



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Maestría en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de los Alimentos

Aislamiento de Fibra Soluble a partir de *Cucurbita moschata* Duch ex Poiret y su Caracterización

Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de los Alimentos

Autor: Ing. Carmen Ana Medina Briceño

Director de tesis: Dra. Lía Noemí Gerschenson

Co – Director de tesis: Dra. Eliana Noemí Fissore

Lugar de trabajo: Departamento de Industrias, FCEN, UBA.

Buenos Aires, 2013

2013 – Buenos Aires – Argentina

Aislamiento de Fibra Soluble a partir de *Cucurbita moschata* Duch ex Poiret y su Caracterización

Resumen

En el presente trabajo se estudió la obtención de fracciones enriquecidas en fibra alimentaria soluble a partir de mesocarpio de calabaza (*Cucurbita moschata* Duch ex Poiret) obtenido en el mercado Argentino. Se aplicaron técnicas de extracción de fibra soluble las cuales involucraban el uso de una solución buffer de citrato de sodio con y sin presencia de enzima (hemicelulasa y/o proteasa). La extracción enzimática se llevó a cabo durante 4 horas a 45 °C y se estudió el efecto de las técnicas extractivas en el rendimiento y funcionalidad de los productos obtenidos al incluir o no una enzima degradadora de la pared celular. Asimismo, se realizó el aislamiento de fibra soluble mediante técnicas convencionales utilizadas a nivel industrial con fines comparativos (extracción con HCl a pH = 2 a 85 °C durante 60 min). Se caracterizó la composición química, capacidad emulsificante y espesante de cada fracción aislada. Las pectinas obtenidas presentaron propiedades fuertemente influenciadas por la técnica de extracción utilizada.

Palabras claves: *Cucurbita moschata* Duch ex Poiret, aislamiento, fibra, pectina, enzimas, composición química, capacidad emulsificante, comportamiento reológico.

2013 - Buenos Aires - Argentina

Soluble Fiber Extraction from *Cucurbita moschata* Duch ex Poiret and Characterization

Abstract

In the present work was studied the obtaining of fractions enriched in soluble dietary fiber from mesocarp of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch ex Poiret) obtained in the Argentine market. Extraction techniques were applied to soluble fiber which involved the use of a buffer solution of sodium citrate with and without the presence of enzyme (hemicellulase and/or protease). Enzymatic extraction was carried out for 4 hours at 45 °C and was study the effect of extractive techniques regarding the performance and functionality of the products obtained by including or not a cell wall enzyme degrading. At the same time, insulation of soluble fiber was performed by conventional techniques used in the industry for comparison (extraction with HCl to pH = 2 to 85 °C for 60 min). Characterization of chemical composition, thickening and emulsifying capacity was done for each fraction isolated. The pectins obtained showed and strongly influenced by the extraction technique used.

Keywords: *Cucurbita moschata* Duch ex Poiret, insulation, fiber, pectin, enzymes, chemical composition, emulsifying capacity, rheological behavior.

Agradecimientos

En estas líneas quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a la Dra. Eliana Fissore y la Dra. Lía Gerschenson, por la orientación, seguimiento, supervisión constante, pero sobre todo por la motivación y apoyo recibido a lo largo de este tiempo.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros y amigos del Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencia Exactas y Naturales y, especialmente al equipo investigador del Laboratorio de Optimización de la Calidad de Alimentos Preservados y/o Almacenados.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibido de mi familia, su apoyo y confianza en cada paso que doy, me impulsa a alcanzar mis objetivos.

A todos, muchas gracias.

*A quien entre mis días vive,
mi **Mamá.***

Índice de contenido

Capítulo 1:	11
Introducción.....	11
1.1. Cucurbita moschata	14
1.1.1. Características.....	14
1.1.2. Cultivo y uso.....	15
1.2. Fibra dietaria	15
1.2.1. Pectina	19
1.2.1.1. Estructura química.....	21
1.2.1.2. Extracción de pectina	22
1.2.1.3. Aplicación de pectina en alimentos.....	24
1.2.1.4. Usos industriales.....	25
1.3. Reología.....	31
1.4. Objetivos de la tesis	34
1.4.1. Generales	34
1.4.2. Específicos.....	34
Capítulo 2:	36
Materiales y Métodos.....	36
2.1. Sistemas a estudiar	36
2.2. Variables.....	36
2.3. Preparación de la Muestra	37
2.4. Extracción enzimática.....	37
2.4.1. Enzimas	37
2.4.2. Extracción enzimática de pectinas.....	37
2.5. Extracción ácida.....	38
2.6. Análisis químicos	39
2.6.1. Caracterización.....	39
2.6.1.1. Determinación de Carbohidratos Totales	39

2.6.1.2.	Determinación del Grado de Metilación	41
2.6.1.3.	Determinación del Grado de Acetilación	42
2.6.1.4.	Determinación de Proteínas.....	44
2.6.1.5.	Determinación de Ácidos Urónicos	45
2.6.1.6.	Determinación de Almidón.....	46
2.6.2.	Determinación de hidratos de carbono en el CWM	48
2.7.	Capacidad emulsificante	50
2.8.	Propiedades reológicas	50
2.8.1.	Sistemas modelo	51
2.8.1.1.	Sistemas Acuosa.....	51
2.8.1.2.	Sistemas Acuosa con Calcio	51
2.8.1.3.	Sistemas con Leche Entera	52
2.8.2.	Ensayos de Flujo.....	53
2.8.2.1.	Ley de la Potencia	53
2.8.2.2.	Modelo de Herschel-Bulkley.....	53
2.8.2.3.	Modelo de Cross	54
2.8.2.4.	Modelo de Carreau	54
2.8.3.	Ensayos Dinámicos	54
2.9.	Análisis estadístico	55
Capítulo 3:	56
Resultados y Discusión.....		56
3.1.	Material de la pared celular	56
3.2.	Caracterización de las fracciones aisladas	58
3.3.	Capacidad emulsificante	62
3.4.	Caracterización reológica	64
3.4.1.	Ensayos de flujo	64
3.4.2.	Ensayos dinámicos	80
Conclusiones		89
Referencias Bibliográficas		92

Índice de Figuras

Figura Nro.1. <i>Cucurbita moschata</i> Duch ex Poiret	14
Figura Nro.2. Pared celular	19
Figura Nro.3. Esquema de la estructura de la pectina que muestra los tres dominios principales: homogalacturonanos (HG), ramnogalacturonano I (RG-I) y ramnogalacturonano II (RG-II) unidos entre sí (Mohnen, 2008)	21
Figura Nro.4. Estructura química del homogalacturonano	22
Figura Nro.5. Estructura de la pared celular.....	24
Figura Nro.6. Curva de Calibración para Carbohidratos Totales a partir de (a) glucosa y (b) ácido galacturónico.	40
Figura Nro.7. Curva de Calibración para metanol	42
Figura Nro.8. Curva de Calibración para acetilos.....	43
Figura Nro.9. Curva de calibración para proteínas	45
Figura Nro.10. Curva de calibración para ácidos urónicos	47
Figura Nro.11. $D_{[3,2]}$ diámetro de Sauter para la fase dispersa de las emulsiones estudiadas.....	62
Figura Nro.12. Curvas de flujo obtenidas experimentalmente a 25°C del producto enriquecido en pectina en la fracción “A” para los sistemas: (a) A-Agua (● Esfuerzo cortante; ○ Viscosidad); (b) A- Ca^{+2} (◆ Esfuerzo cortante; ◇ Viscosidad); (c) A-Leche (■ Esfuerzo cortante; □ Viscosidad).....	66
Figura Nro.13. Curvas de flujo obtenidas experimentalmente a 25°C del producto enriquecido en pectina en la fracción “SE” para los sistemas: (a) SE-Agua (● Esfuerzo cortante; ○ Viscosidad); (b) SE- Ca^{+2} (◆ Esfuerzo cortante; ◇ Viscosidad); (c) SE-Leche (■ Esfuerzo cortante; □ Viscosidad).....	69
Figura Nro.14. Curvas de flujo obtenidas experimentalmente a 25°C del producto enriquecido en pectina en la fracción “H” para los sistemas: (a) H-Agua (● Esfuerzo cortante; ○ Viscosidad); (b) H- Ca^{+2} (◆ Esfuerzo cortante; ◇ Viscosidad); (c) H-Leche (■ Esfuerzo cortante; □ Viscosidad).....	72

Figura Nro.15. Curvas de flujo obtenidas experimentalmente a 25°C del producto enriquecido en pectina en la fracción “HP” para los sistemas: (a) HP-Agua (● Esfuerzo cortante; ○ Viscosidad); (b) HP-Ca⁺² (◆ Esfuerzo cortante; ◇ Viscosidad); (c) HP-Leche (■ Esfuerzo cortante; □ Viscosidad)..... 75

Figura Nro. 16. Curvas de flujo obtenidas experimentalmente a 25°C del producto enriquecido en pectina en la fracción “P” para los sistemas: (a) P-Agua (● Esfuerzo cortante; ○ Viscosidad); (b) P-Ca⁺² (◆ Esfuerzo cortante; ◇ Viscosidad); (c) P-Leche (■ Esfuerzo cortante; □ Viscosidad). 77

Figura Nro. 17. Espectros mecánicos a 25°C de los sistemas al 2,00% p/v de producto enriquecido en pectina aislado en la fracción “A”. (a) A-Agua (● G', ○ G'', x tan δ); (b) A-Ca⁺² (● G', ○ G'', x tan δ); (c) A-Leche (● G', ○ G'', x tan δ)..... 82

Figura Nro.18. Espectros mecánicos a 25°C de los sistemas al 2,00% p/v de producto enriquecido en pectina aislado en la fracción “SE”. (a) SE-Agua (● G', ○ G'', x tan δ); (b) SE-Ca⁺² (● G', ○ G'', x tan δ); (c) SE-Leche (● G', ○ G'', x tan δ)..... 83

Figura Nro.19. Espectros mecánicos a 25°C de los sistemas al 2,00% p/v de producto enriquecido en pectina aislado en la fracción “H”. (a) H-Agua (● G', ○ G'', x tan δ); (b) H-Ca⁺² (● G', ○ G'', x tan δ); (c) H-Leche (● G', ○ G'', x tan δ)..... 84

Figura Nro.20. Espectros mecánicos a 25°C de los sistemas al 2,00% p/v de producto enriquecido en pectina aislado en la fracción “HP”. (a) HP-Agua (● G', ○ G'', x tan δ, x tan δ); (b) HP-Ca⁺² (● G', ○ G'', x tan δ); (c) HP-Leche (● G', ○ G'', x tan δ)..... 85

Figura Nro.21. Espectros mecánicos a 25°C de los sistemas al 2,00% p/v de producto enriquecido en pectina aislado en la fracción “P”. (a) P-Agua (● G', ○ G'', x tan δ); (b) P-Ca⁺² (● G', ○ G'', x tan δ); (c) P-Leche (● G', ○ G'', x tan δ). 86

Índice de Tablas

Tabla Nro. 1. Distribución porcentual de cada tipo de tejido y rendimiento de CWM obtenido tras el procesamiento de calabaza (<i>Cucurbita moschata</i> Duch ex Poiret) fresca	56
Tabla Nro. 2. Caracterización del CWM de <i>Cucurbita moschata</i> Duch ex Poiret	57
Tabla Nro. 3. Rendimiento de extracción para las distintas fracciones aisladas.....	58
Tabla Nro. 4. Composición química de las fracciones enriquecidas en pectina aisladas de calabaza.....	61
Tabla Nro. 5. Viscosidad aparente y parámetros del modelo de ajuste calculados tras ajustar los datos experimentales de flujo (25°C) de los sistemas estudiados (2,00 % p/v) de la fracción “A”.	67
Tabla Nro. 6. Viscosidad aparente y parámetros del modelo de ajuste calculados tras ajustar los datos experimentales de flujo (25°C) de los sistemas estudiados (2,00 % p/v) de la fracción “SE”.	70
Tabla Nro. 7. Viscosidad aparente y parámetros del modelo de ajuste calculados tras ajustar los datos experimentales de flujo (25°C) de los sistemas estudiados (2,00 % p/v) de la fracción “H”.	73
Tabla Nro. 8. Viscosidad aparente y parámetros del modelo de ajuste calculados tras ajustar los datos experimentales de flujo (25°C) de los sistemas estudiados (2,00 % p/v) de la fracción “HP”	76
Tabla Nro. 9. Viscosidad aparente y parámetros del modelo de ajuste calculados tras ajustar los datos experimentales de flujo (25°C) de los sistemas estudiados (2,00 % p/v) de la fracción “P”.	78
Tabla Nro. 10. Viscosidad aparente (25°C, 20 s ⁻¹) (Pa s) de los sistemas analizados	80

Capítulo 1:

Introducción

A la hora de hablar sobre el cultivo frutihortícola en Sudamérica emerge Argentina como plaza comercial y estratégica. Siguiendo de norte a sur el país, en todos los nichos productivos y durante todo el año se encuentran disponibles variedades de calabazas entre las cuales se encuentra el tipo Anquito (Butternut squash).

Según Ayastuy y col. (2010), en Argentina se cultivan alrededor de 32.500 hectáreas, las cuales corresponden a una producción de 648.700 toneladas lo que representa más de 135 millones de dólares anuales. Las provincias de Santiago del Estero, Salta, Formosa, Mendoza, San Juan, Chaco, Buenos Aires y Santa Fe, son algunas de las provincias más productivas y mejor posicionadas en este cultivo (Larrazabal, 2011).

El 95 % de la producción nacional es comercializada en el mercado interno. Los otros canales comerciales nacionales son la industria del deshidratado con un 2 %, la producción de semillas con un 1 % y el mercado de exportación con un 2 %. En relación a la exportación, los destinos más significativos son Gran Bretaña, Italia, España, Holanda y Francia. Las estadísticas argentinas de exportación de calabazas marcan unas 18.000 toneladas en 2009 y 17.200 toneladas a septiembre de 2010, y con respecto al producto industrializado (escamas y polvo deshidratados), 136 toneladas en 2009 y 207 toneladas en 2010 (Larrazabal, 2011).

De acuerdo con Larrazabal (2011): “Los cultivares del tipo Butternut son los más difundidos en Argentina y pertenecen a la especie *Cucurbita moschata*. Esta preferencia del mercado se debe a dos aspectos, uno es que esta especie es más resistente a los hongos del suelo como *Phytophthora capsici* L. que causa el marchitamiento repentino de las plantas, por lo cual se incrementan los rendimientos en la finca; el otro aspecto, es que los frutos que se comercializan son de un tamaño intermedio (1,5 a 2 kg) beneficiando tanto a los consumidores como a los productores”, facilitando su comercialización.

Desde el punto de vista del manejo del cultivo y cuidados, se mantiene la forma tradicional, tratándolo como un producto natural, con lo cual en las fincas se generan residuos con la finalidad de cumplir con los estándares de calidad, al realizarse la eliminación de frutos deformes y desparejos; asimismo, se deben tener en cuenta los desperdicios del procesamiento. La amplitud en la producción de *Cucurbita moschata* ofrece, sin dudas, la posibilidad de desarrollar aplicaciones tecnológicas de estos residuos. Es una cuestión preponderante el acompañamiento de expertos en estos desafíos; el conocimiento de mercado marca el camino por el cual las instituciones de investigación y empresas deben transitar.

Por otro lado, los subproductos del procesamiento de alimentos vegetales representan un serio problema de eliminación para la industria (Launferberg y col., 2003). Una parte importante de los residuos que se generan en la industria de vegetales está constituida por una fracción orgánica sólida. En la actualidad, esta fracción de sólidos se emplea en parte como alimentación animal, una pequeña proporción se destina a otras aplicaciones como combustible y el resto constituye un residuo. Mientras que años atrás los subproductos generados durante el

procesamiento de alimentos vegetales constituían un problema económico y ambiental, hoy son considerados una prometedora fuente de compuestos funcionales (Rodríguez y col., 2006). La transformación de los desechos vegetales en productos de valor agregado, como lo son las fibras, puede contribuir a disminuir la polución y a recuperar biomasa de valor.

Debido a que comercialmente la obtención de fibra soluble, específicamente la pectina, se realiza tratando al material vegetal crudo con ácido mineral diluido caliente a $\text{pH} \approx 2$, los efluentes se han vuelto una importante consideración en la industria de las pectinas; de hecho, los problemas por efluentes han causado el cierre de algunas plantas (May, 1990). Con la finalidad de encontrar una alternativa y un modo ambientalmente amigable de extraer pectinas “*green labelled*”, se ha estudiado el uso de enzimas (Panouillé y col., 2006).

Fissore y col. (2007, 2009, 2011) estudiaron la extracción de pectina a partir de distintos vegetales mediante hidrólisis enzimática con celulasas y hemicelulasas. Las pectinas obtenidas demostraron ser altamente influenciadas por la técnica de extracción utilizada y se obtuvieron algunas pectinas con alto potencial de uso como aditivos alimentarios espesantes y gelificantes.

El uso de pectinas de nuevos orígenes y la posibilidad de modificarlas mediante tratamientos enzimáticos amplían el campo de aplicación de las mismas y proveen herramientas para crear alimentos más saludables y nuevos aditivos para modificar la reología y textura de los alimentos (Laufenberg y col., 2003).

1.1. *Cucurbita moschata*

El anco, anquito, auyama, calabacita, calabaza, calabaza almizclera, calabaza moscada, calabacín, tamalayote o zapallito coreano (*Cucurbita moschata*) (Figura Nro.1) es una planta herbácea reptante anual, de la familia de las cucurbitáceas, oriunda de América Central y del Sur. Se la cultiva económicamente en su continente de origen y en Asia para su consumo, aprovechándose sus flores, brotes tiernos, frutos y semillas (Caili y col., 2006).



Figura Nro.1. *Cucurbita moschata* Duch ex Poiret

1.1.1. Características

Es un fruto de importancia económica en la región del nordeste argentino y es una buena fuente de nutrientes. Posee menos de un 10 % de hidratos de carbono, bajo contenido en lípidos, 1,1 % de compuestos nitrogenados y 1,6 % de fibra bruta. Es valioso además por el contenido en carotenoides (β -caroteno, α -caroteno y luteína), potasio, vitaminas B₂, C y E y tiene un reducido contenido calórico (De Escalada Pla y col., 2007).

1.1.2. *Cultivo y uso*

Cucurbita moschata se cultiva por sus brotes tiernos, consumidos como verdura, su flor carnosa y comestible, y sobre todo por sus frutos. Verdes se emplean cocidos de varias maneras o aún crudos en ensalada; maduros, se utilizan hervidos, asados u horneados, formando también parte de numerosos platos dulces. Sin embargo, no es una fuente convencionalmente explorada para la producción de pectina y existe muy poca información disponible respecto a las propiedades físico-químicas y fisiológicas de la pectina de *Cucurbita moschata* Duch ex Poiret (Jun y col., 2006; Fissore y col., 2007, 2011).

1.2. **Fibra dietaria**

Según Selvendran y col. (1995), la fibra dietaria (FD) se encuentra en alimentos de origen vegetal como los cereales, frutas, verduras y legumbres, siendo un componente importante de la pared celular y el término fibra dietaria o fibra alimentaria, corresponde al residuo de los vegetales no digeribles por el hombre. Años atrás se consideraba que la fibra era el residuo de los componentes de las plantas comestibles, resistentes a la hidrólisis por la acción de las enzimas endógenas del tracto digestivo humano, que está formada por un conjunto de compuestos químicos de naturaleza heterogénea tales como polisacáridos, oligosacáridos, lignina, celulosa, hemicelulosa, pectina, inulina y una variedad de gomas (Portela, 2006).

La definición actualmente vigente para el término FD, fue explicitada por la Comisión del Codex Alimentarius, programa conjunto con la FAO/OMS sobre normas alimentarias, en el

“Codex Dietary Fiber Definition, ALINORM 09/32/REP” (Codex Alimentarius, 2010), en la cual se establecieron los siguientes parámetros:

Se entenderá por FD los polímeros de hidratos de carbono con diez o más unidades monoméricas, que no son hidrolizados por las enzimas endógenas del intestino delgado humano y que pertenecen a las categorías siguientes:

- Polímeros de carbohidratos comestibles que se encuentran naturalmente en los alimentos en la forma en que se consumen.
- Polímeros de carbohidratos obtenidos de materia prima alimentaria por medios físicos, enzimáticos o químicos, y que se haya demostrado que tienen un efecto fisiológico beneficioso para la salud mediante pruebas científicas generalmente aceptadas aportadas a las autoridades competentes.
- Polímeros de carbohidratos sintéticos que se haya demostrado que tienen un efecto fisiológico beneficioso para la salud mediante pruebas científicas generalmente aceptadas aportadas a las autoridades competentes.

Las notas al pie en la definición de FD del año 2009 fueron modificadas en el año 2010 (ALINORM 10/33/26, 10/33/REP) y dicen:

La FD, si es de origen vegetal, puede incluir fracciones de lignina y/u otros compuestos asociados con los polisacáridos en la pared celular vegetal y si tales compuestos se han cuantificado mediante el método de análisis gravimétrico de la AOAC (1990) para el análisis de la FD, estas sustancias quedan incluidas en la definición de fibra por cuanto están

efectivamente asociadas con la fracción polisacárida u oligosacárida de la fibra. Sin embargo, no pueden ser definidas como FD si se extraen y se reintroducen en un alimento que contiene polisacáridos no digeribles. Al combinarse con polisacáridos, estas sustancias asociadas pueden aportar efectos beneficiosos complementarios. La decisión sobre si se deben incluir los carbohidratos entre tres y nueve unidades monoméricas debe recaer en las autoridades nacionales.

La FD se subdivide en insoluble (FDI) y soluble (FDS) dependiendo de su forma de interaccionar con el agua. De acuerdo a Roberfroid (1993), la FD puede ser de dos tipos: (a) soluble/viscosa/fermentable o (b) insoluble/no-viscosa/lentamente fermentable.

Los beneficios de la ingesta de fibra para el intestino son ampliamente reconocidos, hecho que ha determinado su consideración como un nutriente (FDA, 1993). Dentro de los sistemas alimenticios, la fibra dietaria se encuentra en dos formas: como constituyente intrínseco de varios alimentos vegetales o adicionada. El objetivo de su adición puede ser el uso como ingrediente (> 5 %) o aditivo (< 5 %) con fines nutricionales, para generar cambios de comportamiento reológico y características sensoriales de los alimentos (Guillon y col., 2000).

El artículo 1385 del Código Alimentario Argentino (CAA, 2013) establece:

Se entiende por Fibra Alimentaria a cualquier material comestible que no sea hidrolizado por las enzimas endógenas del tracto digestivo humano. Incluye polisacáridos no almidón, pectinas, almidón resistente, inulina, oligofructosa, polidextrosa, maltodextrinas resistentes,

fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), transgalactooligosacáridos (TOS), y todos los que en el futuro incorpore la Autoridad Sanitaria Nacional.

Se entiende por Fructooligosacáridos (FOS) a los oligosacáridos de fructosa con uniones β 2-1 de origen natural o sintético. Se entiende por Inulina el fructano natural constituido por unidades de fructosil con uniones β -2,1 terminado en una unidad de glucosa. La longitud de la cadena es generalmente de 2 a 60 unidades.

Se entiende por Oligofructosa natural el producto constituido por 3 a 5 unidades de fructosa con una unidad terminal de glucosa. La oligofructosa sintética contiene β -2,1 cadenas de fructosa con o sin unidades de glucosa terminales. Las cadenas varían de 2 a 8 residuos de monosacáridos.

Se entiende por Fructooligosacáridos (FOS) sintético el producto de la hidrólisis enzimática (enzima fructofuranosidasa fúngica) de la inulina o de la síntesis o de la transfructosilación de la sacarosa. Los FOS sintéticos poseen la misma composición química y estructural que la oligofructosa, excepto que el promedio de los grados de polimerización es de 2 a 4.

Se entiende por Galactooligosacáridos (GOS) el oligosacárido no digerible (3 a 10 grados de polimerización) compuesto por unidades de galactosa.

Se entiende por Transgalactooligosacáridos (TOS o TGOS) el producto de la transgalactosilación enzimática de la lactosa. Los oligómeros son lineales y consisten en moléculas de lactosa con varias galactosas con uniones β -1,6 y β -1,4.

1.2.1. Pectina

Las pectinas se componen de un conjunto complejo de polímeros ramificados que no sólo están presentes en la pared celular primaria, sino también en la laminilla media entre las células de la planta (Figura Nro. 2), donde ayuda a las células a mantenerse juntas (Leroux y col., 2003). Son un tipo de fibra soluble económicamente significativa, con aplicaciones tecnológicas importantes en alimentos y efectos beneficiosos en la salud. El Código Alimentario Argentino (CAA, 2013) define a la pectina dentro de los aditivos como un *“polímero constituido esencialmente por unidades de ácidos galacturónico parcialmente esterificado con metanol que se obtiene por extracción de materias primas vegetales”*.

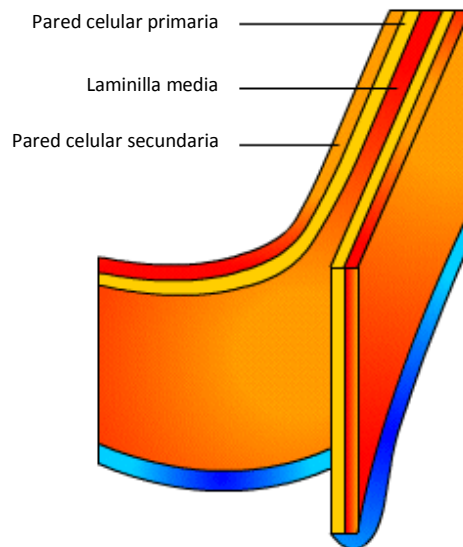


Figura Nro.2. Pared celular

La cantidad, estructura y composición química de las pectinas se diferencian tanto entre plantas como en las diferentes partes de una misma planta. Durante la maduración de los

frutihortícolas, la pectina es degradada por ciertas enzimas; en este proceso, la fijación mutua de las células se relaja y la fruta se vuelve más blanda, ya que la lámina media entre éstas se rompe y las células se separan unas de otras (Harte y col., 2007).

La pectina es un integrante natural de la fibra dietaria humana. Las enzimas humanas no son capaces de degradarla a azúcares simples asimilables. Por esta razón se considera a la pectina como una fibra soluble, la cual es fermentada en el colon por la flora nativa permitiendo un adecuado desarrollo de la misma. Las principales fuentes de pectina comercial son las cáscaras de cítricos y el residuo seco de la extracción del jugo de manzana (Waldron y col., 2003).

Las pectinas son heteropolímeros de alto peso molecular constituidos mayormente por unidades de ácido galacturónico (GalA). Según May (1990, 2000), además de ácido galacturónico, las sustancias pécticas contienen cantidades muy sustanciales de un rango de azúcares neutros, pero las pectinas comerciales se caracterizan por un alto contenido de ácido galacturónico.

A nivel tecnológico, su uso principal en alimentos es como agente gelificante, espesante y estabilizante. Una característica esencial de una pectina comercialmente relevante es su poder de gelación; la aplicación clásica es la de dar la estructura característica de gel a las confituras o mermeladas (King, 1993). La pectina también puede utilizarse para estabilizar bebidas ácidas de proteína como el yogur y como texturizante en productos horneados bajos en grasa. Es un hidrocoloide al cual la Food and Drug Administration (FDA) lo clasifica como aditivo alimenticio y lo considera sustancia “Generalmente Reconocida como Segura” (GRAS).

1.2.1.1. Estructura química

El principal residuo azúcar encontrado en las pectinas es el ácido galacturónico (GalA), una fracción del cual está esterificada con metanol. Otros azúcares comúnmente presentes incluyen ramnosa (Rha), arabinosa (Ara), galactosa (Gal) y xilosa (Xyl) y otros monosacáridos (Waldron y col., 2003). Las pectinas están constituidas por tres dominios principales: homogalacturonanos (HG), ramnogalacturonano I (RG-I) y ramnogalacturonano II (RG-II) (Figura Nro.3). Los homogalacturonanos (Figura Nro.4), están compuestos por residuos de ácido galacturónico unidos por un enlace α (1 \rightarrow 4). Los grupos carboxilo del C₆ pueden estar metil-esterificados o permanecer libres. Los grupos carboxilo libres, si están disociados, dan lugar a enlaces de calcio entre las cadenas de homogalacturonanos vecinas, formando zonas de juntura, uniendo cadenas antiparalelas (Marry y col., 2006).

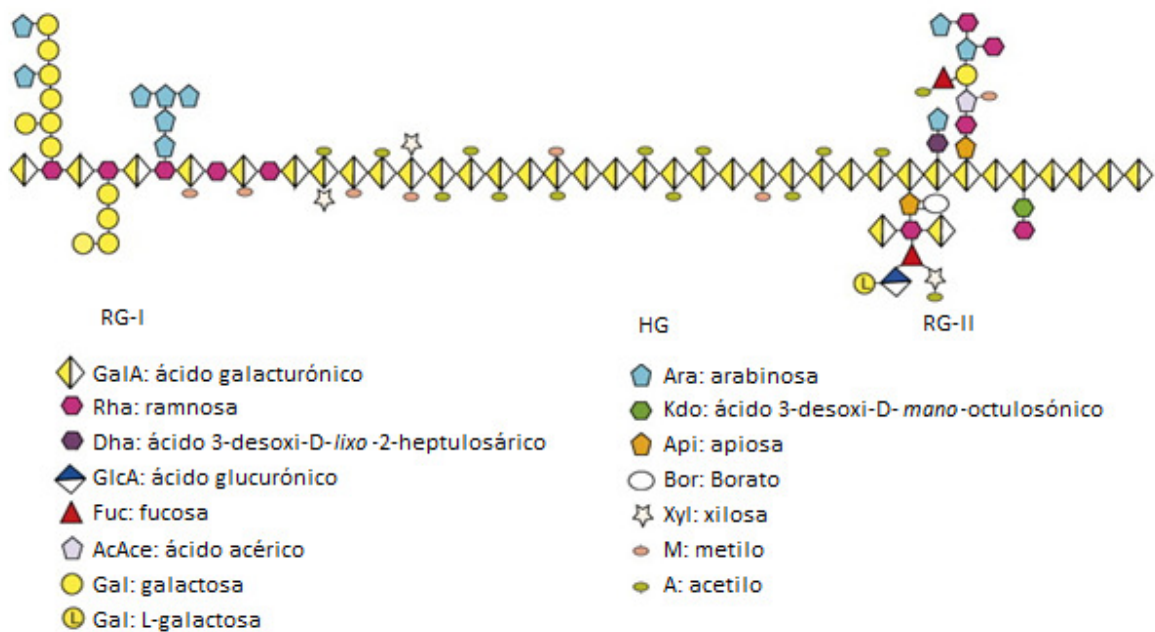


Figura Nro.3. Esquema de la estructura de la pectina que muestra los tres dominios principales: homogalacturonanos (HG), ramnogalacturonano I (RG-I) y ramnogalacturonano II (RG-II) unidos entre sí (Mohnen, 2008)

El dominio RG-I, está formado a partir del ácido galacturónico enlazado en $\alpha(1\rightarrow4)$ con restos de ramnosa intercalados con un enlace $\alpha(1\rightarrow2)$. Estos restos de ramnosa son el anclaje de cadenas laterales de azúcares neutros; aproximadamente la mitad están unidas por el C4 a cadenas de arabinanos.

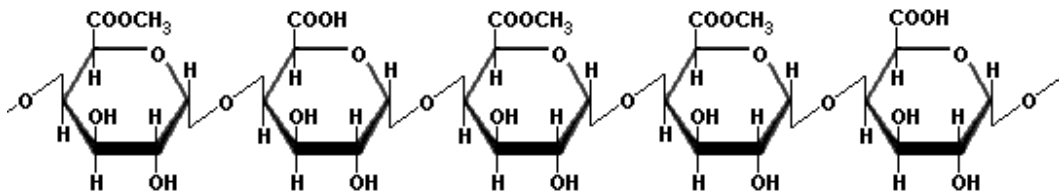


Figura Nro.4. Estructura química del homogalacturonano

Incrustado en partes específicas del HG, aparece el RG-II, que posee una estructura muy compleja, formada por ácido galacturónico, ramnosa, arabinosa, galactosa y pequeñas cantidades de azúcares poco frecuentes. Las longitudes de cadenas de los dominios pueden variar considerablemente (Willats y col., 2006).

1.2.1.2. Extracción de pectina

Industrialmente, las principales fuentes de pectina son la pulpa de manzana, las cáscaras de cítricos (residuos de la extracción de jugos y aceites cítricos, principalmente limón pero también se usa lima, naranja y pomelo) y la remolacha azucarera (May, 1990, 2000). Las diversas materias primas producen diferentes cantidades de pectina extraíbles por cada 100 g de material, tal es el caso de la pulpa de manzana, de la cual se extrae alrededor de 10 - 15 % de pectina, la remolacha azucarera de la cual se extrae entre 10 – 20 % y de las cáscaras de cítricos

alrededor de 20 – 35 %. La pectina extraída se usa ampliamente como un ingrediente alimenticio funcional y su código (E440) se lista entre los ingredientes de innumerables productos alimenticios.

A pesar que varios procesos alternativos han sido patentados en los últimos años, la extracción de la pectina a nivel industrial se lleva a cabo por medio de hidrólisis ácida y posterior precipitación con alcohol. Después se seca, se muele y se tamiza a un tamaño de partícula definido (Levigne y col., 2002).

La red de polisacáridos de pared debe romperse para permitir la extracción de pectina a partir de los tejidos vegetales. Debido a que la pared celular vegetal se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa, pectina y proteína (Figura Nro. 5), el uso de enzimas tales como celulasas, hemicelulasas y proteasas, permite degradar la pared celular de la planta, facilitando el aislamiento de las pectinas (MacDougall y col., 2004).

Por otro lado, el tratamiento enzimático es amigable con el medio ambiente, ya que no se generan residuos de ácidos minerales como ocurre en el tratamiento tradicional. Además, las enzimas están diseñadas para actuar sobre un sustrato específico (Shkodina y col., 1998). Por ejemplo, la hemicelulasa degrada las hemicelulosas dejando libre la pectina. De esta forma, la incorporación de enzimas tales como hemicelulasa y proteasa, permitiría extraer pectina por un tratamiento menos agresivo y menos contaminante del medioambiente.

Las pectinas extraídas de diversas materias primas pueden diferir en la estructura molecular y, por lo tanto, poseer diferentes propiedades funcionales (Willats y col., 2006). Como se

mencionó previamente, la composición, estructura y propiedades fisiológicas de la pectina pueden estar influenciadas por las condiciones de extracción así como por la fuente, lugar y muchos otros factores ambientales (Fissore y col., 2011).

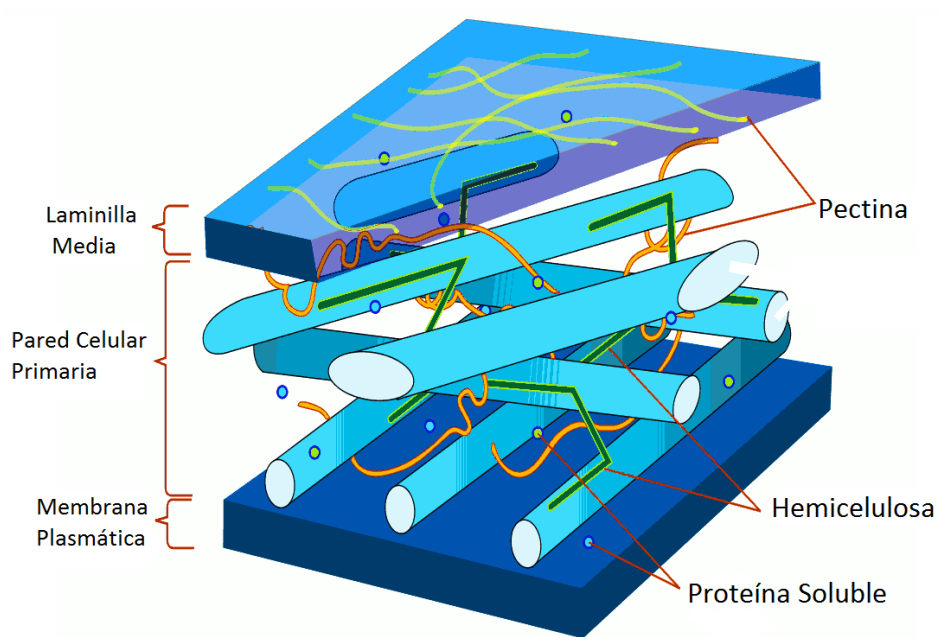


Figura Nro.5. Estructura de la pared celular

1.2.1.3. Aplicación de pectina en alimentos

Desde hace décadas, las industrias de alimentos invierten en la mejora de sus productos y en la innovación, generando nuevos productos en relación a la textura, el sabor y la apariencia. Varios hidrocoloides, tales como carragenato, alginato, xantano, gelatina, pectina y el almidón, se utilizan para cambiar la textura del material alimenticio. Estos compuestos se utilizan en diferentes alimentos obteniéndose distintos efectos ya que sus propiedades de espesamiento y

gelificación dependen de las condiciones del producto, tales como pH, presencia de co-soluto, sales y temperatura (Endress y col., 2005).

Las pectinas, se extraen de tejidos comestibles vegetales y son agentes espesantes y gelificantes naturales. Como producto natural y, debido a sus propiedades diversas, las pectinas son ampliamente utilizadas en varios sistemas alimentarios: confituras, mermeladas, bebidas lácteas, postres (reellenos de productos de panadería), dulces, aderezos para ensaladas, frutas y pastas de tomate (Braddock, 1999). Los diferentes tipos de pectinas se pueden usar en diferentes aplicaciones; las pectinas de alto metoxilo (HM) se utilizan, en general, en productos de alto contenido de azúcar y bajo pH y también se pueden utilizar en los productos lácteos ya que impiden la agregación de la caseína cuando se calienta la leche como ocurre en el caso de las leches ultra alta temperatura o UHT y en yogures bebibles (May, 1990).

Con el aumento de la oferta de productos bajos en calorías en el mercado, debido a la conciencia de los consumidores sobre la importancia de controlar su peso, la reducción de azúcar en aproximadamente 30 % o aún más, determina la necesidad de controlar la textura utilizando, por ejemplo, pectinas de bajo metoxilo (LM) las cuales son sensibles a la presencia de calcio en el alimento como estrategia de espesamiento.

1.2.1.4. Usos industriales

Como ya se ha comentado, las pectinas, debido a su amplia gama de funcionalidades, se utilizan en la industria alimenticia como agentes espesantes, gelificantes y estabilizantes (Lapasin y col., 1995). Los cambios reológicos pueden deberse al entrecruzamiento físico entre las

macromoléculas o por su interacción con el solvente (Waldron y col., 2003). Estos cambios pueden obtenerse una vez alcanzada la hidratación completa de las moléculas.

1.2.1.4.1. Agente espesante

Las pectinas poseen la propiedad de aumentar la viscosidad de sistemas acuosos. El poder espesante varía de acuerdo a la concentración a la cual es aplicada la pectina en la solución con la finalidad de obtener propiedades diferenciales en cuanto a la textura del producto (Leroux y col., 2003).

La mayor parte de los espesantes son hidrocoloides y es la naturaleza expandida de estas moléculas de alto peso molecular en solución lo que da lugar a sus propiedades espesantes aún cuando se usen en bajas concentraciones.

Las moléculas polisacarídicas de cadena larga existen en solución, generalmente, en forma desordenada y que fluctúa continuamente bajo el movimiento browniano. Sin embargo, cuando compacta o expandida esté la molécula depende de la composición monosacáridica de la cadena polimérica y, más específicamente, del tipo de uniones entre residuos en la cadena. Por ejemplo, en segmentos de cadena lineales, cierto tipo de uniones promueven más un “sentido de dirección” desde un residuo al siguiente en la cadena polimérica y, entonces, llevan a moléculas más expandidas, mientras que para un dado peso molecular, los polímeros más ramificados tienen estructuras más compactas. Superpuesto a los efectos de tipo de enlace o unión, el impedimento estérico también juega un papel en la determinación de las orientaciones relativas de los residuos sucesivos a lo largo de la cadena y, entonces, en la

flexibilidad de la cadena polimérica en solución. Claramente, entonces, los diferentes hidrocoloides del mismo peso molecular pero con diferentes estructuras primarias, pueden resultar en soluciones en las cuales las macromoléculas tengan dimensiones significativamente diferentes, lo que es un factor muy importante en determinar la viscosidad de las soluciones de hidrocoloides (Clegg, 1995).

Los estudios reológicos permiten, entre otras cosas, apreciar el poder espesante de los hidrocoloides. Las pectinas en soluciones acuosas muestran comportamiento pseudoplástico, independiente de su grado de metilación. Esto implica la disminución de la viscosidad con el aumento de la velocidad de deformación (van Vliet, 1999).

La influencia de las características físico-químicas de la pectina en su comportamiento reológico, ha sido ampliamente estudiada. La pectina puede contener cadenas laterales de azúcares neutros, o sea que la cadena de homogalacturonanos puede estar ramificada y es importante destacar que MacDougall y col. (2004) establecieron que la ramificación de las cadenas largas de un polímero puede tener importantes efectos en la reología de los sistemas concentrados.

Por su parte, Ström y col. (2007) analizaron la influencia del contenido y distribución de grupos metilo en las propiedades reológicas de la pectina, demostrando que la distribución de los metilos de las pectinas influencia fuertemente su habilidad para interactuar. También ha sido estudiado el efecto de las características del medio en el cual se aplica la pectina, sobre la respuesta reológica.

Así, Fissore y col. (2009) analizaron el comportamiento de pectina de remolacha de bajo grado de metilación en leche, resaltando la influencia de la interacción con la proteína y el calcio de la leche en la respuesta observada.

1.2.1.4.2. *Gelificante*

En contraste con las propiedades espesantes que poseen todos los hidrocoloides, la formación de estructuras de gel verdadero no es universal entre ellos y es observada sólo en un número limitado como consecuencia de la manera en la cual las moléculas interactúan una con otra cuando se hidratan bajo la influencia de ciertos factores externos, tales como la temperatura, pH, calidad del solvente y presencia de iones específicos (Clegg, 1995).

Esencialmente, un gel puede pensarse como una solución polimérica que forma una red en la cual los entrecruzamientos entre diferentes cadenas poliméricas son más que sólo transitorios y pueden ser clasificados como permanentes, cuando se consideran en relación a las escalas de tiempo de otros eventos moleculares. Así, las moléculas poliméricas están permanentemente unidas entre sí a través de entrecruzamientos constituyendo una red tridimensional y con el solvente atrapado en la misma.

En contraste a los geles de polímeros sintéticos, con sus redes unidas covalentemente, los entrecruzamientos en los geles de hidrocoloides están constituidos por zonas de unión ordenadas en las cuales los segmentos de diferentes cadenas poliméricas están empaquetados en un arreglo ordenado de segmentos de cadena unidos no-covalentemente (Clegg, 1995).

El uso de las pectinas como gelificante, depende de ciertas propiedades tales como el grado de esterificación (DM). Las pectinas de alto metoxilo (HM) cuyo grado de esterificación es mayor al 50 %, requieren generalmente bajo pH (2,5 a 3,8) con alto contenido de sólidos solubles (alrededor de 55 %) para formar el gel (May, 1990; Voragen y col., 1995). Las zonas de unión se forman por el entrecruzamiento de HG por puentes de hidrógeno y fuerzas hidrofóbicas entre los grupos metoxilo.

Las pectinas de bajo metoxilo (LM), cuyo grado de esterificación es menor que 50 %, necesitan de iones calcio para gelificar, dentro de un amplio intervalo de pH (2,8 a 7,0) (Voragen y col., 1995). Las zonas de unión se forman por entrecruzamiento con calcio entre los grupos carboxilo libres o no esterificados (Rolin y col., 1990). La formación de redes calcio-pectina históricamente ha sido descrita por el llamado “modelo de egg-box” en el cual el calcio está unido a los grupos carboxilo de distintas cadenas de pectina. Un alto contenido de pectina con cantidades relativamente bajas de calcio dará un gel elástico, mientras que el uso de más calcio con un mínimo de pectina originará un producto mucho más frágil, posiblemente con sinéresis. Todos estos diferentes parámetros hacen que las pectinas LM tengan un comportamiento reológico muy versátil (Racape y col., 1989). Para que se forme una zona de unión estable, se requieren un mínimo de 10 - 17 grupos carboxilo adyacentes, lo que sugiere que no sólo el DM juega un rol importante en la gelación pectina - calcio sino también la distribución de los metil-ésteres (Ström y col., 2007). De acuerdo a Braccini y col. (2001), los resultados teóricos confirman las observaciones experimentales y corroboran el proceso en dos etapas propuesto para la gelación inducida por calcio: (1) dimerización inicial correspondiente a asociaciones fuertes; (2) agregación subsiguiente de dichos dímeros. Estos autores propusieron un modelo

alternativo para los geles de pectina formados con el agregado de calcio que se denomina “shifted egg-box”, basado en un estudio de simulación molecular. Dicho modelo propone que en dichos geles ocurre un pequeño cambio en la conformación del dímero donde el galacturonato es ligeramente desplazado 1,7 Å respecto a la posición de las otras cadenas (esto no ocurre con los alginatos).

1.2.1.4.3. Emulsificante

Las pectinas también son utilizadas para mejorar la suspensión de otros ingredientes o aumentar la estabilidad de las emulsiones. Estos polisacáridos se utilizan para la estabilización de bebidas lácteas ácidas, espumas y emulsiones, como sustitutos de grasas o para micro encapsulación de ingredientes (Sperber y col., 2010).

Distintos autores han sugerido que la proteína que acompaña a la pectina sería responsable de la capacidad emulsificante de la misma. La capacidad viscosante de la pectina en la fase acuosa continua, contribuiría a estabilizar la fase oleosa dispersa de una emulsión aceite en agua (Williams y col., 2005; Fissore y col., 2013). Ha sido informado que la pectina contribuye a la estabilidad de las proteínas de la leche tales como la β -lactoglobulina (β -lg) y la caseína (Leroux y col., 2003; Wang y col., 2005). Se ha reportado que la caseína está asociada directamente a la superficie del glóbulo de grasa tras la homogenización de la leche fluida, previniendo la desestabilización de la emulsión (Sharma y col., 1996; Attaie y col., 2000).

Factores muy importantes para la calidad de las emulsiones son el tamaño de la gota y la distribución de tamaño de gota. Esto último influye en la estabilidad física y propiedades

reológicas y ópticas de una emulsión. La calidad de las emulsiones es a menudo evaluada midiendo el tamaño de gota y caracterizando sus propiedades reológicas. El tamaño de las gotas alcanzado en el proceso de emulsificación depende de la cinética de sorción del emulsionante usado y de la elección de un adecuado equipo de emulsificación.

1.3. Reología

La reología se define como la ciencia que estudia la deformación y el flujo de la materia (Rosenthal, 1999). Se evalúa el comportamiento de flujo por medio de viscosímetros. En el caso de los rotatorios, una de las puntas de medición habitualmente usada es la de platos paralelos. En un viscosímetro rotatorio Searle, el plato inferior es estacionario, mientras que el plato superior rota a velocidad controlada. El movimiento del plato establece un gradiente de velocidad en el fluido el cual es proporcional a la viscosidad de dicho fluido, si el mismo es Newtoniano (Macosko, 1994).

En relación a la caracterización reológica, los parámetros importantes a definir son:

- **Esfuerzo de corte:** Es la fuerza por unidad de área necesaria para alcanzar una dada deformación. La unidad de este parámetro es el Pascal (Pa).
- **Velocidad de deformación o de corte:** Es el cambio de velocidad a través de la distancia entre los dos platos. La unidad es la inversa del tiempo (s^{-1}).
- **Viscosidad:** Es la relación entre el esfuerzo de corte aplicado y la velocidad de corte adoptada por el fluido. Las unidades de viscosidad son la productoria de la unidad de esfuerzo de corte y la unidad de tiempo (Pa s). La viscosidad se evalúa variando la

velocidad de corte y midiendo el esfuerzo de corte resultante o viceversa, lo cual puede realizarse adecuadamente en viscosímetros rotatorios.

Los fluidos pueden presentar comportamiento reológico Newtoniano o no Newtoniano (Carreau y col., 2002). En el primero, la viscosidad es constante e independiente del esfuerzo de corte al cual se somete el fluido y en el segundo, la viscosidad depende del esfuerzo de corte aplicado. Un gráfico de esfuerzo de corte ó viscosidad en función de la velocidad de corte se conoce como reograma. El reograma para un fluido Newtoniano es una línea recta que nace en el origen de coordenadas y cuya pendiente es la viscosidad. El comportamiento no Newtoniano puede ser independiente del tiempo o dependiente del tiempo. Existen varios tipos de comportamiento no Newtoniano independiente del tiempo, por ejemplo:

- **Flujo Dilatante:** La viscosidad aumenta a medida que aumenta el esfuerzo de corte al cual es sometido el fluido.
- **Flujo Pseudoplástico:** La viscosidad disminuye a medida que aumenta el esfuerzo de corte sobre el fluido.
- **Flujo de Bingham:** El producto presenta un valor umbral de esfuerzo de corte, el cual es necesario sobrepasar para que el fluido se ponga en movimiento y, a partir de este momento, la dependencia del esfuerzo de corte con la velocidad de deformación es una recta.

La mayor parte de los alimentos presenta comportamiento de flujo de tipo pseudoplástico. Para estos fluidos, la viscosidad se conoce generalmente como viscosidad aparente, ya que disminuye a medida que la velocidad de corte aumenta y, por lo tanto, no se puede hablar de

una única viscosidad. El comportamiento pseudoplástico se debería a que las macromoléculas del sistema sometido a un esfuerzo de corte, se reorientan para facilitar el flujo del fluido causando una disminución de la viscosidad.

La existencia de un valor umbral de esfuerzo de corte se debería a que el sistema se comporta como un sólido a bajas deformaciones. Los fluidos pseudoplásticos muchas veces presentan este umbral en cuyo caso se denominan como fluidos pseudoplásticos con esfuerzo mínimo de corte.

La elasticidad de un material se refiere a la habilidad del mismo para almacenar la energía recibida por el trabajo de deformación y recuperar su configuración original luego que la fuerza responsable de la deformación es removida. Por otra parte el carácter fluido de un material se refiere a la habilidad que posee el mismo para utilizar la energía recibida en su flujo. Los materiales que exhiben ambos comportamientos se clasifican como materiales viscoelásticos. Cuando se le entrega energía a un material viscoelástico, una porción de dicha energía puede ser almacenada por su carácter elástico, mientras que el resto es utilizada para fluir. Las propiedades viscoelásticas de un material pueden ser caracterizadas mediante ensayos dinámicos, sometiendo el material a un estímulo sinusoidal. El estímulo puede ser la deformación o el esfuerzo y la respuesta puede entonces ser el esfuerzo o la deformación, respectivamente. La respuesta a obtener también es sinusoidal y puede estar en fase (para los sólidos ideales) o desfasada 90° (para los fluidos ideales) respecto al estímulo. El ángulo de desfasaje se suele denominar δ . Los materiales viscoelásticos presentan un ángulo de desfasaje entre 0 y 90° .

Antes de realizar cualquier ensayo dinámico con la finalidad de caracterizar un material, debe determinarse el intervalo de comportamiento viscoelástico lineal para el material de interés, pues es necesario trabajar en dicha condición para evitar afectar el material durante el ensayo (Steffe, 1996).

El módulo de almacenamiento o componente elástica (G') y el módulo de pérdida o componente viscosa (G'') pueden ser evaluados en los ensayos dinámicos. G' es una medida del carácter sólido del material y G'' de su carácter viscoso. La relación entre la componente viscosa y la componente elástica del material viscoelástico, G'' / G' , es el valor de la tangente del ángulo de desfase entre el estímulo y la respuesta ($\tan \delta$). Aquellos materiales con valores grandes de $\tan \delta$, muestran una considerable pérdida de energía entregada por fluencia.

Los ensayos dinámicos son ampliamente utilizados en la caracterización reológica de distintos alimentos, brindando información sobre la estructura del material.

1.4. Objetivos de la tesis

1.4.1. Generales

- Recuperar la biomasa residual de las actividades de la industria frutihortícola contribuyendo al aprovechamiento integral de las materias primas y agregándoles valor mediante el uso de tecnologías limpias.
- Contribuir al desarrollo de alimentos sanos y nutritivos.

1.4.2. Específicos

- Estudiar la influencia de la técnica de aislamiento en:
 - I. La composición química

II. Las propiedades reológicas

III. Las propiedades emulsificantes

de los productos enriquecidos en fibra soluble aislados de tejido de *Cucurbita moschata* Duch ex Poiret.

Capítulo 2:

Materiales y Métodos

En todos los casos, el estudio se desarrolló atendiendo a la comprensión de los aspectos básicos involucrados en el tema. Para ello, se evaluó la influencia de las condiciones de extracción en el rendimiento, la composición química y la funcionalidad de los productos aislados.

2.1. Sistemas a estudiar

La materia prima vegetal se usó para la obtención de productos enriquecidos en pectina. El trabajo se desarrolló sobre tejidos de mesocarpio de calabaza (*Cucurbita moschata* Duch ex Poiret).

2.2. Variables

a) Técnica aplicada para la obtención: tratamiento enzimático utilizando hemicelulasa o proteasa o su combinación. En todos los casos, se realizó una posterior insolubilización con alcohol (Fissore y col., 2007; 2008 a y b; 2009). También se aplicó la técnica de aislamiento de pectina convencional (extracción ácida) con fines comparativos.

b) Condiciones de obtención del producto rico en fibra: tiempo, temperatura, pH y ácido usado, enzima usada y relación enzima/sustrato.

2.3. Preparación de la Muestra

Se utilizaron calabazas (*Cucurbita moschata* Duch ex Poiret) adquiridas en un supermercado local de Argentina, con forma ovoide a cilíndrica con engrosamiento basal, corteza naranja claro irregular y pulpa naranja. La calabaza cruda fue lavada, pelada y el mesocarpio fue cortado en bastones para la posterior extracción del jugo mediante el uso de un extractor de jugo doméstico. Tanto la cáscara como las semillas y el jugo fueron descartados. La pulpa residual fue sometida a un lavado con agua deionizada con el propósito de extraer la mayor cantidad de almidón posible. Posteriormente, se filtró mediante el uso de gasa y el residuo sólido obtenido fue secado en una estufa con convección (velocidad del aire: 0,508 m/s) a 85 ± 1 °C por 3 h. El residuo seco fue molido y tamizado en un molinillo doméstico (Wemir E909, Argentina) para obtener el polvo enriquecido en material de pared celular (CWM), con partículas de tamaño en el rango de 420-710 micrones.

2.4. Extracción enzimática

2.4.1. Enzimas

Las enzimas utilizadas fueron: **Proteasa** producida por *Bacillus amyloliquefaciens* (P-1236, SIGMA, Dinamarca) y **Hemicelulasa** producida por *Aspergillus niger* (H-2125, SIGMA, Alemania).

2.4.2. Extracción enzimática de pectinas

Una alícuota de 10 g del CWM fue sometida a digestión mediante la suspensión en 1 L de solución buffer de citrato de sodio (0,05 M, pH = 5,2). Los sistemas estudiados fueron los siguientes:

- (1) 0,25 g de Hemicelulasa / 10 g CWM / 1 L buffer (*Fissore y col., 2009*). La fracción obtenida fue identificada como “H”.
- (2) 250 µL de Proteasa / 10 g CWM / 1 L buffer (*Zykwinska y col., 2009*). La fracción obtenida fue identificada como “P”.
- (3) 0,25 g de Hemicelulasa + 250 µL de Proteasa / 10 g CWM / 1 L buffer. La fracción obtenida fue identificada como “HP”.
- (4) 10 g CWM/ 1 L buffer. Este sistema sin agregado de enzima, se preparó con el fin de estudiar el efecto del buffer *per se*. La fracción obtenida fue identificada como “SE”.

Fissore y col. (2009), estudiaron la obtención de pectina utilizando hemicelulasa a 30 °C por 20 h. Con la finalidad de minimizar los tiempos del proceso y teniendo en cuenta que el rango de temperatura óptima para la acción de las enzimas (hemicelulasa y proteasa) es de 30 a 50 °C, se decidió realizar la hidrólisis con agitación constante durante 4 horas a 45 ± 1 °C.

Los componentes solubles fueron separados del residuo insoluble por filtración con fibra de vidrio bajo vacío. Luego, a la fracción soluble se le agregaron dos volúmenes de etanol 96 % (v/v) para precipitar los polisacáridos de la pared celular. Finalmente, el precipitado fue separado por filtración con fibra de vidrio bajo vacío, congelado y liofilizado. El rendimiento se calculó como g de producto obtenido por 100 g de CWM sometido a extracción.

2.5. Extracción ácida

Con fines comparativos, se realizó la extracción de pectina de calabaza utilizando el método aplicado a nivel industrial. La extracción ácida de pectina fue llevada a cabo suspendiendo 10 g

de CWM en 500 ml de agua deionizada acidificada con HCl a pH = 2 (Koubala y col., 2008). La mezcla acidificada se mantuvo a 85 °C durante 60 min con agitación constante. El residuo fue separado por filtración con fibra de vidrio bajo vacío. Con la finalidad de precipitar los polisacáridos presentes en la pared celular, se añadieron dos volúmenes de etanol 96 % (v/v) al sobrenadante. El sistema, al igual que los enzimáticos, fue almacenado refrigerado (10 °C) alrededor de 20 h para favorecer la precipitación de los polisacáridos. Luego fue filtrado con fibra de vidrio bajo vacío y la fase sólida fue almacenada a temperatura de congelación. La muestra posteriormente se liofilizó durante 48 h. El material resultante fue molido y el rendimiento calculado como g de producto obtenido por 100 g de CWM sometido a la extracción. La fracción obtenida fue identificada como “A”.

2.6. Análisis químicos

2.6.1. Caracterización

Se empleó agua deionizada (Milli-Q™) para la preparación de todos los reactivos utilizados en los análisis químicos. Los reactivos fueron todos de calidad analítica y provistos por Merck (Argentina), Anedra (Argentina) o SIGMA-Aldrich (USA).

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado en cada muestra.

2.6.1.1. Determinación de Carbohidratos Totales

Se realizó la determinación del contenido de carbohidratos totales según el método colorimétrico de Dubois y col. (1956) que utiliza fenol – ácido sulfúrico. El método se basa en la medición a una longitud de onda de 490 nm de la absorbancia de un complejo coloreado

formado entre el fenol y los carbohidratos. Se utiliza ácido galacturónico o glucosa para las curvas estándar (Figura Nro. 6).

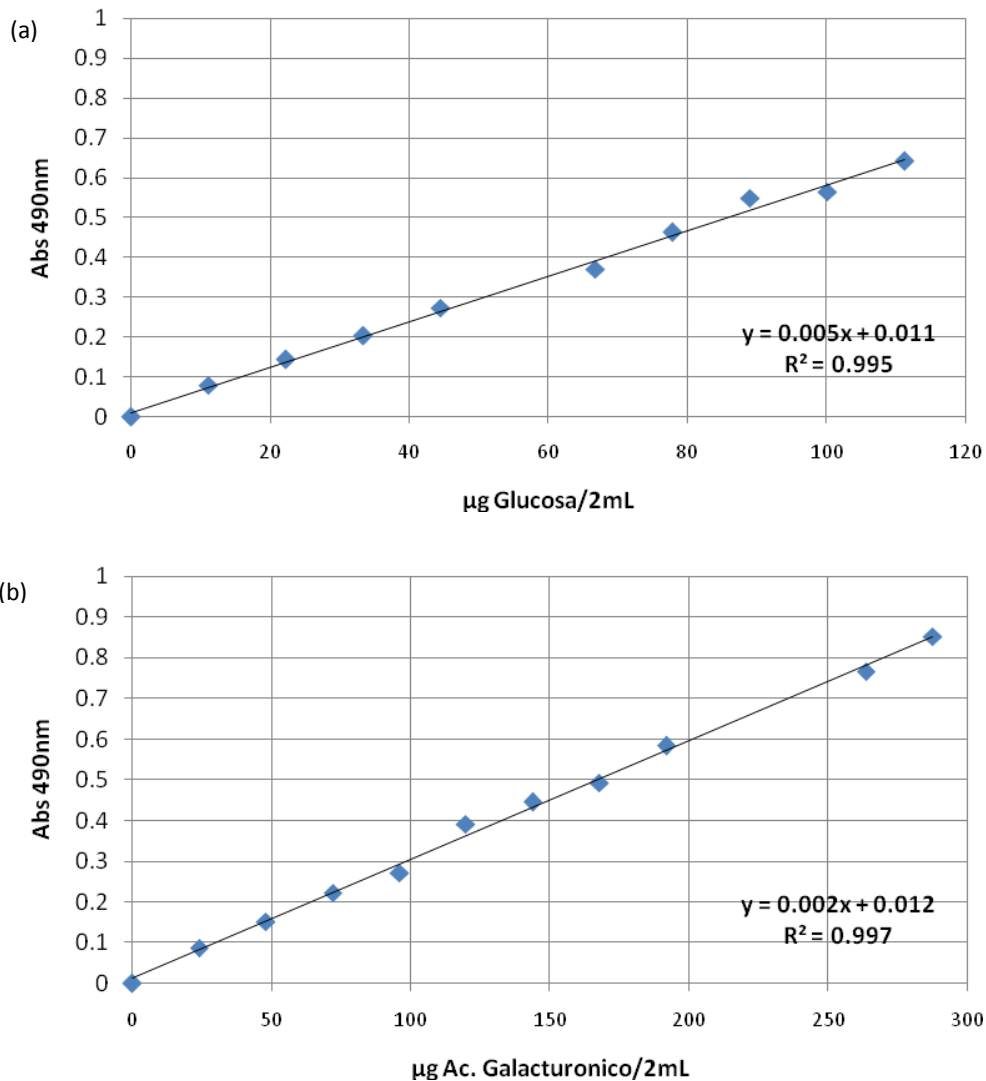


Figura Nro.6. Curva de Calibración para Carbohidratos Totales a partir de (a) glucosa y (b) ácido galacturónico.

El fenol, en presencia de ácido sulfúrico, es utilizado para la micro-determinación colorimétrica cuantitativa de azúcares y sus metil-derivados, oligosacáridos y polisacáridos. La intensidad del color producida a una concentración de fenol constante es proporcional a la cantidad de azúcar presente.

Técnica:

Se pipetearon 2 ml de solución de muestra dentro de un tubo de ensayos y se agregaron 0,05 ml de fenol 80 % (p/p). Luego se agregaron 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se dejó reposar 10 min a 25 °C. El color amarillo-anaranjado que se desarrolló, se evaluó midiendo la absorbancia a 490 nm. La cantidad de azúcar presente en la muestra se determinó entonces por referencia a una curva estándar construida previamente con el carbohidrato de interés.

2.6.1.2. Determinación del Grado de Metilación

Para calcular el grado de metilación se determinó la concentración de metanol según el método de Wood y Siddiqui (1971) por el cual se analizó el contenido de metanol a través de su oxidación con permanganato de potasio a formaldehído, seguido por la condensación con 2,4-pentadiona y amonio para generar un producto coloreado.

Técnica:

A 0,50 ml de muestra se agregaron 0,25 ml de NaOH (1,5 N) y, tras agitar, se dejó a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 h con el fin de hidrolizar los ésteres. Luego se agregaron 0,25 ml de H₂SO₄ (5,5 N) para ajustar el pH del medio. La muestra hidrolizada se llevó a un baño de hielo y agua y se agregaron 0,20 ml de KMnO₄ 2 % (p/v), se agitó y se dejó enfriar 15 min. Se agregaron 0,20 ml de AsO₃H₂Na 0,5 M (disuelto en H₂SO₄ 0,15 N) y 0,60 ml de agua deionizada, se agitó y se dejó reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 2 ml de una solución 0,02 M de 2,4-pentadiona (disuelta en una mezcla de buffer acetato de amonio 2 M y ácido acético 0,05 M). Se mezcló bien y se calentó en baño de agua a

60 °C durante 15 min. Cuando la temperatura de la muestra alcanzó la temperatura ambiente, se tomó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 412 nm.

Para el cálculo del contenido de metanol, se utilizó una curva de calibración obtenida usando una solución de metanol (8690 µg / 100 ml de H₂SO₄ 1 N) como estándar (Figura Nro.7).

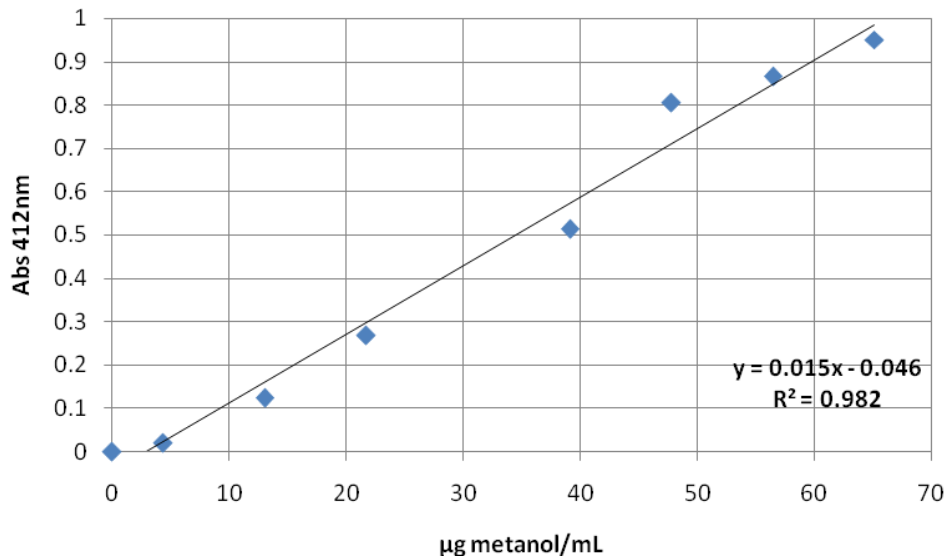


Figura Nro.7. Curva de Calibración para metanol

El grado de metilación (DM) fue calculado como la relación porcentual entre los moles de metanol y los moles de ácido galacturónico.

2.6.1.3. Determinación del Grado de Acetilación

El contenido de grupos acetilos se determinó según el método de Naumenko y col. (1992). Se utilizó una solución acuosa de Fe(NO₃)₃. El Fe⁺³ reacciona con el ácido acetilhidroxámico que se forma por hidrólisis alcalina de los grupos acetilo de la pectina, en presencia de hidroxilamina. La absorbancia de dicho complejo se mide a una longitud de onda de 495 nm. El grado de acetilación (DA) se calculó como la relación porcentual entre los moles de grupo acetilo y los

moles de ácido galacturónico en las muestras. Para la curva de calibración se usó pentaacetato de glucosa (SIGMA, USA) (Figura Nro.8).

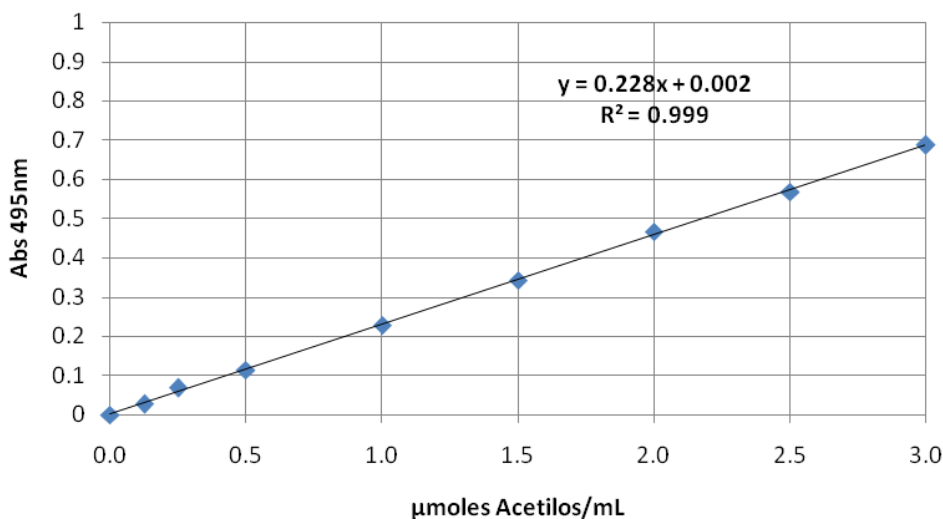


Figura Nro.8. Curva de Calibración para acetilos

Técnica:

A una cantidad perfectamente pesada de muestra (30 – 40 mg) se le agregaron 5 ml de mezcla de clorhidrato de hidroxilamina 0,125 M en agua e NaOH 0,25 M en una relación 1:1 y se agitó durante 1 h. A 1 ml de la solución obtenida se le agregó 1 ml de HNO₃ 0,125 M y 3 ml de Fe(NO₃)₃ 0,01 M, se mezcló por agitación y apareció la coloración específica. La mezcla de reacción se dejó reposar 10 min y se centrifugó durante 15 min a 6000 x g para separar el gel que se hubiese formado en la solución. El gel se separó cuidadosamente y la dilución coloreada se evaluó fotométricamente a una longitud de onda de 495 nm.

En calidad de blanco de reactivos, se utilizó una mezcla de 1 ml de la mezcla de clorhidrato de hidroxilamina 0,125 M en agua e NaOH 0,25 M en proporción 1:1, 1 ml de HNO₃ 0,125 M y 3 ml de Fe(NO₃)₃ 0,01 M.

2.6.1.4. *Determinación de Proteínas*

El contenido proteico se determinó en cada muestra mediante el ensayo de Lowry y col. (1951) usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Según Matto y col. (1987), el ensayo de Lowry, aunque involucra varios pasos, es el método de elección para tejidos vegetales.

En este procedimiento, bajo condiciones alcalinas, el cobre se compleja con la proteína en presencia de tartrato. Luego, se produce la reacción con el reactivo Folin-fenol o Folin-Ciocalteu, cuyo constituyente activo es el ácido mezcla de fosfomolibdico-túngstico. Los ácidos mezclados en la preparación Folin-Ciocalteu son el cromógeno final. Las proteínas efectuarán una reducción de dicho ácido por pérdida de 1, 2 ó 3 átomos de oxígeno del tungstato y/o molibdato, produciendo así una o más especies reducidas que dan lugar a un característico color azul. El cobre se quelata en la estructura peptídica y facilita la transferencia de electrones al cromógeno, incrementando su sensibilidad hacia las proteínas.

Técnica:

A una alícuota de 100 µl de muestra, se le agregaron 100 µl de agua y 1000 µl de Reactivo A. Se preparó un blanco de reacción con 200 µl de agua y 1000 µl de Reactivo A. Se agitó bien y se mantuvo durante 20 min en un baño de agua a 37 °C. Se agregaron 100 µl de Reactivo B al tubo de reacción y nuevamente se agitó bien y se mantuvo durante 20 min en un baño de agua a 37 °C. El color desarrollado por la muestra se midió a una longitud de onda de 660 nm.

REACTIVO A

Mezclar 1, 2 y 3 en relación en volumen de 10 (de 1): 0,1 (de 2): 0,1 (de 3):

1. Carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2 % (p/v) en NaOH (0,1 N).

2. Sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1 % (p/v) en agua.
3. Tartrato sódico potásico ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) al 1 % (p/v) en agua.

REACTIVO B

1. Solución Folin-Ciocalteu en agua en una relación 1:1 en volumen.

La curva de calibración se realizó con una solución acuosa de BSA (SIGMA Protein Standard; SIGMA, USA) en concentración de 400 μg BSA / ml (Figura Nro.9).

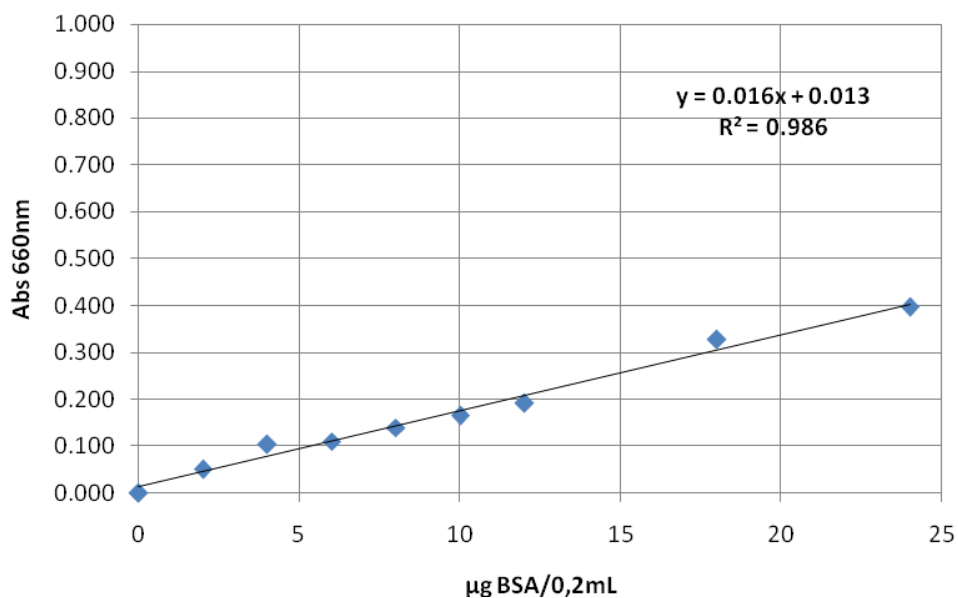


Figura Nro.9. Curva de calibración para proteínas

2.6.1.5. Determinación de Ácidos Urónicos

Se utilizó la técnica para ácidos urónicos reportada por Filisetti-Cozzi y col. (1991), agregando ácido sulfámico – sulfamato de potasio a las muestras para suprimir el pardeamiento de los monosacáridos que fueron liberados y calentando con una mezcla de ácido sulfúrico –

tetraborato. El método se basa en la aparición de un cromógeno de color rosado cuando el ácido urónico es calentado en una mezcla de ácido sulfúrico/tetraborato de sodio, y posterior agregado de un hidroxidifenilo. La adición de sulfamato reduce sustancialmente el pardeamiento que ocurre en los azúcares neutros.

Técnica:

La muestra conteniendo aproximadamente 200 μmol de ácido urónico se disolvió en 0,40 ml de agua en un tubo de ensayo, se agregó 0,04 ml de solución de ácido sulfámico 4 M -sulfamato de potasio (pH 1,6) y se mezcló minuciosamente. Se agregaron 2,4 ml de ácido sulfúrico concentrado conteniendo tetraborato de sodio 0,075 M y se agitó. La solución se calentó a aproximadamente 100 °C durante 20 min en un baño de agua hirviente. Los tubos se colocaron en un baño de hielo para enfriar rápidamente y se agregó 0,08 ml de m-hidroxidifenilo 0,15 % (p/v) disuelto en NaOH 0,5 % (p/v). Se agitó vigorosamente y en 5 – 10 min se desarrolló un color rosado que fue estable durante 1 h. Se leyó la absorbancia a 525 nm. La curva de calibración se realizó con una solución estándar de ácido galacturónico (GalA) (Figura Nro.10).

2.6.1.6. Determinación de Almidón

El contenido de almidón se determinó utilizando el método enzimático propuesto por AACC (1995). Para ello se utilizaron reactivos provistos por SIGMA (USA). En este método la α -amilasa y la amiloglucosidasa catalizan la hidrólisis del almidón a glucosa. La glucosa es luego oxidada a ácido glucónico por la glucosa oxidasa, con formación de peróxido de hidrógeno. Finalmente, el peróxido de hidrógeno reacciona con o-dianisidina en presencia de peroxidasa para formar un

producto que en presencia de ácido sulfúrico genera o-dianisidina oxidada, de color rosa. La intensidad del color se evalúa a través de la medición de la absorbancia a 540 nm.

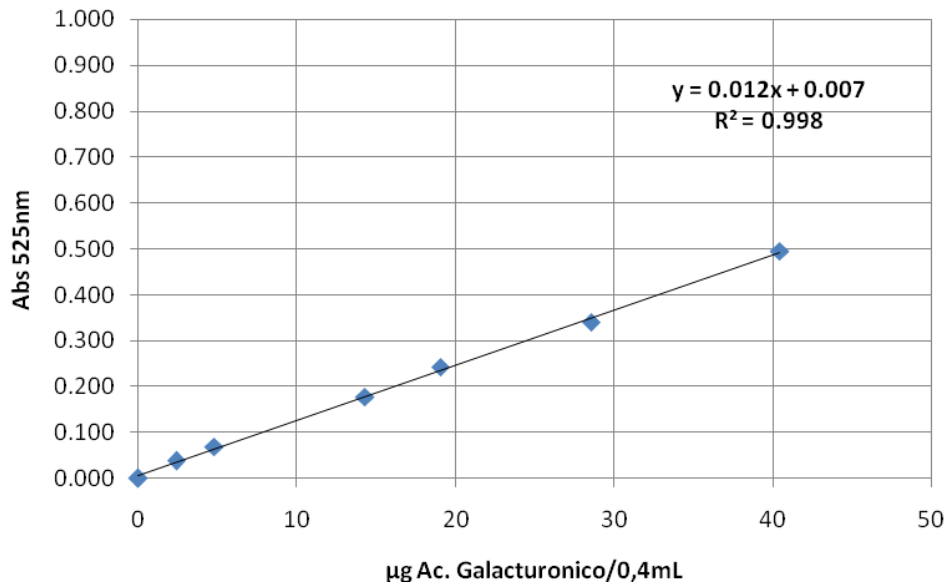


Figura Nro.10. Curva de calibración para ácidos urónicos

Técnica:

Para remover glucosa libre y maltodextrinas, se colocaron aproximadamente 100 mg de muestra molida en tubos de ensayo y se agregaron 5 ml de etanol 80 % (v/v), se incubó a 80 °C durante 5 min, se mezcló y se agregaron otros 5 ml de etanol 80 % (v/v). El pellet se resuspendió en 10 ml de etanol 80 % (v/v), se mezcló, se centrifugó durante 10 min a 1000 x g, y se descartó cuidadosamente el sobrenadante.

Para determinar almidón total se agregaron 2 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) a cada muestra, se mezcló y se incubó durante 5 min en un baño de agua hirviente. Luego se procedió con la digestión del almidón. Para ello se agregaron 0,2 ml de solución de etanol 80 % (v/v) a cada

muestra y a un tubo vacío que constituyó el blanco de digestión. Se pipetearon 3 ml de agua y 0,02 ml de α -amilasa en cada tubo. Se mezcló y se incubó durante 5 min en un baño de agua hirviente y luego se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Se llevó el volumen de cada tubo a 10 ml con agua y se mezcló. Se tomó 1 ml de cada solución (muestras y blanco) y se le agregó 1 ml de reactivo que contiene amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* en buffer, se mezcló y se incubó durante 15 min en un baño de agua a 60 °C con agitación. Los tubos se llevaron a temperatura ambiente. Se tomó 1 ml de cada tubo y se diluyó a 10 ml con agua, para luego proceder con la determinación de glucosa.

Se preparó el estándar de la reacción con 0,05 ml de una solución estándar de glucosa (1 mg D-glucosa / ml de ácido benzoico 0,1 %) y 0,95 ml de agua. A tiempo cero se inició la reacción agregando 2 ml de un reactivo que involucra glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, peroxidasa de rábano picante y dihidrocloruro de o-dianisidina a un primer tubo y se mezcló. Se asignaron intervalos de 60 seg entre la adición del reactivo a cada tubo subsiguiente. Cada tubo se incubó exactamente 30 min a 37 °C y la reacción se detuvo agregando 2 ml de ácido sulfúrico (12 N) a cada tubo, mezclando cuidadosamente.

Se midió la absorbancia de cada tubo a 540 nm y, por comparación con los resultados obtenidos para el estándar, se calculó el contenido porcentual de almidón.

2.6.2. Determinación de hidratos de carbono en el CWM

Se determinó el contenido de hidratos de carbono totales no-celulósicos, celulosa y lignina. La hidrólisis de la celulosa y de los hidratos de carbono no celulósicos de la pared celular se realizó de acuerdo a Ng y col. (1998).

Técnica:

Se dispersaron 0,30 g de muestra del producto en 2080 µl de solución de ácido sulfúrico 72 % (v/v) durante 3 h a temperatura ambiente. A continuación, se agregó suficiente cantidad de agua deionizada de manera de tener una concentración final 1 M en ácido sulfúrico (≈ 25 ml). Cada muestra fue luego calentada a 100 °C durante 2,5 h en un baño de agua. La dispersión resultante fue enfriada, centrifugada durante 10 min a 12000 x g y, finalmente, se separó el sobrenadante. El mismo se neutralizó cuidadosamente y el contenido de hidratos de carbono totales (celulosa y no-celulósicos) se determinó por el método del fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956). El residuo se lavó tres veces con agua deionizada, se centrifugó durante 10 min a 12000 x g y, finalmente, se liofilizó para luego pesarlo e informarlo como lignina.

Se llevó a cabo un segundo procedimiento con otra porción de ≈ 0,30 g de cada muestra a las cuales se les agregó 2080 µl de solución 72 % (v/v) de ácido sulfúrico; se dispersó el material y se agregó agua inmediatamente para alcanzar una dilución final en ácido sulfúrico 1 M, seguida de calentamiento por 2,5 h a 100 °C. Se procedió a continuación igual que en el caso anterior. El residuo final obtenido y pesado corresponde a celulosa y lignina, por lo tanto los hidratos de carbono totales contenidos en el sobrenadante están constituidos por polisacáridos no-celulósicos.

El tercer procedimiento de hidrólisis se llevó a cabo con una nueva porción de cada muestra, seguida por la técnica aplicada durante el segundo procedimiento, pero en este caso se aplicó una hora de calentamiento a 100 °C en un baño de agua. Solo se separó el sobrenadante para la cuantificación del contenido de ácidos urónicos por el método espectrofotométrico de Filisetti-Cozzi y col. (1991).

Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

2.7. Capacidad emulsificante

Con cada fracción aislada se prepararon soluciones acuosas al 2 % (p/p) calentando suavemente a 65 °C para asegurar la completa disolución. Para formar la emulsión, se agregó 10 % (p/p) de fase oleosa. El aceite que se utilizó fue aceite de triglicéridos de cadena media (MCT oil), de uso habitual como vehículo de aditivos liposolubles en alimentos. Las muestras fueron a agitación por 30 seg inmediatamente antes de someterlas a homogenización por 3 min utilizando un mezclador Ultra-Turrax T25 basic (IKA-WERKE, GMBH & Co. KG, Staufen, Alemania) a 13500 rpm. El tamaño de gota se midió a lo largo de 45 días utilizando un Mastersizer 2000 con una unidad de dispersión Hydro 2000MU (Marlvern Instruments, Reino Unido). Para describir el tamaño de gota, se usó la teoría de la esfera equivalente (Fissore y col., 2011). Utilizando los distintos diámetros equivalentes (d_i) medidos, se pudo evaluar el momento de área superficial ó diámetro medio de Sauter ($D_{[3,2]}$).

2.8. Propiedades reológicas

Para cada una de las fracciones aisladas a partir de *Cucurbita moschata* Duch ex Poiret, la caracterización reológica se realizó utilizando un reómetro Paar Physica MCR 300 (Anton Paar GMBH, Alemania) equipado con geometría de platos paralelos rugosos (PP 25/P2) con una luz entre platos de 0,5 mm, siendo las mediciones realizadas en estado estacionario. Se trabajó a esfuerzo controlado.

2.8.1. *Sistemas modelo*

Con el objetivo de analizar la potencial aplicación de las fracciones aisladas en alimentos, se evaluó el comportamiento de distintos sistemas:

2.8.1.1. *Sistemas Acuosos*

Se prepararon sistemas acuosos de fibra al 2,00 % (p/v). Para ello, alrededor de 0,02 g de cada fibra aislada fueron suspendidos en 1000 µl de agua deionizada y se agitaron hasta lograr su hidratación. Luego, los sistemas se almacenaron a 25 °C durante 18 h para lograr que el sistema complete su hidratación y se equilibre. Se obtuvieron los siguientes sistemas:

- (1) **A-Agua:** Sistema acuoso obtenido a partir de la fracción “A” al 2,00 % (p/v).
- (2) **H-Agua:** Sistema acuoso obtenido a partir de la fracción “H” al 2,00 % (p/v).
- (3) **P-Agua:** Sistema acuoso obtenido a partir de la fracción “P” al 2,00 % (p/v).
- (4) **HP-Agua:** Sistema acuoso obtenido a partir de la fracción “HP” al 2,00 % (p/v).
- (5) **SE-Agua:** Sistema acuoso obtenido a partir de la fracción “SE” al 2,00 % (p/v).

2.8.1.2. *Sistemas Acuosos con Calcio*

Una masa de 0,04 g de fracción aislada se suspendió en 2 ml de agua destilada y se agitó hasta hidratar completamente. Para cada sistema de fracción al 2 % (p/v) se agregaron 70 µl de solución de Cl_2Ca al 10 % (v/v) y se agitó vigorosamente. De esta manera, la concentración de Ca^{+2} / g de fracción aislada usada fue de aproximadamente 60 mg / g de fracción aislada para

obtener una concentración de calcio similar a la declarada en la leche líquida. Se obtuvieron los siguientes sistemas:

- (1) **A-Ca⁺²**: Sistema acuoso con calcio obtenido a partir de la fracción “A” al 2,00 % (p/v) conteniendo 70 µl de solución de Cl₂Ca al 10 % (v/v).
- (2) **H-Ca⁺²**: Sistema acuoso con calcio obtenido a partir de la fracción “H” al 2,00 % (p/v) conteniendo 70 µl de solución de Cl₂Ca al 10 % (v/v).
- (3) **P-Ca⁺²**: Sistema acuoso con calcio obtenido a partir de la fracción “P” al 2,00 % (p/v) conteniendo 70 µl de solución de Cl₂Ca al 10 % (v/v).
- (4) **HP-Ca⁺²**: Sistema acuoso con calcio obtenido a partir de la fracción “HP” al 2,00 % (p/v) conteniendo 70 µl de solución de Cl₂Ca al 10 % (v/v).
- (5) **SE-Ca⁺²**: Sistema acuoso con calcio obtenido a partir de la fracción “SE” al 2,00 % (p/v) conteniendo 70 µl de solución de Cl₂Ca al 10 % (v/v).

2.8.1.3. *Sistemas con Leche Entera*

Se utilizó Leche UAT entera homogeneizada fortificada con vitaminas A, C y D libre de gluten (Milkaut, Argentina), la cual declara un contenido de calcio de 220 mg / 200 ml de leche líquida. Una masa de 0,04 g de fracción aislada se suspendió en 2 ml de leche y se agitó hasta hidratación completa. Se obtuvieron los siguientes sistemas:

- (1) **A-Leche**: Sistema con leche entera obtenido a partir de la fracción “A” al 2,00 % (p/v).
- (2) **H-Leche**: Sistema con leche entera obtenido a partir de la fracción “H” al 2,00 % (p/v).
- (3) **P-Leche**: Sistema con leche entera obtenido a partir de la fracción “P” al 2,00 % (p/v).
- (4) **HP-Leche**: Sistema con leche entera obtenido a partir de la fracción “HP” 2,00 % (p/v).

(5) **SE-Leche**: Sistema con leche entera obtenido a partir de la fracción “SE” al 2,00 % (p/v).

De acuerdo a las características reológicas de las muestras y con la finalidad de aplicar los modelos de ajuste, se realizaron los siguientes ensayos:

2.8.2. Ensayos de Flujo

Para evaluar el comportamiento reológico de flujo, se determinó la curva de viscosidad en un amplio rango de valores de velocidad de deformación (shear rate, $\dot{\gamma}$). Las curvas de flujo se determinaron a temperatura constante (25 °C) en un rango de velocidad de deformación entre 0,01 – 300 s⁻¹. A cada velocidad de deformación, se alcanzó el estado estacionario antes de registrar los datos. Fue testeado el ajuste de los perfiles de flujo obtenidos a los siguientes modelos:

2.8.2.1. Ley de la Potencia

$$\tau = k * \dot{\gamma}^n$$

donde τ representa al esfuerzo de corte, k representa el índice de consistencia, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación y n es el índice de flujo.

2.8.2.2. Modelo de Herschel-Bulkley

$$\tau = \tau_0 + k * \dot{\gamma}^n$$

donde τ representa al esfuerzo de corte, τ_0 representa el esfuerzo de corte mínimo necesario para que el sistema comience a fluir, k representa el índice de consistencia, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación y n es el índice de flujo.

2.8.2.3. Modelo de Cross

$$\eta_a = \eta_{\infty} + \frac{(\eta_0 - \eta_{\infty})}{1 + (\tau_{CR} * \dot{\gamma})^m}$$

donde η_a representa a la viscosidad aparente, η_0 representa a la viscosidad a velocidad de deformación cero, η_{∞} representa la viscosidad para velocidad de deformación infinita, τ_{CR} representa la constante de tiempo, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación y, m es la constante adimensional.

2.8.2.4. Modelo de Carreau

$$\eta_a = \eta_{\infty} + \frac{(\eta_0 - \eta_{\infty})}{[1 + (\tau_{CA} * \dot{\gamma})^2]^M}$$

donde η_a representa a la viscosidad aparente, η_0 representa a la viscosidad a velocidad de deformación cero, η_{∞} representa la viscosidad para velocidad de deformación infinita, τ_{CA} es la constante de tiempo, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación y, M es la constante adimensional.

2.8.3. Ensayos Dinámicos

En primer lugar se realizaron los barridos de amplitud para determinar el rango viscoelástico lineal (RVL). Para ello, los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G''), así como la

deformación (γ), se evaluaron como función del esfuerzo (τ), a una frecuencia constante de 0,1 Hz y a una temperatura constante de 25 °C. El valor de esfuerzo constante para trabajar en los barridos de frecuencia (espectro mecánico), se eligió a partir del rango viscoelástico lineal determinado previamente para cada fracción aislada. Luego, se obtuvo cada espectro mecánico al valor de esfuerzo constante seleccionado: los valores de G' y G'' , así como $\tan \delta$, se registraron en función del aumento de la frecuencia angular (ω , s^{-1}), luego de alcanzar la condición de estado estacionario para cada punto.

2.9. Análisis estadístico

Los ajustes de los datos experimentales fueron evaluados mediante el software Prism6 Statistical Software para Windows (GraphPad, USA). Los análisis estadísticos para comparar los resultados fueron realizados por medio del análisis de varianza ANOVA (nivel de significancia 0,05) y con el test post-hoc de Tukey (Sokal y col., 2000).

Capítulo 3:

Resultados y Discusión

3.1. Material de la pared celular

El material de la pared celular fue concentrado a partir de la eliminación del jugo del mesocarpio de la calabaza. Este proceso y el posterior lavado pudieron conducir a la pérdida de algunos componentes hidrosolubles del mesocarpio.

La deshidratación de la pulpa arrojó un rendimiento de polvo enriquecido en material de pared celular (CWM) del 3,21 % (3,21 g de CWM por cada 100 g de material utilizado fresco) (Tabla Nro.1).

Tabla Nro. 1. Distribución porcentual de cada tipo de tejido y rendimiento de CWM obtenido tras el procesamiento de calabaza (*Cucurbita moschata* Duch ex Poiret) fresca

Descripción	Cantidad (g)	Rendimiento (%)
<i>Cucurbita moschata</i>	25989,81	100,00
Cáscara	1864,47	7,17
Jugo	13124,85	50,50
Residuos	2455,04	9,45
Mesocarpio	8545,45	32,88
CWM	834,27	3,21¹

¹ g CWM / 100 g *Cucurbita moschata*

Se observó un rendimiento de CWM mayor al resultado obtenido por Fissore y col., (2009) quienes obtuvieron 1,9 g CWM / 100 g de calabaza. Como se observa en la Tabla Nro.2, el CWM obtenido estaba compuesto principalmente por hidratos de carbono ($84,6 \pm 3,4$ g / 100 g de CWM) y bajo contenido de lignina ($2,6 \pm 0,6$ g / 100 g CWM). Se determinó un contenido de celulosa de $18,2 \pm 1,1$ g / 100 g CWM y una porción de ácidos urónicos de $3,7 \pm 0,2$ g / 100 g CWM. Se determinó por diferencia un contenido de hidratos de carbono no celulósicos y no urónicos de 55,8 g / 100 g CWM.

Tabla Nro. 2. Caracterización del CWM de *Cucurbita moschata* Duch ex Poiret¹

Hidratos de Carbono Totales (g / 100 g CWM) ²	$84,6 \pm 3,4$
Ácidos Urónicos (g / 100 g CWM)	$3,7 \pm 0,2$
Almidón (g/ 100 g CWM)	$6,9 \pm 0,1$
Celulosa (g / 100 g CWM)	$18,2 \pm 1,1$
Lignina (g / 100 g CWM)	$2,6 \pm 0,6$
Proteína (g /100 g CWM)	$7,1 \pm 0,5$
Humedad (g /100g CWM)	$3,0 \pm 0,1$

¹ Se informa media y desvío estándar (n=3).

² Calculado en base a ácido galacturónico

Fissore y col. (2009) caracterizaron el CWM de calabaza y reportaron una mayor cantidad de ácidos urónicos (6,7 g / 100 g) y celulosa (24,7 g / 100 g). Por otro lado, el nivel de hidratos de carbono totales, lignina y proteína es mayor al obtenido por Fissore y col. (2009), quienes informaron valores de 55 g / 100 g, 1,5 g / 100 g y 2,9 g / 100 g, respectivamente. La composición química, puede presentar diferencias entre una misma especie, así como en las diferentes partes de una misma especie, incluso por factores climáticos, geográficos, entre otros.

3.2. Caracterización de las fracciones aisladas

Se estudiaron diferentes procesos de extracción de fracciones ricas en pectina a partir del CWM de calabaza. Al emplear el proceso convencional a nivel industrial (fracción “A”) el rendimiento obtenido fue de 8,35 g / 100 g de CWM, mientras que con todos los tratamientos enzimáticos (fracciones “H”, “P”, “HP” y “SE”) el rendimiento fue menor, encontrándose entre 4,70 y 5,10 g / 100 g de CWM.

Tabla Nro. 3. Rendimiento de extracción para las distintas fracciones aisladas

Sistema analizado	Rendimiento (g / 100 g) ^{1,2}
A	8,35 ± 2,33
H	5,10 ± 2,05
P	4,70 ± 1,29
HP	4,90 ± 1,14
SE	4,90 ± 1,24

¹ Se informa media y desvío estándar (n=3).

² Expresado como g fracción aislada / 100 g de CWM.

El CWM de calabaza fue sometido a digestión enzimática en buffer citrato de sodio de pH 5,2. Los buffers son útiles para controlar el pH y son sustancias activas como agentes de ruptura de entrecruzamientos físicos de los polisacáridos de la pared celular, debido a las sales que contienen (Fry, 1986; Kravtchenko y col., 1992). Por ello, se realizó una digestión sin enzimas con el objetivo de evaluar las características de los productos extraídos del material de la pared celular por acción del buffer *per se*. Las interacciones iónicas se rompen por efecto de la sal así como por el pH ácido, principalmente cuando el material se trata a temperaturas mayores que 18 – 20 °C (Parker y col., 1995; Brett y col., 1996). En la pared celular, los polisacáridos pueden presentar interacciones iónicas con la extensina, proteína catiónica de la pared celular (Fry,

1986). Parte de la extensina puede extraerse de la pared celular, principalmente las macromoléculas recién establecidas, por rotura de los entrecruzamientos pectina-extensina debido a la acción de las sales del buffer usado. También otros entrecruzamientos no-covalentes como los puentes Ca^{+2} pueden romperse específicamente por el citrato del buffer debido a su efecto quelante. Además, las temperaturas mayores a 18 – 20 °C pueden llevar a la remoción y partición de algunas cadenas pécticas sin importar el pH (Fry, 1986), promoviendo algún grado de β -eliminación (Brett y col., 1996).

La adición de hemicelulasa (fracción “H”), de proteasa (fracción “P”) y de proteasa y hemicelulasa (fracción “HP”) no produjo un aumento significativo de rendimiento frente a la fracción sin enzima (SE).

Fissore y col. (2007, 2008a, 2008b) obtuvieron, a partir de calabaza, rendimientos de entre 4 y 7 % de fracciones tratadas con hemicelulasa en otras condiciones de temperatura y tiempo de tratamiento (30 °C, 20 h).

En la Tabla Nro.4 se observa la composición química de las diferentes fracciones aisladas. El contenido de hidratos de carbono totales presentó valores entre 55 y 95 g / 100 g de fracción y fue mayor en la fracción “A” (95,0 g / 100 g de fracción) y en la fracción “H” (91,5 g / 100 g de fracción). En relación a los hidratos de carbono totales, hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre fracciones salvo entre “P” y “HP”.

El contenido de ácidos urónicos varió entre 41 – 57 g / 100 g. Fissore y col. (2010) confirmaron la ausencia de ácido gulurónico en calabaza, por lo cual el contenido detectado de urónicos corresponde a ácido galacturónico (GalA). Las fracciones “A” y “P” presentaron contenidos similares y significativamente más altos al de las otras fracciones ($p < 0,05$).

Se pudo observar que el contenido de proteína fue más alto en la fracción “A” lo cual muestra una mayor recuperación de la fracción de proteínas asociadas a la pared celular seguramente por la acción del ácido a $\text{pH} \approx 2$ y posterior precipitación con etanol. Para las demás fracciones, el contenido de proteína fue menor. Todas las fracciones presentaron contenidos significativamente diferentes con un 95% de confianza.

El grado de metilación (DM) para la fracción “A” fue mayor y para la fracción “P” fue ligeramente mayor al 50 % (pectina de alto metoxilo), mientras que para las fracciones “H”, “HP” y “SE”, el DM fue ligeramente menor al 50 % (pectina de bajo metoxilo). El grado de acetilación (DA) fue muy bajo y varió entre 0,26 - 0,53 % molar, siendo la fracción “SE” la que presentó el mayor DA. Sin embargo, las diferencias no fueron significativas ni para el DM ni para el DA de las distintas fracciones.

El contenido de azúcares neutros se calculó a partir de la diferencia entre el contenido de hidratos de carbono totales, GalA y almidón. Entre todas las fracciones estudiadas, la fracción “A” presentó el mayor contenido de azúcares neutros (≈ 34 g de azúcares neutros / 100 g de fracción aislada). Se observó que de las fracciones extraídas enzimáticamente, la fracción “H” tenía el mayor contenido de azúcares neutros (≈ 25 g / 100 g). El producto aislado por el buffer “SE”, estaba esencialmente constituido por HG con una baja proporción de azúcares neutros (≈ 7 g / 100 g). Los azúcares neutros son la expresión de los azúcares presentes en los dominios RG-I y muchos de los presentes en RG-II, con lo que los altos contenidos de azúcares neutros en las fracciones aisladas pueden atribuirse a los mismos (Vincken y col., 2003). En base a lo expuesto, el alto nivel de azúcares neutros de las fracciones “H” y “A” puede asociarse a una mayor proporción de estos dominios que la observada en la fracción “SE”.

La fracción “H” presentó el mayor contenido de almidón (25 g / 100 g) seguida por la fracción “HP” (10,44 g /100 g). Las demás fracciones presentaron valores entre 0,63 y 3,93 g / 100 g de fracción. Fissore y col. (2008a) también determinaron un mayor contenido de almidón en las fracciones aisladas por acción de la enzima hemicelulasa utilizada en este trabajo.

Tabla Nro. 4. Composición química de las fracciones enriquecidas en pectina aisladas de calabaza

Sistema analizado	Hidratos de Carbono Totales (g/100g) ^{1, 2, 3}	Ácidos Urónicos (g/100g) ^{1, 2, 3}	Almidón (g /100g) ^{1, 3}	Azúcares Neutros (g/100g) ^{2, 3}	Proteína (g /100g) ^{1, 3}	Grado de Metilación DM (%molar) ⁴	Grado de Acetilación DA (%molar) ⁴
A	95,00 ± 5,47 ^a	56,88 ± 6,08 ^a	3,93 ± 0,04 ^a	34,19	8,10 ± 0,45 ^a	61,61 ± 1,87 ^a	0,32 ± 0,22 ^a
H	91,50 ± 3,06 ^b	41,54 ± 2,69 ^b	25,20 ± 0,50 ^b	24,76	4,29 ± 0,33 ^b	48,01 ± 2,03 ^a	0,34 ± 0,13 ^a
P	75,15 ± 3,22 ^c	56,55 ± 5,24 ^a	0,63 ± 0,09 ^c	17,97	6,92 ± 0,66 ^c	50,89 ± 6,44 ^a	0,26 ± 0,16 ^a
HP	74,61 ± 3,46 ^c	47,13 ± 5,15 ^c	10,44 ± 0,03 ^d	17,04	5,51 ± 0,31 ^d	45,04 ± 0,82 ^a	0,39 ± 0,06 ^a
SE	55,22 ± 1,32 ^d	46,60 ± 0,20 ^c	1,70 ± 0,10 ^e	6,92	5,13 ± 0,30 ^e	46,22 ± 6,08 ^a	0,53 ± 0,07 ^a

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en los contenidos entre las distintas fracciones.

¹ Se informa media y desvío estándar (n=3).

² Calculado en base a ácido galacturónico.

³ Expresado como g / 100 g de fracción aislada.

⁴ Relación porcentual entre moles de metanol o grupos acetilo y moles de GalA por 100g de muestra.

De acuerdo a Redgwell y col. (1990) y Vincken y col. (2003), las moléculas de pectina extraídas por buffer sin la presencia de enzima, probablemente, fueron aquéllas que estaban originalmente confinadas a las regiones de la laminilla media y las zonas donde se producen interconexiones celulares y la adhesión ocurre.

Fissore y col. (2008a) aislaron productos enriquecidos en pectina por acción de la hemicelulasa.

Las fracciones obtenidas presentaron bajos niveles de GalA (≈ 40 g / 100 g) y de azúcares neutros; los azúcares neutros principalmente constituidos por arabinosa, galactosa y ramnosa, sugirieron la presencia de RG-I. Asimismo, se observó la presencia de RG-II. La distribución de

los azúcares neutros depende de diversos factores, incluyendo planta, tipo de tejido, grado de maduración y método de extracción (Round y col., 2001).

3.3. Capacidad emulsificante

Se estudió la capacidad emulsificante de las fracciones aisladas. En bibliografía, esta capacidad se atribuye a la fracción proteica que acompaña a muestras con alto contenido polisacárido y más específicamente, a las características hidrofóbicas / hidrofílicas de dichas proteínas (Funami y col., 2007). El poder espesante de los hidratos de carbono en la fase continua de las emulsiones también ha sido mencionado en bibliografía como factor de estabilización (Chanamai y col., 2000). En la Figura Nro.11 se muestran los resultados del ensayo realizado durante 45 días sobre emulsiones aceite en agua y conteniendo un 2 % (p/p) de cada una de las fracciones.

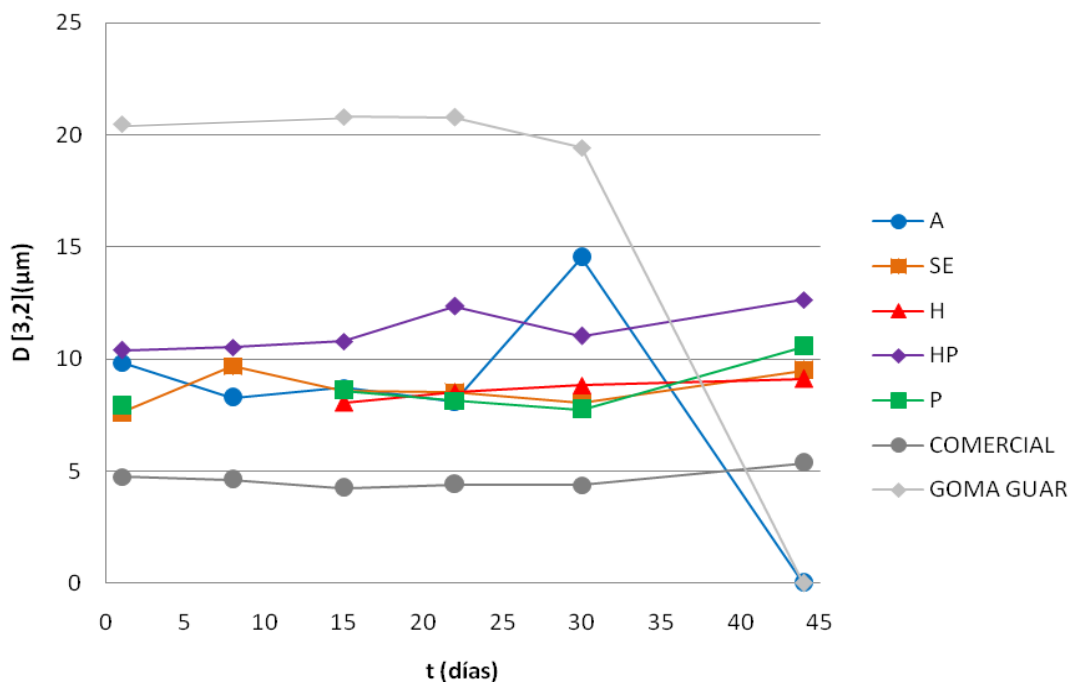


Figura Nro.11. $D_{[3,2]}$ diámetro de Sauter para la fase dispersa de las emulsiones estudiadas

Las emulsiones formadas con las fracciones “H”, “P”, “HP” y “SE” mantuvieron un valor de diámetro medio de Sauter ($D_{[3,2]}$) relativamente constante durante el tiempo de estudio. Además, fueron capaces de estabilizar emulsiones con igual eficiencia que la pectina comercial, pero presentaron un mayor valor de $D_{[3,2]}$, siendo éste un factor importante de calidad que, de acuerdo a Herbstraith & Fox (2007), depende de la cinética de sorción del emulsificante. Leroux y col. (2003), reportaron que el contenido de proteínas de las fracciones polisacáridicas podría contribuir notoriamente a la estabilidad de la emulsión. Guillotin y col. (2005), determinaron que las propiedades emulsionantes de pectinas se deben principalmente a la presencia de grupos hidrofóbicos en las proteínas que le confieren a la molécula un carácter activo en superficie. Fissore y col. (2013), usando pectinas extraídas de calabaza mediante tratamiento enzimático con celulasa a 30 °C y durante 30 h, obtuvieron emulsiones de aceite en agua estables por 30 días, asociando esto al contenido de proteínas de la fracción sorbida en la interfase aceite-agua. En base a esto se podría pensar que las fracciones “H”, “P”, “HP” y “SE”, con contenidos de proteína entre 4,29 y 8,10 g proteína / 100 g fracción, tienen capacidad emulsionante con una eficacia comparable a otros hidrocoloides comerciales, mostrando así un gran potencial como aditivo alimenticio. La fracción “A” y el patrón con goma guar mostraron una desestabilización de la emulsión a los 30 días de ensayo. En el caso de la fracción “A”, se observó un alto contenido de proteína (capacidad emulsificante) y de hidratos de carbono (capacidad espesante) pero el alto contenido de azúcares neutros (pectina altamente ramificada) podría afectar su capacidad emulsificante en la interfase aceite / agua por razones estéricas.

3.4. Caracterización reológica

Se evaluó la variación del esfuerzo cortante en función de la velocidad de deformación para los sistemas formados a partir de las fracciones aisladas al 2 % (p/v) en agua, con adición de calcio o con leche. Las muestras se hidrataron mediante agitación vigorosa y luego se dejaron en reposo para alcanzar el equilibrio previo a la medición; no se observó formación de precipitado en ninguna de las fracciones. En los ensayos de flujo se observó capacidad viscosante especialmente en presencia de Ca^{+2} o leche. En los ensayos dinámicos realizados en condiciones de viscoelasticidad lineal, se observaron valores de G' inferiores a los de G'' en los sistemas acuosos y, en presencia de Ca^{+2} o de leche, el comportamiento fue más complejo.

3.4.1. Ensayos de flujo

Los reogramas de los sistemas estudiados, mostraron claramente que la dependencia del esfuerzo cortante con el aumento de la velocidad de deformación, se correspondía con la de un fluido pseudoplástico, es decir, la viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de deformación. Por lo tanto, no tiene un valor único de viscosidad, a presión y temperatura constantes como los fluidos newtonianos. Los datos ajustaron, en general adecuadamente, al modelo de la potencia, a excepción de los sistemas SE-Leche, HP- Ca^{+2} , HP-Leche y P-Leche, los cuales fueron adecuadamente descritos por el modelo de Herschel-Bulkley. Otros modelos evaluados como el modelo de Cross y el modelo de Carreau, no produjeron ajustes significativos en ninguno de los sistemas, por lo que los resultados correspondientes no se informan.

Los valores menores a la unidad, obtenidos para el índice de pseudoplasticidad (Tablas Nro.5 a 9), se corresponden con el carácter claramente pseudoplástico de los sistemas acuosos de las fracciones extraídas a partir del CWM de calabaza. El sistema SE-Ca⁺² mostró el mayor índice de consistencia (k) y el menor valor del índice de pseudoplasticidad (n), denotando mayor carácter pseudoplástico, ya que para fluidos newtonianos n toma un valor de 1 y cuanto menor es, denota mayor pseudoplasticidad (García y col., 1980). Además, el alto valor del índice de consistencia muestra el efecto espesante de la fracción extraída con buffer (SE) en presencia de calcio.

En todos los sistemas se observó el efecto generado por la adición de leche, mostrando un poder de espesamiento diferencial debido a la interacción de las proteínas de la leche (β -lactoglobulina, caseína) con la pectina, favoreciendo la formación de complejos que imparten mayor estabilidad estructural (Leroux y col., 2003). Asimismo, el calcio de la leche contribuye al espesamiento.

La Figura Nro. 12 muestra las curvas de flujo de la fracción "A" para cada uno de los sistemas analizados. Para una misma velocidad de deformación, el esfuerzo cortante de los sistemas A-Agua y A-Ca⁺² son comparables, mientras que gráficamente se observa un esfuerzo cortante ligeramente superior en el sistema A-Leche. Con lo cual, las proteínas de la leche, afectan el comportamiento reológico del sistema, ya que producen un aumento del esfuerzo cortante del sistema A-Leche con respecto al sistema A-Agua y A-Ca⁺².

En la Tabla Nro. 5 se muestran las variaciones en los parámetros **k** y **n** para los diferentes sistemas; los valores de n y los valores de k son semejantes para los sistema A-Agua y A-Ca⁺².

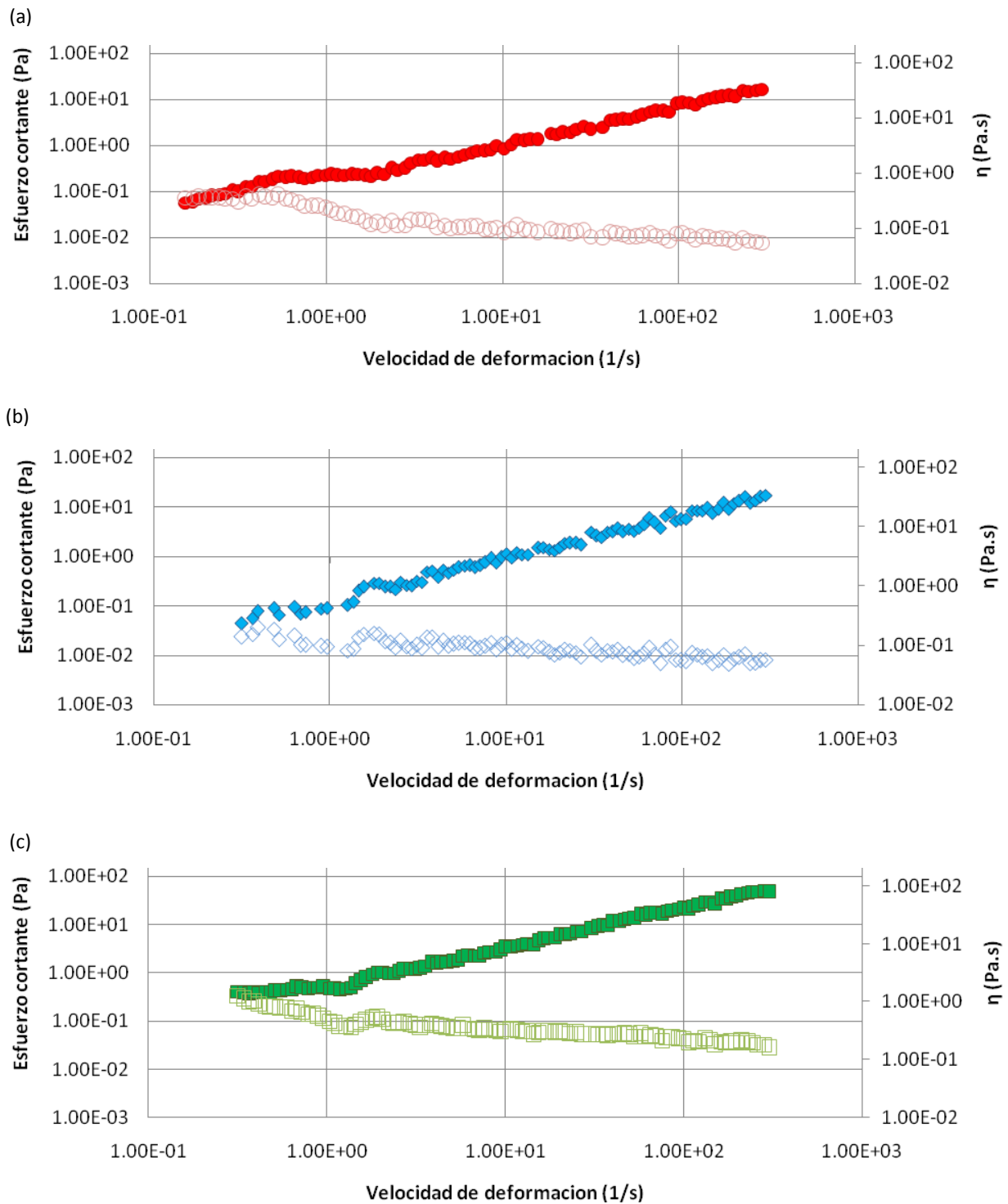


Figura Nro.12. Curvas de flujo obtenidas experimentalmente a 25°C del producto enriquecido en pectina en la fracción "A" para los sistemas: (a) A-Agua (● Esfuerzo cortante; ○ Viscosidad); (b) A-Ca²⁺ (◆ Esfuerzo cortante; ◇ Viscosidad); (c) A-Leche (■ Esfuerzo cortante; □ Viscosidad)

Para el sistema A-Leche el índice de consistencia es ligeramente superior, ajustando con un coeficiente de determinación, R^2 , del orden de 0,99. Para A-Agua, el ajuste arrojó un valor de índice de consistencia (k) de $0,15 \pm 0,01 \text{ Pa s}^n$ y un índice de pseudoplasticidad (n) de $0,83 \pm 0,01$, para un R^2 de 0,9913. Cuando se agregó calcio (A- Ca^{+2}), el ajuste arrojó un valor de índice de consistencia (k) de $0,13 \pm 0,02 \text{ Pa s}^n$ y un índice de pseudoplasticidad (n) de $0,85 \pm 0,03$, para un R^2 de 0,9714. Para A-Leche, el ajuste arrojó un mayor valor de índice de consistencia ($0,57 \pm 0,03 \text{ Pa s}^n$) y un índice de pseudoplasticidad (n) de $0,80 \pm 0,01$, para un R^2 de 0,9936.

A modo comparativo, se calculó la viscosidad aparente de los distintos sistemas de la fracción “A” a 20 s^{-1} . Se observaron valores de $0,0912 \pm 0,0006 \text{ Pa s}$ para A-Agua, $0,085 \pm 0,001 \text{ Pa s}$ para A- Ca^{+2} y de $0,310 \pm 0,002 \text{ Pa s}$ para A-Leche.

Tabla Nro. 5. Viscosidad aparente y parámetros del modelo de ajuste calculados tras ajustar los datos experimentales de flujo (25°C) de los sistemas estudiados (2,00 % p/v) de la fracción “A”.¹

	A-Agua	A- Ca^{+2}	A-Leche
	Ley de Potencia	Ley de Potencia	Ley de Potencia
$k (\text{Pa s}^n)$	$0,15 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,03$
n	$0,83 \pm 0,01$	$0,85 \pm 0,03$	$0,80 \pm 0,01$
R^2	0,9913	0,9714	0,9936
Viscosidad Aparente (25°C , 20 s^{-1}) (Pa s)	$0,0912 \pm 0,0006$	$0,085 \pm 0,001$	$0,310 \pm 0,002$

¹ Se muestra la media \pm error estándar.

k : índice de consistencia.

n : índice de pseudoplasticidad.

R^2 : bondad del ajuste (α : 0,05).

La fracción “A” estaba compuesta, básicamente, por $\approx 56 \%$ de GalA con alto grado de metilación ($> 50 \%$), así como por un alto contenido de azúcares neutros ($\approx 34 \%$) y bajo contenido de almidón. El alto contenido de azúcares neutros y/o el alto DM, determinarían la pobre capacidad espesante de esta fracción para los sistemas A-agua y A- Ca^{+2} . El alto DM de esta fracción determinó que ella fuera poco sensible al apantallamiento de sus cargas por el

calcio. La presencia de leche (A-Leche) determinó un aumento de la consistencia probablemente por la interacción de la proteína de la leche con la pectina, pero la misma se vería parcialmente afectada por el alto contenido de azúcares neutros de la pectina (alto nivel de ramificaciones) lo cual afectaría los resultados, determinando un menor espesamiento que en otras fracciones descriptas más adelante.

La Figura Nro. 13 muestra las curvas de flujo de la fracción "SE" para cada uno de los sistemas analizados. Para una misma velocidad de deformación, el esfuerzo cortante del sistema SE-Ca⁺² y SE-Leche tomaron valores comparables, mientras que el menor esfuerzo cortante correspondió al sistema SE-Agua, el cual, a bajas-medias velocidades de deformación, disminuyó en un orden de magnitud en relación a los sistemas con calcio o leche. La fracción "SE", por poseer un DM ligeramente menor a 50 %, fue más sensible a la adición de Ca⁺² que la fracción "A". Esto se evidenció en un aumento del esfuerzo cortante para los sistemas SE-Ca⁺² y SE-Leche con respecto al sistema SE-Agua.

En la Tabla Nro. 6 se muestran los parámetros **k** y **n** para los diferentes sistemas. Los datos experimentales de los sistemas SE-Agua y SE-Ca⁺², se ajustaron a la ley de la potencia con un coeficiente de determinación, R², superior a 0,990. El sistema SE-Leche se ajustó con R² mayor que 0,9900 a la ley de Herschel-Bulkley. Se observa que el sistema SE-Agua arrojó un valor de índice de consistencia (k) de $1,44 \pm 0,07 \text{ Pa s}^n$, con un índice de pseudoplasticidad (n) de $0,661 \pm 0,009$ con un R² de 0,9922. En cuanto al sistema SE-Ca⁺², se obtuvo un índice de consistencia (k) de $20,6 \pm 0,2 \text{ Pa s}^n$ con un índice de pseudoplasticidad (n) de $0,328 \pm 0,002$ y un R² de 0,9967.

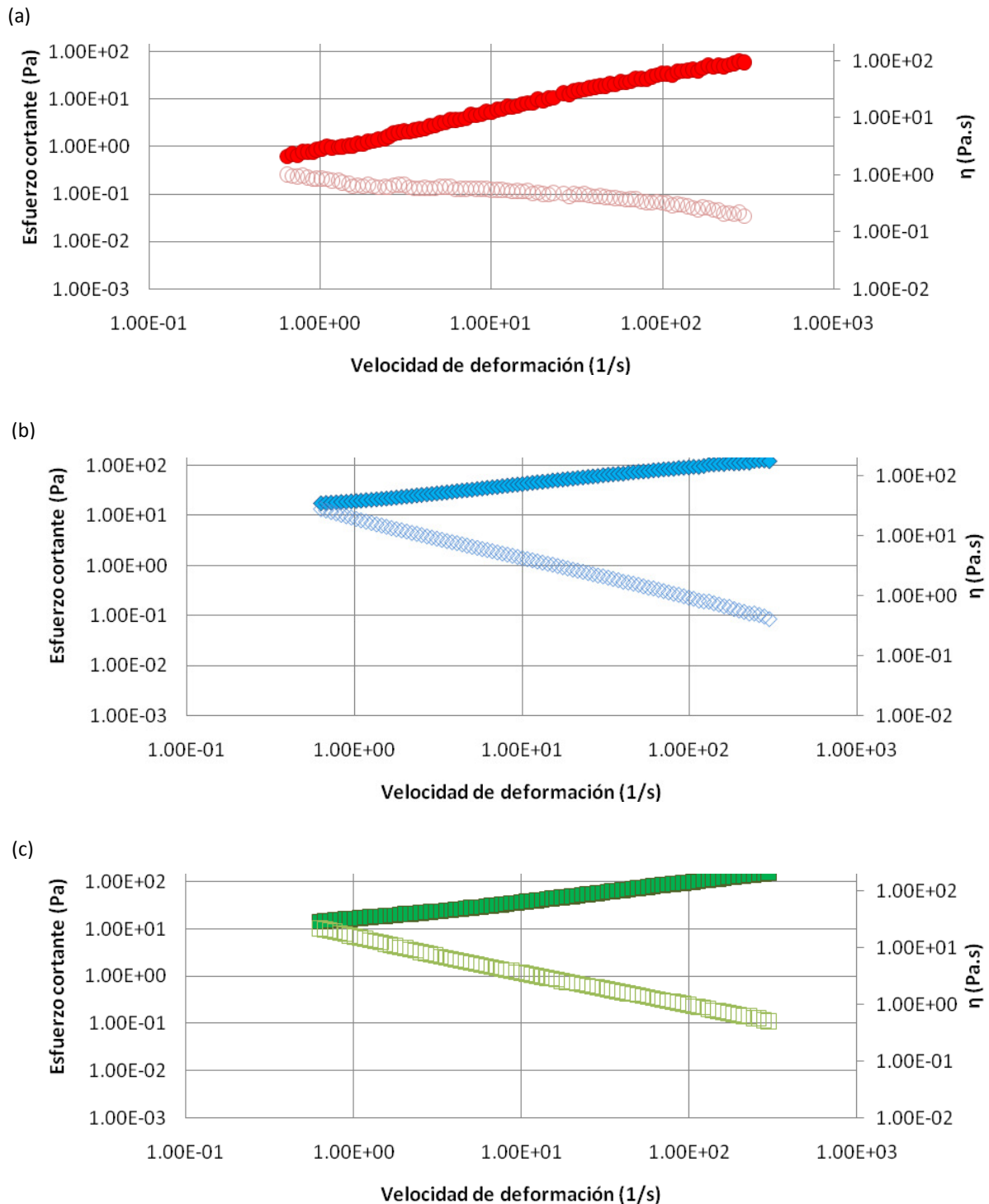


Figura Nro.13. Curvas de flujo obtenidas experimentalmente a 25°C del producto enriquecido en pectina en la fracción "SE" para los sistemas: (a) SE-Agua (● Esfuerzo cortante; ○ Viscosidad); (b) SE-Ca⁺² (◆ Esfuerzo cortante; ◇ Viscosidad); (c) SE-Leche (■ Esfuerzo cortante; □ Viscosidad).

En el caso del sistema SE-Leche, se observó un esfuerzo mínimo de corte, arrojando valores de $\tau_0 = 3,0 \pm 0,5$ Pa, índice de consistencia (k) de $12,4 \pm 0,3$ Pa sⁿ e índice de pseudoplasticidad (n) de $0,439 \pm 0,004$, con R² de 0,9993. A partir de estos valores, podemos decir que el sistema SE-Ca⁺² tiene un mayor carácter pseudoplástico que los demás sistemas debido a su menor valor de n. El índice de consistencia de los sistemas SE-Ca⁺² y SE-Leche aumentó en un orden de magnitud en relación al sistema SE-Agua.

Tabla Nro. 6. Viscosidad aparente y parámetros del modelo de ajuste calculados tras ajustar los datos experimentales de flujo (25°C) de los sistemas estudiados (2,00 % p/v) de la fracción "SE".¹

	SE-Agua	SE-Ca ⁺²	SE-Leche
	Ley de Potencia	Ley de Potencia	Herschel-Bulkley
τ_0 (Pa)	-	-	$3,0 \pm 0,5$
k (Pa. s ⁿ)	$1,44 \pm 0,07$	$20,6 \pm 0,2$	$12,4 \pm 0,3$
n	$0,661 \pm 0,009$	$0,328 \pm 0,002$	$0,439 \pm 0,004$
R ²	0,9922	0,9967	0,9993
Viscosidad Aparente (25°C, 20 s ⁻¹) (Pa s)	$0,521 \pm 0,004$	$2,74 \pm 0,01$	$2,47 \pm 0,04$

¹ Se muestra la media \pm error estándar.

τ_0 : esfuerzo de corte mínimo.

k: índice de consistencia.

n: índice de pseudoplasticidad.

R²: bondad del ajuste (α : 0,05).

Los valores de viscosidad aparente a 20 s⁻¹ fueron de $0,521 \pm 0,004$ Pa s para el sistema SE-Agua, $2,74 \pm 0,01$ Pa s para el sistema SE-Ca⁺² y de $2,47 \pm 0,04$ Pa s para SE-Leche. Fissore y col. (2007), reportaron valores de viscosidad aparente a 20 s⁻¹ de 1,33 Pa s, para una fracción de fibra soluble aislada de calabaza con solución buffer. Esto muestra que los sistemas con Ca⁺² y leche presentaron el mayor poder de espesamiento, mientras que el sistema SE-Agua, presentó un más débil efecto espesante.

La fracción "SE" está constituida, básicamente, por ≈ 46 % de GalA, bajo contenido de azúcares neutros (≈ 7 %) y bajo contenido de almidón. Se puede atribuir el efecto espesante a la

estructura tridimensional de la molécula de pectina en el sistema acuoso, ya que por haber menor concentración de azúcares neutros, o sea menos ramificaciones, la molécula péctica podría organizarse espacialmente de manera más favorable dando lugar a un sistema macromolecular pectina – agua más consistente. En el caso del sistema SE-Ca⁺², se destaca el incremento de la viscosidad con el agregado de calcio, que podría deberse a la influencia del mismo, apantallando cargas y modificando la fuerza iónica del sistema. Ello determinaría una mayor expansión espacial de la molécula de pectina, permitiendo desarrollar sistemas con incremento de la consistencia. Para el sistema SE-Leche, se presentarían dos efectos, el propio del calcio ya mencionado y la interacción de la pectina con caseína y β -lactoglobulina; esto determinaría el complejamiento de las proteínas con las pectinas lo cual provocaría la aparición de un valor umbral y un descenso del índice de consistencia.

La Figura Nro. 14 muestra el comportamiento característico de un fluido pseudoplástico para la fracción “H” en cada uno de los sistemas analizados. Al estudiar los distintos reogramas, para una misma velocidad de deformación, el esfuerzo cortante del sistema H-Leche toma valores ligeramente superiores al sistema H-Ca⁺², mientras que el menor esfuerzo cortante correspondió al sistema H-Agua.

En la Tabla Nro. 7 se muestran las variaciones en los valores de **k** y **n** para los diferentes sistemas. En todos los casos los estimados de los parámetros k y n, ajustaron con un coeficiente de determinación, R² superiores a 0,990 a la ley de la potencia. Se observa que el sistema H-Agua arrojó un valor de índice de consistencia (k) de $0,38 \pm 0,03 \text{ Pa s}^n$ con un índice de pseudoplasticidad (n) de $0,77 \pm 0,01$ con un ajuste R² de 0,9906.

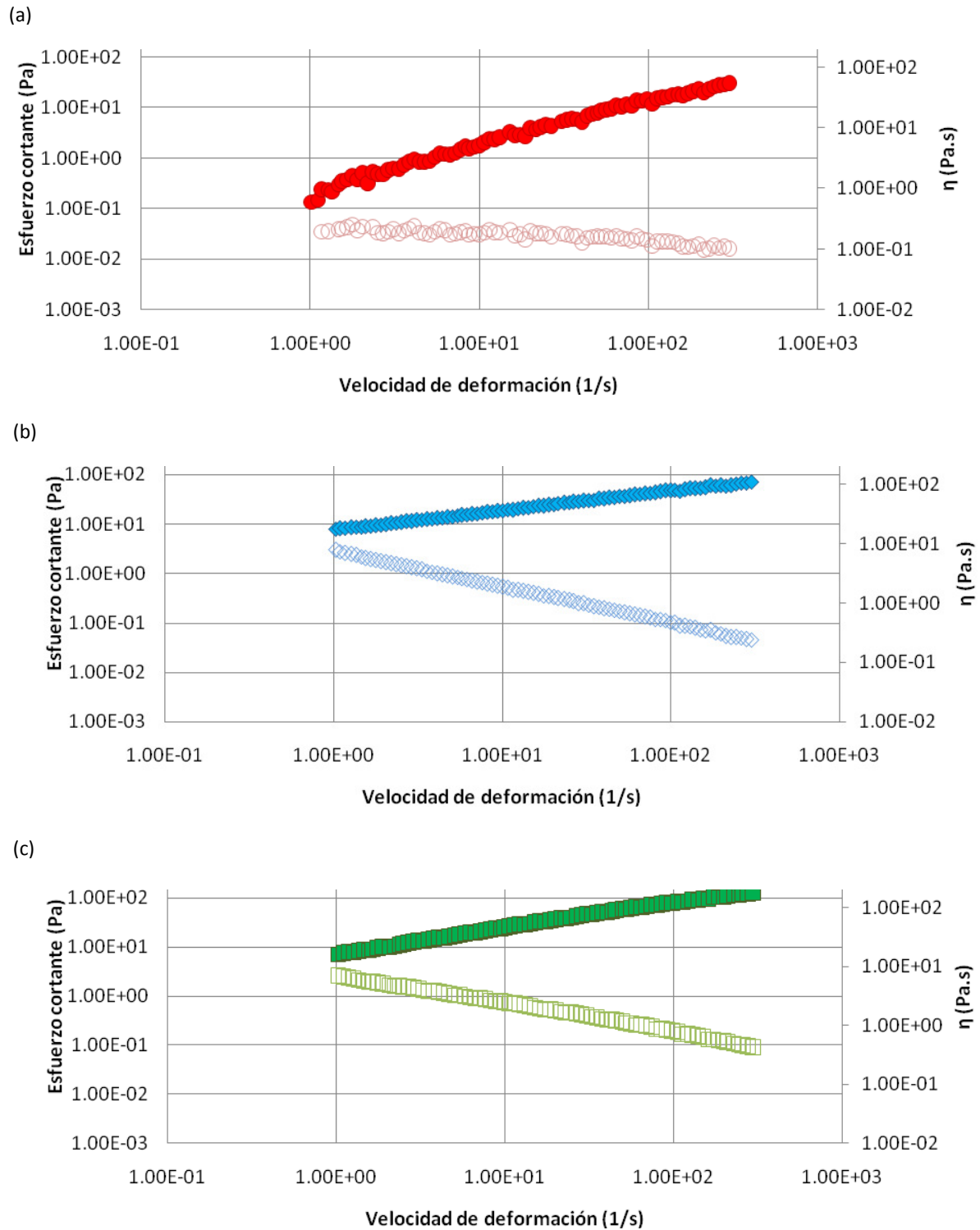


Figura Nro.14. Curvas de flujo obtenidas experimentalmente a 25°C del producto enriquecido en pectina en la fracción "H" para los sistemas: (a) H-Agua (● Esfuerzo cortante; ○ Viscosidad); (b) H-Ca⁺² (◆ Esfuerzo cortante; ◇ Viscosidad); (c) H-Leche (■ Esfuerzo cortante; □ Viscosidad)

En cuanto al sistema H-Ca⁺², se obtuvo un índice de consistencia (k) de $7,87 \pm 0,09 \text{ Pa s}^n$ con un índice de pseudoplasticidad (n) de $0,387 \pm 0,002$ con un R² de 0,9978.

Tabla Nro. 7. Viscosidad aparente y parámetros del modelo de ajuste calculados tras ajustar los datos experimentales de flujo (25°C) de los sistemas estudiados (2,00 % p/v) de la fracción "H".¹

	H-Agua	H-Ca ⁺²	H-Leche
	Ley de Potencia	Ley de Potencia	Ley de Potencia
k (Pa s ⁿ)	0,38 ± 0,03	7,87 ± 0,09	8,4 ± 0,1
n	0,77 ± 0,01	0,387 ± 0,002	0,479 ± 0,004
R ²	0,9906	0,9978	0,9974
Viscosidad Aparente (25°C, 20 s ⁻¹) (Pa s)	0,190 ± 0,001	1,252 ± 0,004	1,767 ± 0,007

¹ Se muestra la media ± error estándar.

k: índice de consistencia.

n: índice de pseudoplasticidad.

R²: bondad del ajuste (α : 0,05).

El sistema H-Leche arrojó un valor de índice de consistencia (k) de $8,4 \pm 0,1 \text{ Pa s}^n$ y un índice de pseudoplasticidad (n) de $0,479 \pm 0,004$, para un R² de 0,9974. A partir de estos valores, podemos decir que el sistema H-Ca⁺² tiene un mayor carácter pseudoplástico que los demás sistemas debido a su menor valor de n. El índice de consistencia para los sistemas H-Ca⁺² y H-Leche aumentó en un orden en relación al sistema H-Agua. Los valores de viscosidad aparente a 20 s⁻¹ son de $0,190 \pm 0,001 \text{ Pa s}$ para el sistema H-Agua, $1,252 \pm 0,004 \text{ Pa s}$ para el sistema H-Ca⁺² y de $1,767 \pm 0,007 \text{ Pa s}$ para H-Leche. Esto muestra un menor poder de espesamiento para el sistema H-Agua, siendo el sistema H-Leche el de mayor poder de espesamiento.

La fracción "H" está constituida, básicamente, por $\approx 40 \%$ de GalA, el más alto contenido de azúcares neutros ($\approx 25 \%$) y el más alto contenido de almidón ($\approx 25 \%$) observado en las fracciones extraídas enzimáticamente. Entre las fracciones aisladas mediante digestión enzimática, "H" es la que presenta la mayor concentración de azúcares neutros y por tanto más

ramificaciones, lo que determinaría mayores dificultades estéricas para organizarse en el espacio y ello podría afectar su capacidad espesante junto con su alto contenido en almidón.

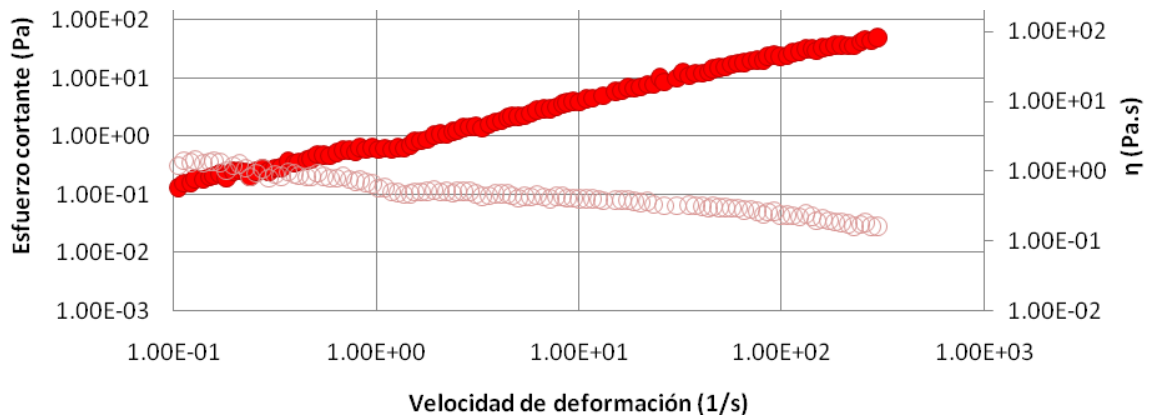
Es importante recordar que el calcio produce apantallamiento de cargas y modificaciones de la fuerza iónica. Por lo tanto, su presencia en el sistema H-Ca⁺² y H-Leche contribuiría al aumento de consistencia de estos sistemas respecto al sistema H-Agua. En el caso particular del sistema H-Leche, hay un aporte adicional de proteínas las cuales interactúan con las pectinas; sin embargo, no se observan grandes diferencias entre este sistema y el sistema H-Ca⁺² lo cual podría deberse a que la presencia de ramificaciones en el polisacárido péctico dificultaría la interacción con la caseína y la β -lactoglobulina.

Los valores que toma la viscosidad aparente a 20 s⁻¹ para los sistemas H-Ca⁺² y H-Leche son mayores al sistema H-Agua, confirmando el efecto de la presencia de iones de Ca⁺² y de proteína de la leche.

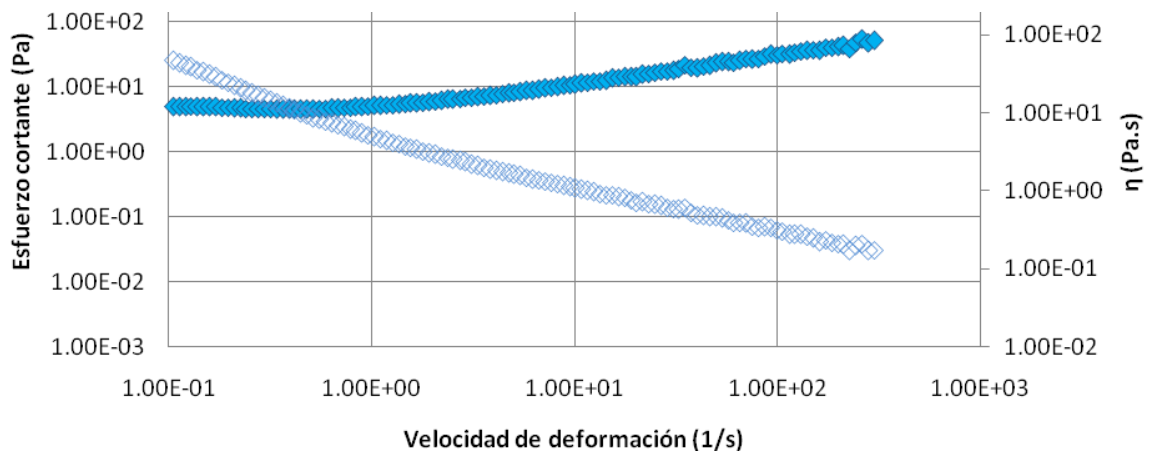
La Figura Nro. 15 muestra las curvas de flujo de la fracción “HP” para cada uno de los sistemas analizados. Al comparar los reogramas correspondientes a los distintos sistemas, la fracción “HP”, por poseer un DM ligeramente menor a 50 %, se vio afectada por la adición de Ca⁺². Esto determinó un aumento del esfuerzo cortante en los sistemas HP-Ca⁺² y HP-Leche con respecto al sistema HP-Agua; es de destacar que, además, el sistema HP-Leche realizó un aporte de proteínas.

La Tabla Nro. 8 muestra los resultados experimentales del esfuerzo cortante y de la velocidad de deformación obtenidos para los sistemas analizados. Los sistemas HP-Ca⁺² y HP-Leche presentaron esfuerzo mínimo de corte al ajustar los datos experimentales al modelo de Herschel-Bulkley.

(a)



(b)



(c)

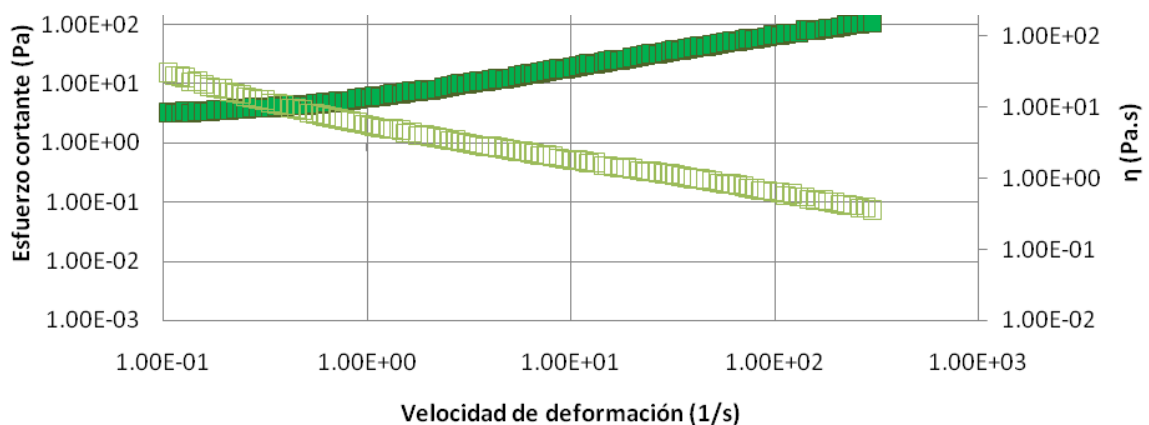


Figura Nro.15. Curvas de flujo obtenidas experimentalmente a 25°C del producto enriquecido en pectina en la fracción “HP” para los sistemas: (a) HP-Agua (● Esfuerzo cortante; ○ Viscosidad); (b) HP-Ca²⁺ (◆ Esfuerzo cortante; ◇ Viscosidad); (c) HP-Leche (■ Esfuerzo cortante; □ Viscosidad).

Los valores de k y n para los diferentes sistemas ajustaron con un coeficiente de determinación, R^2 , superior a 0,990. La fracción HP-Agua mostró un valor de índice de consistencia (k) de $1,02 \pm 0,04$ Pa sⁿ con un índice de pseudoplasticidad (n) de $0,678 \pm 0,008$ con un ajuste R^2 de 0,9945. Para el sistema HP-Ca⁺² se observó $\tau_0 = 3,2 \pm 0,2$ Pa, índice de consistencia (k) de $2,4 \pm 0,1$ Pa sⁿ e índice de pseudoplasticidad (n) de $0,53 \pm 0,01$ con un R^2 de 0,9925. Para el sistema HP-Leche, $\tau_0 = 0,4 \pm 0,2$ Pa, índice de consistencia (k) de $5,6 \pm 0,1$ Pa sⁿ e índice de pseudoplasticidad (n) de $0,523 \pm 0,004$ con R^2 de 0,9987. Los valores de viscosidad aparente a 20 s⁻¹ fueron de $0,388 \pm 0,002$ Pa s para el sistema HP-Agua, $0,74 \pm 0,02$ Pa s para el sistema HP-Ca⁺² y de $1,35 \pm 0,02$ Pa s para HP-Leche. Esto muestra menor poder de espesamiento para el sistema H-Agua, siendo el sistema con leche el de mayor poder de espesamiento. Las tendencias observadas se deberían a la presencia de calcio (HP-Ca⁺² y HP-Leche) y de proteínas (HP-Leche) como se explicó anteriormente.

Tabla Nro. 8. Viscosidad aparente y parámetros del modelo de ajuste calculados tras ajustar los datos experimentales de flujo (25°C) de los sistemas estudiados (2,00 % p/v) de la fracción "HP".¹

	HP-Agua	HP-Ca ⁺²	HP-Leche
	Ley de Potencia	Herschel-Bulkley	Herschel-Bulkley
τ_0 (Pa)	-	$3,2 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$
k (Pa s ⁿ)	$1,02 \pm 0,04$	$2,4 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,1$
n	$0,678 \pm 0,008$	$0,53 \pm 0,01$	$0,523 \pm 0,004$
R^2	0,9945	0,9925	0,9987
Viscosidad Aparente (25°C, 20 s ⁻¹) (Pa s)	$0,388 \pm 0,002$	$0,74 \pm 0,02$	$1,35 \pm 0,02$

¹ Se muestra la media \pm error estándar.

τ_0 : esfuerzo de corte mínimo.

k : índice de consistencia.

n : índice de pseudoplasticidad.

R^2 : bondad del ajuste (α : 0,05).

La Figura Nro. 16 muestra las curvas de flujo de la fracción "P" para cada uno de los sistemas analizados.

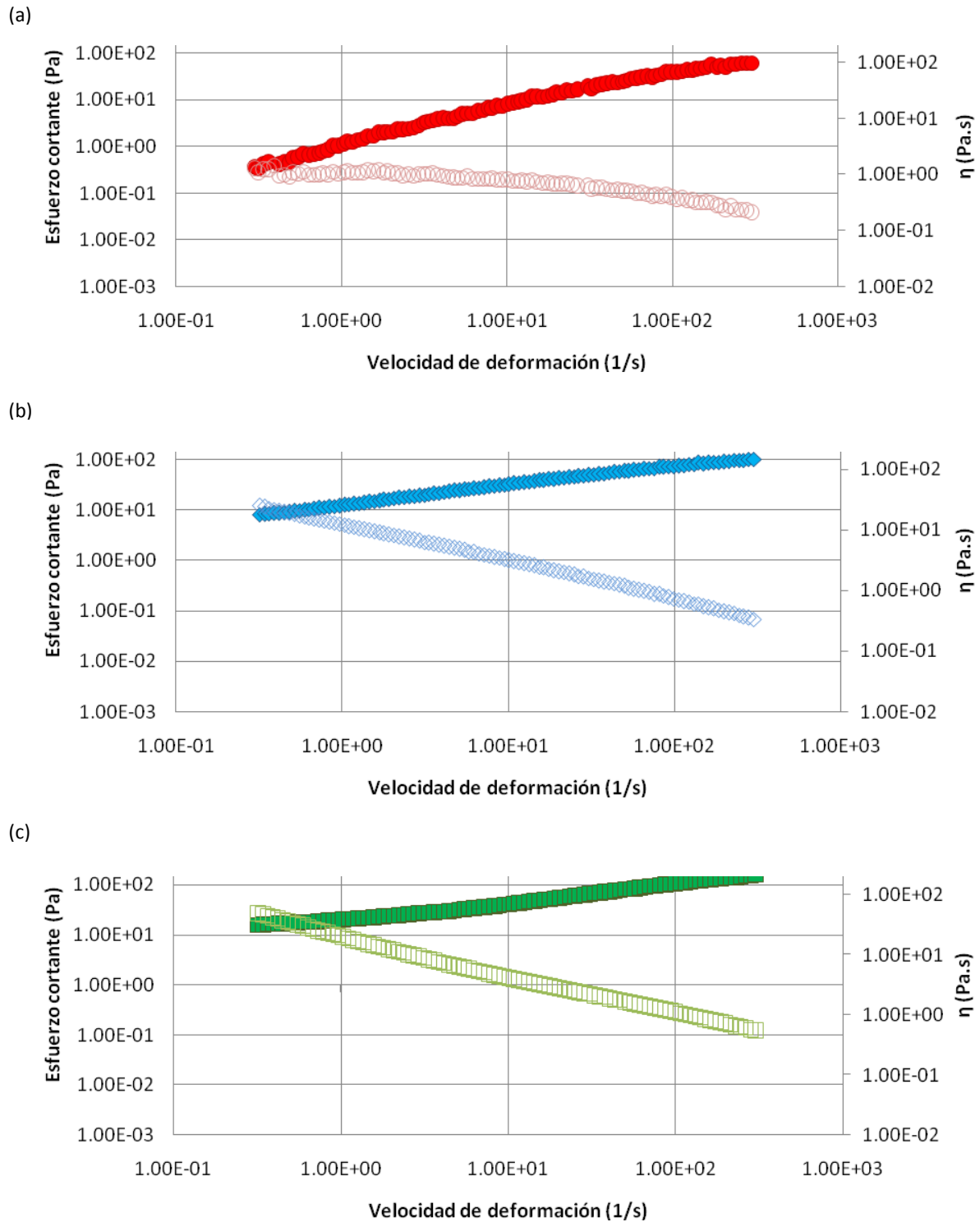


Figura Nro. 16. Curvas de flujo obtenidas experimentalmente a 25°C del producto enriquecido en pectina en la fracción "P" para los sistemas: (a) P-Agua (● Esfuerzo cortante; ○ Viscosidad); (b) P-Ca⁺² (◆ Esfuerzo cortante; ◇ Viscosidad); (c) P-Leche (■ Esfuerzo cortante; □ Viscosidad).

Al estudiar los distintos reogramas, a una misma velocidad de deformación, los esfuerzos cortantes del sistema P-Ca⁺² y P-Leche tomaron valores comparables, y el menor esfuerzo cortante correspondió al sistema P-Agua.

El comportamiento reológico de la fracción “P” (DM = 50,74 %) se vio afectado por la adición de Ca⁺². Probablemente el apantallamiento de cargas de esta fracción y el cambio de fuerza iónica hayan sido los responsables de esta tendencia. MacDougall y col. (1996), observaron que pectinas extraídas de la pared celular con alto grado de metilación eran sensibles a la presencia de calcio. La fuerza de interacción en pectinas de alto metoxilo se ve afectada por la adición de calcio, pudiendo jugar un rol importante en su reología de acuerdo a Neidhart y col. (1996), Löfgren y col. (2005) y Yang y col. (2013).

La Tabla Nro. 9 muestra los valores de **k** y **n** para los diferentes sistemas, los cuales ajustaron con un coeficiente de determinación, R², superior a 0,990. La fracción P-Agua mostró un valor de índice de consistencia (k) de 2,4 ± 0,1 Pa sⁿ con un índice de pseudoplasticidad (n) de 0,591 ± 0,009 y un ajuste R² de 0,9901. El sistema P-Ca⁺² mostró un índice de consistencia (k) de 14,1 ± 0,2 Pa sⁿ con un índice de pseudoplasticidad (n) de 0,354 ± 0,003 con un R² de 0,9956.

Tabla Nro. 9. Viscosidad aparente y parámetros del modelo de ajuste calculados tras ajustar los datos experimentales de flujo (25°C) de los sistemas estudiados (2,00 % p/v) de la fracción “P”.¹

	“P” + Agua	“P” + Ca ⁺²	“P” + Leche
	Ley de Potencia	Ley de Potencia	Herschel-Bulkley
τ ₀ (Pa)	-	-	4,9 ± 0,7
k (Pa s ⁿ)	2,40 ± 0,1	14,1 ± 0,2	14,6 ± 0,5
n	0,591 ± 0,009	0,354 ± 0,003	0,423 ± 0,006
R ²	0,9901	0,9956	0,9982
Viscosidad Aparente (25°C, 20 s ⁻¹) (Pa s)	0,697 ± 0,006	2,04 ± 0,01	2,84 ± 0,06

¹ Se muestra la media ± error estándar.

τ₀: esfuerzo de corte mínimo.

k: índice de consistencia.

n: índice de pseudoplasticidad.

R²: bondad del ajuste (α: 0,05).

El ajuste con la ecuación de Herschel-Bulkley para el sistema P-Leche, mostró un esfuerzo mínimo de corte, con valores de $4,9 \pm 0,7$ Pa, índice de consistencia (k) de $14,6 \pm 0,5$ Pa sⁿ e índice de pseudoplasticidad (n) de $0,423 \pm 0,006$ y R² de 0,9982.

A partir de estos valores, podemos decir que el índice de consistencia de los sistemas P-Ca⁺² y P-Leche es mucho mayor que el del sistema P-Agua. Los valores de viscosidad aparente a 20 s⁻¹ son de $0,697 \pm 0,006$ Pa s para el sistema P-Agua, $2,04 \pm 0,01$ Pa s para el sistema P-Ca⁺² y de $2,84 \pm 0,06$ Pa s para P-Leche. Esto muestra un menor poder de espesamiento para el sistema P-Agua, siendo el sistema con leche el de mayor poder de espesamiento.

La fracción “P” está constituida, básicamente, por ≈ 56 % GalA, 18 % de azúcares neutros y el más bajo contenido de almidón obtenido en las extracciones enzimáticas, por lo que, además del efecto del calcio, esta fracción, al tener menos ramificaciones (menos azúcares neutros) ve favorecida su interacción con las proteínas de la leche, lo cual sería responsable de la aparición del valor umbral en el sistema P-Leche.

La Tabla Nro.10 muestra la viscosidad aparente (25 °C, 20 s⁻¹) (Pa s) de todos los sistemas analizados. Fissore y col. (2009) estudiaron el comportamiento de flujo de un sistema acuoso con un 2 % (p/v) de fracción rica en pectina aislada de calabaza a 30 °C y 20 h y obtuvieron una viscosidad de 3,5 Pa s con la muestra aislada sin enzimas y 0,56 Pa s para la muestra aislada utilizando hemicelulasa, tendencia semejante a la observada en dicha tabla. La viscosidad de los sistemas generados a partir de las fracciones “H” y “HP” es más baja que en los sistemas generados a partir de las fracciones “SE” y “P”; esto podría ser atribuido al efecto del almidón, ya que el elevado contenido del mismo actuaría como una impureza afectando la actividad espesante de la pectina.

Tabla Nro. 10. Viscosidad aparente (25°C, 20 s⁻¹) (Pa s) de los sistemas analizados ^{1,2}

Sistema analizado	Acuoso	Acuoso con Calcio	Con Leche Entera
A	0,0912 ± 0,0006	0,085 ± 0,001	0,310 ± 0,002
H	0,190 ± 0,001	1,252 ± 0,004	1,767 ± 0,007
P	0,697 ± 0,006	2,04 ± 0,01	2,84 ± 0,06 ³
HP	0,388 ± 0,002	0,74 ± 0,02 ³	1,35 ± 0,02 ³
SE	0,521 ± 0,004	2,74 ± 0,01	2,47 ± 0,04 ³

¹ Se muestra la media ± error estándar.

² Expresado como Pa s en el sistema estudiado.

³ Sistemas ajustados con la ecuación de Herschel-Bulkley

La presencia del esfuerzo mínimo de corte en los sistema con calcio y/o leche generados a partir de las fracciones “SE”, “H” y “HP”, muestra la potencialidad de usar estas fracciones con fines tecnológicos específicos.

3.4.2. Ensayos dinámicos

Bajo condiciones de deformación oscilatoria en el régimen viscoelástico lineal, se realizó la caracterización reológica de los sistemas estudiados. Los espectros mecánicos de los sistemas se pueden observar en las Figuras Nro. 17 a 21. En los sistemas acuosos, para todas las fracciones extraídas, la componente viscosa predominó en todo el barrido de frecuencia, o sea, $G'' > G'$, mostrando un comportamiento típico de soluciones hidrocoloidales dependiente de la frecuencia (Lapasin y col., 1995). La presencia de calcio o leche para la fracción A no modificó el comportamiento. Mientras que en los sistemas con calcio o con leche de las restantes fracciones, los valores de G' y G'' se superpusieron o G' fue ligeramente superior a G'' a bajas

frecuencias. Hietala y col. (2007), observaron que, a determinadas concentraciones de polímero en solución acuosa, G' es del orden de G'' , siendo éste el comportamiento típico de algunas soluciones hidrocoloidales concentradas. En el presente trabajo, a altas frecuencias para algunos sistemas, se evidenció el predominio del módulo viscoso. Adicionalmente, todos los espectros mecánicos mostraron una deriva positiva con el aumento de la frecuencia, tanto para G' , como para G'' .

Al comparar los espectros mecánicos en la Figura Nro. 17 correspondientes a los sistemas A-Agua, A- Ca^{+2} y A-Leche, resulta evidente que, para G'' no se observa diferencia de orden de magnitud. En el sistema A-Leche, se evidencia cierta diferencia en el comportamiento del ángulo de desfasaje ($\tan \delta$), atribuible a la menor magnitud del G' .

En la Figura Nro. 18, se muestra el espectro mecánico en función de la frecuencia para los sistemas conformados con la fracción "SE". Al analizar el sistema SE- Ca^{+2} , se observa que hasta 100 s^{-1} , coincidieron G' y G'' . A altas frecuencias se evidenció un cruce de los módulos porque dichos sistema vio afectada su estructura. En el sistema SE-Leche, G' fue levemente mayor que G'' hasta el cruce. A partir de $50 - 70 \text{ s}^{-1}$ y un $G' \approx 100 \text{ Pa}$, predominó el módulo viscoso mostrando que prevalece el comportamiento líquido. Esto muestra que las interacciones de los iones de calcio y las proteínas con la molécula de pectina, fueron factor importante para el comportamiento del sistema.

En la Figura Nro. 19, se muestra el espectro mecánico en función de la frecuencia de los sistemas conformados a partir de la fracción "H". En el sistema H- Ca^{+2} , a bajas frecuencias, predominó ligeramente G' respecto a G'' ; a partir de $10 - 20 \text{ s}^{-1}$ y un $G' \approx 10 \text{ Pa}$, predominó la componente viscosa.

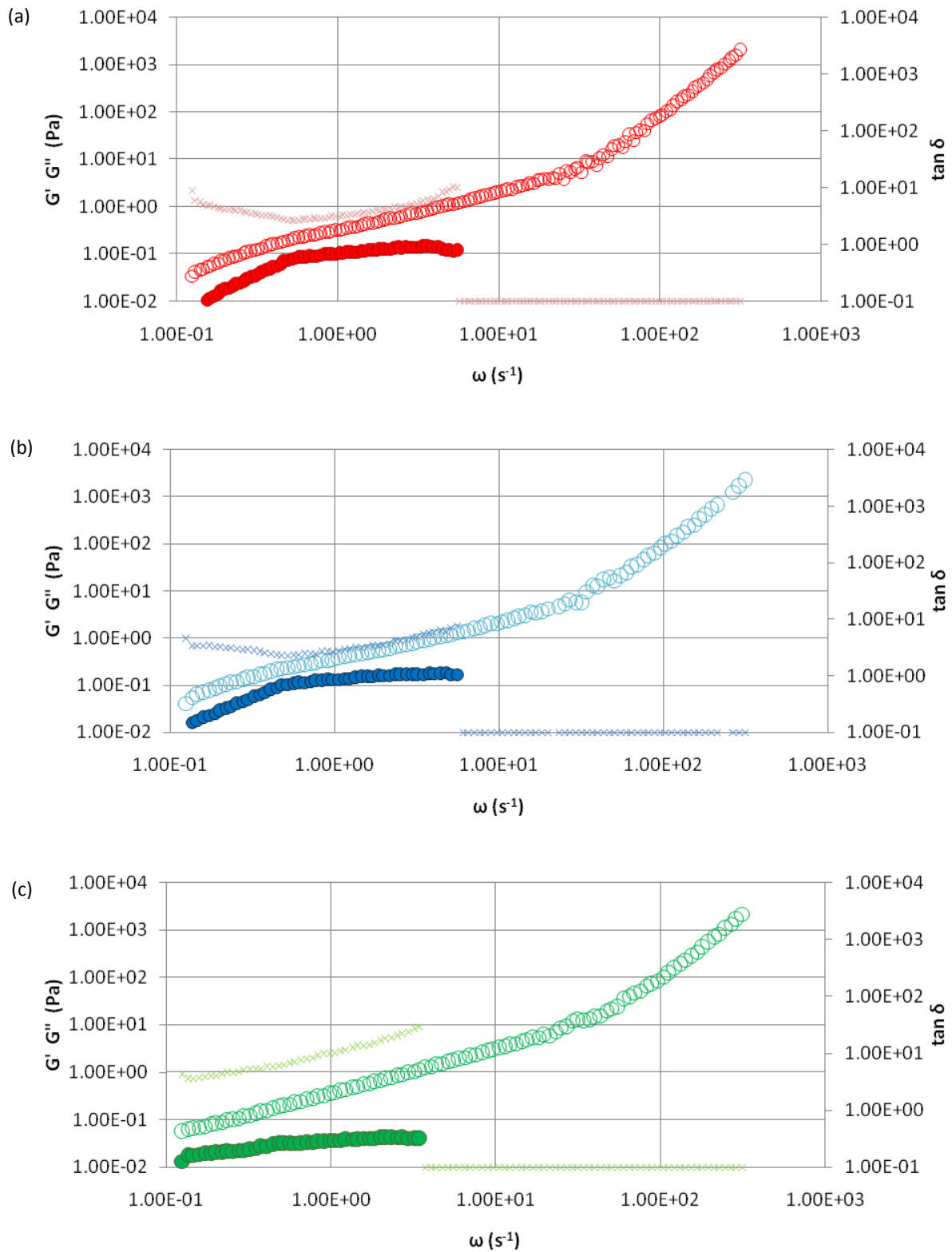


Figura Nro. 17. Espectros mecánicos a 25°C de los sistemas al 2,00% p/v de producto enriquecido en pectina aislado en la fracción "A". (a) A-Agua (● G' , ○ G'' , x $\tan \delta$); (b) A- Ca^{+2} (● G' , ○ G'' , x $\tan \delta$); (c) A-Leche (● G' , ○ G'' , x $\tan \delta$).

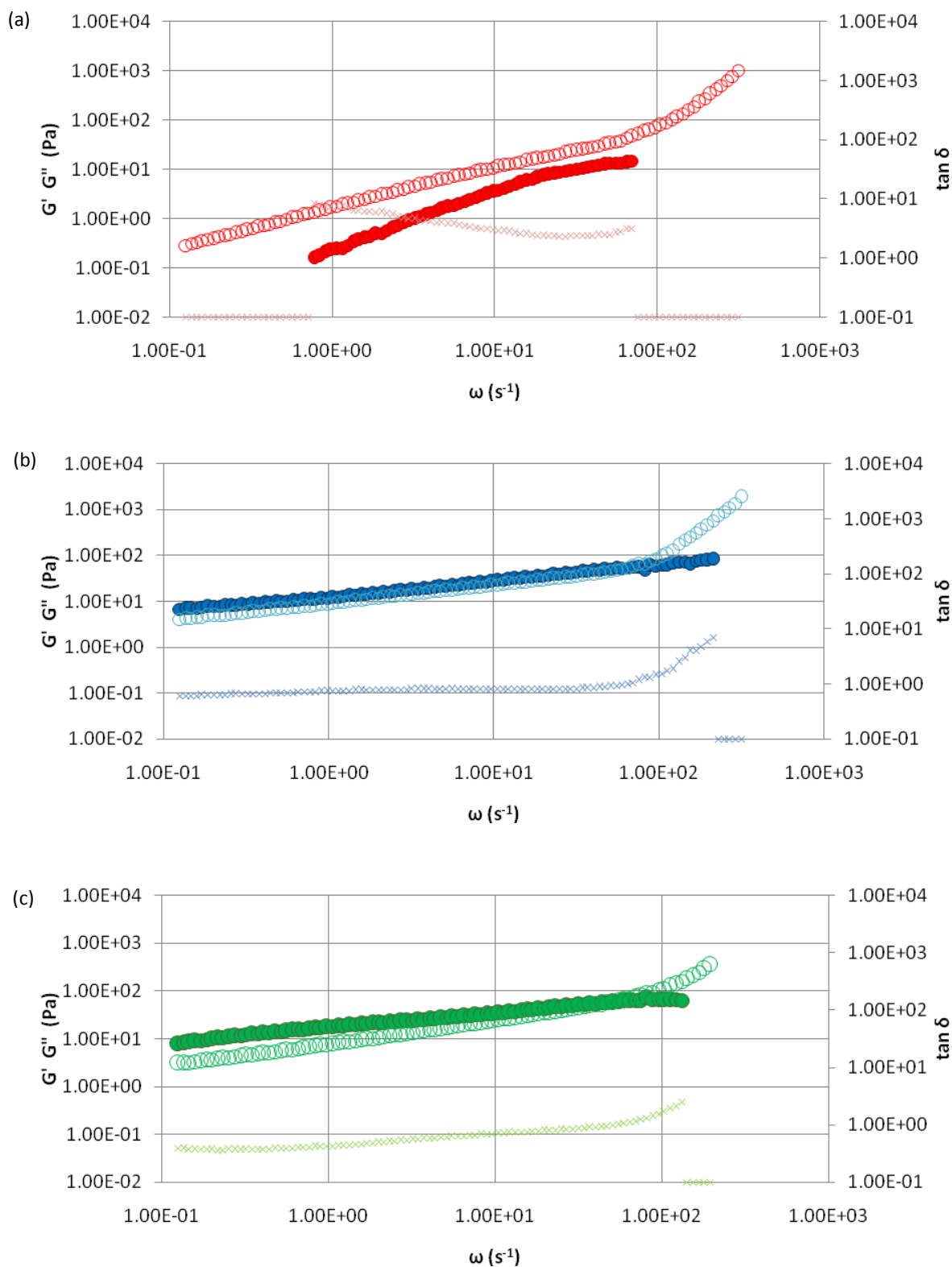


Figura Nro.18. Espectros mecánicos a 25°C de los sistemas al 2,00% p/v de producto enriquecido en pectina aislado en la fracción "SE". (a) SE-Agua (● G' , ○ G'' , × $\tan \delta$); (b) SE- Ca^{+2} (● G' , ○ G'' , × $\tan \delta$); (c) SE-Leche (● G' , ○ G'' , × $\tan \delta$).

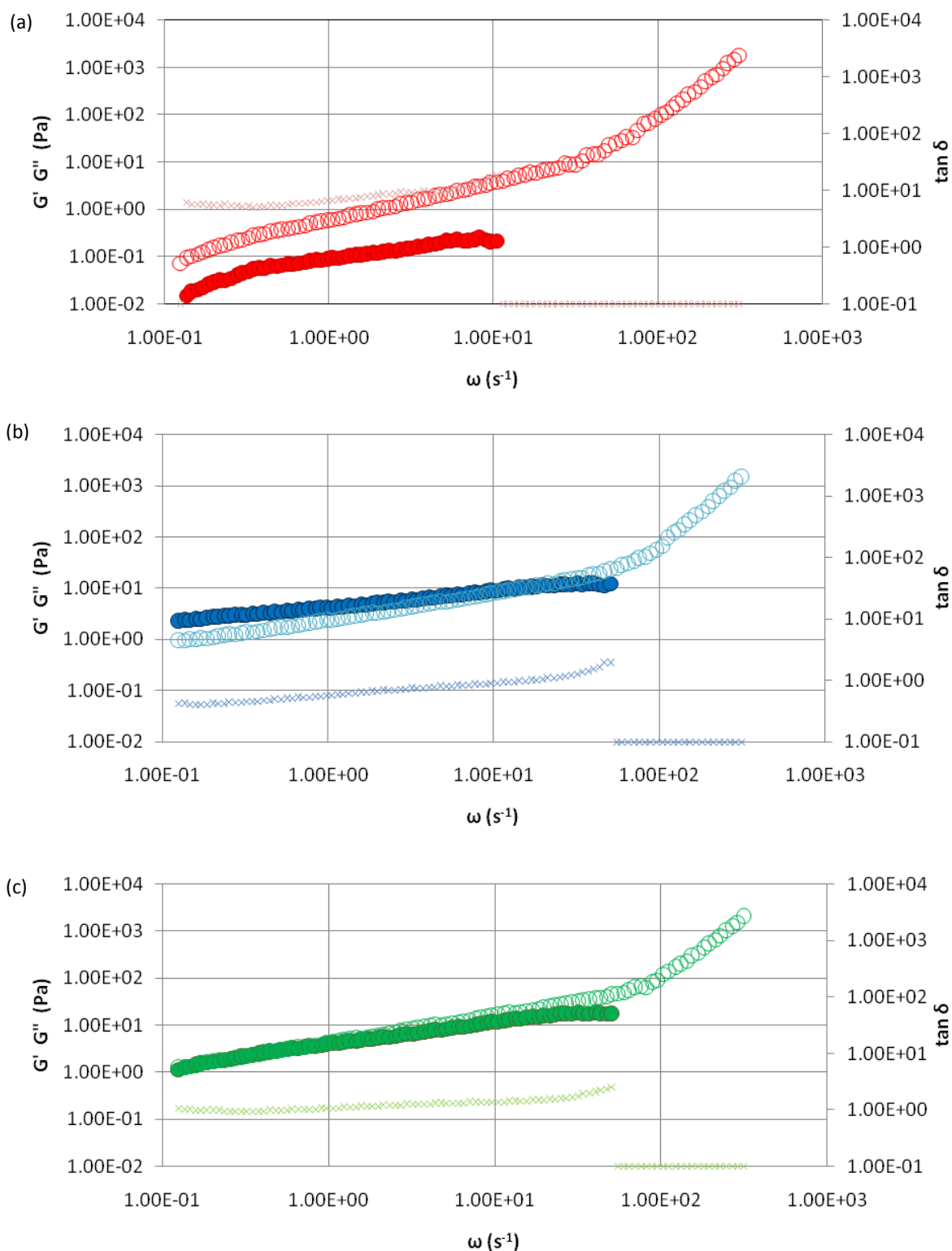


Figura Nro.19. Espectros mecánicos a 25°C de los sistemas al 2,00% p/v de producto enriquecido en pectina aislado en la fracción "H". (a) H-Agua (● G' , ○ G'' , × $\tan \delta$); (b) H-Ca²⁺ (● G' , ○ G'' , × $\tan \delta$); (c) H-Leche (● G' , ○ G'' , × $\tan \delta$).

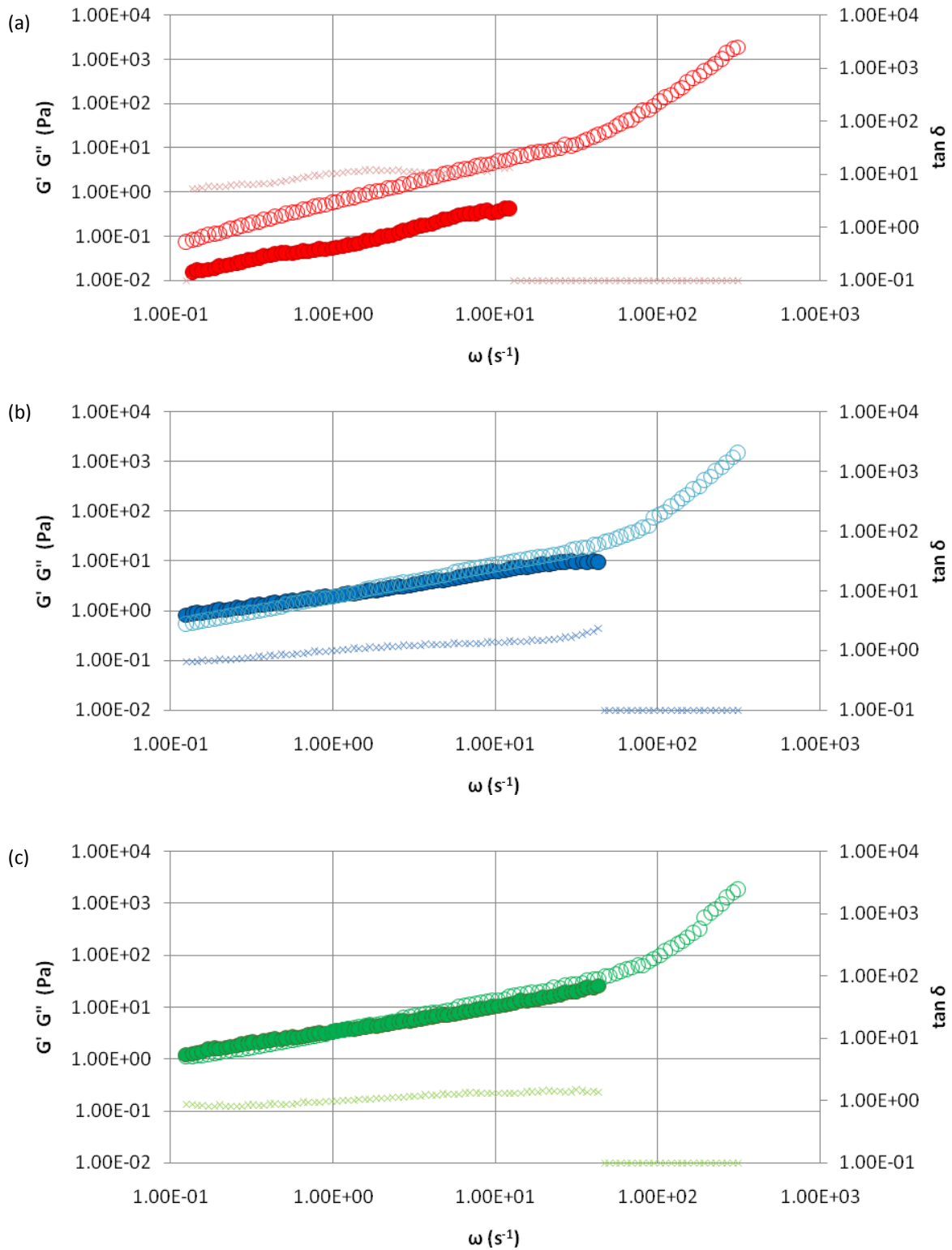


Figura Nro.20. Espectros mecánicos a 25°C de los sistemas al 2,00% p/v de producto enriquecido en pectina aislado en la fracción "HP". (a) HP-Agua (● G' , ○ G'' , x $\tan \delta$, x $\tan \delta$); (b) HP- Ca^{+2} (● G' , ○ G'' , x $\tan \delta$); (c) HP-Leche (● G' , ○ G'' , x $\tan \delta$).

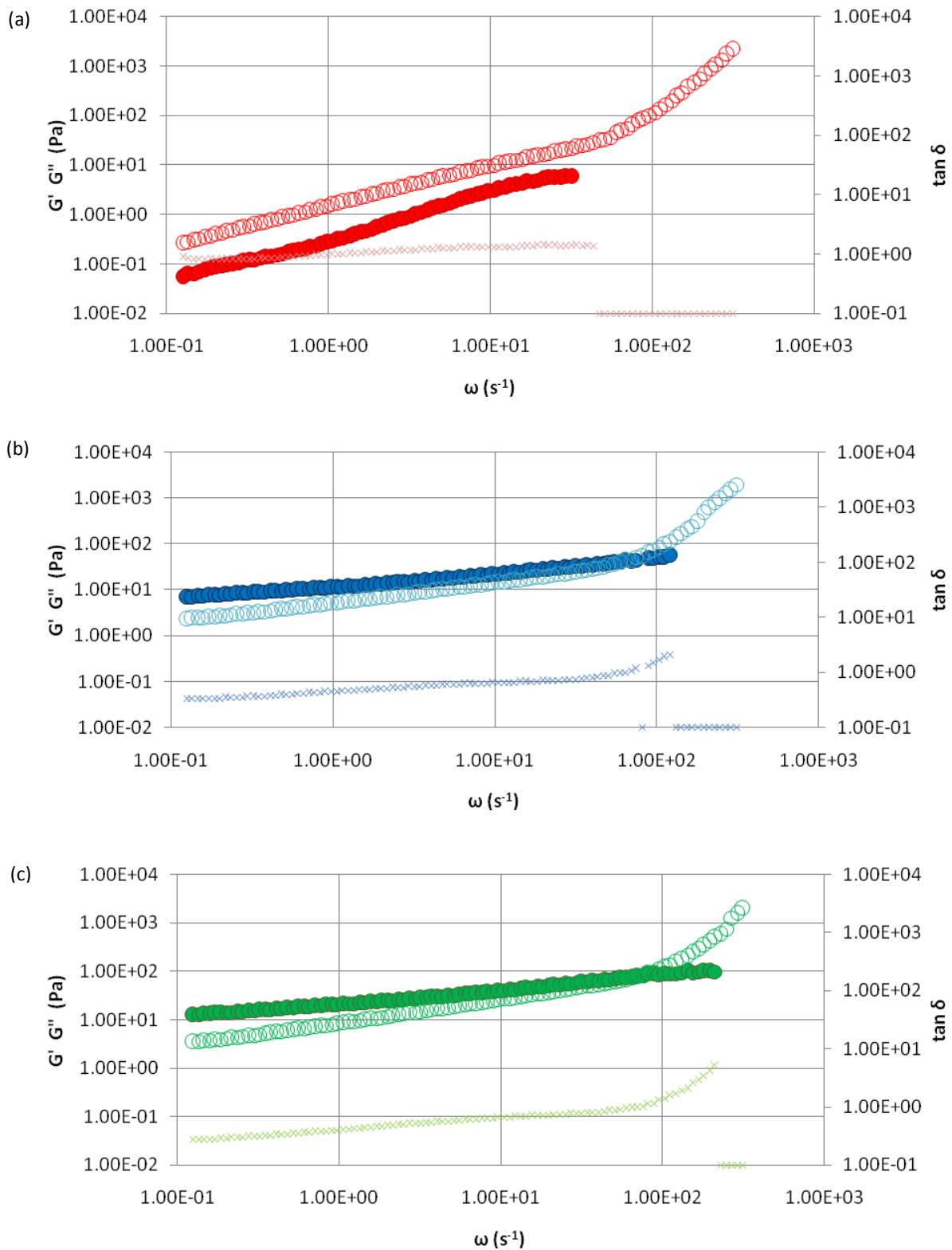


Figura Nro.21. Espectros mecánicos a 25°C de los sistemas al 2,00% p/v de producto enriquecido en pectina aislado en la fracción "P". (a) P-Agua (● G' , ○ G'' , × $\tan \delta$); (b) P- Ca^{+2} (● G' , ○ G'' , × $\tan \delta$); (c) P-Leche (● G' , ○ G'' , × $\tan \delta$).

En el sistema H-Leche, se evidenció que G' y G'' se superponían a bajas frecuencias y la componente viscosa predominó a partir de frecuencias del orden de $0,8 - 0,9 \text{ s}^{-1}$, las cuales son menores que para el sistema H-Ca^{+2} .

En la Figura Nro. 20, se muestra el espectro mecánico en función de la frecuencia de los sistemas conformados en base a la fracción "HP". Al analizar los espectros mecánicos de los sistemas HP-Ca^{+2} y HP-Leche , se evidenció la superposición de G' y G'' a bajas frecuencias y el predominio de G'' sobre G' a partir de 2 s^{-1} para el sistema HP-Ca^{+2} .

En la Figura Nro. 21, se muestra el espectro mecánico en función de la frecuencia de los sistemas constituidos en base a la fracción "P". Para los sistemas P-Ca^{+2} y P-Leche , a bajas frecuencias, G'' es ligeramente inferior a G' . Luego de un cruce, predomina la componente viscosa a partir de frecuencias de 60 s^{-1} para el sistema con calcio ($G' = G'' = 60 \text{ Pa}$) y 80 s^{-1} para el sistema con leche ($G' = G'' = 100 \text{ Pa}$).

De acuerdo a lo analizado, los sistemas capaces de mantenerse por mayores frecuencias como solución hidrocoloidal concentrada son los sistemas SE-Ca^{+2} y SE-Leche , seguido de los sistemas P-Ca^{+2} y P-Leche .

Se desea destacar que las fracciones "P" y "SE" que presentan una prevalencia del comportamiento sólido en los ensayos dinámicos, especialmente en leche, son las fracciones que en los ensayos de flujo en leche mostraban τ_0 , al cual se lo ha considerado en bibliografía (Vu y col., 2010) como una expresión del comportamiento sólido en las evaluaciones de flujo de distintos materiales.

Es sabido que las propiedades reológicas de las pectinas comerciales dependen en gran medida, del grado de metil-esterificación del ácido galacturónico (Voragen y col., 1995);

además, pectinas con características químicas similares en cuanto a contenido de ácido galacturónico (GalA), nivel de metil-esterificación (DM), pueden tener propiedades espesantes/gelificantes diversas en función de la distribución de los metilos y de los azúcares neutros. Son necesarios estudios adicionales tales como estudios estructurales de la molécula de la pectina, para la interpretación acabada del efecto del calcio y de las proteínas de la leche en las tendencias observadas.

De acuerdo a los estudios reológicos realizados, se puede ver que cada una de las fracciones aisladas en este trabajo, pueden ser útiles tecnológicamente en distintas aplicaciones potenciales de acuerdo al requerimiento tecnológico del proceso y/o producto y a las características antes informadas para cada una de ellas.

Conclusiones

- La hidrólisis del polvo enriquecido en pared celular del mesocarpio de calabaza (*Cucurbita moschata* Duch ex Poiret) por acción de las enzimas hemicelulasa y proteasa, generó, con un rendimiento de $\approx 5\%$, productos enriquecidos en pectina con significativos efectos espesantes en especial en presencia de calcio y/o leche.
- Las fracciones extraídas por acción enzimática (“H”, “P”, “HP”) mostraron diferencias significativas en la composición química y en las propiedades funcionales, diferenciándose principalmente en la cantidad de hidratos de carbono, ácido galacturónico, azúcares neutros. La hemicelulasa y la proteasa, produjeron intensa hidrólisis de la pared celular dando lugar a fracciones con contenidos de azúcares neutros comprendidos entre 18 – 25 %. Todos los productos aislados con el uso de hemicelulasa (“H” y “HP”) presentaron un alto contenido de almidón. Las fracciones obtenidas presentaron un contenido de proteína entre 4 – 6 % y poder emulsificante en emulsiones aceite en agua, determinando la estabilidad de las mismas a lo largo de 45 días. La fracción “P” presentó la mayor capacidad espesante entre las fracciones extraídas con enzima.
- El tratamiento con buffer (“SE”) del material de pared celular de calabaza dio lugar a un rendimiento y grado de metilación similares a los obtenidos en las extracciones enzimáticas. Los productos obtenidos bajo la acción de buffer presentaron bajo contenido de almidón y el contenido más bajo de azúcares neutros. Estas fracciones son

adecuadas para ser usados en emulsiones que requieran estabilidad por periodos de 45 días. Una alta capacidad espesante se evidenció en los sistemas ensayados con este tratamiento.

- La hidrólisis ácida (“A”) del material de pared celular de calabaza dio lugar a altos rendimientos de producto ($\approx 8\%$) conteniendo elevados niveles de ácidos urónicos con alto grado de metilación, rico en azúcares neutros, con un bajo contenido de almidón y baja capacidad espesante. Estos productos no son adecuados para ser usados en emulsiones que requieran estabilidad por períodos mayores a 30 días.
- La caracterización reológica de las fracciones aisladas mostró que poseen comportamiento pseudoplástico. El comportamiento reológico fue descrito por medio de los modelos de la potencia y Herschel-Bulkley. Los sistemas SE-Leche, P-Leche, HP- Ca^{+2} y HP-Leche, presentaron esfuerzo mínimo de corte.
- Los ensayos dinámicos de los sistemas acuosos, acuosos con calcio y con leche de las fracciones aisladas, permitieron conocer el espectro mecánico del material. Los sistemas acuosos presentaron módulo de pérdida (G'') mayor al módulo de almacenamiento (G') (comportamiento de solución hidrocoloidal). Los sistemas con calcio y con leche de las fracciones aisladas enzimáticamente o con buffer solamente, presentaron valores de módulo de almacenamiento (G') comparables o ligeramente superiores a los valores de módulo de pérdida (G'') mostrando comportamiento de solución hidrocoloidal concentrada.
- Las pectinas obtenidas a partir de *Cucurbita moschata* Duch ex Poiret, son materiales prometedores como aditivo alimentario. Los resultados obtenidos en este trabajo

generan un aporte a la transformación de los desechos vegetales, contribuyendo a disminuir la polución y a recuperar biomasa de valor. Se propone continuar trabajando en los tratamientos aplicados al material de pared celular para mejorar el rendimiento de extracción de productos enriquecidos en pectina. Se necesita profundizar los estudios estructurales para mejorar la comprensión de los resultados obtenidos.

Referencias Bibliográficas

- AACC, American Association of Cereal Chemists. (1995). Approved Methods of the AACC. 9th edn. St Paul, MN: The Association, pp 76-12.
- AACC, American Association of Cereal Chemists (2001). AACC Technical Committee Report. Cereal World, 48 (3), 128-129.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists (1990). Official Methods of Analysis. Washington, DC.
- Attaie R., y Richter R.L. (2000). “Size Distribution of Fat Globules in Goat Milk”. Journal of Dairy Science, 83, 940-944.
- Ayastuy M.E., Rodriguez R.A. y Elisei V.R. (2010). Producción orgánica de zapallo anquito bajo diferentes prácticas culturales. Horticultura Argentina, Vol 30 N° 71.
- Braddock, R.J. (1999). Handbook of citrus by-products and processing technology. New York: Wiley. pp. 191-192.
- Braccini I., y Pérez S. (2001). Molecular basis of Ca²⁺ - induced gelation in alginates and pectins: the Egg-Box Model revisited. Biomacromolecules, 2, 1089-1096.
- Brett C.T., y Waldron K.W. (1996). The physiology and biochemistry of plant cell walls. 2nd edicion. London: Chapman and Hall. pp. 26-32.
- CAA (2013). Código Alimentario Argentino. Ministerio de Salud Pública de la Argentina, www.anmat.gov.ar/CODIGOA/CAA1.htm

- Caili F., Huan S. y Quanhong L. (2006). A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61, 2, 73 - 80.
- Carreau P.J., Cotton F., Citerne G.P., y Moan M. (2002). “Rheological properties of concentrated suspensions: Applications to foodstuffs”. En: J. Welti-Chanes. G.V. Barbosa-Canovas, J.M. Aguilera (Eds), *Engineering and Food for the 21st century*, CRC Press LLC, USA.
- Chanamai R. y McClements D.J. (2000). *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 172, 79 - 86.
- Clegg S.M. (1995). Thickeners, gels and gelling.. En “*Physico-chemical aspects of food processing*. Edited by T.S. Beckatt. Blackie Academic and Professional, Glasgow, U.K. pp. 117 - 141.
- Codex Alimentarius (2010) Dietary Fiber Definition. ALINORM 09/32/REP <http://www.codexalimentarius.org/>
- De Escalada Pla M., Ponce N.M., Stortz C.A., Gershenson L.N. y Rojas A.M. (2007). Composition and functional properties of enriched fiber products obtained from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch-esne ex Poiret). *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 40, 1176 - 1185.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Robers P.A. y Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350 - 356.
- Endress H.U., Mattes F. y Norz H. (2005). Pectins. *Handbook of Food Science Technology and Engineering*, Vol 3, Marcel Dekker, USA.

- FDA (1993). Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services, “Health Claims: fruits and vegetables and cancer”. (Revised as of April 1, 2005). En: F.D.A., Code of Federal Regulations. Vol. 2. Título 21. Capítulo I. Subcapítulo B. Part 101. Subparte E. Section 101.78. Rockville, MD, USA.
- Filisetti-Cozzi T.M.C.C. y Carpita N.C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197, 157 - 162.
- Fissore E., Ponce N., Stortz C., Rojas A.M. y Gerschenson L. (2007). Characterization of fiber obtained from Pumpkin (*Cucumis moschata* Duch.) mesocarp through enzymatic treatment. *Food Science and Technology International*, 13 (2), 141 - 151.
- Fissore E., Rojas A.M. y Gerschenson L.N. (2008a). Composición química de productos enriquecidos en pectina obtenidos a partir de calabaza (*Cucurbita moschata* Duch ex Poiret) y remolacha (*Beta vulgaris* subsp vulgaris). Congreso de la Asociación Química Argentina.
- Fissore E., Rojas A.M. y Gerschenson L.N. (2008b). Enzimas de uso industrial para la obtención, a partir de calabaza (*Cucurbita moschata* Duch ex Poiret), de productos enriquecidos en pectina. Congreso de la Asociación Química Argentina.
- Fissore E., Matkovic L., Wider E., Rojas A.M. y Gerschenson L. (2009). Rheological properties of pectin-enriched products isolated from butternut (*Cucurbita moschata* Duch ex Poiret). *Food Science and Technology*, 42, 8, 1413 – 1421.
- Fissore E., Ponce N., Matkovic L., Stortz C., Rojas A.M. y Gerschenson L. (2011). Isolation of pectin-enriched products from red beet (*Beta vulgaris* L. var. conditiva) wastes:

composition and functional properties. *Food Science and Technology International*. 17, 6, 517 - 527.

- Fissore E., Rojas A., Gerschenson L. y Williams P. (2013). Butternut and beetroot pectins: characterization and functional properties. *Food Hydrocolloids*. vol. 31 p. 172 – 182.
- Funami T., Zhang G., Hiroe M., Noda S., Nakauma M., Asai I., Cowman M., Al-Assaf S. y Phillips G. (2007). Effects of the proteinaceous moiety on the emulsifying properties of sugar beet pectin. *Food Hydrocolloids*, 21(8), 1319 - 1329.
- Fry S.C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology*, 37, 165 - 186.
- García T.R. y Buron A.F. (1980). “Relación entre la estructura y las propiedades de los zumos y purés de frutas y hortalizas”. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 20, 70 - 78.
- Guillon F., Champ M. y Thibault J.F. (2000). Dietary fibre functional products. En: G.R. Gibson & C.M. Williams (Eds.) *Functional foods, Concept to Product*, Woodhead Publishing Limited, 315-364.
- Guillotin S.E., Bakx E.J., Boulenguer P., Mazoyer J., Schols H.A. y 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.
- Harte F.M., Montes C., Adams M. y San Martin-Gonzalez M.F. (2007). Solubilized micellar calcium induced low methoxyl-pectin aggregation during milk acidification. *Journal of dairy science*, 90, 6, 2705 - 2709.

- Herbstreith & Fox (2007). Rheological Methods to Characterize Pectins in Solutions and Gels. www.herbstreith-fox.de.
- Hietala S., Mononen P., Strandman S., Järvi P., Torkkeli M., Jankova K., Hvilsted S. y Tenhu H. (2007). Synthesis and Rheological Properties of an Associative Star Polymer in Aqueous Solutions. *Polymer*, 48, 4087 - 4096.
- Jun H.I., Lee C.H., Song G.S. y Kimet Y.S. (2006). Characterization of the pectic polysaccharides from pumpkin peel. *LWT - Food Science and Technology*, 39, 5, 554 - 561.
- King, K. (1993). Pectin: an untapped natural source. *Food Science and Technology*, 7 (3), 147 - 152.
- Kravtchenko T.P., Arnould I., Voragen A.G.J., y Pilnik W. (1992). Improvement of the selective depolymerization of pectic substances by chemical α -elimination in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 19, 4, 237 - 242.
- Koubala B.B., Mbome L.I., Kansci G., Tchouangueo F., Crepeau M.J., Thibault J.F. y Ralet M.C. (2008). Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondias cytherea*) obtained using different extraction conditions. *Food Chemistry*, 106, 1202 - 1207.
- Lapasin R. y Prici S. (1995). Rheology of industrial polysaccharides. Theory and applications. London: Chapman & Hall, Blackie Academic and Professional.
- Larrazabal M. (2011). La calabaza Argentina, un producto consolidado. e-Magazine Horticultura. <http://www.horticom.com/pd/print.php?sid=77113>

- Laufenberg G., Kunz B. y Nystroem M. (2003). Transformation of vegetable waste into value added products. *Bioresource Technology*, 87, 2, 167 - 198.
- Leroux J., Langendorff V., Schick G., Vaishnav V. y Mazoyer J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17, 455 - 462.
- Levigne S., Ralet M.C. y Thibault J.F. (2002). Characterization of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohydrate Polymers*, 49, 2, 145 - 153.
- Löfgren C., Guillotin S., Evenbratt H., Schols H. y Hermansson A. (2005). Effects of calcium pH, and blockiness on kinetic rheological behavior and microstructure of HM pectin gels. *Bio macromolecules*, 6, 646 - 652.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265 - 275.
- MacDougall A.J., Needs P.W., Rigby N.M. y Ring S.G. (1996). Calcium gelation of pectin polysaccharides isolated from unripe tomato fruit. *Carbohydrate Research*, 923, 2, 235 - 249.
- MacDougall A.J. y Ring S.G. (2004). Pectic polysaccharides. En: P. Tomasik (Ed) *Chemical and functional properties of food saccharides*, CRC Press LLC, USA.
- Macosko, Ch. W. (1994). En: John Wiley and Sons, Inc (Eds) *“Rheology: Principles, Measurements and Applications”*. Hoboken, NJ, USA.
- Marry M., Roberts K., Huxham I.M., Jarvis M.C., Corsar J., Robertson E. y McCann C. (2006). Cell-cell adhesion in fresh sugar-beet root parenchyma requires both pectin esters and calcium cross-links. *Physiological Plantarum*, 126, 2, 243 - 256.

- Mattoo R., Ishaq M. y Saleemuddin M. (1987). Protein assay by Coomassie Brilliant Blue G-250 binding method is unsuitable for plant tissues rich in phenols and phenolases. *Analytical Biochemistry*, 163, 376 - 384.
- May C.D. (1990). Industrial Pectins: Sources, Production, and Applications. *Carbohydrate Polymers*, 12, 79 - 99.
- May C.D. (2000). Pectins. En: G.O. Phillips & P.A. Williams (Eds) *Handbook of Hydrocolloids*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, England.
- Mohnen D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 3, 266 - 277.
- Naumenko I.V. y Phillipov M.P. (1992). Colorimetric method for determination of acetyl groups in pectic substances. *Akad Nauk Rep Moldova Biol i Khim Nauki*, 1, 56 - 59.
- Neidhart S., Hannak C., Gierschener K., Visser, J. y Voragen, A.G.J. (1996). Investigations of the influence of various cations on the rheological properties of high-esterified pectins gels. *Progress in Biotechnology*, 14, 583 - 590.
- Ng A., Parr A.J., Ingham L.M., Rigby N.M. y 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.
- Panouillé M., Thibault J.F. y Bonnin E. (2006). Cellulase and protease preparations can extract Pectins from various plant byproducts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 8926 - 8935.
- Parker M.L., y Waldron K.W. (1995). Texture of Chinese water chestnut: involvement of cell wall phenolics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 68, 337 - 346.

- Portela M.L. (2006). *Energía y Macronutrientes en la nutrición del siglo XXI*. La Prensa Medica Argentina Editores.
- Racape E., Thibault J. F., Reitsma E. y Pilnik W. (1989). Properties of aminated pectins. II. Polyelectrolyte behavior and calcium binding of aminated pectins and aminated pectic acids. *Biopolymers*, 28, 8, 1435 - 1448.
- Redgwell R.J., Melton R.D. y Brasch D.J. (1990). Cell wall changes in kiwifruit following post-harvest ethylene treatment. *Photochemistry*, 29, 399 - 407.
- Robertfroid M. (1993). Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33 (2), 103 - 148.
- Rodríguez R., Jiménez A., Fernández-Bolaños J., Guillén R. y Heredia A. (2006). Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Food Science and Technology*, 17, 3 - 15.
- Rolin C. y De Vries J. (1990). Pectin. En: P. Harris (Ed.) *Food Gels*, Elsevier Sci. Publ. Ltd: New York, pp. 401 - 434.
- Steffe J.F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*. Freeman Press, Missouri, USA. Capítulo 5., pp. 294-349.
- Round A.N., Rigby N.M., MacDougall A.J., Ring S.G. y Morris V.J. (2001). Investigating the nature of branching in pectin by atomic force microscopy and carbohydrate analysis. *Carbohydrate Research*, 331, 3, 337 - 342.
- Selvendran R. y MacDougall, (1995). Cell-wall chemistry and architecture in relation to sources of dietary fibre. *European Journal of Clinical Nutrition*, 49(3), S27 – S41.

- Sharma R., Sing H. y Taylor M.W. (1996). “Composition and Structure of Fat Globule Surface Layers in Recombined Milk”. *Journal of Food Science*, 61, 1, 28 - 32.
- Shkodina O.G., Zeltser O.A., Selivanov N.Y. e Ignatov V.V. (1998). Enzymic extraction of pectin preparations from pumpkin. *Food Hydrocolloids*, 12, 313 - 316.
- Sokal R.R. y Rohlf J.B. (2000). *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. San Francisco: WH Freeman and Company, pp. 253-380.
- Sperber B.L., Cohen S.M.A., Schols H.A., Voragen A.G. y Norde W. (2010). Overall charge and local charge density of pectin determines the enthalpic and entropic contributions to complexation with β -lactoglobulin. *Biomacromolecules*, 11, 3578 - 3583.
- Ström A., Ribelles P., Lundin L., Norton I., Morris E.R. y Williams M.A.K. (2007). Influence of pectin fine structure on the mechanical properties of calcium-pectin and acid-pectin gels. *Biomacromolecules*, 8, 2668 - 2674.
- Van Vliet T. (1999). Rheological classification of foods and instrumental techniques for their study. En: A.J. Rosenthal (Ed.) *Food texture: measurement and perception*. Aspen Publishers, Maryland, USA. Capítulo 4, pp. 65-98.
- Vincken J.P., Schols H.A., Oomen R.J.F.J., McCann M.C., Ulvskov P., Voragen A.G.J. y Visser R.G.F. (2003). If homogalacturonans were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*, 132, 1781 - 1789.
- Voragen A.G.J., Pilnik W., Thibault J.F., Axelos M.A.V. y Renard C.M.G.C. (1995). Pectins. En: A.M. Stephen (Ed.), *Food polysaccharides*, Marcel Dekker, NY., pp. 287-339.
- Vu T., Ovarlez G. y Chateau C. (2010). Macroscopic behavior of bidisperse suspensions of noncolloidal particles in yield stress fluids. *Journal of Rheology* 54, 815 - 833.

- Waldron K.W., Parker M.L. y Smith A.C. (2003). Plant cell walls and food quality. *Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 101 –1 19.
- Wang Q. y Cui S.W. (2005). Understanding the physical properties of food polysaccharides. En: S.W. Cui (Ed.), *Food Carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications*, London: Taylor & Francis, United Kingdom.
- Willats W.G.T., Knox J.P. y Mikkelsen J.D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 97 - 104.
- Williams P.A., Sayers C., Viebke C., Senan C., Mazoyer J. y Boulenguer P. (2005). Elucidation of the Emulsification Properties of Sugar Beet Pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3592 - 3597.
- Wood P.J. y 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.
- Yang Y., Zhang G., Hong Y., Gu Z. y Fang F. (2013). Calcium cation triggers and accelerates the gelation of high methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids* 32, 228 - 234.
- Zykwincka A., Gaillard C., Boiffard M. H., Thibault J. F. y Bonnin E. (2009). Green labelled pectins with gelling and emulsifying properties can be extracted by enzymatic way from unexploited sources. *Food Hydrocolloids*, 23, 8, 2468 - 2477.