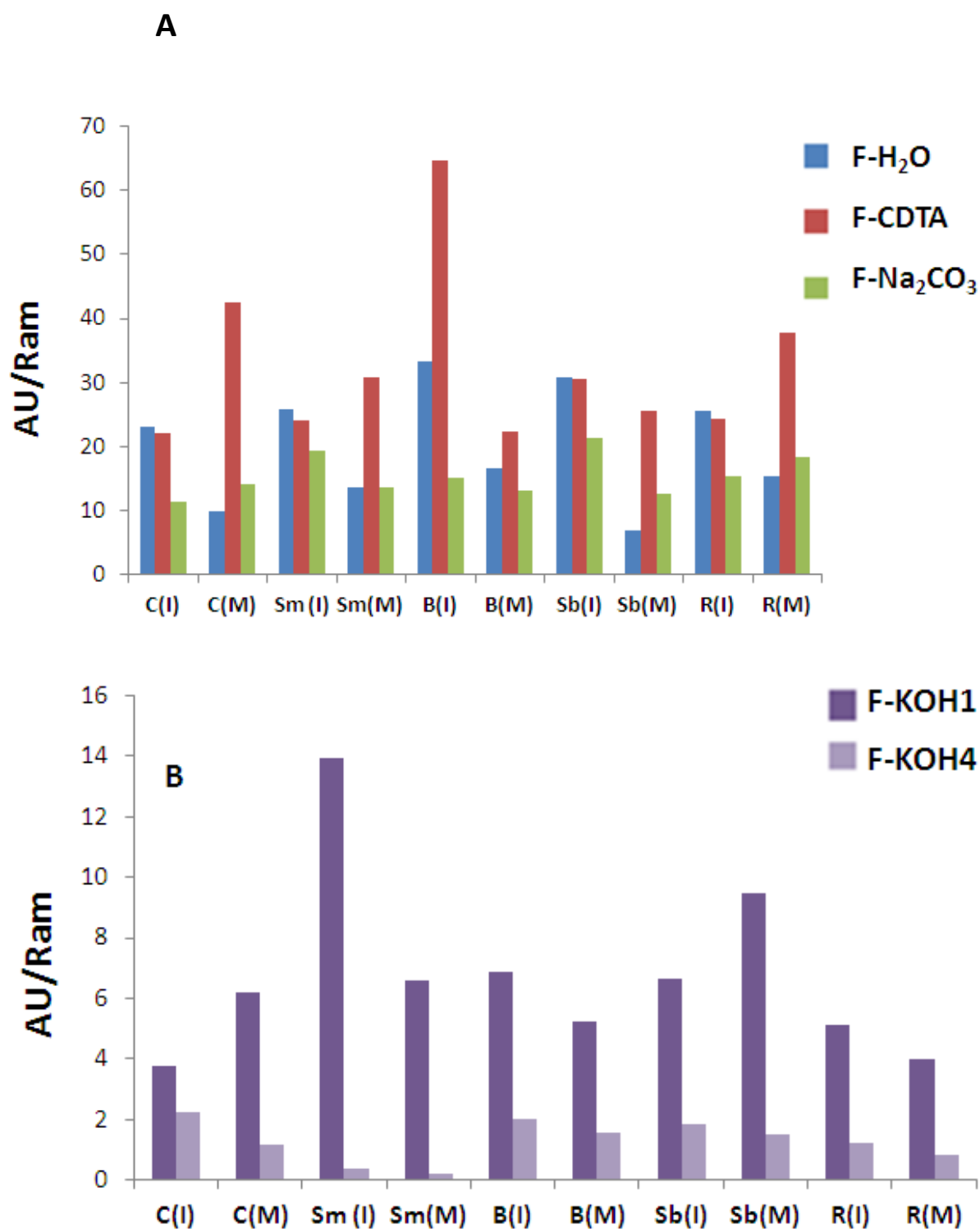


Figura 3.3. Relación molar ácidos urónicos/ramnosa en las fracciones **F-H₂O**, **F-CDTA** y **F-Na₂CO₃** (A), y en las fracciones **F-KOH1** y **F-KOH4** ricas en glicanos entrecruzantes (B), extraídas de las cinco variedades de cerezas: Chelan (C), Sumele (Sm), Brooks (B), Sunburst (Sb) y Regina (R), inmaduras (I) y maduras (M).

Es sabido que la arabinosa y galactosa se encuentran principalmente formando las cadenas laterales de las pectinas a nivel del RG-I (Carpita & Mc Cann, 2000), por lo tanto, a

partir de la relación Ara/Gal se puede estimar la importancia relativa de estos monosacáridos en las cadenas laterales, es decir, determinar si las pectinas extraídas son ricas en arabinanos, galactanos o en arabinogalactano-I (Figura 3.4 A). Analizando las fracciones pécticas (H_2O , CDTA y Na_2CO_3) se aprecia, en general, una relación Ara/Gal > 1 para todas las variedades, mostrando valores entre 3 y 20, según la fracción péctica. La menor relación Ara/Gal la muestran las pectinas extraídas en agua (Figura 3.4 A). No se encuentran cambios significativos entre los estadios para la fracción extraída en agua, aunque en Brooks y Sunburst habría una tendencia al aumento. En la fracción extraíble en CDTA se observa una relación entre 2,5 y 7 para todas las variedades, salvo para Brooks, donde la relación aumenta significativamente con la madurez, desde ≈ 3 hasta ≈ 20 . La mayor proporción de arabinosa con respecto a galactosa la presenta la fracción péctica solubilizada por el Na_2CO_3 , excepto en Sunburst y Regina inmaduras, determinándose cómo aumenta claramente con la madurez en todas las variedades: Chelan de 6 a 16; Sumele de 4 a 8; Brooks de 5 a 12, Sunburst de 3 a 16 y Regina de 3 a 9 (Figura 3.4 A). Este hecho sugiere la pérdida más específica de cadenas laterales de galactanos o arabinogalactanos con la madurez respecto de las de arabinanos, sin distinción de variedades.

Como la mayor parte de estas cadenas laterales de arabinosa y galactosa forman las regiones ramificadas de las cadenas de ramnogalacturonano I un cálculo de la relación $(Ara + Gal)/Ram$ permite estimar cuán ramificado se encuentra el esqueleto de RG-I (Figura 3.4 B). En las fracciones extraídas en H_2O o CDTA esta relación en general disminuye al madurar la cereza, sugiriendo una pérdida de las ramificaciones, aunque sin cambio en la proporción de ramnosa (Tabla 3.8). En cambio, la fracción péctica extraíble en Na_2CO_3 muestra no sólo los valores más altos para esta relación $(Ara + Gal)/Ram$ (8-13) respecto a las del resto de las fracciones pécticas sino que también se ve el aumento de la misma con la maduración en todas las variedades (excepto Sunburst), de lo que se puede inferir que aumentan las ramificaciones del RG-I. Sin embargo, esto se vio acompañado por una disminución de la proporción de ramnosa (Tabla 3.8) y por una disminución del contenido de ácido galacturónico (Tabla 3.3). Por lo tanto, con la maduración, las pectinas covalentemente relacionadas presentan cadenas más cortas de RG-I, pero presentando el mismo nivel de sustitución total (Figura 3.4 B) aunque más ricas en arabinosa (Figura 3.4 A). El aumento con la maduración de la proporción de arabinanos sustituyentes en estas pectinas, podría ser un recurso estructural para compensar la disminución de HGs entrecruzados por Ca^{2+} a nivel de la laminilla media y corners entre células contiguas, con el fin de mantener una mínima integridad de la pared celular en Brooks y Sunburst.

En las fracciones de glicanos entrecruzantes (**F-KOH1 y F-KOH4**), las pectinas son un componente minoritario, remanente de las extracciones previas. Sin embargo, cabe mencionar que la alta relación $(Ara + Gal)/Ram$ (> 10) detectada en las fracciones extraídas con KOH 1M, sugiere que los restos pécticos de RG-I (Tabla 3.9) que quedaron enredados en los glicanos presentan una alta proporción de ramificaciones.

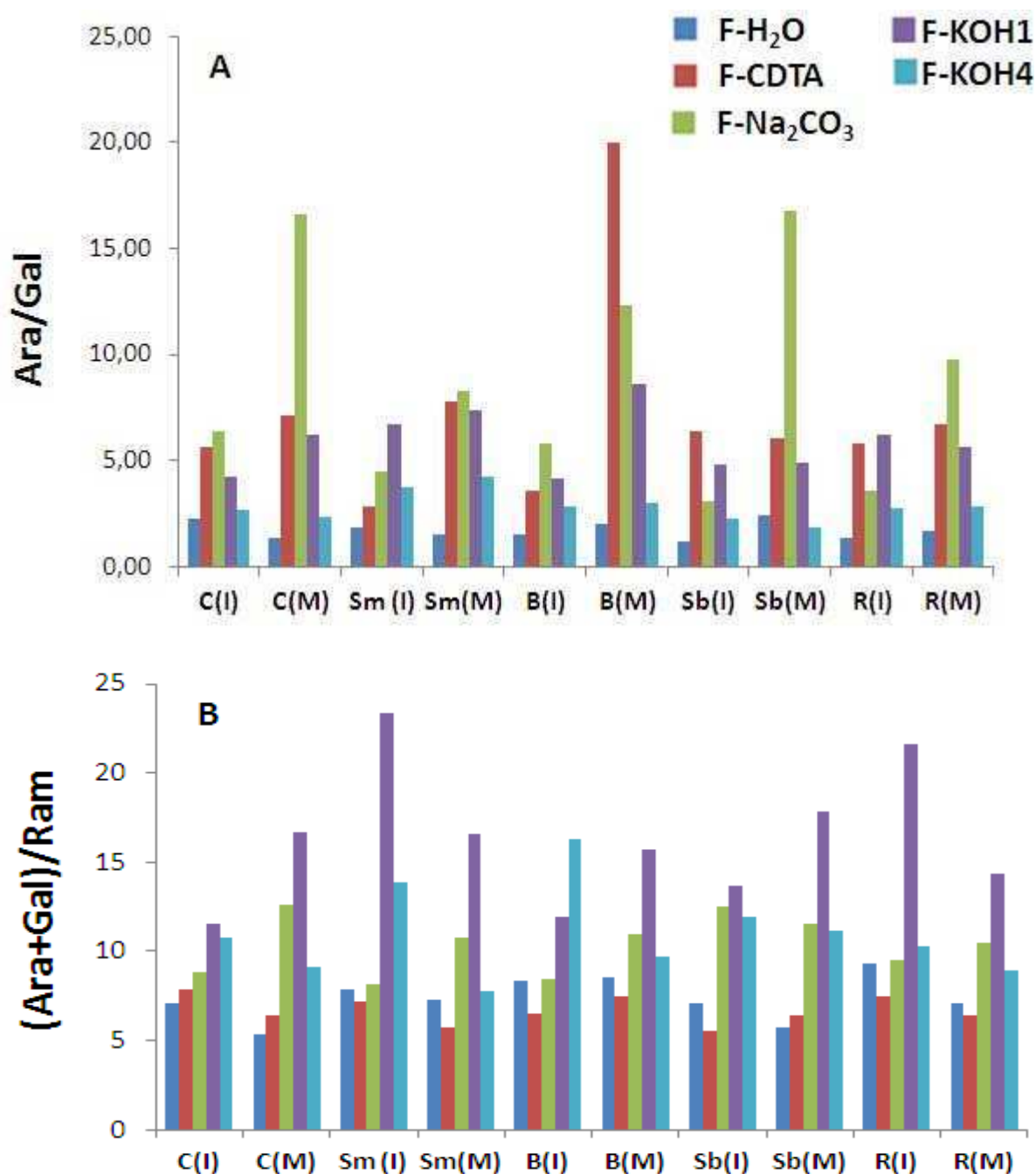


Figura 3.4. Relaciones molares: arabinosa/galactosa **(A)** y (arabinosa + galactosa)/ramnosa **(B)** de las cinco fracciones **F-H₂O**, **F-CDTA**, **F-Na₂CO₃**, **F-KOH1** y **F-KOH4** extraídas de las cinco variedades de cerezas: Chelan (C), Sumele (Sm), Brooks (B), Sunburst (Sb) y Regina (R), inmaduras (I) y maduras (M).

3.3.4 Despolimerización de pectinas y glicanos entrecruzantes

De cada una de las fracciones ricas en pectinas o en glicanos entrecruzantes se analizó la distribución del tamaño molecular mediante filtración en gel de Sepharose CL-6B para las fracciones **F-H₂O**, **F-KOH1** y **F-KOH4**, y Sepharose CL-2B para las fracciones **F-CDTA** y **F-Na₂CO₃**.

La fracción acuosa (Figura 3.5) muestra para todas las variedades inmaduras salvo Regina, perfiles anchos, que implican pectinas de rango amplio de pesos moleculares, aunque se distingue un pico desplazado hacia la zona de mayor peso molecular (izquierda). En cambio, los frutos maduros dieron curvas más deformadas indicando un aumento de la distribución de los pesos moleculares con la aparición de un segundo pico en la zona de pesos moleculares menores (derecha), excepto para Regina. Es evidente que para estas variedades de cerezas dulces, las pectinas extraídas en agua se despolimerizan parcialmente al madurar el fruto.

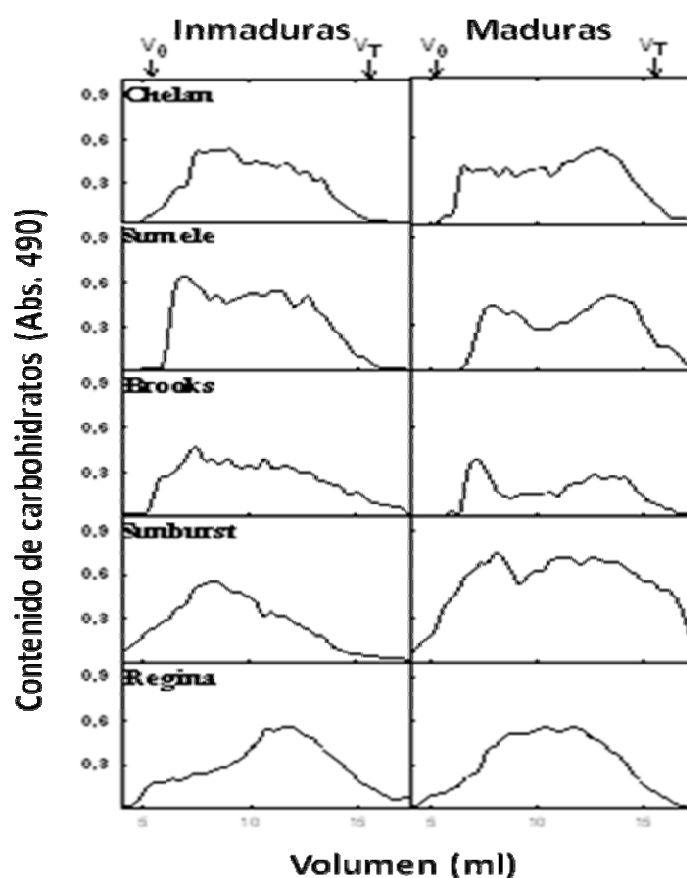


Figura 3.5. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de la **F-H₂O** de las cinco variedades de cerezas inmaduras y maduras fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B. V_0 , volumen muerto; V_T , volumen total.

Se puede observar en la Figura 3.6 que las pectinas extraídas con CDTA para las cinco variedades eluyen como un pico ancho de pesos moleculares medios, incluidos en la columna, sin presentar en general diferencias entre los estadios, indicando que no sufrieron variaciones importantes en el grado de polimerización. Cabe destacar, sin embargo, que en el caso de Sunburst se observó la desaparición de dos picos de peso molecular máximo (izquierda) al madurar, mientras que en Regina se observó, por el contrario, la aparición de un pico de peso molecular mayor.

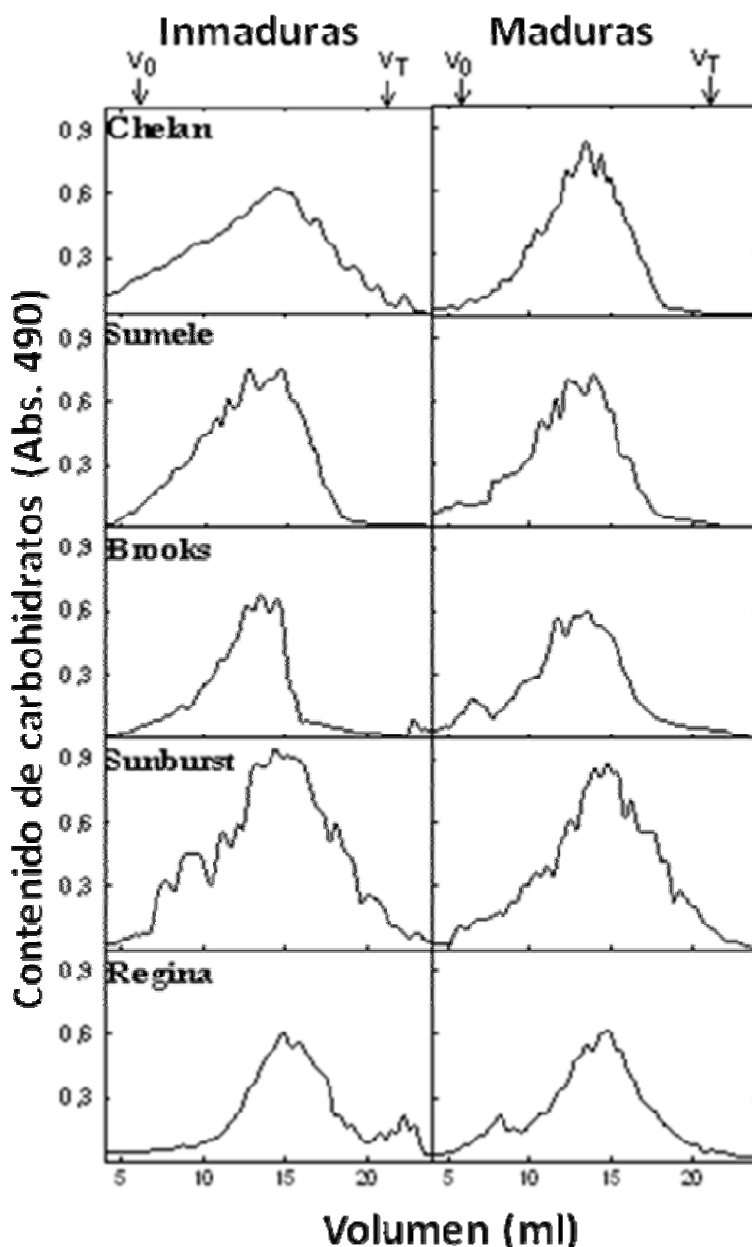


Figura 3.6. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de la F-CDTA de las cinco variedades de cerezas inmaduras y maduras fraccionadas en una columna de Sepharose CL-2B. V₀, volumen muerto; V_T, volumen total.

Las pectinas extraídas con Na_2CO_3 (Figura 3.7) de Brooks, Sunburst y Regina inmaduras eluyen también como un único pico en la zona de bajos pesos moleculares y se observa que al madurar, éstos se ensanchan aumentando así la distribución de pesos moleculares de las pectinas covalentemente unidas. Para las variedades Chelan y Sumele se ve un desplazamiento de los perfiles cromatográficos a zonas de menor peso molecular.

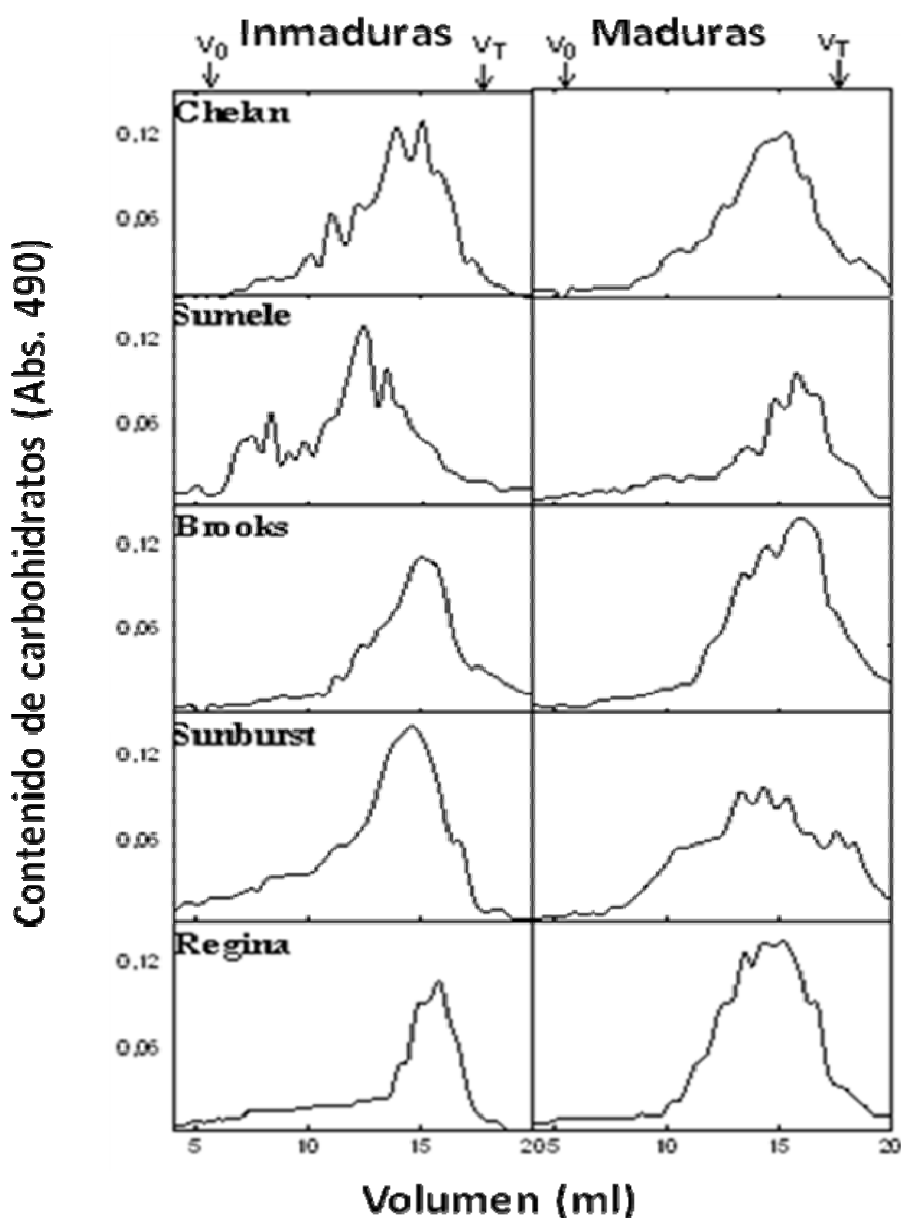


Figura 3.7. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de la $\text{F-Na}_2\text{CO}_3$ de las cinco variedades de cerezas inmaduras y maduras fraccionadas en una columna de Sepharose CL-2B. V_0 , volumen muerto; V_T , volumen total.

Observando los perfiles de peso molecular de los glicanos unidos débilmente (**F-KOH1**) se puede apreciar que no presentan grandes cambios con la maduración, pero se observa que todas las variedades maduras presentan dos picos, uno bajo y angosto a altos pesos moleculares y otro más alto y ancho a bajos pesos moleculares (Figura 3.8) como se observo en ciruelas japonesas (Ponce, et al., 2010) y en las variedades de cerezas dulces Sweetheart y Newstar (Salato, 2012) Los glicanos de la variedad Regina conservan idéntico perfil de pesos moleculares en ambos estadios.

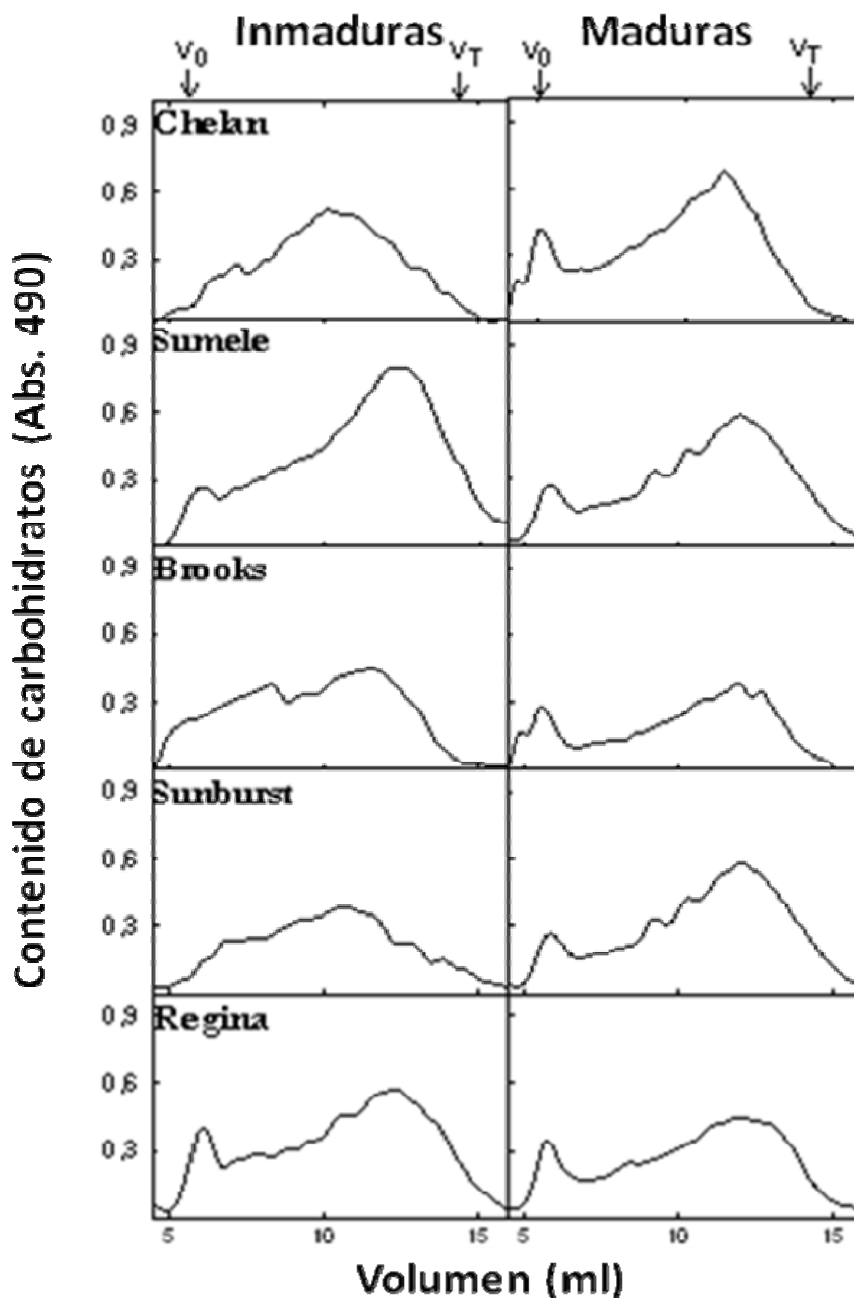


Figura 3.8. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de la **F-KOH1** de las cinco variedades de cerezas inmaduras y maduras fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B. V_0 , volumen muerto; V_T , volumen total.

Las fracciones de glicanos unidos fuertemente (**F-KOH4**) presentan cambios más notables con la maduración, mostrando un aumento de la proporción de polisacáridos de peso molecular medio y bajo y perdiendo aquellos de alto peso molecular (Figura 3.9).

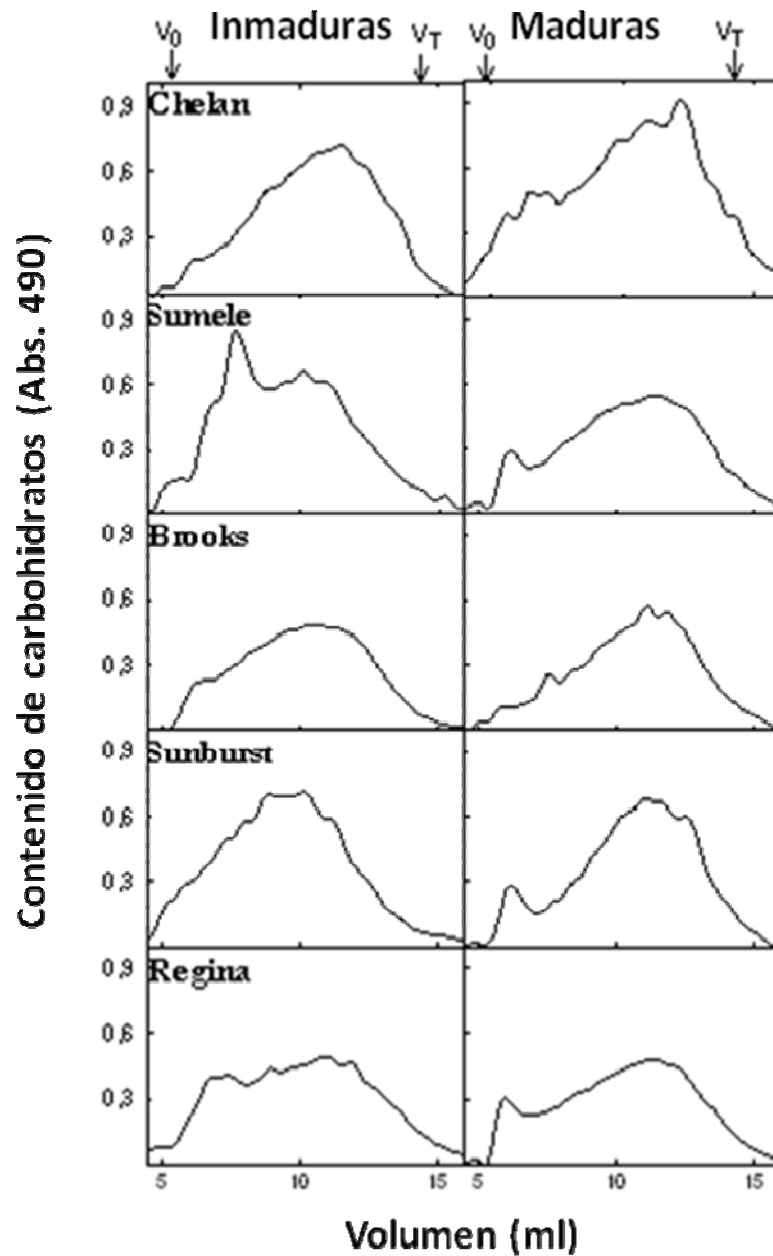


Figura 3.9. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de la **F-KOH4**, de las cinco variedades de cerezas inmaduras y maduras fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B. V_0 , volumen muerto; V_T , volumen total.

3.4 Discusión

Los polisacáridos que constituyen la pared celular de los frutos son pectinas, hemicelulosas y celulosa. Éstos sufren cambios en su estructura macromolecular durante el crecimiento y maduración de los frutos, lo cual afecta la arquitectura de la pared celular (Peña & Carpita, 2004). Los cambios más importantes que se han registrado en otras especies estudiadas son la solubilización y despolimerización de las pectinas, la pérdida de galactosa y arabinosa del RG-I y una importante despolimerización de los glicanos de la matriz (Brummell, 2006). Sin embargo, en pocos casos se ha intentado estudiar todos estos parámetros al mismo tiempo. Por otro lado, muchas veces se hace difícil poder comparar los resultados entre diferentes trabajos debido a las distintas técnicas utilizadas para inactivar las enzimas, para fraccionar y analizar la pared celular, así como a las distintas técnicas para medir la distribución de pesos moleculares.

En el presente trabajo se observa un leve aumento del rendimiento de pectinas solubles en agua con la madurez, concomitante con la disminución de las pectinas solubles en Na_2CO_3 , hechos que muy posiblemente se encuentran relacionados. En cambio, prácticamente no varía la cantidad de pectinas solubles en CDTA. Este aumento de pectinas solubles en la fracción H_2O durante la maduración, se observó también en otras dos variedades de cerezas dulces (Newstar y Sweetheart, Salato, 2012) y en otros frutos como uvas (Nunan et al., 1998), cerezas 'Bigarreau Napoleón' (Fils-Lycaon y Buret, 1990), ciruelas japonesas (Ponce et al. 2010), frambuesas (Vicente et al., 2007), peras 'Bartlett' (Ahmed y Labavitch, 1980) y kiwis (Redgwell et al., 1992) donde se relacionó con la disminución de pectinas en las fracciones de CDTA y/o Na_2CO_3 , lo que indica que durante la maduración las moléculas de pectinas unidas mediante puentes calcio o uniones covalentes se convierten en débilmente unidas (Brummell, 2006). De esta forma se puede decir que en estas variedades de cerezas hay una leve pero apreciable solubilización de las pectinas.

Con la maduración también se produce una pérdida de ácido D-galacturónico en todas las variedades de cerezas estudiadas tal como ocurre también en peras (Ahmed y Labavitch 1980; Yoshioka et al. 1992) y uvas (Nunan et al. 1998). Sin embargo Regina, variedad más firme, es la única que presenta un aumento en la proporción de ácidos urónicos hacia madurez en cada fracción. Al analizar el total de azúcares neutros y ácidos urónicos según el rendimiento obtenido de cada fracción (Tabla 3.6) sólo se observa que es menor el

contenido total de ácidos urónicos para las variedades más blandas aunque no se encuentren diferencias entre variedades para el total de azúcares neutros. Según Choi et al. (2002) la cantidad total de azúcares neutros y ácidos urónicos no están relacionadas con la firmeza de los frutos.

Como ya se mencionó, la arabinosa y la galactosa forman las ramificaciones del RG-I, por lo tanto en la fracción soluble en Na_2CO_3 se suele encontrar la mayor parte de Gal y Ara. Sin embargo, ambos azúcares también están usualmente presentes en cantidades importantes en las fracciones solubles en álcali, sugiriendo que una parte de RG-I se encuentra firmemente integrada a la matriz de glicanos, posiblemente mediante las cadenas laterales (Redgwell et al., 1997 b; Zykwiniska et al., 2005), lo cual es compatible con la alta ramificación observada en dichas pectinas.

La pérdida de galactosa es importante en especies como el tomate, durazno, melón y manzana. En muchos casos esta pérdida ocurre en los polímeros extraídos en álcali como en kiwi y melón (Redgwell et al. 1990) pero no parece ser importante en ciruelas, damascos, peras, arándanos y frambuesas (Brummell, 2006; Gross & Sams, 1984). En las variedades estudiadas en este trabajo, la pérdida de Gal es importante en la fracción de Na_2CO_3 y leve en las fracciones de glicanos, lo cual podría deberse a la acción de la enzima β -galactosidasa ya que en estudios anteriores se vio que la supresión de la actividad β -galactosidásica en estadíos tempranos de la maduración reduce significativamente el ablandamiento de los frutos, sugiriendo que la remoción de galactosa de las cadenas laterales de las pectinas es un factor importante en los cambios en la pared celular que llevan a la pérdida de firmeza durante la maduración (Salato, 2012).

Por otra parte en ciruelas, la arabinosa fue el azúcar neutro que más se perdió (Ponce et al., 2010) mientras que en duraznos esta pérdida se produjo en las fracciones correspondientes a glicanos entrecruzantes (Brummell et al., 2004). Por el contrario, en las cerezas este monosacárido aumentó con la maduración en todas las fracciones, sin presentar diferencias entre las variedades. Además la arabinosa está en mucha mayor proporción que la galactosa, por lo cual, a nivel del RG-I, predominarían las cadenas laterales de $(1\rightarrow5)\text{-}\alpha\text{-L-arabinanos}$ frente a las de $(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-galactanos}$ y, quizás también, frente a las de arabino- $(1\rightarrow4)\text{-galactanos}$ (arabinogalactano-I).

Brummell (2006) indicó que tanto la pérdida de galactosa como de arabinosa se pueden observar en diversos frutos con relación a los procesos de maduración, y que generalmente ocurren en los extractos alcalinos concentrados más que en los extractos de pectinas débilmente unidas. Contrariamente, en el presente trabajo de cerezas, la pérdida

de galactosa se observa principalmente en las fracciones pécticas. Brummell (2006) también agregó que la pérdida de las cadenas laterales de arabinanos y galactanos de RG-I durante la maduración es probable que altere la firmeza y la textura de la fruta. Sin embargo, en este caso no se observan diferencias claras en la pérdida de galactosa entre las diferentes variedades de distinta firmeza.

En literatura se han observado considerables diferencias en la despolimerización de pectinas durante la maduración entre distintas especies. Por ejemplo, las pectinas extraídas con CDTA de la frutilla (Huber, 1984), banana (Wade et al, 1992) y manzana (Yoshioka et al., 1992) no presentan cambios en los perfiles de pesos moleculares durante la maduración; en otras como el tomate (Huber y O'Donoghue, 1993) y el durazno (Brummell et al. 2004) se observó una despolimerización parcial. En cambio la palta (Sakurai y Nervins 1997) presentó una notable despolimerización de las pectinas. Por otra parte las pectinas extraídas con Na_2CO_3 generalmente eluyen como un pico de peso molecular medio y presentan sólo pequeños cambios en los perfiles de pesos moleculares. La despolimerización de las cadenas de HG puede ser atribuida en muchos casos a la enzima *endo*-poligalacturonasa (*endo*-PG) aunque el nivel de actividad de esta enzima es bajo en la fruta madura Brummell (2006). En las variedades de cerezas estudiadas, sólo las pectinas extraídas con agua (de entre todas las fracciones pécticas) son las que presentan una depolimerización parcial, ya que se observa un aumento de moléculas de bajo peso molecular a costa de una disminución de las de alto peso molecular. En las extraídas en Na_2CO_3 si bien eluyen prácticamente como un único pico, éste resulta más ancho al madurar, lo que se podría atribuir a la acumulación de polisacáridos nuevos. Esto concuerda con el hecho de que según la relación (Ara+Gal)/Ram (Figura 3.3 B) en el estadio maduro aumentan las ramificaciones sobre el RG-I.

Por otro lado, la despolimerización de glicanos (hemicelulosas) es uno de los cambios de la pared celular que se correlaciona estrechamente con el ablandamiento de los frutos (maduración). Esto se ha observado en la mayoría de las especies maduras estudiadas como frutillas (Huber, 1984), tomate (Gross, 1988), melón (Mc Collum et al., 1989), kiwi (Redgwell et al., 1991), palta (O'Donoghue y Huber, 1992) y durazno (Brummell et al., 2004). En algunos casos se observa tanto en los glicanos débilmente como fuertemente unidos y en otros sólo en uno de los dos. En las presentes variedades de cerezas se produce despolimerización de los glicanos entrecruzantes, especialmente de los unidos fuertemente (**F-KOH 4**), lo que ya había sido observado en las variedades Sweetheart y Newstar por Salato (2012).

A diferencia de la mayoría de los frutos, el ablandamiento de las cerezas no parece depender de la despolimerización de pectinas, dado que se observó una insignificante actividad de la enzima endo-PG durante la maduración de la fruta (Batisse et al. 1996b). No obstante, hay evidencias en cerezas del aumento de la actividad de otras enzimas como β -glucosidasa y β -galactosidasa durante ontogenia, las cuales promueven la solubilización de pectinas a partir de la desvinculación de algunas uniones covalentes entre ellas (Gerardi et al. 2001).

3.5 Conclusiones

A partir del análisis completo de la pared celular de estas cinco variedades de cerezas con características diferentes en el primero y último estadios de madurez, se pudo comprobar que se producen cambios importantes a nivel de pared celular durante la ontogenia.

Los cambios encontrados fueron los siguientes:

- 1) Pérdida de ácido D-galacturónico (22-30%), la cual fue mayor (55%) para las variedades reportadas como menos firmes (Brooks y Sunburst), y menor (13%) para la variedad más firme (Regina).
- 2) Los azúcares totales (sumados los de las cinco fracciones) disminuyen con la madurez para todas las variedades como también ocurre con los ácidos urónicos totales.
- 3) Leve solubilización de las pectinas covalentemente unidas.
- 4) Marcada pérdida de galactosa de las pectinas covalentemente unidas, la cual podría deberse a la acción de la enzima β -galactosidasa.
- 5) No se observó pérdida de arabinosa, por el contrario aumentó en todas las fracciones.
- 6) Aumento de las ramificaciones de RG-I de las pectinas extraídas con Na_2CO_3 .
- 7) Leve despolimerización de las pectinas débilmente unidas (F- H_2O), mientras que no se observó despolimerización de las pectinas iónicamente y covalentemente unidas.
- 8) Despolimerización de glicanos entrecruzantes fuertemente unidos a la matriz.

Contrariamente a lo esperado, todos estos cambios se observaron en las cinco variedades con diferencias muy sutiles, no se puede aventurar una conclusión definitiva sobre un patrón de metabolismo de pared celular diferenciado por las características de firmeza ni de susceptibilidad al *cracking* de las diversas variedades.

CAPÍTULO 4

Comportamiento de la pared celular de cerezas: composición química y propiedades funcionales de biopolímeros extraídos secuencialmente de dos variedades de cerezas en dos estadios de madurez

4.1 Introducción

Como ya se describió en el Capítulo 1, la pared celular tiene un rol esencial en cuanto a la textura de los vegetales (y entre ellos, a la de los alimentos de ese origen) porque, debido a su elasticidad y resistencia mecánica, soporta la presión de turgencia ejercida por el contenido celular (Jarvis, 2011). Estas características necesariamente deberán estar moduladas por la composición química y propiedades funcionales (propiedades reológicas y de hidratación) de los polímeros que constituyen las paredes celulares (Chanliaud et al., 2002; Toivonen & Brummell, 2008)

Como se describió en el Capítulo 3, durante la ontogenia en las cerezas y tal como ocurre con otras especies de frutas, se producen ciertos cambios a nivel de la pared celular: las pectinas se vuelven más solubles, algunas cadenas laterales de RG-I se eliminan (Kondo y Danjo, 2001), se produce un ablandamiento del fruto en cual parecen estar involucradas las enzimas degradantes (metil pectinesterasas, poligalacturonasas y β -galactosidasas) (Fils-Lycaon & Buret, 1990; Barrett & Gonzalez, 1994; Andrews & Shulin, 1995), aunque no existen patrones definidos para todos los frutos.

Las propiedades funcionales de los biopolímeros de la pared celular también se ven afectadas por los cambios químicos relacionados con la maduración del fruto, alterando su firmeza, y por ende su funcionalidad. Estas propiedades funcionales también son relevantes a la hora de aprovechar los residuos de la industrialización de vegetales para el aislamiento de biopolímeros de interés para la industria farmacéutica y de alimentos.

De las cinco variedades de cerezas dulces estudiadas en el Capítulo 3, para esta parte del trabajo, se eligieron las dos variedades que presentan características opuestas de firmeza: *i.e.* Regina, que como se mencionó se caracteriza por tener un mesocarpio firme y compacto, y Sunburst que es la más blanda de las variedades cultivadas en la Argentina

Mediante extracciones secuenciales de los componentes poliméricos de las paredes celulares de estas dos variedades de cerezas es posible estudiar la composición química y la forma en la que interaccionan los polímeros dentro de las paredes celulares (Capítulo 3) (Fry, 1986; Koh & Melton, 2002). El estudio de las características funcionales de los biopolímeros secuencialmente extraídos y de los residuos remanentes en cada paso extractivo pueden contribuir a entender su desempeño o funcionalidad biológica en la pared celular y los cambios relacionados con la maduración así como predecir la utilidad de

los biopolímeros extraídos, evaluando así la potencialidad de los residuos de la industrialización de las cerezas dulces.

4.2 Objetivo

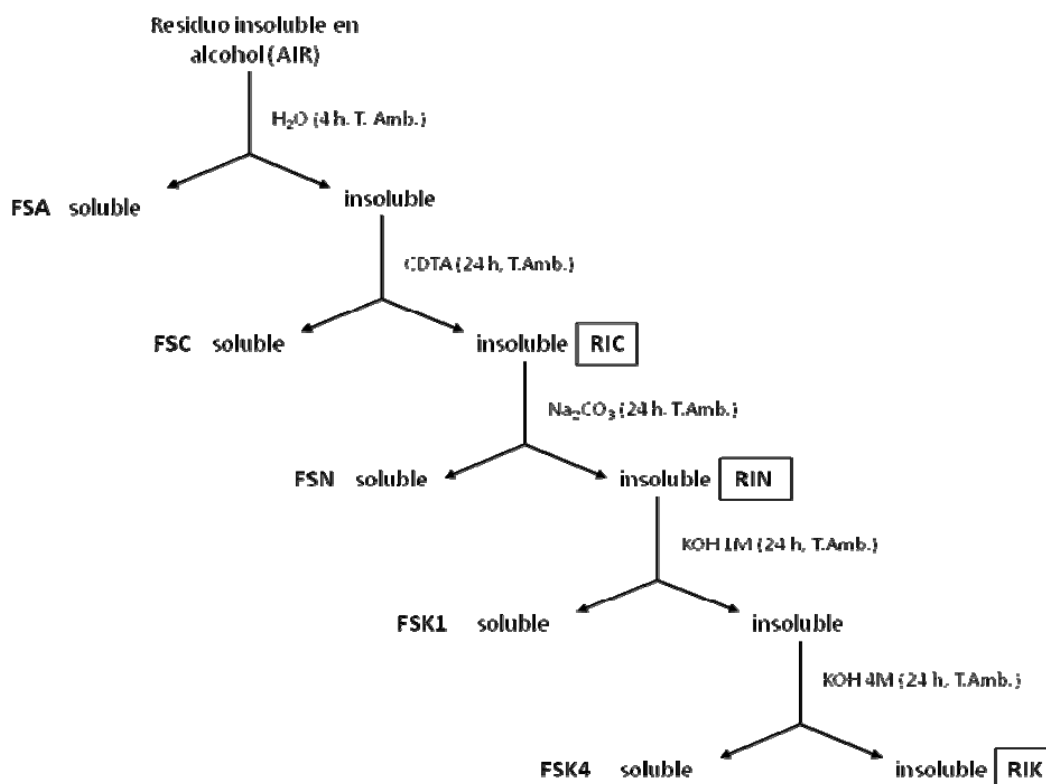
El objetivo del trabajo presentado en este capítulo consiste en estudiar los cambios asociados a la maduración que sufren los polímeros de las paredes celulares de dos variedades de cerezas de firmeza contrastante, en dos estadios de madurez y, simultáneamente evaluar el desempeño reológico de las fracciones solubles, así como las propiedades de hidratación de los residuos insolubles, todos ellos aislados en algunos pasos de la extracción secuencial de los biopolímeros de la pared celular. Esto contribuiría a entender los cambios relacionados con la maduración y su funcionalidad biológica.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Extracción de los diferentes biopolímeros

Para este estudio se eligieron dos variedades de cerezas dulces (*Prunus avium* L.) de firmeza contrastante, Regina y Sunburst, en dos estadios de madurez (inmaduro y maduro) las cuales fueron recolectadas de árboles localizados en el Alto Valle de Rio Negro un año después que las utilizadas en el Capítulo 3 (Ver Item 6.2).

Se obtuvieron las paredes celulares (AIR, residuo insoluble en alcohol) y se realizó la extracción secuencial completa (Ver Item 6.4 y 6.5.2) como se puede ver en el Esquema 4.1 donde se resaltan tanto las fracciones como los residuos estudiados. Para todos los casos se recuperaron los sobrenadantes y residuos insolubles luego de centrifugación, diálisis y posterior liofilización. Así se obtuvieron las fracciones solubilizadas o residuales de cada etapa extractiva. Si bien en parte el procedimiento extractivo completo repite parte de lo realizado en el capítulo 3, esto fue necesario para poder aislar también los residuos de interés.



Esquema 4.1. Esquema de extracción de los biopolímeros.

4.3.2 Análisis químico de las fracciones

Sobre las fracciones solubles (**FSA**, **FSC**, **FSN**, **FSK1** y **FSK4**), se determinaron nuevamente azúcares neutros, ácidos urónicos, grado de metil-esterificación (DM), peso molecular y composición de azúcares neutros. Los resultados pueden observarse en las Tabla 4.1 y 4.2. Los resultados de estos análisis corroboran que estos parámetros no se vieron modificados de una cosecha a otra (3.4, 3.6, 3.8 y 3.9).

Aquí se resumen más brevemente las características encontradas en el presente estudio para las fracciones pécticas y de glicanos entrecruzantes de estas dos variedades durante la maduración.

4.3.2.1 Fracción extraída con agua (FSA)

- Pectinas con alto DM de los grupos carboxílicos (64-77%)
- AN/AU: aumenta para ambas variedades al madurar, siendo mayor para Sunburst (Figura 4.1 A).
- AU/Ram: disminuye en ambos casos al madurar (Figura 4.1 B).
- Zonas de las vellosidades de RG-I constituida por Ara en igual proporción en ambos estadios y por una proporción molar de Gal levemente menor en las cerezas inmaduras, y disminuye con la maduración (Figura 4.1 C y D).
- Aumento del contenido de ramnosa para ambas variedades al madurar (Tabla 4.2)

Se puede inferir una pérdida de cadenas HG durante la maduración, sugiriendo que el RG-I dominaría la estructura de las pectinas solubles en agua en los frutos maduros.

El peso molecular promedio de las fracciones **FSA** para ambos estadios de madurez de la variedad Regina es similar, en cambio para Sunburst decrece notablemente al madurar el fruto (Tabla 4.1).

4.3.2.2 Fracción extraída con CDTA (FSC)

- Pectinas enriquecidas en HGs.
- HGs tienen un bajo DM (47-50%) excepto los HGs de cerezas inmaduras de la variedad Regina (63%), decrece a 50% al madurar (Tabla 4.1).
- AN/AU y AU/Ram no muestran mayores diferencias durante la maduración siendo AU/Ram mayor para Regina, sugiriendo que las cadenas de HG están menos interrumpidas por torceduras (“*kinks*”) (Figura 4.1 A, B).
- La variedad Regina madura presenta la mayor proporción de cadenas de HG, las cuales darían largas zonas de unión a través de iones Ca^{2+} localizadas en la laminilla media, lo que justificaría la mayor firmeza de esta variedad.

El peso molecular promedio de los polímeros aislados en estas fracciones para ambas variedades no se vio afectado por la maduración (Tabla 4.1).

4.3.2.3 Fracción extraída con Na_2CO_3 (FSN)

- AN/AU para Sunburst es mayor que en las **FSA** y **FSC**, en cambio para Regina es similar a **FSA**. En ambos casos aumenta con la maduración (Figura 4.1 A).
- AU/Ram menor que en las otras fracciones pécticas, por lo que hay mayor proporción de RG-I. Para Sunburst esta relación disminuye con la madurez (Figura 4.1 B).
- Regiones de las vellosidades del RG-I principalmente compuestas por Ara (Figura 4.1 C).
- La Ara aumenta con la maduración, mientras que la Gal disminuye notablemente.

Los pesos moleculares promedios de los polisacáridos de las **FSN** para ambas variedades son similares en los dos estadios pero es mayor para las pectinas extraídas de la variedad Sunburst (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Rendimientos y análisis de las fracciones extraídas con H₂O (FSA), CDTA (FSC) y N₂CO₃ (FSN) mediante la extracción secuencial de las paredes celulares de Regina(R) y Sunburst (S) , inmaduras (I) y maduras (M).*

	FSA				FSC				FSN			
	RI	RM	SI	SM	RI	RM	SI	SM	RI	RM	SI	SM
Rendimiento (g/100 g AIR)	2,0 ± 0,2	3,0 ± 0,2	2,4 ± 0,2	3,6 ± 1,2	4 ± 2	5 ± 1	9 ± 4	4 ± 1	26 ± 2	17 ± 1	26 ± 5	14 ± 2
Azúcares neutros (g/100 g fracción)	27 ± 2	31 ± 1	22 ± 5	28 ± 1	12 ± 2	11 ± 4	14 ± 2	17 ± 1	27 ± 2	29 ± 6	32 ± 1	34 ± 1
Acidos urónicos (g/100 g fracción)	52 ± 2	48 ± 6	53 ± 1	50 ± 2	66 ± 4	69 ± 2	64 ± 1	71 ± 4	52 ± 2	50 ± 4	54 ± 2	46 ± 3
DM ^b (%)	72	77	74	65	63	50	47	51	19	21	18	22
Peso Molecular (kDa)	39	55	145	48	38	34	44	29	14	13	34	28
Distribución de pesos moleculares (ml)**	6,3	7,3	6,2	11,3	5,0	4,6	6,1	6,3	2,6	5,1	4,1	8,2

DM: grado de metilación

*Se informa el promedio y la desviación estándar (n=2)

**Expresada como ancho del pico a mitad de su altura (ml)

Tabla 4.2. Composición de azúcares neutros de las fracciones secuencialmente aisladas con H₂O (**FSA**), CDTA (**FSC**) y N₂CO₃ (**FSN**) moles/100moles.*

	FSA				FSC				FSN			
	R1	RM	S1	SM	R1	RM	S1	SM	R1	RM	S1	SM
Ramnosa	6,4 ± 0,1	8,3 ± 0,1	7,6 ± 0,4	10,1 ± 0,7	10 ± 2	13 ± 1	13,8 ± 0,4	12 ± 2	9 ± 2	8,2 ± 0,2	7,4 ± 0,8	8,2 ± 0,9
Fucosa	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,2	0,5 ± 0,7	1,1 ± 0,3	3 ± 2	1,0 ± 0,4	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1	----	0,3 ± 0,4
Arabinosa	32,0 ± 0,5	36,4 ± 0,6	31,0 ± 0,6	41 ± 5	58 ± 5	66 ± 4	64 ± 2	65 ± 5	67 ± 5	78 ± 3	69,5 ± 0,1	84 ± 6
Xilosa	12 ± 1	4,7 ± 0,6	11 ± 3	7 ± 1	8,3 ± 0,5	3,7 ± 0,3	7,7 ± 0,4	3,5 ± 0,3	1,1 ± 0,5	1,9 ± 0,9	----	1,9 ± 0,8
Manosa	12,7 ± 0,4	11,1 ± 0,1	12,6 ± 0,3	9,2 ± 0,3	3 ± 5	1,7 ± 0,3	4,7 ± 0,6	3 ± 2	0,3 ± 0,4	0,5 ± 0,1	----	0,2 ± 0,4
Galactosa	24 ± 2	22 ± 1	26 ± 2	17 ± 2	11 ± 8	10 ± 5	10,3 ± 2	11 ± 6	19 ± 2	8,2 ± 0,3	23,2 ± 0,8	8 ± 2
Glucosa	12,9 ± 0,3	16,8 ± 0,7	11,7 ± 0,1	14 ± 2	3 ± 2	3,8 ± 0,1	3 ± 2	3,3 ± 0,2	2 ± 3	2,5 ± 2	----	0,7 ± 0,9

*Se informa el promedio y la desviación estándar (n=2)

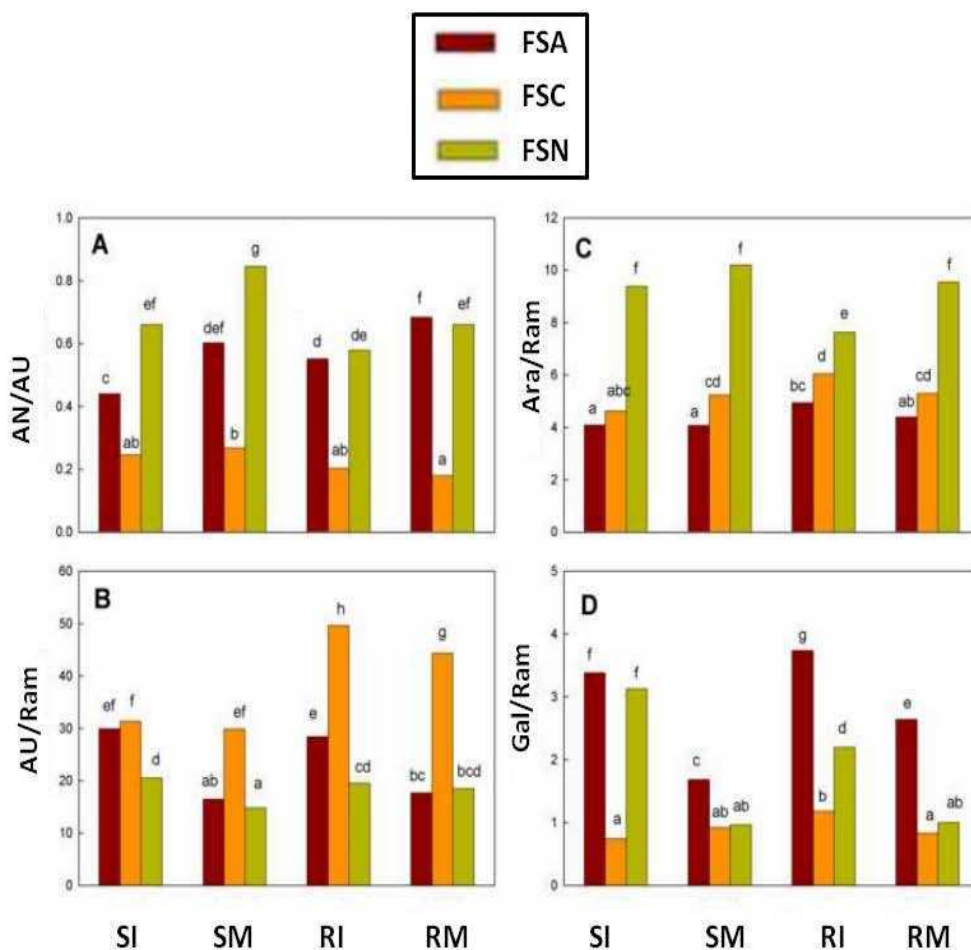


Figura 4.1. Relaciones molares para: azúcares neutros/ácidos urónicos (A), ácidos urónicos/ramnosa (B), arabinosa/ramnosa (C) y galactosa/ramnosa (D) de las fracciones **FSA**, **FSC** y **FSN** extraídas de las variedades Sunburst (S) y Regina (R), inmadura (I) y madura (M).

4.3.2.4 Fracciones extraídas con KOH 1M y 4M

- AN/AU cercano a 2 para ambas variedades inmaduras y entre 5 y 6 para las maduras, o sea que aumenta con la maduración (Figura 4.2 A).
- AU/Ram es baja en ambas fracciones, esto significa que se co-extrae RG-I con ambas fracciones de glicanos entrecruzantes (Figura 4.2 B).
- En **FSK1** se encuentran mayoritariamente arabinosilanos, en **FSK4** además de arabinosilanos hay xiloglucanos (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Rendimiento y análisis químico de las fracciones extraídas con KOH 1 M (**FSK1**) y 4 M (**FSK4**) de las paredes celulares de Regina(R) y Sunburst (S) , inmaduras (I) y maduras (M).*

	FSK1				FSK4			
	RI	RM	SI	SM	RI	RM	SI	SM
Rendimiento (% p/p)	11 ± 1	7 ± 1	10 ± 1	7 ± 2	7 ± 1	4 ± 1	7 ± 1	6 ± 2
Az. Neutros (g/100 g fracción)	20 ± 3	25 ± 2	17 ± 4	21 ± 1	32 ± 2	24 ± 1	28 ± 2	31 ± 3
Ac. Urónicos (g/100 g fracción)	12,0 ± 1,0	5,0 ± 1,0	10,0 ± 3,0	5,0 ± 1,0	3,0 ± 1,0	4,0 ± 0,5	3,3 ± 0,9	5,0 ± 0,8
Composición de azúcares neutros (moles/100 moles)								
Ramnosa	3,6 ± 0,8	4,1 ± 0,5	4,6 ± 0,8	3,7 ± 0,1	3,8 ± 0,6	5,8 ± 0,8	4,1 ± 0,1	5 ± 2
Fucosa	0,4 ± 0,6	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,1	2,5 ± 0,6	1,8 ± 0,6	2,4 ± 0,5	2,1 ± 0,4
Arabinosa	56 ± 3	56,5 ± 0,3	52 ± 4	49 ± 6	27 ± 6	42 ± 2	34 ± 2	36 ± 9
Xilosa	24 ± 9	13,4 ± 0,5	21 ± 3	17 ± 2	27 ± 1	13,8 ± 0,4	24 ± 3	18 ± 3
Manosa	0,6 ± 0,8	4,7 ± 0,1	2,3 ± 0,3	5,5 ± 0,1	5,1 ± 0,5	13 ± 4	6 ± 1	5 ± 3
Galactosa	9 ± 3	12 ± 1	11 ± 8	11 ± 1	10 ± 4	13,5 ± 0,8	15 ± 3	20 ± 8
Glucosa	6 ± 4	8 ± 3	7,4 ± 0,6	13 ± 3	26 ± 2	19,4 ± 0,5	14 ± 6	14 ± 2

*Se informa el promedio y la desviación estándar (n=2)

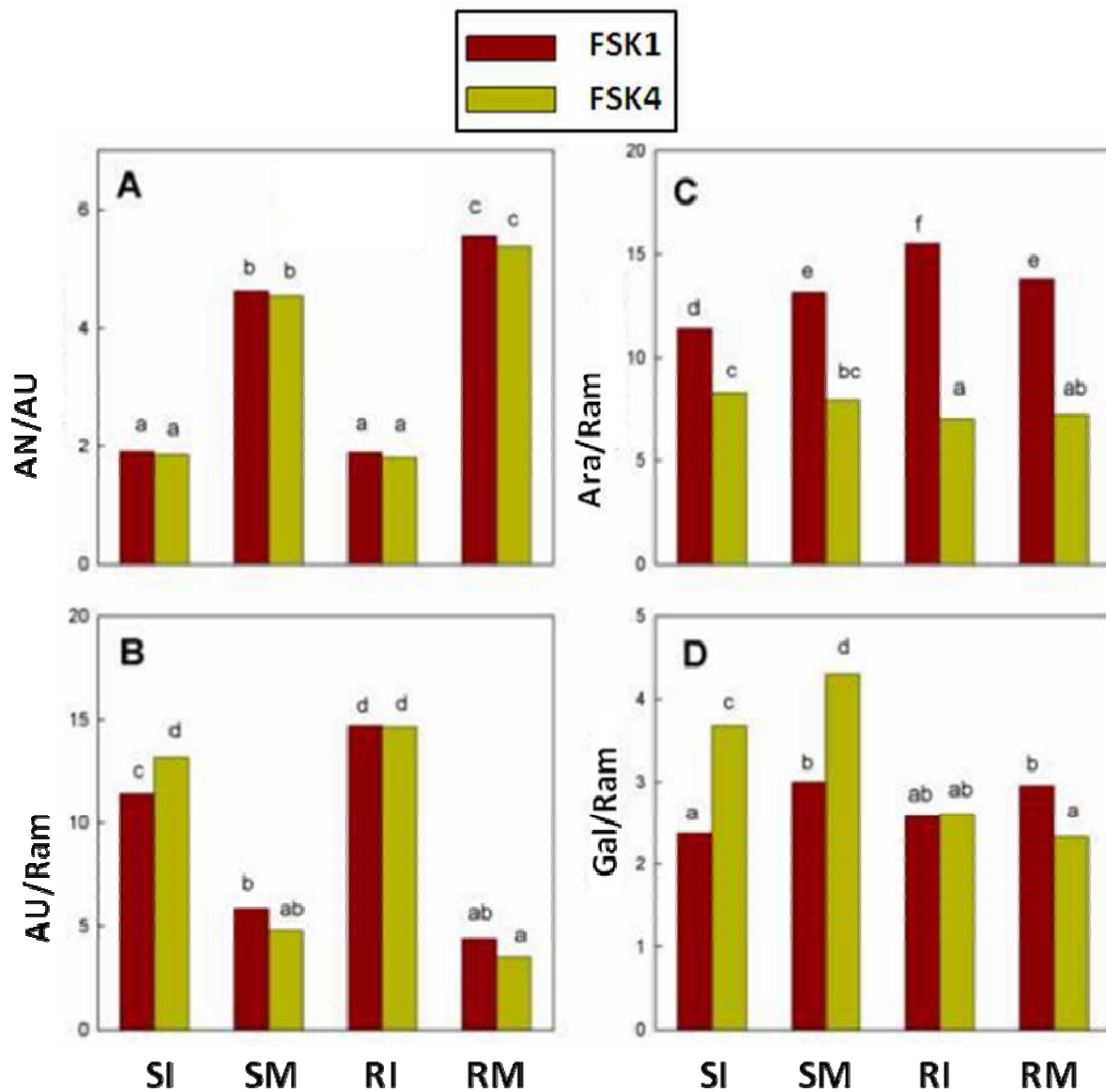


Figura 4.2. Relaciones molares para: azúcares neutros/ácidos urónicos (A), ácidos urónicos/ramnosa (B), arabinosa/ramnosa (C) y galactosa/ramnosa (D) de las fracciones **FSK1** y **FSK4** extraídas de las variedades Sunburst (S) y Regina (R), inmadura (I) y madura (M).

4.3.3 Caracterización reológica de las fracciones solubles en H₂O, CDTA y Na₂CO₃

Las fracciones poliméricas de la pared celular que fueron extraídas secuencialmente con H₂O, soluciones acuosas de CDTA y Na₂CO₃ representan principalmente pectinas débilmente unidas (**FSA**), iónicamente unidas (**FSC**) y covalentemente unidas (**FSN**) respectivamente. Dada su solubilidad en agua, se llevó a cabo la caracterización funcional de estas pectinas estudiando su comportamiento reológico en dicho solvente.

El comportamiento de flujo se determinó para los polímeros de las fracciones **FSA** y **FSC** a través de las curvas de viscosidad obtenidas sobre un rango de velocidades de corte o deformación tangencial ($\dot{\gamma}$) entre 10⁻⁴ y 0,1 -10 rad.s⁻¹ para cada solución acuosa polimérica (2 % p/p), por triplicado, a una temperatura constante de 20°C.

Para las soluciones de **FSA** de ambas variedades maduras se observa un plateau newtoniano a las más bajas velocidades de deformación y extendiéndose hasta aproximadamente 0,01 rad.s⁻¹ para ambas variedades maduras, y hasta 0,04 rad.s⁻¹ para las inmaduras (Figura 4.3 A). Las **FSA** aisladas de las variedades maduras muestran un valor de viscosidad newtoniana (η_0) entre 10 y 50 Pa.s, mientras que los valores de η_0 para las inmaduras son significativamente menores (\approx 2 Pa.s) (Tabla 4.4).

Para las **FSC**, el plateau newtoniano se extiende hasta valores de $\dot{\gamma}$ menores (\approx 10⁻³ rad.s⁻¹) que los de **FSA** (Figura 4.3 B). Para los valores de η_0 (\approx 1800 Pa.s) ocurre lo mismo que en las **FSA**, esto es, los de ambas variedades maduras son mucho mayores que los correspondientes a las inmaduras, (Figura 4.3 B; Tabla 4.4). A bajas velocidades de deformación, las macromoléculas se interpenetran unas con otras produciendo cambios más bien repentinos en las propiedades de flujo, lo que se demuestra en un incremento más pronunciado mayor tanto en la viscosidad newtoniana (η_0) como en la dependencia de la viscosidad con la velocidad de deformación. Debido a que a baja velocidad de corte ($\dot{\gamma}$), hay suficiente tiempo experimental para que se desarrollen nuevas interacciones entre los enredos intermoleculares inicialmente desatados o desenredados por los $\dot{\gamma}$ previamente aplicados (Ross y Murphy, 1994).

Como se describió en el Capítulo 2, a mayores velocidades de corte, es decir cuando termina la zona newtoniana, se puede observar claramente un comportamiento

pseudoplástico, el cual comienza cuando la velocidad de movimiento impuesta externamente al sistema es progresivamente mayor que la velocidad de formación de nuevos enredos entre las moléculas hidratadas (Figura 4.3). Por lo tanto la “densidad de entrecruzamientos” de la red (tridimensional macromolecular) se ve progresivamente disminuida a medida que aumenta $\dot{\gamma}$ y la viscosidad es entonces progresivamente reducida (Morris et al., 1981). En consecuencia, la escala de tiempo en la que ocurre el re-arreglo (intermolecular) de la red polimérica hidratada estaría relacionada a los tiempos de relajación intramolecular de las macromoléculas o, al menos, de relajación de la red polimérica estacionaria.

Cuanto más fluida es la red polimérica formada, el valor de la velocidad de deformación $\dot{\gamma}$ correspondiente al comienzo de la zona del comportamiento pseudoplástico aumenta, tal como se puede observar para los extractos **FSA** y **FSC** de ambas variedades inmaduras (RI y SI) (Figura 4.3 A y B).

Por otra parte, analizando las curvas de flujo en la zona de pseudoplasticidad se puede ver que algunas presentan mayores pendientes, lo que significa que existe una mayor dependencia de la viscosidad con la velocidad de corte. Esto se puede observar para el extracto **FSA** de Sunburst madura (Figura 4.3 A), así como para los extractos de **FSC** de ambas variedades maduras (Figura 4.3 B).

Una mayor dependencia con la velocidad de deformación se debe a que las asociaciones intermoleculares son más estables. Una red más estable, constituida por los polisacáridos hidratados, necesita más tiempo para relajar. Cuando la velocidad de corte es más alta, no hay tiempo suficiente para que las macromoléculas que constituyen la red hidratada puedan relajar y, entonces, se produce una disminución más rápida de la viscosidad que en sistemas menos estables. Este hecho puede ser analizado desde los valores de τ (tiempo de relajación estructural, Tabla 4.4) obtenidos mediante el ajuste de los datos experimentales al modelo de Cross (Ecuación 4.1), con el objetivo de obtener los parámetros reológicos que permitan comparar entre sistemas. El modelo ajustado se observa como una línea continua para cada curva en la Figura 4.3.

$$\eta(\dot{\gamma}) = \eta_{\infty} + \frac{(\eta_0 - \eta_{\infty})}{1 + (\tau \cdot \dot{\gamma})^m}$$

Ecuación 4.1. Ecuación correspondiente al modelo de Cross, donde $\eta(\dot{\gamma})$ es la viscosidad a cada valor de velocidad de corte, η_0 representa a la viscosidad a velocidad de deformación tendiendo a cero, η_{∞} representa la viscosidad para velocidades de corte máximas, τ es la constante de tiempo correspondiente al modelo de Cross, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de corte o de deformación y m es una constante adimensional.

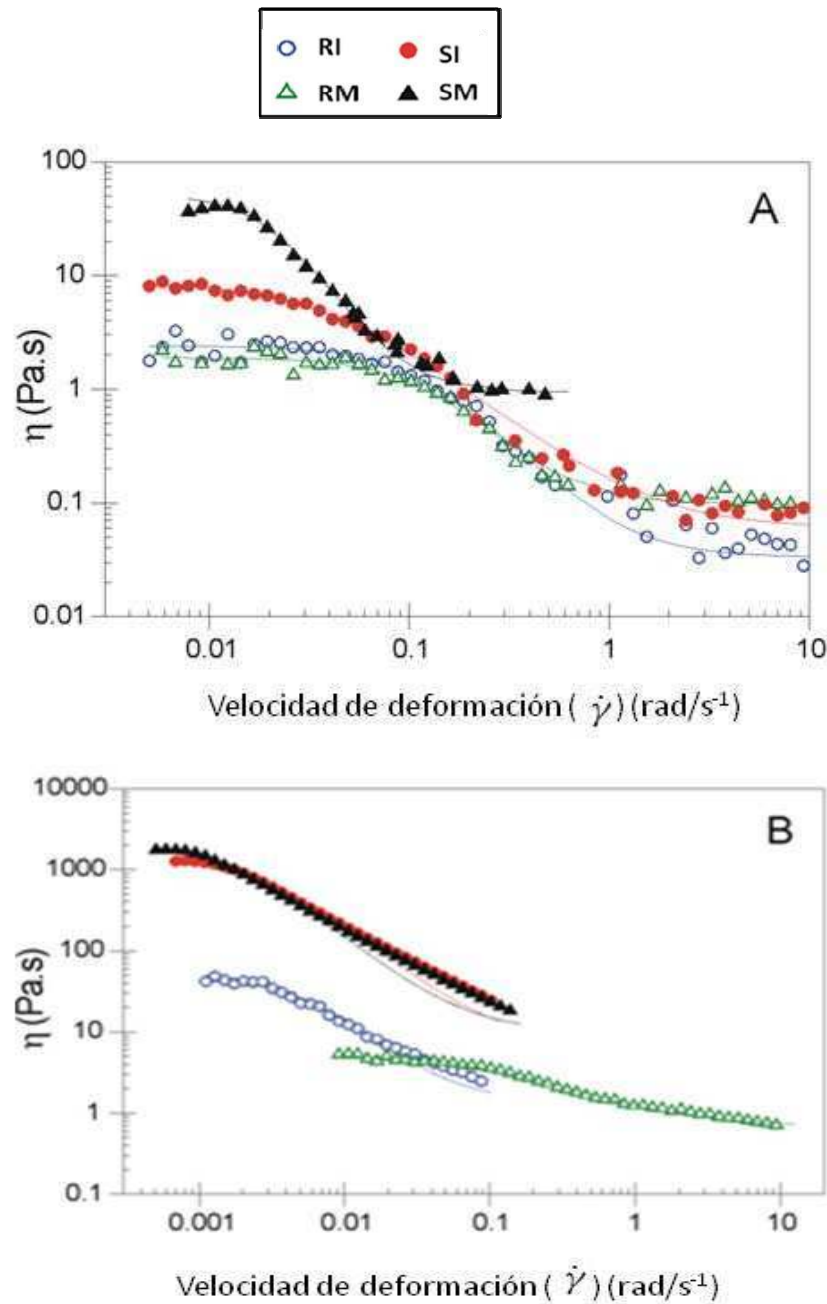


Figura 4.3. Curvas de flujo registradas para las fracciones FSA (A) y FSC (B) extraídas de Regina y Sunburst, inmadura y madura (RI, RM, SI y SM). Las líneas continuas corresponden al ajuste de los puntos experimentales obtenidos por triplicado mediante el modelo de Cross.

Como era de esperar, los valores más altos de τ corresponden a las **FSC** aisladas de las paredes celulares de Regina y Sunburst maduras, y decrece bruscamente para las **FSC** de los frutos inmaduros. Para los polímeros aislados con agua (**FSA**), los valores de τ mayores también corresponden a aquellos extraídos de las variedades maduras (Tabla 4.3).

Aun en ausencia de Ca^{2+} , las pectinas de las **FSC** son más estructuradas en agua y capaces de interactuar por sí mismas a través de solapamientos y enredos; estas interacciones entre los polímeros son menos transientes que las de las **FSA**.

El plateau newtoniano de la tercera zona, esto es, a las más altas velocidades de corte, correspondiente a la viscosidad residual o infinita (η_{∞}), es experimentalmente inaccesible para los sistemas de pectinas **FSC** (Figura 4.3 B), pero se lo puede observar claramente para las pectinas **FSA** (Figura 4.3 A).

Las pectinas interactúan en agua a través de uniones físicas, esto es, no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas). El efecto viscosante producido por un polisacárido en agua es dependiente de su composición química, estructura macromolecular y concentración. Su viscosidad está directamente relacionada con propiedades moleculares fundamentales tales como la configuración de las macromoléculas, el peso molecular y su distribución e interacciones intra e intermoleculares (Lefebvre & Doublier, 2005). Se ha evidenciado que el tamaño promedio de bloque desmetilado del HG y el patrón de distribución de estos bloques son biológicamente (o pueden *in vitro* ser) controlados por la actividad hidrolizante, por bloques, de una pectinmetil esterasa aislada de cítricos, produciendo pectinas con diferentes propiedades de hidratación (Zsivanovits et al., 2004), desempeño reológico y reactividad al Ca^{2+} , aún cuando estas pectinas tengan el mismo grado de metilesterificación (Guillotin et al., 2005; Willats et al., 2006; Cameron, Luzio, Vasu, Savary, & Williams, 2011).

Volviendo a la Tabla 4.1 y Figura 3.6 se puede observar que las pectinas de las **FSC** muestran una menor distribución de pesos moleculares que las correspondientes a **FSA** (Figura 3.5), así como también presentan la mayor proporción de cadenas de HG y además menos interrumpidas por *kinks* de ramnosa (sección 4.2.2.2). Estas características están indudablemente asociadas al alto poder viscosante que presentan en solución (Lapasin & Prich, 1995), lo cual concuerda con Morris et al. (2010) quienes pudieron caracterizar el comportamiento reológico de HG y RG-I, luego de separar selectivamente estas fracciones mediante una hidrólisis enzimática de las pectinas de la remolacha azucarera, obteniendo como resultado una viscosidad intrínseca mayor para la fracción rica en HG que para la de RG-I, Estos resultados confirman que una estructura semiflexible como la de HG da

soluciones de mayor viscosidad que una estructura de ovillos al azar (“*random coil*”) como la de RG-I.

Tabla 4.4. Parámetros del modelo de Cross determinados al ajustar los datos experimentales obtenidos al estudiar los ensayos de flujo (20°C) de las soluciones acuosas al 2 %p/p de los polímeros extraídos con agua y CDTA de Regina (**R**) y Sunburst (**S**) en los dos estadios de madurez (**I**, inmaduro; **M**, maduro).*

	Cereza	η_{∞} (Pa s)	η_0 (Pa s)	τ (s)	m	R^2
FSA	RI	0,03 ± 0,02	2,40 ± 0,07	8,7 ± 0,7	1,6 ± 0,2	0,956
	RM	0,06 ± 0,03	8,8 ± 0,2	23,7 ± 0,9	1,40 ± 0,06	0,995
	SI	0,10 ± 0,05	1,88 ± 0,06	8,3 ± 0,7	1,9 ± 0,3	0,958
	SM	0,9 ± 0,2	52 ± 3	51 ± 3	2,6 ± 0,2	0,992
FSC	RI	1,4 ± 0,4	51 ± 2	203 ± 14	1,6 ± 0,1	0,990
	RM	7,0 ± 0,9	1581 ± 30	411 ± 14	1,42 ± 0,04	0,998
	SI	0,68 ± 0,05	5,3 ± 0,1	7,0 ± 0,5	1,03 ± 0,07	0,992
	SM	10 ± 4	2221 ± 57	631 ± 28	1,47 ± 0,05	0,956

*Se informa el promedio y la desviación estándar (n=2)

Debido a que los sistemas acuosos de pectinas al 2 % p/p de las **FSN** (pectinas unidas covalentemente) no fluyen a temperatura ambiente, debieron evaluarse mediante ensayos oscilatorios.

Los espectros mecánicos obtenidos por barrido de frecuencia angular (ω) en tres décadas logarítmicas corresponden a geles verdaderos (Figura 4.4), donde G' está por encima de G'' en todo el barrido pero, como usualmente ocurre con biopolímeros, los módulos muestran una ligera dependencia con la frecuencia (Lefebvre & Doublier, 2005). Debido a esta última característica, se caracterizó el comportamiento ajustando los datos experimentales al modelo tipo ley de la potencia [Ecuaciones 4.2 y 4.3 (Kim & Yoo, 2006)]. Los parámetros obtenidos se muestran en la Tabla 4.5.

$$G'(\omega) = G_o' \cdot \omega^A \quad (4.2)$$

$$G''(\omega) = G_o'' \cdot \omega^B \quad (4.3)$$

Ecuaciones 4.2 y 4.3. G' y G'' son los módulos elástico o de almacenamiento y viscoso o de pérdida, respectivamente, G_o' y G_o'' son los módulos de equilibrio correspondientes; A y B son los exponentes relacionados a la dependencia de G' y de G'' con la frecuencia, siendo parámetros de ajuste; ω es la frecuencia angular (s^{-1}) (Kim & Yoo, 2006).

Analizando la Tabla 4.5 se observa que el módulo elástico (G') decrece entre 8 y 15 veces con la maduración, para ambas variedades, como se demuestra comparando los valores obtenidos para el parámetro G_o' . Además, los mayores valores de G' se obtuvieron para los polisacáridos de la variedad Regina tanto inmadura como madura, siendo los de Regina madura del mismo orden de magnitud que para Sunburst inmadura. El perfil de G' muestra una dependencia similar con la frecuencia para ambas variedades y estadíos como lo indica el exponente A .

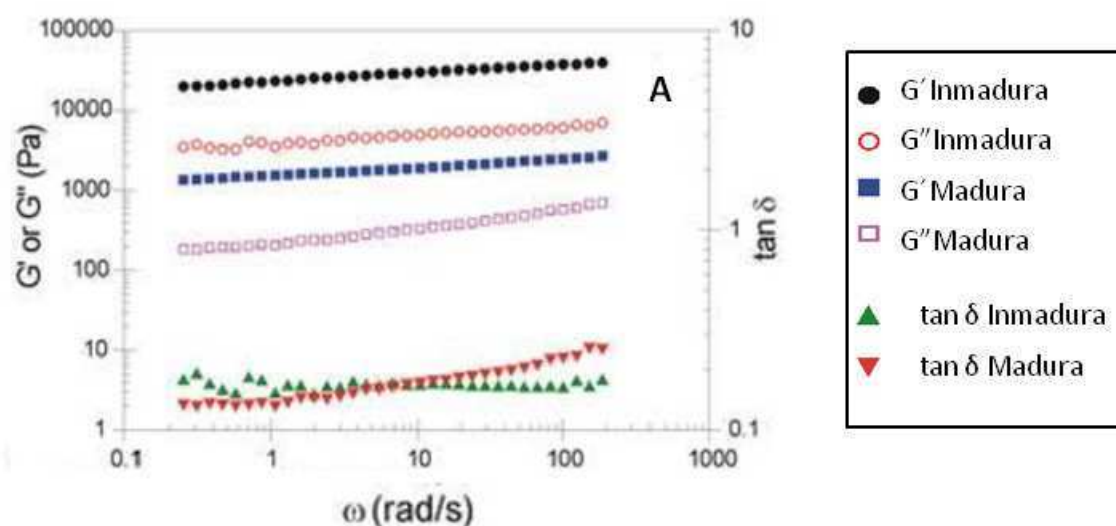
Además, analizando G'' se observa que es un orden de magnitud menor que G' , como lo muestran los valores de G_o'' (Tabla 4.5). Los altos valores de “ B ” indican que G'' es significativamente más dependiente de la frecuencia que G' excepto para las pectinas **FSN** aisladas de Regina inmadura (Figura 4.4 A y B, Tabla 4.5). En la Figura 4.4 A se observa que la tangente del ángulo de desfase δ ($\tan \delta = G''/G'$) tiene un valor próximo a cero y no muestra dependencia con la frecuencia para las pectinas **FSN** extraídas de Regina inmadura, tal como es esperable de un material viscoelástico sólido. Al madurar la variedad Regina, el gel péctico obtenido ya muestra dependencia de $\tan \delta$ con la frecuencia, aunque sigue mostrando valores cercanos a 0. Para las pectinas extraídas de la variedad Sunburst, tanto inmadura como madura, ambos barridos de $\tan \delta$ son altamente dependientes de la frecuencia y se alejan de cero, especialmente para las pectinas obtenidas de las cerezas maduras (Figura 4.4 B). Los espectros mecánicos obtenidos concuerdan con la mayor firmeza informada para la variedad Regina.

Como se analizó en la sección 4.2.2.3 y en la Figura 4.1, las pectinas de **FSN** para la variedad Sunburst, inmadura y madura, presentan más alta relación molar de AN/AU que las correspondientes a las **FSA** y **FSC**. Además esta relación aumenta significativamente en ambas variedades al madurar el fruto. Esto lleva a sugerir que cuando la relación AN/AU aumenta a 0,6 o más, la contribución elástica se reduce con la maduración como lo muestran los espectros mecánicos de los geles pécticos. Al mismo tiempo la relación molar de AU/Ram es menor en estas fracciones y disminuye significativamente al madurar el fruto;

Sunburst presenta el valor más bajo ($AU/Ram \approx 15$) calculado (Figura 4.1 B). En consecuencia, una relación molar de $AU/Ram \leq 15$ correspondería a una más baja contribución elástica (G') con respecto a la viscosidad (G'') en la microestructura del gel desarrollada por las pectinas de **FSN**.

Comparadas al resto de las fracciones, las pectinas de **FSN** están enriquecidas en RG-I. Estas regiones están formadas principalmente por arabinosa, mostrando la mayor relación molar Ara/Ram (≈ 9) (Figura 4.1 C). Entre ellas Regina madura presenta el mayor valor de esta relación, lo que sugiere que una alta proporción de “kinks” de ramnosa (*random coils* del RG-I) interrumpiendo las cadenas semiflexibles de HG. Si a eso se le suma la alta presencia de cadenas laterales de Ara en RG-I, pueden predecirse fuertes interacciones macromoleculares que conducen a la gelificación de soluciones de estas pectinas y a una mayor rigidez del tejido.

En conclusión, las diferencias observadas en la viscoelasticidad de los geles físicos producidos por las pectinas de las **FSN**, se pueden atribuir principalmente a la diferencia en la distribución de los pesos moleculares, a más altas relaciones molares de AN/AU (implica una alta proporción de RG-I con respecto a HG) y de Ara/Ram en los núcleos de RG-1, así como a menores relaciones AU/Ram. La relación molar AN/AU involucra una más alta (y probablemente adecuada) proporción de RG-I respecto a HG necesaria para tener el desempeño reológico observado en la Figura 4.4 (A y B).



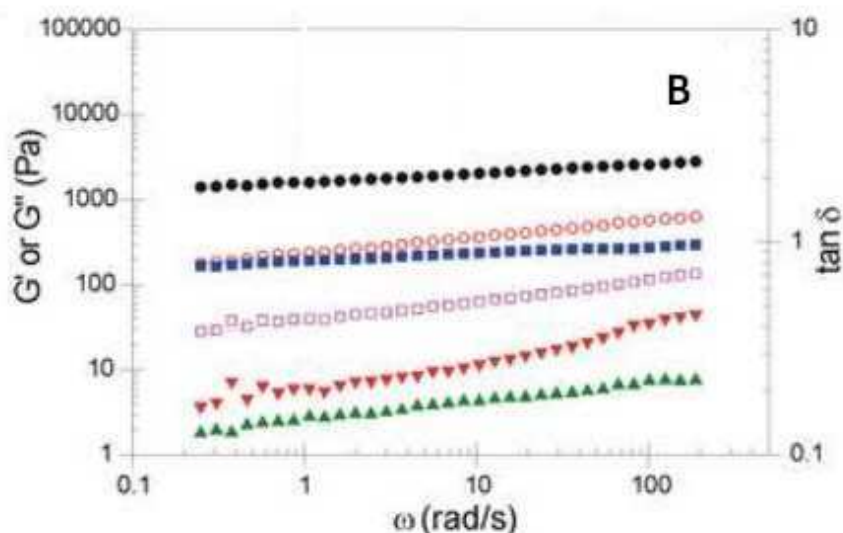


Figura 4.4. Espectros mecánicos de los sistemas acuosos de pectinas al 2 % p/p de las **FSN** extraídas de Regina (**A** página anterior) y Sunburst (**B**). La línea continua corresponde al ajuste de los puntos experimentales obtenidos por triplicado, al modelo tipo ley de la potencia (Ecuaciones 4.2 y 4.3; Kim & Yoo, 2006).

Tabla 4.5. Parámetros del modelo tipo Ley de la potencia determinados al ajustar los datos experimentales obtenidos del ensayo oscilatorios de los sistemas acuosos de pectinas al 2 % p/p de las **FSN** correspondiente a Regina(R) y Sunburst (S) inmaduras (I) y maduras (M).*

	Cereza	G_o'	A	R^{2**}
G' (Pa)	RI	23099 ± 86	0,105 ± 0,001	0,997
	RM	1525 ± 6	0,101 ± 0,002	0,994
	SI	1582 ± 6	0,108 ± 0,001	0,997
	SM	190 ± 1	0,087 ± 0,002	0,985
	Cereza	G_o''	B	R^2
G'' (Pa)	RI	3821 ± 47	0,106 ± 0,004	0,965
	RM	210 ± 3	0,206 ± 0,005	0,986
	SI	232 ± 1	0,193 ± 0,002	0,998
	SM	37 ± 1	0,247 ± 0,009	0,968

*Se informa el promedio y el desvío estándar (n=2)

** R: coeficiente de correlación.

4.3.4 Propiedades de hidratación de los residuos

Con el fin de caracterizar funcionalmente a los residuos insolubles remanentes de cada etapa de extracción secuencial realizada con soluciones de CDTA (**RIC**), Na₂CO₃ (**RIN**) y KOH 4M (**RIK**) (Esquema 4.1), se hicieron las siguientes determinaciones: volumen específico (VE), capacidad de hinchamiento (SC), capacidad de atrapamiento de agua (WHC), capacidad de retención de agua (WRC) y cinética de absorción de agua.

Los valores obtenidos para el volumen específico están entre 15 y 35 cm³/g para todos los residuos excepto para los **RIK** (residuos finales) de Regina y Sunburst maduras, los cuales fueron de 55 cm³/g o superiores (Figura 4.5). Se observa que el VE de los residuos finales aumenta significativamente al madurar el fruto para ambas variedades. Los **RIC** muestran VE mayores que los **RIN** para las dos variedades y en ambos estadios de madurez. Además se puede apreciar que los VE de **RIC** y **RIN** aumentan notablemente con la madurez para Regina pero no para la variedad Sunburst.

La capacidad de hinchamiento (SC), definida como la relación entre el volumen ocupado por la muestra luego de la inmersión en exceso de agua y su equilibración en ella durante 18 h y el peso inicial seco (Reghavendra et al., 2004), indica cuánto se hincha la matriz polimérica o fibras extraídas en el residuo al absorber el agua. En este ensayo está siendo considerada el agua débilmente asociada. Este parámetro varía entre 20 y 90 g/g y se ve que aumenta para la mayoría de los casos de la siguiente forma: **RIN** < **RIC** < **RIK**, sin mayor dependencia con la madurez para los residuos de CDTA y Na₂CO₃. El residuo final (**RIK**) de las cerezas maduras muestra valores de SC significativamente más altos que el resto.

El volumen específico (cm³/g) se puede usar como indicador de las diferencias en la estructura capilar del polvo ensayado (de Escalada Pla et al., 2007). Teóricamente cuanto más poroso es el sistema, puede absorber mayor cantidad de agua, asumiendo una composición química constante. En este caso la SC correlaciona significativamente (Pearson $r = +0.9790$; $p < 0.0001$; $\alpha = 0.05$) con el VE. Los **RIC** dieron altos valores de VE (≈ 30 - 35 cm³/g). Por lo tanto, muestran una alta porosidad después de deshidratados. Los residuos **RIC** están constituidos por las pectinas covalentemente unidas caracterizadas en las **FSN** y por pectinas residuales aisladas con KOH, así como por glicanos entrecruzantes, celulosa y lignina. Para todos los casos, el mayor valor del VE y SC se obtiene para los residuos finales

de la extracción secuencial (**RIK**), los cuales son el resultado de la extracción previa de las glicanos entrecruzantes y pectinas residuales constituidas por RG-I con cadenas laterales de arabinanos, ancladas a la red de glicanos entrecruzantes-celulosa.

En el presente trabajo, se determinó el contenido de celulosa y lignina de las paredes celulares concluyendo que estas están constituidas por un 17 y 13 % de celulosa y 8 % de lignina en ambas variedades. Por lo tanto los **RIK** (residuos finales) contienen únicamente celulosa y lignina. Esta celulosa remanente produce una microestructura más porosa y, además, parece relajarse ampliamente dando así altos valores de SC para estos residuos.

En los residuos posteriores a la extracción con carbonato (**RIN**) los glicanos entrecruzantes se encuentran fuertemente unidos a la celulosa mediante enlaces de hidrógeno, impidiendo la relajación de la celulosa lo cual conduciría a menor hinchamiento (menor SC) (Figura 4.5 B). Además la presencia de glicanos entrecruzantes conduce a una microestructura menos porosa (Figura 4.5 A). Por otro lado, la disminución de los volúmenes específicos y de la capacidad de hinchamiento observada para los **RIC** y **RIN** (Esquema 4.1) también se debería al menor contenido de pectinas en los mismos, mientras que la remoción de los glicanos entrecruzantes genera residuos (**RIK**) con los valores más altos de VE y SC para ambas variedades maduras. Sin embargo, los **RIK** obtenidos de las paredes celulares de ambas variedades inmaduras muestran VE y SC similares a los de los **RIC**, los cuales contienen pectinas (Figura 4.5 A y B).

Al eliminar las pectinas solubles en carbonato, ricas en RG-I y largas cadenas laterales de arabinanos ancladas a la red de XG-celulosa, se puede en parte alterar las características de la microestructura, y por lo tanto, la porosidad. También se sugiere que los valores altos para VE y la SC de los residuos finales (**RIK**) pueden ser el resultado del tratamiento sucesivo con dos soluciones alcalinas (KOH 1M y 4M), ya que estas soluciones alterarían la estructura de la celulosa produciendo diferentes alomorfos con distintas relaciones de uniones hidrógeno (Mittal et al., 2011).

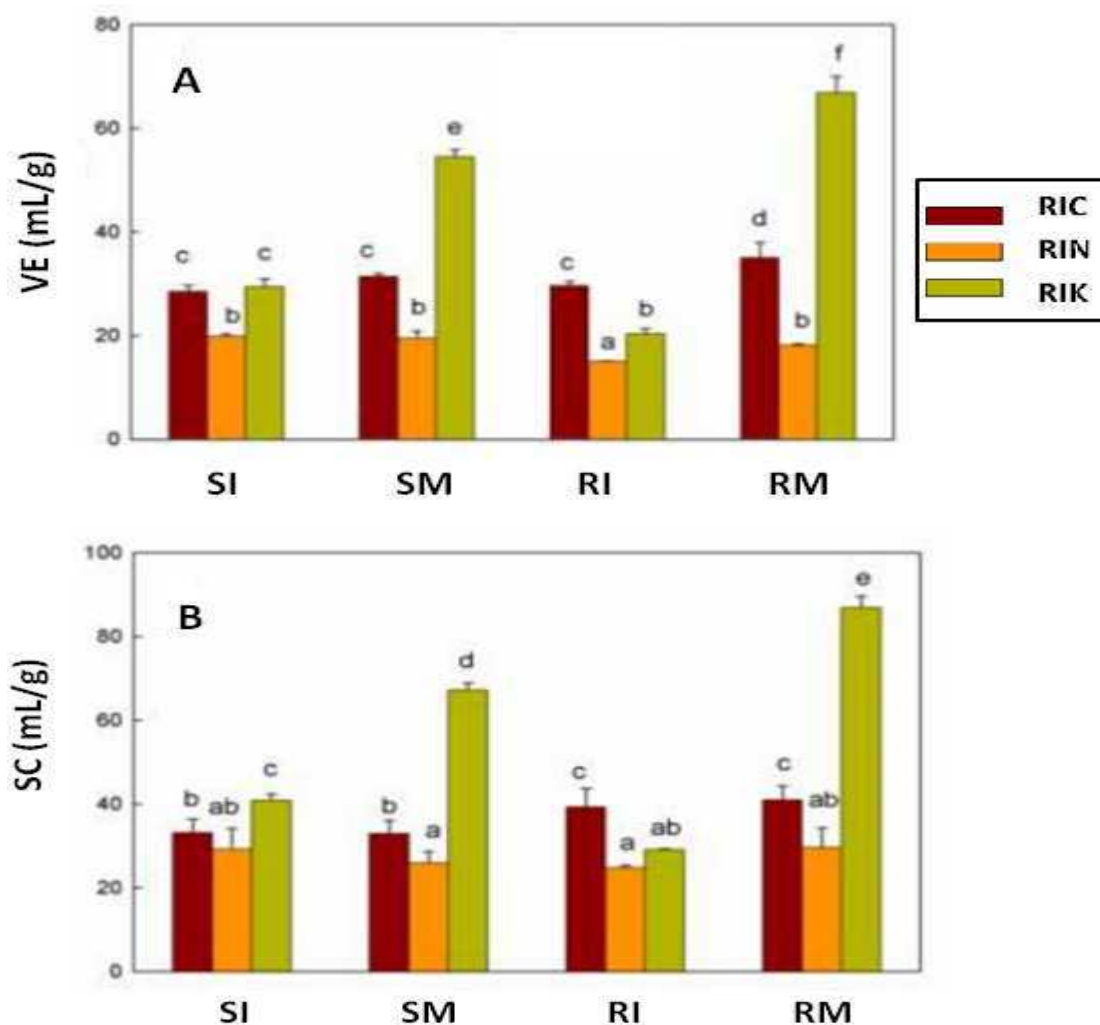


Figura 4.5. Volumen específico (A), capacidad de hinchamiento (B), determinadas para los residuos RIC, RIN y RIK de Regina y Sunburst (R, S), inmadura y madura (I, M).

La capacidad de absorción de agua de los polisacáridos de la pared celular es importante debido a que está relacionada a su función biológica en la pared celular. Además, estos polímeros de la pared celular son componentes de la fibra dietaria (Brett y Waldron, 1996) y su propiedad de absorción de agua es determinante de la masa fecal formada en el intestino, la cual está más relacionada con la forma en la que el agua es retenida más que con la cantidad absoluta retenida.

La máxima cantidad de agua que la fibra puede retener está relacionada a sus características químicas, físicas y microestructurales (Brett y Waldron 1996; Raghavendra et al., 2004). Los parámetros que permiten evaluar esta propiedad son: la capacidad de atrapamiento de agua (WHC) y la capacidad de retención de agua (WRC) (Raghavendra et al., 2004).

La capacidad de atrapamiento de agua (WHC) se define como la cantidad de agua retenida por la fibra sin aplicación de fuerzas externas, con excepción de fuerza de la gravedad y la presión atmosférica. Por lo tanto, este parámetro también incluye la proporción de agua débilmente asociada a la matriz de fibra. En la Figura 4.6 A se puede ver que los valores de WHC varían entre 24 y 40 g/g y disminuyen significativamente para ambas variedades de cerezas inmaduras en la siguiente dirección **RIC** > **RIN** > **RIK** lo que coincide con la complejidad decreciente de dichos residuos. Luego de madurar las cerezas, los **RIN** y **RIK** de Regina muestran el mismo WHC mientras que los **RIC** y **RIN** de Sunburst no difieren significativamente entre sí. De estos resultados se puede inferir que una alta proporción de pectinas, como aquella aún presente en los residuos de la extracción con CDTA, está asociada a una alta capacidad de atrapamiento de agua. Estos residuos (**RIC**) incluyen sólo las pectinas covalentemente unidas, probablemente a través de puentes diferúlicos, ancladas a la pared celular o red de glicanos entrecruzantes-celulosa mediante largas cadenas laterales de arabinanos, y estarían funcionando como un hidrogel. Estas pectinas representan aproximadamente el 26 % del total del material de la pared celular (calculado a partir de los rendimientos de las fracciones **FSN**) para ambas variedades inmaduras y disminuye abruptamente para los **RIC** obtenidos de las cerezas maduras (Tabla 4.1).

La capacidad de retención de agua (WRC) se define como la cantidad de agua remanente en las fibras hidratadas después de aplicar una fuerza externa como la centrifugación, por lo tanto este parámetro se relaciona con el agua fuertemente unida (Raghavendra et al., 2004). Los valores de WRC varían entre 12 y 31 g/g (Figura 4.6 B). Los correspondientes a los **RIK** son los más bajos para cada variedad y grado de madurez, excepto para Sunburst inmadura, el cual no fue significativamente diferente de los valores de WRC mostrados por los **RIN** (Figura 4.6 B). El **RIC** obtenido a partir de Sunburst inmadura muestra el valor más alto obtenido de WRC. Además se puede ver que los valores de WRC para de los **RIC** y **RIN** no presentan grandes diferencias entre ellos para la variedad Regina. Estos resultados demuestran que este parámetro de hidratación depende de la variedad de cereza.

Se puede observar que hay una correlación significativa entre WHC y WRC (Pearson $r=0,7841$, $p < 0,0025$; $\alpha = 0,05$). El valor más alto de WHC y WRC está relacionado a polisacáridos para los cuales el agua es un buen solvente, esto significa polímeros capaces de retener agua mediante enlaces de hidrógeno como las pectinas (RIC). En este caso el

WHC siempre es mayor que el correspondiente WRC para ambas variedades y estadíos (Figura 4.6 A y B).

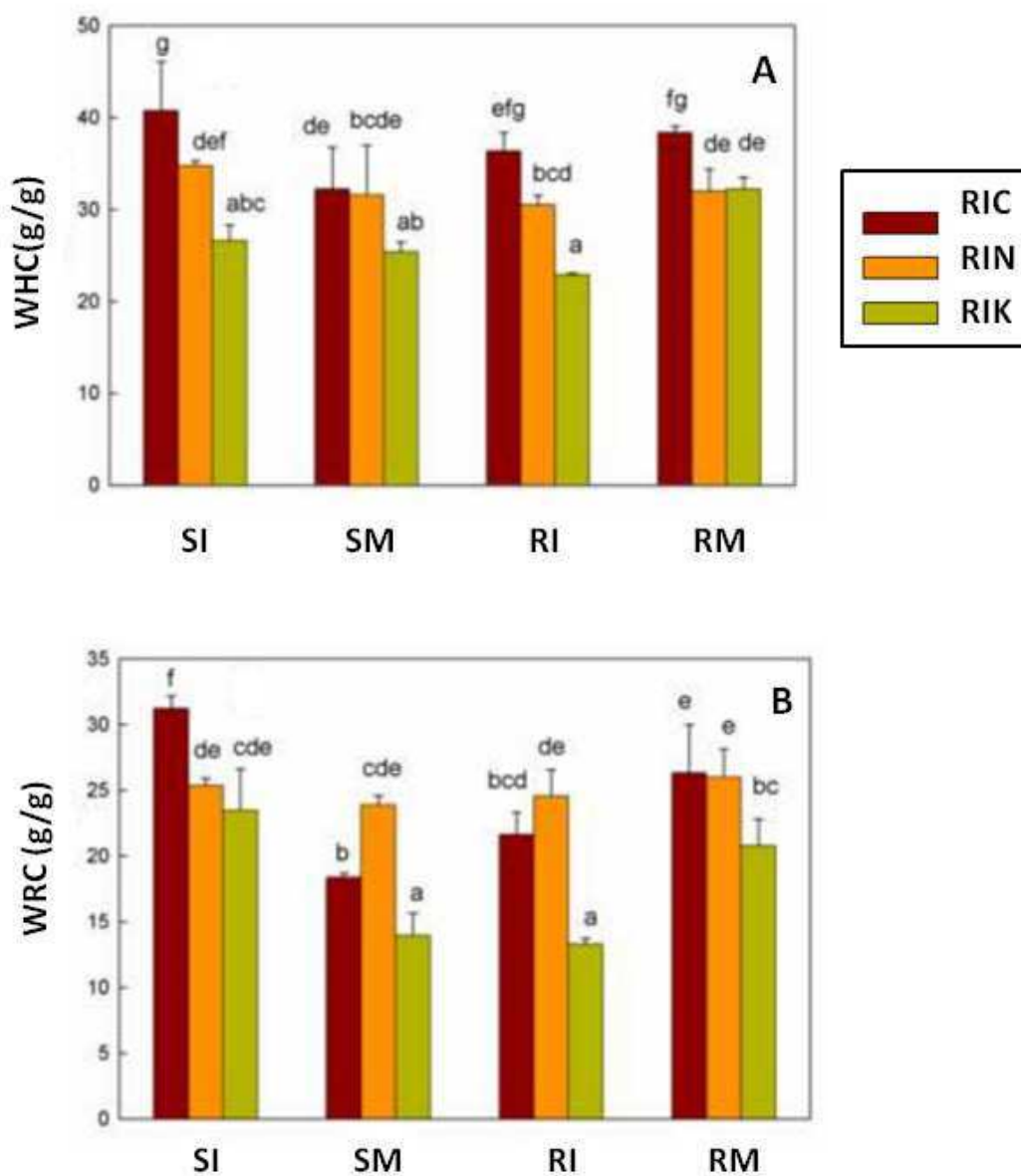


Figura 4.6. Capacidad de atrapamiento de agua WHC (A), capacidad de retención de agua WRC (B), determinadas para los residuos **RIC**, **RIN** y **RIK** de Regina y Sunburst (R, S), inmadura y madura (I, M).

Por último se determinó la cinética de absorción espontánea de agua de estos residuos, a 25°C, mediante el método de Baumann. A modo de ejemplo, se muestran los puntos experimentales obtenidos para la cinética del residuo **RIC** de Sunburst inmadura y del residuo final (**RIK**) de Regina madura (Figura 4.7), junto con el ajuste de los datos a la Ecuación 4.4 (línea continua), según el modelo propuesto por Pilosof (2000). Los parámetros resultantes (WBC y B) se muestran en la Tabla 4.6.

$$q(t) = \frac{WBC \cdot t}{(B + t)}$$

Ecuación 4.4. Ecuación correspondiente al modelo de Baumann donde q corresponde al volumen de agua absorbida por gramo de muestra seca (mL/g) a tiempo t , WBC es la máxima capacidad de absorción de agua, B es el tiempo necesario para absorber la mitad de la WBC .

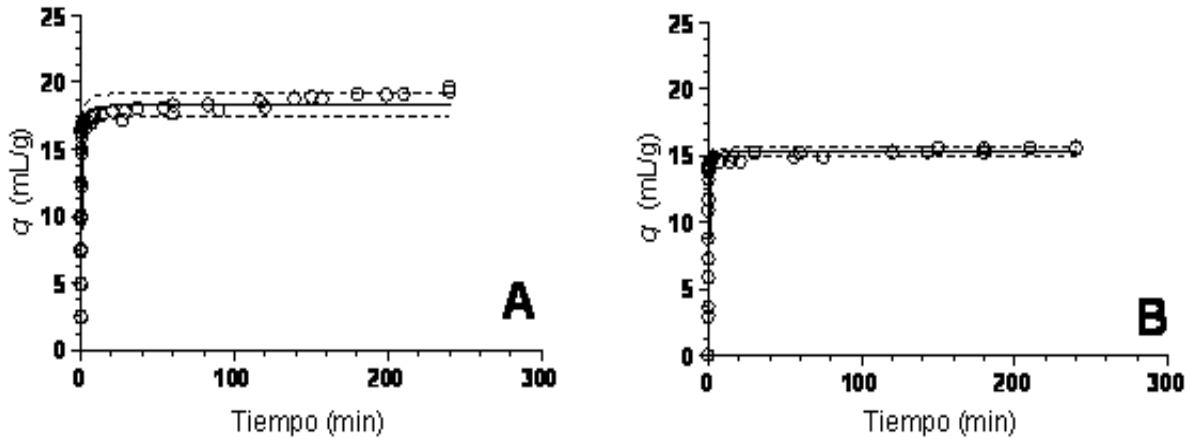


Figura 4.7. Cinética de absorción espontánea de agua obtenida según el método de Baumann para el residuo remanente de la etapa de extracción con CDTA (**RIC**) a partir de Sunburst inmadura (**A**) y del residuo final (**RIK**) de Regina madura (**B**). La línea continua corresponde a la curva del modelo ajustado (Ecuación 4.4) y las discontinuas indican el intervalo de confianza (95%) para $n = 3$.

Se puede observar en la Tabla 4.6 que la WBC (máxima capacidad de absorción de agua) tiende a disminuir en el orden **RIC** > **RIN** > **RIK**. Este resultado concuerda con los obtenidos para WHC y WRC. De acuerdo con Chen et al. (1984), la fibra de frutas, rica en pectinas, tiene un valor más alto de WBC que las fibras de cereales y legumbres, debido a la capacidad de las pectinas de interactuar con agua mediante enlaces no covalentes (enlaces hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas). Además se observa que la WBC disminuye con el grado de madurez.

El parámetro cinético B, indica el tiempo necesario para absorber la mitad de la capacidad máxima de absorción de agua ($WBC/2$). En la Tabla 4.6, se observa que B disminuye con la madurez para Sunburst pero aumenta para Regina, excepto para el residuo celulósico final, por lo tanto el valor de B depende de la variedad y del grado de madurez. Los residuos finales (**RIK**) para la variedad Regina tanto inmadura como madura absorben agua más rápido que el resto de los residuos aislados.

Tabla 4.6. Parámetros cinéticos obtenidos al ajustar los datos experimentales mediante el modelo de Baumann.*

	Cereza	WBC (ml/g)	B (min)	R²**
	RI	19,7 ± 0,4	0,15 ± 0,02	0,857
	RM	16,1 ± 0,3	0,38 ± 0,04	0,867
RIC	SI	18,4 ± 0,5	0,14 ± 0,02	0,785
	SM	16,6 ± 0,1	0,117 ± 0,005	0,985
	RI	15,2 ± 0,2	0,092 ± 0,007	0,957
RIN	RM	12,4 ± 0,4	0,13 ± 0,03	0,542
	SI	17,6 ± 0,2	0,23 ± 0,01	0,972
	SM	14,8 ± 0,3	0,08 ± 0,01	0,872
	RI	13,2 ± 0,3	0,08 ± 0,01	0,839
RIK	RM	15,3 ± 0,2	0,073 ± 0,006	0,971
	SI	16,3 ± 0,2	0,30 ± 0,02	0,965
	SM	14,2 ± 0,3	0,16 ± 0,03	0,763

*Se informa el promedio y la desviación estándar (n=3).

** R: coeficiente de correlación.

4.4 Conclusiones

Con los resultados obtenidos en esta parte del trabajo se puede concluir que la matriz de la pared celular de las cerezas de las variedades Regina y Sunburst está constituida esencialmente por pectinas covalentemente unidas extraíbles con solución acuosa de Na_2CO_3 entre ellas, pectinas unidas por puentes diferulatos con largas cadenas laterales de arabinosa, tal como se describió en el Capítulo 3. Los dominios de RG-I sustituidos lateralmente con los arabinanos más largos estarían anclados a la pared celular mediante enredos con la red de xiloglucano-celulosa.

Al madurar el fruto para ambas variedades se produce un aumento de los azúcares neutros asociado principalmente a la disminución de la proporción de HG. Además se encontró que hay una relación molar óptima de AN/AU y AU/Ram que da el mejor poder espesante y las viscosidades más elevadas. Se puede inferir que la presencia de cadenas largas tanto de HGs en las fracciones solubles en CDTA como de arabinanos en las fracciones solubles en Na_2CO_3 , junto con una distribución más estrecha de los pesos moleculares, estarían asociadas a un aumento de las interacciones de las macromoléculas de pectinas y, por lo tanto, a una mayor contribución viscosante o elástica del gel en agua, lo que contribuiría a la rigidez de la pared celular.

Mediante el análisis de la composición química y las propiedades funcionales de los polímeros aislados en las fracciones solubles, se puede concluir que la alta firmeza y compactibilidad que presenta la variedad Regina está relacionada a la alta proporción de uniones calcio en las cadenas de HGs de las FSC localizadas en la laminilla media de la pared celular, así como a una mayor proporción molar de azúcares neutros (ramnosa y arabinosa) en las pectinas unidas por puentes diferúlicos extraíbles con Na_2CO_3 .

Por otro lado, la presencia de pectinas entrecruzadas covalentemente en los residuos remanentes luego de la extracción con CDTA (**RIC**) fue asociada a mejores propiedades de hidratación. La desaparición de las pectinas en los residuos sucesivos (**RIN** y **RIK**) conducen a la disminución en la capacidad de hidratación de las fibras resultantes, mientras que la capacidad de hinchamiento (SC) está asociada al volumen específico y, por lo tanto, a la porosidad de la muestra. En este sentido, los tratamientos alcalinos sufridos por el residuo final (**RIK**) de la extracción secuencial completa, conducen a una celulosa esencialmente amorfa, responsable del máximo valor encontrado de SC en agua.

Diferente composición y estructura de las macromoléculas, originan biopolímeros de pared celular con funcionalidad diferente. Se sabe que las pectinas constituyen la matriz de la pared, con característica viscosa, en la cual está incrustada la red elástica de xiloglucanocelulosa. Un mayor efecto viscosante debido a las pectinas entrecruzadas por Ca^{2+} y a aquellas ricas en arabinanos puede contribuir significativamente a la rigidez de la pared celular y, por lo tanto, a la mayor firmeza de las cerezas de la variedad Regina.

Los análisis efectuados en el presente Capítulo respecto de la composición química y de las propiedades funcionales contribuyen a comprender el desempeño de la pared celular en cerezas.

CAPÍTULO 5

Caracterización química y funcional de las fibras aisladas a partir del descarte de la cosecha de cerezas dulces (*Prunus avium* L.) en vista de su aprovechamiento como ingrediente funcional y/o fibra dietaria.

5.1 Introducción

Fibra dietaria

A través de los años se han utilizado distintas definiciones de fibra dietaria fundamentadas en diferentes conceptos; las mismas pueden ser agrupadas en tres visiones principales. La primera se basa en un enfoque “botánico” y considera a la fibra dietaria prácticamente como sinónimo de “constituyente de las paredes celulares de plantas”. El segundo grupo de definiciones aportan una visión más “química”, relacionada con los métodos utilizados para medir fibra dietaria en alimentos e incluye fundamentalmente a los polisacáridos distintos de almidón (“non-starch”). La tercera se vincula con las consecuencias fisiológicas y nutricionales de consumir fibra dietaria. Esta última definición parece ser la más consensuada (y la más lógica considerando que se refiere a “dietaria”), aunque es difícil formalizarla legalmente en un sentido preciso ya que incluye un amplio surtido de compuestos que varían en estructura química y propiedades: polisacáridos no almidón de las paredes celulares y lignina, pero también mucílagos, polisacáridos microbianos, inulina, almidón resistente y oligosacáridos (Guillon et al., 2000).

La definición oficial aceptada ya en 2001 por la entonces American Association of Cereal Chemists (AACC) (ahora AACC International) es la siguiente: “La fibra dietaria es la parte comestible de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y a la absorción en el intestino delgado, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso. La fibra dietaria incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias asociadas de origen vegetal. La fibra dietaria promueve efectos fisiológicos beneficiosos para la salud que incluyen efecto laxante y/o atenuación del nivel sanguíneo de colesterol y/o de glucosa”.

Posteriormente, en su 30ª sesión en Sudáfrica en noviembre de 2008, El Comité del Codex sobre Nutrición y Alimentos para usos Dietarios Especiales (CCNFSDU) acordó una definición para “fibra dietaria” basada esencialmente en la de 2001 anteriormente descripta. En este marco, algunos aspectos acerca de qué puede ser considerado “fibra dietaria” fueron resueltos. El tratamiento de esta última definición hizo que surgieran cuestiones adicionales o más finas para resolver. Así, por el momento se estableció que a

menos que todos los países acepten (o no acepten) que los oligosacáridos con 3-9 unidades monoméricas son fibra dietaria, habrá más que una sola definición de la misma. Nuevamente, si cada país tiene su propio criterio acerca de lo que considera como beneficios fisiológicos de la fibra y acerca de cómo verificar estos beneficios, habrá tantas “definiciones” de fibra como efectos aceptados por todos los estados miembros. Dada la importancia para los consumidores, la industria alimentaria, los investigadores y las agencias regulatorias de contar con una definición más precisa aún de “fibra dietaria” en la cual se consideren también estos últimos aspectos en discusión, se mencionó la importancia que el Comité trabaje para resolver estas últimas cuestiones (Lupton et al., 2009).

Finalmente, en el 2012 se acordó una definición actualizada, según la cual la “fibra dietaria” consiste en:

1. Carbohidratos con un grado de polimerización o número de unidades de sacáridos de 3 o más que están naturalmente presentes en alimentos de origen vegetal y que no son digeridos ni absorbidos en el intestino delgado.
2. Fibras novedosas aceptadas.

Las fibras novedosas son ingredientes manufacturados para ser fuentes de fibra dietaria y también están constituidos por carbohidratos con un grado de polimerización de 3 o más unidades de sacáridos, que no son digeridos ni absorbidos en el intestino delgado. Éstas son producidas sintéticamente o bien son obtenidas de fuentes naturales que no tienen historia de uso seguro como fibra dietaria o que han sido procesadas con la finalidad de modificar las propiedades de la fibra contenida. Las fibras novedosas aceptadas deben tener al menos un efecto fisiológico demostrado por evidencia científica aceptada” (Bureau of Nutritional Sciences, Food Directorate, Health Products and Food Branch, Canada, 2012). En Canadá, el término “fibra novedosa” se lo usa solamente durante el proceso de evaluación del producto antes de salir a la venta. Una vez que la misma es aprobada por las autoridades de Salud, es entonces rotulada como “fibra dietaria” y pasa a ser conocida como tal.

Las sustancias comprendidas en el ítem “1” de esta definición incluyen a todos los materiales comestibles de origen vegetal que tienen una historia de uso como alimento y han sido procesados o cocidos usando procesos convencionales. Éstos comprenden frutas, hortalizas, semillas, frutos secos, cereales, legumbres, etc. Otras sustancias presentes en menor proporción tales como la lignina, ceras, cutina, suberina, fitatos y taninos, aunque no son polisacáridos, son considerados parte integrante de la fibra dietaria, por estar asociados a los polisacáridos, a menudo como entrecruzantes químicos entre varios componentes e incrementando la resistencia a la digestión en el intestino delgado. En algunos de los

métodos gravimétricos utilizados, estas sustancias así como algunas fracciones proteicas, no son separadas de los polisacáridos (Lee et al, 1992; Prosky et al, 1992, 1994). Por ello, estas sustancias son incluidas en la definición de fibra dietaria cuando son parte de la matriz de la pared celular vegetal, pero no pueden ser definidas como fibra dietaria si estas sustancias son aisladas e introducidas *a posteriori* en los alimentos.

Las sustancias comprendidas en el ítem “2” de esta definición incluyen, por ejemplo, sustancias obtenidas a partir de subproductos agrícolas o de materias primas, sustancias de origen animal o bacteriano, sustancias químicamente modificadas, productos sintéticos, etc. Estas sustancias no son históricamente utilizadas como fuentes de fibra dietaria.

A pesar de los incuestionables avances en este campo de investigación, no se ha alcanzado consenso internacional sobre una única y precisa metodología para su determinación. De todos modos, la mayoría de los científicos que investigan la fibra desde distintas sub-disciplinas se han puesto de acuerdo en incluir a la fibra entre los ingredientes importantes de la dieta.

“Fibra dietaria total” es el término analítico para la fibra dietaria. Incluye tanto a la fibra dietaria insoluble como a la soluble. La mayoría de las fuentes de fibra son mezclas de ambos tipos. El tipo más común de fibra dietaria es la fibra insoluble compuesta por celulosa, lignina y hemicelulosa. Aproximadamente un 75% de la fibra dietaria en alimentos está en la forma insoluble y, la fibra soluble, compuesta por pectina, gomas y mucílagos, comprende un 25% de la fibra dietaria consumida (Dreher, 1999).

Dentro de los sistemas alimenticios, la fibra dietaria se encuentra en dos formas: como constituyentes intrínsecos de varios alimentos vegetales o adicionada como un suplemento. De acuerdo con Guillon et al. (2000), el objetivo de su adición puede ser el uso como ingrediente (> 5%) o aditivo (< 5%).

La AACC junto con la AOAC International, reunidos en enero de 2012, también validaron y aprobaron el AACC Approved Method 32-45/ AOAC Official Method of Analysis 2009.01 para determinar si la muestra que se evalúa ajusta a la definición de fibra dietaria total. De la misma manera, se validó y aprobó el AACC Approved Method 32-50 / AOAC Official Method of Analysis 2011.25 para determinar si la muestra ajusta a la definición de fibra dietaria insoluble, soluble y total (AACC International, 2012).

Actualmente se ha informado que los hidrocoloides de uso en formulación de alimentos y productos farmacéuticos, así como la fibra dietaria generan 2 kcal (8 kJ)/g de energía metabolizable en dietas mixtas. Esto ha sido asumido por expertos consultados de la FAO y de la OMS, la cual cuenta con un grupo de consultas sobre Carbohidratos en

Nutrición Humana (Bureau of Nutritional Sciences, Food Directorate, Health Products and Food Branch, Canada, 2012).

5.1.1 Efectos de la fibra dietaria sobre la salud

Desde los años '70, la fibra dietaria se ha convertido en uno de los componentes alimenticios más ampliamente investigados en relación a su efecto sobre la salud y con propósitos tecnológicos (Dreher, 1999).

En general, se observa que un gran número de enfermedades que ocurren frecuentemente en los países desarrollados, consideradas enfermedades propias de Occidente, como ser varios desórdenes gastrointestinales (hernia, úlcera de duodeno, cálculos biliares, enfermedad de Crohn, apendicitis, constipación, carcinoma de colon), diabetes mellitus, obesidad y enfermedades cardiovasculares, tienen una muy baja incidencia entre la población que consume grandes cantidades de fibra (Oguido et al., 1998). Los beneficios de la ingesta de fibra para el intestino son ampliamente reconocidos, hecho que ha determinado su consideración como un nutriente (FDA, 1993). Los individuos que tienen una elevada ingesta de fibra dietaria parecen tener un menor riesgo de desarrollo de enfermedades coronarias, infartos, hipertensión, diabetes u obesidad. El incremento de fibra en la dieta produce un descenso de la presión arterial y del nivel sérico de colesterol. Un aumento del consumo de fibra soluble en la dieta mejora la glucemia y la sensibilidad a la insulina tanto en individuos diabéticos como en aquellos que no sufren la enfermedad. La suplementación con fibra a individuos obesos favorece la pérdida de peso (Anderson et al., 2009).

La adición de fibra a los alimentos constituye una alternativa para compensar la deficiencia existente en la dieta occidental (Guillon et al., 2000). Inclusive, los alimentos que contienen pequeñas cantidades de fibra dietaria, pueden hacer una importante contribución a una dieta individual si se consumen con frecuencia o en grandes cantidades (Dreher, 1999). A su vez, la fibra dietaria puede caer en la definición de “alimento funcional” por el hecho de que puede afectar de manera positiva a una o más funciones del organismo (Driplock et al., 1999). Más precisamente, esta definición cabe cuando imparte una función especial al alimento más allá de la normalmente esperada y, además, cuando la fibra dietaria es usada como aditivo alimentario. Por ejemplo, la fibra dietaria contribuye a

la salud del colon, la estimulación del *Bifidobacterium* o de los lactobacilos en el intestino (Prosky, 2000).

5.1.2 Usos tecnológicos de la fibra dietaria

Además del aspecto nutricional, y como se explicó para el caso de las pectinas (fibra soluble) en el Capítulo 2, las fibras pueden usarse con propósitos tecnológicos debido a sus propiedades funcionales. El objetivo de su adición puede ser el uso como ingrediente (> 5%) o como aditivo (< 5%) (Guillón et al., 2000). Los componentes de la fibra dietaria, aislados de sus plantas nativas, proveen propiedades funcionales que ayudan al desarrollo de alimentos y, también de productos farmacéuticos. Las principales propiedades que proveen están relacionadas con su solubilidad, viscosidad, habilidad para formar geles, capacidad de retención de agua y de aceite, así como de adsorber minerales y moléculas orgánicas (Tungland & Meyer, 2002).

Las fibras pueden cambiar la consistencia, textura, comportamiento reológico y características sensoriales de los alimentos. Su uso puede ir desde “agentes de carga” a sustitutos de grasas. El uso de fibra soluble como emulsificante puede tener potenciales aplicaciones en productos de bajas calorías con alto nivel nutricional (Fernandez, 2001). Los subproductos ricos en fibra pueden ser incorporados en productos alimenticios como agentes de carga de muy bajo tenor calórico para el reemplazo parcial de harina, grasa o azúcar, actuando además como mejoradores de la capacidad de retención de agua o de aceite por el producto alimenticio formulado y para mejorar la estabilidad física de una emulsión o la estabilidad química a la oxidación (Elleuch et al., 2011). El agregado de fibra dietaria a los productos panificados contribuye a incrementar la ingesta de fibra, disminuye el aporte calórico de productos de harina de trigo y posterga el envejecimiento del panificado debido a la capacidad de la fibra para retener agua, reduciendo las pérdidas económicas (de Escalada Pla et al., 2011; Kohajdová et al., 2012).

Las propiedades fisicoquímicas de las fibras pueden manipularse a través de distintos tratamientos para mejorar su funcionalidad. Por ejemplo, el tratamiento enzimático resulta en un incremento en la cantidad de fibra soluble en agua (BeMiller & Whistler, 1996; Guillon & Champ, 2000; Willats et al., 2006).

5.1.3 Fuentes de obtención de fibra dietaria

Como se mencionó anteriormente, las frutas y los vegetales son fuentes importantes de fibras dietarias aunque su contenido es menor que el de los cereales. La matriz de la pared celular es la mayor fuente de fibra en este tipo de alimentos (Redgwell et al., 1990; Carpita et al., 1993).

Por otro lado, los residuos o remanentes 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 biomasa 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 así como en la formulación farmacéutica, constituye un importante 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 (Laufenberg et al., 2003). Podrían así aplicarse al desarrollo de “nutracéuticos” así como en la ciencia de los materiales (Anal & Singh, 2007; John & Thomas, 2008; Pérez et al., 2012).

Ya que las paredes celulares constituyen una porción mayoritaria del peso seco de los tejidos vegetales y porque en una dieta normal, la mayoría de la fibra dietaria proviene de las paredes celulares, surge la necesidad de conocer la composición química de las mismas (Femenia et al., 2009). La caracterización funcional de las fracciones de biopolímeros extraídas de vegetales contribuye a predecir la potencial utilidad de los mismos en vistas del aprovechamiento de los residuos de la industrialización de vegetales.

Los mercados de destino de las cerezas argentinas son cada vez más exigentes en cuanto a la calidad de los frutos y uno de los parámetros de calidad más importante es el calibre de los mismos. En temporadas en donde las temperaturas para el crecimiento de los frutos son poco favorables y en montes en donde hay un exceso de carga por árbol, el descarte de frutos por falta de tamaño puede alcanzar hasta un 30% de la producción. Las lluvias ocurridas durante la última etapa de crecimiento de los frutos pueden causar una pérdida de hasta un 50% de la producción por *cracking*, especialmente en variedades sensibles. Los pájaros también pueden dañar mecánicamente a los frutos en la fase final del

crecimiento, ocasionando mermas de hasta el 10% de la producción, indistintamente de la variedad. Por lo tanto, en esta última parte de la tesis se evaluó utilizar cerezas de descarte de la cosecha como posible fuente de fibra útil.

5.2 Objetivo

En función de lo expresado, el objetivo de esta última parte del trabajo es aislar fibras a partir de residuos de la cosecha de cerezas dulces (*Prunus avium* L.) de las variedades Chelan, Brooks y Sunburst, estudiar su composición química y propiedades funcionales, con el fin de evaluar su potencial utilidad como ingrediente funcional para la formulación de alimentos.

5.3 Resultados y discusión

Se trabajó con frutos de descarte de tres variedades de cerezas dulces; Chelan, Brooks y Sunburst provenientes de la zona del Alto Valle de Río Negro.

Una vez removido el endocarpio y el pedúnculo, se procesó la fruta con etanol (80% v/v) a ebullición durante 30 min. Luego, se centrifugó y el residuo insoluble se lavó con acetona, se seco al aire y luego se liofilizó. De esta manera se obtuvo el residuo insoluble en alcohol (AIR).

El proceso de secado utilizado en el presente trabajo (liofilización) permite la obtención de fibras con alta calidad funcional, principalmente en relación a sus propiedades de hidratación (de Escalada Pla et al., 2012). Por lo tanto, es posible así evaluar la mayor potencialidad de estas fibras en vista de su uso como aditivo o ingrediente funcional para la formulación farmacéutica y/o de alimentos, además de su aplicación nutricional como fibra dietaria.

5.3.1 Análisis químico y físico de las fibras aisladas

Estas fibras aisladas (AIRs) fueron caracterizados, determinando: actividad de agua, contenido de hidratos de carbono totales, ácidos urónicos, celulosa, lignina, tamaño de partícula y DM de las pectinas. Los resultados pueden observarse en las Tablas 5.1.

Las fibras obtenidas tuvieron una coloración púrpura oscuro; sus parámetros de color se informan en la Tabla 5.1. Las fibras aisladas de Chelan muestran la menor luminosidad (L^*), así como los menores grados de amarillo (a^*) y de rojo (b^*). La actividad de agua (a_w) de las fibras fue baja, entre 0,253 y 0,285 (Tabla 5.1).

La fibra extraída de las cerezas de cada variedad por tratamiento con etanol (AIR) está constituida por todos los biopolímeros de la pared celular, tal como se muestra en la Tabla 5.1: 17 a 20% de celulosa, $\approx 7\%$ de lignina, $\approx 36\%$ de carbohidratos no celulósicos (pectinas y glicanos entrecruzantes) y entre 12 y 15 % de proteínas propias de la pared celular. La variedad Chelan es la que muestra un rendimiento significativamente ($p < 0,05$) mayor de

fibra obtenida; esta alta proporción de pared celular puede explicar (aunque sea en parte) la mayor firmeza que presenta (Capítulo 3).

Se determinó la distribución del tamaño de partícula mediante dispersión de rayo láser, informándose el diámetro mediano equivalente $D_{(0,5)}$, para el cual el valor de la distribución acumulativa es del 50% (Melcion, 2000). El valor de $D_{(0,5)}$ obtenido en EtOH es $\approx 520 \mu\text{m}$, valor que se encuentra en el límite superior de la escala de Malvern, siendo el menor tamaño de partícula que se pudo obtener por molienda de las fibras. Para polvos se ha informado que un tamaño de partícula inferior a 20-50 μm es cohesivo debido a lo intensas que resultan las fuerzas atractivas entre las partículas, mostrando en ese caso el polvo un pobre comportamiento de flujo y capacidad de fluidización (fluye como aglomerado). A mayor tamaño de partícula, el flujo de los polvos se vuelve más fácil ya que las fuerzas de inercia son mayores que las fuerzas entre partículas. Para partículas de mayor tamaño ($\approx 550 \mu\text{m}$), la fluidización puede hacerse dificultosa debido al aumento de la masa de las partículas. Una disolución rápida de las partículas en los jugos gástricos y en el lumen intestinal es deseable en productos farmacéuticos, así como en las aplicaciones hogareñas cuando se utilizan o regeneran formulaciones de alimentos deshidratados. Luego de una adecuada hidratación, generalmente se observa que al disminuir el tamaño de partícula hay un aumento de la velocidad de disolución, relacionado con una mayor superficie específica (Merkus, 2009). Por lo tanto, el tamaño de partícula incide también en esta propiedad.

Tabla 5.1. Color, actividad de agua, rendimiento y composición química de las fibras aisladas a partir de las variedades de cerezas Chelan, Brooks y Sunburst*

	Fibras aisladas		
	Chelan	Brooks	Sunburst
Color			
L*	21,2 \pm 0,2	35,14 \pm 0,04	37 \pm 1
a*	5,07 \pm 0,07	9,37 \pm 0,2	9,8 \pm 0,1
b*	6,64 \pm 0,04	15,8 \pm 0,4	18,4 \pm 0,4
a_w^o	0,253	0,255	0,285
Rendimiento(g fibra/100 g fruta)	12,7	7,9	8,0
Proteínas (% p/p)	14,7 \pm 0,9	12,24 \pm 0,02	12,9 \pm 0,5
Hidratos de carbono no celulósicos (% p/p)	32 \pm 2	34 \pm 4	37 \pm 3
Ácidos urónicos (% p/p)	12,9 \pm 0,6	13,52 \pm 0,09	13,44 \pm 0,08
Lignina (% p/p)	7,3 \pm 0,2	7 \pm 0,2	8,4 \pm 0,2
Celulosa (% p/p)	18 \pm 1	20 \pm 2	17 \pm 2

* Los valores representan las medidas \pm desviación estándar (n=3).

5.3.1.1 Contenido de fenoles y capacidad antioxidante

Las cerezas dulces contienen varios compuestos fenólicos y antocianinas que contribuyen a la actividad antioxidante total. Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles que se localizan en las vacuolas del citoplasma celular, desde donde contribuyen a proteger del daño por radiación UV y visible a los tejidos del vegetal (Yoshikazu et al., 2008). Dependiendo del pH, las antocianinas pueden presentar color rojo, púrpura o azul.

Mediante la técnica de Folin-Ciocalteu, Usenik et al. (2008) determinaron el contenido total de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos de cerezas dulces, obteniendo como resultado valores entre 44,3 y 87,9 mg (expresado como ácido gálico) por cada 100 gramos de tejido fresco. Posteriormente, determinaron que los principales compuestos fenólicos presentes eran ácido neoclorogénico, ácido *p*-cumaroilquínico, ácido clorogénico, epicatequina y rutina. Los ácidos neoclorogénico y *p*-cumaroilquínico son los principales compuestos fenólicos incoloros encontrados en las cerezas (Gao & Mazza, 1995). Se ha informado que la capacidad antioxidante total de cerezas frescas, medida por el ensayo del ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sufónico)), correlacionó positivamente con el contenido de ácido ascórbico y el de compuestos fenólicos totales y, sólo a partir de un determinado estadio de maduración, también con la concentración de antocianinas (Serrano y col., 2005). El ácido ascórbico y las antocianinas son solubles en agua (Chalker-Scott, 1999) y, por lo tanto, serían eliminados durante la extracción con etanol de las fibras del presente trabajo. Sin embargo, las fibras igual presentaron color púrpura intenso (Tabla 5.1). Por lo tanto, se determinó el contenido total de compuestos fenólicos en las fibras aisladas de cerezas, utilizando el método de Folin-Ciocalteu luego de hidrólisis alcalina (Tabla 5.2). Existe una amplia variedad de compuestos fenólicos que pueden estar conjugados a través del hidroxilo fenólico y/o a través de sus grupos carboxilos, siendo todos liberados luego de la hidrólisis alcalina (Robards, 2003). El resultado se expresa como mg de ácido gálico por gramo de fibra (Tabla 5.2). El mayor contenido de fenoles hallado luego de la hidrólisis alcalina corresponde a las fibras de la variedad Chelan y el menor a las de Brooks. Por otro parte, la hidrólisis ácida es el método tradicional para la determinación de agliconas (fenólicas o no) de glicósidos flavonoides y de ésteres de ácidos fenólicos. Los resultados muestran que una baja proporción de fenoles se liberaron luego de la hidrólisis ácida, la mayor ($p < 0,05$) cantidad de estos compuestos la presenta Sunburst mientras que Chelan y Brooks muestran una cantidad menor y similar. Por lo tanto, luego del tratamiento con etanol, hubo compuestos fenólicos residuales que

permanecieron retenidos en el material de pared celular constituyente de las fibras aisladas. El contenido de fenoles totales obtenido por hidrólisis ácida para estas fibras resulto ser comparable al encontrado por Tsao et al. (2005) para el residuo seco del mesocarpio de la manzana (1,6-3,6 mg/g masa seca) y menor que el obtenido por Bravo et al. (2007) para la yerba mate (80 mg/g), el vino blanco (19 mg/100 ml) y el té verde (116 mg/100 ml de infusión), todo expresado como ácido gálico.

Teniendo en cuenta que la hidrólisis ácida extrae principalmente compuestos fenólicos libres o no esterificados, por la diferencia aritmética entre el contenido de fenoles en las fracciones correspondientes a la hidrólisis alcalina y a la hidrólisis ácida, se puede calcular el contenido de compuestos fenólicos unidos (entrecruzantes de pectinas). De esta forma se encontró una cantidad significativamente ($p < 0,05$) mayor de compuestos fenólicos unidos covalentemente (63 %) para las fibras extraídas de la variedad Chelan. Podría tratarse de la fracción de fenólicos entrecruzantes de las cadenas laterales de arabinanos de las pectinas, esto es, serían los puentes diferulato, como ya se mencionó en el Capítulo 4 (Basanta et al., 2013). Esto contribuiría también a justificar la mayor firmeza informada en literatura para las cerezas de la variedad Chelan (Australian Cherry Production Guide, 2010).

Tabla 5.2. Contenidos de polifenoles totales (fenoles de hidrólisis alcalina), fenoles de hidrólisis ácida y de fenoles entrecruzantes de pectinas, determinados en las fibras aisladas a partir de las tres variedades de cerezas.

	Fibras aisladas		
	Chelan	Brooks	Sunburst
Fenoles de hidrólisis ácida (mg ac. gálico/ g fibra)	3,72 ± 0,05	3,2 ± 0,4	4,5 ± 0,1
Fenoles de hidrólisis alcalina (mg ac. gálico/ g fibra)	10,1 ± 0,2	7,21 ± 0,06	9,33 ± 0,03
Fenoles entrecruzantes de pectinas (mg ac. gálico/ g fibra)	6,3 ± 0,05	4,0 ± 0,3	4,7 ± 0,02

*Se informa el promedio y la desviación estándar (n=2)

El contenido de fenoles está directamente relacionado con la capacidad antioxidante (Bravo et al, 2007), lo que constituye una cualidad importante desde el punto de vista nutricional y funcional como fibra dietaria o como potenciales aditivos o ingredientes para estas fibras aisladas a partir de cerezas. Los compuestos fenólicos pueden atrapar intermediarios de oxígeno reactivo sin por ello promover nuevas reacciones oxidativas de radicales libres (Ainsworth & Gillespie, 2007). Como la actividad antioxidante no enzimática suele estar mediada por reacciones redox, se determinó la capacidad antioxidante de los polifenoles de las fibras de cereza mediante la determinación del poder reductor de ellas sobre el Fe^{3+} , por el método FRAP (TPTZ ó 2, 4, 6-tripiridil-s-triazina y FeCl_3) (ver Item 6.6.9). El cambio en la absorbancia está directamente relacionado al poder reductor combinado o total del antioxidante (donante de electrones) presente en la muestra. Se utilizó para la calibración una solución estándar de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ analizada con el reactivo de FRAP (Figura 5.1). El ensayo fue realizado de esta manera ya que es necesario determinar la capacidad antioxidante real que las fibras de cereza extraídas (matriz polimérica soluble e insoluble) tendrían si ellas fuesen utilizadas como aditivo, ingrediente y desde un punto de vista fisiológico, en todos los cuales la fibra está en presencia de agua como solvente, siendo hidratada.

En la Figura 5.1 se observa que los equivalentes de Fe^{2+} formados, expresados como μmoles por gramo de fibra de cereza, muestran un incremento lineal con el tiempo hasta los 120 min de reacción. Este aumento continuo puede ser en parte debido a la hidratación que sufren en paralelo las fibras en presencia de exceso de agua durante la reacción, pero esta cinética de orden cero no se podría explicar por el retardo en la hidratación de la fibra.

Si fases diferentes (sólida y líquida, en este caso) se encuentran presentes en el medio de reacción, se originan diferencias de gradiente de concentración, debido a variaciones locales considerables en la composición. Las reacciones que ocurren en presencia de un gradiente de concentración significativo se las llama reacciones heterogéneas. En ciertas reacciones químicas heterogéneas donde la fase sólida actúa como catalizador, la velocidad es independiente de la concentración de reactivo y por lo tanto se caracterizan por una cinética de orden cero (Levine, 2008). En este caso las fibras actúan como soporte sólido de las moléculas antioxidantes activas asociadas (compuestos fenólicos) generándose gradientes de concentración importantes, lo cual explicaría el orden cero de esta reacción.

Además se observa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) en la intercepción del eje siendo Sunburst la que presenta la mayor capacidad antioxidante y Brooks la menor. Sin embargo, las pendientes (constantes de velocidad de orden cero, k_0) no son significativamente ($p < 0,05$) diferentes, siendo su valor $0,226 \mu\text{mol Fe}^{2+} \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ fibra}$.

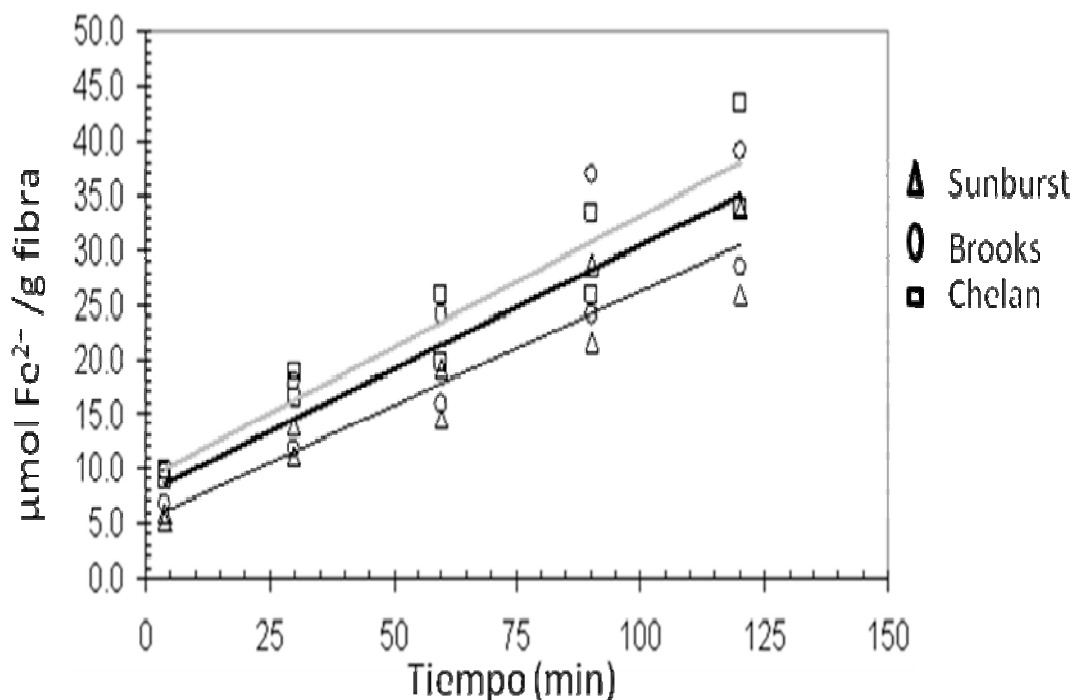


Figura 5.1. Capacidad antioxidante determinada mediante el método de FRAP para las fibras obtenidas a partir de las tres variedades de cerezas.

Utilizando la reacción de FRAP, Pulido et al. (2000) determinaron para una solución de ácido gálico de $250 \mu\text{mol/l}$, un valor de FRAP equivalente de $1281 (\mu\text{mol de Fe}^{2+}/\text{l})$ a los 4 min de reacción. Un valor similar se determinó en este trabajo a los 4 min de reacción. Usando esta equivalencia entre ácido gálico y $\mu\text{mol de Fe}^{2+}$, se calculó el valor de Fe^{2+} esperable (Tabla 5.3) a partir del contenido de compuestos fenólicos de cada fracción de fibra aislada mostrados en la Tabla 5.2, los cuales están expresados como ácido gálico. Aun a los 120 min de reacción, los valores ($\mu\text{mol de Fe}^{2+}/\text{g de fibra}$) obtenidos en la reacción de FRAP que se muestra en la Figura 5.1 resultan ser $\approx 6-8$ veces menores que los calculados a partir del contenido de fenoles totales y 3 veces menores que los calculados a partir del contenido de fenoles de hidrólisis ácida (Tabla 5.3). Esto podría confirmar que la actividad antioxidante de las fibras de cerezas determinada en agua, que es el solvente natural

utilizado en el procesamiento y la formulación de alimentos, es menor que la esperada después de la hidrólisis alcalina de los compuestos fenólicos asociados a la pared celular, como por ejemplo, los puentes de diferulato. Aunque en el intestino existe un pH menos alcalino ($\approx 8,2$), igualmente se esperaría la liberación de una alta proporción del contenido total de compuestos fenólicos informados en la Tabla 5.2 durante la digestión y absorción en el duodeno. El medio ácido del estómago ($\text{pH} \approx 1,4$) podría también contribuir a la liberación de compuestos fenólicos desde las fibras de cerezas, antes de alcanzar el duodeno.

Tabla 5.3. Valor esperado de FRAP calculado a partir de la equivalencia* entre ácido gálico y μmol de Fe^{2+} para los contenidos de polifenoles totales (fenoles de hidrólisis alcalina) y fenoles de hidrólisis ácida**.

	Fibras aisladas		
	Chelan	Brooks	Sunburst
Fenoles de hidrólisis ácida (μmol de Fe^{2+} /g fibra)	21,8	18,9	26,8
Fenoles de hidrólisis alcalina (μmol de Fe^{2+} /g fibra)	304,6	217,48	281,4

*1281 (μmol de Fe^{2+} /l) a los 4 min de reacción.

**Valores de la Tabla 5.2, expresados como mg de ácido gálico/g de fibra.

5.3.2 Propiedades físicas y de hidratación

Las características de hidratación son relevantes para evaluar la funcionalidad de las fibras como ingrediente, aditivo y fibra dietaria, ya que afectan la textura del producto final, entre otras cualidades (Biswas et al., 2011). Las fibras agregadas compiten por el agua disponible en una formulación. Las propiedades de hidratación están relacionadas con la composición química y con la microestructura desarrollada, estando esta última influida por la composición y por el método de secado aplicado. Las propiedades físicas están en relación con la microestructura. En el presente trabajo se determinaron propiedades físicas como la densidad verdadera, la densidad aparente y el volumen específico (VE), y propiedades de hidratación (capacidad de hinchamiento (SC), de atrapamiento de agua

(WHC), de retención de agua (WRC) y cinética de absorción de agua). Las propiedades de hidratación como SC, WHC, WRC y la cinética de absorción de agua no son relevantes para los polisacáridos solubles, sino que son más bien atributos de los polisacáridos insolubles (Thebaudin et al., 1997), por lo que son aquí utilizadas para caracterizar la fibra total aislada a partir de cerezas.

La densidad verdadera permite estimar el volumen de la parte sólida de una muestra. Se determinó mediante picnometría de helio. En la Tabla 5.4 se observa que no hubo diferencias significativas entre las densidades verdaderas de las fibras de las distintas variedades de cerezas ($\approx 1,50 \text{ g/cm}^3$). La densidad verdadera de productos farmacéuticos sólidos refleja propiedades químicas fundamentales (ej. peso molecular, fórmula molecular, etc.) de los materiales implicados. Como los principios activos y excipientes son primariamente sustancias orgánicas, su densidades verdaderas no varían sustancialmente para la mayoría de ellos y caen en el rango de $1,2\text{--}1,6 \text{ g/cm}^3$ (Hancock et al., 2003).

Por otro lado, la densidad aparente presenta valores entre $0,578$ y $0,334 \text{ g/cm}^3$, siendo las fibras obtenidas a partir de la variedad Sunburst las que presentan el mayor valor y las de Brooks el menor (Tabla 5.4). Por consiguiente, las fibras obtenidas de la variedad Brooks muestran el mayor valor para el volumen específico (VE) y, por lo tanto, la mayor porosidad, mientras que Sunburst presentó el menor. Estos valores de VE son similares a los obtenidos por Escalada Pla et al. (2012) para las fibras de duraznos (*Prunus pérsica* L., $\approx 2,3 \text{ ml/g}$). El VE puede ser usado como un indicador de diferencias en la estructura capilar del material. El proceso de secado también condiciona la porosidad del material deshidratado (Vetter & Kunzek, 2003).

Las fibras de Brooks presentan mayor valor de SC que el resto de las fibras (Tabla 5.4), lo que es consistente con su mayor porosidad (VE). Lo mismo se observa para la WHC. Los valores de WRC para las fibras obtenidas a partir de las variedades Brooks y Chelan no presentan diferencias significativas mientras que las fibras obtenidas a partir de Sunburst muestran el menor valor (Tabla 5.4). Como puede observarse en la Tabla 5.4, casi no hay diferencia entre los valores de WHC y WRC para estas fibras, por lo que éstas muestran una proporción mayoritaria de agua fuertemente retenida (WRC).

Estos valores de SC, WHC y WRC obtenidos para las fibras de cerezas son similares a los determinados por Kohajdová et al. (2012) para fibras obtenidas por otra forma de secado (40°C , 12 h) a partir de los residuos de la obtención de jugo de zanahoria y superiores a los obtenidos para el salvado de avena y arroz tratado con endoxilasas para el desarrollo de fibra dietaria (Lebesi & Tzia, 2012).

Como se explicó en el Capítulo 4, WHC y WRC son propiedades de hidratación que, en las cerezas, fueron principalmente atribuidas a las pectinas y hemicelulosas, mientras que el VE y la SC fueron asociados a la celulosa componente de las fibras aisladas.

Tabla 5.4. Propiedades físicas y de hidratación de las fibras aisladas a partir de las variedades de cerezas Chelan, Brooks y Sunburst: densidad verdadera y aparente, volumen específico (VE), capacidad de hinchamiento (SC), capacidad de absorción de agua (WHC) y capacidad de retención de agua (WRC) *

	Fibras aisladas		
	Chelan	Brooks	Sunburst
Densidad verdadera (g/ml) **	1,52 ± 0,03 ^a	1,50 ± 0,04 ^a	1,48 ± 0,04 ^b
Densidad aparente (g/ml)	0,448 ± 0,002 ^a	0,334 ± 0,01 ^a	0,578 ± 0,008 ^b
VE (ml/g)	2,23 ± 0,06 ^a	2,99 ± 0,2 ^a	1,73 ± 0,06 ^b
SC (ml/g) ¹	11,8 ± 0,4 ^a	13,7 ± 0,5 ^b	11,7 ± 0,4 ^a
WHC (g/g)	9,4 ± 0,1 ^a	10,7 ± 0,1 ^b	9,04 ± 0,06 ^a
WRC (g/g)	9,0 ± 0,2 ^{a,b}	9,5 ± 0,2 ^b	7,9 ± 0,6 ^a

* Se informa la media y la desviación estándar (n=3).

**Letra igual en la misma fila significa que no hay diferencia significativa ($p < 0,05$).

La cinética de absorción de agua permite, entre otras cosas, determinar el tiempo necesario para absorber una cierta cantidad de agua para la rehidratación de la fibra si ésta se comercializa deshidratada o como parte de un producto deshidratado. Permite a su vez conocer en qué grado compete por el agua durante la rehidratación, así como determinar la cantidad de agua que está comprometida durante este proceso. En la Figura 5.2 se muestran las curvas obtenidas al ajustar los datos experimentales a la Ecuación 5.1 durante la absorción espontánea de agua tras 240 min. Como se puede observar, las fibras obtenidas a partir de las variedades Brooks y Chelan muestran curvas cinéticas similares, las cuales se encuentran por encima a la obtenida para Sunburst.

$$q = k \cdot t^n$$

Ecuación 5.1. k es la constante cinética de absorción que depende de las características microestructurales y de las condiciones experimentales y n es el exponente, el cual se relaciona con el mecanismo de transferencia de materia (agua) durante la absorción e hinchamiento simultáneo de la matriz (Ritger & Peppas, 1987a, b).

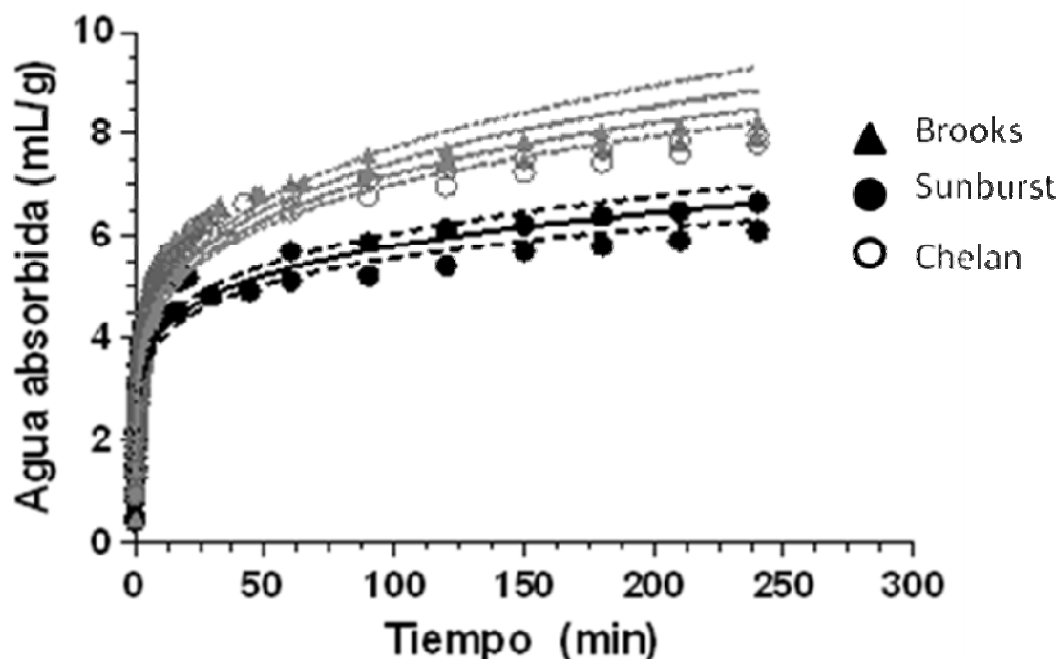


Figura 5.2. Puntos experimentales y curvas cinéticas ajustadas con la Ecuación 5.1 (líneas continuas), para la absorción espontánea de agua por las fibras de cereza. La línea punteada indica el rango de incertidumbre (95% de confianza).

En la Tabla 5.5 se presentan los parámetros cinéticos obtenidos, k y n , generalmente utilizados para determinar el poder de hinchamiento de los hidrogeles. El exponente n está relacionado al mecanismo por el cual el agua difunde y produce, en simultáneo, el hinchamiento de la matriz polimérica (Jabbari & Nozari, 2000). Para muestras de hidrogeles (o de polvos) dispuestos en la celda de medición, en forma de disco (placa plana infinita), n tiene un valor de 0,5 si el hinchamiento se produce por un mecanismo de difusión fickiano, lo que indica que la relajación de las cadenas poliméricas tiene poco efecto sobre la velocidad de hinchamiento. En cambio, para una difusión anómala o no fickiana, la relajación de las cadenas contribuye al hinchamiento y los valores de n están entre 0,5 y 1. Como se observa en la Tabla 5.5, los valores de n obtenidos para estas fibras son menores a 0,5 ($\approx 0,153$ para Sunburst y $\approx 0,19$ para Brooks y Chelan). Por lo tanto, la relajación de las cadenas probablemente tiene muy poco efecto sobre la velocidad de hinchamiento, aunque el mecanismo no corresponda estrictamente a una transferencia fickiana.

Como se indicó en los Capítulos 3 y 4, las pectinas covalentemente unidas mediante puentes diferulato a las cadenas laterales de arabinanos ($\text{F-Na}_2\text{CO}_3$) constituyen entre el 44 y 64 % del contenido de pectinas total de las fibras de cerezas aisladas. Por su parte, las cadenas de HG entrecruzadas electrostáticamente por Ca^{2+} (F-CDTA), constituyen el $\approx 37\%$

del contenido total de pectinas de las fibras de Chelan y Brooks, y algo menos ($\approx 26\%$) de las de Sunburst. Por lo tanto, debido al importante grado de entrecruzamiento que las fibras aisladas de cereza presentan, podrían ser entonces consideradas como un hidrogel. Cuando un hidrogel seco se pone en contacto con agua, ésta difunde y el hidrogel se hincha. Esta difusión incluye la migración de agua en los espacios preexistentes o en aquellos dinámicamente formados (Karadağ et al., 2002). En consecuencia, un hinchamiento significativo necesita la existencia de puntos hidrofílicos a lo largo de los polisacáridos donde las moléculas de agua (tridimensionalmente estructuradas) puedan formar enlaces de hidrógeno más fuertes que consigo mismas, quedándose de esta forma localizadas en los sitios poliméricos (Da Silva & Rao, 1992). Una difusión más rápida necesita también un adecuado grado de porosidad de la muestra y, como se mencionó anteriormente, el VE está relacionado con la porosidad. En consecuencia, los valores más altos obtenidos para las constantes cinéticas de hidratación-hinchamiento (k) de las fibras de Chelan y Brooks e inferiores para Sunburst (Tabla 5.5) son consistentes con los VE de las mismas (Tabla 5.4). Además se observa que los valores de SC y WHC (Tabla 5.4) siguen la misma tendencia que los de k (Tabla 5.5).

Tabla 5.5. Parámetros cinéticos obtenidos al ajustar los datos experimentales mediante la Ecuación 5.1.*

	Fibras aisladas		
	Chelan	Brooks	Sunburst
k (ml/g min ⁿ)	3,04 ± 0,07	2,96 ± 0,09	2,87 ± 0,08
n	0,188 ± 0,006	0,200 ± 0,008	0,152 ± 0,007
R^2 **	0,917	0,894	0,883

*Se informa el promedio y la desviación estándar (n=2)

**R: coeficiente de correlación.

5.3.3 Estabilización de emulsiones

Por último se evaluó la capacidad de las fibras para constituir emulsiones estables por (al menos) el primer periodo de mezclado necesariamente involucrado en la elaboración de alimentos. Por ejemplo, puede ser la pre-mezcla de ingredientes menores con parte del agua total y con el aceite, previa a su incorporación a la harina en la mezcladora, durante la elaboración de un panificado.

Para este ensayo se utilizó un aceite de triglicéridos de cadena media (MCT), usualmente utilizado para la disolución de aditivos hidrofóbicos en alimentos (Fissore et al., 2013). Basado en el experimento informado por Prakongpan et al. (2002), se ensayó una emulsión de aceite en agua con una fracción en volumen de aceite (ϕ) del 50 %, para cada fibra de cereza aislada. Después del cizallamiento con el homogeneizador utilizado, estos sistemas muestran una capacidad de formación de espuma de $\approx 128,7$ % para las tres variedades. Esto evitó que la emulsión entrampada en este sistema drenara y colapsara por lo menos durante las primeras 24 horas después de su formación. Este sistema muestra una elevada viscosidad. Se lo caracterizó mediante ensayos dinámicos tangenciales realizados en condiciones de viscoelasticidad lineal, con el objetivo de obtener el espectro mecánico del material desarrollado (Figura 5.3). El mismo corresponde más bien a un viscoelástico sólido, ya que el módulo elástico (G') se encuentra por encima del módulo viscoso (G'') en todo el barrido de frecuencias estudiado ($\omega = 0,1-50 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$). Sin embargo, hay mucho menos que un ciclo logarítmico u orden de magnitud de separación entre G' y G'' en todo el barrido y, además, existe una cierta dependencia con la frecuencia (Figura 5.3). Por lo tanto, este espectro mecánico no sería el de un gel verdadero. Patrones similares de barrido en el mismo rango de frecuencia angular ($\omega = 0,1-50 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$) fueron previamente encontrados por Karaman et al (2011) para emulsiones cárnicas, aunque los módulos G' y G'' estaban separados por un orden de magnitud, correspondiente a un comportamiento viscoelástico más sólido. Bressy et al. (2003) determinaron que para una fracción en volumen baja ($\phi < 40\%$), las emulsiones exhiben un comportamiento maxwelliano, y el modulo elástico aumenta lentamente con la fracción en volumen de aceite (ϕ). Esto puede ser cuantitativamente descripto de mejor manera considerando la deformación de una gota incrustada en una matriz continua, teniendo en cuenta todas las funciones de respuesta mecánicas en el rango lineal de la interfase, la tensión interfacial, así como las elasticidades

tangencial y dilatacional interfaciales (Bressy et al., 2003). Para fracciones en volumen mayores ($\phi > 40\%$), las gotas de aceite agregadas forman una red conectada que puede sostener la tensión o el esfuerzo al que se vea sometida, mostrando entonces, propiedades elásticas. Este sería el caso de lo que se observa para las emulsiones desarrolladas en presencia de fibra de cereza (Figura 5.3).

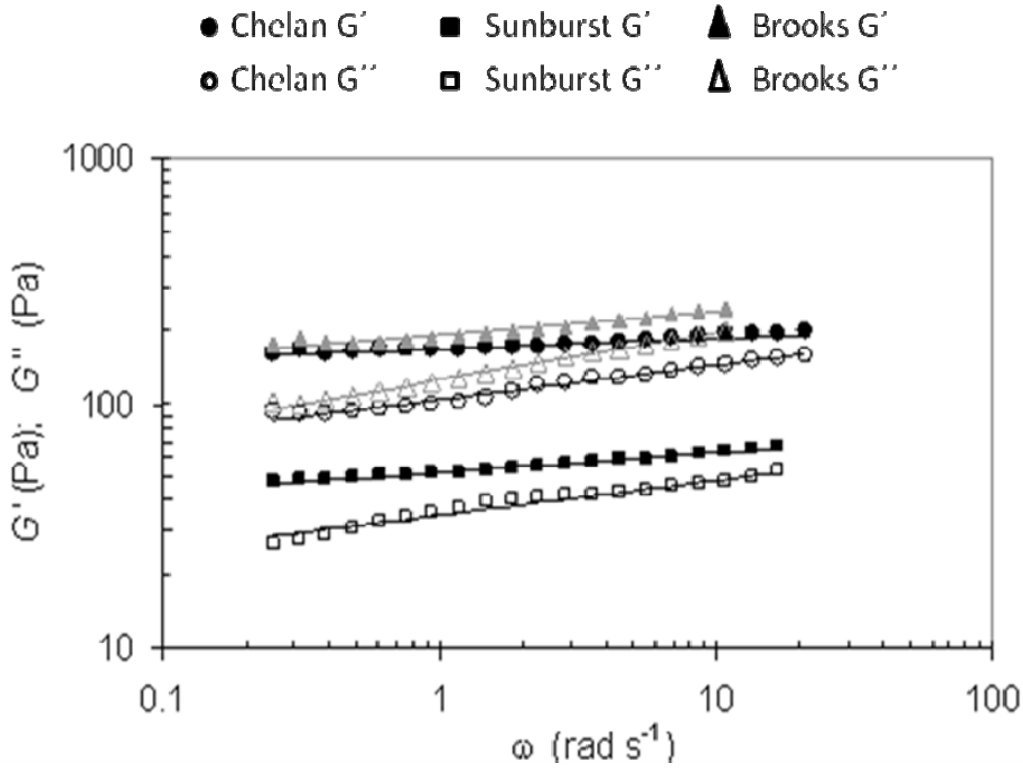


Figura 5.3. Espectros mecánicos de las emulsiones agua:aceite 50:50. La línea continua corresponde al ajuste (Ecuaciones 4.2 y 4.3) de los puntos obtenidos por triplicado.

Dada la dependencia observada con la frecuencia, se ajustaron los datos experimentales según las Ecuaciones 4.2 y 4.3 (Kim & Yoo, 2006). Los parámetros obtenidos del ajuste se pueden observar en la Tabla 5.5. La emulsión preparada con las fibras de Chelan, presenta el mayor comportamiento viscoelástico sólido debido a la menor dependencia del módulo de elasticidad (G') con la frecuencia, tal como lo muestra el valor menor del exponente A (Tabla 5.6). Aunque las emulsiones de Chelan y Brooks dan valores más altos de G'_0 que el sistema de Sunburst (Tabla 5.6), las emulsiones con fibra de Brooks y Sunburst muestran una dependencia similar con la frecuencia (exponente A). Como se observa en general en esta clase de sistemas viscoelásticos, el módulo de pérdida (G'') es más dependiente de la frecuencia (exponente B) que G' .

Tabla 5.6. Parámetros del modelo tipo Ley de la potencia determinados al ajustar los datos experimentales obtenidos del espectro mecánico de cada sistema mostrado en la Figura 5.3.*

	G'			
	G_o' (Pa)	A	R^2	$P <$
Chelan	167 ± 1	0,043 ± 0,005	0,836	0,01
Brooks	190 ± 1	0,094 ± 0,005	0,951	0,001
Sunburst	52,2 ± 0,2	0,081 ± 0,003	0,978	0,001
	G''			
	G_o'' (Pa)	B	R^2	$P <$
Chelan	103,8 ± 0,9	0,141 ± 0,007	0,965	0,001
Brooks	124,6 ± 0,6	0,194 ± 0,003	0,996	0,0001
Sunburst	35,1 ± 0,4	0,142 ± 0,006	0,970	0,001

*Se informa el promedio y la desviación estándar (n=3)

**R: coeficiente de correlación.

Es sabido que las gotas de aceite dispersas son susceptibles de ser estabilizadas por pectinas disueltas en la fase continua acuosa, concentradas en la interfase aceite-agua. Como se mostró en los Capítulos 3 y 4, entre el 3 y 4 % de la pared celular de cerezas maduras de las variedades Chelan, Brooks y Sunburst corresponde a pectinas solubles en agua. Siguiendo el mismo proceso de desarrollo de la emulsión con las fibras de cereza, se homogeneizaron las fibras sólo en agua, en la proporción correspondiente a la usada en las emulsiones. Luego de 10 min de reposo de cada suspensión resultante, se la centrifugó y se separó el sobrenadante. Este último fue caracterizado reológicamente, registrando las curvas de flujo de la fase continua, acuosa. En la Figura 5.4 se observa que la fase acuosa de cada una de las muestras de fibra de cerezas (pH 6,5) es viscosa, ya que presenta en reposo (bajas velocidades de corte) entre 2 y 10 Pa·s de viscosidad newtoniana (η_0), correspondiendo la mayor viscosidad a la fase acuosa de la emulsión que contiene la fibra de la variedad Chelan, seguida por Brooks, siendo la mínima para Sunburst. Esta viscosidad η_0 resultante no estaría relacionada con la concentración de pectina solubilizada en la fase acuosa después de la homogeneización (Tabla 3.2), sino mas bien con las características de las macromoléculas. El inicio de la caída de la viscosidad o comienzo de la zona de

pseudoplasticidad se corre a mayores velocidades de corte ($\dot{\gamma}$) conforme la solución acuosa es menos estructurada, siguiendo el orden Chelan < Brooks < Sunburst (Figura 5.4). El ajuste de los puntos experimentales al modelo de Cross (Ecuación 4.1), que se observa como una línea continua en la Figura 5.4, produjo un valor de exponente m semejante para los tres sistemas (Tabla 5.7). En consecuencia, comparando los valores resultantes para el parámetro τ (tiempo característico de relajación estructural), se observa que la fase acuosa proveniente de la fibra extraída de Chelan genera la solución acuosa más estructurada mientras que la correspondiente a Sunburst origina la menos estructurada. Siendo $1/\tau$ la velocidad de desestructuración, ya se vio en el Capítulo 4 que, cuanto más estructurado es un sistema, más rápido se desestructura ante un esfuerzo aplicado. Una mayor dependencia con la velocidad de corte se debe a que las asociaciones intermoleculares son más estables. Entonces, efectivamente, como consecuencia del esfuerzo de cizalla realizado por el homogeneizador, es esperable que pectinas solubles en agua pasen a la fase continua acuosa, las cuales actúan como estabilizantes al aumentar la viscosidad del medio porque disminuyen los movimientos brownianos y así, las gotas de aceite se mantienen separadas (no coalescen).

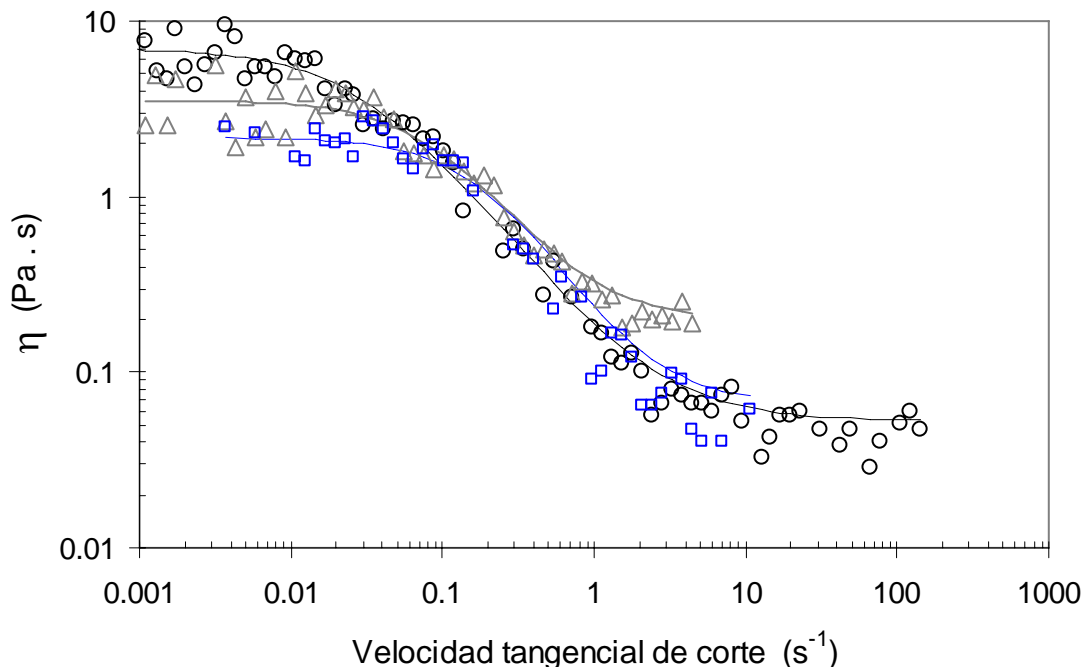


Figura 5.4. Curvas de flujo registradas para las soluciones acuosas resultantes de la homogeneización de cada tipo de fibra de cereza en la proporción usada para constituir la emulsión, y posterior centrifugación para eliminar la fibra insoluble. Los puntos experimentales corresponden a Chelan (○), Brooks (△) y Sunburst (□). Las líneas continuas corresponden al ajuste de los puntos experimentales, obtenidos por triplicado, mediante el modelo de Cross.

Tabla 5.7. Parámetros del modelo de Cross determinados al ajustar los datos experimentales obtenidos de los ensayos de flujo (20°C) realizados con las soluciones acuosas resultantes de la homogeneización de cada tipo de fibra de cereza en la proporción usada para constituir la emulsión, y posterior centrifugación para eliminar la fibra insoluble.*

Variedad de cereza	η_{∞} (Pa s)	η_0 (Pa s)	τ (s)	m	R^2 **
Chelan	0,07 ± 0,2	7,0 ± 0,4	33 ± 6	1,1 ± 0,2	0,909
Brooks	0,2 ± 0,2	3,5 ± 0,2	11 ± 2	1,3 ± 0,5	0,828
Sunburst	0,07 ± 0,05	2,16 ± 0,08	5,6 ± 0,6	1,4 ± 0,4	0,943

*Se informa el promedio y la desviación estándar (n=2).

**R: coeficiente de correlación.

Las fibras extraídas de las cerezas tienen, además entre un 12 y 14% de proteínas (Tabla 5.1) propias de la pared celular, seguramente en su mayoría extensinas (Fry, 1986; Kravtchenko et al., 1992; Nuñez et al., 2009). Ellas podrían ser también en parte extraídas a la fase acuosa (pH 6,5) y, actuando en la interfase aceite-agua, ser las responsables de la actividad emulsionante debido a que a pH 6,5 los grupos carboxilos se encuentran mayormente desprotonados. De esta forma las proteínas cargadas negativamente se pueden disponer en la interface, haciendo que disminuya la tensión superficial debido a que aumentan las repulsiones electrostáticas (Leroux et al., 2003; Williams et al., 2005).

3.4 Conclusiones

En este Capítulo se presentaron los resultados del estudio de la composición y propiedades funcionales de las fibras aisladas de frutos de descarte de tres variedades de cerezas, con el fin de evaluar su potencial utilidad como ingrediente funcional para la formulación de alimentos. Los resultados demuestran que:

- 1) Las fibras obtenidas mediante tratamiento con etanol a partir de las cerezas de descarte de las variedades Chelan, Brooks y Sunburst están constituidas esencialmente por biopolímeros de la pared celular, que incluye 72-85% de polisacáridos y 12-14 % de proteínas.
- 2) El mayor rendimiento de fibras se obtuvo para la variedad Chelan (12,8 %).
- 3) Los polvos de las fibras presentan un diámetro de partícula de $\approx 520 \mu\text{m}$ y una densidad verdadera de $\approx 1,50 \text{ g/cm}^3$, siendo Brooks la variedad que muestra el mayor volumen específico y Sunburst el menor, lo que está directamente relacionado con la porosidad de la muestra. Por lo tanto, las fibras obtenidas a partir de la variedad Brooks presentan los mayores valores de SC y WHC, lo que es coherente con la alta porosidad de la muestra.
- 4) Los valores de WHC y WRC obtenidos se atribuyen principalmente a las pectinas y glicanos entrecruzantes, y el VE y SC a la celulosa.
- 5) Las pectinas constituyen el 54% de las fibras aisladas de las tres variedades de cereza, de las cuales, el 60% son pectinas entrecruzadas por puentes diferulato a nivel de las cadenas laterales de arabinano y el 27% son pectinas con HG entrecruzados por Ca^{2+} . Esto sugeriría que estas fibras pueden comportarse como un hidrogel, que muestra absorción espontánea de agua e hinchamiento simultáneo.
- 6) Tanto Brooks como Chelan presentan curvas cinéticas de absorción de agua similares, las cuales están por encima de la obtenida para Sunburst. Además, las fibras de Sunburst muestran el valor más bajo para k y n .

- 7) Las fibras aisladas tienen un importante contenido de compuestos fenólicos, el 51 al 63% de los cuales están covalentemente asociados a las fibras extraídas. Estos compuestos asociados le darían carácter de ingrediente funcional a las fibras aisladas de cereza.
- 8) La presencia de compuestos fenólicos se traduce en capacidad antioxidante de las fibras aisladas.
- 9) Considerando la equivalencia entre Fe^{2+} -ácido gálico, se observa que la capacidad antioxidante (FRAP) de estas fibras determinada en agua (solvente natural para el procesamiento de alimentos y desarrollo de formulaciones) es menor que el esperado de acuerdo al contenido de fenoles totales, determinado luego de la hidrólisis alcalina. Sin embargo la actividad antioxidante de las fibras de cerezas podría ser mayor al pH fisiológico del estómago ($\text{pH} \approx 1,4$) y del intestino ($\text{pH} \approx 8,2$), al cual se liberarían también los compuestos fenólicos covalentemente unidos. Las fibras de todas las variedades presentan la misma constante de velocidad de orden cero de reacción con FRAP, pero la mayor capacidad antioxidante corresponde a las fibras de Sunburst y la menor a Brooks.
- 10) Estas fibras hidratadas forman emulsiones estables de aceite en agua ($\phi = 50\%$) por al menos las primeras 24 h, mostrando además capacidad de espumado.
- 11) Las pectinas solubilizadas en la fase continua acuosa a partir de la fibra funcionarían como estabilizantes del sistema emulsión-espuma al aumentar la viscosidad, mientras que las proteínas de la pared celular se comportan como emulsionantes en la interfase agua-aceite.
- 12) Los resultados obtenidos en cuanto a la estabilización del sistema emulsión-espuma están relacionados con las propiedades de hidratación de las fibras, ya que los hidrogeles formados pueden constituir una red que contribuye a soportar la emulsión – espuma.

En base a estos resultados y más allá de las sutiles diferencias encontradas entre las fibras de las diversas variedades de cerezas, se puede concluir que los residuos de las

cosechas de cerezas son una valiosa fuente de biopolímeros funcionales y compuestos bioactivos (por su capacidad antioxidante), pudiendo ser aplicados a la obtención de fibras útiles como ingredientes de alimentos funcionales y como fibra dietaria. Debido a las semejanzas encontradas en sus propiedades funcionales, los residuos de la cosecha de las distintas variedades podrían ser procesados en forma conjunta.

CAPÍTULO 6

Materiales y Métodos

6.1 Consideraciones generales

Para las extracciones y los fraccionamientos se utilizaron agitadores magnéticos FAC AM20, Thermolyne Nuova II y Cole-Parmer modelo 4658, y agitadores mecánicos modelo Glas-Col (Terre Haute, IN USA) y Decalab, ambos con paletas de acero inoxidable.

Para centrifugar se utilizaron las centrífugas Sargent S-15700 trabajando a 3400 rpm, Internacional Centrifuge A7213X-1 y P7115 a 2000 rpm, Sigma Laboratory Centrifuges 4K15C a 9000-10000 rpm y Eppendorf 5804 R.

Las evaporaciones se realizaron mediante un evaporador rotatorio Büchi 10566 a presión reducida con temperaturas del baño de agua inferiores a 40 °C.

Las muestras en solución acuosa se llevaron a sequedad utilizando liofilizadores Virtis 10-324, Rifacor L-T12 y Christ D-37520, a presiones inferiores a 0,1 mm Hg (100 mTorr), y a temperaturas del condensador cercanas a -45 °C.

Para la homogeneización de las soluciones y suspensiones de las muestras se utilizó un vórtex Rotamixer (Hook & Tucker Ins., Ltd.). En los casos necesarios las muestras se sonicaron en un equipo Ultrasonic LC 30H (Elma).

Las diálisis se realizaron a temperatura ambiente utilizando tubos de celulosa (Spectra Por o Sigma) seleccionando el diámetro según el volumen a dializar. El corte de peso molecular empleado fue el que se detalla en cada caso. Las diálisis se efectuaron durante 48 h en sistema abierto contra agua corriente y en sistema cerrado contra agua destilada, en este último caso, renovando el agua tres o cuatro veces por 24-48 h.

Las determinaciones colorimétricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Spectronic 20D (Milton Roy Company) empleando celdas cilíndricas de 1 cm de recorrido óptico.

Las determinaciones reológicas se realizaron con un reómetro dinámico Paar Physica MCR300 (Austria).

6.2 Obtención de las frutas utilizadas

Las muestras de las ciruelas japonesas (*Prunus salicina* variedad 'Roysum'), y de las cerezas (*Prunus avium* L. variedades 'Chelan', 'Brooks', 'Sumele', 'Sunburst' y 'Regina') fueron recolectadas de árboles ubicados en la zona del Alto Valle de la provincia de Río Negro (39°01'32" S, 67°44'22" O y 242 m sobre el nivel del mar)

Para el estudio de los polisacáridos de pared celular de las ciruelas japonesas se utilizaron frutos completamente maduros con una firmeza entre 5 y 10 N.

Para el estudio de los polisacáridos de pared celular de las cerezas (Capítulos 3 y 4) se utilizaron frutos en dos estadios de madurez:

- Inmaduros (primer estadio de madurez):

Cerezas utilizadas en el Capítulo 3 (cosecha 2009): Chelan 47 días después de la floración (ddf), Brooks 49 ddf, Sumele 45 ddf, Sunburst 49 ddf, Regina 47 ddf.

Cerezas utilizadas en el Capítulo 4 (cosecha 2010): Sunburst 49 ddf, Regina 47 ddf.

- Maduros:

Cerezas utilizadas en el Capítulo 3 (cosecha 2009): Chelan 75 ddf, Brooks 75 ddf, Sumele 73 ddf, Sunburst 84 ddf, Regina 90 ddf.

Cerezas utilizadas en el Capítulo 4 (cosecha 2010): Sunburst 85 ddf, Regina 91 ddf.

Para el estudio de las fibras de cerezas (Capítulo 5) se trabajó con frutos completamente maduros de descarte (Brooks 73 ddf, Chelan 71 ddf, Sunburst 86 ddf).

6.3 Índices fisiológicos, índices de madurez y calidad

6.3.1 Firmeza

La firmeza de las ciruelas se determinó individualmente sobre el radio ecuatorial de 20 frutos en los lados opuestos a la sutura donde se ubica el diámetro mayor, mediante prueba de punción, midiendo la fuerza requerida para penetrar cada fruto hasta una profundidad de 8mm, removiendo previamente la piel. Se utilizó un equipo Instron Universal Testing Machine modelo 4442 (Instron Corp., Canton, MA). Cada fruto fue ubicado entre placas de acero y deformado con una velocidad constante de 50 mm/min, se expresó en Newton.

En el caso de las cerezas, la firmeza se determinó individualmente sobre el radio ecuatorial de 20 frutos midiendo la fuerza en un recorrido de 0,5 mm, utilizando un tensiómetro electrónico GÜSS (FTA-14) a velocidad constante de 50 mm/s. Se registró la fuerza máxima obtenida en cada fruto. Los datos se presentan en g/mm.

6.3.2 Contenido de sólidos solubles

Sólo para las muestras de cerezas maduras mencionadas en el Capítulo 5, se efectuaron mediciones del contenido de sólidos solubles en muestras de jugo extraído de 10 frutos por variedad, tomando tres repeticiones, y utilizando un refractómetro de mano autocompensado Atago (Japón). Los resultados se expresan en °Brix.

6.3.3 Acidez titulable

Se determinó por titulación de 10 ml del jugo de 20 frutos de cada muestra, con NaOH 0,1N hasta alcanzar un pH final de 8,2. Se expresa como el porcentaje de acidez titulable.

6.3.4 Color

El color fue medido en el espacio CIELab, usando un colorímetro triestímulo Minolta CR300 (Japón), bajo iluminante D65 y con un ángulo del observador de 2°. Se midió sobre 10 frutos por variedad. Se expresan los valores como L^* , a^* y b^* , donde L (de 0 a 100) indica la luminosidad, a (de -60 a +60) el rango de verde a rojo y b (de -60 a +60) el rango de azul a amarillo.

6.3.5 Índice de cracking

Mediante el índice de *cracking* (IC) se puede estimar la susceptibilidad de los frutos a sufrir *cracking*.

Se colocaron 50 frutos por tratamiento en 1 litro de agua destilada (a $20 \pm 1^\circ\text{C}$). Luego de 2, 4 y 6 h se sacaron los frutos y se determinó el número de ellos que mostraba una herida o rotura del exocarpio o piel (los cuales no se volvieron a sumergir). Para el cálculo del IC se utilizó la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{5a + 3b + c}{250} \cdot 100$$

donde a es el número de frutos partidos a las 2 h de inmersión, b es el número de frutos partidos a las 4 h y c es el número de frutos partidos a las 6 h.

6.4 Preparación de las paredes celulares

Tras la eliminación del endocarpio, las ciruelas fueron cortadas en trozos, congeladas inmediatamente con N_2 líquido y almacenadas a -50°C hasta su utilización. En cambio, a las cerezas se les eliminó manualmente el endocarpio y el pedúnculo, y se las trató directamente.

La preparación de la pared celular se realizó de acuerdo a protocolos previos descritos por Ponce et al. (2010):

Se licuó la fruta con etanol frío al 80% v/v (400 ml por cada 100 g de fruta) en un Omni Mixer (Ultra Turrax). El homogenato fue inmediatamente hervido por 30 minutos, luego se enfrió, centrifugó y filtró a través de un papel de filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/C). El material insoluble retenido fue lavado con abundante etanol 95% v/v. El sólido fue resuspendido en 500 ml CHCl_3 : MeOH (1:1), agitándolo durante 15 minutos; luego fue centrifugado y filtrado nuevamente a través de papel de filtro de fibra de vidrio Whatman GF/C. El material retenido fue lavado con la misma mezcla de solventes. Por último, el material insoluble fue lavado con acetona hasta su decoloración total, obteniendo el extracto crudo de pared celular (residuo insoluble en alcohol, AIR). El AIR fue secado al aire bajo campana y posteriormente pesado. Las fracciones insolubles en alcohol (AIR) estudiadas en el capítulo 5 se obtuvieron mediante el mismo procedimiento, exceptuando el tratamiento con CHCl_3 : MeOH (1:1). Luego fue liofilizado.

6.5 Fraccionamiento de polisacáridos de la pared celular

6.5.1 Optimización del fraccionamiento de polisacáridos de la pared celular (Capítulo 2)

Se optimizó el fraccionamiento de pared celular descrito previamente por Sozzi et al. (2002) y por Ponce et al. (2010).

6.5.1.2 Comparación agitador magnético vs agitador orbital (*shaker*)

300 mg de pared celular fueron extraídos a temperatura ambiente durante 24 h con 30 ml de solución acuosa conteniendo 0,02 % p/v de timerosal tanto en agitador magnético como en agitador orbital (Incubator shaker Innova 4000, New Brunswick Scientific). Se recuperó el sobrenadante luego de centrifugación a 9000 rpm a 6°C durante 40 min, se lo dializó (utilizando membrana de corte de peso molecular 6000–8000) exhaustivamente contra agua corriente por 2 días y luego contra agua destilada por un día a 4°C. Las

fracciones fueron recuperadas por liofilización y posteriormente pesadas. Este procedimiento fue realizado por duplicado.

6.5.1.3 Optimización del tiempo de extracción acuosa

300 mg de pared celular fueron extraídos a temperatura ambiente durante 0,5; 2; 4; 8; 16 y 24 h con 30 ml de solución acuosa conteniendo 0,02 % [p/v] de timerosal con agitación magnética. Se recuperó el sobrenadante luego de centrifugación a 9000 rpm a 6°C durante 40 min, se lo dializó (utilizando membrana de corte de peso molecular 6000-8000) exhaustivamente contra agua corriente por 2 días y luego contra agua destilada por un día a 4°C. Las fracciones solubles en agua (**F-0,5; F-2; F-4; F-8; F-16; F-24**) fueron recuperadas por liofilización y posteriormente pesadas. Este procedimiento fue realizado por duplicado.

6.5.1.4 Extracción acuosa a ebullición

300 mg de pared celular fueron extraídos con 30 ml de solución acuosa conteniendo 0,02 % [p/v] de timerosal **a ebullición** durante 2 h y se re-extrajo el residuo de **F-2** de la misma manera, recuperando las fracciones solubles (**FC-2** y **F-RC**) de la misma forma anteriormente mencionada. Este procedimiento fue realizado por duplicado.

6.5.2 Fraccionamiento completo de los polisacáridos de pared celular de cerezas (Capítulos 3 y 4)

1 g de de pared celular fue extraído por 4 h a temperatura ambiente con 100 ml de solución acuosa conteniendo 0,02 % [p/v] de timerosal. El sobrenadante, designado fracción soluble en agua (**F-H₂O**), fue separado. Al residuo insoluble se lo sometió a extracciones sucesivas (extracción secuencial) con CDTA 0.05M (en buffer 0,05M NaOAc/AcOH pH 6 conteniendo 0,02% (p/v) de timerosal) por 24 h; con Na₂CO₃ 0,1 M (en NaBH₄ 0,1 mM) por 24 h; con KOH 1 M (en 0,1% p/v NaBH₄) por 24 h; con KOH 4 M (en 0,1 % p/v NaBH₄) por 24

h. De esta manera se obtuvieron las fracciones solubles en CDTA (**F-CDTA**), en Na_2CO_3 (**F- Na_2CO_3**), en KOH 1M (**F-KOH1**) y en KOH 4M (**F-KOH4**), respectivamente. Estos sobrenadantes fueron recuperados después de centrifugación a 9000 rpm a 6°C durante 40 min. En el caso de las extracciones con KOH, el pH fue ajustado previamente a 5 con ácido acético glacial. Todas las fracciones fueron dializadas (utilizando membrana de corte de peso molecular 6000-8000) exhaustivamente contra agua corriente por 2 días y luego contra agua destilada por un día a 4°C. Las fracciones fueron recuperadas por liofilización y posteriormente pesadas.

6.6 Análisis químico

6.6.1 Disolución de las muestras

Tanto para la determinación de hidratos de carbono totales como para la de ácidos urónicos, las fracciones acuosas fueron disueltas directamente en agua destilada, en cambio las de CDTA, Na_2CO_3 , KOH 1M y KOH 4M, se trataron según la técnica de Ahmed & Labavitch (1977) para producir una solubilización completa del material.

Se trataron 2 mg de cada fracción con 1 ml de ácido sulfúrico concentrado en un baño de hielo y se agitaron por 10 minutos. Luego se agregaron cuidadosamente, gota a gota, 0,5 ml de agua destilada completando hasta 2 ml, siempre en baño de hielo y se dejó agitando hasta disolución total. Una vez solubilizadas las muestras, se transfirieron a matraces de 5 ml y se enrasó con agua destilada.

6.6.2 Determinación cuantitativa de los hidratos de carbono totales

Se empleó el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico según la técnica descrita por Dubois et al. (1956)

REACTIVOS:

- Solución de fenol al 5 % (p/v). Esta solución es estable a temperatura ambiente durante varios meses conservada en frascos de color caramelo.

- Acido sulfúrico 98 % grado analítico.

PROCEDIMIENTO:

A 0,5 ml de solución conteniendo hasta 80 $\mu\text{g/ml}$ de hidratos de carbono se le adicionaron 0,5 ml de fenol al 5 % y se mezclaron. Luego se agregaron 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado directamente sobre la superficie de la solución a fin de asegurar un calentamiento máximo y se dejaron reposar 10 min. Transcurrido este tiempo, los tubos se agitaron en un vórtex y se mantuvieron 20 min a temperatura ambiente. En forma paralela se preparó un blanco con agua destilada. Finalmente se leyó la absorbancia del color desarrollado a 490 nm (máximo de absorción para hexosas), y el contenido de hidratos de carbono totales se cuantificó por referencia a curvas patrón de galactosa. El resultado se expresó como porcentaje de azúcar anhidro ($\times 162/180$).

6.6.3 Determinación de ácidos urónicos

Se realizó siguiendo la modificación de Filisetti-Cozzi & Carpita (1991) del método de Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973).

REACTIVOS:

- Solución A: ácido sulfámico/ sulfamato de potasio 4 M (pH 1,6).
- Solución B: tetraborato de sodio 0,0125 M en ácido sulfúrico concentrado, grado analítico.
- Solución C: *m*- hidroxidifenilo (0,15 %) en hidróxido de sodio acuoso al 0,5 %.

PROCEDIMIENTO:

Se tomaron alícuotas de la solución de la muestra de polisacárido conteniendo hasta 200 nmoles de ácido hexurónico y se diluyeron con agua hasta 0,5 ml. Posteriormente se agregaron 40 μl de la Solución A a cada tubo y se agitaron en un vórtex. Sobre los tubos colocados en baño de hielo se adicionaron 2,5 ml de la Solución B. Nuevamente se agitaron los tubos, y se llevaron a un baño de agua a 100 °C durante 30 min, tapados con bolitas de vidrio. Luego se colocaron en un baño de hielo para alcanzar la temperatura ambiente rápidamente y se les agregaron 80 μl de la Solución C. Finalmente, los tubos fueron agitados, y luego se los dejó reposar durante 5 a 10 minutos, leyéndose luego las absorbancias a 525 nm. El color permanece estable por 1 hora.

Se preparó un blanco con agua destilada y la curva estándar se la obtuvo con una solución de ácido D-galacturónico (0,16 mg/ml).

En los cálculos se considera que la absorbancia producida por reacción con azúcares neutros es 1/40 de la que produce el ácido D-galacturónico.

6.6.4 Determinación del grado de metilación

El grado de metilación (DM) fue determinado utilizando el método colorimétrico descrito por Wood & Siddiqui (1971)

REACTIVOS

- Solución de KMnO_4 2%.
- Solución de $\text{AsO}_3\text{H}_2\text{Na}$ 0,5 M (en ácido sulfúrico 0,12 N); preparar en el día.
- Solución de 2,4-pentanodiona (acetilacetona) 0,02 M (en buffer acetato de amonio 2M – AcOH acético 0,05M); preparar en el día.

PROCEDIMIENTO

Se saponifica la muestra con NaOH 0,5 N durante 1 hora a temperatura ambiente; luego se acidifica con H_2SO_4 5,5 N.

Se tomaron alícuotas de la solución resultante llevándolas a un volumen final de 0,5 ml con H_2SO_4 1 N en tubos con tapa a rosca. Fueron entonces colocados en un baño de hielo y se agregaron 100 μl de la solución de KMnO_4 sin salpicar las paredes del tubo. A continuación fueron agitados en un vórtex y se los volvió a dejar durante 15 min en el baño de hielo. Luego se les adicionaron 100 μl de la solución de $\text{AsO}_3\text{H}_2\text{Na}$ y 300 μl de agua destilada. Luego de dejarlos reposar durante 1 hora a temperatura ambiente, se les agregó 1 ml de solución de 2,4-pentanodiona. Fueron agitados nuevamente, tapados y colocados durante 15 min en un baño de agua a 58-60 °C. Finalmente, se los dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se leyeron las absorbancias a 412 nm antes de transcurrida la primera hora. Se preparó un blanco con agua destilada y la curva estándar con una solución de metanol (0,0869 mg/ml).

El DM fue calculado como la relación molar entre el metanol generado y los ácidos urónicos presentes, determinados por el método colorimétrico indicado en 6.6.3.

6.6.5. Determinación cuantitativa de proteínas totales.

Se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Lowry et al. (1951)

REACTIVOS:

- Solución A: solución de carbonato de sodio al 2 %, en NaOH 0,1 M.
- Solución B: sulfato cúprico pentahidratado al 0,5 %, en solución de tartrato de sodio y potasio al 1 %.
- Solución C: preparada mezclando 50 ml de la Solución A y 1 ml de la Solución B. Esta solución mezcla debe ser usada dentro de las 24 h posteriores a su preparación.
- Solución D: dilución al medio de un volumen del reactivo de Folin-Ciocalteau (Merck). Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de ser usada, y su absorbancia contra agua destilada debe ser inferior a 0,040.

PROCEDIMIENTO:

Se tomaron alícuotas de la solución de la muestra conteniendo hasta 500 μg de proteínas por ml y fueron llevadas a un volumen final de 0,4 ml con agua destilada. Luego se agregaron a cada tubo 2,5 ml de la Solución C. Se mezclaron y se dejaron a temperatura ambiente durante al menos 10 min. Se agregaron 0,2 ml de la Solución D, rápidamente y con agitación, dentro de los 2 s. En forma paralela fue preparado un blanco de agua destilada. Las muestras se mantuvieron durante 30 min en reposo y luego de este tiempo se leyeron las absorbancias a 600 nm. Para determinar la cantidad de proteínas presentes en las muestras, se preparó una curva patrón con solución de albúmina de suero bovino de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

6.6.6. Determinación de los azúcares componentes

Se realizó analizando por cromatografía gaseosa los derivados correspondientes de los monosacáridos generados a partir de los polisacáridos hidrolizados.

6.6.6.1. Hidrólisis ácida total (Albersheim et al., 1967)

Se colocaron 3 mg de muestra en viales provistos de cierre de teflón. Se adicionó 1 ml de CF_3COOH (TFA) 2 M a cada vial y se dejó hidrolizar en estufa a 121 °C durante 90 min. Luego fueron llevados a sequedad bajo corriente de aire. Posteriormente los hidrolizados fueron disueltos en agua y nuevamente evaporados; este tratamiento se realizó las veces necesarias hasta eliminar totalmente el ácido, reconocible por el olor. Las muestras fueron colocadas en un desecador al vacío durante una noche.

6.6.6.2 Preparación de los alditoles peracetilados (Shea & Carpita, 1988)

A las muestras secas provenientes de las hidrólisis contenidas en los viales y/o dedales, se les agregaron 0,2 ml de hidróxido de amonio 1 M y se redujeron con BH_4Na (2 mg) durante al menos 2 h a temperatura ambiente. En un paso posterior, se adicionaron gotas de ácido acético diluido para destruir el exceso de agente reductor, es decir, hasta que cesó la efervescencia, y se descationizaron por agregado de resina Amberlite IR-120 (H^+). Las muestras fueron filtradas y evaporadas a sequedad. El ácido bórico generado se eliminó como borato de metilo, mediante 5 agregados de 0,5 ml de metanol y evaporación a sequedad en cada oportunidad. Los residuos fueron dejados en desecador al vacío durante una noche y la mezcla de alditoles obtenida fue acetilada con 1 ml de anhídrido acético-piridina (1:1), calentando durante 45 min a 100 °C.

Una vez que las soluciones alcanzaron la temperatura ambiente, se realizó una extracción de la misma con una mezcla CHCl_3 -agua. La fase acuosa fue nuevamente extraída con cloroformo. Los extractos clorofórmicos recuperados fueron juntados y lavados tres veces con 1 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio y dos veces con 1 ml de agua destilada. Finalmente los extractos fueron secados con sulfato de sodio anhidro y llevados a sequedad. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo y se inyectó en el cromatógrafo gaseoso.

6.6.6.3 Cromatografía gas-líquido

Las cromatografías gas-líquido se realizaron en un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 A equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un integrador HP3395. Se utilizó nitrógeno como gas portador y las corridas se efectuaron con una relación de split 80:1.

Análisis de alditoles.

Se utilizó una columna capilar SP-2330 (Supelco), de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 μm de espesor de la fase líquida.

El flujo del gas portador fue de 1 ml/min y la presión en cabeza de columna fue de 15 Psi (= 1,02 atm). Se realizó una corrida isotérmica a 220°C y las temperaturas del inyector y detector fueron de 240°C.

Se utilizó *mio*-inositol como estándar interno, y los diferentes acetatos de alditoles fueron identificados por comparación con estándares. El porcentaje de los diferentes monosacáridos presentes en las mezclas se calculó considerando que las respuestas FID son proporcionales al peso molecular de los acetatos de alditoles.

6.6.7 Determinación de lignina, celulosa y ácidos urónicos en los AIR

Se efectuó mediante la técnica descrita por Ng et al. (1998)

LIGNINA

Se dispersaron 0,3 g de muestra en 2,0 ml de solución de H_2SO_4 72%, dejando en contacto por 3 horas a temperatura ambiente. Se ajustó la concentración de esta dispersión a 1 M en ácido sulfúrico, agregando el volumen necesario de H_2O desionizada (Milli-Q, USA) (≈ 25 ml), luego se las colocó en un baño de agua a 100 °C durante 2,5 h manteniendo el volumen constante por agregado periódico de agua desionizada a ebullición. Cada dispersión fue enfriada, centrifugada durante 10 min a 12000 g, procediendo entonces a separar el sobrenadante. Éste fue neutralizado muy cuidadosamente y el contenido de

hidratos de carbono totales (celulosa y no-celulósicos) fue determinado por el método del fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956). El residuo de la centrifugación (pellet) fue lavado tres veces con agua desionizada, centrifugado durante 10 min a 12000 *g* y finalmente liofilizado. El residuo obtenido fue pesado e informado como lignina.

CELULOSA

A 0,3g de cada muestra se le agregó 2,08 ml de solución H₂SO₄ 72%, dispersándola cuidadosamente con ayuda de una pequeña varilla de vidrio. Inmediatamente se agregó H₂O desionizada para alcanzar una dilución total de 1 M en el ácido, seguida de calentamiento por 2,5 h en baño de agua a 100°C. Cada dispersión fue enfriada y centrifugada durante 10 min a 12000 *g*, procediendo entonces a separar el sobrenadante. Éste fue neutralizado muy cuidadosamente y el contenido de hidratos de carbono totales (no-celulósicos) fue determinado por el método del fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956). El residuo de la centrifugación (pellet) fue lavado tres veces con agua desionizada, centrifugado durante 10 min a 12000 *g* y finalmente liofilizado. El residuo obtenido fue pesado e informado como celulosa + lignina.

ÁCIDOS URÓNICOS

Se realizó de la misma manera que la determinación de celulosa pero en este caso se aplicó 1 hora de calentamiento a 100°C en un baño de agua. Sólo se separó el sobrenadante para la cuantificación procediendo para ello de idéntica manera a como fuera arriba indicado, determinándose el contenido de ácidos urónicos por el método colorimétrico reportado por Filisetti-Cozzi & Carpita (1991; ver sección 6.6.3).

Todos los ensayos descriptos fueron realizados por duplicado.

6.6.8 Determinación de compuestos fenólicos de la pared celular

La hidrólisis alcalina libera los compuesto fenólicos retenidos por uniones covalentes. Por lo tanto, el contenido de fenoles, compuestos fenólicos o polifenoles totales (liberados todos por hidrólisis alcalina) fue determinado en los AIR según Bunzel et al. (2000). Para ello, 0,9 g de AIR fueron saponificados con 50 ml de NaOH 2 N y mantenidos durante 18-20

horas a temperatura ambiente, bajo vacío y al abrigo de la luz. Finalizada la hidrólisis alcalina, se agregó a cada muestra 9,5 ml de HCl (pH < 2). Los sobrenadantes fueron separados por centrifugación durante 15 min a 8000 g (6°C).

El contenido de polifenoles pasibles de hidrólisis ácida (mayoritariamente, fenoles libres) fue determinado en los AIR de acuerdo con Parr et al. (1997) y Budini et al. (1980). A 0,9 g de AIR se le agregó 50 mL de HCl 2 M y se colocó en baño de agua caliente (90 °C) durante 30 minutos (las muestras permanecen tapadas, durante la hidrólisis). Finalizada la hidrólisis ácida y una vez enfriadas las muestras, los sobrenadante fueron separados por centrifugación durante 15 min a 8000 x g (6°C). Todas las hidrólisis fueron realizadas por duplicado.

Los sobrenadantes obtenidos de las hidrólisis alcalina y ácida (previamente descriptas) fueron utilizados para evaluar el contenido de polifenoles totales y no-ferúlicos, respectivamente según Shui & Leong (2006) utilizando la técnica de Folin-Ciocalteu.

Para la reacción colorimétrica y posterior medición espectrofotométrica, se tomaron 40 µl de las muestras hidrolizadas y se agregaron 1800 µl de una mezcla de reactivo de Folin-Ciocalteu y H₂O desionizada (relación 1:10). Se agitó y se dejó reaccionar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 1200 µl de una solución de NaHCO₃ 7,5 % (p/v) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalizada la reacción y completado el desarrollo del color, se evaluó la absorbancia a 765 nm.

Para la curva de calibración se usó como estándar una solución de 2 mg/ml de ácido gálico (Anedra, Argentina).

El contenido de fenoles se informó como mg ácido gálico/g de AIR.

El contenido de fenoles entrecruzantes covalentes de pectinas, fue calculado a partir de la diferencia matemática del contenido de fenoles en las fracciones correspondientes a la hidrólisis alcalina (fenoles totales) y a la hidrólisis ácida.

6.6.9 Determinación de la capacidad antioxidante de los polifenoles

Se determinó la capacidad antioxidante de los polifenoles como el poder de reducción del hierro (Fe^{3+}) mediante el método FRAP (Pulido et al., 2000)

REACTIVOS:

- Solución estándar de 27,8 mg/ml de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en H_2O Milli Q.
- HCl 0,04 N
- Buffer AcOH/NaOAc 0,3 M, pH 3,6
- Solución A: 0,02 M de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Solución B: 0,01 M de TPTZ (2,4,6-tripiridil-5-triazina) en HCl 0,04 N, preparar esta solución en el día.
- Solución C: (preparar en el día) 2,5 ml de solución B + 2,5 ml solución A + 25 ml buffer acetato 0,3 M.

PROCEDIMIENTO:

Suspender 3 mg de AIR en 270 μl H_2O Milli Q de en tubo de vidrio y agitar. Agregar 9 ml de reactivo de de FRAP (solución C) y 0,9 ml de H_2O . Calentar en baño a 37 °C. Se leyó la absorbancia a 595 nm, a los 4; 30; 60; 90 y 120 min.

Realizar la curva de calibración tomando alícuotas (entre 100 y 2000 μl) de la solución estándar de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, llevando con H_2O Milli Q a volumen final de 2000 μl . Leer la absorbancia a 595 nm.

El resultado se expresa en $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /g de AIR en función del tiempo.

6.7 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Para obtener la distribución de tamaño de los polisacáridos y sus pesos moleculares promedios, se disolvieron 3 mg de cada fracción en el solvente adecuado (ver luego) con agitación magnética durante toda la noche. Se utilizó una columna de exclusión por tamaño (SEC) de baja presión con bomba (BIO RAD Econo pump, USA) y colector (BIO RAD Modelo 2110, USA) utilizando un flujo de 0,4 ml/min. Para realizar las curvas de calibración se utilizaron dextranos de peso molecular 40.000, 80.700 y 500.000 Da.

Las fracciones de CDTA y Na_2CO_3 se disolvieron en 0,8 ml de imidazol acuoso (0,4mg/ml). Tras agitar toda la noche, se le adicionaron 0,2 ml de NH_4AcO 1M (pH 5). Las soluciones fueron centrifugadas y el sobrenadante fue sembrado en una columna de Sepharose CL-2B (Sigma Chemical Co., Saint Louis, Missouri) de 300mm x 9mm d.i., eluyendo a temperatura ambiente con NH_4AcO 0,2 M (pH 5).

Las fracciones acuosa, KOH 1 y 4 M fueron disueltas en 1 ml de NaOH 0,1M, y tras centrifugación, el sobrenadante fue sembrado en una columna de Sepharose CL-6B (Sigma Chemical Co.) de 300mm x 9mm d.i., eluyendo a temperatura ambiente con 0,1M NaOH (Brummell et al, 2004).

En ambos casos las fracciones fueron colectadas y las alícuotas fueron analizadas para carbohidratos totales debido a que en experiencias previas (Ponce et al., 2010) los perfiles de ácidos urónicos y carbohidratos totales fueron similares. En consecuencia sólo se llevó a cabo la metodología para carbohidratos totales de cada fracción.

6.8 Análisis reológico

Se realizó utilizando un reómetro de esfuerzo controlado tangencial (Paar Physica MCR300, Austria) equipado con geometría de platos paralelos no pulidos (PP25-P2) de 25 mm de diámetro. Se eligió una luz entre platos de 800 μm y los datos se tomaron en estado estacionario. El sistema es termostatzado en las condiciones deseadas mediante un baño Viscotherm VT2 (Physica, Alemania) conectado a un sistema Peltier.

Alrededor de 0,0400 g de las fracciones analizadas se suspendieron en H_2O Milli Q y fueron agitadas en vórtex hasta su disolución, obteniendo una solución de concentración final de 2,00 % (p/p). Luego, los sistemas se almacenaron a 8°C durante 18 h para lograr que el sistema se equilibrara previo a la medición.

6.8.1 Ensayos de flujo

Para caracterizar el fluido se registró la curva de viscosidad mediante un ensayo rotatorio realizado en un rango de valores de velocidad de deformación o de corte

tangencial ($\dot{\gamma}$) suficientemente amplio. Las curvas de flujo se determinaron por triplicado a una temperatura constante de 20,00 °C en el rango de velocidad de deformación de 0,0001 – 300 s⁻¹. A cada velocidad de deformación, se alcanzó el estado estacionario antes de registrar los datos. Los perfiles de flujo obtenidos se ajustaron mediante el modelo de Cross:

$$\eta(\dot{\gamma}) = \eta_{\infty} + \frac{(\eta_0 - \eta_{\infty})}{1 + (\tau \cdot \dot{\gamma})^m}$$

donde: $\eta(\dot{\gamma})$ es la viscosidad a cada valor de velocidad de corte, η_0 representa la viscosidad Newtoniana, a velocidad de deformación baja o tendiendo a cero, η_{∞} representa la viscosidad para deformaciones extremas, τ es la constante de tiempo correspondiente al modelo de Cross y m es una constante adimensional.

6.8.2 Ensayos dinámicos de oscilación

Para los sistemas que no fluían se prefirió determinar los espectros mecánicos, esto es, de frecuencia en condiciones de viscoelasticidad lineal. Se usó una temperatura constante de 20°C. Las mediciones se efectuaron por triplicado.

En primer lugar se realizaron los barridos de amplitud para determinar el rango de viscoelasticidad lineal (RVL). Los módulos de almacenamiento o elástico (G') y de pérdida o viscoso (G''), así como la deformación relativa o *strain* (γ), fueron evaluados como función del esfuerzo (*stress*) tangencial (σ) aplicado como estímulo, a una frecuencia constante de 1 Hz. El valor de deformación al que se realizaría luego el barrido de frecuencias (espectro mecánico) se eligió del rango de viscoelasticidad lineal determinado en el barrido de amplitud, para cada muestra y fracción aislada. Se trabajó a $\approx 0,1\%$ o a $\approx 2\%$ de deformación constante para viscoelásticos sólidos (geles) y para viscoelásticos líquidos (soluciones), respectivamente. Así se obtuvo cada espectro mecánico al valor de esfuerzo constante seleccionado: los valores de G' y G'' , así como la tangente del ángulo de desfase ($\tan\delta = G''/G'$) entre las ondas de estímulo y de respuesta, fueron registradas en función del

aumento de la frecuencia angular (ω , $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$), luego de alcanzar la condición de estado estacionario para cada punto.

Los espectros mecánicos obtenidos fueron ajustados utilizando el siguiente modelo (Kim & Yoo, 2006)

$$G'(\omega) = G'_0 \cdot \omega^A$$

$$G''(\omega) = G''_0 \cdot \omega^B$$

donde G' y G'' son los módulos elástico y viscoso, respectivamente, G'_0 y G''_0 son los módulos de equilibrio correspondientes; A y B son los exponentes relacionados a la dependencia de G' y de G'' con la frecuencia, siendo parámetros de ajuste; ω es la frecuencia angular ($\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$).

6.9 Caracterización funcional

6.9.1 Densidad aparente

Se determinó según la técnica descrita por Chau et al (2007), midiendo el volumen que ocupan 0,0500 g de muestra en una probeta graduada de 5,00 ml, luego de darle tres golpes suaves en la base de la probeta. La determinación se realizó por triplicado para cada fracción.

6.9.2 Volumen específico

Se calculó como la inversa de la densidad aparente.

6.9.3 Densidad verdadera

Se determinó con un picnómetro de helio (Accupyc 1330, Micromeritics, Gosford, Australia) a 20 °C, utilizando 6 g de fibra. La determinación se realizó diez veces para cada muestra de fibra.

6.9.4 Propiedades de hidratación

Siguiendo la técnica de Escalada Pla et al. (2007) se determinaron las propiedades de hidratación de los residuos y AIRs. Las muestras fueron molidas previamente a cada determinación.

6.9.4.1 Capacidad de hinchamiento (SC)

Se pesaron 0,0200 g de muestra, se la colocó en un tubo graduado de fondo cónico, se agregaron 2250 µl de agua y se lo dejó hidratar durante 18 horas a una temperatura constante de 25°C. Después de este lapso, se midió el volumen total alcanzado por la fibra hidratada (Robertson et al., 2000; Rhagavendra et al., 2004). Este ensayo se realizó por triplicado para cada residuo y AIR.

- $SC \text{ (ml/g)} = \text{Volumen ocupado por la muestra hidratada} / \text{peso de la muestra seca original}$

6.9.4.2 Capacidad de atrapamiento de agua (WHC)

Se pesaron 0,0200 g de muestra, se hidrató en un tubo graduado de fondo cónico con 2250 µl de agua, durante 18 horas, a 25°C. Luego se la filtró a través de papel de filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/C) 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. El WHC se determinó por triplicado para cada fracción.

- $WHC (g/g) = (\text{Peso del residuo hidratado} - \text{peso del residuo seco}) / \text{peso del residuo seco}$.

6.9.4.3 Capacidad de retención de agua (WRC)

La capacidad de retención de agua se determinó por hidratación a 25°C, durante 18 h de 0,0200 g de muestra con 2250 µl de agua, en un tubo graduado de fondo cónico. Luego se centrifugó durante 30 min a 2000 x g. Se separó el sobrenadante y se transfirió el residuo a un papel de filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/C) previamente pesado, para escurrir el líquido restante. Se pesó la fibra húmeda retenida (R+W₂) se liofilizó y se pesó el residuo seco R (Raghavendra et al., 2004). El ensayo se llevó a cabo por triplicado para cada fracción.

De este modo:

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

6.9.4.4 Cinética de la absorción de agua

La cinética de absorción de agua y también la capacidad máxima de unión de agua (WBC), se determinaron midiendo la absorción espontánea de agua a través del hinchamiento, por capilaridad a 25 °C, de una pequeña cantidad exactamente pesada (≈ 0,0400 g) de la muestra en polvo, utilizando un aparato modificado de Baumann (Robertson et al., 2000). El volumen de agua tomada por la muestra se midió a diferentes intervalos de tiempo, durante 4 h. Los ensayos cinéticos se llevaron a cabo por duplicado.

Los datos se ajustaron utilizando la siguiente ecuación (Pilosof, 2000):

$$q(t) = \frac{WBC \cdot t}{(B + t)}$$

donde:

- q corresponde al agua absorbida a tiempo t .

- **WBC** es la máxima capacidad de absorción de agua, también llamada capacidad de unión de agua (WBC).
- **B** es el tiempo necesario para absorber la mitad de la máxima absorción de agua (WBC/2).

6.10 Tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula se determinó mediante dispersión de radiación laser (*laser light scattering*) con un Mastersizer 2000E (Malvern, UK). Las mediciones se realizaron en etanol (96 % v/v) de acuerdo a Guillon & Champ (2000). Cada determinación se realizó por triplicado.

6.11 Capacidad de estabilización de emulsiones

Las propiedades emulsificantes de las fibras aisladas a partir de cerezas se evaluaron en base a la técnica de Prakongpan et al., (2002).

6.11.1 Emulsión

Se pesaron 0,7000 g de muestra (fibra), se la hidrató en un tubo graduado de fondo cónico con 10,00 ml de H₂O Milli Q durante de 18 horas, a 25°C. Luego, se agregaron 10,00 ml aceite de triglicéridos de cadena media (MCT) y se midió el volumen total inicial ($V_{inicial}$). La mezcla fue emulsionada a 9500 rpm durante 60 segundos utilizando un homogeneizador (Ultra Turax-T25, IKA Werke, Germany) con una punta de dispersión (S25N25F). Se midió el volumen total final (V_{final}) y la capacidad de formación de espuma o capacidad de espumado se calculó como:

- Capacidad de formación de espuma = $(V_{final} - V_{inicial}) \cdot 100 / V_{inicial}$

Luego, la muestra fue almacenada por 1 h, 4 h y 24 h a 20°C y evaluada mediante ensayos dinámicos para obtener el espectro mecánico.

6.11.2 Fase acuosa continúa

Se pesaron 0,7000 g de muestra (fibra), se la hidrató en un tubo graduado de fondo cónico con 10,00 mL de agua desionizada durante de 18 horas, a 25°C. A continuación, la mezcla fue homogeneizada a 9500 rpm durante 60 segundos utilizando un homogeneizador (Ultra Turax-T25, IKA Werke, Germany) con una punta de dispersión (S25N25F). La suspensión obtenida fue dejada reposar durante 1 h, 4 h y 24 h a 20°C y, a continuación, fue centrifugada. El sobrenadante fue separado y evaluado a 20°C mediante ensayos rotatorios para obtener la curva de flujo correspondiente, tal como se indicara previamente en el ítem “6.8.1”.

6.12 Análisis estadístico

Los resultados se reportan como la media y desviación estándar para n replicados. El análisis estadístico de los resultados se realizó a través de ANOVA (α : 0,05) seguido de comparaciones múltiples evaluadas por diferencia de cuadrados mínima, utilizando el programa Statgraphic package (Statgraphic Plus, versión 5.0, 2001, Manugistic Inc., Rockville, MD, USA). Las correlaciones y regresiones no lineales se realizaron utilizando GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc., USA, 2007), la función solver del Excel (Microsoft Office Excel, 2003) o por medio del programa OriginPro 7.5 SRO (Origin Lab Corporation, USA).

APÉNDICE

Entre los planes de trabajo de la Tesis estaba prevista la utilización de la espectroscopía de masa UV- MALDI-TOF para complementar los resultados obtenidos de la distribución del tamaño molecular mediante filtración en gel de Sepharose estudiados en el Capítulo 3. Dados los problemas técnicos ocurridos en el equipo destinado a esa tarea, la investigación se fue derivando a otros trabajos, que son los que forman el cuerpo principal de esta Tesis. Durante el último año fue posible realizar las primeras pruebas trabajando con MALDI en modo positivo, en colaboración con las Dras. Rosa Erra-Balsells y María L. Salum.

Resultados

Se comenzó el estudio con las fracciones **F-H₂O**, **F-CDTA** y **F-Na₂CO₃** obtenidas a partir de las paredes celulares de la variedad Regina tanto inmadura como madura (Capítulo 3).

Los mejores resultados se obtuvieron con el método de preparación de muestra de las capas sucesivas y no hubo diferencias significativas entre los resultados obtenidos a partir de las soluciones preparadas por agitación y por sonicación. Los resultados preliminares permiten efectuar las siguientes aseveraciones:

F-H₂O inmadura: reproduce bien los espectros y los repite en el tiempo, se observa un perfil de distribución de pesos moleculares semejante al de una gaussiana. Además presenta las mismas señales con diferentes matrices, lo que implica que son señales independientes de la matriz utilizada.

F-H₂O madura: también muestra siempre las mismas señales indistintamente de la matriz utilizada.

F-CDTA inmadura: se observaron pocas señales, todas debajo de 40 kDa.

F-CDTA madura: se comporta como **F-H₂O madura**, pero dentro del rango observado tiende a dar señales de menor peso molecular.

F-Na₂CO₃ inmadura: es la única que presenta señales propias de la muestra, distinguibles de la matriz, a bajos pesos moleculares

F-Na₂CO₃ madura: sólo se observan señales entre 30 y 50 kDa.

En la Tabla A.1 se resumen las señales características encontradas para cada fracción.

Tabla A.1. Rango de pesos moleculares encontrados en los espectros UV- MALDI-TOF para las seis fracciones de pectinas analizadas.

	<20 kDa	20 - 30 kDa	30 - 50 kDa	122 KDa
F-H ₂ O inmadura			X	X
F-H ₂ O madura		X		
F-CDTA inmadura			< 40 kDa	
F-CDTA madura		X		
F-Na ₂ CO ₃ inmadura	X			
F-Na ₂ CO ₃ madura			X	

Debido a los resultados promisorios obtenidos se planea continuar con este estudio para el resto de las fracciones pécticas de las otras cuatro variedades de cerezas en ambos estadios de madurez, lo que, como se explicó anteriormente, no pudo realizarse dentro de los acotados tiempos previstos para esta Tesis

Experimental

Para evaluar el rango de peso molecular de la muestras estudiadas por UV-MALDI MS, se prepararon soluciones de dos matrices diferentes (M) a partir de los compuestos comerciales *nor*-harmano (9H-pirido [3,4]indol, nHo, PM 168) y ácido gentísico (ácido 2,5-hidroxibenzoico, PM 154). Se pesaron 2 mg de (M) y se solubilizaron en una mezcla metanol:agua (MeOH: H₂O) 7:3 vol/vol.

Se utilizaron para el estudio por espectrometría de masa UV-MALDI-TOF las fracciones **F-H₂O**, **F-CDTA** y **F-Na₂CO₃** obtenidas a partir de las paredes celulares de la variedad Regina tanto inmadura como madura.

Se prepararon con las mismas soluciones de concentración 1 mg/ml (A) utilizando como solvente agua de baja conductividad (grado miliQ) para evitar el agregado de iones a la solución. Se utilizaron dos métodos para disolver las muestras: uno fue agitando la solución durante toda una noche a temperatura ambiente y el otro consistió en tratar la solución acuosa con un sonicador de alta frecuencia a 20 kHz (3 x 20 min) a temperatura ambiente.

Se utilizaron tres métodos diferentes para la preparación de las muestras depositadas sobre el electrodo portamuestra:

1. Metodo de las capas sucesivas (sándwich) preparadas con una relación 3:1(v/v) matriz-analito. La secuencia de su deposición sobre el electrodo portamuestra fue 0,5 µl de cada solución en el orden matriz:analito:matriz:matriz, dejando evaporar el solvente luego de cada transferencia, a temperatura ambiente y presión normal.
2. Metodo mezcla. (a) Se preparo una mezcla 3:1(v/v) de las soluciones de matriz y de analito. Se transfirieron 0,5 µl de la mezcla sobre el portamuestra y se dejo evaporar el solvente a temperatura ambiente y presión normal. (b) Se preparo una mezcla 1:1(v/v) matriz-analito, transfireindose 0,5 µl de la mezcla sobre el portamuestra de la manera ya descripta.

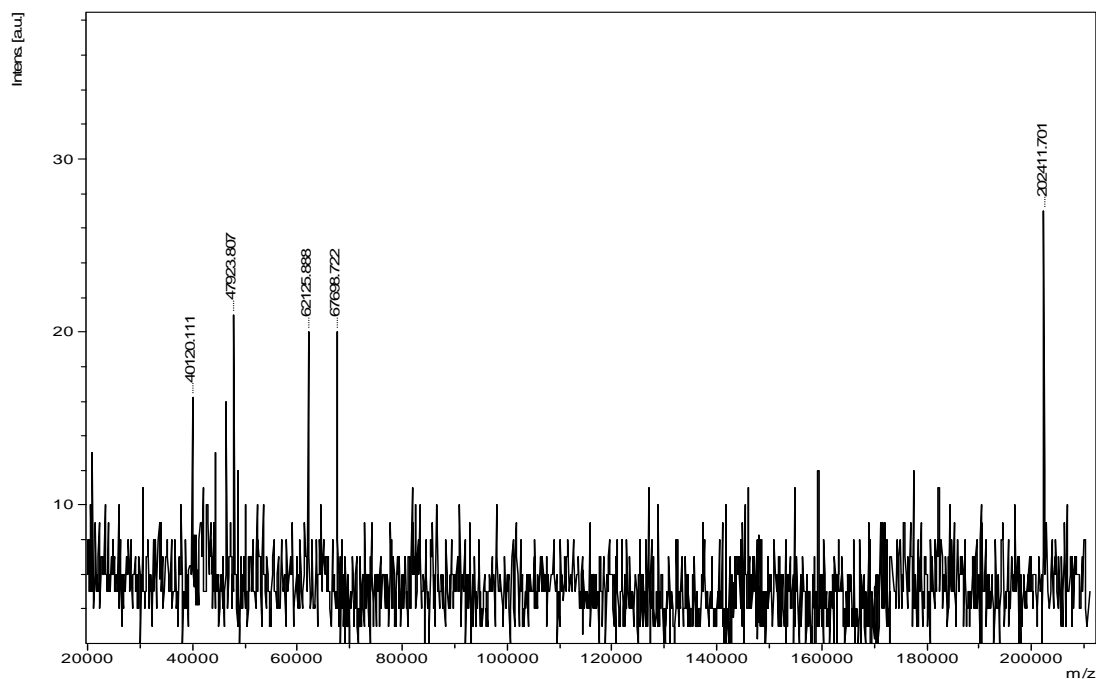
Los espectros fueron calibrados con un calibrante externo. Para ello se utilizó una proteína comercial (albúmina de suero bovino, PM 67000 Da) y el ácido *trans*- α -ciano-4-hidroxicinámico (CHC) como matriz.

Equipamiento

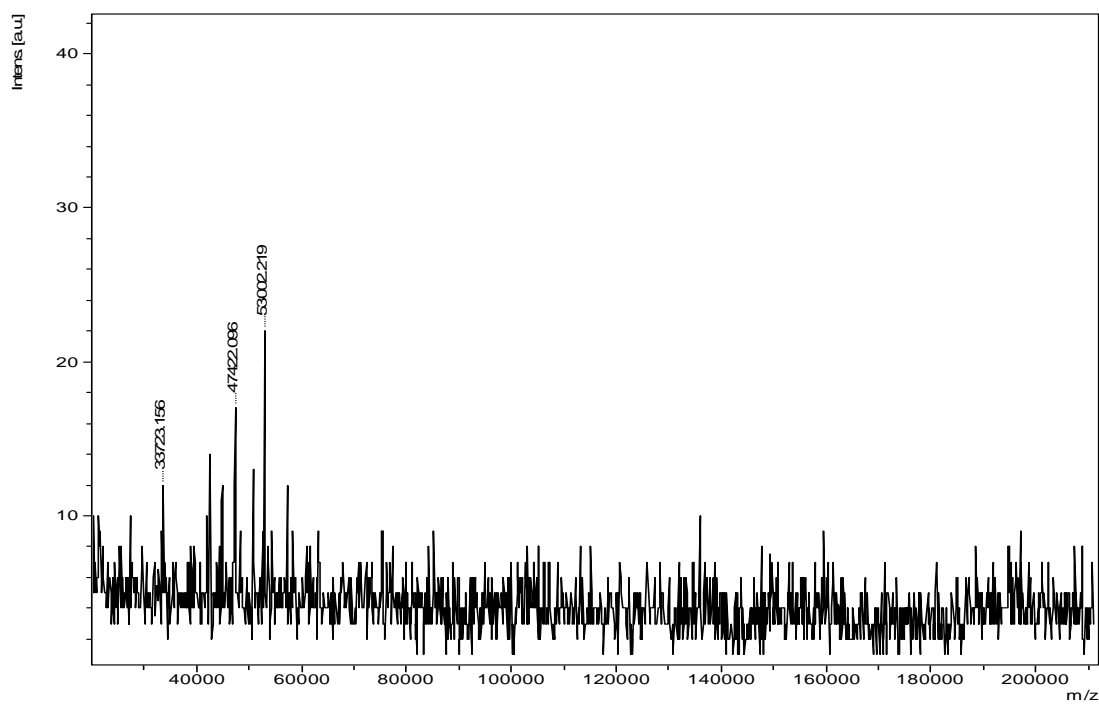
Los espectros se obtuvieron en un equipo UV-MALDI-TOF/TOF Bruker Ultraflex Daltonics, equipado con un láser sólido ($\lambda_e=355\text{nm}$) en modo lineal positivo. Cada espectro fue medido con una energía de aceleración de 20 kV y una frecuencia de disparos de 100.0. La obtención de espectros se realizó a partir del programa FlexControl, con tres métodos en modo lineal positivo cubriendo un amplio rango de detección: LP 4 (10-24 KDa), LP 22 (20-70 KDa) y LP 66 (30-200 KDa), y el análisis de los espectros se realizó con el programa FlexAnalysis. Se trabajó con una potencia del láser de 60% para modo positivo. Los espectros fueron obtenidos sobre un total de 500 disparos. El rango de masa/carga (m/z) estudiado fue de 10-200 KDa.

Espectros obtenidos

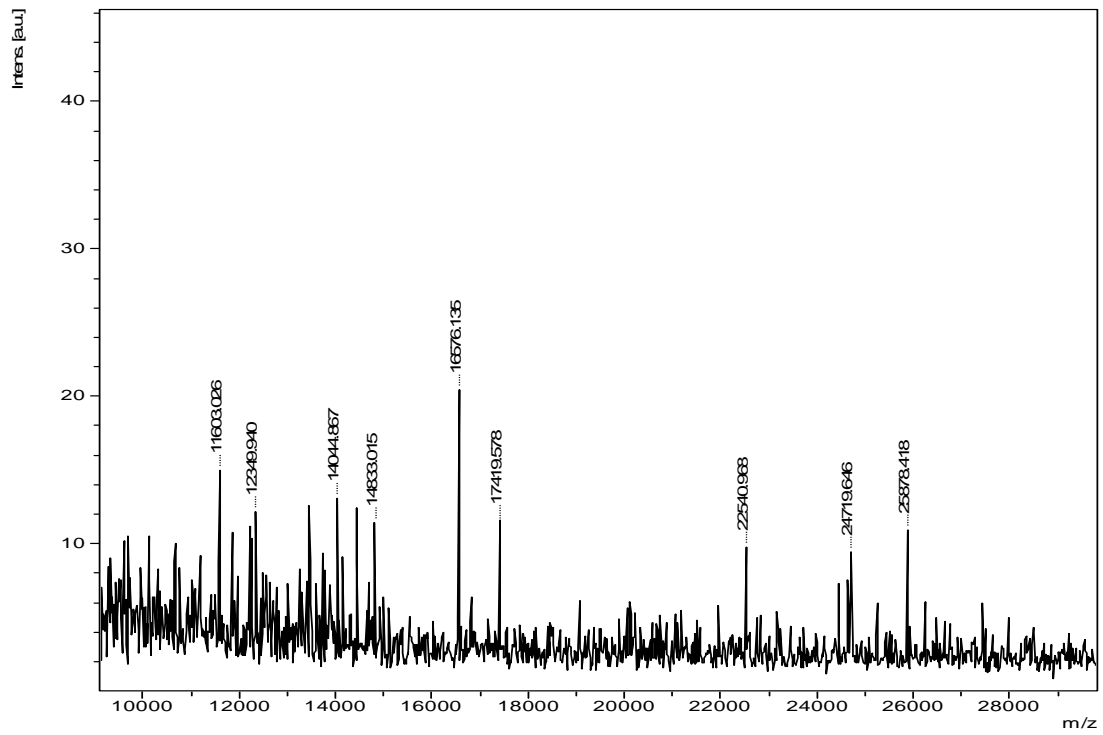
A continuación se muestran algunos de los espectros obtenidos.



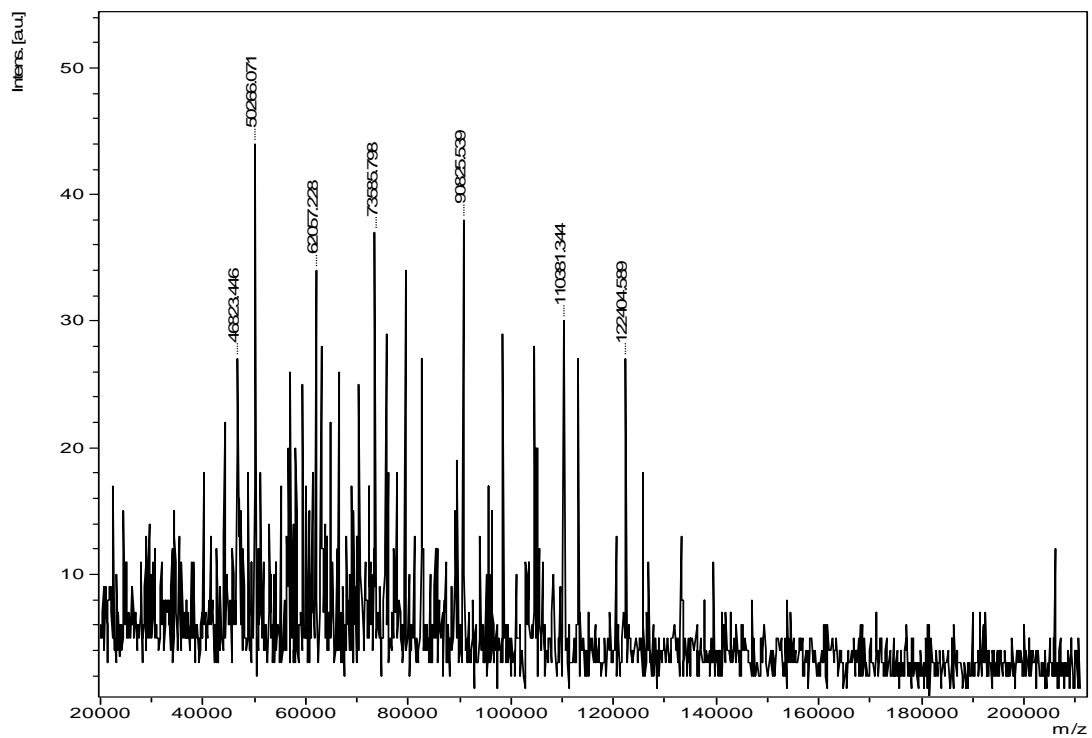
Espectro 1. F-Na₂CO₃ madura, matriz: norharmano, método: LP_66.



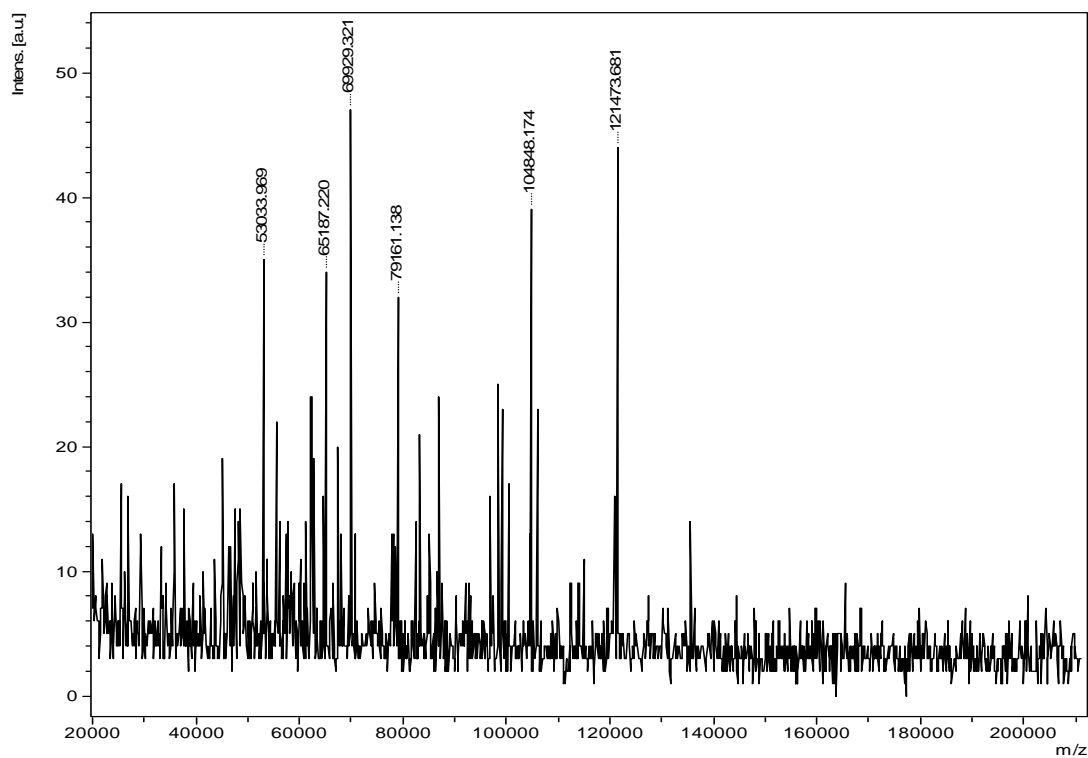
Espectro 2. F-Na₂CO₃ madura, matriz: ácido gentísico, método: LP_66.



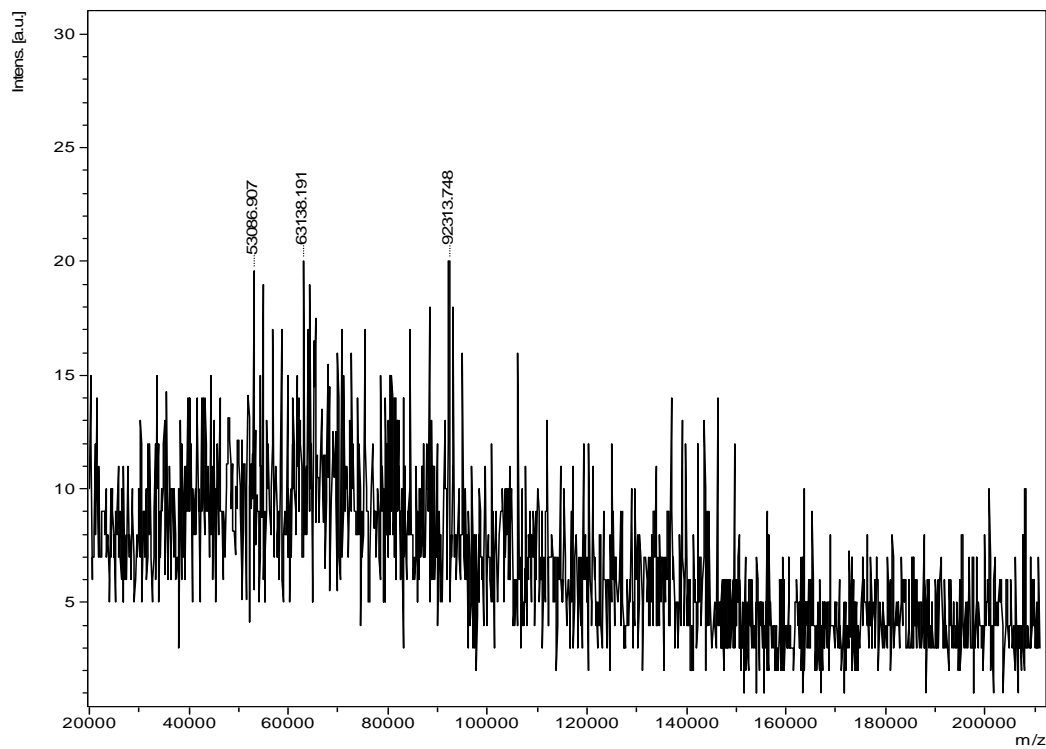
Espectro 3. F-Na₂CO₃ inmadura, matriz: ácido gentsico, método: LP_4.



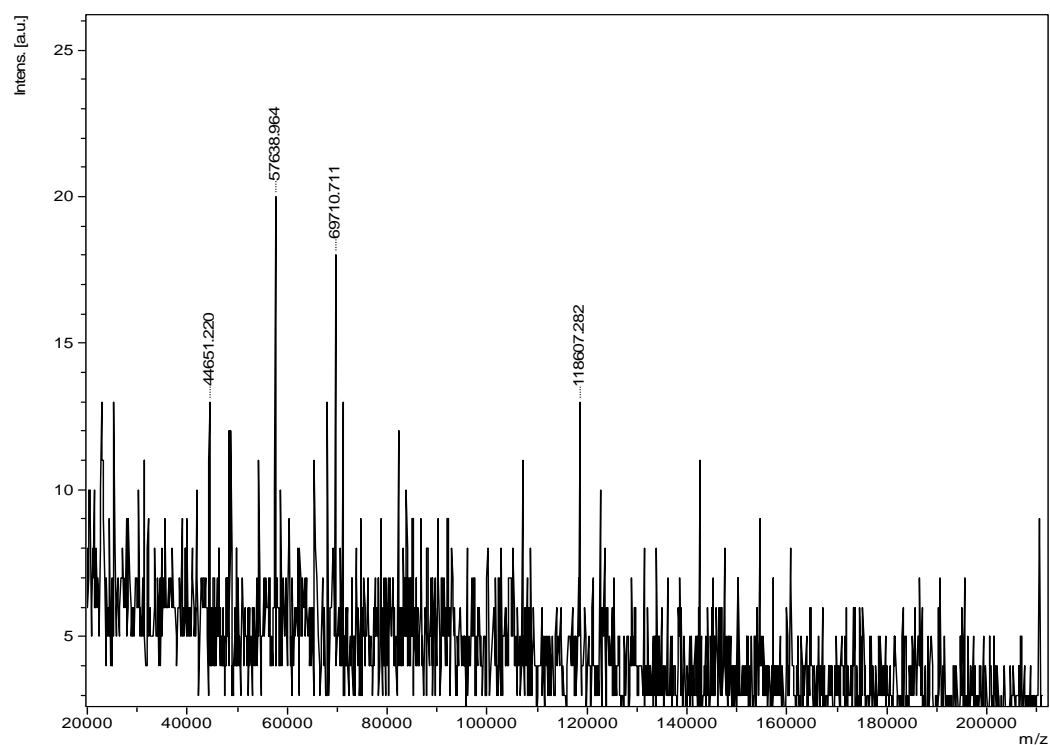
Espectro 4. F-H₂O inmadura, matriz: norharmano, método: LP_66.



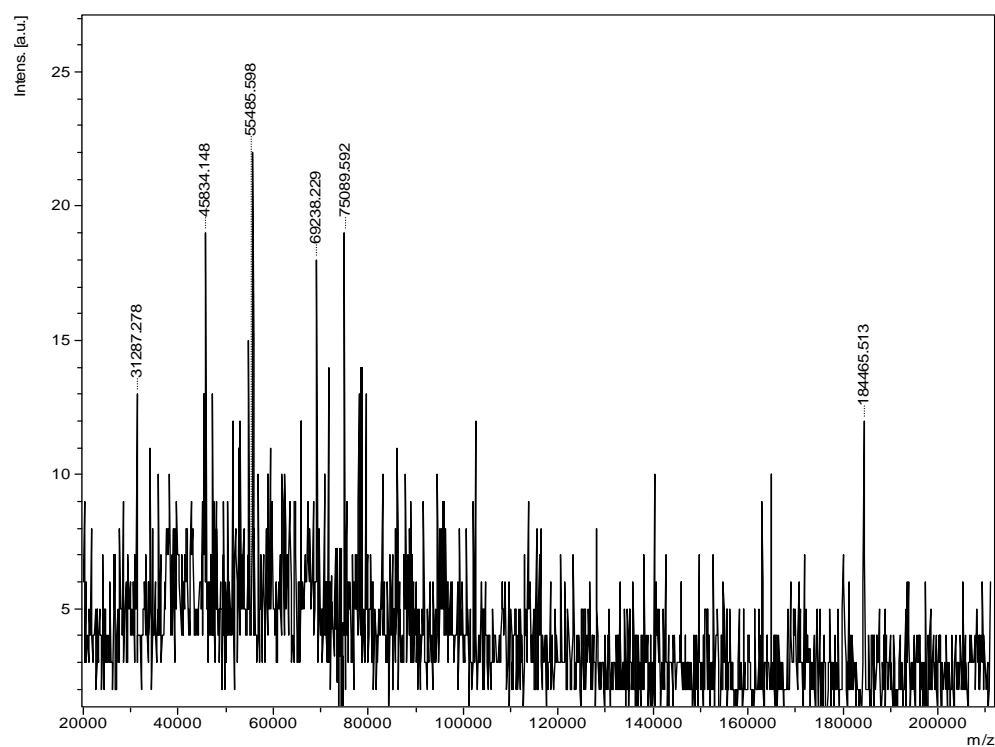
Espectro 5. F-H₂O inmadura, matriz: ácido genticóico, método: LP_66.



Espectro 6. F-H₂O madura, matriz: ácido genticóico, método: LP_66.



Espectro 7. F-CDTA inmadura, matriz: norharmano, método: LP_66.



Espectro 8. F-CDTA inmadura, matriz: ácido gentísico, método: LP_66.

RESUMEN FINAL

El objetivo del presente trabajo de Tesis fue el estudio químico y funcional de pectinas y glicanos entrecruzantes de paredes celulares de prunoideas. La Tesis incluye un capítulo introductorio general sobre la pared celular, cuatro capítulos de resultados (cada uno de ellos con una introducción particular al tema), uno que contiene a los materiales y métodos utilizados, un apéndice con los resultados obtenidos hasta el momento en el estudio por espectroscopía de masa UV- MALDI-TOF y por último la bibliografía.

En el **Capítulo 1** se presenta una introducción general sobre las paredes celulares componentes y modelos de estructura de la misma, modificaciones que puede sufrir durante el crecimiento y maduración de los frutos e importancia en la textura de los mismo también se presentan los antecedentes sobre estudios de pared celular de frutas realizados en nuestro laboratorio.

En el **Capítulo 2** se presentan los resultados obtenidos al evaluar la manera en que diferentes condiciones de extracción acuosa (tiempo y temperatura) de pectinas débilmente unidas aisladas a partir de las paredes celulares de ciruelas japonesas (*Prunus salicina* Lindl.) variedad "Roysum" afectan las características químicas y reológicas de los productos extraídos. Se pudo determinar que el procedimiento extractivo de las pectinas débilmente unidas habitual que demora 24 h a temperatura ambiente puede acortarse a 2 h sin afectar los rendimientos ni las características del producto. Además que todas las fracciones extraídas de polímeros están constituidas por pectinas fisiológicamente activas, esto es, pectinas con un efecto viscosante acorde a lo que ocurre en la pared celular y que las pectinas extraídas con agua a temperatura ambiente presentan un comportamiento reológico útil para aplicaciones farmacéuticas y formulación de alimentos, lo que permitiría aprovechar las frutas descartadas de la comercialización y del procesamiento industrial de vegetales, para el aislamiento de biopolímeros, con la consiguiente valorización de las materias primas.

En el **Capítulo 3** se estudiaron los cambios en los polisacáridos de la pared celular durante el desarrollo de frutos de diferentes variedades de cerezo dulce (*Prunus avium* L.) con diferentes características de firmeza y susceptibilidad al *cracking*, tratando de encontrar un modelo característico para las paredes celulares según las características que presentan cada una de las variedades estudiadas. Los resultados demostraron que los cambios que ocurren a nivel de la pared celular durante la maduración de las cerezas presentan

diferencias sutiles entre las distintas variedades no pudiendo aventurar una conclusión definitiva sobre un patrón de metabolismo de pared celular diferenciado por las características de firmeza ni de susceptibilidad al *cracking* de las diversas variedades.

En el **Capítulo 4** se eligieron entre las cinco variedades de cerezas dulces estudiadas en el Capítulo 3, las dos variedades que presentan las características opuestas de firmeza, es decir Regina (firme) y Sunburst (blanda), inmaduras y maduras, para entender mejor los cambios relacionados con la maduración y su funcionalidad biológica. Para ello, además del análisis químico se evaluó el desempeño reológico de las fracciones solubles así como las propiedades de hidratación de los residuos insolubles, todos ellos aislados en algunos pasos de la extracción secuencial de los biopolímeros de la pared celular. A partir de este estudio se pudo concluir que la alta firmeza y compactibilidad que presenta la variedad Regina está relacionada a la alta proporción de uniones calcio en las cadenas de HGs de las fracciones solubles en CDTA localizadas en la laminilla media de la pared celular, así como a una mayor proporción molar de azúcares neutros (ramnosa y arabinosa) en las pectinas unidas por puentes diferúlicos extraíbles con Na₂CO₃. También contribuyeron significativamente a la rigidez de la pared celular y, por lo tanto, a la mayor firmeza de las cerezas de esta variedad, el mayor efecto viscosante debido a las pectinas entrecruzadas por Ca²⁺ y a aquellas ricas en arabinanos. Las determinaciones realizadas en el presente Capítulo de la composición química y de las propiedades funcionales pueden ayudar a comprender las funciones de la pared celular en cerezas.

Por último, en el **Capítulo 5** se realizó la caracterización química y funcional de las fibras aisladas a partir del descarte de la cosecha de cerezas dulces (*Prunus avium L.*) en vista de su aprovechamiento como ingrediente funcional y/o posible nueva fuente de fibra dietaria. Se concluyó que los residuos de las cosechas de cerezas son una valiosa fuente de biopolímeros funcionales y compuestos bioactivos (por su capacidad antioxidante), pudiendo ser aplicados a la obtención de fibras útiles como ingredientes de alimentos funcionales y como fibra dietaria. Además debido a las semejanzas encontradas en sus propiedades funcionales, los residuos de la cosecha de las distintas variedades podrían ser procesados en forma conjunta.

En el **Capítulo 6** se especifican los materiales utilizados, así como se describen todos los métodos aplicados durante el desarrollo de la Tesis.

En el **Apéndice** se presentan los resultados preliminares obtenidos hasta el momento en el estudio de la distribución de pesos moleculares de las pectinas extraídas en H₂O, CDTA y Na₂CO₃ por espectroscopía de masa UV- MALDI-TOF.

Parte de este trabajo de Tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

- María F. Basanta, Nora M. A. Ponce, Ana M. Rojas, Carlos A. Stortz.
*Effect of the extraction time and temperature on the characteristics of loosely-bound pectins from Japanese plum (*Prunus salicina*).*
Carbohydrate Polymers, **2012**, 89, 230-235.
- María F. Basanta, Marina F. de Escalada Pla, Carlos A. Stortz, Ana M. Rojas.
Chemical and functional properties of cell wall polymers from two cherry varieties at two developmental stages.
Carbohydrate Polymers, **2013**, 92, 830-841.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, E.A.; Labavitch, J.M. (1980) Cell wall metabolism in ripening fruit. I. Cell wall changes in ripening 'Bartlett' pears. *Plant Physiology* 65, 1009-1013.
- Ainsworth, E.A.; Gillespie, K.M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2(4), 875–877.
- Alayón-Luaces, P.; Ponce; N.M.A.; Mroginski, L. A.; Stortz C.A.; Sozzi, G.O. (2012). Compositional changes en cell wall polysaccharides from apple fruit callus cultures modulated by different plant growth regulators. *Plant Science* 185, 169-175.
- Albersheim, P.; Nevins D.J.; English P.D.; Karr A. (1967). A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research* 5, 340–345.
- Alkorta, I.; Garbisu C.; Llama M.J.; Serra J.L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes. *Process Biochemistry* 33 (1), 21-28.
- Altube ,H.A.; Santinoni, L.A.; Alem, H.J. (2007) *Introducción a la fruticultura*. Pp 3-40. En Sozzi GO (Ed.), *Árboles frutales: Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento*. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Anderson, J.W.; Baird, P.; Davis R.H.; Ferreri, S.; Knudtson, M.; Koraym,A.; Waters, V. ; Williams, C.L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews* 67(4), 188–205.
- Andrews, P.K.; Shulin, L. (1994) Partial purification and characterization of β -D-galactosidase from sweet cherry, a non climateric fruit. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 42, 2177-2182.
- Andrews, P.K.; Shulin, L. (1995) Cell wall hydrolytic enzyme activity during development of nonclimateric sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Journal Horticultural Science and Biotechnology* 70, 561-567.
- Australian Cherry Production Guide (2010). Publication compiled by Paul James, Rural Solutions SA., C/- Lenswood Centre, Lenswood, South Australia 5240. Disponible en: http://www.tia.tas.edu.au/_data/assets/pdf_file/0006/154095/Cherry-Production-Guide.pdf
- Barret, A.J.; Northcote, D.H. (1965) Apple fruit pectic substances. *Biochemistry Journal* 94,617-627.
- Barret; D.M.; Gonzalez, C. (1994) Activity of softening enzymes during cherry maturation. *Journal of Food Science* 59, 574-577.
- Batisse, C.; Fils-Lycaon, B., Buret, M. (1994) Pectin changes in ripening cherry fruit. *Journal Food. Science* 59, 389-393.

- Batisse, C.; Buret, M.; Coulomb, P.J.; Coulomb, C. (1996a) Ultrastructure of different textures of Bigarreau Burlat cherries during maturation. *Canadian Journal of Botany* 74, 1974-1981.
- Batisse, C.; Buret, M.; Coulomb, P.J. (1996b) Biochemical differences in cell wall of cherry fruit between soft and crisp fruit. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44, 453-457.
- BeMiller, J. N.; Whistler, R.L. *Carbohydrates In: Food chemistry* 3rd Ed (Fennema, O. R., et al), Taylor and Francis Group, New York USA, 191-204 (1996).
- Beneke, C.E.; Viljoen, A.M.; Hamman, J.H. (2009). Polymeric plant-derived excipients in drug delivery. *Molecules* 14, 2602–2620.
- Blumenkrantz, N.; Asboe-Hansen, G. (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54:484-489.
- Boonrod, D.; Reanma, K.; Niamsup, H. (2006). Extraction and physicochemical characteristics of acid-soluble pectin from raw papaya (*Carica papaya*) peel. *Chiang Mai Journal Science* 33, 129–135.
- Bourne, M.C. (1979) Texture of temperate fruit. *J. Texture Studies* 10, 25-44.
- Budini, R., Tonelli, D.; Girotti, S. (1980) Analysis of total phenols using prussian blue method. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 28, 1236–1238.
- Braccini, I.; Pérez, S. (2001). Molecular basis of Ca²⁺ -induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules* 2, 1089–1096.
- Bravo, L.; Goya, L.; Lecumberri, E. (2007). LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International* 40, 393–405.
- Brett, C.T.; Waldron, K.W. (1996). *The physiology and biochemistry of plant cell walls* (second edition). London, UK: Chapman and Hall pp. 26–32.
- Brown, J.A.; Fry, S.C. (1993). Novel O-D-galacturonyl esters in the pectic polysaccharides of suspension-cultured plant cells. *Plant Physiology* 103, 993–999.
- Brownleader, M.D.; Jackson, P.; Mobasheri, A.; Pantelides, A.T.; Sumar, S.; Trevan, M.; Dey, P.M. (1999) Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39 (2), 149-164.
- Brummell, D.A.; Harpster, M.H. (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47, 311-340.
- Brummell, D.A.; Dal Cin, V.; Crisosto, C.H.; Labavitch, J.M. (2004). Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany* 55, 2029–2039.

- Brummell, D.A. (2006) Cell wall disassembly in ripening fruits. *Functional Plant Biology* 33, 103-119.
- Bunzel, M.; Ralph, J.; Marita, J.M.; Steinhart H. (2000) Identification of 4-O-5-coupled diferulic acid from insoluble cereal fiber. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48(8) 3166–3169.
- C.A.A. (2012). Código Alimentario Argentino. Ministerio de Salud Pública de la Argentina, www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XVIII.pdf
- Caffall, K.H; Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 344, 1879-1900.
- Cameron, R.G.; Luzio, G. A.; Vasu, P.; Savary, B. J.; Williams, M.A.K. (2011). Enzymatic modification of a model homogalacturonan with the thermally tolerant pectin methylesterase from citrus: 1. Nanostructural characterization, enzyme mode of action, and effect of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 2717–2724.
- Campana, B.M.R. (2007) Índices de madurez, cosecha y empaque de frutas. Pp.705-768. En: Sozzi GO (Ed.) *Árboles Frutales: Ecofisiología, Cultivo y Aprovechamiento*. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Carpita, N.C.; Gibeaut, D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* 3, 1–30.
- Carpita, N.C. ; Mc Cann M.C. (2000) The cell wall. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. pp. 52-108 En Eds. Buchanan BB, Grisse W, Jones R (American Society of Plant Physiologists).
- Cittadini, E.D. (2007) Sweet cherries from the end of the world: Options and constraints for fruit production systems in South Patagonia, Argentina. Ph.D. thesis, Wageningen University, Holland.
- Coenen,G.J.; Bakx E.J.; Verhoef, R.P.; Schols, H.A.; Vorangen, A.G.J.; Identification of the connecting linkage between homo – or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydrate Polymers* 70, 224-235.
- Cosgrove, D.J. (1989). Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. *Planta* 177, 121–130.
- Cosgrove, D.J (2001) Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiology* 125, 131-134.
- Chanliaud, E.; Burrows, K.M.; Jeronimidis, G.; Gidley, M. J. (2002). Mechanical properties of primary plant cell wall analogues. *Planta* 215, 989–996.
- Chau, C.F.; Wang, Y.T.; Wen, Y.L. (2007). Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre. *Food Chemistry* 100, 1402–1408.

- Chen, J.Y.; Piva, M.; Labuza, T.P. (1984). Evaluation of water binding capacity (WBC) of food fiber sources. *Journal of Food Science* 49, 59–63.
- Choi, C.; Toivonen, P.; Wiersma, P.A.; Kappel, F. (2002a) Differences in levels of pectic substances and firmness in fruit from six sweet cherry genotypes. *Journal American Pomological Society* 56, 197-201.
- Choi, C.; Wiersma, P.A.; Toivonen, P.; Kappel, F. (2002b) Fruit growth, firmness and cell wall hydrolytic enzyme activity during development of sweet cherry fruit treated with gibberellic acid (GA₃). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77, 615-621.
- Da Silva, Y.A.L.; Rao, M.A. (1992). Viscoelastic properties of food hydrocolloid dispersions. In M. A. Rao, & J. F. Steffe (Eds.), *Viscoelastic properties of foods* (pp. 285–315). Essex, England: Elsevier Science Publishers Ltd.
- de Escalada Pla, M.F.; Ponce, N.M.A.; Stortz, C.A.; Rojas, A.M. ; Gerschenson, L.N. (2007). Composition and functional properties of enriched fibre products obtained from pumpkin (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret). *LWT – Lebensm.-Wiss. U–Technol* 40, 1176–1185.
- de Escalada Pla, M.F.; Rojas, A.M.; Gerschenson, L.N. (2011). Effect of butternut (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) fibres on bread-making, quality and staling. *Food and Bioprocess Technology*, 58, 1-11.
- De’Nobili, M.D.; Pérez, C.D.; Navarro, D.A.; Stortz, C.A.; Rojas, A.M. (2013). Hydrolytic stability of l-(+)-ascorbic acid in low methoxyl pectin films with potential antioxidant activity at food interfaces. *Food and Bioprocess Technology* 6 (1), 186-197.
- Diaz, J.V.; Anthon, G.E.; Barrett, D.M. (2007) Nonenzymatic degradation of citrus pectin and pectate during prolonged heating: effects of pH, temperature, and degree of methyl esterification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 5131-5136.
- Donaghy, J.A.; McKay, A.M. (1994). Novel screening assay for the detection of phenolic acid esterases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10, 41–44.
- Dreher, M. (1999). “Food Sources and Uses of Dietary Fiber”. En: S.S. Cho, L. Prosky & M. Dreher (Eds.), *Complex Carbohydrates in Foods*. Marcel Dekker Inc., NY, USA.
- Diplock, A.T; Aggett P.A.; Ashwell M.; Bornet F.; Fern E.B. Roberfroid M.B.Scientific (1999) Concepts of functional foods in Europe. *Consensus Document. Br J Nutr* 81(1), 1-27.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Robers, P.A.; Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350–356.
- Egley, E.; Paul Jr.; R.N., Vaughn, K.C.; Duke, S.O. (1983). Role of peroxidase in the development of water-impermeable seed coats in *Sida spinosa* L. *Plant* 157 (3), 157–224.

- Elleuch, M.; Bedigian, D.; Roiseux, O.; Besbes, S.; Blecker, Ch.; Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterization, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry* 124(2), 411–421.
- Endre H.U.; Mattes, F.; Norz, H. (2005). "Pectins" En: Y.H. Hui (Ed.) *Handbook of Food Science Technology and Engineering*, vol 3, Marcel Dekker, USA.
- Esti, M.; Cinquanta, L.; Sinesio, F.; Moneta, E.; Di Matteo, M. (2002) Physicochemical and sensory fruit characteristics of two sweet cherry cultivars after cool storage. *Food Chemistry* 46,399-405.
- FAOSTAT (2008) Exportación de cultivos: Exportación de cerezas. Página web: <http://faostat.fao.org>
- FAOSTAT (2009) Producción de cultivos: Producción de cerezas. Página web: <http://faostat.fao.org>
- Faravash, R.S.; Ashtiani F.Z. (2008). "The influence of acid volume, ethanol-to-extract ratio and acid-washing time on the yield of pectic substances extraction from peach pomace". *Food Hydrocolloids* 22, 196-202.
- 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.; Bestard, M.J.; Sanjuan, N.; Roselló, C.; Mulet, A. (2000). Effect of rehydration temperature on the cell wall components of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) plant tissues. *Journal of Food Engineering* 46, 157–163.
- Femenia, A.; Sastre-Serrano, G.; Simal, S.; Garau, M. C.; Eim, V. S.; Rosselló, C. (2009). Effects of air-drying temperature on the cell walls of kiwifruit processed at different stages of ripening. *LWT – Food Science and Technology* 42(1), 106–112.
- Fernandez, M.L. (2001). "Pectin Composition, Chemistry, Physicochemical Properties, Food Applications, and Physiological Effects". En: S.S. Cho, & M.L. Dreher, *Handbook of Dietary Fibre*, London: Taylor & Francis, United Kingdom.
- Filisetti-Cozzi, T.M.C.C.; Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197, 157–162.
- Fils-Lycaon B.; Buret, M. (1990) Loss of firmness and changes in the pectic fractions during ripening and overripening of sweet cherry. *HortScience* 25, 777-778.

- Fissore, E.N.; Rojas, A.M.; Gerschenson, L.N. (2012). Rheological performance of pectin enriched products isolated from red beet (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*) through alkaline and enzymatic treatments. *Food Hydrocolloids* 26, 249–260.
- Fraeye, I.; De Roeck, A.; Duvetter, Thomas; Verlent, I.; Hendrickx, M. ; Loey, A.V. (2007) Influence of pectin properties and processing conditions on thermal pectin degradation. *Food Chemistry* 105 555-563.
- Fry, S.C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology* 37, 165–186.
- Gao, L.; Mazza, G. (1995). Characterization, quantitation, and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 343-346.
- Garna, H.B.; Mabon, N.; Robert, C.; Cornet, C.; Nott, K.; Legros, H.; Wathelet, B.; Paquot, M. (2007). "Effect of extraction conditions on the yield and purity of apple pomace pectin precipitated but not washed with alcohol" *Journal of Food Science* 72 1, 1 – 9.
- Goulao, L.F.; Oliveira, C.M. (2008) Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology* 19, 4-25.
- Gross, K. C.; Wallner, S.J. (1979). Degradation of cell wall polysaccharides during tomato fruit ripening. *Plant Physiology* 63, 117–120.
- Gross, K.C.; Sams C (1984) Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry* 23, 2457-2461.
- Guillon, F.; Champ, M. (2000). Structural and physical properties of dietary fibers, and consequences of processing on human physiology. *Food Research International* 33, 233–245.
- Guillotin, S.E.; Bakx, E. J.; Boulenguer, P.; Mazoyer, J.; Schols, H. A.; Voragen, A. G. J. (2005). Populations having different GalA blocks characteristics are present in commercial pectins which are chemically similar but have different functionalities. *Carbohydrate Polymers* 60, 391–398.
- Ha, M.A; Apperley, D.C.; Jarvis, M.C. (1997) Molecular Rigidity in Dry and Hydrated Onion Cell Walls. *Plant Physiology* 115, 593-598.
- Harker, F.R.; Redgwell, R.J.; Hallett, I.C.; Murray, S.H. (1997) Texture of fresh fruit *Horticultural Reviews* 20, 121-224.
- Hatfield, R.D.; Ralph, J.; Grabber, J.H. (1999). Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 403-407.
- Houben, K.; Jolie, R.P.; Fraeye, I.; Van Loey, A.M.; Hendrickx, M.E. (2011). Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: Structural

- characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. *Carbohydrate Research* 346, 1105–1111.
- Huber, D.J. (1984) Strawberry (*Fragaria ananassa*) fruit softening, the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *Journal of Food Science* 49, 1310-1315.
- Huber, D.J.; O'Donoghue, E.M. (1993) Polyuronides in avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits exhibit markedly different patterns of molecular weight downshifts during ripening. *Plant physiology* 102, 473-480.
- Jackson, P.; Paulo, S.; Brownleader, M.D.; Freire, P.; Ricardo, C.P.P.; (1999). An extensin peroxidase is associated with white-light inhibition of lupin (*Lupinus albus*) hypocotyl growth. *Aust. J. Plant Physiol* 26, 313–326.
- Jarvis, M.C. (2011). Plant cell walls: Supramolecular assemblies. *Food Hydrocolloids* 25, 257–262.
- John, M. J.; Thomas, S. (2008). Biofibres and biocomposites. *Carbohydrate Polymers* 71, 343–364.
- Joye, D.D.; Luzio, G.A. (2000). "Process for selective extraction of pectins from plant material by differential pH." *Carbohydrate Polymers* 43, 337-342.
- Karadağ, E.; Üzümlü, Ö.; Saraydin, D. (2002). Swelling equilibria and dye adsorption studies of chemically crosslinked superabsorbent acrylamide/maleic acid hydrogels. *European Polymer Journal* 38, 2133–2141.
- Keegstra, K.; Talmadge, K; Bauer, W.D.; Albersheim, P. (1973) The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiology* 51, 188-196
- Kim, C.; Yoo, B. (2006). Rheological properties of rice starch-xanthan gum mixtures. *Journal of Food Engineering* 75, 120–128.
- Koh, T.H.; Melton, L. D. (2002). Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. *Postharvest Biology and Technology* 26, 23–33.
- Kohajdová, Z.; Karovičová, J.; Jurasová, M. (2012). Influence of carrot pomace powder on the rheological characteristics of wheat flour dough and on wheat rolls quality. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 11(4), 381-387.
- Kondo, S.; Danjo, C. (2001) Cell wall polysaccharide metabolism during fruit development in sweet cherry 'Satohnishiki' as affected by gibberellic acid. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 70, 178-184.
- Kratchanova, M.; Slavov, A.; Kratchanov, C. (2004) Interaction of pectin with amino acids and other aminocompounds in aqueous solution. *Food Hydrocolloids* 18, 677-683.

- Kulkarni, S.G.; Vijayanand, P. (2010). Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* L.). *LWT – Food Science and Technology* 43, 1026–1031.
- Lapasin, R.; Pricl, S. (1995). *Rheology of industrial polysaccharides. Theory and applications*. Wester Cleddens Road, Bishopbriggs, Glasgow G64 2NZ, UK: Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall., pp. 85–103.
- Lasheras, M.S. (2004). “Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*”. Tesis Doctoral, Barcelona.
- 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.
- Lebesi, D. M.;Tzia, C. (2012). Use of endoxylanase treated cereal brans for development of dietary fiber enriched cakes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 13, 207–214.
- Lee, S.C.; Prosky, L.; DeVries, J.W. (1992) Determination of total, soluble, and insoluble dietary fibre in foods--Enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: Collaborative study. *Journal. AOAC International* 75, 395-416.
- Lefebvre, J.; Doublier, J.L. (2005). Rheological behaviour of polysaccharides aqueous systems. In S. Dumitriu (Ed.), *Polysaccharides: Structural diversity and functional diversity* (pp. 357–394). New York: Marcel Dekker Inc.
- Levine, I. N. (2008). *Physical Chemistry*. McGraw-Hill Science-Engineering-Math, 6th edition, New York.
- Looney, N.E.; Webster, A.D.; Kupferman, E.M. (1996) Harvest and handling sweet cherries for the fresh market. Pp 411-441. En: Webster AD y Looney NE (Eds.) *CHERRIES: Crop Physiology, Production and Uses*. CAB International, Wallingford, UK.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr A.L.; Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Lupton, J.R.; Betteridge,V.A.; Pijls, L.T.J. (2009). Codex final definition of dietary fibre: issues of implementation. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, Special Issue: Dietary Fibre, 1(4), 206–212.
- Luzio, G.A.; Cameron, R. G. (2008). Demethylation of a model homogalacturonan with the salt-independent pectin methylesterase from citrus: Part II. Structure–function analysis. *Carbohydrate Polymers* 71, 300–309.
- MacDougall, A.J.; Ring, S.G. (2004). “Pectic polysaccharides.” En: P. Tomasik (Ed) *Chemical and functional properties of food saccharides*, CRC Press LLC, USA.

- Manganaris, G.A.; Vicente, A.R.; Crisosto, C.H.; Labavitch, J.M. (2008). Cell wall modifications in chilling-injured plum fruit (*Prunus salicina*). *Postharvest Biology & Technology* 48, 77–83.
- Marcus, S.E.; Verhertbruggen, Y.; Herve, C.; Ordaz-Ortiz, J.J.; Farkas, V.; Pedersen, H.L. (2008) Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC. Plant Biology* 8, 60
- Marry, M.; Roberts, K.; Jopson, S. J.; Huxham, I. M.; Jarvis, M.C.; Corsar, J.; Robertson, E.; McCann, M.C. (2006). Cell-cell adhesion in fresh sugar-beet root parenchyma requires both pectin esters and calcium cross-links. *Physiologia Plantarum* 126, 243–256.
- May, C.D. (2000). “Pectins”. En: G.O. Phillips & P.A. Williams (Eds) *Handbook of Food Hydrocolloids*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, England.
- May, C.D. (1990). “Industrial Pectins: Sources, Production, and Applications”. *Carbohydrate Polymers* 12, 79-99.
- Mazeau, K.; Perez, S. (1998). The preferred conformations of the four oligomeric fragments of rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Research* 311, 203–217.
- McCollum, T.G.; Huber D.J., Cantliffe D.J. (1989). Modification of polyuronides and hemicelluloses during muskmelon fruit softening. *Physiologia Plantarum* 76, 303-308.
- McNeil, M.; Darvill, A.; Albersheim, P. (1980) Structure of plant cell wall, rhamnogalacturonan I a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension cultured sycamore cells acer-pseudoplatanus cells. *Plant Physiology* 66 (6), 1128.
- Melcion, J. P. (2000). La granulométrie de l'aliment: principe, mesure et obtention. *INRA Productions Animales* 13(2), 81–97.
- Merkus, H. G. (2009). *Particle Size Measurements: Fundamentals, Practice, Quality*. Particle Technology Series, Springer Science+Business Media B.V.
- Mittal, A.; Katahira, R.; Himmel, M. E.; Johnson, D. K. (2011). Effects of alkaline or liquid-ammonia treatment on crystalline cellulose: changes in crystalline structure and effects on enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels* 4, 41–57.
- Mohnen, D. (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 266-277.
- Morris, E. R.; Cutler, A.N.; Ross-Murphy, S. B.; Rees, D. A.; Price, J. (1981). Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. *Carbohydrate Polymers* 1, 5–21.

- Morris, G. A.; Ralet, M.C.; Bonnin, E.; Thibault, J.F.; Harding, S.E. (2010). Physical characterisation of the rhamnogalacturonan and homogalacturonan fractions of sugar beet (*Beta vulgaris*) pectin. *Carbohydrate Polymers* 82, 1161–1167.
- Ng, A.; Waldron, K. W. (1997). Effect of cooking and pre-cooking on cell-wall chemistry in relation to firmness of carrot tissues. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73, 503–512.
- Ng, A.; Parr A.J.; Ingham, L.M.; Rigby, N.M.; Waldron K.M. (1998). Cell wall chemistry of carrots (*Daucus carota* CV. Amstrong) during maturation and storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46, 2933-2939.
- Nunan, K.J.; Sims, I.M.; Bacic, A.; Robinson; S.P.; Fincher, G.B. (1998) Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant physiology* 118, 783-792
- Núñez, A.; Fishman, M.L.; Fortis, L.L.; Cooke, P.H.; Hotchkiss, A.T. (2009). Identification of extensin protein associated with sugar beet pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 10951–10958.
- O'Donoghue E.M.; Huber, D.J. (1992). Modification of matrix polysaccharides during avocado (*Persea americana*) fruit ripening: an assessment of the role of Cx-cellulase. *Physiologia Plantarum* 86, 33-42.
- Oguido, A.K.; Takamatsu, E.E.; 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*. Volumen 2. México: Instituto Politécnico Nacional. pp: 199-205.
- Oudgenoeg, G.; Dirksen, E.; Ingemann, S.; Hilhorst, R.; Gruppen; H., Boeriu; C.G., Piersma; S.R.; van Berkel, W.J.; Laane, C.; Voragen, A.G.J.(2002). Horse radish peroxidase-catalyzed oligomerization of ferulic acid on a template of a tyrosinecontaining tripeptide. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 21332–21334.
- Parr, A.J.; Waldron, K.W.; Ng, A.; Parker, M.L. (1996) The wall-bound phenolics of Chinese water chestnut. *Journal of Science and Food Agriculture* 71: 501–507.
- Passardi, F.; Longet, D.; Penel, C.; Dunand, C.(2004). The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* 65, 1879–1893.
- Peña, M. J.; Carpita, N.C. (2004). Loss of highly branched arabinans and debranching of rhamnogalacturonan I accompany loss of firm texture and cell separation during prolonged storage of apples. *Plant Physiology* 135, 1305–1313.
- Pereira da Silva, B.; de Medeiros Silva, G.; Paz Parente, J. (2009). Chemical properties and adjuvant activity of a galactoglucomannan from *Acrocomia aculeata*. *Carbohydrate Polymers* 75, 380–384.

- Pérez, S.; Rodríguez-Carvajal, M.A.; Doco, T. (2003). A complex plant cell wall polysaccharide: Rhamnogalacturonan I. A structure in quest of a function. *Biochimie* 85, 109–121.
- Pérez, C. D.; Fissore, E.N.; Gerschenson, L. N.; Cameron, R. G.; Rojas, A.M. (2012). Hydrolytic and oxidative stability of L-(+)-ascorbic acid supported in pectin films: influence of the macromolecular structure and calcium presence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (21), 5414–5422.
- Pilosof, A. M. (2000). Propiedades de hidratación. In A. M. Pilosof, & G.B. Bartholomai (Eds.), *Caracterización funcional y estructural de proteínas* (pp. 17–29). Buenos Aires, Argentina: Editorial Universitaria de Buenos Aires (EUDEBA)
- Ping, Z.H.; Nguyen, Q.T.; Chen, S.M.; Zhou, J.Q.; Ding, Y.D. (2001). States of water in different hydrophilic polymers-DSC and FTIR studies. *Polymer* 42, 8461-8467.
- Ponce, N.M.A.; Ziegler, V.H.; Stortz, C.A.; Sozzi, G.O. (2010). Compositional changes in cell wall polysaccharides from Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) during growth and on-tree ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 2562–2570.
- Prakongpan, T.; Nitithamyong, A.; Luangpituksa, P. (2002). Extraction and application of dietary fiber and cellulose from pineapple cores. *Journal of Food Science* 67(4), 1308–1313.
- Prosky, L.; Asp, N.G.; Schweizer, T.F.; DeVries, J.W.; Furda, I. (1992) Determination of insoluble and soluble dietary fibre in foods and food products: Collaborative study. *Journal AOAC International* 75, 360-367.
- Prosky, L.; Asp, N.G.; Schweizer, T.F.; DeVries, J.W.; Furda I, Lee SC (1994) Determination of soluble dietary fibre in foods and food products: Collaborative study. *Journal AOAC International* 77, 690-694.
- Prosky, L. (2000). When is dietary fiber considered a functional food?. *Biofactors* 12(1-4), 289-297.
- Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3396–3402.
- Raffo, M.D.; Ponce, N.M. A.; Sozzi, G.O.; Vicente, A.R.; Stortz, C.A. (2011). Compositional changes in 'Bartlett' pear (*Pyrus communis* L.) cell wall polysaccharides as affected by sunlight conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 12155–12162.
- Raffo, M.D.; Ponce, N.M.A.; Sozzi, G.O.; Stortz C.A.; Vicente, A. R., (2012). Changes on the cell wall composition of tree-ripened 'Bartlett' pear (*Pyrus communis* L.). *Postharvest Biology and Technology* 73, 72-79.

- Raghavendra, S. N., Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S.; Tharanathan, R.N. (2004). Dietary fiber from coconut residue: Effects of different treatments and particle size on the hydration properties. *European Food Research and Technology* 218, 563–567.
- Ralet, M.C.; Crépeau, M.J.; Lefèbvre, J.; Mouille, G.; Höfte, H.; Thibault, J.F. (2008). Reduced number of homogalacturonan domains in pectins of an arabidopsis mutant enhances the flexibility of the polymer. *Biomacromolecules* 9, 1454–1460.
- Redgwell, R.J.; Melton, R.D.; Brasch DJ. (1990). Cell wall changes in kiwifruit following post harvest ethylene treatment. *Phytochemistry* 29, 399-407.
- Redgwell, R.J; Melton, L.D.; Brasch, D.L. (1991). Cell wall polysaccharides of kiwifruit (*Actinidia seliciosa*): effect of ripening on the structural features of cell wall materials. *Carbohydrate Research* 209, 191-202.
- Redgwell, R.J; Melton, L.D.; Brasch, D.J. (1992) Cell wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). Solubilization of the pectic polymers. *Plant Physiology* 98, 71-81
- Redgwell, R. J.; MacRae, E.; Hallett, I.; Fischer, M.; Perry, J.; Harker, R. (1997). In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta* 203, 162–173.
- Redgwell, R.J.; Fischer, M. (2002) *Fruit texture, cell wall metabolism and consumer perception*. Pp. 46-88. En: Knee, M. (Ed.). *Fruit Quality and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK.
- Ridley, B.L; O'Neill, M.A.; Mohnen, D. (2001) Pectins: structure biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929-967.
- Ritger, P.L.; Peppas, N.A. (1987a). A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-Fickian release from nonswellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release* 5, 23–36.
- Ritger, P.L.; Peppas, N.A. (1987b). A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release* 5, 37–42.
- Robertson, J.A.; Monredon, F.D.; Dyssele, P.; Guillon, F.; Amado, R. (2000). Hydration properties of dietary fiber and resistant starch: A European collaborative study. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 33, 72–79.
- Ross-Murphy, S.B. (1994). Rheological methods. In. S. B. Ross-Murphy (Ed.), *Physical techniques for the study of food biopolymers* (pp. 343-393). Glasgow, UK: Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall.
- Sakurai, N.; Nevins, D.J. (1997). Relationship between fruit softening and wall polysaccharides in avocado (*Persea Americana* Mill) mesocarp tissues. *Plant & Cell Physiology* 38, 603-610.

- Salato, G.S.; (2012). *Modificaciones en la composición de la pared celular de frutos de cerezo dulce (Prunus avium L): incidencia del estado ontogénico y del cultivo*. Tesis de Maestría, Facultad de Agronomía de la U.B.A.
- Shea, E.M.; Carpita, N.C. (1988) Separation of partially methylated alditol acetates on SP-2330 and HP-1 vitreous silica capillary columns. *Journal of Chromatography* 445, 424-428.
- Scheller ,H.V.; Ulvskov, P. (2010) Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61, 263-289.
- Schieber, A.; Stintzing, F.C.; Carle, R. 2001. By-products of plant food processing as source of functional compounds, recent developments. *Trends in Food Science & Technology* 12,401-413.
- Schmelter, T.; Wientjes R.; Vreeker R.; y Klaffke W. (2002). "Enzymatic modifications of pectins and the impact on their rheological properties". *Carbohydrate Polymers* 47, 99-108.
- Schols, H.A.; Voragen, A.G.J. (2003). "Pectic polysaccharides". En: J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen & D.W.S. Wong (Eds.) *Handbook of Food Enzymology*, Marcel Dekker Inc., NY, USA.
- Schröder, R.; Nicolas, P.; Vincent, S.J.F.; Fischer, M.; Reymond, S.; Redgwell, R.J. (2001). Purification and characterisation of a galactoglucomannan from ripe kiwifruit (*Actinia deliciosa*). *Carbohydrate Research* 331, 291-306.
- Shui, G.; Leong L.P.(2006) Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry* 97, 277-284.
- Serrano, M. (2005) Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2741-2745.
- Siew, C.K.; Williams, P.A. (2008). Role of protein and ferulic acid in the emulsification properties of sugar beet pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 4164-4171.
- Sila, D.N.; Doungra, E.; Smout, C.; Van Loey, A.; Hendrickx, M. (2006). Pectin fraction interconversions: Insight into understanding texture evolution of thermally processed carrots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 8471-8479.
- Sozzi, G.O.; Greve, L.C.; Prody, G.A.; Labavitch, J.M. (2002). Gibberellic acid, synthetic auxins, and ethylene differentially modulate α -L-arabinofuranosidase activities in antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic synthase tomatopericarp discs. *Plant Physiology* 129, 1330-1340.
- Sozzi, G.O.; (2004) *Strategies for the regulation of postharvest fruit softening by changing cell wall enzyme activity*. Pp. 135-172. En: Dris, R. y Jain, S.M. (Eds.), *Production*

Practices and Quality Assessment of Food Crops, Vol. 4: Postharvest Treatment and Technology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- Sozzi, G.O.; Civello, P.M. (2005) *Fruit cell wall enzymes as targets for biotechnology*. Pp. 214-249. En: Thangadurai D, Pullaiah T, Pinheiro de Carvalho MA (Eds.), *Genetic Resources and Biotechnology*, Vol I. Regency Publications, New Delhi.
- Srinivasan, C.; Padilla, I.M.G.; Scorza, R. (2005). *Prunus ssp.*, almond, apricot, cherry, nectarine, peach and plum. In R. E. Litz (Ed.), *Biotechnology of fruit and nut crops* (pp. 512–542). Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Srivastava, P.; Malviya, R. (2011). Sources of pectins, extraction and its applications in pharmaceutical industry – an overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 2, 10–18.
- Szczesniak, A.S.; Ilker, R. (1988) The meaning of textural characteristics-juiciness in plant foodstuffs. *Journal Texture Stud* 19, 61-78.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2002) *The plant cell*. En Taiz L, Zeiger E (Eds) *Plant Physiology*, 3^{ra} edición. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Talbott, L.D.; Ray, P.M. (1992) Changes in molecular size of previously deposited and newly synthesized pea cell wall matrix polysaccharides: Effects of auxin and turgor. *Plant Physiology* 98, 369-379.
- Toivonen, P.M.A.; Brummell, D.A. (2008). Biochemical bases of appearance and texture in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 48, 1–14.
- Tsao, R.; Yang, R.; Xie, S.; Sockovie, E; Khanizadeh, S. (2005) Which Polyphenolic Compounds Contribute to the Total Antioxidant Activities of Apple?. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53, 4989–4995.
- Tukey, H.B. (1942) Time interval between full bloom and fruit maturity for several varieties of apples, pears, peaches and cherries. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 40, 133-140.
- Tungland, B.C.; Meyer D. (2002) Nondigestible Oligo- and Polysaccharides (Dietary Fiber): Their Physiology and Role in Human Health and Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1(3), 90-109.
- Usenik, V.; Fabčič, J.; Štampa, F. (2008). Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry* 107, 185–192.
- Vicente, A.R.; Ortugno, C.; Powell, A.L.T; Greve, L.C.; Labavitch, J.M. (2007) Temporal sequence of cell wall disassembly events in developing fruits. 1. Analysis of raspberry (*Rubus idaeus*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55, 4119-4124.

- Vincken, J.P.; Schols, H.A.; Oomen, R.J.F.J.; McCann, M.C.; Ulvskov, P.; Voragen, A.G.J. (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology* 132, 1781–1789.
- Voragen, A.G.J.; Coenen, G.J.; Verhoef, R. P.; Schols, H.A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry* 20, 263–275.
- Wade, N.L.; Kavanagh, E.E.; Hockey, D.G.; Brady, C.J. (1992). Relationship between softening and the polyuronides in ripening banana fruit. *Journal of Science of Food and Agriculture* 60, 61–68.
- Waldron, K.W.; Ng, A.; Parker M.L.; Parr, A.J. (1997). Ferulic acid dehydrodimers in the cell walls of *Beta vulgaris* and their possible role in texture. *Journal Science Food Agriculture* 74, 221–228.
- Waldron, K.W.; Parker, M.L.; Smith A.C. (2003). Plant cell walls and food quality. *Reviews in Food Science and Food Safety* 2, 101–119.
- Willats, W.G.T.; Knox, J.P.; Mikkelsen, J.D. (2006). Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* 17, 97–104.
- Wyman, C.E.; Decker, S.R.; Himmel, M.E.; Brady, J.W.; Skopec, C.E.; Viikari, L. (2005). "Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose." En: S. Dumitriu (Ed.) *Polysaccharides: Structural diversity and Functional Versatility*, 2nd Ed. Marcel Dekker, NY.
- Wood, P. J.; Siddiqui, I. R. (1971). Determination of methanol and its application for measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. *Analytical Biochemistry* 39 418–428.
- Yapo, B.M. (2011). Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model (Review). *Carbohydrate Polymers* 86, 373–385.
- Yoshikazu, T.; Nobuhiro, S.; Akemi, O. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54(4), 733–749.
- Yoshioka, H., Aoba, K.; Kashimura, Y. (1992) Molecular weight and degree of methoxylation in cell wall polyuronide during softening in pear and apple fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117, 600–606.
- Zsivanovits, G.; MacDougall, A. J.; Smith, A.C.; Ring, S.G. (2004). Material properties of concentrated pectin networks. *Carbohydrate Research* 339, 1317–1322.
- Zykwinska, A.W.; Ralet, M.C.J.; Garnier, C.D.; Thibault, J.F. J. (2005). Evidence for in vitro binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiology* 139, 397–407.

FE DE ERRATAS

- **Pág. 61 donde dice:** "...Analizando los rendimientos (Tabla 3.2) se observa que la fracción soluble en H₂O (pectinas débilmente unidas) aumentó significativamente ($p < 0,05$) con la madurez, salvo para la variedad Chelan, donde disminuyó ($p < 0,05$)..."

Debe decir: "... se observa que la fracción soluble en H₂O (pectinas débilmente unidas) aumentó con la madurez, siendo este aumento significativo ($p < 0,05$) para la variedad Regina, y disminuyó ($p < 0,05$) para Chelan..."

- **Pág. 61 donde dice:** "...se determinó que entre el 46 y el 54% de los polímeros..."

Debe decir: "...se determinó que entre el 28 y el 52 % de los polímeros..."

- **Pág. 99 donde dice:** "... lo que se demuestra en un incremento más pronunciado mayor tanto en la viscosidad newtoniana..."

Debe decir: "... lo que se demuestra en un incremento más pronunciado tanto en la viscosidad newtoniana..."



- **Pág. 101 Figura 4.3 donde dice:**

Debe decir:

● RM	○ RI
▲ SM	△ SI

- **Pág. 101 Figura 4.3 donde dice:** Velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) (rad/s⁻¹)

Debe decir: Velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) (s⁻¹)

- **Pág. 108 donde dice:** "...la disminución de los volúmenes específicos y de la capacidad de hinchamiento observada para los **RIC** y **RIN** (Esquema 4.1) también se debería al menor contenido de pectinas en los mismos..."

Debe decir: "...la disminución de los volúmenes específicos y de la capacidad de hinchamiento observada al pasar de **RIC** a **RIN** (Esquema 4.1) también se debería al menor contenido de pectinas en los **RIN**..."

- **Capítulo 5:** Cuando se habla de fibra aislada de cereza, se refiere a los AIRs.

- **Capítulo 5 Tablas: 5.1; 5.2; 5.3; 5.4 donde dice:** Fibra aislada

Debe decir: AIR

- **Pág. 127 donde dice:** un pobre comportamiento de flujo y capacidad de fluidización (fluye como..."

Debe decir: "...un pobre comportamiento de flujo (fluye como..."

- **Pág. 127 donde dice:** la fluidización puede hacerse dificultosa debido al aumento de la masa..."

Debe decir: "...el flujo puede hacerse dificultoso debido al aumento de la masa..."

- **Pág. 129 donde dice:** "...El contenido de fenoles totales obtenido por hidrólisis ácida..."

Debe decir: "...El contenido de fenoles obtenido por hidrólisis ácida..."

▲ Sunburst

○ Brooks

- **Pág. 131 Figura 5.1 donde dice:** □ Chelan

○ Chelan

▲ Brooks

Debe decir: □ Sunburst

- **Pág. 132 Tabla 5.3 donde dice:**

	AIR		
	Chelan	Brooks	Sunburst
Fenoles de hidrólisis ácida ($\mu\text{mol de Fe}^{2+}/\text{g fibra}$)	21,8	18,9	26,8

Debe decir:

	AIR		
	Chelan	Brooks	Sunburst
Fenoles de hidrólisis ácida ($\mu\text{mol de Fe}^{2+}/\text{g fibra}$)	112,1	97	137,3

- **Pág. 142 donde dice:** "...Las pectinas constituyen el 54%..."

Debe decir: "...Las pectinas constituyen el 35 %..."

- **Pág. 168 donde dice:** "... La suspensión obtenida fue dejada reposar durante 1 h, 4 h y 24 h..."

Debe decir: "... La suspensión obtenida fue dejada reposar durante 24 h..."

- **Pág. 168 donde dice:** "...y agitadores mecánicos modelo Glas-Col (Terre Haute, IN USA) y Decalab, ambos con paletas de acero inoxidable..."

Debe decir: ...y agitadores mecánicos (Shaker) modelo Glas-Col (Terre Haute, IN USA)..."