

INNOTEC ISSN 1688-6593 [en línea]

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

EQUIPO EDITORIAL**Dirección**

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

CONSEJO EDITORIAL**Dra. Sofia Barrios**

Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ingeniería,
Instituto de Ingeniería Química, Uruguay

MBA. Ing Mariela De Giuda

Gerente de Tecnología y Gestión, Laboratorio Tecnológico
del Uruguay (LATU), Uruguay

Dr. Andrés Dieste

Universidad de la República (UdelaR), Facultad de
Ingeniería, Instituto de Ingeniería Química, Uruguay

Dr. Gustavo Domínguez

Gerente de Latitud - Fundación LATU, Uruguay

Dra. Gabriela Eguren

Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ciencias,
Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Uruguay

PhD. Federico Harte

Profesor adjunto de Food Science, Penn State University,
Estados Unidos

MSc. Rosa Márquez

Latitud - Fundación LATU, Uruguay

Dr. Eduardo Méndez

Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ciencias,
Instituto de Química Biológica, Uruguay

PhD. Laura Moya Silva

Universidad ORT Uruguay, Facultad de Arquitectura, Uruguay

Dr. Daniel Vázquez

INIA La Estanzuela, Plataforma de Agroalimentos, Uruguay

MSc. Daniel Volpe

Gerente de Análisis, Ensayo y Metrología, Laboratorio
Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

EDICIÓN**Lic. Marina Barrientos**

Edición revistas INNOTEC, Centro de Información Técnica,
Laboratorio Tecnológico del Uruguay-LATU, Uruguay

EDITORIA ASOCIADA**MSc. Rosa Márquez**

Latitud - Fundación LATU, Uruguay

**Administración de OJS
y gestión de información**

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

ACERCA DE INNOTEC

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

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

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



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

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

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

INNOTEC - NÚMERO 19**Enero-junio de 2020**

ISSN electrónico: 1688-6593

Título clave: INNOTEC (En línea)

Título clave abreviado: Innotec (En línea)

Centro de Información Técnica, LATU

Av. Italia 6201. Tel. (598) 2601 3724,

internos 1314 y 1350

ditec@latu.org.uy

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

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

DISEÑO Y ARMADO

Manosanta Desarrollo Editorial

contacto.manosanta@gmail.com

<http://manosanta.com.uy>

SUMARIO

Artículos

- 10 Evaluación de la degradación de penicilina en leche mediante el uso de la enzima beta-lactamasa**
Evaluation of Penicillin Degradation in Milk Using Beta-Lactamase Enzyme
Rey, Fabiana S.; López, Victoria; Cardozo, Gonzalo; Olazábal, Laura; De Torres, Elena; Escobar, Daniela
- 23 Pérdida de solubilidad de sistemas modelo de aislado de proteínas de lactosuero, caseinato de calcio, lactosa e inulina por acción de la composición y el tratamiento térmico**
Solubility loss of whey protein isolate, calcium caseinate, lactose and inulin model systems by action of composition and heat treatment
Rodríguez Arzuaga, Mariana; Añón, María Cristina; Abraham, Analía Graciela
- 37 Estudio del contenido de selenio en carne vacuna luego del proceso de cocción**
Study of the selenium content in beef after the cooking process
Pistón, Mariela; Silva, Javier; Suárez, Analía; Belluzzi, Marcelo; Iaquina, Fiorella; Panizzolo, Luis; Méndez, Carlos; Cerminara, Marcelo
- 52 Desarrollo de una metodología analítica para la determinación de Cd, Pb y As en frutas y hortalizas como una alternativa a los métodos estándar de análisis**
Development of an analytical methodology for the determination of Cd, Pb and As in fruits and vegetables as an alternative to standard methods of analysis
Tissot, Florencia; Pereira, Mónica; Pistón, Mariela; Ibáñez, Facundo; Dini, Sebastián
- 64 Bioactive compounds and antioxidant capacity in native fruits of Uruguay**
Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en frutos nativos del Uruguay
Ferrari, Virginia; Ibáñez, Facundo; Cabrera, Danilo; Pintado, Betiana
- 76 De residuo industrial a ingrediente funcional: el potencial de la cáscara de granada**
From industrial waste to functional ingredient: the potential of the pomegranate peel
Torres, Ángela; Lebed, Melina; Arcia, Patricia; Curutchet, Ana; Cozzano, Sonia
- 97 Bio-plastic polymers from renewable sources**
Bio-plásticos de polímeros a partir de fuentes renovables
Baigts-Allende Diana K.; Pérez-Alva Alexa; Sandoval-Haro María F.; Sorroza-Martínez Adriana P.; Metri-Ojeda Jorge C.
- 109 Almacenamiento de arroz: influencia en la inocuidad del grano**
Rice storage: effects on grain safety
Sánchez, Alicia; Gómez-Guerrero, Blanca; Billiris, Alejandra

NOTA TÉCNICA

- 125 Design of a sustainable, intelligent and interconnected food container following Cradle to the Cradle principles and using Life Cycle Analysis for the evaluation of environmental impacts**
Diseño de un envase para alimentos sostenible, inteligente e interconectado siguiendo los principios de la cuna a la cuna y utilizando el Análisis del Ciclo de Vida para la evaluación de impactos ambientales
Cabot, María I.; Luque, Amalia; De Las Heras, Ana; Aguayo, Francisco

POLÍTICA EDITORIAL DEL LATU

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

Misión

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

Los objetivos específicos son:

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

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

CÓDIGO ÉTICO DE INNOTEC

La revista INNOTEC adhiere a los principios publicados por COPE (Committee on Publication Ethics) en <https://publicationethics.org/resources/code-conduct> y promueve así la conducta ética de todos los participantes del proceso editorial: autores, revisores y equipo editorial.

Los autores se comprometen a:

- Enviar artículos originales, de su autoría y que no infrinjan derechos de propiedad intelectual y/o derecho de imagen y/o de datos personales de terceros, e inéditos, que no hayan sido presentados simultáneamente a otra publicación.
- Asegurar la veracidad de los datos presentados en su investigación.
- Asegurar la integridad de su investigación, evitando la publicación de resultados parciales.
- Consignar a los autores de acuerdo al nivel de responsabilidad intelectual que han tenido en la elaboración del artículo, en orden decreciente, sin que medien otros criterios jerárquicos.
- Designar un autor de correspondencia, que asume la responsabilidad de difundir entre todos los autores los avances y resultados del proceso editorial.
- Identificar debidamente las fuentes originales de los trabajos que cita en su artículo.
- Revisar los antecedentes de otras investigaciones del ámbito teórico inmediato de su trabajo para dar cuenta de la información más actualizada y relevante.
- Reconocer los apoyos académicos, financieros y logísticos que hicieron posible la investigación y/o la elaboración del artículo.

Los revisores se comprometen a:

- Declarar que no existe conflictos de interés para la evaluación de un artículo.
- Realizar su evaluación respondiendo a criterios objetivos y respetando su independencia académica.
- Asegurar la confidencialidad tanto del contenido del artículo como del resultado de su evaluación.
- Preservar el anonimato en todo el proceso, apelando al editor como intermediario de cualquier comunicación con los autores.
- Respetar los tiempos acordados con los editores de la revista para la realización de su trabajo.

El equipo editorial se compromete a:

- Asegurar la honestidad y transparencia de todo el proceso editorial, desde la presentación del artículo, evaluación por pares y publicación en las condiciones pautadas.
- Seleccionar los revisores idóneos para cada trabajo.
- Garantizar la independencia de criterio de los revisores en el ejercicio de su rol.
- Asegurar el anonimato de todas las partes involucradas en el proceso de arbitraje por pares.
- Mediar en posibles conflictos de interés con el apoyo del consejo editorial.
- Velar por el cumplimiento de los plazos acordados en cada fase del proceso.
- Difundir los números publicados en las redes académicas y bases bibliográficas de su entorno local y regional.
- Controlar el cumplimiento de los requisitos por parte de los autores y la actuación acorde de los árbitros.
- Identificar casos de incumplimiento de los compromisos éticos enumerados en este código y penalizar a sus responsables con sanciones que van de la suspensión del infractor en su rol en el proceso editorial a la difusión de una rectificación pública y la remoción del artículo.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES PARA PUBLICAR EN INNOTEC

Ámbito de los artículos y proceso de revisión

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

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

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

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

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

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

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

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

Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos publicados y el uso que otros puedan hacer de ellos son de responsabilidad de sus autores. Esta responsabilidad se asume con la sola publicación del artículo enviado. El LATU se reserva el derecho de publicar aquellos artículos que responden a las áreas estratégicas fijadas por la organización para cada edición y de realizar modificaciones que considere favorables a la óptima presentación de los contenidos en la revista.

PROCESO DE REVISIÓN

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

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

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

NORMAS DE PRESENTACIÓN Y ENVÍO DE LOS TEXTOS

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

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

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

DEFINICIONES:

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

Título. Refleja el contenido del texto con precisión, es neutro e informativo.

Resumen. Provee información específica. Sintetiza, anuncia y jerarquiza contenidos.

Introducción. Incluye antecedentes concretos y datos del proceso, enumeración de objetivos e importancia del tema.

Materiales y métodos. Relato de los métodos y procedimientos que permitieron obtener los resultados presentados. Obtención del material, condiciones y metodología. Análisis estadísticos, programas.

Resultados. Presentación y expresión de los hallazgos en tablas, gráficos y/o figuras.

Discusión y conclusiones. Síntesis de los avances y las contribuciones más relevantes de la investigación. En esta sección se discuten los resultados en el orden en el que fueron presentados. Asimismo, se define y diferencia claramente el aporte del trabajo en relación al conocimiento previo.

Si procede, se mencionan posibles líneas futuras de investigación y de aplicación de los resultados.

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

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

LOS ARTÍCULOS DEBEN PRESENTAR:

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

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

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

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

Texto de tres (3) a veinticinco (25) páginas de desarrollo (introducción, métodos, descripción de equipos, descripción de programas, desarrollo de teorías, resultados y discusión, conclusiones, referencias, tablas, figuras, gráficos e imágenes, (ver sección Estilo y formato de citas y referencias en este documento). El texto deberá ser presentado en fuente Arial 11, a espacio doble y con numeración de líneas, con títulos en mayúsculas y minúsculas y en formato .doc, de cualquier versión de Microsoft Word.

Secciones. Los títulos de sección (que señalan Introducción, Materiales y Métodos, Discusión, etc.) deben ser escritos en mayúscula y minúsculas, estilo de fuente bold y centrados en el texto. Los

subtítulos serán justificados a la izquierda, escritos en mayúscula y minúsculas, también en bold. Tanto la primera letra del título y la primera letra de los nombres propios deben ser escritas en mayúscula. Se debe dejar un espacio entre líneas antes y después de cada subtítulo.

Fórmulas, figuras, tablas y gráficos. Las figuras deben numerarse correlativamente en orden de aparición en el texto, y deben incluir un breve título explicativo en el margen inferior. Si es necesario incluir fotos o imágenes, estas se deben designar como figuras, deben ser nítidas y enviadas en formato jpg (mínimo 300 px aseguran una buena calidad de visualización). Las tablas deben ser numeradas correlativamente y en forma independiente de las figuras, y cada entrada debe ocupar su propia celda. Las tablas se numeran según el orden de aparición en el texto, y su título explicativo debe ubicarse en el margen inferior. Evite utilizar líneas verticales, incluir más de dos tablas por carilla y dividir tablas en más de un folio o en forma perpendicular al texto. Recuerde que el texto presenta las tablas, no desarrolla su contenido, estas deben explicarse en sí mismas.

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

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

Evite las notas al pie en el desarrollo del artículo.

Denominaciones en latín: deben ir en cursiva.

ESTILO DE CITAS Y REFERENCIAS SEGÚN EL SISTEMA HARVARD

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

Ejemplos usuales de citas

Registro de citas textuales

(López, 1985, p.93)

(González y Rubio, 1990, pp.110-111)

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

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

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

(Alonso, 1988b, p.84)

Registro de cita ideológica o paráfrasis

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

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

(Pérez y González, 2005)

(Rodríguez, et al., 2011).

(Pérez, 2014a)

(Pérez, 2014b)

EJEMPLOS USUALES DE REFERENCIAS MONOGRAFÍAS (LIBROS)

Apellidos(s), Nombre o Inicial, año de edición. *Título del libro en cursiva*. N^o de edición. Lugar de edición: editorial.

(Serie; N^o). ISBN (Este último si se posee)

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

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

REVISTAS COMO UN TODO

Título de la publicación en cursiva. Responsabilidad. Edición. Identificación del fascículo. Lugar de edición: editorial, fecha del primer volumen-fecha del último volumen. ISSN

Boletín Económico. Banco de España. 1998, (1). Madrid: Banco de España, Servicio de Publicaciones, 1979- . ISSN: 0210-3737

ARTÍCULOS DE REVISTAS

Apellido(s), Nombre o Inicial, año. Título del artículo. En: *Título de la publicación seriada*, Volumen(Número), páginas.

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

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

NORMAS

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

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

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

TEXTOS ELECTRÓNICOS, BASES DE DATOS Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS

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

Rapp, A. O., Augusta, U. y Peek, R. D., 2001 *Facts and ideas of testing wood durability above ground* [En línea]. Hamburgo: BFH. [Consulta: 25 de setiembre de 2008]. Disponible en:

<http://www.bfah.de/inst4/43/pdf/3doublay.pdf>

PATENTES

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

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

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

Evaluación de la degradación de penicilina en leche mediante el uso de la enzima beta-lactamasa

Evaluation of Penicillin degradation in milk using beta-lactamase enzyme

Avaliação da degradação da penicilina no leite através da utilização da enzima beta-lactamase

RECIBIDO: 25/9/2019 → APROBADO: 18/11/2019 ✉ frey@latitud.org.uy

REY, FABIANA S.(1); LÓPEZ, VICTORIA(1); CARDOZO, GONZALO(1); OLAZÁBAL, LAURA(2); DE TORRES, ELENA(3); ESCOBAR, DANIELA(1)

(1) LATITUD - FUNDACIÓN LATU. MONTEVIDEO, URUGUAY.

(2) LATU. MONTEVIDEO, URUGUAY.

(3) CAMPO EXPERIMENTAL N^o2, FACULTAD DE VETERINARIA, UDELAR. SAN JOSÉ, URUGUAY.

RESUMEN

Los antibióticos son utilizados en los tambos para el tratamiento y prevención de enfermedades en ganado bovino lechero, como la mastitis, cojeras, infecciones respiratorias y diarrea. Los residuos de antibióticos en leche pueden generar problemas en la población en forma de alergias y resistencia antimicrobiana, así como en la industria y el medio ambiente. Existen reglamentaciones nacionales e internacionales que prohíben el procesamiento de leche con antibióticos, por lo que es de importancia el estudio de alternativas para su disposición. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del tratamiento con β -lactamasa (BL) en la degradación de penicilina G (PG) en leche. Los ensayos se realizaron en leche en polvo descremada contaminada con tres concentraciones de antibiótico: 6, 12 y 30 ppb. Se probaron tres concentraciones de BL (0,1, 0,5 y 1,0 mU/mL). Se extrajeron muestras a las 3, 6, y 9 horas para la detección y cuantificación de antibióticos. Los resultados obtenidos indican que en 3 horas se degradó la PG utilizando 0,5 mU/mL de β -lactamasa y en 6 horas con una concentración menor de enzima (0,1 mU/mL) en todas las concentraciones de antibiótico evaluadas. Las enzimas estudiadas presentan un alto potencial para degradar antibióticos en leche en tambos antes de su disposición final.

PALABRAS CLAVE: degradación de antibióticos, enzimas microbianas, leche.

ABSTRACT

Antibiotics are used in dairy farms for the treatment and prevention of diseases in dairy cattle, such as mastitis, lameness, respiratory infections and diarrhea. Antibiotic residues in milk can generate problems in the population in the form of allergies and antimicrobial resistance, as well as in industry and the environment. There are national and international regulations that prohibit the processing of milk with antibiotics, so it is important to study alternatives for their disposal. The aim of this work was to study the effect of treatment with β -lactamase (BL) on the degradation of penicillin G (PG) in milk. The trials were performed on skimmed milk powder contaminated with three antibiotic concentrations: 6, 12 and 30 ppb. Three concentrations of BL (0,1, 0,5 and 1,0 mU/mL) were tested. Samples were taken at 3, 6, and 9 hours for detection and quantification of antibiotics. The results obtained indicate that in three hours the PG was degraded using 0,5 mU/mL of β -lactamase, and in six hours with a lower concentration of enzyme (0,1 mU/mL) in all the antibiotic concentrations analyzed. The β -lactamase studied have a high potential to degrade penicillin in milk in dairy farms before final disposal.

KEYWORDS: antibiotic degradation, microbial enzymes, milk.

RESUMO

Os antibióticos são utilizados nas explorações leiteiras para o tratamento e prevenção de doenças do gado leiteiro, como a mastite, a claudicação, as infecções respiratórias e a diarreia. Os resíduos de antibióticos no leite podem gerar problemas na população sob a forma de alergias e resistência antimicrobiana, bem como na indústria e no ambiente. Existem regulamentações nacionais e internacionais que proíbem o processamento de leite com antibióticos, por isso é importante estudar alternativas para a sua eliminação. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do tratamento com β -lactamase (BL) na degradação da penicilina G (PG) no leite. Os ensaios foram realizados com leite em pó desnatado contaminado com três concentrações de antibióticos: 6, 12 e 30 ppb. Três concentrações de BL (0,1, 0,5 e 1,0 mU/mL) foram testadas. As amostras foram colhidas em 3, 6 e 9 horas para detecção e quantificação de antibióticos. Os resultados obtidos indicam que em três horas o PG foi degradado com 0,5 mU/mL de β -lactamase e em seis horas com menor concentração de enzima (0,1 mU/mL) em todas as concentrações de antibióticos analisadas. A β -lactamase estudada tem um alto potencial para degradar a penicilina no leite em fazendas leiteiras antes da disposição final.

PALAVRAS-CHAVE: degradação antibiótica, enzimas microbianas, leite.

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son agentes terapéuticos, naturales o sintéticos, que actúan inhibiendo el crecimiento o eliminando microorganismos sensibles. Según su modo de

acción, se clasifican en los siguientes grupos: betalactámicos, sulfonamidas, carbapenems, aminoglicósidos, glicopéptidos, lincomicinas, macrólidos, polipéptidos, polienos, rifamicina, tetraciclinas, cloranfenicol, quinolonas y fluoroquinolonas (Gothwal y Shashidhar, 2014). Su uso está ampliamente extendido, tanto en humanos como en animales. En medicina veterinaria son usados como terapéuticos para tratar enfermedades clínicas, en tratamientos de corta duración para tratar animales enfermos y evitar el contagio, como profilácticos y como promotores de crecimiento (Mathew, et al., 2007; Landers, et al., 2012). Según un estudio realizado por USDA, en los tambos de Estados Unidos la mayor parte de los antibióticos son usados para tratar mastitis (16,4% de los animales), cojera (7,1%), enfermedades respiratorias (2,8%), diarreas y otros problemas digestivos (1,9%) (USDA - APHIS, 2008). Cerca del 90% de los tambos usan antibióticos para la prevención de enfermedades, como por ejemplo la terapia de secado al terminar la lactancia. La cefalosporina y los beta-lactámicos son los más utilizados para el tratamiento de la mastitis en el mundo (Mathew, et al., 2007). Asimismo, para la terapia de secado los de preferencia son la penicilina G y la cefapirina (Oliver, et al., 2011). En Uruguay, los beta-lactámicos (penicilina, amoxicilina, cloxacilina, etcétera) son uno de los grupos de agentes antimicrobianos más utilizados y recomendados como droga en primera línea, por su bajo costo, toxicidad y riesgo de desarrollo de resistencia antimicrobiana (Giannechini, et al., 2005). El uso excesivo de antibióticos y la presencia de residuos de estos en la cadena alimentaria han provocado una gran preocupación a nivel mundial tanto por sus efectos en la salud humana y animal como en los procesos industriales. Desde el punto de vista sanitario, en humanos pueden generar reacciones alérgicas, toxicidad, efectos sobre la flora intestinal y la emergencia de bacterias resistentes en animales con la posible transferencia de genes de resistencia a patógenos humanos (Mitchell, et al., 1998; Van Boeckel, et al., 2015). Desde el punto de vista tecnológico, los antimicrobianos pueden generar enlentecimiento o inhibición de los procesos de acidificación, cuajado y maduración, deteriorando las propiedades organolépticas e incluso inhibiendo por completo la fermentación en la elaboración de quesos y yogures (Grunwald y Petz, 2003; Berruga, et al., 2016).

Existen reglamentaciones a nivel nacional e internacional que prohíben el procesamiento de leche con antibióticos. La leche es analizada antes de su entrada a la planta industrializadora y es desechada si no cumple con el límite máximo de residuos (LMR) establecido en las reglamentaciones (Uruguay, 2016; Codex Alimentarius, 2018). El descarte de esta leche tiene un impacto negativo en los sistemas de tratamiento de efluentes de tambos e industrias y puede producir acumulación y persistencia de estas moléculas en el suelo y potencialmente en los cursos de agua, lo que afectaría los ecosistemas acuáticos y terrestres (Kemper, 2008; Correa, et al., 2016).

Existen distintos métodos para detección de antibióticos: los utilizados para cribado, los de inhibición microbiológica y los métodos enzimáticos, inmunoenzimáticos y de unión a receptores, que permiten detectar, de una forma más específica y rápida, la presencia de residuos de antibióticos (Kantiani, et al., 2009). Los kits “rápidos” son capaces de identificar familias de antimicrobianos e incluso grupos combinados.

La prueba Charm, que detecta los betalactámicos y las tetraciclinas (Charm MRL BLTET; Charm Sciences Inc. Massachusetts, USA), es un ensayo inmunorreceptor que utiliza la tecnología de flujo lateral de ensayo rápido de un paso (ROSA) para la detección en leche cruda y su límite de detección (presencia / ausencia) es el límite máximo de residuos (LMR) que surge de las recomendaciones dadas por el Codex Alimentarius para cada tipo de antibiótico (Codex Alimentarius, 2018). Para controles confirmatorios son utilizados los métodos cuantitativos instrumentales, como la cromatografía líquida masa-masa (HPLC-MS/MS) (Holstege, et al., 2002; Tian, et al., 2016).

En este contexto se ha tornado de gran importancia la posibilidad de degradar y/o remover los residuos de antibióticos de la leche previo a su descarte, con el fin de mitigar el daño a la salud y al ambiente. Se han reportado estudios en los que se emplearon distintas metodologías para la remoción y/o degradación de antibióticos, fundamentalmente en medio acuoso, entre las que se destacan: filtración por membranas, luz ultravioleta, ozono, métodos electroquímicos, adsorción con carbón activado y la utilización de microorganismos y/o las enzimas que estos producen (Koyuncu, et al., 2008; Homem y Santos, 2011; Gómez-Pacheco, et al., 2011; Karigar y Rao, 2011; Kitazono, et al., 2012).

Los procesos enzimáticos son una alternativa muy prometedora para la degradación de residuos de antibióticos y otros agentes terapéuticos en medios acuosos y otras matrices como la leche. Se han reportado numerosos estudios en los que queda demostrado que tanto las enzimas oxidativas como las hidrolíticas catalizan la degradación de estas moléculas (Karam y Nicell, 1997; Park y Choung, 2007; Wen, et al., 2010; de Cazes, et al., 2016; Ding, et al., 2016; Copete-Pertuz, et al., 2018).

Como fue expuesto anteriormente, los antibióticos betalactámicos se encuentran entre los más usados en veterinaria en Uruguay. Son de origen natural o semisintético y tienen la característica de poseer un anillo betalactámico en su estructura. Actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana y su espectro de acción incluye bacterias gram positivas, gram negativas y espiroquetas. Las penicilinas contienen un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico y difieren entre ellas por la sustitución en la posición 6 del anillo betalactámico (Seija y Vignoli, 2006).

La beta-lactamasa (EC 3.5.2.6) es una enzima producida por ciertas bacterias, lo que confiere resistencia a la penicilina a estos microorganismos. Su modo de acción se basa en la hidrólisis del anillo betalactámico, dando lugar a la formación de ácido peniciloico (Desphande, et al., 2004).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del tratamiento con β -lactamasa de leche contaminada con penicilina G en la degradación del antibiótico. Para ello se estudiaron tres variables: concentración de antibiótico, concentración de enzima y tiempo de reacción. Se utilizó una metodología que permitiera evaluar el porcentaje de degradación del antibiótico mediante su detección cualitativa, aplicando un método rápido de unión a receptores proteicos, y confirmar los resultados obtenidos mediante HPLC-MS/MS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos

Para las pruebas de degradación se utilizó leche en polvo descremada Conaprole reconstituida en agua destilada, según instrucciones del fabricante. La enzima β -lactamasa de *Enterobacter cloacae* (tipo III, EC 3.5.2.6, polvo liofilizado, 6-18 unidades/mg de proteína usando bencilpenicilina) y el antibiótico Penicilina G sal sódica (PENNA, \sim 1650 U/mg) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad pura para análisis y HPLC. Las soluciones stock de antibiótico fueron preparadas con agua ultrapura (resistividad \geq 18,2 M Ω cm) y conservadas a -20 °C. Las soluciones stock de enzima fueron preparadas en buffer PBS pH 7 y conservadas a 4 °C. La solución de nitrocefina (Thermo Scientific - Oxoid) fue preparada reconstituyendo la nitrocefina liofilizada en el líquido de rehidratación provisto por el fabricante (buffer fosfato pH 7 y dimetilsulfóxido).

Ensayo de actividad β -lactamasa

Se preparó una solución stock de enzima (3,3, mg/mL) disolviendo la enzima liofilizada en buffer PBS pH 7, y se realizó una dilución 1:1000. El sustrato utilizado fue nitrocefina (Oxoid) en concentración 1 mM ($\epsilon = 20.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Se incubó a 25 °C y se midió absorbancia a 486 nm cada 1 minuto durante un intervalo de 10 minutos. Se definió una unidad de β -lactamasa como la cantidad necesaria para hidrolizar 1 μ mol de nitrocefina en 1 minuto a pH 7 y 25 °C.

Ensayo de degradación de penicilina G con β -lactamasa

Para la degradación de penicilina G, se estudió el efecto de tres concentraciones de enzima β -lactamasa (0,1; 0,5; y 1,0 mU/mL) en el tiempo (3, 6 y 9 horas) sobre leche descremada contaminada con tres concentraciones de antibiótico (6, 12 y 30 ppb).

Los ensayos de degradación del antibiótico fueron realizados en batch en tubos de 15 mL. Se utilizó leche en polvo descremada reconstituida al 9% (p/v) con agua destilada a la que se le adicionó Penicilina G en las cantidades necesarias para obtener las concentraciones 6, 12 y 30 ppb en la mezcla de reacción. Se vortexeó para homogeneizar el antibiótico en la leche y se realizaron alícuotas de 5 mL en distintos tubos. Para cada concentración de antibiótico se agregó la cantidad de enzima correspondiente para obtener las tres concentraciones de trabajo: 0,1; 0,5 y 1,0 mU/mL. Las reacciones se incubaron en baño de agua a $23,0 \pm 0,5$ °C y 50 rpm. Se tomaron muestras de cada condición a las 3, 6 y 9 horas. Como blancos se utilizó leche en polvo descremada reconstituida, leche en polvo descremada reconstituida contaminada con las tres concentraciones de antibiótico, y leche en polvo descremada reconstituida con las tres concentraciones de enzima. Todos los ensayos fueron hechos por duplicado para la determinación por el método de cribado y por triplicado para la cuantificación por HPLC-MS/MS.

Detección de antibióticos mediante prueba de cribado inmunoensayo/receptor

Para la detección de penicilina G en las muestras de leche contaminadas con antibiótico y tratadas con β -lactamasa, se utilizó la prueba Charm DIP MRL Beta-lactamas y Tetraciclinas para leche cruda mezclada (Charm Sciences, Inc. Massachusetts, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trata de un inmunoensayo rápido que utiliza la tecnología de flujo lateral. Se realiza una toma de 300 μ L de la mezcla de reacción, se coloca en un tubo de plástico de 1,5 mL y se sumerge la tira. Se incubó a 56 °C durante 10 minutos. Los residuos de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas interactúan con las esferas coloreadas en la tira y la intensidad del color en las zonas de prueba y control se lee visualmente y con ello se interpreta un resultado positivo o negativo (Figura 1). Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

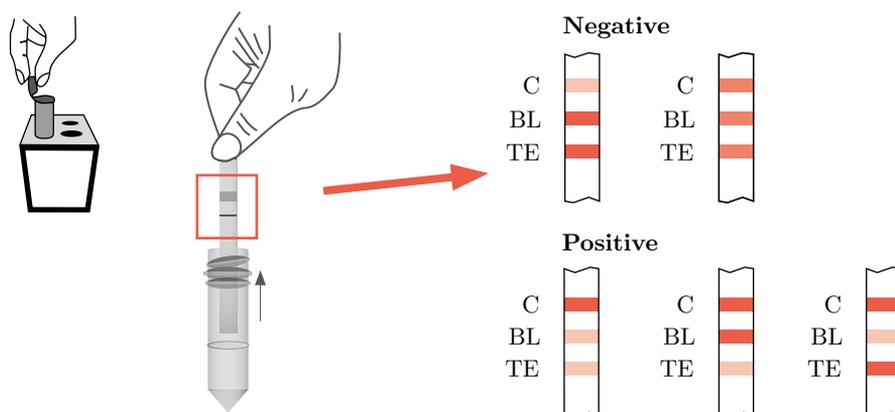


Figura 1. Prueba Charm DIP MRLBLT para leche cruda mezclada. Procedimiento e interpretación de resultados (Charm Sciences, 2016).

El límite de detección (LD) de esta prueba es de 3 ppb para Penicilina G (Charm Sciences, 2016), base sobre la que se calculó la concentración de penicilina G con la que debía contaminarse la muestra, con el objetivo de lograr por lo menos un 50, 75 y 90% de degradación por parte de la β -lactamasa. Utilizando 6, 12, y 30 ppb de antibiótico podrían asumirse esos porcentajes de degradación (mínimos estimados) si se obtenía un resultado negativo con la tira reactiva (Tabla 1).

TABLA 1. Diseño del experimento y cálculo de la concentración inicial de antibiótico y el porcentaje de degradación mínimo estimado según el LD de las tiras.

Antibiótico	Concentración enzima (mU/mL)	Límite detección de atb tiras (ppb)	Concentración final atb (ppb)	% degradación (mínimo estimado)
Penicilina G	0,1	3	6	50
		3	12	75
		3	30	90
	0,5	3	6	50
		3	12	75
		3	30	90
	1	3	6	50
		3	12	75
		3	30	90

El cálculo del porcentaje de degradación se realizó según la siguiente fórmula:

$$\text{Degradación (\%)} = \left[\frac{\text{Concentración PG inicial} - \text{Límite detección PG tiras}}{\text{Concentración PG inicial}} \right] * 100$$

Identificación y cuantificación de antibióticos por HPLC-MS/MS

A los efectos de detener la reacción enzimática, se tomó 1 mL de muestra y se le agregó 1 mL de acetonitrilo calidad UPLC. Se agitó en vortex durante 5 minutos, en multi rotator 5 minutos y con agitador mecánico 5 minutos. Se centrifugó a 8500 g, a temperatura de 4 °C durante 15 minutos. Se separó el sobrenadante y se filtró con filtro de 0,22 µm en viales uniprep.

El HPLC-MS/MS utilizado (Agilent UPLC 1290) está equipado con un detector de masa Triple Quad LC/MS (Agilent 6430) y se usó una columna Poroshell 120 EC-C18 2.1 x 100 mm 2.7-Micron (Agilent Technologies). La fase móvil fue acetonitrilo/agua, ambas con 5 mM de formiato de amonio y 0,1% de ácido fórmico. El programa de gradiente usado para la concentración de acetonitrilo fue el siguiente: se inició 5% de acetonitrilo en la fase móvil y a los 10 minutos hay 50% de la fase orgánica. Se mantuvo la concentración de acetonitrilo en 50% hasta los 13 minutos, y a partir del minuto 16 la fase orgánica fue de 5% hasta los 22 minutos. El flujo de la fase móvil fue de 0,25 mL/min.

Se trabajó en modo MRM y las condiciones de operación del espectrómetro de masas fueron las siguientes: fuente de ionización ESI en modo positivo, temperatura de la fuente de ionización 300 °C, flujo del gas nitrógeno (gas de nebulización) 10 L/min, presión del nebulizador 50 psi, voltaje del capilar 4000 V.

El rango de linealidad estudiado fue entre 4-200 ppb.

Análisis estadístico

Se utilizó Análisis de Varianza (ANOVA) en el estudio de porcentaje de degradación, se determinó diferencia significativa entre muestras por test de Tukey ($\alpha \leq 0,05$). Los análisis se realizaron usando InfoStat Statistical Software versión 2011.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la degradación mediante prueba de cribado inmunoensayo/receptor

En la Tabla 2 se pueden observar los resultados obtenidos luego de la acción de la β -lactamasa sobre la penicilina G, determinados con la prueba Charm DIP MRLBLT.

TABLA 2. Degradación de penicilina G en leche, detectada con tiras reactivas (prueba Charm DIP MRLBLT) en función de la concentración de β -lactamasa (0,1; 0,5 y 1 mU/mL) a distintos tiempos de reacción (3, 6 y 9 horas).

Antibiótico	Concentración enzima (mU/mL)	Límite detección PG tiras (ppb)	Concentración PG inicial (ppb)	% degradación (mínimo estimado)	Tiempo (hs)		
					3	6	9
PG	0,1	3	6	50	+	-	
			12	75	+	+	-
			30	90	+	+	-
	0,5	3	6	50	-		
			12	75	+	-	
			30	90	+	-	
	1	3	6	50	-		
			12	75	-		
			30	90	-		

La prueba Charm es un ensayo cualitativo para detectar la presencia de antibióticos en leche, que arroja un resultado positivo (presencia) o negativo (ausencia), según la respectiva concentración de antibiótico por encima o por debajo del límite de detección de las tiras. Como se desprende de la Tabla 2, en tres horas 1,0 mU/mL de β -lactamasa degradó por lo menos un 90% de los 30 ppb de penicilina G presente en la leche. Con 0,1 mU/mL de enzima, a las 6 hs se degradó por lo menos el 50% de la penicilina G inicial en la muestra contaminada con 6 ppb, y a las 9 hs el 90% de los 30 ppb. Con 0,5 mU/mL de enzima a las 3 hs se degradó por lo menos el 50% del antibiótico inicial en la muestra con 6 ppb y a las 6 hs el 90% de los 30 ppb.

Algunos autores han reportado que la penicilina es una molécula que contiene un enlace amida β -lactámico inestable y reactivo, por lo que su degradación puede darse en varias condiciones: ácidas, básicas, en presencia de β -lactamasa o por tratamiento con iones metálicos (Desphande, et al., 2004). Es importante destacar que prácticamente no se encontraron en la bibliografía estudios de degradación de antibióticos en leche mediante el uso de la enzima β -lactamasa. Korycka-Dahl y colaboradores (1985) reportaron un estudio realizado en leche para la degradación de penicilina G en leche usando una β -lactamasa de *Bacillus cereus*. En ese estudio obtuvieron degradación de la penicilina, pero recién a las 18 hs, usando 1,0 mU/mL de enzima y trabajando a 4 °C (Korycka-Dahl, et al., 1985).

En este trabajo se obtuvieron resultados muy prometedores con respecto al uso de la β -lactamasa para degradar penicilina en condiciones perfectamente escalables a un tambo o a la industria.

Evaluación de la degradación mediante cuantificación de penicilina por HPLC-MS/MS

A los efectos de verificar los resultados obtenidos con la prueba rápida de cribado se realizó el mismo experimento de degradación, y la concentración de antibiótico en las muestras fue cuantificada por HPLC-MS/MS, según metodología puesta a punto y validada en el laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). La validación de la técnica se realizó bajo los requerimientos de la Directiva 2002 / 657 / CE "Funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados" (Unión Europea, 2002).

Los resultados de degradación obtenidos se presentan en la Tabla 3. Se observa que con 0,1 mU/mL de β -lactamasa, a las 3 horas se degradó un 39,8%, 60,4% y 61,9% de la penicilina G en concentraciones iniciales de 6, 12 y 30 ppb, respectivamente. Fueron necesarias seis horas para obtener degradaciones mayores a 94,2% de penicilina G y no se observó efecto de la concentración de antibiótico en las muestras contaminadas con 12 y 30 ppb con respecto al porcentaje de degradación obtenido. Sin embargo, con 6 ppb sí se notaron diferencias, debido a que esta concentración se encuentra cerca del límite de detección de la técnica. Los resultados obtenidos a las tres horas con 0,1 mU/mL de enzima medidos con las tiras reactivas Charm son verificados por los resultados de HPLC-MS/MS.

En las muestras de leche contaminada con 6 ppb de penicilina G tratadas con 0,1 y 0,5 mU/mL de β -lactamasa se reportaron porcentajes de degradación de 74,0%. Este valor es el máximo que se puede informar con esta técnica si se considera que la concentración de antibiótico inicial fue de 6 ppb y que el límite de detección de 2 ppb no permite evaluar si la degradación fue mayor a 74%. A pesar de este efecto, se corrobora el resultado obtenido con las tiras reactivas de la prueba Charm para estas dos condiciones de estudio. Del mismo modo, con la concentración de enzima de 0,5 mU/mL y concentración inicial de antibiótico de 12 y 30 ppb, a las 6 horas se verifica el resultado obtenido con las tiras reactivas por el método cromatográfico.

Las muestras obtenidas a las 9 horas de tratamiento con 1,0 mU/mL de β -lactamasa que contenían 6 ppb de penicilina inicial no fueron analizadas por HPLC-MS/MS, ya que en el ensayo con tiras reactivas se había observado la degradación de por lo menos 90% del antibiótico, con lo cual no iba a ser detectable el antibiótico remanente.

En el análisis por HPLC-MS/MS se observó una degradación mayor al 92,7% cuando la concentración de β -lactamasa fue de 1,0mU/mL a partir de las tres horas de reacción, en las muestras con 12 y 30 ppb de penicilina G, resultado que confirma los obtenidos con la prueba Charm (Tabla 2).

TABLA 3. Degradación de penicilina G con β -lactamasa en leche en distintas condiciones cuantificado por HPLC-MS/MS. Sd: sin datos (no se analizaron por HPLC-MS/MS porque dieron negativo con la prueba rápida). *: valor informado considerando el límite de detección de 2 ppb de la técnica, por lo cual el porcentaje de degradación podría ser aún mayor que el valor reportado ya que no se detectó presencia de antibiótico.

Concentración de enzima (mU/ mL)	Concentración de PG (ppb) inicial	% de degradación		
		tiempo (horas)		
		3	6	9
0,1	6	39,8 ± 4,3 a	74,0 ± 6,7 b*	Sd
	12	60,4 ± 2,8 b	92,7 ± 3,9 c*	92,7 ± 3,9 c*
	30	61,9 ± 3,0 b	94,2 ± 3,9 c*	95,2 ± 3,9 c*
0,5	6	74,7 ± 4,8 b*	74,7 ± 4,8 b*	Sd
	12	92,7 ± 3,9 c*	92,7 ± 3,9 c*	92,7 ± 3,9 c*
	30	95,2 ± 3,9*	95,2 ± 3,9*	95,2 ± 3,9*
1,0	6	Sd	Sd	Sd
	12	92,7 ± 3,9 c*	92,7 ± 3,9 c*	92,7 ± 3,9 c*
	30	95,2 ± 3,9 c*	95,2 ± 3,9 c*	95,2 ± 3,9 c*

En las muestras que contenían 12 y 30 ppb de penicilina tratadas con 0,1 mU/mL de enzima se observó a las 6 horas una degradación del 92,7 y 94,2%, respectivamente, mientras que en el ensayo con tiras reactivas se reportó una degradación de menos del 75% (lo que marca presencia de antibiótico). Lo mismo ocurre con las muestras con 12 y 30 ppb de antibiótico tratadas con 0,5 mU/mL de enzima. Este hecho indica un resultado falso positivo de las tiras reactivas.

CONCLUSIONES

La β -lactamasa de *Enterobacter cloacae* presenta un gran potencial para degradar penicilina G en leche mantenida a 23 °C durante tres horas con una concentración

de enzima de 0,5 mU/mL, condiciones razonables para su aplicación en el tambo. Esto podría ser parte de una solución a un problema que tienen los establecimientos lecheros con respecto al destino de la leche de descarte con residuos de antibióticos, que no puede ser usada para alimentación animal ni vertida en el sistema de tratamiento de efluentes.

Con respecto a los productos de degradación de los antibióticos generados con esta estrategia es necesario realizar estudios cromatográficos y toxicológicos para determinar cuáles son y qué impacto tendrían.

En este trabajo se desarrolló una metodología que permite estimar porcentajes de degradación de penicilina G mediante el uso de un ensayo rápido de cribado.

Todos los resultados en los que no se detectó antibiótico (negativo) en la prueba Charm DIP MRLBLT fueron confirmados con los resultados obtenidos por HPLC-MS/MS. Por lo que las tiras reactivas podrían ser utilizadas como método rápido para evaluar degradación de penicilina G en leche con la metodología desarrollada en este trabajo, pero es necesario tener presente que se pueden obtener resultados falsos positivos.

RECONOCIMIENTOS

La investigación que da origen a los resultados presentados en esta publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código FSA_I_2017_1_138926.

REFERENCIAS

- Berruga, M., Molina, A., Althaus, R. y Molina, M., 2016. Control and prevention of antibiotic residues and contaminants in sheep and goat's milk. En: *Small Ruminant Research*, 142, pp.38-43.
- Charm Sciences, 2016. *Manual del operador: prueba Charm DIP MRL Beta-lactamas y Tetraciclinas para leche cruda mezclada*. Massachusetts: Charm Sciences.
- Codex Alimentarius, 2018. *Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CX/MRL 2-2018* [En línea]. Roma: FAO/WHO. [Consulta: 17 de setiembre de 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/en/>
- Copete-Pertuz, L., Plácido, J., Serna-Galvis, E., Torres-Palma, R. y Mora, A., 2018. Elimination of Isoxazolyl-Penicillins antibiotics in waters by the ligninolytic native Colombian strain *Leptosphaerulina* sp. considerations on biodegradation process and antimicrobial activity removal. En: *Science of the Total Environment*, 630, pp.1195-1204.
- Correa, C., Rezzano, N. y García, F., 2016. *Manual para la Gestión Ambiental de Tambos*. Montevideo: MVOTMA
- de Cazes, M., Belleville, M., Petit, E., Salomo, M., Bayer, S., Czaja, R. y Sanchez-Marcano, J., 2016. Erythromycin degradation by esterase (EreB) in enzymatic

- membrane reactors. En: *Biochemical Engineering Journal*, 114, pp.70-78.
- Desphande, A., Baheti, K. y Chatterjee, N., 2004. Degradation of beta-lactam antibiotics. En: *Current Science*, 87(12), pp.684-1695.
- Ding, H., Wu, Y., Zou, B., Lou, Q., Zhang, W., Zhong, J. y Dai, G., 2016. Simultaneous removal and degradation characteristics of sulfonamide, tetracycline, and quinolone antibiotics by laccase-mediated oxidation coupled with soil adsorption. En: *Journal of Hazardous Materials*, 307, pp.350-358.
- Giannechini, R.E., Concha, B., Gil, C., Moreno-Lopez, J. y Rivero, R., 2005. Monitoreo de la resistencia de *Staphylococcus aureus* aislados en rodeos lecheros de la cuenca lechera tradicional de Uruguay. En: Centro Médico Veterinario de Paysandú. *XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría*. Paysandú, Uruguay (9-11 de junio de 2005). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú. pp.205-207.
- Gómez-Pacheco, C., Sánchez-Polo, M., Rivera-Utrilla, J. y López-Penalver, J., 2011. Tetracycline removal from waters by integrated technologies based on ozonation and biodegradation. En: *Chemical Engineering Journal*, 178, pp.115-121.
- Gothwal, R. y Shashidhar, T., 2014. Antibiotic pollution in the environment: a review. En: *Clean – Soil, Air, Water*, 42, pp.1-11.
- Grunwald, L. y Petz, M., 2003. Food processing effects on residues: penicillins in milk and yoghurt. En: *Analytica Chimica Acta*, 483, pp.73-79.
- Holstege, D., Puschner, B., Whitehead, G. y Galey, F., 2002. Screening and mass spectral confirmation of beta-lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS. En: *J. Agric. Food Chem.*, 50(2), pp.406-411.
- Homem, V. y Santos, L., 2011. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. En: *Journal of Environmental Management*, 92, pp.2304-2347.
- Kantiani, L., Farré, M. y Barceló, D., 2009. Analytical methodologies for the detection of beta-lactam antibiotics in milk and feed samples. En: *Trends in Analytical Chemistry*, 28(6), pp.729-744.
- Karam, J. y Nicell, J., 1997. Potential applications of enzymes in waste treatment. En: *J.Chem. Tech. Biotechnol.*, 69, pp.141-153.
- Karigar, C. y Rao, S., 2011. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. En: *Enzyme Research*, 2011, pp.1-11. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/805187>
- Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. En: *Ecological Indicators*, 8, pp.1-13.
- Kitazono, Y., Ihara, I., Yoshida, G., Toyoda, K. y Umetsu, K., 2012. Selective degradation of tetracycline antibiotics present in raw milk by electrochemical method. En: *Journal of Hazardous Materials*, 243, pp.112-116.
- Korycka-Dahl, M., Richardson, T. y Bradley Jr., R., 1985. Use of microbial beta-lactamase to destrpy penicillin added to milk. En: *J. Dairy Sci.*, 68, pp.1910-1916.
- Koyuncu, I., Osman A. Arikan, O., Wiesner, M. y Rice, C., 2008. Removal of hormones and antibiotics by nanofiltration membranes. En: *Journal of Membrane Science*, 309, pp.94-101.
- Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E. y Larson, E.L. A review of antibiotic use

- in food animals: perspective, policy, and potential. En: *Public Health Reports*, 127(1), pp.4-22.
- Mathew, A.G., Cissell, R.S. y Liamthong, S., 2007. Food animals: a United States perspective of livestock production. En: *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(2), pp.115-133. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.0066>
- Mitchell, J., Griffiths, M., S.A., M., McNab, W. y Yee, A., 1998. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. En: *Journal of Food Protection*, 61(6), pp.742-756.
- Oliver, S.P., Murinda, S.E. y Jayarao, B.M., 2011. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. En: *Food Borne Pathogens and Disease*, 11, pp.337-355.
- Park, H. y Choung, Y.K., 2007. Degradation of antibiotics (Tetracycline, Sulfathiazole, Ampicillin) using enzymes of Glutathion S-Transferase. En: *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 13(5), pp.1147-1155. doi:10.1080/10807030701506223
- Seija, V. y Vignoli, R., 2006. Principales grupos de antibióticos. En: Facultad de Medicina. *Temas de bacteriología y virología médica*. [En línea]. 2da ed. Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR. pp.631- 647. [Consulta: 20 de setiembre de 2019]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/TapadeTemasdeBacteriologiayVirologiamedicaed2006.pdf>
- Tian, H., Wang, J., Zhang, Y., Li, S., Jiang, J., Tao, D. y Zheng, N., 2016. Quantitative multiresidue analysis of antibiotics in milk and milk powder by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometry. En: *Journal of Chromatography B*, 1033-1034, pp.172-179.
- Unión Europea. Decisión de la Comisión 2002/657/CE, del 12 de agosto de 2002. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 17 de agosto de 2002, pp. L 221/8- L 221/36
- Uruguay. Decreto 382/016, de 5 de diciembre de 2016. *Diario Oficial*, 13 de diciembre de 2016, No. 29.600, p. 17
- USDA - APHIS, 2008. *Antibiotic use on U.S. dairy operations, 2002 and 2007*. [En línea] [Consulta: 18 de setiembre de 2019] Disponible en: www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_AntibioticUse.pdf
- Van Boeckel, T., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. y Levin, S., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. En: *PNAS*, 112(18), pp.5649-5654.
- Wen, X., Jia, Y. y Li, J., 2010. Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*. En: *Journal of Hazardous Materials*, 177, pp.924-928.

Pérdida de solubilidad de sistemas modelo de aislado de proteínas de lactosuero, caseinato de calcio, lactosa e inulina por acción de la composición y el tratamiento térmico

Solubility loss of whey protein isolate, calcium caseinate, lactose and inulin model systems by action of composition and heat treatment

Perda de solubidade dos sistemas modelos de isolado de proteína do soro de leite, caseinato de cálcio, lactose e inulina devido à composição e tratamento térmico

RECIBIDO: 9/9/2019 → APROBADO: 3/12/2019 ✉ marodrig@latitud.org.uy

✉ RODRÍGUEZ ARZUAGA, MARIANA (1,2); AÑÓN, MARÍA CRISTINA (2);
ABRAHAM, ANALÍA GRACIELA (2)

(1) LATITUD, FUNDACIÓN LATU, MONTEVIDEO, URUGUAY.

(2) CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN CRIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
(CIDCA), LA PLATA, BUENOS AIRES, ARGENTINA.

RESUMEN

Las proteínas del lactosuero son sometidas a calor durante la producción de fórmulas infantiles. Su desnaturalización y agregación puede reducir la solubilidad, lo que tiene connotaciones funcionales, tecnológicas y nutricionales en el producto final. En este trabajo se estudió el efecto del tratamiento térmico y la presencia de caseína, lactosa e inulina –en las proporciones utilizadas en fórmulas infantiles– en la solubilidad de las proteínas. Dispersiones acuosas de aislado de proteínas del lactosuero (WPI), con o sin caseinato de calcio (CAS), inulina (INUL) y lactosa (LAC) se analizaron antes (STT) y luego del tratamiento térmico (TT) a 66 °C, 75 °C y 85 °C durante 30 o 60 min. Los sistemas STT con mayor solubilidad fueron WP ($89,3 \pm 2,0\%$ m/m) y WP-INUL ($89,6 \pm 1,8\%$ m/m). La solubilidad de WP disminuyó con TT a partir de 75 °C -30 min y alcanzó una solubilidad mínima de $41,7 \pm 1,2\%$ m/m luego de 85 °C -60 min. WP - INUL mostró la misma tendencia. WP - LAC redujo su solubilidad

con TT, aunque la caída en la solubilidad luego de 75 °C -60 min fue menor que en el sistema sin lactosa. CAS impidió la pérdida de solubilidad, que aumentó con TT hasta 75 °C -60 min (alcanzando 100% m/m en WP - CAS). Este estudio provee información relevante sobre el rol de los principales ingredientes no grasos de fórmulas infantiles en la pérdida de solubilidad de las proteínas del lactosuero.

PALABRAS CLAVE: desnaturalización, agregación, fórmulas infantiles, proteínas, leche.

ABSTRACT

Whey proteins are heated during production of infant formulae. The denaturation and aggregation of whey proteins can reduce their solubility, with functional, technological and nutritional implications. In the current work, the effect of heat treatment and presence of casein, lactose and inulin, at the proportions used during production of infant formula, on the protein solubility was studied. Aqueous whey protein isolate (WPI) dispersions with or without calcium caseinate (CAS), inulin (INUL) and lactose (LAC) were prepared. Unheated (UH) and heated (HT) dispersions at 66, 75 and 85 °C for 30 and 60 min were analyzed. The UH systems with the highest solubility were WP ($89.3 \pm 2.0\%$ w/w) and WP - INUL ($89,6 \pm 1,8\%$ w/w). Solubility of WP decreased with HT from 75 °C -30 min, reaching the minimum solubility ($41,7 \pm 1.2\%$ w/w) after 85 °C -60 min. WP-INUL showed the same trend. Solubility of WP-LAC decreased with HT, although the solubility loss after HT 75 °C -60 min was lower than in the system without lactose. CAS presence prevented the loss of protein solubility, which increased with HT until 75 °C -60 min (reaching 100% w/w in the WP - CAS system). This study provides relevant information on the role of the main non-fatty ingredients of infant formulae in the loss of solubility of whey proteins.

KEYWORDS: denaturation, aggregation, infant formulae, proteins, milk.

RESUMO

As proteínas do soro de leite são submetidas ao calor durante a produção de fórmulas para bebês. Sua desnaturação e agregação podem reduzir a solubilidade, que possui conotações funcionais, tecnológicas e nutricionais no produto final. Neste trabalho estudamos o efeito do tratamento térmico e a presença de caseína, lactose e inulina, nas proporções utilizadas nas fórmulas infantis, na solubilidade das proteínas. Dispersões aquosas de isolado de proteínas do soro de leite (WPI) foram preparadas, com ou sem caseinato de cálcio (CAS), inulina (INUL) e lactose (LAC). As dispersões foram analisadas antes (STT) e após tratamento térmico (TT) a 66 °C, 75 °C e 85 °C por 30 ou 60 min. Os sistemas STT com maior solubilidade foram WP ($89,3 \pm 2,0\%$ m/m) e WP-INUL ($89,6 \pm 1,8\%$ m/m). A solubilidade do WP diminuiu gradualmente com o TT de 75 °C -30 min, atingindo uma solubilidade mínima de $41,7 \pm 1,2\%$ m/m após 85 °C -60 min. WP - INUL mostrou a mesma tendência. O WP - LAC reduziu sua solubilidade com TT, embora a queda na solubilidade após TT 75 °C -60 min foi menor do que no sistema sem lactose. A presença de CAS impediu a perda de solubilidade da proteína, que aumentou com o TT até 75 °C -60

min (atingindo 100% m/m no sistema WP-CAS). Este estudo fornece informações relevantes sobre o papel dos principais ingredientes não gordurosos das fórmulas infantis na perda de solubilidade das proteínas do soro de leite.

PALAVRAS-CHAVE: desnaturação, agregação, fórmulas infantis, proteína, leite.

INTRODUCCIÓN

La leche humana es considerada el mejor alimento para los recién nacidos. Sin embargo, hay algunas situaciones en las que debe sustituirse o complementarse con fórmulas infantiles (Sabater, et al., 2016). Las fórmulas infantiles de inicio, destinadas a niños de hasta seis meses, están normalmente formuladas en base a leche bovina descremada adicionada de proteínas del lactosuero, lactosa, aceites vegetales, oligosacáridos, vitaminas y minerales, en concentraciones diseñadas para imitar el perfil nutricional de la leche materna. Las importantes diferencias composicionales entre las leches bovina y materna hacen necesaria la suplementación de la primera para la obtención de fórmulas infantiles con el perfil nutricional adecuado. La leche de vaca contiene una concentración de proteína total mayor que la leche humana, por lo que suele agregarse lactosa, pero también presenta una menor relación proteínas del lactosuero/caseínas que hace necesaria la fortificación con proteínas del lactosuero. Otra importante diferencia composicional es la presencia de oligosacáridos, que en la leche humana representan el tercer componente mayoritario, mientras que en la leche bovina se encuentra a nivel de trazas (Kunz y Rudloff, 2008; Fenelon, et al., 2019). Los oligosacáridos permitidos en la normativa europea vigente sobre fórmulas infantiles son los galacto-oligosacáridos (GOS) y los fructo-oligosacáridos (FOS) de cadena larga, o inulina con un grado de polimerización superior a 10 (Boehm, 2013; Unión Europea, 2016).

Durante la producción de fórmulas infantiles, la aplicación de tratamientos térmicos es una práctica común para asegurar la calidad microbiológica y prolongar la vida útil del producto. La intensidad de los tratamientos es variable, pero los más severos pueden derivar en desnaturalización de las proteínas del lactosuero, agregación y, finalmente, pérdida de solubilidad. La estabilidad térmica reviste gran importancia cuando concentrados lácteos o fórmulas infantiles son calentados antes del secado spray (Huppertz, 2016).

Las proteínas del lactosuero se caracterizan por su solubilidad, propiedades tecno-funcionales (emulsionantes, espumantes, gelificantes, capacidad de retención de agua) y su excelente valor nutricional debido a una combinación balanceada de aminoácidos esenciales y un alto *score* de digestibilidad (de Wit, 1998; Bouaouina, et al., 2006). Sin embargo, las proteínas deben ser solubles, de lo contrario sus propiedades funcionales se ven negativamente afectadas y su digestibilidad y biodisponibilidad reducidas (Anandharamakrishnan, et al., 2008; Pellegrino, et al., 2013). La pérdida de solubilidad durante el calentamiento depende de las condiciones del tratamiento térmico (temperatura, tiempo y tipo de calentamiento) pero también del pH, fuerza iónica, concentración proteica, presencia de otros componentes, entre

otros (Packard y Morris, 1984; de Wit y Klarenbeek, 1984; Anandharamakrishnan, et al., 2008).

Dado que durante la producción de fórmulas infantiles están presentes componentes ausentes naturalmente en la leche bovina, y que la concentración relativa de proteínas del lactosuero/caseína y proteína total/lactosa está alterada, resulta de interés estudiar el efecto individual de cada uno de estos componentes en la pérdida de solubilidad de las proteínas del lactosuero durante su calentamiento. Por lo tanto, se propone como objetivo determinar los efectos de la composición y el tratamiento térmico en la pérdida de solubilidad proteica de sistemas modelo con WPI, caseína, lactosa y/o inulina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para la preparación de los sistemas modelo se utilizaron como ingredientes: aislado de proteínas del lactosuero (WPI, Provon® 292, Glanbia Nutritionals Inc, Fritchburg, USA), caseinato de calcio (Lactoprot, Kalttenkirchen, Alemania), lactosa (Variolac® 850, Arla, Viby J, Dinamarca) e inulina con polimerización promedio ≥ 10 (Orafiti® GR, Beneo, Tienen, Bélgica). El contenido de proteína bruta (Nitrógeno total $\times 6,38$), determinado por el método de Kjeldahl (International Organization for Standardization, 2014), fue 86,99% (m/m) en el WPI, 88,39% (m/m) en el caseinato de calcio y 2,03% (m/m) en la lactosa.

Para la preparación del reactivo de Bradford se utilizó Coomassie Azul Brillante G250 (Merck, Burlington, Massachusetts, USA). Para la preparación de soluciones estándar se utilizó seroalbúmina bovina (BSA; Merck, Burlington, Massachusetts, USA) y el WPI y caseinato de calcio con los que fueron preparados los sistemas modelo.

Preparación de los sistemas modelo

Se prepararon dispersiones acuosas que contenían WPI solo y con el agregado de caseinato de calcio, lactosa o inulina y todas sus combinaciones. Los cálculos de las concentraciones de los componentes individuales se realizaron de manera de obtener 25% (m/v) de sólidos totales en una mezcla húmeda con la formulación completa (proteínas del lactosuero, caseínas, lactosa, inulina y aceite). El aceite fue excluido de este estudio. La concentración de los componentes individuales se calculó en base al Reglamento Delegado (UE) 2016/127 (Unión Europea, 2016). En todos los sistemas modelo se mantuvieron fijas las relaciones másicas 1:5 de proteína total:lactosa y 60:40 de proteínas del lactosuero:caseína. La concentración de inulina utilizada corresponde al máximo nivel permitido de oligosacáridos totales en la normativa europea (Unión Europea, 2016).

Considerando el nivel de proteína total de cada componente, los insumos previamente pesados (Tabla 1) se agregaron lentamente a aproximadamente 300 mL de agua destilada a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) en agitación magnética.

El orden de agregado de los componentes fue el siguiente: WPI - Caseinato de calcio - Lactosa - Inulina. Una vez incorporados los componentes, se agregó agua hasta un volumen final de 500 mL y se continuó agitando durante 30 min.

TABLA 1. Composición de los sistemas modelo para ensayos de solubilidad proteica.

Sistema modelo	Proteína del lactosuero (% m/v) ¹	Proteína de caseína (% m/v) ²	Lactosa (% m/v) ³	Inulina (% m/v)	Sólidos totales (% m/v)
WP	1,8	0,0	0,0	0,0	2,1
CAS	0,0	1,2	0,0	0,0	1,4
WP - CAS	1,8	1,2	0,0	0,0	3,4
WP - LAC	1,8	0,0	15,1	0,0	19,0
WP - INUL	1,8	0,0	0,0	1,5	3,6
WP - CAS - LAC	1,8	1,2	15,1	0,0	20,4
WP - CAS - INUL	1,8	1,2	0,0	1,5	4,9
WP - LAC - INUL	1,8	0,0	15,1	1,5	18,7
WP - CAS - LAC - INUL	1,8	1,2	15,1	1,5	20,1

¹Corresponde al contenido de proteína en el ingrediente WPI agregado.

²Corresponde al contenido de proteína en el ingrediente caseinato de calcio agregado.

³Corresponde al contenido de la lactosa en el ingrediente lactosa agregado.

Tratamientos térmicos

Las muestras se dividieron en submuestras de 40 mL en tubos Falcon de 50 mL de capacidad. Cada una de las submuestras se sometió a los siguientes tratamientos: 66 °C -30 min, 66 °C -60 min, 75 °C -30 min, 75 °C -60 min, 85 °C -30 min, 85 °C -60 min y sin tratamiento térmico (STT). El mínimo tratamiento térmico (66 °C -30 min) se seleccionó por corresponder a la pasteurización en batch para productos lácteos con un nivel de sólidos totales superior a 18% (Food and Drug Administration, 2017). Los tratamientos térmicos se realizaron en baño de agua con agitación (JP Selecta, Barcelona, España). Una vez cumplido el tiempo de calentamiento, las muestras se enfriaron rápidamente en baño de hielo y se llevaron a cámara de refrigeración (2 °C) por 16 h.

Solubilidad proteica

La solubilidad proteica en los sistemas modelo se determinó de acuerdo a la Ecuación 1.

$$\text{Solubilidad proteica (\%,m/m)} = \frac{\text{Contenido de proteína soluble}}{\text{Contenido de proteína total}} \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde: el contenido de proteína total se calculó como la suma del contenido de proteína total (determinada por Kjeldahl) de cada uno de los ingredientes presentes en el sistema y el contenido de proteína soluble se determinó por el método de Bradford (1976).

Cuantificación de proteína soluble

Para la cuantificación de proteína soluble, cada sistema modelo se centrifugó durante 20 min a 10.000 x g a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) y se midió el contenido de proteína en el sobrenadante por el método de Bradford (1976).

Preparación de reactivo de Bradford

100 mg de Coomassie Azul Brillante G250 se diluyeron en 50 mL de etanol 95% (v/v) y 100 mL de ácido fosfórico 85% (m/m), antes de llevar a un volumen final de 1000 mL con agua destilada. El reactivo se conservó al resguardo de la luz.

Procedimiento analítico

100 µL de una dilución correspondiente del sobrenadante y 1000 µL de reactivo de Bradford, previamente filtrado a través de papel Whatman N°1, se mezclaron en un tubo Eppendorf y a los 10 min se midió la absorbancia a 595 nm (espectrofotómetro Shimadzu UV - 2550, Tokio, Japón). Para el cálculo de la concentración de proteína soluble se utilizaron distintas curvas de calibración según la composición proteica del sistema modelo.

Curvas de calibración

Se prepararon soluciones estándar de BSA (0,35 µg µL⁻¹), WPI (0,36 µg µL⁻¹), caseinato de calcio (0,31 µg µL⁻¹) y WPI : caseinato de calcio en relación 60:40 (0,15 µg WPI µL⁻¹ y 0,096 µg caseinato de calcio µL⁻¹), en agua destilada.

En tubos Eppendorf se agregaron volúmenes de solución patrón de entre 0 y 100 µL y el volumen de agua destilada correspondiente para completar 100 µL. En cada tubo se agregó 1000 µL de reactivo de Bradford, se agitó y se midió la absorbancia a 595 nm luego de 10 min de reposo. Cada punto de las curvas se determinó por triplicado. Se obtuvieron las cuatro curvas de calibración ($A_{595 \text{ nm}}$ en función de la masa de proteína expresada en µg), que se utilizaron para el cálculo del contenido

de proteína soluble. Las curvas de calibración se obtuvieron por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados utilizando el software Microsoft® Excel® 2013.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para comparar los resultados entre los distintos sistemas o tratamientos. Se aplicó el test de Tukey ($P < 0,05$) para detectar diferencias significativas entre sistemas o tratamientos. Los análisis de datos se realizaron en el software Statgraphics Centurion XV (Addinsoft, New York, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Adaptación del método de Bradford

El método de Bradford es una técnica rápida, sencilla, con alta sensibilidad y con muy pocas interferencias para la cuantificación de proteínas (Kamizake, et al., 2003), hecho por el cual se seleccionó para este estudio.

La seroalbúmina bovina (BSA) es comúnmente utilizada como estándar para la construcción de las curvas de calibración debido a que está disponible en su forma pura y su precio es accesible. Además, el hecho de ser ampliamente utilizada facilita la comparación con resultados con estudios previos. Sin embargo, la utilización de BSA como estándar puede subestimar el contenido proteico debido a que presenta una tinción inusualmente alta en el ensayo de Bradford. Por otro lado, la respuesta del método a las distintas proteínas es muy variable (Kruger, 1994). Por lo tanto, teniendo en cuenta que en este estudio la composición proteica difiere entre los distintos sistemas modelo, se decidió cuantificar la proteína soluble en cada sistema utilizando una curva construida con una solución de igual composición proteica que el sistema en cuestión. En la Figura 1 se presentan las curvas de calibración obtenidas para cada solución patrón. La curva de calibración obtenida con la solución patrón de BSA obtuvo la mayor pendiente, mientras que para una concentración dada de proteína total la curva de WPI presentó una absorbancia mucho menor. Por lo tanto, la utilización de una curva de BSA para todos los sistemas modelo redundaría en una subestimación del contenido de proteína.

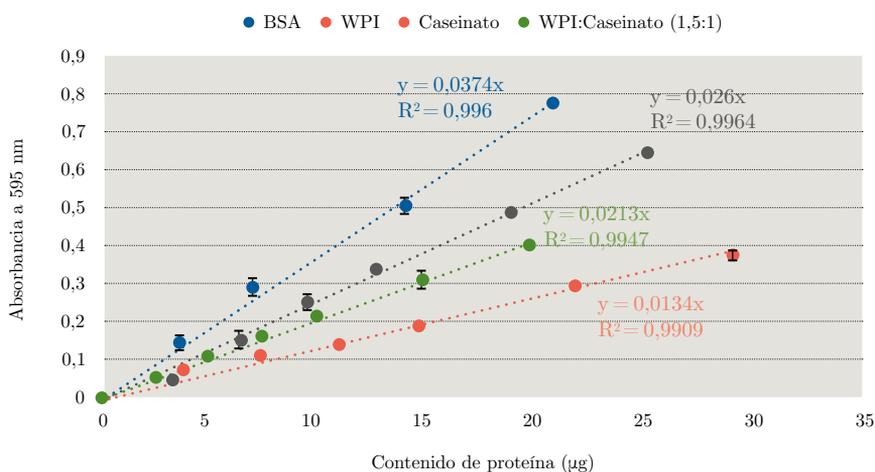


Figura 1. Curvas de calibración para el método de Bradford obtenidas con soluciones patrón de seroalbúmina bovina (BSA), aislado de proteínas del lactosuero (WPI), caseinato de calcio y WPI:caseinato en relación 1,5:1.

Efecto de la composición en la pérdida de solubilidad de los sistemas modelo

Los sistemas sin tratar térmicamente (STT) con mayor solubilidad proteica fueron WP ($89,3 \pm 2,0\%$ m/m) y WP - INUL ($89,6 \pm 1,8\%$ m/m). Tanto el agregado de caseinato como de lactosa provocaron una reducción significativa de la solubilidad (Figura 2). La lactosa se encuentra en una proporción muy alta en los distintos sistemas (Tabla 1). Por lo tanto, la pérdida de solubilidad puede explicarse por una menor proporción de agua disponible para solubilizar las proteínas. El sistema CAS presentó una solubilidad de $102,0 \pm 9,3\%$ m/m. Este resultado indica que la reducción de solubilidad obtenida en los sistemas que contenían caseína no se debe a una menor solubilidad del caseinato. Posiblemente las caseínas interaccionen con las proteínas presentes en el WP y formen agregados insolubles.

El sistema WP-CAS-LAC-INUL presentó la menor solubilidad ($63,2 \pm 2,3\%$ m/m). Este sistema contiene los cuatro componentes y, por lo tanto, tiene el mayor nivel de sólidos totales y la menor cantidad de agua disponible para la solubilización proteica.

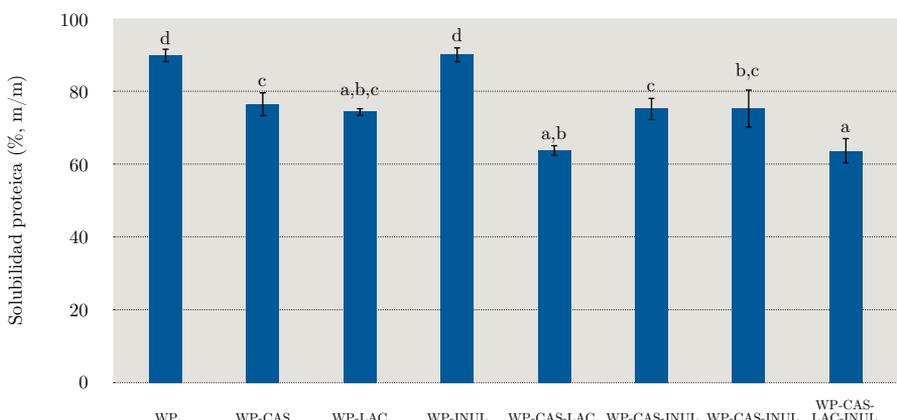


Figura 2. Solubilidad proteica de los sistemas modelo sin tratar térmicamente.

Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre sistemas.

Efecto del tratamiento térmico en la pérdida de solubilidad de los sistemas modelo

La solubilidad del sistema WP aumentó al tratarlo térmicamente a 66 °C. El tratamiento a 75 °C -30 min redujo la solubilidad en un 39%, luego se observó una disminución paulatina con el incremento de la intensidad del tratamiento térmico (Figura 3a). Las proteínas del lactosuero son proteínas globulares con altos niveles de estructura secundaria y terciaria y son, por lo tanto, susceptibles a desnaturalización. El mecanismo de desnaturalización de la β -lactoglobulina (proteína del lactosuero mayoritaria) ha sido ampliamente estudiado. A temperaturas de aproximadamente 65 °C la β -lactoglobulina sufre desnaturalización reversible, pero a temperaturas mayores a 70 °C comienza una serie de reacciones de agregación que conducen a una desnaturalización irreversible. Inicialmente las reacciones de agregación involucran la formación de enlaces disulfuro intermoleculares, mientras que en una segunda etapa también intervienen interacciones no covalentes, incluyendo enlaces hidrofóbicos e interacciones electrostáticas (Fox, et al., 2015).

El sistema WP - LAC presentó una pérdida de solubilidad mucho menor que WP hasta el tratamiento a 75 °C -60 min (12% respecto a la solubilidad inicial) y el descenso drástico se observó luego del tratamiento a 85 °C. Comparando el comportamiento de los sistemas WP y WP - LAC se observa que, si bien la solubilidad inicial del sistema WP - LAC es menor (debido al mayor contenido de sólidos), la presencia de lactosa reduce la pérdida de solubilidad de las proteínas del lactosuero (Figura 3a). De hecho, luego de un tratamiento térmico a 75 °C por 60 min el sistema WP presentó una solubilidad de 54,8% m/m mientras que la correspondiente al sistema WP - LAC fue 61,9% m/m. Este resultado es coincidente con reportes previos. Anema et al. (2006) determinaron que al aumentar la concentración de lactosa, la velocidad de desnaturalización irreversible, tanto de la β -lactoglobulina como de la α -lactalbúmina, disminuye. Los autores

explicaron este efecto por la teoría de la hidratación preferencial, de acuerdo a la cual la presencia de azúcares en niveles altos favorece la autoasociación de las proteínas. Esta autoasociación reduce el área superficial total y la energía libre del sistema. La disociación del dímero de β -lactoglobulina es el primer paso en la desnaturalización irreversible, por lo tanto, estos autores indican que el efecto estabilizador de la lactosa se debe a un cambio del equilibrio monómero-dímero, lo que favorece la presencia de estos últimos. Dissanayake et al. (2013) también observaron que la adición de lactosa aumenta la resistencia de las proteínas del lactosuero a la desnaturalización durante la aplicación de altas presiones hidrostáticas. Los autores concluyeron que la lactosa favorece las interacciones intramoleculares dentro de la estructura globular compacta de las moléculas proteicas, que de esta forma presentan menor reactividad en ambientes acuosos. Por otro lado, luego de calentamientos prolongados de proteínas y azúcares reductores, tales como la lactosa, si las condiciones de pH y actividad acuosa para la reacción de Maillard están dadas, los conjugados formados entre el grupo amino libre de la proteína y el extremo reductor del azúcar pueden inducir la formación de agregados insolubles (Cardoso, et al., 2019). Sin embargo, en este estudio no se observaron cambios de color durante el calentamiento de los sistemas modelo que contenían lactosa, lo que indicaría presencia de compuestos formados en etapas avanzadas de la reacción de Maillard. Probablemente esto se deba a que la actividad acuosa no era lo suficientemente baja como para propiciar la reacción.

Por otro lado, la presencia de inulina no redujo la pérdida de solubilidad de las proteínas del lactosuero. La solubilidad del sistema WP-INUL se mantuvo estable hasta el tratamiento 75 °C-30 min que produjo una reducción del 24,4%. A su vez, el sistema WP-LAC-INUL presentó un comportamiento similar al de WP-LAC, por lo que se puede concluir que el efecto protector de la lactosa se mantiene en presencia de inulina (Figura 3a).

Para estudiar el efecto del agregado del caseinato fue necesario estudiar la solubilidad y resistencia térmica de un sistema compuesto únicamente por caseinato de calcio (CAS). Como se observa en la Figura 4, este sistema mantuvo una solubilidad cercana al 100% m/m que no varió significativamente al aplicar los distintos tratamientos térmicos. Este resultado se explica por la alta resistencia térmica de las caseínas, las cuales no son susceptibles a desnaturalización térmica. Se ha reportado que el caseinato de sodio puede ser sometido a temperaturas superiores a 140 °C por más de 1 h sin que se observe ningún cambio fisicoquímico (Fox, et al., 2015). Sin embargo, el agregado de CAS produjo cambios en la resistencia térmica de las proteínas del lactosuero (Figura 3b). En los sistemas WP-CAS y WP-CAS-INUL se observó un incremento de la solubilidad proteica al aumentar la intensidad del tratamiento. Al comparar los resultados de WP-CAS y WP-CAS-INUL con sistemas similares sin caseinato (WP y WP-INUL), se observa claramente que en presencia de caseinato no hay una pérdida drástica de la solubilidad luego del tratamiento 75 °C-30 min. Incluso luego de un tratamiento muy severo, como el de 85 °C-60 min, el sistema WP-CAS presentó una solubilidad del 93,2% m/m (52% más alta que la de WP luego del mismo tratamiento) y WP-CAS-INUL una solubilidad

del 95,2% m/m (53% más alta que la de WP - INUL luego del mismo tratamiento). Cuando la β -lactoglobulina se desnaturaliza, su grupo reactivo sulfhidrilo se expone y puede participar de reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro con otras proteínas del lactosuero desnaturalizadas y con la α -caseína y/ la α_2 -caseína, debido a que estas caseínas contienen residuos de cistina (Wijayanti, et al., 2019). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio sugieren la existencia de una asociación preferencial entre las proteínas del lactosuero y las caseínas, lo que evitaría la formación de grandes agregados entre proteínas del lactosuero e impide su pérdida de solubilidad. Similarmente, otros autores han reportado que los agregados formados en presencia de caseínas y proteínas del lactosuero son de menor tamaño que aquellos formados por proteínas del lactosuero en ausencia de caseínas (Mounsey y O'Kennedy, 2009; Kehoe y Foegeding, 2011; Gaspard, et al., 2017).

Por último, en los sistemas con caseinato y lactosa (WP - CAS - LAC y WP - CAS - LAC - INUL) la solubilidad se mantuvo constante ($P > 0,05$) hasta luego del tratamiento 75 °C-60 min y presentó una reducción al tratarlos a 85 °C (Figura 3b).

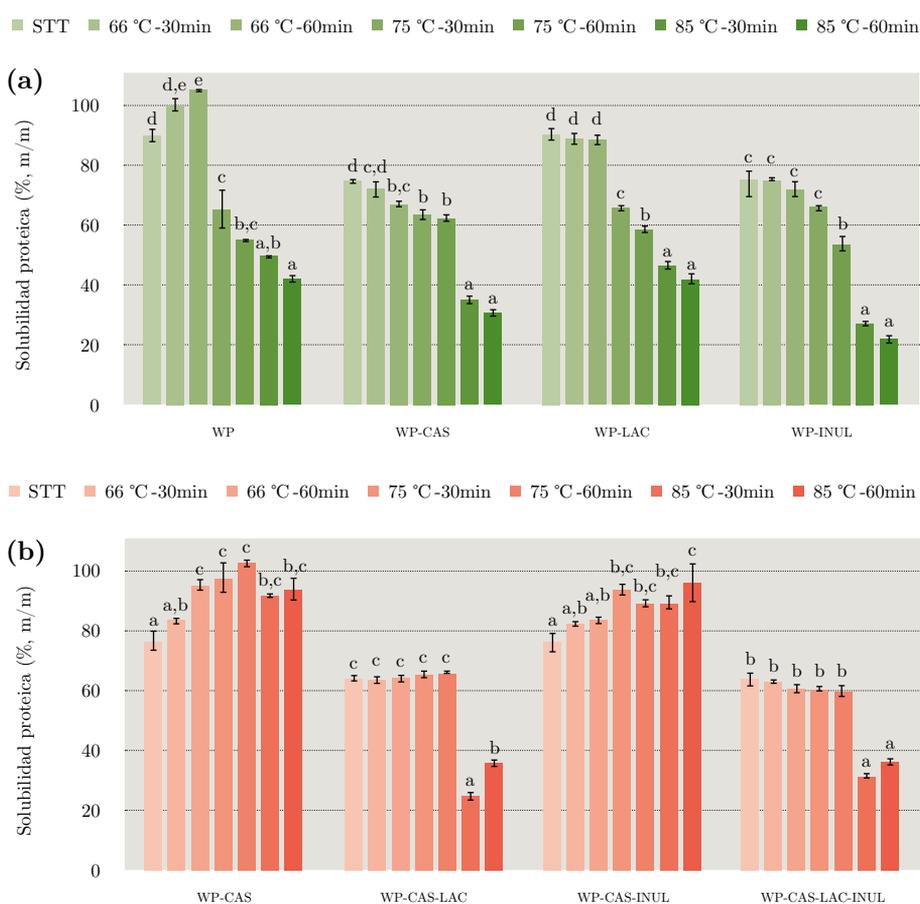


Figura 3. Solubilidad proteica de los sistemas modelo con WP (a) y WP - CAS (b) sin tratar térmicamente y tratados a 66, 75 y 85 °C por 30 y 60 min.

Letras distintas dentro de un mismo sistema indican diferencia significativa ($P < 0,05$) entre tratamientos.

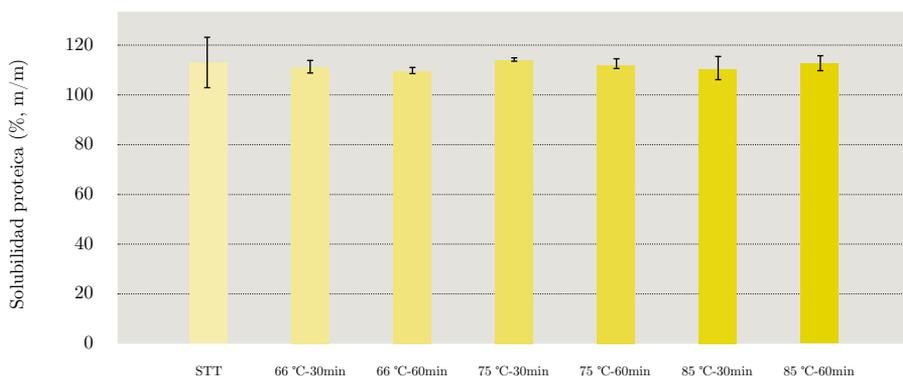


Figura 4. Solubilidad proteica del sistema CAS sin tratar térmicamente y tratado a 66, 75 y 85 °C por 30 y 60 min.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que las proteínas del lactosuero presentan alta solubilidad en agua en sistemas sin tratar térmicamente y tratados a 66 °C durante al menos 60 min. Sin embargo, esta solubilidad cae abruptamente cuando el sistema es calentado a 75 °C por 30 min. La presencia de lactosa, a pesar de disminuir la solubilidad inicial del sistema, redujo la pérdida de solubilidad obtenida a 75 °C. A su vez, la presencia de caseína, en la proporción encontrada en fórmulas infantiles, impidió la pérdida de solubilidad, y se obtuvo un 100% m/m de solubilidad en el sistema WP - CAS, incluso luego de un tratamiento a 75 °C por 60 min (47% mayor que en el sistema sin caseína). Finalmente, la presencia de inulina no afectó la solubilidad proteica en las condiciones estudiadas. Este estudio provee información relevante sobre el rol de los principales ingredientes no grasos de fórmulas infantiles y de las condiciones del tratamiento térmico en la pérdida de solubilidad de las proteínas del lactosuero. Futuros trabajos deberían centrarse en investigar los cambios conformacionales que ocurren durante el tratamiento térmico de los distintos sistemas modelo y que explican su pérdida de solubilidad.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos a L&G S.A. (Montevideo, Uruguay) por la donación de la inulina utilizada en este estudio.

Este trabajo fue financiado por Latitud, Fundación LATU.

REFERENCIAS

- Anandharamakrishnan, C., Rielly, C.D. y Stapley, A.G.F., 2008. Loss of solubility of α -lactalbumin and β -lactoglobulin during the spray drying of whey proteins. En: *LWT*, 41, pp.270-277.
- Anema, S.G., Kim Lee, S. y Klostermeyer, H., 2006. Effect of protein, nonprotein-soluble components, and lactose concentrations on the irreversible thermal denaturation of β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin in skim milk. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), pp.7339-7348.
- Boehm, G., 2013. Soluble and insoluble fibre in infant nutrition. En: Delcour, J.A. y Poutanen, K., eds. *Fibre-rich and wholegrain foods*. Oxford: Woodhead Publishing, pp.421-449. ISBN: 0857090380.
- Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C. y Legrand, J., 2006. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. En: *International Dairy Journal*, 16, pp.275-284.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. En: *Analytical Biochemistry*, 72, pp.248-254.
- Cardoso, H.B., Wierenga, P.A., Gruppen, H. y Schols, H.A., 2019. Maillard induced aggregation of individual milk proteins and interactions involved. En: *Food Chemistry*, 276, pp.652-661.
- de Wit, J.N., 1998. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. En: *Journal of Dairy Science*, 81, pp.597-608.
- de Wit, J.N. y Klarenbeek, G., 1984. Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. En: *Journal of Dairy Science*, 67, pp.2701-2710.
- Dissanayake, M., Kasapis, S., George, P., Adhikari, B., Palmer, M. y Meurer, B., 2013. Hydrostatic pressure effects on the structural properties of condensed whey protein/lactose systems. En: *Food Hydrocolloids*, 30, pp.632-640.
- Fenelon, M.A., Hickey, R.M., Buggy, A., McCarthy, N. y Murphy, E.G., 2019. Whey proteins in infant formula. En: Deeth, H.C. y Bansal, N., eds. *Whey proteins*. Cambridge: Academic Press, pp.439-494. ISBN: 9780128121245.
- Food and Drug Administration, 2017. *Grade "A" pasteurized milk ordinance*. Rockville: FDA.
- Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H. y O'Mahony, J.A., 2015. *Dairy chemistry and biochemistry*. 2da ed. New York: Springer. ISBN: 978-3-319-14892-2.
- Gaspard, S.J., Auty, M.A.E., Kelly, A.L. y Mahony, J.A.O., 2017. Isolation and characterisation of κ -casein / whey protein particles from heated milk protein concentrate and role of κ -casein in whey protein aggregation. En: *International Dairy Journal*, 73, pp.98-108.
- Huppertz, T., 2016. Heat stability of milk. En: McSweeney, P.L.H. y O'Mahony, J.A., eds. *Advanced dairy chemistry. Vol. 1B: proteins: applied aspects*. 4ta ed. New York: Springer. pp.179-196. ISBN: 978-1-4939-2799-9.
- International Organization for Standardization, 2014. ISO 8968-1: *Milk and milk*

- products. Determination of nitrogen content. Part 1. Determination of nitrogen content using the Kjeldahl method.* Ginebra: ISO.
- Kamizake, N.K.K., Goncalves, M.M., Zaia, C.T.B.B. y Zaia, D.A.M., 2003. Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. En: *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, pp.507-516.
- Kehoe, J.J. y Foegeding, E.A., 2011. Interaction between β -casein and whey proteins as a function of pH and salt concentration. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, pp.349-355.
- Kruger, N.J., 1994. The Bradford method for protein quantitation. En: Walker, J.M., ed. *Basic protein and peptide protocols. Methods in molecular biology.* Totowa: Humana Press. pp. 9-15. ISBN: 0896032698.
- Kunz, C. y Rudloff, S., 2008. Potential anti-inflammatory and anti-infectious effects of human milk oligosaccharides. En: Bösze, Z., ed. *Bioactive components of milk.* New York: Springer. pp.455-466. (Advances in experimental medicine and biology). ISBN: 1441925457.
- Mounsey, J.S. y O’Kennedy, B.T., 2009. Stability of β -lactoglobulin/micellar casein mixtures on heating in simulated milk ultrafiltrate at pH 6.0. En: *International Journal of Dairy Technology*, 62, pp.493-499.
- Packard, V.S. y Morris, H.A., 1984. Effect of processing on whey protein functionality. En: *Journal of Dairy Science*, 67, pp.2723-2733.
- Pellegrino, L., Masotti, F., Cattaneo, S., Hogenboom, J.A. y de Noni, I., 2013. Nutritional quality of milk proteins. En: McSweeney, P.M.H. y Fox, P.F., eds. *Advanced dairy chemistry. Volume 1A: proteins: basic aspects.* 4ta ed. New York: Springer, pp.515-538. ISBN: 978-1-4614-4713-9.
- Sabater, C., Prodanov, M., Olano, A., Corzo, N. y Montilla, A., 2016. Quantification of prebiotics in commercial infant formulas. En: *Food Chemistry*, 194, pp.6-11.
- Unión Europea. *Reglamento Delegado (UE) 2016/127, del 25 de setiembre de 2015.* *Diario Oficial de la Unión Europea*, 02 de febrero de 2016, pp. L 25/1- L 25/29
- Wijayanti, H.B., Brodkorb, A., Hogan, S.A. y Murphy, E.G., 2019. Thermal denaturation, aggregation, and methods of prevention. En: Deeth, H.C. y Bansal, N., eds. *Whey proteins.* Cambridge: Academic Press, pp.185-247. ISBN: 9780128121245.

Estudio del contenido de selenio en carne vacuna luego del proceso de cocción

Study of the selenium content in beef after the cooking process

Estudo do teor de selênio na carne bovina após o processo de cozimento

RECIBIDO: 1/9/2019 → APROBADO: 4/12/2019 ✉ mpiston@fq.edu.uy

✉ PISTÓN, MARIELA (1); SILVA, JAVIER (1); SUÁREZ, ANALÍA (1); BELLUZZI, MARCELO (1); IAQUINTA, FIORELLA (1); PANIZZOLO, LUIS (2); MÉNDEZ, CARLOS (3); CERMINARA, MARCELO (4)

- (1) GRUPO DE ANÁLISIS DE ELEMENTOS TRAZA Y DESARROLLO DE ESTRATEGIAS SIMPLES PARA PREPARACIÓN DE MUESTRAS (GATPREM). ÁREA QUÍMICA ANALÍTICA, DEC, FACULTAD DE QUÍMICA. UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY.
- (2) ÁREA DE QUÍMICA DE ALIMENTOS, CYTAL, FACULTAD DE QUÍMICA. UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY.
- (3) INSTITUTO NACIONAL DE CARNES (INAC), GERENCIA DE CONTRALOR, ÁREA DE INOCUIDAD, MONTEVIDEO, URUGUAY.
- (4) IMERL, FACULTAD DE INGENIERÍA; DMMCC, FACULTAD DE CIENCIAS ECONÓMICAS. UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY.
-

RESUMEN

Se determinó el contenido de selenio (Se) antes y después del proceso de cocción en tres cortes de carne vacuna (asado, cuadril y bola de lomo) provenientes de 20 animales. Los distintos cortes fueron sometidos a dos puntos de cocción. Cada corte fue dividido en varias porciones y se realizó la cocción en plancha y horno. El tratamiento de las muestras consistió en una digestión asistida con microondas y posterior determinación de Se mediante espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas acoplado a generación de hidruros (HG-MIP OES). El método analítico propuesto fue validado, resultó adecuado para el fin definido y presentó ventajas respecto a los métodos habitualmente utilizados en los laboratorios de análisis.

Los puntos de cocción se establecieron evaluando la pérdida de peso (desde 8 hasta 35%). Los resultados indican que la carne vacuna aporta entre 20 y 26% del

requerimiento diario de Se de un adulto. Este porcentaje se mantiene sin cambios significativos aun luego de una pérdida de peso de hasta un 35%, por lo que se concluye que la cocción no influye en el aporte de selenio a la dieta.

PALABRAS CLAVE: Selenio, valor nutricional, carne vacuna, cocción.

ABSTRACT

Selenium (Se) content was determined, before and after the cooking process, in three cuts of beef (rib plate, rump and knuckle) from 20 animals. Each cut was divided into several portions and cooked in a cooking plate and oven. Sample preparation consisted of a microwave assisted digestion and subsequent determination of Se by means of atomic emission spectrometry with microwave induced plasma coupled with hydride generation (HG-MIP OES). The proposed analytical method was validated and resulted suitable for the purpose presenting advantages compared to the standard methods commonly used in food analysis.

The cooking points were established by evaluating the weight loss (from 8 to 35%). The results indicate that beef provides between 20 and 26% of the daily intake requirement of Se of an adult. It was observed that this percentage remains without significant changes even after a weight loss of up to 35%, thus concluding that cooking does not influence the contribution to the diet of this trace element.

KEYWORDS: Selenium, nutritional value, beef, cooking.

RESUMO

O teor de selênio (Se) foi determinado antes e após o processo de cozimento em três cortes de carne bovina (placa de costela, quadril e lombo) de 20 animais. Os diferentes cortes foram submetidos a dois pontos de cozimento. Cada corte foi dividido em várias porções e o cozimento foi feito em chapa e forno. O tratamento da amostra consistiu em digestão assistida por microondas e subsequente determinação de Se por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por microondas acoplado à geração de hidreto (HG-MIP OES). O método analítico proposto foi validado e adequado para a finalidade proposta, apresentando vantagens sobre os métodos comumente utilizados nos laboratórios de análise.

Os pontos de cozimento foram estabelecidos avaliando-se a perda de peso (de 8 a 35%). Os resultados indicam que a carne bovina fornece entre 20 e 26% da necessidade diária de Se de um adulto. Essa porcentagem permanece sem alterações significativas, mesmo após uma perda de peso de até 35%, portanto, conclui-se que o cozimento não influencia a contribuição do selênio na dieta.

PALAVRAS-CHAVE: Selênio, valor nutricional, carne bovina, cozimento.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha desarrollado en forma creciente el conocimiento acerca del papel que tienen en la nutrición humana diversos minerales traza (micronutrientes). Existe actualmente considerable investigación acerca del rol que juega el selenio (Se) en relación con la salud humana. El Se forma parte de metaloenzimas involucradas en diversos procesos metabólicos, tanto en animales como en vegetales (Hefnway, et al., 2008). Existen estudios que demuestran la asociación entre la deficiencia de Se y la aparición de ciertas enfermedades, entre ellas la enfermedad de Keshan (una afección cardíaca), la Enfermedad de Kashin-Beck (una osteoartropatía) y el cretinismo mixedematoso endémico, que causa retardo mental (Thomson, 2004; National Institute of Health, NIH, 2019). El RDA (Recommended Dietary Allowance) aceptado en Estados Unidos va desde 20 $\mu\text{g}/\text{día}$ para niños de hasta 3 años hasta 55 $\mu\text{g}/\text{día}$ para adultos. Estos valores se ven incrementados en el caso de la mujer embarazada o en el período de lactancia (Food and Nutrition Board, 2011).

La carne constituye una importante fuente de proteínas de alto valor biológico que proporciona todos los aminoácidos indispensables, fundamentales para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de las funciones vitales que permitirían un adecuado bienestar y salud. Es también una excelente fuente de micronutrientes (vitaminas, minerales y oligoelementos), que a menudo son limitantes en la dieta, como la vitamina A, hierro, zinc, cobre, selenio y otros compuestos bioactivos (Alfaia, et al., 2013).

Según las últimas estadísticas publicadas por el Instituto Nacional de Carnes (INAC), el 85% de las exportaciones de carne uruguaya corresponden a carne bovina (Instituto Nacional de Carnes, 2018). Además, Uruguay es uno de los países que más carne consume en el mundo, 100,9 kg/hab./año de las especies bovina, ovina, aviar y porcina, y se destaca en particular la carne bovina, con 59,2 kg/hab./año (Instituto Nacional de Carnes, 2018).

Los tratamientos térmicos pueden mejorar el valor nutricional de la carne, haciendo que aumente la bioaccesibilidad de los nutrientes o se generen pérdidas de estos por procesos de lixiviación (Lombardi Boccia, et al., 2005; Lopes, et al., 2015; Goran, et al., 2016). Existen dos estrategias generales de cocción por transferencia de calor que incluyen cocinar con calor seco o calor húmedo. Las cocciones en seco utilizan aire caliente para conducir el calor y los alimentos se cuecen en su propio jugo. Tales métodos de cocción incluyen horneado, asado y asado a la parrilla, métodos de cocción tradicionales que causan cambios inevitables en la cantidad de nutrientes disponibles (Alfaia, et al., 2013; Campo, et al., 2013; Domínguez, et al., 2015). Lombardi-Boccia et al. (2005) reportaron los porcentajes de retención para Fe, Cu y Zn de algunas carnes de Italia según el método de cocción y hallaron que para estos elementos el contenido total variaba luego de determinadas cocciones (Lombardi-Boccia, et al., 2005).

Se ha estudiado la distribución geográfica de los niveles de selenio en los suelos y se ha encontrado que algunos países, de forma notable China, presentan bajos niveles, asociados con la aparición de las enfermedades mencionadas anteriormente (Saadoun, et al., 2019). Investigadores uruguayos reportaron niveles de Se en cortes de carne vacuna de la raza Hereford y Bradford y encontraron valores de Se en

carne cruda que podrían aportar hasta el 100% del requerimiento diario para un adulto si se consumen 100 g (Cabrera, et al., 2010; Ramos, et al., 2012; Cabrera y Saadoun, 2014). No obstante, no se han encontrado reportes que aporten información sobre el contenido de este nutriente en el alimento luego de algún tipo de cocción.

Con el objetivo de evaluar cómo afecta la cocción aplicada a algunos cortes de carne vacuna de consumo popular en Uruguay, se estudió el porcentaje de retención del micronutriente luego de este proceso. Para ello se utilizó la ecuación descrita por Bognár y Piekarski (2000), en la que se relaciona la pérdida de peso que sufre el corte luego de la cocción y la concentración de selenio determinada (Bognár y Piekarski, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Las muestras de carne vacuna fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Carnes (INAC). La correspondencia entre la carne y sistema de alimentación fue corroborada mediante la conexión del Sistema Electrónico de Información de la Industria Cárnica (SEIIC) y el Sistema Nacional de Identificación Ganadera (SNIG), que garantizan la trazabilidad de todo el proceso. De allí también se obtuvo que la edad media de los animales fue de 25 meses (novillos y vaquillonas), con un peso en el rango de 109-153 kg (promedio de 139 kg) y procedentes principalmente de los departamentos de Soriano, Lavalleja y Florida.

Se muestrearon 20 medias canales con 36 horas de maduración sanitaria. El 50% de las medias canales provenían de animales con sistemas de alimentación terminados en pasturas, mientras que el otro 50% fue terminado a grano (feedlot). En el cuarteo se obtuvieron el asado, la herradura y el corte pistola. En las Figuras 1 y 2 se muestran los cortes de uno de los muestreos. El asado y el corte pistola fueron identificados mediante etiquetado para obtener correspondencia entre los cortes a bajar en el desosado (cuadril y bola de lomo) y los asados previamente separados. La etiqueta de trazabilidad (SEIIC) acompañó los cortes en todo el proceso (Figura 3).



Figura 1. Medias canales previo al cuarteo.



Figura 2. Pistolas en cuarteo.



Figura 3. Cortes identificados con etiqueta de trazabilidad (SEIIC).

En el desosado se bajaron los cortes y se retiraron de la línea de producción junto con la etiqueta de trazabilidad. Se extrajo una porción de aproximadamente 500 g de cada corte asado (centro de la parrilla costal), cuadril (Bíceps Femoral) y bola lomo (músculo Vastus Intermedius). Las porciones se etiquetaron, se envasaron al vacío y se llevaron a Facultad de Química en conservadoras refrigeradas.

En el laboratorio se realizó el deshuesado y desgrasado utilizando cuchillos de acero inoxidable (440C), y posteriormente se dividió cada corte en tres porciones de aproximadamente 100 g. Una de las porciones se analizó cruda y las otras dos se sometieron a cocción para luego ser analizadas. Tanto la porción cruda como las cocidas se homogenizaron y trituraron con picadora de cuchillas y fueron conservadas en tubo tipo Falcon® en freezer (-18 °C) hasta el momento del análisis.

Una vez trituradas las muestras se secaron en estufa a 103 °C según método AOAC 950.46 para obtener el producto seco y el contenido de humedad. Las muestras secas fueron molidas hasta obtener un polvo fino con molino de cuchillas (AOAC International, 2005).

Cocciones

Las cocciones se realizaron en plancha de aluminio con recubrimiento antiadherente Teflón® (Ufesa, modelo GR7451) y en horno eléctrico (Delne, modelo Te-5604 i). Se

pesaron las muestras de cada corte (asado, cuadril y bola de lomo) antes y después de la cocción para establecer la pérdida de peso en todos los casos. El proceso general consistió en sellar el corte en una plancha, como primera etapa, hasta alcanzar una determinada temperatura en el centro (Tabla 1) y posteriormente terminar la cocción en horno. La temperatura se controló en el centro de los cortes mediante una sonda de temperatura (ThermaQ): la temperatura de la plancha fue 300 °C y la del horno fue en promedio 250 °C.

Se buscó obtener dos puntos de cocción: poco cocido y muy cocido. En la Tabla 1 se resumen las condiciones de temperaturas de cocción según el corte para ambos puntos y en las Figuras 4 a 6 se muestra el aspecto del corte luego de la cocción.

TABLA 1. Condiciones de cocción. PC: poco cocido; MC: muy cocido.

Corte	Punto de cocción	Tiempo en plancha (min)	Temperatura al finalizar sellado (°C)	Tiempo en el horno (min)	Temperatura al sacar del horno (°C)	Tiempo total de cocción (min)
Asado	PC	4	50	5	75	9
Asado	MC	8	74	14	98	22
Cuadril	PC	8	24	12	53	20
Cuadril	MC	12	26	28	83	40
Bola de lomo	PC	7	34	11	64	18
Bola de lomo	MC	12	38	32	82	44

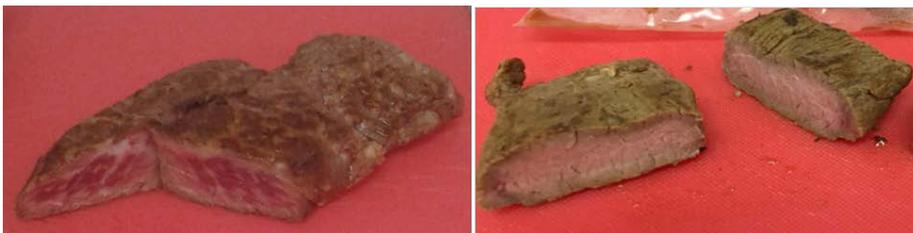


Figura 4. Cortes de asado poco cocido (izquierda) y muy cocido (derecha).



Figura 5. Cortes de cuadril poco cocido (izquierda) y muy cocido (derecha).



Figura 6. Cortes de bola de lomo poco cocidos (izquierda) y muy cocido (derecha).

Reactivos e instrumentación

El material utilizado fue previamente descontaminado utilizando una disolución de HNO_3 (Merck pa) 10% v/v. Los patrones de calibración de selenio se prepararon a partir de una disolución comercial de concentración 1000 mg L^{-1} (Carlo Erba). Se utilizó agua calidad I según norma ASTM (resistividad no menor a $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtenida de un sistema de purificación de agua Millipore®. La digestión de las muestras se realizó con HNO_3 ($4,5 \text{ mol L}^{-1}$). El ácido se obtuvo mediante un proceso de destilación *sub-boiling* (Milestone, subClean) a partir de ácido comercial. Todos los demás reactivos utilizados fueron de calidad para análisis o superior.

Para la evaluación de la veracidad de las determinaciones analíticas se utilizaron dos materiales de referencia certificados: uno de músculo bovino ERM-BB184 (provisto por el Institute for Reference Materials and Measurements, Comisión Europea) y otro de hígado bovino (SRM 1577c provisto por The National Institute of Standards and Technology, NIST).

Para las digestiones se utilizó un digestor de microondas (CEM, Mars 6) provisto con 12 vasos del tipo Easy Prep Plus®. Las determinaciones analíticas fueron realizadas en un espectrómetro de emisión atómica con plasma inducido por microondas (Agilent 4210 MIP OES) equipado con una antorcha estándar, y cámara de nebulización multimodo (MSIS®, Agilent) para generación de hidruros.

Tratamiento de las muestras

El tratamiento de las muestras desarrollado consistió en una digestión asistida por microondas: 0,5 g de muestra (seca y molida) se trataron con 10 mL de HNO_3 diluido $4,5 \text{ mol L}^{-1}$; el uso de ácidos diluidos para digestiones de muestras complejas ha sido validado por nuestro grupo en trabajos previos (Machado, et al., 2016). El programa de digestión fue: 15 minutos de calentamiento hasta $200 \text{ }^\circ\text{C}$, mantenimiento en $200 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos y enfriamiento posterior hasta temperatura ambiente (potencia 400-1800 W).

Una vez concluida la digestión se realizó una etapa de prerreducción para convertir cuantitativamente todo el analito al estado de oxidación IV para la posterior formación del hidruro correspondiente. Para esta etapa se tomaron 5 mL del digerido y se agregó HCl 37% (m/v) (relación muestra/ácido 1:1) en Erlenmeyer. La mezcla

se colocó en plancha calefactora (a ebullición controlada) durante 1 hora, posteriormente se dejó enfriar y se completó el volumen con agua ultrapura. La reducción en línea para la generación del hidruro correspondiente (H_2Se) fue realizada con $NaBH_4$ 2% (m/v) en $NaOH$ 0,5% (m/v).

Determinación de selenio

Las determinaciones se realizaron con la técnica de espectrometría de emisión atómica con generación de hidruros (HG MIP OES), a la longitud de onda de 196,026 nm. Las condiciones operativas fueron: caudal de nitrógeno $0,45 L min^{-1}$ (obtenido a partir de un generador Agilent 4107); velocidad de la bomba peristáltica 30 rpm; posición de observación de la antorcha -70, y tiempo de lectura 10 s.

Los patrones, las muestras y los blancos fueron sometidos al proceso de prerreducción descrito antes de la medición. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Dado que se trata de una técnica que no se utiliza como método estándar para esta determinación se realizó la correspondiente validación. Se evaluaron los principales parámetros de desempeño (linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y veracidad), siguiendo las recomendaciones de la Guía Europea de validación Eurachem (Magnusson y Örnemark, 2014).

Los porcentajes de retención de selenio luego de las cocciones fueron calculados utilizando la guía de Bognár y Piekarski publicada en el año 2000. Se trata de una guía informativa muy completa sobre la evaluación y cálculo de los porcentajes de retención de minerales (y otros nutrientes) en platos preparados luego de algún tipo de cocción, tomando como referencia una porción de 100 g y contemplando en el cálculo la pérdida de peso de la pieza durante el proceso de cocción (Bognár y Piekarski, 2000). La ecuación utilizada fue:

$$\%R = \frac{\text{Contenido del nutriente}/100 \text{ g de carne cocida} \times \text{peso (g) de la carne cocida}}{\text{Contenido del nutriente}/100 \text{ g de carne cruda} \times \text{peso (g) de la carne cruda}} \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Validación del método analítico

El uso de la técnica HG-MIP OES para la determinación de Se en muestras complejas es novedoso y se requiere la validación completa del método analítico antes de utilizarlo para cualquier aplicación. Se trata de una técnica alternativa a las utilizadas en los métodos citados en el compendio de normas AOAC Internacional (AOAC 986.15; AOAC International, 2016) que evita el uso de gases inflamables y costosos en el laboratorio. En la Tabla 2 se resumen los parámetros de desempeño obtenidos.

TABLA 2. Parámetros de desempeño de la validación analítica (Magnusson y Örnemark, 2014).

Parámetro	Resultado
Linealidad (rango estudiado)	5,0 - 50 $\mu\text{g L}^{-1}$
Límite de detección	0,032 mg kg^{-1} (1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$)
Límite de cuantificación	0,098 mg kg^{-1} (4,9 $\mu\text{g L}^{-1}$)
Precisión (RSD %, n = 6)	10%
Veracidad (% de recuperación comparado con el valor certificado de los materiales de referencia certificados)	76 - 93%

Cuando se trabajó con determinaciones del orden de las partes por billón (ppb), de acuerdo con la relación de Horwitz, la precisión y la veracidad obtenidas fueron buenas (Rivera y Rodríguez, 2010). El límite de cuantificación obtenido fue apropiado para la determinación de Se en muestras de carne, y se pudo determinar niveles muy bajos de este elemento, lo cual no había sido reportado antes en la literatura con esta técnica. Los resultados obtenidos fueron adecuados para los fines propuestos porque demuestran que el método es exacto (preciso y veraz) para la determinación de Se a nivel de trazas y que se puede utilizar como alternativa a los métodos estándar.

Contenido de selenio en carnes antes y después de la cocción

Se realizaron las determinaciones de Se en 180 muestras (tres cortes, crudos, poco cocidos y cocidos de 20 animales) y se obtuvieron los resultados que se resumen en la Tabla 3.

TABLA 3. Contenido de Se en diferentes cortes de carne vacuna (n = 20 para cada corte). Los resultados se expresan como el promedio de todos los animales \pm desviación estándar (base seca).

Corte	Crudo (mg/100 g)	Poco cocido (mg/100 g)	Muy cocido (mg/100 g)
Asado	0,038 \pm 0,004	0,038 \pm 0,004	0,044 \pm 0,004
Cuadril	0,041 \pm 0,004	0,043 \pm 0,004	0,047 \pm 0,005
Bola de lomo	0,044 \pm 0,005	0,041 \pm 0,005	0,044 \pm 0,005

Los resultados se expresan en base seca a los efectos de que puedan compararse entre los tres cortes, y puede observarse que el contenido de Se es bastante similar

en todos ellos. Estadísticamente se verificó que los valores, comparando los promedios entre cortes y según el punto de cocción, no difieren significativamente entre sí mediante test $t(0,05;20)$ ($t_{\text{tabla}} = 2,023$; $t_{\text{calculado}} = -0,118$).

El contenido en los cortes crudos es significativamente menor a los reportados por varios autores en publicaciones anteriores en carnes crudas uruguayas (Cabrera, et al., 2010; Ramos, et al., 2012; Cabrera y Saadoun, 2014). Estos autores reportaron niveles de selenio en el rango de 0,049 a 0,130 mg/100 g en base fresca (aproximadamente 0,20 a 0,52 mg/100 g base seca), sin embargo, se debe tener en cuenta que la variabilidad en el contenido de Se es muy grande según la edad de los animales y la zona donde fueron alimentados con pasturas. Como ejemplo se puede mencionar que durante los muestreos se recibieron cortes de dos animales de mayor edad (53 y 56 meses) y se notó un aumento en el contenido de Se (estos no fueron considerados en los resultados presentados). Por otra parte, los trabajos mencionados no se refieren a los mismos cortes, ni se describe claramente la edad de los animales. Los resultados obtenidos sí son concordantes con los reportados a nivel internacional (0,021-0,033 mg/100 g) en las tablas de alimentos noruegas NORFOODS (Norwegian Food Safety Authority, 2018) y con niveles reportados en Europa (Demirezen y Uruc, 2006).

No se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos de los animales cuya terminación fue con pastura o con grano (verificado mediante test t-Student, nivel de confianza 95%, $n = 10$ animales de cada sistema de alimentación).

A los efectos de evaluar la retención de Se en los diferentes cortes se tomaron como valores de partida aquellos obtenidos para los cortes crudos y se comparó con los obtenidos en los cortes cocidos. La ecuación de Bognár y Piekarski se aplicó para cada una de las muestras analizadas según la pérdida de peso de cada muestra durante la cocción. Los resultados obtenidos (porcentaje de retención, %R) según el corte y el punto de cocción se presentan en la Tabla 4. Cabe mencionar que resulta muy difícil alcanzar en todas las muestras el mismo porcentaje de pérdida de peso en cada punto, por lo cual se fue registrando y sistematizando el proceso para obtener siempre dos puntos bien definidos, tanto por el aspecto como por la temperatura, al final del proceso en el centro del corte (Tabla 1). Los resultados de %R obtenidos para cada corte y para cada punto de cocción se promediaron y se expresan en la Tabla 4. El procesamiento de las carnes se realizó tomando en consideración cómo lo haría un consumidor en su domicilio o en un restaurante. No se agregaron sal ni otros condimentos.

TABLA 4. Porcentaje de retención promedio de Se en cortes de carne vacuna según dos puntos de cocción (Bognár y Piekarski, 2000).

Corte	Poco cocido (pérdida de peso entre 8 y 12%)	Muy cocido (pérdida de peso entre 20 y 33%)
Asado	101 ± 8	104 ± 8
Cuadril	91 ± 7	83 ± 7
Bola de lomo	86 ± 7	90 ± 7

Considerando los resultados obtenidos y su correspondiente incertidumbre asociada, se puede observar que en general no existen pérdidas significativas del nutriente, aun cuando se alcanza un porcentaje de pérdida de masa de 33% (lo cual se corresponde con un punto bien cocido).

Información nutricional

Existen guías que reportan valores de ingestas dietéticas de referencia (IDR) y que contienen tablas con los niveles de ingesta recomendada de los oligoelementos, entre otras informaciones relevantes para la nutrición. El valor de IDR es el nivel promedio diario de ingesta suficiente por medio de la dieta necesario para satisfacer los requerimientos de nutrientes de casi todas las personas sanas (97-98%) en un grupo (National Institute of Health, NIH, 2011).

En la Tabla 5 se muestran los valores de IDR para Se según la etapa de la vida.

TABLA 5. IDR de Selenio en la dieta según las edades, expresadas en microgramos por día. Los grupos por edades se refieren a hombres y mujeres.

Grupos según edades	IDR $\mu\text{g}/\text{día}$
1 a 3 años	20
4 a 8 años	30
9 a 13 años	40
14 hasta más de 70 años	55
Embarazadas	60
Mujeres en etapa de lactancia	70

Los estudios sobre valor nutricional de un alimento deben evaluar las concentraciones de los nutrientes en la forma en que el alimento puede ser consumido, en el caso de la carne vacuna se consume cocida (el punto de cocción es a gusto del consumidor). Al analizar los resultados obtenidos, según el contenido de Se en cada corte y la cocción y la IDR por edades, es posible tener una idea del porcentaje de la necesidad diaria que este alimento puede cubrir. Para esto se consideró una porción de 100 g de carne en todos los casos. En la Tabla 6 se presentan los resultados.

TABLA 6. Porcentaje de la IDR cubierta según franja etaria por porción de 100 g del alimento cocido. PC: poco cocido, MC: muy cocido.

Cortes	Edades				
	4 a 8 años	9 a 13 años	14 hasta más de 70 años	Embarazadas	Mujeres en etapa de lactancia
Asado PC	37	27	20	18	16
Asado MC	44	33	24	22	19
Cuadril PC	41	31	22	20	18
Cuadril MC	48	36	26	24	20
Bola de lomo PC	39	29	21	19	17
Bola de lomo MC	44	33	24	22	19

Con base en estos resultados se demuestra que la carne vacuna es una buena fuente de Se en la dieta. Esto se reafirma considerando que la bioaccesibilidad del elemento en carne es entre el 75 y 91% (Ramos, et al., 2012). En un país como Uruguay es frecuente que se consuman más de 100 g en una comida por parte de un adulto y que esto ocurra con frecuencia en la semana. Si se considera que los niños de entre 4 y 8 años ya consumen este alimento en diversas formas, el aporte es aún mayor.

El consumir la carne menos cocida, lo que generalmente se denomina “bien jugosa”, con el centro de color rojo, o hacerlo en forma más cocida, “bien cocida” o “pasada”, no afecta significativamente el contenido del elemento en el alimento.

Este tipo de estudios se podrá extender a un mayor número de muestras, pero por las tendencias que se muestran en este trabajo es de esperar que se mantengan. Si bien el trabajo abarca pocas muestras, estas se han obtenido a lo largo de un período de casi dos años, y dado que el selenio es un elemento muy variable en los suelos y pasturas según la estación y región geográfica, es importante que se realicen en períodos cortos de tiempo y a largo plazo para hacer un seguimiento a la situación e informar al sector productivo de los resultados.

CONCLUSIONES

Se pudo concluir que la concentración de selenio en los cortes luego de la cocción no se vio significativamente afectada, por lo cual el valor nutricional se mantuvo. Se confirmó que la carne vacuna es una buena fuente de selenio en la dieta.

Adicionalmente se desarrolló y validó un método analítico simple y económico para la determinación de selenio en muestras de carne vacuna.

Este tipo de estudios se consideran de importancia para el sector productivo y para la población en general debido a que el valor nutricional de los alimentos debe evaluarse en las formas en las que estos habitualmente se consumen.

RECONOCIMIENTOS

Se agradece a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC-Proyecto Vinculación con el Sector Productivo-1608).

Al Programa de Ciencias Básicas (PEDECIBA).

Al Frigorífico Pando – Ontilcor S.A por proporcionar las muestras.

Al Dr. Juan Burghi (INAC) y la Ing. Paz Xavier (INAC) por su colaboración en la obtención de las muestras.

A los estudiantes Valentina Meléndrez y Fabián Bermúdez.

REFERENCIAS

- Alfaia, C.M., Lopes, A.F. y Prates, J.A.M., 2013. *Diet quality*. New York: Human Press. ISBN: 978-1-4614-7338-1.
- AOAC International, 2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 950.46, First Action 1950.
- AOAC International, 2016. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 20va ed. Maryland: AOAC. Official Method 986.15, first action 1986-final action 1988.
- Bognár, A. y Piekarski, J., 2000. Guidelines for Recipe Information and Calculation of Nutrient Composition of Prepared Foods (Dishes). En: *Journal of food composition and analysis*, 13(4), pp.391-410. <https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0922>.
- Cabrera, M., Ramos, A., Saadoun, A. y Brito, G., 2010. Selenium, copper, zinc, iron and manganese content of seven meat cuts from Hereford and Braford steers fed pasture in Uruguay. En: *Meat Science*, 84(3), pp.518–52. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.10.007>.
- Cabrera, M.C. y Saadoun, A., 2014. An overview of the nutritional value of beef and lamb meat from South America. En: *Meat Science*, 98(3), pp.435-444. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.033>.
- Campo, M., Muela, E., Olleta, E., Moreno, L., Santaliestra-Pasías, A., Mesana, M. y Sañudo, C., 2013. Influence of cooking method on the nutrient composition of Spanish light lamb. En: *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(2), pp.185–190. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.05.010>.
- Demirezen, D. y Uruc, K., 2006. Comparative study of trace elements in certain fish, meat and meat products. En: *Meat Science*, 74(2), pp.255-260. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.03.012>.
- Domínguez, R., Borrajo, P. y Lorenzo, J., 2015. The effect of cooking methods on nutritional value of foal meat. En: *Journal of Food Composition and Analysis*, (43), pp.61–67. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.04.007>.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies, 2011. Dietary reference intakes (DRIs): recommended dietary allowances and adequate intakes, elements [En línea]. En: Institute of Medicine, Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium, Ross A.C., Taylor C.L., Yaktine A.L., et al., (eds.). *Dietary reference intakes for Calcium and*

- Vitamin D*. Washington: National Academic Press. [Consulta: 27 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56068/table/summarytables.t3/?report=objectonly>.
- Goran, G.V., Tudoreanu, L., Rotaru, E. y Crivineanu, V., 2016. Comparative study of mineral composition of beefsteak and pork chops depending on the thermal preparation method. En: *Meat Science*, (118), pp.117-121. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.031>.
- Hefnway, A.E. y Pérez, J.T., 2008. Selenio y salud animal. Importancia, deficiencia, suplementación y toxicidad. En: *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar*, (11), pp.153-165. <https://doi.org/10.25110/arqvet.v11i2.2008.2571>.
- Instituto Nacional de Carnes (INAC), 2006. *Handbook of uruguayan meat* [En línea]. Montevideo: Instituto Nacional de Carnes [Consulta: 18 de agosto de 2019]. Disponible en: http://www.inac.gub.uy/innovaportal/file/2043/1/manual_corregido_2a_edicion.pdf.
- Instituto Nacional de Carnes (INAC), 2018. *Reporte mercado doméstico* [En línea]. Montevideo: Instituto Nacional de Carnes [Consulta: 18 de agosto de 2019]. Disponible en: <http://www.inac.uy/innovaportal/file/16190/1/informe-consumo-de-carnes-mercado-domestico--cierre-2017-vf.pdf>.
- Lombardi-Boccia, G., Lanzi, S. y Aguzzi, A., 2005. Aspects of meat quality: trace elements and B vitamins in raw and cooked meats. En: *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1), pp.39-46. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.007>.
- Lopes, A., Alfaia, C., Partidário, A., Lemos, J. y Prates J., 2015. Influence of household cooking methods on amino acids and minerals of Barrosã-PDO veal. En: *Meat Science*, (99), pp.38-43. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.08.012>.
- Machado, I., Dol, I., Rodríguez-Arce, E., Cecio, V. y Pistón, M., 2016. Comparison of different sample treatments for the determination of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*). En: *Microchemical Journal*, (128), pp.128-133. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.04.016>.
- Magnusson, B. y Örnemark, U., 2014. *Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics*. 2a ed. Torino: Eurachem. ISBN: 978-91-87461-59-0.
- National Institute of Health (NIH), 2011. *Dietary reference intakes (DRIs): recommended dietary allowances and adequate intakes, elements* [En línea]. Bethesda: National Institute of Health, [Consulta: 27 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56068/table/summarytables.t3/?report=objectonly>.
- National Institute of Health (NIH), 2019. *Selenium, fact sheet for health professionals* [En línea]. Bethesda: National Institute of Health. [Consulta: 27 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/>.
- Norwegian Food Safety Authority, 2018. *The Norwegian food composition table* [En línea]. Oslo: Norwegian Food Safety Authority, [Consulta: 23 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.norwegianfoodcomp.no/poultry-and-meat-g3>.

- Ramos, A., Cabrera, M.C. y Saadoun, A., 2012. Bioaccessibility of Se, Cu, Zn, Mn and Fe, and heme iron content in unaged and aged meat of Hereford and Braford steers fed pasture. En: *Meat Science*, 91(2), pp.116-124. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.01.001>.
- Rivera, C.A. y Rodríguez, M.R., 2010. Uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayo NMX-EC-17025-IMNC-2006. En: CENAM. *Simposio de Metrología 2010*. Santiago de Querétaro, México (27-29 de octubre de 2010) [En línea]. Santiago de Querétaro: CENAM. [Consulta: 6 de setiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.cenam.mx/sm2010/info/pviernes/sm2010-vp03c.pdf>.
- Saadoun, A., Cabrera, M.C., Terevino, A., Del Puerto, M. y Zaccari, F., 2019. Nutritional value of bovine meat produced on pasture. En: *Encyclopedia of Food Security and Sustainability*, (2), pp.189-196.
- Thomson, C.D., 2004. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. En: *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(3), pp.391-402. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601800>.

Desarrollo de una metodología analítica para la determinación de Cd, Pb y As en frutas y hortalizas como una alternativa a los métodos estándar de análisis

Development of an analytical methodology for the determination of Cd, Pb and As in fruits and vegetables as an alternative to standard methods of analysis

Desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de Cd, Pb e As em frutas e vegetais como alternativa aos métodos padrão de análise

RECIBIDO: 9/9/2019 → APROBADO: 12/11/2019 ✉ ftissot@fq.edu.uy

✉ TISSOT, FLORENCIA (1); PEREIRA MÓNICA (1); PISTÓN, MARIELA (1);
IBÁÑEZ, FACUNDO (2); DINI, SEBASTIÁN (2)

(1) GRUPO DE ANÁLISIS DE ELEMENTOS TRAZA Y DESARROLLO DE ESTRATEGIAS SIMPLES PARA PREPARACIÓN DE MUESTRAS (GATPREM). ÁREA QUÍMICA ANALÍTICA, DEPARTAMENTO ESTRELLA CAMPOS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY.

(2) AGROALIMENTOS INIA, ESTACIÓN EXPERIMENTAL LAS BRUJAS, INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA, CANELONES, URUGUAY.

RESUMEN

Las frutas y hortalizas pueden contener contaminantes que llegan al producto en cualquier punto de la cadena productiva. En este sentido, se debe controlar la acumulación de elementos potencialmente tóxicos como arsénico (As), cadmio (Cd) y plomo (Pb) para asegurar y controlar la inocuidad de estos alimentos.

Con el objetivo de monitorear los contaminantes inorgánicos, de forma rápida, confiable y con métodos analíticos en acuerdo con los principios de la química verde, se desarrolló y validó una metodología para la extracción simultánea de estos elementos asistida con microondas, en un solo paso y utilizando ácido diluido.

Se aplicó el método validado a cuatro productos: zanahoria, lechuga, manzana y tomate. Los parámetros de desempeño de esta metodología indicaron que resultó adecuada para monitorear estos alimentos tomando como referencia la reglamentación vigente y que todas las muestras analizadas cumplieron con los criterios establecidos. Esta metodología validada puede ser considerada como alternativa a los métodos estándar de análisis de As, Cd y Pb en este tipo de alimentos. El desarrollo de estas herramientas analíticas es de relevancia y deja disponible una plataforma analítica al servicio del sector productivo y de organismos de contralor nacional.

PALABRAS CLAVE: inocuidad alimentaria, vegetales, plomo, cadmio, arsénico.

ABSTRACT

Fruits and vegetables may contain contaminants that reach the product at any point in the production chain. In this sense, the accumulation of potentially toxic elements such as arsenic (As), cadmium (Cd) and lead (Pb) must be controlled to ensure food safety.

In order to monitor inorganic pollutants, a fast and reliable analytical method also following the principles of green chemistry was developed and validated for simultaneous extraction of these elements using a microwave-assisted procedure, in a single step and with diluted acid. The validated method was applied in four products: carrot, lettuce, apple and tomato. The figures of merit of this methodology indicated that it was adequate to monitor these contaminants in the analyzed foods fulfilling with the current regulations. The developed method can be considered as an alternative to standard methods for the determination of As, Cd and Pb in these foods. These kinds of studies applied to monitor food safety are relevant and, in this case, an analytical platform is now available for the productive sector and national control agencies.

KEYWORDS: food safety, vegetables, lead, cadmium, arsenic.

RESUMO

Frutas e legumes podem conter contaminantes que atingem o produto em qualquer ponto da cadeia de produção. Nesse sentido, o acúmulo de elementos potencialmente tóxicos como arsênico (As), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) deve ser controlado para garantir e controlar a segurança desses alimentos.

Para monitorar poluentes inorgânicos de arsênico, cádmio e chumbo, de forma rápida, confiável e com métodos analíticos de acordo com os princípios da química verde, foi desenvolvida e validada uma metodologia para a determinação simultânea desses elementos assistida por microondas, em uma única etapa e usando ácido diluído.

O método validado foi aplicado em quatro produtos: cenoura, alface, maçã e tomate. Os parâmetros de desempenho dessa metodologia indicaram que o método era adequado para monitorar esses alimentos tomando como referência as normas vigentes. O método analítico desenvolvido pode ser considerado uma alternativa aos métodos padrão de análise para a determinação de As, Cd y Pb nesses alimentos.

Todas as amostras analizadas atenderam aos criterios regulatórios. Essa metodologia validada e aplicada a estudos de segurança é relevante e disponibiliza uma plataforma analítica ao serviço do setor produtivo e das agências nacionais de controle.

PALAVRAS-CHAVE: segurança alimentar, vegetais, chumbo, cádmio, arsênico.

INTRODUCCIÓN

El concepto de inocuidad de los alimentos comprende diferentes acciones para garantizar seguridad al consumirlos, un aspecto fundamental para la salud pública y un factor muy relevante en la comercialización. Las políticas y actividades a implementar deben abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción hasta el consumidor final.

Las frutas y hortalizas podrían contener contaminantes inorgánicos que ingresan al producto en cualquier punto, desde su cultivo a su cosecha y hasta en la cadena de procesamiento que las lleva al consumidor final.

En particular, la acumulación de metales y semimetales potencialmente tóxicos en alimentos es crucial para definir el concepto de calidad de los mismos (Islam, et al., 2016; Rehman, et al., 2016; Rehman, et al., 2017). Debido a esto las determinaciones analíticas de elementos como arsénico (As), cadmio (Cd) y plomo (Pb) en diversas matrices alimentarias han tomado vital importancia para asegurar y monitorear la inocuidad de los alimentos.

Entre las principales fuentes de contaminación inorgánica se encuentran el agua de riego, el suelo, el aire y el uso de fertilizantes (Allende y Monaghan, 2015).

En Uruguay algunos estudios demuestran que las aguas de determinados acuíferos presentan niveles de As superiores a los admitidos por la Organización Mundial de la Salud ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) y que no se cuenta con información reportada respecto a los suelos (Mañay, et al., 2013; World Health Organization, 2018; Mañay, et al., 2019).

El Cd llega a los suelos y aguas principalmente debido al uso indiscriminado de fertilizantes fosfatados, que contienen Cd como un producto secundario en su obtención y se acumula en los suelos pudiendo ser absorbido por los vegetales y, por lo tanto, incorporado en los alimentos de consumo humano (Nziguheba y Smolders, 2008).

El Pb se encuentra en el ambiente en forma natural, sin embargo, los altos niveles de este elemento en el ambiente son de origen antropogénico.

Las plantas han desarrollado mecanismos específicos para absorber, traslocar y acumular nutrientes, pero esos mismos mecanismos pueden también incorporar elementos no esenciales debido a su comportamiento electroquímico, similar al de los esenciales (Lasat, et al., 2000).

El Reglamento Técnico Mercosur establece límites máximos de concentración de contaminantes inorgánicos en alimentos. Indica que para el Cd el máximo admitido es de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ para hortalizas de hoja y $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ para frutas y demás hortalizas; para Pb es $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ para hortalizas de hoja y $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ para frutas

y hortalizas, y para As es $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ para frutas y hortalizas (MERCOSUR, 2011). En todos los casos se refiere a base fresca. La determinación de estos elementos se debe realizar en laboratorios analíticos que cuenten con metodologías validadas y de forma rápida y confiable, para cumplir con los requerimientos y así liberar los productos al mercado o para su exportación.

Para la determinación analítica de As, Cd y Pb en muestras de tejido vegetal se requiere un pretratamiento de extracción de los analitos de la matriz y posterior medición en una disolución. Este proceso puede ser más o menos complejo según la matriz y el elemento en cuestión. Generalmente se utilizan protocolos o métodos estándar que requieren digestiones ácidas por vía húmeda o seca. En particular, el método oficial para análisis de metales y otros elementos traza en alimentos de la AOAC Internacional (AOAC 986.15) utiliza ácido nítrico concentrado para la digestión de las muestras (AOAC International, 2016).

Buscando el desarrollo de métodos analíticos más alineados a los principios de la química verde se propone la utilización de una digestión asistida por microondas con ácido diluido como procedimiento alternativo de extracción de los elementos de las matrices vegetales (Nobrega, et al., 2002).

Una vez que las muestras son tratadas mediante procedimientos para obtener una disolución adecuada para la realización de las mediciones analíticas, los elementos As, Cd y Pb pueden determinarse mediante diversas técnicas de espectrometría atómica. En el caso de Cd y Pb habitualmente se utilizan las técnicas de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) y de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP OES) y acoplado a masas (ICP MS) (Welz y Sperling, 1999). Para determinación de As, se utiliza en los métodos oficiales la técnica de absorción atómica de llama acoplada a hidruros (HG-AAS), esta técnica requiere el uso de un gas inflamable como el acetileno (Welz y Sperling, 1999). Una técnica aún poco extendida en los laboratorios analíticos es la de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MIP OES), que permite el acople de una cámara para generación de hidruros. Esta técnica cuenta con múltiples ventajas respecto a otras, entre ellas el hecho de que el plasma es sostenido por nitrógeno que se obtiene a partir de un generador alimentado con aire comprimido (Williams, et al., 2019). Los costos tanto de inversión como de mantenimiento de este instrumento son considerablemente menores a cualquier otra técnica atómica y elimina el uso de acetileno en los laboratorios.

Para este trabajo se seleccionaron frutas y hortalizas de consumo masivo que presentan mayor riesgo de contener elevados niveles de estos elementos, ya sea por su contacto directo con el suelo o por su capacidad concentradora (Burlo, et al., 1999; Mengel, et al., 2001). Se desarrolló y validó una metodología para la determinación de contaminantes inorgánicos en lechuga, manzana, tomate y zanahoria utilizando ácido diluido e introduciendo el uso de la técnica novedosa (HG-MIP OES) para la determinación de As. Esta plataforma analítica, amigable con el ambiente, aporta una herramienta práctica al sector productivo y organismos de contralor para el monitoreo de la inocuidad de alimentos en Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Para las determinaciones de los analitos se utilizaron disoluciones estándar para absorción atómica de 1000 mg L⁻¹ de As, Cd y Pb (Merck, Alemania). Las curvas de calibración fueron preparadas mediante diluciones apropiadas a partir de las disoluciones comerciales concentradas, utilizando agua ultrapura de resistividad 18,2 MΩcm (ASTM Tipo I), obtenida mediante un purificador Millipore Direct-Q 3 UV. Todo el material utilizado se descontaminó previamente durante 12 horas con ácido nítrico 10% v/v preparado a partir de HNO₃ concentrado (67% v/v, Merck, Alemania).

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica o superior. Para las determinaciones de As se utilizó NaBH₄ 2% m/v (Sigma Aldrich, USA) en hidróxido de sodio 0,5% m/v preparado a partir de NaOH (Mallinckrodt, México). Para el proceso de prerreducción se utilizó HCl 12 mol L⁻¹ (Merck, Alemania) y KI 20% m/v (Carlo Erba, Francia). Como modificadores de matriz para las determinaciones de Cd y Pb se utilizaron disoluciones de Pd (NO₃)₂ (Merck, Alemania) 10000 mgL⁻¹ y NH₄H₂PO₄ 5000 mgL⁻¹ (Sigma Aldrich, USA).

Muestras

Las muestras de frutas y hortalizas frescas fueron tomadas del Mercado Modelo de Montevideo, entidad que comercializa más del 60% de los vegetales frescos en Uruguay. Se siguió un protocolo estandarizado de selección al azar de los operadores del Mercado, donde cada muestra es representativa del total del volumen a la venta del día. Los muestreos fueron realizados durante las primeras horas de operación y, simultáneamente, se realizó una encuesta complementaria según la Metodología de Evaluación de Cadenas Agroalimentarias (MECA) (La Gra, et al., 2016). En el caso de lechuga se seleccionaron aleatoriamente cinco unidades de distintos cajones, y para manzana, tomate y zanahoria se tomaron muestras de al menos 1 kg, siguiendo el mismo criterio de aleatoriedad. Las muestras fueron envasadas en bolsas de polietileno virgen, precintadas, codificadas y llevadas al laboratorio donde se procedió al cuarteo y submuestreo (100-200 g) en el mismo día. Luego fueron cortadas con cuchillo de cerámica sobre superficie plástica y secadas en estufa de circulación forzada Modelo DN93 (Yamato, Tokio, Japón) a 70 °C por 96 horas. Una vez secas fueron procesadas en un molino de martillos Willey Model 4 (Thomas Scientific, NJ, USA), tamizadas en malla de tamaño de partícula de 1 mm, acondicionadas en tubos plásticos y mantenidas en condiciones de baja humedad hasta el momento del análisis.

Para la optimización y la evaluación de la veracidad y precisión de las metodologías analíticas se utilizaron dos materiales de referencia certificados: hojas de espinaca (NIST 1570a) y hojas de tomate (NIST 1573a).

Digestión de muestras

Se realizó una digestión asistida por microondas utilizando un digestor CEM (Mars 6, EUA). El procedimiento consistió en pesar 0,5 g de muestra (seca y tamizada) en vasos de reacción EasyPrep Plus® y luego se agregaron 10,00 mL de ácido diluido (HNO_3 4,8 mol L^{-1}). La programación de temperatura fue la siguiente: potencia 400-1800 W, rampa de temperatura: 15 min hasta alcanzar 200 °C, 10 min a 200 °C, presión 500 psi. Se realizaron blancos de reactivos simultáneamente con las muestras.

Una vez finalizada la digestión se trasvasó cuantitativamente y se completó a un volumen final de 20,00 mL con agua ultrapura. Sobre esta disolución se realizaron las determinaciones analíticas de los As, Cd y Pb. El procedimiento fue el mismo para las cuatro matrices analizadas.

Determinaciones analíticas

La determinación de As puede realizarse mediante la medida de su hidruro volátil que es generado luego de una reducción con tetrahidroborato de sodio (NaBH_4) en medio ácido. Antes se requiere de un proceso de digestión para destruir los compuestos orgánicos de arsénico, y debido a que se utiliza ácido nítrico en el proceso este es oxidado a la especie As(V). Para la determinación de As total en una matriz es necesario que todo el elemento se encuentre en un mismo estado de oxidación. Dado que la formación de los hidruros es más favorable para los estados de oxidación más bajos, es necesario realizar una prerreducción de As (V) a As (III) fuera de línea con ioduro de potasio (KI) o cloruro de estaño (SnCl_2) y luego una nueva reducción en línea con NaBH_4 para la generación de hidruros (Welz y Sperling, 1999).

La prerreducción fue llevada a cabo con HCl 12 mol L^{-1} y KI 20% (m/v) en relación: muestra/estándar (10): HCl (1): KI (1). En primer lugar, se agregó HCl y se llevó a ebullición hasta una reducción de volumen del 50%, aproximadamente. A continuación, se reconstituyó el volumen original con agua ultrapura y se procedió al agregado del KI. Se dejó reaccionar una hora a temperatura ambiente antes de la realización de las medidas (Tanabe, et al., 2016; Mikheev, et al., 2017).

Las mediciones de As se realizaron mediante la técnica HG-MIP OES a 193,695 nm en un espectrómetro de emisión atómica inducido por microondas (MIP OES, Agilent 4210) con generador de nitrógeno (Agilent 4107) alimentado con un compresor de aire (DurrTechnik, Alemania). El equipo cuenta con una antorcha estándar y una cámara de nebulización multimodo (MSIS, Agilent) para la generación de hidruros. Esta cámara tiene dos canales, uno para la muestra y otro para el agente reductor. Las condiciones operativas utilizadas fueron: flujo de N_2 0,7 L min^{-1} , velocidad de la bomba 30 rpm, posición de lectura 10 y tiempo de lectura 10 s.

Todas las muestras y blancos fueron analizados por triplicado.

En el caso de Cd y Pb las determinaciones se realizaron en un espectrómetro de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) Thermo Scientific iCE 3500 (Cambridge, Reino Unido), equipado con módulo atomizador de horno de grafito calefaccionado transversalmente (GFS35Z), un módulo automuestreador

(GFS33) y con aplicación de corrección de fondo basada en efecto Zeeman. Las longitudes de onda de medida utilizadas fueron 228,8 nm (Cd) y 283,3 nm (Pb). La cuantificación fue realizada utilizando como señal la absorbancia integrada (área de pico). En todos los casos se utilizaron tubos de grafito con recubrimiento pirolítico (Thermo Scientific) y gas argón 99,998% (Praxair, Uruguay).

En la Tabla 1 se muestran los programas de temperatura optimizados para ambos elementos.

TABLA 1. Programas de temperatura para las determinaciones de Cd y Pb.

	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Flujo de gas (L min ⁻¹)
Cadmio	Secado	110	20	0,2
	Pirólisis	800	20	0,2
	Atomización	1800	3	---
	Limpieza	2500	3	0,2
Plomo	Secado	120	35	0,2
	Pirólisis	900	20	0,2
	Atomización	1400	4	---
	Limpieza	2500	3	0,2

Los volúmenes de inyección fueron de 20 µL. Para la determinación de Cd, como modificador de matriz se utilizaron 10 µL de una disolución con un contenido de 5 µg de Pd(NO₃)₂. En el caso del Pb, se utilizó como modificador 10 µL de una mezcla de Pd(NO₃)₂ y NH₄H₂PO₄ con 2,5 µg de Pd(NO₃)₂ y 25 µg de NH₄H₂PO₄.

RESULTADOS

Para la caracterización y evaluación de la metodología desarrollada se determinaron los principales parámetros de desempeño o cifras de mérito (linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y veracidad) siguiendo las recomendaciones de la Guía Europea de validación Eurachem (Magnusson, et al., 2014). En todos los casos se mantuvieron las condiciones experimentales descritas para cada uno de los analitos en la sección Materiales y Métodos.

La linealidad fue determinada mediante inspección visual de las curvas de calibración, valor del coeficiente de determinación (R²) y el estudio de aleatoriedad de los residuales. Los coeficientes de determinación obtenidos para las regresiones lineales fueron mayores a 0,99 para todos los analitos en estudio en los rangos que se presentan en la Tabla 2.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) fueron expresados como el contenido del analito correspondiente a 3,3 y 10 veces la desviación estándar del blanco, respectivamente (Magnusson, et al., 2014). La precisión expresada como RSD (%) (desviación estándar relativa porcentual) fue estudiada utilizando los

materiales de referencia certificados y las muestras, y se obtuvieron valores menores al 10% para todos los analitos en estudio.

La veracidad y la precisión fueron evaluadas analizando materiales de referencia certificados. Los métodos desarrollados fueron luego aplicados para el análisis de muestras de lechuga, manzana, tomate y zanahoria.

Se realizó la prueba *t* de Student para los resultados obtenidos a partir de las determinaciones de As, Cd y Pb en los materiales de referencia certificados, todos los valores experimentales de *t* se encontraron por debajo del valor teórico $t(0,05, 5) = 2,57$. Por lo tanto, a un nivel de significancia del 95%, las concentraciones obtenidas utilizando los métodos desarrollados no difieren significativamente de los respectivos valores certificados, con lo cual se garantiza la veracidad de los métodos.

La Tabla 2 resume los parámetros de validación obtenidos.

TABLA 2. Parámetros de desempeño de los métodos analíticos.

Matriz	Manzana	Lechuga	Tomate	Zanahoria	
Parámetro	Analito				
Rango lineal estudiado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cd	hasta 4			
	Pb	hasta 40			
	As	hasta 100			
Límite de detección (mg kg^{-1} base húmeda)	Cd	0,001	0,0004	0,0005	0,002
	Pb	0,003	0,003	0,003	0,003
	As	0,004	0,003	0,003	0,003
Límite de cuantificación (mg kg^{-1} base húmeda)	Cd	0,004	0,001	0,001	0,007
	Pb	0,008	0,010	0,010	0,010
	As	0,010	0,009	0,010	0,010
Precisión (% RSD $n = 6$)	Cd	<8,5			
	Pb	<10,0			
	As	<7,2			
Veracidad (% Recuperación, $n = 6$) (* CRM NIST 1570a (**) CRM NIST 1573a	Cd(*)	81-100			
	Pb(*)	92-102			
	As(**)	87-107			

Se realizaron las determinaciones analíticas de As, Cd y Pb en las matrices en estudio utilizando la metodología desarrollada y validada. En todos los casos, como se muestra en la Tabla 3, los resultados de los analitos que pudieron ser cuantificados fueron menores a los límites máximos permitidos.

TABLA 3. Resultados promedio de muestras analizadas por triplicado en base húmeda. Incertidumbre expresada como desviación estándar. ND: no detectado.

Analito	Manzana	Lechuga	Tomate	Zanahoria
Cd (mg kg ⁻¹)	0,0059 ± 0,0005	0,0017 ± 0,0001	<0,001	<0,007
	<0,004	0,0017 ± 0,0001	<0,001	ND
	<0,004	0,0041 ± 0,0006	<0,001	ND
Pb (mg kg ⁻¹)	0,017 ± 0,003	0,019 ± 0,002	<0,010	ND
	ND	0,056 ± 0,006	<0,010	ND
	0,044 ± 0,002	0,030 ± 0,002	<0,010	ND
As (mg kg ⁻¹)	ND	<0,009	ND	ND
	ND	<0,009	ND	ND
	ND	<0,009	ND	ND

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta los valores máximos de concentración permitidos para los elementos en estudio (Cd 0,2 mg kg⁻¹ para hortalizas de hoja y 0,1 mg kg⁻¹ para frutas y demás hortalizas; Pb 0,3 mg kg⁻¹ para hortalizas de hoja, y 0,1 mg kg⁻¹ para frutas y demás hortalizas y As 0,3 mg kg⁻¹ para frutas y hortalizas; MERCOSUR, 2011), es de destacar que los límites de detección y cuantificación obtenidos se encuentran entre uno y dos órdenes por debajo, por lo que la detectabilidad es más que suficiente para el objetivo propuesto.

El valor objetivo para la desviación estándar de un análisis determinado varía con la concentración de analito a medir y para estimarlo se puede establecer una relación funcional entre la concentración y la desviación estándar relativa (RSD). Esta ecuación conduce a una curva que se puede utilizar para estimar valores objetivo de desviación estándar relativa para los análisis (Rivera y Rodríguez, 2010). Para los niveles de concentraciones de trabajo según la distribución de Horwitz se esperarían resultados de precisión (RSD) de hasta 20%. Los RSD obtenidos para el método desarrollado fueron menores al 10% para todos los elementos, lo cual se considera muy bueno y, sumado a los resultados del estudio de veracidad, avala la aplicación del método para determinar la concentración de As, Cd y Pb en las matrices seleccionadas con fines de control sanitario.

La AOAC establece que las metodologías estándar para análisis de metales pesados en alimentos en una concentración hasta 100 mg kg⁻¹ deben presentar un límite de cuantificación menor o igual a 10 mg kg⁻¹, la veracidad evaluada como recuperación (ya sea de materiales de referencia o de muestras fortificadas) debe ser entre 60 y 115% y la precisión como %RSD debe ser menor a 15%. Para el caso de As, para valores

de concentración hasta 100 mg kg⁻¹ los requerimientos para límite de cuantificación y veracidad son los mismos que para metales pesados y la precisión como %RSD debe ser menor a 20% (AOAC International, 2016). En lo que respecta al tratamiento de la muestra, este método utiliza solamente ácido nítrico diluido (concentrado diluido tres veces) como reactivo. No utiliza ácidos concentrados ni reactivos auxiliares para la digestión como los métodos estándar, lo que disminuye los costos y la generación de residuos peligrosos. Un ejemplo que ilustra este aspecto es que para la determinación de As mediante el método oficial para la preparación de la muestra se requiere una calcinación en mufla a 450 °C con Mg(NO₃) por 30 minutos como mínimo y luego de enfriar las cenizas se retoman en ácido clorhídrico concentrado. En la misma línea, para Cd y Pb las digestiones por el método oficial se realizan con ácido nítrico concentrado en sistemas cerrados durante 2 horas a 150 °C (AOAC 986.15, AOAC International, 2016).

Si bien cada vez se está extendiendo más el uso de tratamientos asistidos con microondas, se ha demostrado que puede realizarse utilizando un solo ácido diluido y que el mismo procedimiento es aplicable a diferentes matrices complejas. A partir de un mismo proceso de digestión se pueden realizar las medidas de todos los elementos, lo que ahorra tiempo de análisis, ya que la digestión de microondas se completa en 25 minutos y con los métodos oficiales los tiempos de digestión pueden llegar a ser de dos horas dependiendo del elemento en estudio (AOAC 986.15, AOAC International, 2016).

La técnica analítica utilizada para la determinación de As, HG-MIP OES, se aplicó exitosamente. Es una tecnología económica debido a que no utiliza argón como gas que genera y sostiene el plasma (como en las técnicas de ICP-OES o ICP MS), sino nitrógeno obtenido mediante un generador que lo produce a partir de aire suministrado por un compresor. Acoplar la generación de hidruros a la emisión atómica también resultó un desafío, debido a que tradicionalmente el acople se realiza con técnicas de absorción atómica (HG-AAS) que brinda límites de detección y cuantificación más bajos, sin embargo, los límites obtenidos son adecuados para el fin propuesto.

En base a lo expuesto anteriormente, los parámetros de desempeño obtenidos indican que los métodos analíticos desarrollados son adecuados para los fines propuestos. Su aplicación no solamente permite emitir resultados confiables y que aseguren la inocuidad del alimento desde el punto de vista del contenido de contaminantes inorgánicos, también es posible postular esta metodología como una alternativa más económica y simple en comparación con los métodos estándar ampliamente utilizados en los laboratorios.

CONCLUSIONES

Se logró desarrollar una metodología analítica que permite la determinación de As, Cd y Pb en diferentes matrices vegetales mediante un tratamiento de muestra único y más amigable con el ambiente comparado con los métodos oficiales. El tratamiento cumple con todas las especificaciones de desempeño requeridas para ser una alternativa viable de análisis de contaminantes inorgánicos en vegetales, en lo relativo a detectabilidad, precisión y veracidad.

Todas las muestras analizadas cumplieron con los criterios establecidos en la reglamentación vigente (MERCOSUR, 2011).

Esta metodología pone a disposición una plataforma analítica fundamental para el sector productivo y para organismos de contralor, que hace posible detectar y cuantificar concentraciones muy por debajo de los límites máximos permitidos. De esta forma, no solamente se puede monitorear la inocuidad mediante la verificación del cumplimiento de la normativa, sino que también es posible conocer el contenido de estos contaminantes en los alimentos seleccionados y controlar los niveles de estos elementos.

RECONOCIMIENTOS

Se agradece a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Proyecto INNOVAGRO FSA_I_2017_1_140199.

Al Mercado Modelo por proveer las muestras.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y a PEDECIBA.

REFERENCIAS

- Allende, A. y Monaghan, J., 2015. Irrigation water quality for leafy crops: a perspective of risks and potential solutions. En: *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12 (7), pp.7457-7477.
- AOAC International, 2016. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 20va ed. Maryland: AOAC. Official Method 986.15, first action 1986-final action 1988.
- Burlo, F., Guijarro, I., Barrachina, A. y Valero, D., 1999. Arsenic species: Effects on and accumulation by tomato plants. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, pp.1247-1253.
- Islam, M.S., Ahmed, M.K., Habibullah-Al-Mamun, M., Raknuzzaman, M., Ali, M.M. y Eaton, D.W., 2016. Health risk assessment due to heavy metal exposure from commonly consumed fish and vegetables. En: *Environment Systems & Decisions*, 36(3), pp.253-265.
- La Gra, J., Katinoja, L. y Apízar K., 2016. *Metodología de evaluación de cadenas agroalimentarias para la identificación de problemas y proyectos* [En línea]. San José: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. [Consulta: 26 de agosto de 2019]. Disponible en: <http://repiica.iica.int/docs/B4231e/B4231e.pdf>
- Lasat, M., 2000. *The use of plants for the removal of toxic metal from contaminated soil* [En línea]. Pensilvania: American Association for the Advancement of Science, Environmental Science and Engineering Fellow. [Consulta: 22 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/9100FZE1.PDF?Dockey=9100FZE1.PDF>
- Magnusson, B. y Örnemark, U., 2014. *Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics*. 2a ed. Torino: Eurachem. ISBN: 978-91-87461-59-0
- Mañay, N., Goso, C., Pistón, M., Fernández-Turiel, J.L., García-Vallés, M., Rejas, M. y Guerequiz, R., 2013. Groundwater arsenic content in Raigón Aquifer system (San José, Uruguay). En: *Revista de la Sociedad Uruguaya de Geología*, 18, pp.20-38.
- Mañay, N., Pistón, M., Cáceres, M., Pizzorno, P. y Bühl, V. 2019. An overview of

- environmental arsenic issues and exposure risks in Uruguay. En: *Science of the total Environment*, 686, pp.590-598.
- Mengel, K., Kirkby E.A., Kosegarten H. y Appel T., 2001. *Principles of plant nutrition*. 5a. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. ISBN: 978- 94- 010- 1009- 2.
- MERCOSUR, 2011. Reglamento Técnico Mercosur MERCOSUR/GMC/RES. N° 12/11 [En línea]. Asunción: MERCOSUR. [Consulta: 22 de agosto de 2019]. Disponible en: http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r_gmc_12-11.pdf.
- Mikheev I.V., Karpukhina E.A., Usol'tseva L.O., Samarina T.O., Volkov D.S. y Proskurnin M.A., 2017. Application of microwave plasma atomic emission spectrometry and hydride generation for determination of arsenic and selenium in mineral water. En: *Inorganic Materials*, 53(14), pp.1422-1426.
- Nobrega, J.A, Trevizan, L.C., Araujo, G.C.L. y Nogueira, A.R.A., 2002. Focused-microwaveassisted strategies for sample preparation. A review. En: *Spectrochimica Acta Part B*, 57, pp.1855-1876.
- Nziguheba, G. y Smolders, E., 2008. Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries. En: *Science of The Total Environment*, 390(1), pp.53-57.
- Rehman, Z., Khan, S., Qin, K., Brusseau, M., Shah, M. y Din, I., 2016. Quantification of inorganic arsenic exposure and cancer risk via consumption of vegetables in southern selected districts of Pakistan. En: *Science of The Total Environment*, 550, pp.321-329.
- Rehman, Z., Khan, S., Brusseau, M. y Shah, M., 2017. Lead and cadmium contamination and exposure risk assessment via consumption of vegetables grown in agricultural soils of five-selected regions of Pakistan. En: *Chemosphere*, 168, pp.1589-1596.
- Rivera C.A. y Rodríguez M.R., 2010. *Uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayo NMX-EC-17025-IMNC-2006* [En línea]. En: CENAM: Simposio de Metrología 2010. Santiago de Querétaro, México (27-29 de octubre de 2010). Santiago de Querétaro: CENAM. [Consulta: 6 de setiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.cenam.mx/sm2010/info/pviernes/sm2010-vp03c.pdf>
- Tanabe, C.K., Hopfer H., Gilleland G., Liba A., Ebelerab S. E. y Nelson J., 2016. Total arsenic analysis in Californian wines with hydride generation – microwave plasma – atomic emission spectroscopy (HG-MP-AES). En: *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31, pp.1223-1227.
- Welz, B. y Sperling, M., 1999. *Atomic absorption spectrometry*. 3a ed. Berlín: Wiley-VCH. ISBN 3-257-28571-7.
- Williams, C., Amais, R., Fontoura, B., Jones, B., Nobrega, J. y Donati, G., 2019. Recent developments in microwave-induced plasma optical emission spectrometry and applications of a commercial Hammer-cavity instrument. En: *Trends in Analytical Chemistry*, 116, pp.151-157.
- World Health Organization, 2018. *Arsénico* [En línea]. Ginebra: WHO. [Consulta: 26 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>

Bioactive compounds and antioxidant capacity in native fruits of Uruguay

Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en frutos nativos del Uruguay

Compostos bioativos e capacidade antioxidante em frutos nativos do Uruguai

RECIBIDO: 10/9/2019 → APROBADO: 12/11/2019 ✉ vferrari@inia.org.uy

✉ FERRARI, VIRGINIA (1); IBÁÑEZ, FACUNDO (1, 2); CABRERA, DANILO (2); PINTADO, BETIANA (3)

(1) INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA, INIA. PLATAFORMA DE AGROALIMENTOS. MONTEVIDEO, URUGUAY.

(2) INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA, INIA. PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCCIÓN FRUTÍCOLA. MONTEVIDEO, URUGUAY.

(3) CONSEJO DE EDUCACIÓN TÉCNICO PROFESIONAL, UTU. MONTEVIDEO, URUGUAY.

RESUMEN

En este trabajo se evaluaron accesiones de frutos nativos de ‘Arazá’ (*Psidium cattleianum*), ‘Guaviyú’ (*Myrcianthes pungens*) y Guayabo del país’ (*Acca sellowiana*) como parte de un programa de selección de variedades para obtener cultivares comerciales. El objetivo es ofrecer a los productores nuevas posibilidades de cultivos frutícolas locales y brindar a los consumidores alternativas alimenticias con reconocidas propiedades nutricionales y nutraceuticas. En diferentes genotipos de estos frutos se evaluó la calidad fisicoquímica, el contenido de compuestos fenólicos, vitamina C y antocianinas, y la relación con la actividad antioxidante total por DPPH y ORAC. Las metodologías para determinar compuestos bioactivos y capacidad antioxidante fueron validadas a escala de microvolúmenes, siguiendo principios de “química verde”. El contenido de compuestos bioactivos difiere significativamente dependiendo de la especie y accesión ($p \leq 0,05$). Los resultados encontrados confirman las propiedades nutricionales y capacidad antioxidante potencial de estos frutos. El efecto de variables agronómicas y ambientales en genotipos seleccionados debe investigarse para ajustar la tecnología de producción comercial.

PALABRAS CLAVE: frutos nativos, vitamina C, compuestos fenólicos, DPPH, ORAC.

ABSTRACT

Accessions of native fruits from ‘Arazá’ (*Psidium cattleianum*), ‘Guaviyú’ (*Myrcianthes pungens*) and ‘Guayabo del país’ (*Acca sellowiana*) were evaluated as part of a selection program to obtain commercial cultivars, with the aim to offer the growers new possibilities of local fruit crops and provide the consumers with food alternatives with recognized nutritional and nutraceutical properties. The objective of this work was to evaluate the physicochemical quality, the total phenolic content, vitamin C and total anthocyanins, and the relationship with the total antioxidant activity by DPPH and ORAC for different fruit genotypes. The methodologies for the determination of bioactive compounds and antioxidant capacity were validated on a microvolume scale, following the principles of “green chemistry”. The content of bioactive compounds differed significantly depending on the species and accession ($p \leq 0,05$). The results obtained confirmed the nutritional properties and potential antioxidant capacity of the native fruits. The effect of agronomic and environmental variables on selected genotypes should be investigated to adjust commercial production technology in order to exploit the nutraceutical characteristics found.

KEYWORDS: native fruits, vitamin C, phenolic compounds, DPPH, ORAC.

RESUMO

Diferentes acessos de frutos nativos de ‘Araçá’ (*Psidium cattleianum*), ‘Guabijú’ (*Myrcianthes pungens*) e ‘Goiaba Serrana’ (*Acca sellowiana*) foram avaliados como parte de um programa de seleção para obtenção de cultivares comerciais. O objetivo foi oferecer aos produtores a opção de cultivo de novas frutíferas locais e proporcionar aos consumidores alternativas alimentares com propriedades nutricionais e nutracêuticas reconhecidas. A qualidade físico-química, conteúdo de compostos fenólicos, vitamina C e antocianinas, e a relação com a atividade antioxidante total por meio de DPPH e ORAC foram avaliadas nos diferentes genótipos. As metodologias para definição dos compostos bioativos e capacidade antioxidante foram validadas a escala micro volumétricas, seguindo os princípios da “química verde”. O conteúdo de compostos bioativos diferiu significativamente dependendo da espécie e do acesso ($p \leq 0,05$). Os resultados encontrados confirmam as propriedades nutricionais e a potencial capacidade antioxidante destes frutos. Os efeitos das variáveis agrônômicas e ambientais nos genótipos selecionados devem ser investigados para ajustar as tecnologias de produção comercial e explorar as características nutracêuticas encontradas.

PALAVRAS-CHAVE: frutos nativos, vitamina C, compostos fenólicos, DPPH, ORAC.

INTRODUCTION

Some fruit chemical compounds such as vitamins, flavonoids, anthocyanins and other phenolic compounds can act reducing the harmful effects of oxidative stress and

preventing the deterioration of physiological functions and hence the occurrence of some types of cancer, neurodegenerative and cardiovascular diseases (Chang, et al., 2016).

Regarding these compounds, several methods are used to determine their concentrations. Most of them include extraction and spectrophotometric measurements steps requiring a large amount of solvent (Harborne, 1998). Even the scientific community searches for new green and efficient techniques in order to improve the extraction process reducing the use of hazardous and/or contaminant chemicals (Bijttebier, et al., 2016). Ultrasound-assisted extraction (UAE) and microplate spectrophotometric readers are common examples of volume microscale working in these assays. Furthermore different methodologies have been employed to evaluate the *in vitro* antioxidant capacity that those compounds confer to the fruits, of which DPPH, ABTS, FRAP, ORAC and TEAC are the most widely used (Parsons, 2017). At least two of these assays must be combined to provide a reliable representation of the total antioxidant capacity of a foodstuff because the methods might be influenced by several factors, mainly physicochemicals, as free radicals generation (Apak, et al., 2013). The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) method involves this radical chromogen compound, which in presence of antioxidants loses its colored signal. In the sample solution, antioxidants lighten the color of DPPH by donating an electron/hydrogen atom to the unpaired electron of DPPH that turns the purple color of DPPH colorless. The reaction is monitored using a simple UV/Vis spectrophotometer. The ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) assay measure scavenging capacity of antioxidant in the sample against the peroxy radical formed from AAPH reactive (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) and a fluorescent probe (usually fluorescein) in a competitive reaction mechanism. The antioxidant elimination of peroxy radical by irreversible reaction protects the fluorescein from degradation. The decay in fluorescence due to the attack of radicals and protection by antioxidant results in a curve. Calculating the area under the fluorescence decay curve (AUC) according to different concentrations of a standard compound (usually Trolox; (\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, a water-soluble analogue of vitamin E), a calibration equation is achieved and can be used to evaluate the radical cleansing activity of antioxidants compounds in the sample. ORAC is the standardized and actually adopted method to determine antioxidant capacity in food (Wu, et al., 2004; Prior, et al., 2005; Prior, 2015).

In the native flora of Uruguay there are more than 20 species that produce edible fruits. The predominant species include those belonging to the family *Myrtaceae*: 'Guayabo del país' (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret); 'Arazá' (*Psidium cattleianum* Sab.) and 'Guaviyú' (*Myrcianthes pungens* (Berg.) Legr.). Multidisciplinary investigations have been developed for years to prospect, characterize and select promising genetic materials (Cabrera, et al., 2008; Feippe, et al., 2011). Although these fruits are not common in the retail market, the interest in planting, commercialize and consume them has increased recently, not only because their unique flavor and aroma but also for their outstanding nutraceutical properties given by the high content of antioxidant compounds (Pasquariello, et al., 2015; Seraglio, et al., 2018).

The aim of this study was to determine the bioactive compounds concentration and antioxidant activities of three native fruits species using the DPPH and ORAC methods and to supply more information on the genetic diversity of the evaluated selections.

MATERIALS AND METHODS

Samples

The fruits were harvested from an evaluation orchard at INIA “W. Ferreira Aldunate” Experimental Station. Fruits from seven selections of ‘Arazá’ (*AA - P. cattleyanum f. lucidum*), three of ‘Guaviyú’ and two of ‘Guayabo del país’ were randomly hand-harvested at the commercial maturity stage. Samples were 1 kg (Arazá and Guaviyú) and 2 kg (Guayabo del país). In the laboratory the fruits were selected based on the uniformity, appearance and the absence of physical damage, and weight and moisture were determined. Three samples of 20 fruits for each accession were selected. ‘Guayabo del país’ fruits were peeled and ‘Guaviyú’ seeds were removed. The edible portions of the fruits were homogenized using a blender during 1 min. After centrifugation at 12500 rpm during 10 min, a small amount of homogenate was used for physicochemical analyses and the remainder immediately frozen at -80 °C until the analysis of total phenolics, vitamin C, anthocyanins and antioxidant activities.

Physicochemical parameters

The pH was determined using a digital pHmeter (MM374, Hach). Titratable acidity (TA) was determined by titration with NaOH 0,1 M and expressed as grams of citric acid in 100 mL of fruit sample. The total soluble solids (SS) were determined using a manual refractometer (RHB-90, ATC) and expressed as °Brix.

Bioactive compounds content

Bioactive compounds were extracted from 0,2 g of fresh fruit homogenates using 1 mL of methanol/water (80:20, v/v). After homogenization, the samples were placed in an ultrasonic bath during 10 min at 20 °C and stored for 4 h at 20 °C avoiding light exposure. Then, they were centrifuged at 12500 rpm during 5 min. The supernatant was diluted for subsequent composition and antioxidant analyses. All spectrophotometrical data were obtained using a 96 well plate multi-mode microplate reader with two independent dispensers (Synergy HT1, BioTek Instruments Inc.).

Anthocyanins content was measured using a pH-differential protocol (Giusti and Wrolstad, 2001) with some modifications. An aliquot of 40 mL of methanolic extract was placed in the microplate and diluted with 200 mL of potassium chloride (0,025 M; pH 1,0) or sodium acetate (0,4 M; pH 4,5) buffers. Absorbance was measured at 520 and 700 nm. The absorption (A) of the anthocyanins in the diluted samples

was calculated from the Equation 1 and anthocyanins concentration was calculated using the cyanidin 3-glucoside extinction coefficient ($26.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4.5} \quad (\text{Eq. 1})$$

The results were expressed as mg cyanidin 3-glucoside (mg c3g) per 100 g of fresh fruit weight (FW).

Ascorbic acid (vitamin C) and total phenolic contents were estimated following the method of Sánchez-Rangel et al. (2013). Briefly, 15 mL of methanolic extract was diluted with distilled water in a microplate well and the Folin-Ciocalteu reagent was added. The mixture was agitated, incubated for 3 min and the absorbance at 765 nm determined. The vitamin C concentration was estimated against ascorbic acid standard curve and expressed as milligrams of ascorbic acid (aa) per 100 g of fresh fruit weight (FW). To obtain the total phenolic content in the sample, the assay was continued by adding Na_2CO_3 to the mixture present in the microplate wells and incubated for 2 h at room temperature in the dark. Then the absorbance at 765 nm was measured and values compared against gallic acid standard calibration curve. The results were expressed as milligram of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of fresh fruit weight (FW).

Antioxidant activity

The Brand-Williams et al. (1995) assay slightly modified was used to evaluate the antioxidant capacity of extract based on the quantification of free radical-scavenging of DPPH. Briefly, 15 mL of appropriate diluted methanolic extract was mixed with 250 mL DPPH solution ($125 \mu\text{M}$) in methanol/water (80:20, v/v). The mixture was shaken and incubated for 24 h at 20°C in the dark. The reduction of absorption was measured at 517 nm and quantified using a Trolox standard curve. The results were expressed as mmol Trolox equivalents (TE) per 100 g of fresh fruit weight (FW).

For ORAC, the procedure followed the methods of Ou et al. (2002) and Prior et al. (2005) with some modifications. Diluted fruit methanolic extracts or control (gallic acid) or standards solutions of Trolox (25 mL) were transferred to microplates. The plates were placed in the microplate reader above described and 150 mL of fluorescein solution in 75 mM potassium phosphate buffer ($0,008 \mu\text{M}$) were added using the automatic dispenser. After shake and incubation at 37°C for 30 min, 25 mL AAPH (153 mM) prepared freshly with 75 mM phosphate buffer was added to each well. The plate was agitated and fluorescence was measured every minute for 60 min. The filters were set at 485 nm and 528 nm for excitation and emission, respectively. The results of each sample were estimated based on standard curve of Trolox concentration and net area in the fluorescence decay curve. The ORAC activity was expressed as mmol Trolox equivalents (TE) per 100 g of fresh fruit weight (FW).

Statistical analysis

Physicochemical and bioactive composition assays were performed in triplicate and antioxidant determination techniques in quadruplicate for each sample. All data are reported as mean \pm standard deviation of replicates. The means of all evaluated parameters were compared using Infostat Software (Di Rienzo, et al., 2017). Analysis of variance (ANOVA) and Tukey test were carried out to identify significant differences between different species or varieties with a significance at $p < 0,05$. Relationships between phenolic compounds content and antioxidant capacity were determined with the Pearson correlation analysis with the same statistical program.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical characterization

According to the results of physicochemical parameters (Table 1) the fruits evaluated were suitable for fresh consumption. Selections of 'Arazá' species were grouped into 'Arazá Amarillo' (AA - *P. cattleyanum f. lucidum*) and 'Arazá Rojo' (AR - *P. cattleyanum f. cattleyanum*) in accordance with the botanical forms and differences in their skin color. Differences found for this fruit were also related to the results of fruit weight, pH, titratable acidity (TA) and total soluble solids (SS), being comparable with previous studies (Medina, et al., 2011; dos Santos Pereira, et al., 2018).

Table 1. Physicochemical characterization in native fruits: AA - Arazá Amarillo; AR - Arazá Rojo; GI - Guaviyú and GO - Guayabo del país. Data are expressed as mean values \pm standard deviation; nd = not determined. Different letters within rows indicate significant differences at $p < 0,05$ by the Tukey test.

	AA	AR	GI	GO
Mass (g per fruit)	9,86 \pm 4,54	6,15 \pm 0,75	3,75 \pm 0,23	41,46 \pm 3,25
Moisture content (%)	76,7 \pm 1,01	78,5 \pm 2,44		80,5 \pm 0,88
pH	3,44 \pm 0,18 ^b	3,31 \pm 0,04 ^a	4,38 \pm 0,07 ^c	3,36 \pm 0,02 ^{ab}
TA (g/100 mL)	1,33 \pm 0,11 ^a	1,77 \pm 0,11 ^b	1,86 \pm 0,29 ^b	1,35 \pm 0,11 ^a
SS ($^{\circ}$ Brix)	12,46 \pm 1,21 ^{ab}	11,91 \pm 1,06 ^a	16,67 \pm 0,79 ^c	13,02 \pm 0,42 ^b

'Guayabo del país' (GO) were larger in size and displayed greater fresh mass than the other fruits. The average weight of all evaluated fruits varied greatly among cultivars, mainly in AA selections. These variations in the fruit weight were mainly influenced by the genotype but also by the soil, climatic conditions and

fruit maturity stage. Since the climatic and soil conditions were the same for all the cultivars evaluated in our study, the variability observed may be due to genetic differences among selections.

The highest values of pH, TA and SS content were found in ‘Guaviyú’ (GI) fruit. The SS:TA ratio is one of the most important parameters to determine the taste and palatability of the fruit and is correlated with consumer acceptability (Crisosto and Crisosto, 2005). In the evaluated fruits this ratio was significantly low for AR, indicating the predominance of acid on sweet taste, confirmed by the high TA and low SS values.

Bioactive compounds

The results for anthocyanins, vitamin C and total phenolic compounds are shown in Table 2. Anthocyanins concentration varied from 0,18 to 45,90 mg of c3g/100 g FW. GI presented the highest anthocyanins content, comparable to those of other well-known fruits sources of anthocyanins (Wu, et al., 2006) as to other Myrtaceae fruits (Rufino, et al., 2010). Anthocyanins are responsible for the red, blue and purple pigmentation in the fruits and, as expected, they were present in very low concentrations in AA and GO fruit flesh. The content of anthocyanins in the AA and AR selections varied significantly between $0,18 \pm 0,16$ to $8,13 \pm 0,04$ mg of c3g/100 g FW, which is consistent with results found in other studies (Vinholes, et al., 2017).

Table 2. Bioactive compounds content in the evaluated native fruits: AA - Arazá Amarillo; AR - Arazá Rojo; GI – Guaviyú and GO - Guayabo del país. Data are expressed as mean values \pm standard deviation; nd = not determined. Different letters within rows indicate significant differences at $p < 0,05$ by the Tukey test.

Antioxidants Compounds	AA	AR	GI	GO
Anthocyanins (mg c3g/100g FW)	$0,18 \pm 0,16^a$	$8,13 \pm 0,04^b$	$45,90 \pm 0,07^c$	nd
Vitamina C (mg aa/100g FW)	$68,89 \pm 6,26^{ab}$	$62,58 \pm 7,53^a$	$69,38 \pm 3,78^{ab}$	$72,91 \pm 17,13^b$
Total phenolics content (mg GAE/100g FW)	$85,14 \pm 6,01^b$	$130,15 \pm 12,13^c$	$137,29 \pm 4,47^c$	$55,47 \pm 15,93^a$

The average vitamin C content was 68,44 mg aa/100 g FW with significantly differences between the evaluated fruits. Similar results were reported for fruits and vegetables like red pepper, orange, grapefruit and kiwifruit which are considered the main contributors of vitamin C in the human diet (National Institutes of Health, 2018). This fruits therefore could be considered as good sources of this vitamin for human nutrition purpose (dos Santos Pereira, et al., 2018). It is well known that ascorbic acid levels are dependent of a wide variety of environmental factors

including light, temperature, salt and drought stress, the presence of atmospheric pollutants, metals and herbicides (Davey, et al., 2000). However in our experimental conditions the differences found between selections for the same species could be explained mainly by genetic factors.

Total phenolic compounds are important for antioxidant capacity due to hydroxyl groups in their structure that give an important scavenging activity of radical species. As shown in Table 2, significant difference ($p < 0,05$) between total phenolic contents in the studied fruits was observed. The highest amount of phenols was determined for AR ($130,15 \pm 12,13$ mg GAE/100g FW) and GI ($137,29 \pm 4,47$) and the least for GO ($55,47 \pm 15,93$). Same differences between AA and AR fruits phenolic contents were found by other authors (Medina, et al., 2011). The range of values was different from those reported in the literature (Denardin, et al., 2015; Zhu, 2018), but it may be due to diverse factors: geographic location, soil type, ambient and culture conditions and genetic variability, among others. In addition, the part of the fruit utilized, the extraction and determination methods can also be responsible for the observed differences. Most of the studies used the whole fruit, but some of them (Medina, et al., 2011) evaluated the composition on the fruit flesh. For the method of extraction, some authors use a multi-step extraction procedure including long periods of maceration with solvents with different polarities and removal of fat soluble substances prior phenolic contents analysis, while others use more simple methods (dos Santos Pereira, et al., 2018). When compared with local results found for these native fruits, we obtained relative higher ascorbic acid content and lower total polyphenol content (Feippe, et al., 2011; Silveira, et al., 2016).

Antioxidant activity

Table 3 shows the antioxidant activity determined by DPPH and ORAC assays. The antioxidant capacity displayed in native fruits varied according to the species analyzed ($p < 0,05$). The AA, AR and GI fruits have the highest DPPH values, more than two times the activity observed in GO ($1560,2 \pm 792,4$ mmol TE/100g FW).

Table 3. Antioxidant activity determined by DPPH and ORAC assays in native fruits: AA - Arazá Amarillo; AR - Arazá Rojo; GI - Guayiyú and GO - Guayabo del país. Data are expressed as mean values \pm standard deviation. Different letters within rows indicate significant differences at $p < 0,05$ by the Tukey test.

Antioxidant Capacity	AA	AR	GI	GO
DPPH ($\mu\text{mol TE}/100\text{g FW}$)	$2576,4 \pm 401,1^b$	$3213,8 \pm 346,9^c$	$2890,7 \pm 1057,5^{bc}$	$1560,2 \pm 792,4^a$
ORAC ($\mu\text{mol TE}/100\text{FW}$)	$3093,7 \pm 446,7^{bc}$	$3083,0 \pm 170,9^c$	$3002,7 \pm 731,3^b$	$673,7 \pm 151,4^a$

Among the 'Arazá' fruit, AR selections exhibited higher DPPH activity than AA. Similarly, the highest ORAC values were observed for AA, AR and GI with an average of 3059,8 mmol TE/100g FW, whereas a low antioxidant activity (637,7 mmol TE/100g FW) was measured in GO fruit. The variability among selections of same fruit species were high, 28% and 16% in average to DPPH and ORAC analysis, respectively. Limited information has been reported about antioxidant capacities in the fruit considered in this study. According to Ribeiro da Silva et al. (2014) 'Arazá' fruit flesh is a potent scavenger of reactive oxygen and nitrogen species. Similar results were obtained by Medina et al. (2011) and Vinholes et al. (2017) where edible portions of 'Arazá' from yellow and red genotypes showed higher antioxidant capacity measured with DPPH. *In vitro* studies of AR and GI demonstrated that these fruit can be considered as a good source of bioactive compounds with antioxidant properties (Dalla Nora, et al., 2014). However, cultivar, harvest time, maturity, storage and agroclimatic factors, as well as the part of fruit tested, can be responsible for frequent variation in antioxidant capacity values observed among fruits.

High and significant correlation between DPPH and ORAC results was obtained ($r = 0,80$, $p < 0,01$), indicating that any of these assays can be suitable for the antioxidant capacity evaluation of the fruits in our analytical conditions. Additionally, significant correlations were observed between total phenolics content and DPPH ($r = 0,73$, $p < 0,01$) and ORAC ($r = 0,82$, $p < 0,01$) showing that these compounds seem to contribute to the antioxidant capacity of the studied fruits.

CONCLUSIONS

'Arazá' (*Psidium cattleianum*), 'Guaviyú' (*Myrcianthes pungens*) and 'Guayabo del país' (*Acca sellowiana*) fruits proved to be good sources of natural antioxidants such as vitamin C and phenolics compounds, with high antioxidant capacity potential. The physicochemical and antioxidant characterizations of these native fruit selections could be a valuable tool to promote their consumption and represent good perspectives for nutraceutical purposes.

The information regarding bioactive compounds and antioxidant activities is important for nutritional characterization of the native fruits, but also to evaluate genetic and agronomic performance in order to develop new fruit crops. More studies could be conducted in other research areas as commercial production, fruit postharvest, storage conditions or food processing.

REFERENCES

- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K.M., Özyürek, M. and Güçlü, K., 2013. *Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity*. Durham: IUPAC. (IUPAC Technical Report).
- Bijttebier, S., Van der Auwera, A., Foubert, K., Voorspoels, S., Pieters, L., and Apers, S., 2016. Bridging the gap between comprehensive extraction protocols in plant metabolomics studies and method validation. In: *Anal Chim Acta*, 935, pp.136-

150. doi: 10.1016/j.aca.2016.06.047.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. In: *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), pp.25-30. doi: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- Cabrera, D., Vignale, B., Nebel, J.P., Feippe, A., Zoppolo, R. and Castillo, A., 2008. INIA y los frutos nativos de nuestra tierra. In: *Revista INIA*, 14, pp.36-38.
- Chang, S.K., Alasalvar, C. and Shahidi, F., 2016. Review of dried fruits: phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. In: *Journal of Functional Foods*, 21, pp.113-132. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.034>.
- Crisosto, C.H. and Crisosto, G.M., 2005. Relationship between ripe soluble solids concentration (RSSC) and consumer acceptance of high and low acid melting flesh peach and nectarine (*Prunus persica* (L.) Batsch) cultivars. In: *Postharvest Biology and Technology*, 38(3), pp.239-246. doi: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.07.007>.
- Davey, M.W., Montagu, M.V., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnov, N., et al., 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), pp.825-860. doi: 10.1002/(sici)1097-0010(20000515)80:7 < 825::aid-jsfa598>3.0.co;2-6.
- Dalla Nora, C., Jablonski, A., Rios, A.O., Hertz, P.F., Vogt de Jong, E. and Hickmann Flores, S., 2014. The characterisation and profile of the bioactive compounds in red guava (*Psidium cattleianum* Sabine) and guabiju (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand). In: *International Journal of Food Science and Technology*, (49), pp.1842-1849. doi: 10.1111/ijfs.12493.
- Denardin, C.C., Hirsch, G.E., da Rocha, R.F., Vizzotto, M., Henriques, A.T., Moreira, J.C.F., et al., 2015. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. In: *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(3), pp.387-398. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.01.006>.
- Di Rienzo, J.A., Balzarini, Mónica, González, Laura, Casanoves, Fernando, Tablada, Margot and Robledo, Carlos, 2017. InfoStat versión 2017 [On line]. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba. [Accessed: september 9, 2019]. Available at: <http://www.infostat.com.ar>
- dos Santos Pereira, E., Vinholes, J., C. Franzon, R., Dalmazo, G., Vizzotto, M. and Nora, L., 2018. *Psidium cattleianum* fruits: a review on its composition and bioactivity. In: *Food Chemistry*, 258, pp.95-103. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.024>.
- Feippe, A., Ibanez, F., Calistro, P., Zoppolo, R. and Vignale, B., 2011. Uruguayan native fruits provide antioxidant phytonutrients and potential health benefits. In: *Acta Horticulturae*, 918, pp.443-447. doi: 10.17660/ActaHortic.2011.918.57.
- Giusti, M. and Wrolstad, R.E., 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1), pp.F1.2.1-F1.2.13.
- Harborne, J.B., 1998. *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. London: Chapman and Hall.

- Medina, A.L., Haas, L.I.R., Chaves, F.C., Salvador, M., Zambiazzi, R.C., da Silva, W.P., et al., 2011. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. In: *Food Chemistry* 128(4), pp.916-922. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.119>.
- National Institutes of Health, 2018. *Vitamin C fact sheet for health professionals*. Office of dietary supplements [On line]. Bethesda: NIH. [Accessed: september 09, 2019]. Available at: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-HealthProfessional/#h4>
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A. and Deemer, E.K., 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. In: *J Agric Food Chem*, 50(11), pp.3122-3128. doi: 10.1021/jf0116606.
- Parsons, B.J., 2017. Antioxidants in food: the significance of characterisation, identification, chemical and biological assays in determining the role of antioxidants in food. In: *Foods*, 6(8), pp.68. doi: 10.3390/foods6080068.
- Pasquariello, M., Mastrobuoni, F., Di Patre, D., Zampella, L., Rita Capuano, L., Scortichini, M., et al., 2015. Agronomic, nutraceutical and molecular variability of feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) germplasm. In: *Scientia Horticulturae*, 191, pp.1-9. doi: 10.1016/j.scienta.2015.04.036.
- Prior, R.L., 2015. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): new horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. In: *Journal of Functional Foods*, 18, pp.797-810. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>.
- Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K.M., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp.4290-4302.
- Ribeiro da Silva, L.M., Teixeira de Figueiredo, E.A., Silva Ricardo, N.M., Pinto Vieira, I.G., Wilane de Figueiredo, R., Brasil, I.M., et al., 2014. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. In: *Food Chem* 143, pp.398-404. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.001.
- Rufino, M.d.S.M., Alves, R.E., de Brito, E.S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., and Mancini-Filho, J., 2010. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. In: *Food Chemistry*, 121(4), pp.996-1002. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>.
- Sánchez-Rangel, J.C., Benavides, J., Heredia, J., Cisneros-Zevallos, L. and Jacobo-Velázquez, D., 2013. The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. In: *Analytical Methods*, 5, pp.5990. doi: 10.1039/c3ay41125g.
- Seraglio, S.K.T., Schulz, M., Nehring, P., Della Betta, F., Valse, A.C., Daguer, H., et al., 2018. Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening. In: *Food Chemistry*, 239, pp.649-656. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.118>.
- Silveira, A.C., Oyarzún, D., Rivas, M. and Zaccari, F., 2016. Evaluación de la calidad

- poscosecha en frutos de guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). In: *Agrociencia Uruguay*, 20(2), pp.14-21.
- Vinholes, J., Lemos, G., Lia Barbieri, R., Franzon, R.C. and Vizzotto, M., 2017. In vitro assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araçá, butiá and pitanga. In: *Food Bioscience* 19, pp.92-100. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.06.005>.
- Wang, S., Meckling, K.A., Marcone, M.F., Kakuda, Y. and Tsao, R., 2011. Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. In: *J Agric Food Chem*, 59(3), pp.960-968. doi: 10.1021/jf1040977.
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E. and Prior, R.L., 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. In: *J Agric Food Chem*, 52(12), pp.4026-4037. doi: 10.1021/jf049696w.
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E. and Prior, R.L., 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), pp.4069-4075. doi: 10.1021/jf060300l.
- Zhu, F., 2018. Chemical and biological properties of feijoa (*Acca sellowiana*). In: *Trends in Food Science & Technology*, 81, pp.121-131. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.008>.

De residuo industrial a ingrediente funcional: el potencial de la cáscara de granada

From industrial waste to functional ingredient: the potential of the pomegranate peel

Do lixo industrial ao ingrediente funcional: o potencial da casca de romã

RECIBIDO: 4/9/2019 → APROBADO: 14/11/2019 ✉ parcia@latitud.org.uy

✎ TORRES, ÁNGELA (1); LEBED, MELINA (1); ARCIA, PATRICIA (2); CURUTCHET, ANA (1); COZZANO, SONIA (1)

(1) GRUPO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA, UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL URUGUAY, MONTEVIDEO, URUGUAY.

(2) LATITUD – FUNDACIÓN LATU, MONTEVIDEO, URUGUAY.

RESUMEN

Durante la elaboración industrial de jugo de granada se genera como subproducto su cáscara. Se plantea como objetivo revalorizar estas cáscaras por métodos de extracción verde utilizando antioxidantes solubles para recuperación de la fibra insoluble. La cáscara, secada y molida, fue sometida a un proceso de extracción con agua (65 °C por 30 min) y se obtuvieron dos fracciones: una soluble y otra insoluble. La fracción insoluble presentó un alto contenido de fibra ($52,28 \pm 2,99$ g/100 g) y la fracción soluble un alto contenido de polifenoles totales de $1049,98 \pm 3,98$ mg ácido gálico/100 g, y una capacidad antioxidante contra los radicales ABTS de $1486,57 \pm 0,05$ μ mol Trolox/g. Con la fracción soluble se formularon gelatinas y una bebida, con la fracción insoluble, galletas y muffins. Todas las formulaciones se desarrollaron sin azúcar, y las galletas y muffins se formularon para que cumplieran con el *claim* “fuente de fibra”. La aceptabilidad fue evaluada por consumidores ($n = 100$), de lo que resultó que las galletas y muffins fueron los más aceptados (7,0 y 6,3, respectivamente). Las cáscaras de granada fueron revalorizadas de forma que se obtuvieron nuevos ingredientes funcionales, lo que representa una oportunidad para la industria.

PALABRAS CLAVE: granada, subproductos, fibra antioxidante, desarrollo de productos, aceptabilidad sensorial.

ABSTRACT

During the industrial production of pomegranate juice, peel is generated as a by-product. The aim of this work was to value this by-product through the green extraction of soluble antioxidants while recovering insoluble fiber. Pomegranate by-product once dried and ground was subjected to a water extraction process (65 °C for 30 min), obtaining two fractions: soluble and insoluble ones. The insoluble fraction had a high fiber content ($52,28 \pm 2,99$ g/100g) while the soluble fraction had a high total polyphenol content ($1049,98 \pm 3,98$ mg gallic acid/100g) and an antioxidant capacity against ABTS radicals of $1486,57 \pm 0,05$ μ mol Trolox/g. Using the soluble fraction, a jelly and a beverage were formulated, while cookies and muffins were formulated with the insoluble fraction. All products were formulated without sugar, and cookies and muffins also complying with the claim "source of fiber". Acceptability was evaluated by consumers (n = 100), being cookies and muffins the most accepted (7,0 and 6,3, respectively). Pomegranate by-product was revalued in a sustainable and low cost way, obtaining new functional ingredients, so representing an opportunity for industry.

KEYWORDS: pomegranate, by-products, antioxidant fiber, product development, sensory acceptability.

RESUMO

Durante a produção industrial de suco de romã, sua casca é gerada como um subproduto. Tem como objetivo reavaliar essas cascas por extração verde de antioxidantes solúveis e recuperação de fibras insolúveis. A casca, seca e moída, foi submetida a um processo de extração com água (65 °C por 30 min), obtendo duas frações: uma solúvel e uma insolúvel. A fração insolúvel apresentou elevado teor de fibras ($52,28 \pm 2,99$ g/100g) e a fração solúvel apresentou alto teor de polifenóis totais de $1049,98 \pm 3,98$ mg de ácido gálico/100g e capacidade antioxidante Radicais ABTS de $1486,57 \pm 0,05$ μ mol Trolox/g. Geléia e uma bebida foram formuladas com a fração solúvel, enquanto que os biscoitos e muffins com a fração insolúvel. Todos os productos foram formulados sem açúcar e bolachas e muffins para que cumpram com a alegação "fonte de fibra". A aceitabilidade foi avaliada pelos consumidores (n = 100), sendo os biscoitos e muffins os mais aceitos (7,0 e 6,3, respectivamente). As cascas de romã foram avaliadas de forma sustentável e a baixo custo, obtendo novos ingredientes funcionais, representando uma oportunidade para a indústria.

PALAVRAS-CHAVE: romã, subprodutos, fibra antioxidante, desenvolvimento de produtos, aceitabilidade sensorial.

INTRODUCCIÓN

En la producción industrial de jugo de granada una tonelada de fruta fresca genera 669 kg de subproducto que contiene 78% de cáscara y 22% de semillas (Qu,

et al., 2009). En consecuencia, la cáscara de granada constituye hasta el 50% de la fruta entera y podría transformarse en una valiosa materia prima para la elaboración de alimentos funcionales.

La cáscara de granada contiene un alto contenido de polifenoles en comparación con su concentración en cualquier otra parte de la fruta, principalmente taninos hidrolizables (punicalina, punicalagina, ácido gálico y elágico) y flavonoides (antocianinas, catequinas y otras sustancias complejas) (Akhtar, et al., 2014). Estos compuestos ejercen efectos beneficiosos para la salud a través de su captación de radicales libres y su potencial antioxidante (Fischer, et al., 2010).

Además, la cáscara de granada es muy rica en fibra, especialmente insoluble. Actualmente, la fibra dietética (FD) se considera un nutriente (Bingham, et al., 2003). Debido a sus propiedades tecnofuncionales, fundamentalmente su capacidad de retención de agua, desempeña un papel importante en el proceso de digestión, lo que ayuda al movimiento de nutrientes en el intestino y reduce la incidencia de cáncer de colon (Bingham, et al., 2003).

Por otra parte, la gestión de residuos es uno de los principales desafíos que enfrentan la mayoría de las plantas de procesamiento de alimentos. La cáscara de granada, como subproducto industrial, no solo ocupa mucho volumen, sino que también libera olores y gases durante su descomposición, todo lo cual ha llevado al sector de la tecnología alimentaria a buscar soluciones (Castillo, 2010). Para lograr recuperar y utilizar los compuestos de interés presentes en las cáscaras, las tendencias van en la línea de generar tecnologías verdes y limpias para la protección del medio ambiente y dar a estos residuos un valor agregado (Castillo, 2010). La extracción verde se basa en el diseño de procedimientos rentables que reducen el consumo de energía, utilizan agua o solventes y productos naturales renovables, y garantizan un producto seguro y de alta calidad (Chemat, et al., 2012).

La recuperación y utilización de subproductos tiene tres objetivos claros: desarrollar productos naturales innovadores, obtener un beneficio económico irrefutable y lograr un impacto ambiental directo y positivo. El costo de oportunidad parecería evidente (Montgomery, 2004).

Desafortunadamente, la granada todavía está poco explotada en los sistemas alimentarios: la astringencia es el factor limitante clave. No obstante, sus innumerables beneficios incitan a llevar adelante mayor investigación para resolver este problema y a lograr su aprovechamiento (Akhtar, et al., 2014). Al momento de crear un producto el primer paso es conocer las expectativas del mercado. Está claro que el consumidor actual busca nuevas opciones saludables, pero no se puede ignorar que las características sensoriales son fundamentales para que las acepte. Por ende, el desarrollo de un nuevo alimento funcional enriquecido con compuestos activos presentes en la cáscara de granada requiere, por un lado, atributos de sabor aceptables y, por otro lado, que se lo presente acompañado de información nutricional visible con el fin de comunicar su valor nutricional y funcional.

Con estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue revalorizar el residuo de la producción de jugo de granada mediante la obtención de extractos ricos en

antioxidantes y fibra, y de un proceso de extracción “verde” y simple. En paralelo, se desarrollaron formulaciones de alimentos funcionales incorporando estos extractos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de harina de cáscara de granada

Las cáscaras de granadas frescas se obtuvieron como un subproducto de la producción de jugo. Se utilizaron las variedades *Acco* y *Wonder*, proporcionadas por la empresa uruguaya Granadas del Sol. Las cáscaras de dos lotes se secaron en un horno de convección a $50,0 \pm 2,0$ °C por 8 hs y luego se molieron en un molino de rotor de laboratorio de alta velocidad (Retsch ZM 200) para obtener un tamaño de partícula de menos de 1 mm.

Obtención de extractos

La harina de cáscara de granada fue sometida a un proceso de extracción acuosa del cual se obtuvieron dos fracciones: una soluble y otra insoluble en agua. La harina se mezcló con agua destilada (1:4, m/v) y la mezcla se colocó en un baño de agua a 65 °C por 30 minutos, de acuerdo a Gutiérrez et al. (2019). Luego, se centrifugó a 9500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez llegado este punto, los sobrenadantes fueron separados de los sedimentos. La fracción soluble formada por los sobrenadantes fue liofilizada (Biobase Bioindustry Shandong Co. Model BKFD) y los sedimentos pasaron a formar la fracción insoluble, la cual se secó en estufa de convección durante 4 horas a 50 °C.

Caracterización fisicoquímica

La harina de cáscara de granada, la fracción insoluble y la soluble fueron caracterizadas fisicoquímicamente. El contenido de humedad fue determinado por análisis gravimétrico en un horno de convección a 105 °C hasta peso constante. El contenido de proteína se determinó por el método de Kjeldahl (AOAC International, 2012a) y la fibra dietética total mediante el método AOAC 985.29 (AOAC International, 2012b). Para estimar la cantidad de grasa total se siguió el procedimiento ISO 6492:1999 (International Organization for Standardization, 1999). El análisis de cenizas se realizó en un horno de mufla siguiendo ISO 5984:2002 (International Organization for Standardization, 2002). Los carbohidratos totales fueron obtenidos por diferencia entre el peso total y la suma de los gramos de proteína, grasa, fibra, humedad y cenizas contenidos en 100 gramos de muestra.

Determinación de polifenoles totales y capacidad antioxidante

Se realizó la determinación del contenido total de polifenoles y la capacidad antioxidante de las tres partes (harina, fracción soluble y fracción insoluble).

Previo a los análisis se realizaron extracciones con etanol, para lo cual se colocaron 5 g de cada matriz (harina de cáscara de granada, extracto soluble e insoluble) en tubos de centrifuga cubiertos con papel de aluminio. Luego se agregaron 25 mL de etanol al 96% con posterior homogeneización en Ultraturrax (5 min). Las soluciones se centrifugaron a 9500 rpm durante 20 min a 4 °C, y a continuación se realizó una filtración a matraces volumétricos de 100 mL. Sobre el precipitado en el tubo de centrifuga se repitió la adición de etanol al 96%, homogeneización, centrifugación y filtración, mezclando los sobrenadantes y completando hasta 100 mL con etanol al 96% cada matraz volumétrico. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada matriz.

Contenido total de polifenoles

El contenido total de polifenoles se determinó utilizando el método de Folin-Ciocalteu. Se añadieron 0,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu a tubos de ensayo, 6 mL de agua destilada y 1 mL de la muestra resultante de la extracción con etanol 96%, agitando cada vez. Luego se agregó 1 mL de carbonato de sodio (al 20%) y finalmente 1,5 mL más de agua destilada. Las mezclas se agitaron en Ultraturrax y se dejaron durante 90 minutos en la oscuridad. Para la curva de calibración se prepararon soluciones a partir de solución estándar de ácido gálico de 10 a 120 mg/l. Se midió la absorbancia a 765 nm. Los resultados se expresaron en mg ácido gálico/100g de muestra en base seca.

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó a través de dos métodos diferentes: el ensayo del catión radical (ABTS⁺) y el análisis de la capacidad para la reducción férrica del plasma (FRAP). El primero consistió en un ensayo de decoloración de cationes radicales ABTS, según lo propuesto por Re et al. (1999) con modificaciones. Una solución acuosa 7 mM de ABTS (5 mL) se mezcló con 88 µL de solución acuosa 140 mM de persulfato de potasio y se dejó reposar en la oscuridad durante 16 horas para completar la formación del catión radical ABTS. La mezcla se diluyó en etanol/agua (50:50, v/v) hasta que la absorbancia a 734 nm fue de $0,7 \pm 0,02$ unidades en el espectrofotómetro (Shimadzu 1800 UV – Visible). Para la curva de calibración se prepararon soluciones de Trolox mezclando solución madre de Trolox en buffer fosfato sódico (2,5 mM) con etanol:agua (50:50, v/v), y se obtuvieron concentraciones que variaron de 0,0 a 2,0 mM. Tanto para las soluciones estándar de Trolox como para las muestras (extractos solubles etanólicos al 96% de harina, fracción soluble e insoluble), 30 µL de cada una se combinaron en tubos de ensayo con 3 mL de la solución de ABTS diluido, y se dejaron reposar durante 30 minutos en la oscuridad después de una correcta agitación en equipo Ultraturrax. La absorbancia se leyó a 734 nm en el espectrofotómetro. Los resultados se expresaron en µmol de Trolox por gramo de muestra en base seca.

El procedimiento FRAP se realizó basándose en el método descrito por Pulido et al. (2000). Para la preparación del reactivo FRAP, se utilizó una solución 10 mM de TPTZ [complejo férrico tripiridil triazina (Fe (III))] en HCl 40 mM, una solución 20 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y otra de tampón de acetato sódico anhidro 0.3 M, pH 3,6, las tres mezcladas en volúmenes iguales (1:1:1), generando un color ámbar. La solución se almacenó en oscuridad a 37 °C en un baño de agua hasta que fue utilizada. Para la curva de calibración, se prepararon soluciones acuosas de Trolox en concentraciones de 50 a 750 μM . Luego se mezclaron en tubos de ensayo alícuotas de 30 μl de agua destilada con 30 μl de muestra o solución estándar de Trolox y 900 μl de reactivo FRAP. Después de 30 minutos de descanso en la oscuridad a 37 °C, se midió la absorbancia a 595 nm (Shimadzu 1800 UV-Visible). Los resultados fueron expresados en μmol de trolox por gramo de muestra en base seca.

Formulación de productos

Se desarrollaron cuatro alimentos funcionales. La fracción soluble se utilizó como ingrediente en la producción de gelatinas y de una bebida, mientras que la insoluble se incorporó a galletas saladas y muffins. Todos los productos fueron formulados sin azúcar. Las galletas y muffins se formularon para que cumplieran con el *claim* “fuente de fibra”, según lo establecido en el MERCOSUR (2012).

En ensayos preliminares se probaron diferentes combinaciones de ingredientes y en las galletas se evaluaron diferentes grosores y temperaturas de horneado. El resultado son las formulaciones finales que se presentan en las Tablas 1, 2, 3 y 4.

TABLA 1. Formulación de galletas.

Ingredientes	%
Harina de trigo 0000	52,41
Agua	27,78
Aceite girasol alto oleico	9,87
Fracción insoluble	8,41
Polvo de hornear	1,01
Sal	0,52

TABLA 2. Formulación de muffins.

Ingredientes	%
Aceite girasol alto oleico	26,31
Harina de trigo 0000	22,89
Huevo	15,71
Fracción insoluble	13,70
Sucralosa (Splenda)	11,11
Agua	6,49
Polvo de hornear	3,20
Saborizante vainilla	0,59

TABLA 3. Formulación de gelatinas.

Ingredientes	%
Agua	80,92
Fracción soluble	12,12
Gelatina	3,60
Sucralosa	1,62
Ácido cítrico	1,21
Agar agar	0,51
Colorante carmín	0,02

TABLA 4. Formulación de bebida.

Ingredientes	%
Agua	90,00
Fracción soluble	9,00
Sucralosa	0,90
Ácido cítrico	0,10
Colorante carmín	0,001

Cabe destacar que el orden de incorporación de los ingredientes en el caso de las gelatinas influye en la textura y consistencia, por lo que luego de recurrir a varias formulaciones se obtuvo el siguiente orden óptimo. Se mezcla inicialmente la gelatina (en forma de polvo) con agua a temperatura ambiente, luego se somete la mezcla a temperatura y al observar la primera burbuja de ebullición se agrega el agar-agar. Se continúa revolviendo hasta que hierve totalmente y una vez homogenizada la mezcla se retira del calor. En este momento se agrega la fracción soluble, sucralosa,

ácido cítrico y colorante natural carmín (en ese orden) y se mezcla hasta que no queden grumos y quede todo unificado. Por último, se vierte la solución en moldes de silicona. Con respecto a los productos horneados, las galletas fueron horneadas durante 15 min a 180 °C, mientras que los muffins se hornearon a 180 °C por 20 min.

Evaluación sensorial

Los cuatro productos fueron sometidos a análisis sensorial con el fin de determinar su aceptabilidad. Los atributos sensoriales fueron evaluados por consumidores (n = 100 para cada producto), quienes los probaron y posteriormente completaron un cuestionario, teniendo a disposición la etiqueta de cada producto con su respectiva información nutricional. La aceptabilidad se evaluó asignando puntajes de acuerdo con una escala hedónica de 9 puntos (desde 1 = “me disgusta mucho” hasta 9 = “me gusta mucho”).

De acuerdo al tipo de producto, se evaluaron atributos específicos mediante el uso de preguntas *check-all-that-apply* (CATA). Dentro de una lista presentada, los consumidores identificaron los atributos que consideraron que mejor describen cada producto.

La evaluación sensorial se llevó a cabo con estudiantes y trabajadores de la Universidad Católica del Uruguay, comprendidos en un rango de entre 17 y 63 años, consumidores frecuentes de cada tipo de producto.

Etiquetas

Para cada producto formulado se diseñaron sus correspondientes etiquetas con el fin de comunicar mediante ellas los ingredientes, la información nutricional y las características más relevantes asociadas al producto. Todos los productos se formularon “sin azúcar”, la bebida y gelatinas se definieron como alimentos “con antioxidantes naturales” y los muffins y galletas como “fuente de fibra”. Las etiquetas se muestran en la Figura 1.

(a)

FUENTE DE FIBRA

GRANITAS

Galletas Saladas adicionadas con Fibra proveniente de Granada

INFORMACIÓN NUTRICIONAL

Porción	30 g (7 galletas)	
	Cantidad por porción	% VD (*)
Valor energético	81 kcal = 339 kJ	4
Carbohidratos	12 g	4
Proteínas	1.7 g	2
Grasas totales	2.9 g	5
Grasas saturadas	0.6 g	3
Grasas trans	0 g	-
Fibra alimentaria	2.5 g	10
Sodio	0.06 mg	-

Ingredientes:
Harina de trigo, agua, aceite de girasol alto oleico, azúcar de Granada, polvo de hornear, sal.

Contenido Neto: 220 g
Industria Uruguaya

- Sin conservantes
Sin aceite vegetal hidrogenado
Sin lactosa
- 0 % GRASAS TRANS
- Con antioxidantes naturales

(*) Valores diarios con base a una dieta de 2000 kcal u 8400 kJ



Figura 1. Información proporcionada a los consumidores durante la evaluación sensorial:
(a) galletas, (b) muffins, (c) bebida, (d) gelatinas

Análisis estadístico

Los análisis fisicoquímicos de la harina, fracción soluble e insoluble se realizaron por duplicado, mientras que los funcionales se realizaron por triplicado. Todos los datos fueron expresados como la media \pm desviación estándar. Se realizaron análisis de varianzas (ANOVA) para evaluar las diferencias entre harina, fracción soluble y fracción insoluble para cada análisis fisicoquímico y funcional. Las diferencias significativas fueron determinadas con el test de Tukey ($p \leq 0,05$). Los análisis fueron ejecutados usando InfoStat (Versión 2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica

La composición fisicoquímica de las tres matrices analizadas se presenta en la Tabla 5.

TABLA 5. Composición fisicoquímica de la harina, fracción soluble y fracción insoluble. Resultados expresados en base húmeda (bh) como media \pm desviación estándar, en g/100g.

	Harina	Fracción soluble	Fracción insoluble
Humedad	22,01 \pm 0,29 ^a	20,95 \pm 0,63 ^a	6,07 \pm 0,13 ^b
Proteínas	2,99 \pm 0,17 ^a	1,11 \pm 0,03 ^b	5,44 \pm 0,02 ^c
Grasas	0,24 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,00 ^b	0,05 \pm 0,01 ^b
Cenizas	3,18 \pm 0,12 ^a	5,72 \pm 0,20 ^b	5,59 \pm 0,23 ^b
Fibra total alimentaria	42,19 \pm 2,07 ^b	9,51 \pm 0,20 ^a	51,35 \pm 5,45 ^b
Carbohidratos ¹	29,39 ^a	62,66 ^b	31,50 ^a

¹Contenido de carbohidratos determinado por diferencia.

Nota. Letras diferentes en una fila implican diferencias significativas entre muestras ($p < 0.05$).

Los valores de humedad, proteínas, grasas, cenizas y carbohidratos obtenidos son similares a lo reportado por Abid et al. (2016), quienes estudiaron distintas variedades de granada y establecieron rangos de resultados posibles correspondientes a cada característica fisicoquímica. Por un lado, concluyen que la cáscara de granada, independientemente de la variedad, no tiene aporte de grasa, lo cual coincide con los datos obtenidos en esta investigación. Por otro lado, establecen un contenido de cenizas que oscila aproximadamente entre 3,61 y 4,70% bh y uno de proteínas que se ubica entre 3,81 a 6,66% bh, los cuales también se asemejan a los valores obtenidos. Con respecto a los azúcares totales, Abid et al. (2016) afirman que estos se conforman principalmente de sustancias solubles, lo cual tiene coherencia con los valores de carbohidratos observados en la Tabla 5, que fueron determinados

por diferencia (62,66 y 31,50 g/100 g bh para fracción soluble e insoluble, respectivamente). El azúcar que posee en mayor cantidad es la glucosa (probablemente de origen celulósico), seguido de manosa y xilosa. En cantidades menores se encuentra la arabinosa, galactosa, ramnosa y fructosa (Abid, et al., 2016).

La Tabla 5 revela un alto contenido de fibra alimentaria total, tanto para la harina como para la fracción insoluble y se aprecia una diferencia significativa entre la fibra presente en estos y en el extracto soluble. El extracto insoluble presenta 51,35 g/100g de fibra y se puede considerar una “fuente” de fibra dado lo reportado por Larrauri (1999), quien observó esta característica para matrices con fibra superior a 50%.

Según Gutiérrez et al. (2019), la cáscara de naranja presenta 43,0 g/100 g en base seca (bs) de fibra dietética total. Asimismo, Pérez et al. (2017) afirman que el subproducto del procesamiento de arándanos tiene 26,15 g/100 g bs. En comparación, tanto la harina de cáscara de granada como la fracción insoluble estudiada ofrecen una fibra alimentaria total superior: en base seca 54,10 g/100 g y 54,67 g/100 g, respectivamente.

Determinación de polifenoles totales y capacidad antioxidante

Los resultados de los análisis de polifenoles totales y capacidad antioxidante se presentan en la Tabla 6.

TABLA 6. Composición funcional de la harina, fracción soluble y fracción insoluble. Resultados expresados en base seca (bs) como media \pm desviación estándar.

	Harina	Fracción soluble	Fracción insoluble
Polifenoles totales (mg ác. gálico/100 g)	1043 \pm 34 ^b	1050 \pm 28 ^b	939,0 \pm 18,00 ^a
ABTS (μ mol Trolox/g)	578,7 \pm 0,1 ^a	1486 \pm 0,1 ^b	198,4 \pm 0,02 ^c
FRAP (μ mol Trolox/g)	57,43 \pm 1,12 ^b	15,46 \pm 0,04 ^a	85,68 \pm 4,21 ^c

Nota. Letras diferentes por fila implican diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$).

Tanto la fracción soluble como la harina no evidenciaron diferencias significativas en el contenido de polifenoles totales. La cáscara de granada se caracteriza por tener un elevado porcentaje de polifenoles y se destacan como componentes principales punicalina y punicalagina (elagitaninos) y flavonoides (Fischer, et al., 2010). Los flavonoides se encuentran en todas las plantas, pero están localizados principalmente en las vacuolas de las células de la piel de frutas y hortalizas y aportan parte del sabor y del color (Carreño, et al., 2015). Todos estos compuestos son solubles en agua y, consecuentemente, es muy probable que hayan sido extraídos en gran medida por ella y, por ende, pasado a estar en la fracción soluble. Esto explicaría la diferencia observada entre los polifenoles totales en ambas fracciones.

Por otro lado, la fracción insoluble presenta cierta cantidad de polifenoles totales y esto se podría explicar considerando dos aspectos. El primero de ellos es que en la cáscara se presentan compuestos insolubles tales como ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos (derivados fenólicos) que también son detectados en este análisis (Ventura, 2012). El segundo se relaciona con el rendimiento de la extracción acuosa, es decir, con el hecho que el 100% de los polifenoles totales solubles presentes en la harina no pueden ser efectivamente extraídos mediante el método de extracción implementado, ya que durante el proceso de extracción de compuestos fenólicos una de sus partes queda embebida en la fibra. Según Saura-Calixto et al. (2010), los compuestos fenólicos se encuentran unidos a polisacáridos por interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes, haciendo necesaria la hidrólisis para su extracción. Se ha reportado que los compuestos que permanecen unidos a la fibra de cáscara de granada corresponden a taninos hidrolizables, como punicalagina, punicalina, pedunculagina, entre otros compuestos fenólicos, como ácido elágico, ácido gálico, rutina y quercetina (Middha, et al., 2013). Esto permite suponer que determinados polifenoles, a pesar de ser solubles, han podido haber permanecido en la fracción insoluble incluso luego de la extracción.

Al comparar los resultados con los obtenidos para otras cáscaras de frutas, como la naranja y el arándano, se observa que la cáscara de la granada es la que tiene mayor concentración de polifenoles totales. Mientras que la cáscara de naranja presenta 41,7 mg ac. gálico/g bs (Gutiérrez, et al., 2019) y la de arándano 285,14 mg ac. gálico/g bs (Pérez, et al., 2017), la harina constituida por cáscara de granada tiene 1043 mg ac. gálico/g bs, valor que es significativamente superior.

Los valores obtenidos por el ensayo de Folin-Ciocalteu son consistentes con los hallados en la bibliografía. El-Gharably y Ashoush (2011) detectaron 1096 mg ácido gálico/100g en cáscara de granadas de Perú. Devatkal et al. (2010) reportaron 585 mg ácido gálico/100g en extractos acuosos de granadas de la India, valor que ronda un orden similar al de los resultados obtenidos en el análisis de polifenoles totales. En el caso de El-Said et al. (2014), la extracción de la cáscara de granada con diferentes métodos y solventes dio lugar a un rango de polifenoles totales comprendidos entre 1398 hasta 1778 mg ác. gálico/100g.

Cabe destacar que el método de extracción ensayado en este trabajo se realizó en base acuosa, con el fin de usar métodos de bajo impacto ambiental. En la bibliografía se reporta el uso de otros solventes y la obtención de mejores resultados en lo que respecta a la solubilización de antioxidantes solubles. Un número considerable de fuentes sugieren que otros solventes como metanol, etanol y acetona brindan mayor rendimiento que el agua a la hora de extraer polifenoles. Ahmed (2012) reporta resultados obtenidos al investigar sobre extractos solubles metanoicos y etanoicos que parten de cáscara de granada que alcanzan valores de polifenoles totales de 86,7 g ác. gálico/100g y 12,434 g ác. gálico/100g, respectivamente, lo que significa una concentración de 8 a 12 veces mayor que los 1049,98 mg ác. gálico/100 g que ofrece la fracción soluble de este trabajo. Singh et al. (2002) extrajeron antioxidantes de la cáscara de granada con el uso de metanol, acetona y agua y encontraron que el metanol fue el solvente con mayor rendimiento. Li et al. (2005) consideran que la forma más eficiente de extraer antioxidantes es utilizar una combinación de

diferentes solventes, ya que la solubilidad de cada antioxidante puede diferir según el solvente. De hecho, en un estudio realizado mostraron que el extracto obtenido mediante el uso de una mezcla de metanol, etanol, acetona y agua tuvo un valor de FRAP significativamente más alto que los extractos obtenidos utilizando los solventes solos. Este resultado indica que la mezcla de distintos solventes tiene un alto poder de recuperación de antioxidantes.

Con respecto a la capacidad antioxidante, es sabido que los polifenoles así como los flavonoides y otros compuestos presentes en la cáscara de granada son altamente efectivos como eliminadores de radicales libres y muy buenos antioxidantes (Ahmed, 2012).

Los resultados de ABTS mostraron que hay diferencias significativas entre la capacidad antioxidante que presenta la fracción soluble con la de la harina y la fracción insoluble.

La cáscara de granada resultó tener una capacidad antioxidante según ABTS de 578,73 $\mu\text{mol trolox/g}$ bs, mayor a la de la cáscara de arándanos reportada por Pérez et al. (2017) y 339,09 $\mu\text{mol trolox/g}$ bs.

Respecto a los valores de capacidad antioxidante obtenidos por el método de FRAP, resultaron con un comportamiento distinto al observado por ABTS. Aunque ambos tienen como objetivo medir la capacidad antioxidante, lo hacen de diferentes maneras, lo que implica mecanismos de reacción distintos. El ensayo de ABTS mide la capacidad para donar hidrógenos o electrones, mientras que el de FRAP mide la capacidad de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} (Surco, et al., 2016). A su vez, el primero permite medir antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos, mientras que el segundo, según Çelik et al. (2010), no responde tan efectivamente a los lipofílicos, subestimando la capacidad antioxidante real de las matrices. Por ejemplo, Gutiérrez (2015) reportó valores mayores de ABTS en comparación con FRAP en su análisis de cáscara de granada. Un comportamiento similar fue observado por Fischer et al. (2010), quienes reportaron la misma tendencia con 1361,9 y 589,1 $\mu\text{mol trolox/g}$ para ABTS y FRAP, respectivamente.

Los valores de capacidad antioxidante obtenidos por FRAP para la harina, fracción soluble e insoluble resultaron con una tendencia opuesta a la obtenida por ABTS. Este resultado no concuerda con lo observado por Fischer et al. (2010), quienes determinaron capacidad antioxidante por ABTS y FRAP en jugo, cáscara y mesocarpio de granada, mostraron una correlación entre ambos análisis y señalaron que el mesocarpio presentó mayor medición tanto de ABTS como de FRAP.

Para poder explicar el comportamiento observado para FRAP se debe profundizar la investigación e identificar los compuestos presentes en la cáscara, de modo de entender cómo reaccionan y tener así una mejor comprensión de las posibles interacciones que pueden interferir con las reacciones que se dan para FRAP. Se sugiere evaluar tendencia contraria de FRAP y ABTS mediante análisis instrumental con el fin de detectar componentes presentes en ambos extractos e identificar compuestos asociados a la fracción insoluble que son detectados por FRAP y no por ABTS.

En este sentido, Surco et al. (2016) aportan información acerca de la influencia de la estructura química de los ácidos fenólicos sobre la determinación de su capacidad antioxidante y establecen que esta depende y está relacionada con la cantidad y

posición de grupos hidroxilos en las moléculas, su posición en la estructura del anillo bencénico con respecto al grupo carboxílico y la longitud de la cadena de este último.

Formulación de productos

La fracción soluble obtenida en este trabajo se destacó por tener un contenido de polifenoles totales y una capacidad antioxidante mayor que la insoluble, mientras que esta última se caracterizó principalmente por ser rica en fibra alimentaria.

La formulación de alimentos fuentes de fibra se puede lograr utilizando esta clase de ingredientes. A modo de ejemplo, Ramírez-Maganda et al. (2015) utilizaron subproductos del procesamiento de mango en la formulación de muffins.

Cabe recalcar que según el reglamento técnico MERCOSUR sobre información nutricional complementaria, declaraciones de propiedades nutricionales, Resolución N° 01/12 (MERCOSUR, 2012), el *claim* “fuente de fibra” está autorizado si un alimento posee como mínimo 2,5 g de fibra por porción. En el caso de las galletas, la porción contempla 30 g y para los muffins 60 g, por lo que se decidió formularlos de manera tal de poder rotularlos como “fuente de fibra”. Se calculó la cantidad necesaria de extracto insoluble para que el producto final cuente como mínimo con tal porcentaje de fibra. La razón por la cual se decidió utilizar la mínima cantidad fue el fuerte impacto de los atributos sensoriales que presentan los extractos de la cáscara de granada, tales como el amargor y la astringencia, que pueden afectar fácilmente la sensibilidad de los consumidores a la hora de calificar a los productos.

A pesar de que no existe un *claim* aprobado en la normativa de Uruguay como “fuente de antioxidantes”, y dada la importancia atribuida a la comunicación de este aspecto a los consumidores en la etiqueta de la bebida y gelatinas, se decidió incorporar la frase “con antioxidantes naturales”. Schubert et al. (1999) realizaron un ensayo *in vitro* de un extracto de jugo de granada fermentado y encontraron que su capacidad antioxidante es superior a la del vino tinto y similar a la del extracto de té verde.

Evaluación sensorial

La aceptabilidad obtenida para cada producto se observa en la tabla 7.

TABLA 7. Aceptabilidad para los cuatro productos (expresada como la media \pm desviación estándar).

Aceptabilidad	
Galletas	7,0 \pm 1,4
Muffins	6,6 \pm 1,7
Bebida	5,7 \pm 1,7
Gelatinas	5,7 \pm 1,7

En consumidores informados, la aceptabilidad de las galletas y muffins alcanzó un valor por el cual, según Muñoz et al. (1992), el producto puede considerarse aceptable y su comercialización recomendable. Estos autores proponen una frontera para separar a los productos aceptables de los que no lo son, y establecen que para los primeros los valores de aceptabilidad tienen que ser iguales o superiores a 6. Si bien la bebida y las gelatinas no alcanzaron este valor mínimo, los resultados del estudio de CATA (*check all that apply*) realizado para estos dos productos revelan que los atributos más destacados pueden considerarse aspectos positivos. El 60% de los consumidores catalogó a la bebida como “saludable” y un 58% la consideró con un “color atractivo”. Por otra parte, las gelatinas obtuvieron altos porcentajes en lo que respecta a los atributos de “color atractivo” (75%), “saludable” (44%), “sabor a fruta” (58%) y “rico” (46%), entre otros. Esto refleja que los consumidores recibieron efectivamente el mensaje que se deseó transmitir mediante la información nutricional y funcional dispuesta en la etiqueta. El uso del atributo “saludable” evidencia una mayor influencia en la aceptabilidad y explica la alta preferencia de los consumidores (Urruzola, et al., 2018). Por este motivo se espera que la consideración de que se trata de alimentos con beneficios para la salud permita que la bebida y las gelatinas alcancen una aceptabilidad adecuada.

Según Carrillo et al. (2012), aunque la aceptabilidad del consumidor se ve afectada principalmente por las características sensoriales del producto, algunos factores extrínsecos (no sensoriales), tales como beneficios para la salud, influyen en la aceptación. Bimbo et al. (2017) explican que ingredientes como la fibra tienen una fuerte aceptación en general, con afirmaciones “naturales” (que en este caso se incluyeron en las etiquetas de las galletas y muffins), y el nivel más alto de aceptación. Además, los autores concluyen que las afirmaciones relacionadas con la salud en los alimentos enriquecidos con fibra dietética y antioxidantes generan un impacto en los consumidores que muestran interés en cuestiones de salud.

Como se puede observar en la Tabla 8, los resultados de la pregunta CATA muestran que, tanto para la bebida, muffins y galletas, los atributos de “saludable” y “rico” se encontraron dentro de los cuatro con mayor porcentaje de respuesta, lo cual es una asociación muy positiva. Las gomitas también comprendieron a estos dos descriptores en posiciones altas de la lista, dentro de los cinco con mayor frecuencia.

TABLA 8. Frecuencia (%) de atributos incluidos en CATA: (a) galletas, (b) muffins, (c) bebida, (d) gelatinas.

Atributos	%	Atributos	%	Atributos	%	Atributos	%
Saludable	80	Saludable	71	Saludable	60	Color atractivo	75
Color atractivo	17	Color atractivo	12	Color atractivo	58	Blando	70
Rico	66	Rico	38	Rica	31	Con retrogusto	16
Blando	1	Húmedo	28	Poco sabor	25	Sabor extraño	22
Sabro a fruta	1	Poco sabor	1	Fresco	38	Amargo	7
Sabor extraño	17	Blando	21	Sin gusto	13	Poco sabor	9
Fibroso	51	Sabor extraño	21	Feo	17	Saludable	44
Sin gusto	7	Grasoso	6	Amigable con el medio ambiente	28	Color feo	4
Feo	1	Seco	36	Astringente	11	Sabor a fruta	58
Amigable	20	Feo	0	Sabor intenso	18	Duro	0
Amargo	9	Amigable con el medio ambiente	26	Color desagradable	5	Elástico	29
Color desagradable	0	Amargo	2	Con retrogusto	18	Rico	46
Húmedo	0	Sin gusto	0	Sabor extraño	24	Feo	9
Sabroso	34	Fresco	19			Sabor intenso	44
Seco	35	Aspecto extraño	23				
Con retrogusto	12	Fibroso	31				
Poco sabor	7	Sabroso	27				
Crocante	70	Con retrogusto	37				
Arenoso	12	Color desagradable	7				
		Esponjoso	23				
		Sabor a fruta	15				
		Arenoso	27				
(a)		(b)		(c)		(d)	

El retrogusto estuvo presente en los muffins y se atribuye al uso de sucralosa como endulzante. La cantidad de edulcorante agregada se consideró necesaria para contrarrestar la astringencia propia de la cáscara de granada. Por lo tanto, se recomienda sustituir la sucralosa por una combinación de edulcorantes si se desea mantener el estatus de “sin azúcar”, o realizar una reducción parcial o total de edulcorante, utilizando una mezcla de edulcorante y azúcar o reemplazándolo totalmente.

Otro aspecto a observar es que las galletas y los muffins tuvieron mayor aceptabilidad que las gelatinas y la bebida. Lo que tienen en común ambos productos es que están compuestos por más carbohidratos y estos podrían ayudar a enmascarar la astringencia. Este es un argumento a considerar al evaluar la inclusión de un pequeño porcentaje de azúcar en los muffins para aumentar su aceptabilidad. Asimismo, también se sugiere probar nuevas formulaciones de bebida y gelatinas reemplazando un porcentaje de edulcorante por azúcar, con base en el mismo argumento.

Es importante destacar que la galleta fue el único producto salado elaborado y el que alcanzó mayor aceptabilidad: presentó cuatros atributos positivos con mayor frecuencia de respuesta. Este valor en la aceptabilidad podría deberse al efecto de la sal, debido a que su utilización como ingrediente en productos que contienen fibra podría estar enmascarando la astringencia y el retrogusto generado por la granada.

Según lo reportado por Akhtar et al. (2014), la sensación astringente en los productos se asocia a la formación de complejos de proteínas y taninos. En la cavidad oral, los taninos se precipitan cuando se exponen a histatinas y proteínas ricas en prolina. En una investigación estos autores demostraron que la astringencia de los fenólicos de la cáscara de granada es perceptible en solución acuosa al 0,025% (p/v) para panelistas capacitados. Sin embargo, los mismos panelistas probaron helado enriquecido con fenólicos de cáscara de granada hasta el 1,0% (p/p) y no percibieron astringencia debido a la presencia de carbohidratos en el producto, los cuales enmascaran el sabor astringente de los fenólicos en las muestras analizadas. Soares et al. (2012) también reportaron que la astringencia de los compuestos fenólicos, así como su interacción con las proteínas, se puede reducir con la adición de carbohidratos.

Aproximadamente un 20% de los consumidores destacaron los cuatro productos como “amigables con el medio ambiente”. Sin embargo, un alto porcentaje de los consumidores identificaron los productos como saludables. Por lo tanto, se recomienda buscar otra estrategia de presentación del producto, que destaque la revalorización de la cáscara de granada y apunte a la reducción de residuos y la protección del medio ambiente.

CONCLUSIONES

Mediante un proceso de extracción verde, se obtuvieron dos fracciones a partir de la cáscara de granada, con diferentes funcionalidades y aplicaciones en el ámbito de la industria.

Por una parte, la fracción soluble, rica en antioxidantes y con alta capacidad antioxidante, fue utilizada como materia prima en la formulación de una bebida y gelatinas. Por otra parte, la fracción insoluble, con altos contenidos de fibra, fue incorporada en galletas y muffins.

De esta investigación surge que es posible desarrollar productos que tengan como ingrediente funcional a la cáscara de granada o extractos derivados de ella, y que a la vez logren un buen nivel de aceptación. Los alimentos formulados se pueden catalogar como alimentos funcionales por su contenido de fibra y antioxidantes. Como atributo adicional ninguno contenía azúcar.

De este modo, se logra brindar a los productores la posibilidad de dar más valor a la producción de jugo de granada, mediante la revalorización de los subproductos y el empleo de técnicas simples y efectivas.

RECONOCIMIENTOS

A la empresa Granadas del Sol por proveer la cáscara de granada utilizada en esta investigación.

REFERENCIAS

- Abid, M., Cheikhrouhou, S., Renard, C., Bureau, S., Cuvelier, G., Attia, H. y Ayadi, M., 2016. Characterization of pectins extracted from pomegranate peel and their gelling properties. En: *Food Chemistry*, 215(15), pp.318-325. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.181>
- Ahmed E. Abdel Moneim, 2012. Antioxidant activities of *Punica granatum* (pomegranate) peel extract on brain of rats. En: *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(2), pp.195-199. DOI: 10.5897/JMPR11.500
- Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D. y Sestili, P. 2014. Pomegranate peel and peel extracts: chemistry and food features. En: *Food Chemistry*, 174, pp.417-425. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.035>
- AOAC International, 2012a. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 19a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 984.13, first action 1984 - final action 1994.
- AOAC International, 2012b. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 19a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 985.29, first action 1985 - final action 1986.
- Bimbo, F., Bonanno, A., Nocella, G., Viscecchia, R., Nardone, G., De Devitiis, B. y Carlucci, D., 2017. Consumers' acceptance and preferences for nutrition-modified and functional dairy products: a systematic review. En: *Appetite*, 113(1), pp.141-154. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.02.031>
- Bingham, S.A., Day, N.E. y Luben, R., 2003. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European prospective investigation into cancer nutrition (EPIC): An observational study. En: *Lancet*, 361, pp.1496-1501. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13174-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13174-1)
- Carreño, J., Pérez, Z., Pérez, E., Gisela, P. y Araujo, K., 2015. Evaluación fisicoquímica y fitoquímica de granada (*Punica granatum L.*). En: *Revista Tecnocientífica URU*, 8, pp.2343-6360.
- Carrillo, E., Varela, P. y Fiszman, S., 2012. Effects of food package information and sensory characteristics on the perception of healthiness and the acceptability of enriched biscuits. En: *Food Research International*, 48(1), pp.209-216. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.016>
- Castillo, T., 2010. *Extracción y cuantificación de aceite esencial de cáscara de Granada (Punica granatum L.) y determinar su efecto antifúngico sobre Penicillium sp.* México: Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" de México. (Tesis de grado).
- Çelik, S.E., Özyürek, M., Güçlü, K., y Apak, R. 2010. Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by

- CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. En: *Talanta*, 81(4-5), pp.1300-1309. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.02.025>
- Chemat, F., Vian, M. A. y Cravotto, G., 2012. Green extraction of natural products: concept and principles. En: *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), pp.8615-8627. DOI: 10.3390/ijms13078615
- Devatkal, S., Narsaiah, K. y Borah, A., 2010. Anti-oxidant effect of extracts of kinnow rind, pomegranate rind and seed powders in cooked goat meat patties. En: *Meat Science*, 85(1), pp.155-159. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.12.019>
- El-Gharably, A.M. y Ashoush, I., 2011. Utilization impact of adding pomegranate rind powder and red beet powder as natural antioxidant on quality characteristics of beef sausage. En: *World Journal of Dairy & Food Science*, 6(1), pp.86-97.
- El-Said, M.M., Haggag, H.F., Fakhr El-Din, H.M., Gad, A.S. y Farahat, A.M., 2014. Antioxidant activities and physical properties of stirred yoghurt fortified with pomegranate peel extracts. En: *Annals of Agricultural Sciences*, 59(2), pp.207-212. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2014.11.007>
- Fischer, U.A., Carle, R. y Kammerer, D.R., 2010. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. En: *Food Chemistry*, 127(2), pp.807-821. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.156>
- Gutiérrez, S., 2015. *Calidad y capacidad antioxidante de salchichas de cerdo adicionadas con jugo y cáscara de granada (Punica granatum L.)*. Hermosillo: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- Gutiérrez Barrutia, B., Curutchet, A., Arcia, P., y Cozzano, S., 2019. New functional ingredient from orange juice byproduct through a green extraction method. En: *J Food Process Preserv.* 43(5), pp.e13934. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13934>
- International Organization for Standardization, 1999. ISO 6492: *Animal feeding stuffs — Determination of fat content*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 2002. ISO 5984: *Animal feeding stuffs — Determination of crude ash*. Ginebra: ISO.
- Larrauri, J., 1999. New approaches in the preparation of high dietary fibre powders from fruit by-products. En: *Trends in Food Science and Technology*, 10(1), pp.3-8. DOI: 10.1016/s0924-2244(99)00016-3
- Lee, C. J., Chen, L. G., Liang, W. L. y Wang, C. C., 2010. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum Linne* in vitro and in vivo. *Food Chem.*, 118(2), pp.315-322.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J. y Cheng, S., 2005. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. En: *Food Chemistry*, 96, pp.254-260.
- Middha, S. K., Usha, T. y Pande, V., 2013. HPLC Evaluation of phenolic profile, nutritive content, and antioxidant capacity of extracts obtained from *Punica granatum* fruit peel. En: *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013, pp.6.

DOI:10.1155/2013/296236

- MERCOSUR, 2012. MERCOSUR/GMC/RES. N01/12. Reglamento técnico Mercosur sobre información nutricional complementaria (declaraciones de propiedades nutricionales) [En línea]. Buenos Aires: GMC. [Consulta: agosto de 2017]. Disponible en: http://montevideo.gub.uy/sites/default/files/resolucion_mercosur_1_2012.pdf
- Montgomery, R., 2004. Development of biobased products. En: *Bioresour. Technol.*, 91(1), pp.1-29. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00154-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00154-8)
- Muñoz, A., Civille, G., y Carr, B., eds, 1992. *Introduction to sensory evaluation in quality control*. New York: Springer. pp.1-22.
- Pérez, C., Tagliani, C., Cozzano, S. y Curutchet, A., 2017. Valorisation of blueberry pomace through the formulation of enriched cookies. En: *Food Science and Technology International*, 24(4), pp.301-308. doi: 10.1007/s13197-015-2128-1
- Pulido, R., Bravo, L. y Saura-Calixto, F., 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), pp.3396-3402. <https://doi.org/10.1021/jf9913458>
- Qu, W.J., Pan, Z.L., Zhang, R.H., Ma, H.L., Chen, X.G., Zhu, B.N., Wang, Z.B. y Atungulu, G.G., 2009. Integrated extraction and anaerobic digestion process for recovery of nutraceuticals and biogas from pomegranate marc. En: *Transactions of the ASABE*, 52(6), pp.1997-2006.
- Ramírez-Maganda, J., Blancas-Benítez, F., Zamora-Gasga, V., García-Magaña, M., Bello-Pérez, L., Tovar, J. y Sáyago-Ayerdi, S., 2015. Nutritional properties and phenolic content of a bakery product substituted with a mango (*Mangifera indica*) 'Ataulfo' processing by-product. En: *Food Research International*, 73, pp.117-123. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.004>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. En: *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9/10), pp.1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Schubert, S.Y., Lansky, E.P. y Neeman I., 1999. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. En: *J. Ethnopharmacol.*, 66(1), pp.11-17. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00222-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00222-0)
- Singh, R., Murthy, K.N.C. y Jayaprakasha, G.K., 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts using in vitro models. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), pp.81-86. <https://doi.org/10.1021/jf010865b>
- Saura-Calixto, F., Pérez-Jiménez, J., Touriño, S., Serrano, J., Fuguet, E., Torres, J. L. y Goñi, I., 2010. Proanthocyanidin metabolites associated with dietary fibre from in vitro colonic fermentation and proanthocyanidin metabolites in human plasma. En: *Mol. Nutr. Food Res.*, 54(7), pp.939-946. DOI: 10.1002/mnfr.200900276
- Soares, S., Mateus, M. y De Freitas, V., 2012. Carbohydrates inhibit salivary

- proteins precipitation by condensed tannins. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(15), pp.3966-3972. <https://doi.org/10.1021/jf3002747>
- Surco, F., Valle, M., Loyola, E., Dueñas, M. y Santos, C., 2016. Actividad antioxidante de metabolitos de flavonoides originados por la microflora del intestino humano. En: *Rev Soc Quím Perú*, 82(1), pp.29-37.
- Urruzola, N., Santana, M. y Gámbaro, A., 2018. Aceptabilidad sensorial de una hamburguesa de carne vacuna y vegetales. En: *INNOTEC*, 15, pp.15-22.
- Ventura, J., Alarcón, F., Roman, R., Campos, E., Reyes, M., Boone, V., Jasso, E. y Aguilar, C., 2012. Quality and antioxidant properties of a reduced-sugar pomegranate juice jelly with an aqueous extract of pomegranate peels. En: *Food Chemistry*, 136(1), pp.109-115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.039>

Bio-plastic polymers from renewable sources

Bio-plásticos de polímeros a partir de fuentes renovables

Polímeros bioplásticos de fontes renováveis

RECIBIDO: 20/9/2019 → APROBADO: 11/12/2019 ✉ diana.baigts@udlap.mx

✉ BAIGTS-ALLENDE DIANA K.(1), PÉREZ-ALVA ALEXA(1), SANDOVAL-HARO MARÍA F.(1),
SORROZA-MARTÍNEZ ADRIANA P.(1), METRI-OJEDA JORGE C.(1)

(1) DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, ALIMENTOS Y AMBIENTAL.
UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS, SAN ANDRÉS CHOLULA, PUEBLA. MÉXICO.

RESUMEN

Los biopolímeros son útiles en la industria por sus propiedades elásticas y su carácter sustentable en el reemplazo de polímeros no renovables. En este artículo se elaboraron y caracterizaron bioplásticos utilizando quitosano (CH), alginato de sodio (SA) y galactomanano (GAL) a partir de insectos (*Hermetia illucens*), algas pardas (*Macrocystis pyrifera*) y semillas (*Leucaena leucocephala*), respectivamente. La estructura de los biopolímeros se observó por espectroscopía de infrarrojo (FTIR) y se caracterizó en viscosidad a diferentes concentraciones, y los bioplásticos desarrollados se caracterizaron en color y propiedades mecánicas (textura). Los resultados fueron comparados con muestras estándar (comerciales). Los espectros de FTIR confirmaron la presencia de la estructura típica (huella) de los polímeros obtenidos. El SA mostró una viscosidad significativamente mayor en todas las concentraciones comparado con el estándar y los otros polímeros. La fuerza de los bioplásticos fue similar entre CH, SA y GAL para todas las concentraciones; únicamente SA (0,5%) demostró una mayor fuerza que el estándar. Para las mediciones de color, los valores de matiz indicaron colores rojo-amarillento y el croma aumentó proporcionalmente a la concentración de polímero. Las propiedades observadas sugieren que estas fuentes sustentables son una alternativa para la producción de bioplásticos y podría mejorarse su funcionalización por interacciones moleculares para su aplicación en diferentes sectores industriales.

PALABRAS CLAVE: galactomanano, quitosano, alginato de sodio.

ABSTRACT

Biopolymers are useful in the industry due to its elastic properties and sustainability as replacements of non-renewable polymers. In this article, bioplastics were produced and characterized using chitosan (CH), sodium alginate (SA), and galactomannan (GAL) from insects (*Hermetia illucens*), brown algae (*Macrocystis pyrifera*) and seeds (*Leucaena leucocephala*), respectively. The structure of biopolymers was observed by infrared spectroscopy (FTIR) and characterized by viscosity at different concentrations. The developed bioplastics were characterized by color and mechanical properties (texture). The results were compared to standard samples (commercial). The FTIR spectra confirmed the presence of the typical structure (footprint) for the obtained polymers. The SA showed significantly higher viscosity for all concentrations compared to the standard and the other polymers. The bioplastics strength was similar among CH, SA and GAL for all concentrations; only SA (0,5%) demonstrated higher strength than the standard. For color measurements, hue value indicated a red-yellowish color and the chrome increased directly proportional with polymer concentration. The observed properties suggest that these sustainable sources might be an alternative to bioplastic production, which can be extended to functionalization and molecular interactions for broad applications in different industries.

KEYWORDS: galactomannan, chitosan, sodium alginate.

RESUMO

Os biopolímeros são úteis na indústria por suas propriedades elásticas e sua natureza sustentável na substituição de polímeros não renováveis. Neste artigo, os bioplásticos foram preparados e caracterizados utilizando quitosana (CH), alginato de sódio (SA) e galactomanano (GAL) de insetos (*Hermetia illucens*), algas marrons (*Macrocystis pyrifera*) e sementes (*Leucaena leucocephala*), respectivamente. A estrutura dos biopolímeros foi observada por espectroscopia no infravermelho (FTIR) e caracterizada em viscosidade em diferentes concentrações, e os bioplásticos desenvolvidos foram caracterizados em propriedades mecânicas e de cor (textura). Os resultados foram comparados com amostras padrão (comerciais). Os espectros de FTIR confirmaram a presença da estrutura típica (pegada) dos polímeros obtidos. O SA mostrou uma viscosidade significativamente maior em todas as concentrações em comparação com o padrão e os outros polímeros. A força dos bioplásticos foi semelhante entre CH, SA e GAL para todas as concentrações; somente o SA (0,5%) demonstrou maior força que o padrão. Para medições de cores, os valores de matiz indicaram cores vermelho-amareladas e o croma aumentou proporcionalmente à concentração do polímero. As propriedades observadas sugerem que essas fontes sustentáveis são uma alternativa para a produção de bioplásticos, podendo ser melhoradas por interações moleculares para aplicação em diferentes setores industriais.

PALAVRAS-CHAVE: galactomanano, quitosana, alginato de sódio.

INTRODUCTION

Nowadays, concern about the environmental impact of industrial sectors has driven the search for sustainable alternatives for both material production and processing. One of the main problems is plastic waste pollution, due to these materials not being biocompatible and, at the same time, highly resistant to degradation. Bio-based polymers are used as an alternative to replacing non-renewable plastics using available, sustainable, and local sources (Wool and Sun, 2005).

Bio-based polymers can be used as adhesives, foams, films, rigid or flexible plastics, coatings, elastomers, rubber and resins, among others (Wool and Sun, 2005) in several industries such as food, chemical, pharmaceutical, cosmetic, textile and agriculture. Some compounds used for that purpose are starch, cellulose, carrageenan, proteins (gluten, soy, zein), gums, alginate, galactomannan and chitosan, which have been considered as novel ingredients (Verlinden, et al., 2007; Vox, et al., 2013).

Galactomannan is a polysaccharide obtained from legumes endosperm. It is structured by a skeleton of mannoses linked by β - (1,4) bonds and branches formed by galactose units linked by α (1,6) bond. Galactomannan edible coatings (konjac, *Cassia grandis* and *Gleditsia triacanthos*), as well as guar and locust bean gum, have been used for food and agricultural applications (Mikkonen, et al., 2010; Vox, et al., 2013; Albuquerque, et al., 2017). *Leucaena leucocephala* (guaje), a legume native from Mexico, belongs to family Fabaceae (Ferreira, et al., 2016; Mittal, et al., 2016) and it is rich mainly in protein (31,70%) and carbohydrates (61,31%) (Román-Cortés, et al., 2014; Almeida Filho, et al., 2016). The principal carbohydrate fraction is the soluble fiber galactomannan, which is formed by linear chains of β -(1-4)-D-mannose units substituted by single α -D-galactose units at O-6 (Ferreira, et al., 2016; Mittal, et al., 2016).

Another highly available biopolymer is chitosan, which is obtained from chitin (N-acetyl glucosamine with β -(1,4) bonds) deacetylation. It is present in crustaceans, insects and other species such as yeast and fungi. Chitosan has been applied in multiple areas (food, cosmetics, textile and pharmaceutical) to produce ecological materials (Caligiani, et al., 2018; Chávez, et al., 2019) such as edible coatings, antimicrobial films and large-scale 3D products (Fernández and Ingber, 2014; Revathi and Thambidurai, 2017; Souza, et al., 2017).

Recently, increasing interest in obtaining compounds from insects such as protein, oil, and polysaccharides has taken place because they are a sustainable and low-cost source for raw material production (Caligiani, et al., 2018). From this point of view, the inclusion of emerging materials such as microalgae, duckweeds (aquatic plants) and algae is being encouraged for the production of added-value compounds. An example is macroalgae, which is rich in alginic acid, also known as alginate. Its salts, especially sodium alginate, are useful for industrial applications such as food packaging material, paper, coating and also for pharmaceutical and medical purposes. In the food industry, it is used as an edible coating and bio-active compounds carrier (De'Nobili, et al., 2016; Ferreira, et al., 2016). Sodium

alginate is a polyelectrolyte constituted by monomeric units of α -D-mannuronate and β -l-glucuronate linked by 1-4 bonds. The brown algae (“giant kelp” *sargassum*) has recently become an environmental concern because of its accumulation in the sea and the harmful effect it causes to a wide array of animal species and coral reefs (Popa, et al., 2011).

This study is aimed to utilize three different sustainable sources (insects, legume seed and brown algae) to obtain bio-based polymers as a potential alternative for bioplastics production.

MATERIALS AND METHODS

Materials

PROENTO Company kindly provided black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) (Queretaro, Mexico), brown algae (*Macrocystis pyrifera*) was purchased from ALGAS PACIFIC (Baja California, Mexico), and guaje seeds (*Leucaena leucocephala*) were obtained from a local market in Oaxaca, Mexico. HCl, NaOH, acetic acid, CaCl₂, Na₂CO₃, ethanol, and glycerol were analytical grade acquired by Sigma-Aldrich Co. Commercial chitosan, sodium alginate and xanthan gum were purchased from Sigma-Aldrich Co and FMC Corporation, respectively, and used as standard polymers.

Chitosan production

Black soldier fly larvae chitin was demineralized using HCl 1N in a ratio of 1:15 (w/v) for 1 hour at 40 °C and continuously stirred, the mixture was washed with distilled water until its neutralization. Next, proteins were removed with NaOH (1M) solution in a ratio of 1:15 (w/v) at the same conditions. Chitin was discolored using an ethanol/acetone solution (1:1) at a ratio of 1:15 (w/v) under constant stirring for 1 hour. The treated chitin was dried by convection at 40 °C. For chitosan production, chitin was deacetylated by boiling chitin solutions (1:15 w/v) in NaOH (50%) for 1 hour. Lastly, chitosan was washed using distilled water until neutrality and dried overnight at 30 °C (Song, et al., 2018).

Sodium alginate production

Brown algae powder (*Macrocystis pyrifera*) was soaked overnight (20 h) in 600 mL of CaCl₂ (1%) at room temperature. Then the algae were washed with distilled water (3 times), afterwards, the pellet was resuspended in 250 mL of HCl 5% for one hour, filtered and then re-washed with distilled water. The obtained pellet was incubated overnight in 600 mL of Na₂CO₃ (3%). The mixture was centrifuged at 6000 rpm for 20 min at room temperature. Sodium alginate was precipitated from the supernatant by adding ethanol (1:1 v/v). Finally, sodium alginate was washed with an excess of ethanol and water and freeze-dried (Chee, et al., 2010).

Galactomannan production

Dried guaje seeds (*Leucaena leucocephala*) were soaked in water (1:10) and stirred at 60 °C for 1 hour. Afterward, the mixture was filtered, and the extract was centrifuged at 6000 rpm at 25 °C for 5 minutes. The galactomannan was precipitated by adding ethanol 96% to the supernatant (1:3 v/v) under slow and constant stirring, filtrated, and freeze-dried (Mittal, et al., 2016).

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The structure of the biopolymers chitosan (CH), galactomannan (GAL) and sodium alginate (SA) was determined by FTIR and compared to commercial samples. Dried-samples (powder) footprint was obtained in a range of 400-4000 cm⁻¹ using an Agilent Cary 630 FTIR infrared spectrometer (Agilent technologies).

Viscosity

Rheological properties of biopolymer aqueous dispersions at three concentrations (0,5%, 1% and 1,5%) were measured using a Brookfield Viscometer DV-II equipped with an SC-27 needle at 20 °C at 100 rpm. Galactomannan and sodium alginate dispersions were heated at 60 °C x 1 h and 40 °C x 10 min (respectively) and cooled down to room temperature prior measurements. In the case of chitosan, the used solvent was acetic acid (0,1 M) and the mixture was kept under stirring overnight. Commercial chitosan, xanthan gum and sodium alginate were used as control samples.

Bioplastics preparation

Biopolymer solutions (0,5%, 1% and 1,5%) with 1% of glycerol were stirred until its homogenization, then 15 mL of the mixture was poured in a silicone cast and left to dry at room temperature for approximately 48 hours.

Bioplastic characterization

The color of bioplastics was determined using a Konica Minolta CR-400 Colorimeter. The results obtained were expressed in CIELab coordinate system. Chroma (C*) and hue angle (H*) were calculated using Equation 1 and Equation 2, respectively.

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$H^* = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

The mechanical properties of bioplastics were measured using a texture analyzer (Shimadzu EZ-SX). Uniaxial compression test was performed to study the fracture properties for a better understanding of the energy in the matrix and determine

the type of network formed by the studied polymers. The bioplastics were cut into cylindrical samples (12 mm of diameter and 0,5 mm of thickness), the final distance was set at 3 mm of deformation using 1 mm/s of speed at room temperature. Data was analyzed by Trapezium software (TRAPEZIUMX).

Statistical analysis

All experiments were done in triplicate ($n = 3$) and an analysis of variance (ANOVA) of the data was performed using the Minitab software version 18. Significant differences were determined by using Duncan's multiple comparison procedure at $p < 0,05$.

RESULTS

FTIR footprint

Extracted biopolymers showed a similar footprint than standard samples for all cases. However, in some regions, higher intensity peaks were observed (Figure 1). In the case of SA, standard samples showed a lower presence of hydroxyl, manuronic and uronic acid groups ($2800-3600\text{ cm}^{-1}$ and $1150-800\text{ cm}^{-1}$) compared to the extracted biopolymers (Figure 1A). For chitosan (Figure 1B), higher peaks for the standard samples were observed uniquely at $2800-3600\text{ cm}^{-1}$ region (C-H, N-H, and O-H bonds). In Figure 1C, it can be observed that xanthan gum (standard) showed an increased intensity compared to GAL, mainly at $900-1150\text{ cm}^{-1}$ $800-870\text{ cm}^{-1}$ (C-O and C-O-H groups) in the carbohydrate structure.

These differences demonstrated some structural changes in the biopolymers; it is well known that the molecule structure is determined by several factors such as the extraction parameters, the nature of the raw material, standardization (commercial material), among others. Commercial chitosan and xanthan gum (CH standard and GAL standard, respectively) were obtained from crustaceous and bacteria, respectively, unlike the biopolymers from this study, which were obtained from insects and legume seed. In the case of SA, even though both standard and extracted are from brown algae, the compositional characteristics and extraction method could differ from each other affecting its structure.

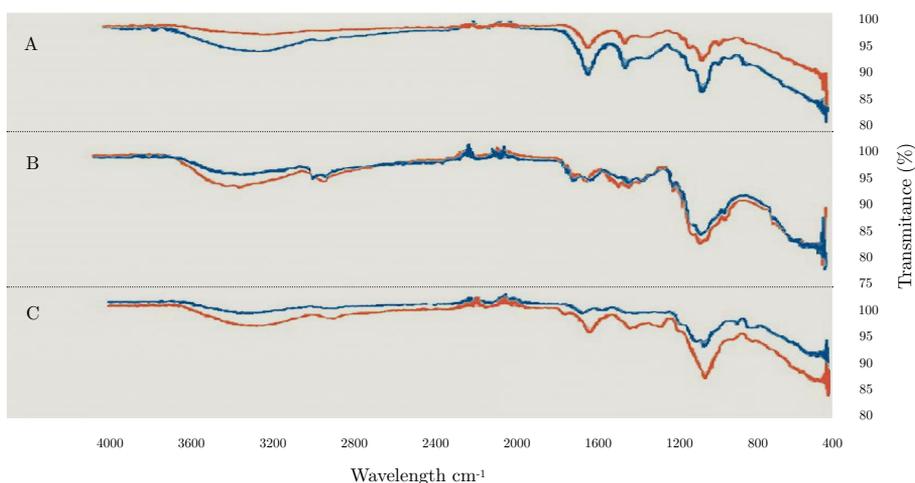


Figure 1. FTIR spectra for SA (A), CH (B), and GAL (C) in blue lines and their respective standard polymers in orange lines.

Viscosity

Flow behavior of biopolymers solutions is shown in Table 1. For all cases, the solutions behaved as shear-thinning fluids (viscosity decreases with increasing shear stress), and the viscosity increased with the biopolymer concentration. At all concentrations, SA showed the highest viscosity values (~ 101 cP, 487 cP, and 1,212 cP for each concentration) compared to the other samples, including the standard. In contrast, CH and GAL presented lower viscosity ($p < 0,05$) compared to their respective standards at all concentrations.

Table 1. Extracted SA, CH, GAL and control polymers viscosity (cP) at 0,5, 1 and 1,5% concentrations.

Polymer	Viscosity (cP)		
	0,50%	1%	1,50%
SA	101,25 ± 1,767	487,5 ± 7,071	1212,5 ± 10,606
SA standard	21,67 ± 1,443	91,67 ± 1,443	244,17 ± 5,204
CH	4,83 ± 0,288	12,33 ± 0,288	15,16 ± 0,288
CH standard	32,5 ± 3,530	102,5 ± 0,001	467,5 ± 0,001
GAL	12,5 ± 0,000	120 ± 3,535	393,75 ± 1,767
GAL standard	392,5 ± 17,677	705 ± 21,213	922,5 ± 45,961

Bioplastics characteristics: color and texture analysis

Standard bioplastics colors were statistically different ($p < 0,05$) compared to the obtained from the extracted polymers, in general colorless and more translucent

films were observed (Table 2). SA, CH, and GAL bioplastics showed a hue value range from 80 to 100°, indicating a red-yellowish color. Chroma (color saturation) increased proportionally with polymer concentration, the higher values were for SA ($15,74 \pm 0,48 - 25,06 \pm 0,21$), followed by GAL ($12,65 \pm 0,14 - 23,00 \pm 0,02$) and CH ($8,63 \pm 0,37 - 12,01 \pm 0,74$).

Table 2. Color (L, a*, b* chroma and hue) of bioplastics obtained by different polymers at 0,5, 1 and 1,5%.

Polymer (%)	L	a*	b*	Chroma	Hue	
CH	0,5	$91,98 \pm 0,304$	$-0,65 \pm 0,068$	$8,60 \pm 0,160$	$8,63 \pm 0,374$	$94,47 \pm 0,374$
	1	$88,59 \pm 1,449$	$-0,48 \pm 0,026$	$10,25 \pm 0,257$	$10,26 \pm 0,190$	$92,68 \pm 0,190$
	1,5	$89,25 \pm 0,156$	$-0,43 \pm 0,156$	$12,01 \pm 0,051$	$12,01 \pm 0,742$	$92,06 \pm 0,742$
CH standard	0,5	$92,09 \pm 0,490$	$-1,11 \pm 0,045$	$8,40 \pm 0,005$	$8,47 \pm 0,303$	$97,54 \pm 0,303$
	1	$93,03 \pm 0,010$	$-1,31 \pm 0,020$	$8,57 \pm 0,040$	$8,67 \pm 0,111$	$98,71 \pm 0,111$
	1,5	$93,56 \pm 0,037$	$-1,24 \pm 0,046$	$8,58 \pm 0,035$	$8,67 \pm 0,329$	$98,23 \pm 0,329$
SA	0,5	$86,3 \pm 1,019$	$-0,17 \pm 0,051$	$15,74 \pm 0,489$	$15,74 \pm 0,202$	$90,63 \pm 0,202$
	1	$84,82 \pm 0,650$	$0,39 \pm 0,145$	$20,26 \pm 0,618$	$20,26 \pm 0,388$	$88,89 \pm 0,388$
	1,5	$79,91 \pm 0,290$	$1,03 \pm 0,098$	$25,04 \pm 0,212$	$25,06 \pm 0,204$	$87,63 \pm 0,204$
SA standard	0,5	$94,08 \pm 0,060$	$-0,98 \pm 0,010$	$5,69 \pm 0,122$	$5,77 \pm 0,145$	$99,77 \pm 0,145$
	1	$93,25 \pm 0,540$	$-1,02 \pm 0,045$	$6,79 \pm 0,331$	$6,86 \pm 0,046$	$98,59 \pm 0,046$
	1,5	$92,33 \pm 0,213$	$1,08 \pm 0,078$	$8,44 \pm 0,786$	$8,51 \pm 0,237$	$97,29 \pm 0,237$
GAL	0,5	$90,17 \pm 0,070$	$0,23 \pm 0,014$	$12,65 \pm 0,148$	$12,65 \pm 0,148$	$88,95 \pm 0,076$
	1	$87,72 \pm 0,100$	$1,32 \pm 0,176$	$19,44 \pm 0,289$	$19,49 \pm 0,277$	$86,09 \pm 0,576$
	1,5	$84,99 \pm 0,014$	$2,32 \pm 0,007$	$22,88 \pm 0,021$	$23,00 \pm 0,021$	$84,19 \pm 0,012$
GAL standard	0,5	$93,6 \pm 0,304$	$-0,53 \pm 0,014$	$4,71 \pm 0,091$	$4,74 \pm 0,092$	$96,41 \pm 0,045$
	1	$93,59 \pm 0,806$	$-1,21 \pm 0,007$	$6,78 \pm 0,021$	$6,89 \pm 0,019$	$100,15 \pm 0,088$
	1,5	$94,27 \pm 0,098$	$-1,03 \pm 0,014$	$6,27 \pm 0,728$	$6,35 \pm 0,716$	$99,38 \pm 1,196$

Texture

The highest strength observed was for GAL bioplastics and its standard for all concentrations measured ($0,955 \pm 0,091$ and $1,478 \pm 0,026$ N, respectively). However, standard bioplastics were stronger. Similar results were found for CH at 0,5 and 1% ($0,369 - 0,451$ N) in comparison to standard bioplastics. At 1,5% of CH ($0,475 \pm 0,021$ N) the firmness was significantly lower ($p < 0,05$) than standard ($0,881 \pm 0,069$ N).

SA films showed a significantly higher mechanical resistance ($p < 0,05$) compared to its standard ($0,207 \pm 0,038$ and $0,085 \pm 0,020$ N, respectively), nevertheless,

when the concentration of the polymers increased, SA bioplastics presented lower resistance at 1 and 1,5 % ($p < 0,05$).

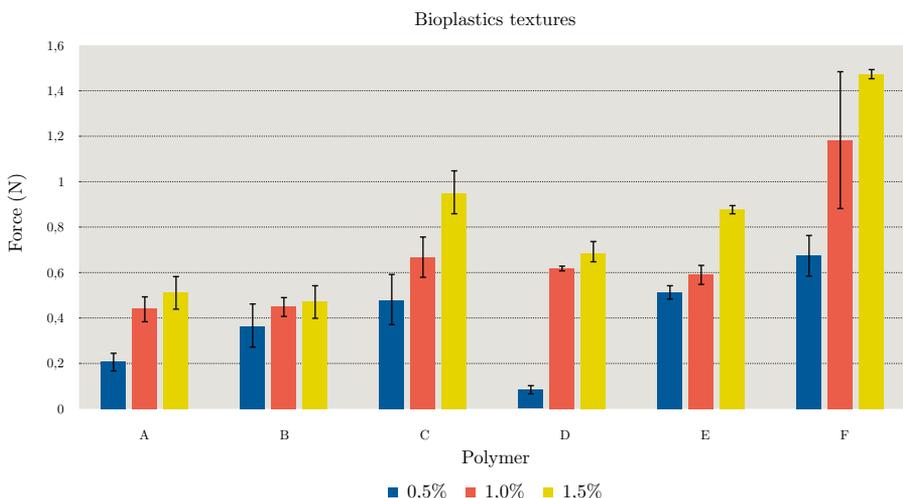


Figure 2. Mechanical properties of bioplastics from sodium Alginate (A), chitosan (B), galactomannan (C) and their controls (D, E and F, respectively).

DISCUSSION

The functionality of biopolymer molecules is closely related to its structure; thus, the presence and characteristics of the structural elements will determine its usage. In general, the structures observed by FTIR were in agreement with the flow behavior (viscosity).

SA samples showed a more preserved structure (higher absorbance peaks) denoted by its higher viscosity in comparison to standard samples. Probably a higher proportion of mannuronic and uronic acids ($800-1150\text{ cm}^{-1}$) allowed better structural building blocks formation and water interactions in the case of viscosity (Zubia, et al., 2008; Gomez, et al., 2009). In GAL polymer, although similar footprint was obtained (compared to its standard), the chemical differences observed were reflected on the viscosity of the dispersions and bioplastics texture. However, the viscosity of legume seed GAL was considerably higher ($\sim 120\text{ cP}$) than reported values for the same raw material (15 cP) at equal concentrations (Mittal, et al., 2016). Non-structural changes were observed for CH biopolymers; nevertheless, the viscosity varied greatly. A critical parameter in these types of compounds is the degree of deacetylation, which in large part determine its molecular weight. The deacetylation degree of CH from insects in this work was not determined. However, commercial chitosan (from shrimp shells) was between 75-85% (medium molecular weight); these features may be the leading cause of distinct viscosity and texture. Bioplastics color depends on the type of source and the treatment applied. In this study, the extracted polymers were not previously purified. Therefore the presence of pigments

(chlorophylls, carotenoids and polyphenols) could decrease the clearness of the obtained bioplastics.

The strength of bioplastics produced using CH (~30,74 – 39,27 MPa), SA (~17,25 – 44,05 MPa) and GAL (~40,28 – 79,58 MPa) in this study was similar than the reported values from different authors (25,3 – 39,3 MPa, 22,5 – 35,0 MPa and 25 – 40 MPa), respectively (Galus and Lenart, 2013; Moura, et al., 2015; Jussen, et al., 2019).

CONCLUSIONS

The desired functional properties of bio-based polymers suggest that the non-conventional sustainable sources from insects (*Hermetia illucens*), legume seeds (*Leucaena leucocephala*) and brown algae (*Macrocystis pyrifera*) could be an alternative for bioplastic production, which can be extended to functionalization and molecular interactions for broad applications in different industrial sectors.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thankfully acknowledge to CONACyT for the fund granted in the project FOINS 4950, as well as “Universidad De Las Américas Puebla” for its contribution with infrastructure and equipment for this investigation.

REFERENCES

- Albuquerque, P.B., Cerqueira, M.A., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. and Carneiro-da-Cunha, M.G., 2017. Immobilization of bioactive compounds in *Cassia grandis* galactomannan-based films: influence on physicochemical properties. In: *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, pp.727-735.
- Almeida Filho, L.C., de Souza, T.M., Tabosa, P.M., Soares, N.G., Rocha-Bezerra, L.C., Vasconcelos, I.M. and Carvalho, A.F., 2016. Trypsin inhibitor from *Leucaena leucocephala* seeds delays and disrupts the development of *Aedes aegyptia* multiple-disease vector. In: *Pest Management Science*, 73(1), pp.181–187.
- Caligiani, A., Marseglia, A., Leni, G., Baldassarre, S., Maistrello, L., Dossena, A. and Sforza, S., 2018. Composition of black soldier fly prepupae and systematic approaches for extraction and fractionation of proteins, lipids and chitin. In: *Food Research International*, 105, pp.812-820.
- Chávez, M., Buenrostro, J. and Aguilar, C., 2019. *Handbook of research on food science and technology: Volume 3: Functional foods and nutraceuticals*. Ontario: Apple Academy Press. ISBN: 9780429487828.
- Chee, S., Wong, P. and Wong, C., 2010. Extraction and characterisation of alginate from brown seaweeds (Fucales, Phaeophyceae) collected from Port Dickson, Peninsular Malaysia. In: *Journal of Applied Phycology*, 23(2), pp.191-196.
- De’Nobili, M.D., Soria, M., Martinefski, M.R., Tripodi, V.P., Fissore, E.N. and Rojas, A.M., 2016. Stability of L-(+)-ascorbic acid in alginate edible films loaded with citric

- acid for antioxidant food preservation. In: *Journal of Food Engineering*, 175, pp.1-7.
- Fernández, J.G. and Ingber, D.E., 2014. Manufacturing of large-scale functional objects using biodegradable chitosan bioplastic. In: *Macromolecular Materials and Engineering*, 299(8), pp.932-938.
- Ferreira, A., Alves, V. and Coelho, I., 2016. Polysaccharide-based membranes in food packaging applications. In: *Membranes*, 6(2), pp.1-17.
- Galus, S. and Lenart, A., 2013. Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin. In: *Journal of Food Engineering*, 115(4), pp.459-465.
- Gomez, C.G., Lambrecht, M.V.P., Lozano, J.E., Rinaudo, M. and Villar, M.A., 2009. Influence of the extraction-purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae (*Macrocystis pyrifera*). In: *International Journal of Biological Macromolecules*, 44(4), pp.365-371.
- Jussen, D., Sharma, S., Carson, J.K. and Pickering, K.L., 2019. Preparation and tensile properties of guar gum hydrogel films. In: *Polymers and Polymer Composites*, 27(7), pp.1-6.
- Mikkonen, K., Heikkilä, M., Helen, H., Hyvonen, L. and Tenkagen, M., 2010. Spruce galactoglucomannan films show promising barrier properties. In: *Carbohydrate Polymers*, 79(4), pp.1107-1112.
- Mittal, N., Mattu, P. and Kaur, G., 2016. Extraction and derivatization of *Leucaena leucocephala* (Lam.) galactomannan: Optimization and characterization. In: *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, pp.831-841.
- Moura, J.M., Farias, B.S., Rodrigues, D.A.S., Moura, C.M., Dotto, G.L. and Pinto, L.A.A., 2015. Preparation of chitosan with different characteristics and its application for biofilms production. In: *Journal of Polymers and the Environment*, 23(4), pp.470-477.
- Popa, E., Gomes, M. and Reis, R., 2011. Cell delivery systems using alginate-carrageenan hydrogel beads and fibers for regenerative medicine applications. In: *Biomacromolecules*, 12(11), pp.3952-3961.
- Revathi, T. and Thambidurai, S., 2017. Synthesis of chitosan incorporated neem seed extract (*Azadirachta indica*) for medical textiles. In: *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, pp.1890-1896.
- Román-Cortés, N., del Rosario García-Mateos, M., Castillo-González, A.M., Sahagún-Castellanos, J. and Jiménez-Arellanes, M.A., 2014. Nutritional components and antioxidants of two species of guaje (*Leucaena* spp.): an underutilized traditional resource. In: *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 20(2), pp.157-170.
- Song, Y.S., Kim, M.W., Moon, C., Seo, D.J., Han, Y.S., Jo, Y.H., Noh, M.Y., Park, Y.K., Kim, S.A., Kim, Y.W. and Jung, W.J., 2018. Extraction of chitin and chitosan from larval exuvium and whole body of edible mealworm, *Tenebrio molitor*. In: *Entomological Research*, 48(3), pp.227-233.
- Souza, V.G.L., Fernando, A.L., Pires, J.R.A., Rodrigues, P.F., Lopes, A.A. and Fernandes, F.M.B., 2017. Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. In: *Industrial Crops and Products*, 107, pp.565-572.
- Verlinden, R.A.J., Hill, D.K., Kenward, M.A., Williams, C.D. and Radecka, I., 2007.

- Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. In: *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), pp.1437-1449.
- Vox, G., Santagata, G., Malinconico, M., Immirzi, B., Mugnozza, G.S. and Schettini, E., 2013. Biodegradable films and spray coatings as eco-friendly alternative to petro-chemical derived mulching films. In: *Journal of Agricultural Engineering*, 44(2S), pp.221-225.
- Wool, R. and Sun, X., 2005. *Bio-Based polymers and composites*. 1st ed. San Diego: Elsevier. ISBN: 0-12-763952-7
- Zubia, M., Payri, C. and Deslandes, E., 2008. Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia). In: *Journal of Applied Phycology*, 20(6), pp.1033-1043.

Almacenamiento de arroz: influencia en la inocuidad del grano

Rice storage: effects on grain safety

Armazenamento de arroz: influência na segurança dos grãos

RECIBIDO: 16/9/2019 → APROBADO: 27/11/2019 ✉ asanchez@latitud.org.uy

✉ SÁNCHEZ, ALICIA (1); GÓMEZ-GUERRERO, BLANCA (1); BILLIRIS, ALEJANDRA (1)
(1) LATITUD - FUNDACIÓN LATU, MONTEVIDEO, URUGUAY

RESUMEN

La producción de arroz (*Oryza sativa*) ocupa el quinto lugar en las exportaciones agrícolas de Uruguay. Inadecuadas condiciones de temperatura y humedad favorecen el desarrollo de hongos e insectos impactando en la inocuidad del arroz almacenado. El objetivo de este trabajo fue evaluar la sanidad del arroz cáscara en condiciones de almacenamiento en silos comerciales durante dos zafas. Se utilizó la variedad de grano largo “El Paso 144” durante 8,5 y 7 meses en los años 2017 y 2018, respectivamente. Se detectaron e identificaron agentes de biodeterioro; se determinó capacidad germinativa, recuento microbiano y contenido de toxinas en arroz extraído de las zonas superior e inferior del silo, a distintos tiempos de almacenamiento. La población microbiana disminuyó en ambos años y posiciones dentro del silo. Se identificaron principalmente dos géneros micotoxigénicos, *Fusarium* sp. y *Aspergillus* sp. En relación con micotoxinas no se detectó Zearalenona ni Ocratoxina A, y Deoxinivalenol se detectó en un máximo 120 ppb (zafa 2017). No se detectaron aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. Los insectos identificados fueron *Sitophilus* sp. y *Rhizopertha* sp. con una incidencia máxima de 0,1%. Estos resultados demuestran que las condiciones de almacenamiento no afectaron la seguridad del grano.

PALABRAS CLAVE: *Oryza sativa*, microorganismos, micotoxinas, insectos.

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa*) production ranks fifth in Uruguay’s agricultural exports. Inadequate temperature and humidity conditions increase grain respiration and favor the action of insects and fungi. This process contributes to mass grain losses and stored rice biodeterioration. The objective of this work was to evaluate paddy rice sanitary conditions during storage in commercial silos through two years. The study was carried out using the “El Paso 144” long grain variety for 8,5 and 7 months in 2017 and 2018, respectively. Main biodeterioration agents were detected

and identified. Germination capacity, microbial population and toxin content in rice extracted from the upper and lower areas of the silo were determined at different storage times. The microbial population decreased after storage time and in both silos sampling positions. Two mycotoxigenic genera, *Fusarium* sp. and *Aspergillus* sp. were detected. Mycotoxins, Zearalenone and Ocratoxin-A were not detected, while Deoxinivalenol reached a maximum level of 120 ppb (2017). Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 were not detected. The coleopteran *Sitophilus* sp. and *Rhizopertha* sp. were identified and quantified with a maximum incidence of 0,1%. These results demonstrate that storage conditions did not affect grain safety.

KEYWORDS: *Oryza sativa*, microorganisms, mycotoxins, insects.

RESUMO

A produção de arroz (*Oryza sativa*) ocupa o quinto lugar nas exportações agrícolas do Uruguai. Condições inadequadas de temperatura e umidade favorecem a ação de insetos e fungos impactando na saúde do grão. O objetivo do trabalho foi avaliar o estado sanitário de casca de arroz em condições de armazenamento em silos comerciais para duas safras. O estudo foi realizado com a variedade de grão longo “El Paso 144” por 8,5 e 7 meses em 2017 e 2018, respectivamente. Os agentes de biodeterioração foram detectados e identificados e a capacidade de germinação, a contagem microbiana e o conteúdo de toxinas no arroz extraído das áreas superior e inferior do silo foram determinados em diferentes tempos de armazenamento. A população microbiana diminuiu nos dois anos e nas posições dentro do silo. Dois gêneros micotoxigênicos foram identificados principalmente: *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp. Em relação às micotoxinas, Zearalenona e Ocratoxina-A não foram detectadas, enquanto o Deoxinivalenol foi detectado no máximo em 120 ppb (safra 2017). Não foram prescritas aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Os insetos *Sitophilus* sp. e *Rhizopertha* sp. foram detectados com uma incidência máxima de 0,1%. Portanto, as condições de armazenamento não afetaram a segurança do grão.

PALAVRAS-CHAVE: *Oryza sativa*, microrganismos, micotoxinas, insetos.

INTRODUCCIÓN

En Uruguay el 95% del volumen de grano de arroz cosechado se exporta, por lo que se ha tenido que desarrollar y mantener un sistema competitivo que satisfaga estándares altos de calidad y rendimiento. En 2019 se posicionó en el quinto lugar del ranking de productos exportados con un total de US\$ 49 millones y una participación de un 6% en el producto bruto interno del país (Salgado, 2018; Uruguay XXI, 2019).

Cuando el grano está maduro se realiza la cosecha y se conduce el grano inmediatamente a las distintas plantas de recibo para su limpieza, secado y posterior conservación. El grano ingresa a la planta industrial con una humedad de entre 24 y 16% aproximadamente, por lo que necesita, luego de una pre-limpieza, ser secado hasta alcanzar una humedad inferior a 13%, de modo de asegurar un almacenamiento

seguro. Luego se procede a una segunda etapa de limpieza del grano y se almacena en galpones, silos, silos bolsa, etcétera, para su posterior elaboración.

Cuando las condiciones en las que transcurre la fase de almacenamiento de granos son desfavorables se producen pérdidas económicas que se atribuyen a la merma de masa, calidad y valor comercial, que condicionan la disponibilidad de alimentos y sus volúmenes exportables (De Lucia y Assennato, 1993).

El establecimiento de agentes de biodeterioro en los granos almacenados depende de las condiciones ambientales (fundamentalmente humedad y temperatura), actividad de agua (*aw*), disponibilidad de alimento, refugio y presencia y abundancia de los competidores, depredadores y parásitos (Jian y Jayas, 2012).

De acuerdo con Abadía y Bartosik (2013), la tasa de respiración de los granos y agentes biológicos como insectos y los microorganismos presentes en los granos almacenados involucran el agua. Cuando la humedad relativa del espacio intergranario es inferior al 67% la mayoría de los hongos del almacenaje no pueden sobrevivir en la masa de granos, por lo que esta es la “humedad relativa de almacenamiento seguro”. Asimismo, la variable tiempo de almacenamiento también es importante y puede definirse un “tiempo de almacenamiento seguro”, entendido como el tiempo máximo que puede ser almacenado un grano a determinadas condiciones de temperatura, humedad y porcentaje de granos dañados mecánicamente, sin perder su condición de grado. Tanto la humedad relativa como el tiempo de almacenamiento seguro dependen del grano de que se trate.

La variable asociada a la humedad y que también influye en el deterioro de granos y alimentos es la actividad de agua disponible para desarrollo de microorganismos y reacciones enzimáticas. Valores cercanos a 1,0 son más propicios para el desarrollo fúngico (Cahagnier, et al., 1993).

Los hongos responsables del deterioro de los granos desde un punto de vista ecofisiológico se pueden agrupar en dos categorías: “hongos de campo”, que infectan los granos antes de la cosecha, y los “hongos de almacenamiento”, que generalmente son saprofitos y se desarrollan después de la cosecha (Christensen y Kaufmann, 1965). Según otros autores, podría incorporarse un tercer grupo fúngico intermedio que se compondría de hongos que continúan desarrollándose durante el almacenamiento si la *aw* permanece alta. Este grupo incluye especies de los géneros *Cladosporium*, *Fusarium* y *Trichoderma* (Mannaa y Kim, 2017). Neningen et al. (2003) reportaron más de 99 especies y 59 géneros de hongos asociados al arroz. Los géneros comúnmente detectados son: *Alternaria*, *Epicoccum*, *Bipolaris*, *Curvularia* y *Cladosporium*.

Los géneros que aparecen más comúnmente en almacenamiento son *Fusarium*, *Aspergillus* y en menor medida *Penicillium* (Richardson, 1996; Tonon, et al., 1997; Lima, et al., 2000; Gutiérrez, et al., 2002; Mew y Gonzales, 2003; Neningen et al., 2003; Karunakara y Manonmani, 2009; Pincirolí, et al., 2013; Shiratori, et al., 2017).

Otro aspecto relevante para asegurar la inocuidad del grano vinculado con el crecimiento de hongos es la presencia de micotoxinas. Se producen pérdidas económicas significativas (25%) en los productos agrícolas mundiales debido a la contaminación por micotoxinas (Marin, et al., 2013). Estas son metabolitos secundarios producidos por estos organismos en respuesta a estrés causado por extremos

ambientales, escasez de alimentos o competencia de otros microorganismos. Las toxinas pueden ser nefrotóxicas, inmunosupresoras, cancerígenas y teratogénicas para salud animal y humana. Los grupos más importantes de micotoxinas que se encuentran en los alimentos son: aflatoxinas, producidas por *Aspergillus*; ocratoxina A, producida tanto por *Aspergillus* como por *Penicillium*; tricotecenos tipo A: toxinas HT-2 y T-2 y tipo B: deoxinivalenol (DON) y nivalenol (NIV), zearalenona (ZEA), fumonisinas B1 y B2 producidas principalmente por las especies de *Fusarium*; alcaloides del ergot producidos por *Claviceps*, y altenueno, alternariol, alternariolmetil éter, altertoxina y ácido tenuazónico producidos por especies de *Alternaria* (Lima, et al., 2000; Marin, et al., 2013).

La proliferación de insectos en los recintos de almacenamiento es también causa de deterioro de granos y consecuentes pérdidas económicas. Respecto del riesgo de daño por insectos, las temperaturas superiores a 25 °C se consideran como de riesgo elevado para el desarrollo de insectos, entre 17 y 25 °C de riesgo moderado, y temperaturas menores a 17 °C corresponden a un bajo riesgo de infestación (Food and Agricultural Organization, 1994; Abadía y Bartosik, 2013). Los insectos plaga y ácaros de los granos almacenados ocasionan daños directos, por el consumo y contaminación del producto, e indirectos, como el calentamiento del grano, desarrollo de hongos y micotoxinas. Se reconocen aproximadamente 250 especies de insectos que atacan a granos y sus productos en la etapa de almacenaje, y alrededor de 20 son las especies más relevantes (Dell'Orto y Velázquez, 1985).

Los mayores perjuicios económicos son provocados por coleópteros, entre ellos *Sitophilus oryzae*, (*Curculionidae*), “gorgojo del arroz”, *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (*Bostrichidae*) (“taladrillo de los cereales”). Se consideran plagas primarias debido a que cumplen su ciclo biológico en el interior del grano que infestan. Las que se alimentan de granos dañados, quebrados y harina se consideran plagas secundarias, como *Tribolium*, los lepidópteros *Sitotroga cerealella* (Gelechiidae), *Plodia interpunctella* Hübner, *Ephesia* = *Anagasta kuehniella*, entre otros (Lorini, et al., 2009; Hagstrum, et al., 2013).

La investigación en relación con el cultivo de arroz en Uruguay se ha focalizado principalmente en el desarrollo de nuevas variedades de arroz que mejoran las características de ecofisiología, rendimiento, manejo y ciclo biológico de plagas en la etapa del cultivo de arroz (Zorrilla, et al., 2017). Sin embargo, con respecto al conocimiento del ecosistema que constituye el grano almacenado en silo no se han desarrollado estudios a nivel nacional que profundicen en el estudio de los factores bióticos y abióticos que interactúan en este ambiente. La inocuidad y calidad son aspectos decisivos para permanecer en los mercados donde se exporta este grano, por lo que estas características deben ser preservadas durante el almacenamiento (Queheille, 2018).

El objetivo del trabajo fue evaluar la sanidad del arroz cáscara en condiciones de almacenamiento en silos comerciales durante dos zafras. Como objetivos específicos se propuso determinar si existen diferencias en la inocuidad del grano en la parte superior e inferior del silo y determinar el contenido de hongos, micotoxinas e insectos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó la variedad de grano largo “El Paso 144”, proveniente de un establecimiento industrial en el este de Uruguay.

Muestreos en silos

La evaluación del almacenamiento se realizó en dos silos comerciales durante 8,5 y 7 meses en las zafas 2016/2017 (mayo a enero) y 2017/2018 (junio a enero), respectivamente. El momento de los muestreos fue inicial, a los 3, 5, 7 y 8,5 meses (en la primera zafa) desde el llenado del silo. En cada fecha de muestreo se realizaron tomas embolsando 3 kg de arroz cáscara en nueve puntos del silo de la parte superior, seleccionados para abarcar la mayor parte de la superficie de grano. Posteriormente, de la zona de descarga media del silo se sacaron nueve bolsas de 3 kg de arroz en forma intermitente desde la cascada de grano. En cada fecha de muestreo se midió la temperatura de masa de grano con termocuplas.

Procesamiento de muestras

En planta se mezclaron las nueve bolsas procedentes de arriba y abajo de los silos para obtener una muestra compuesta homogénea. Se fracciona esta muestra en tres bolsas con 3 kg de arroz cada una de la parte inferior y superior del silo, de la que finalmente se extrae 1 kg y apartan 100 g para evaluar insectos presentes y otros 100 g para detectar la presencia e incidencia de hongos.

Se determinó la actividad de agua (aw) mediante equipo Aqualab y de acuerdo con el método ISO 21807 (International Organization for Standardization, 2004). La capacidad germinativa se realizó de acuerdo con el método por vitascopio 7-010 indicado por las Reglas ISTA (International Seed Testing Association, 2019). El recuento de hongos y levaduras se realizó de acuerdo al método de APHA (American Public Health Association, 2015) basado en cultivar en placas de Petri con medio de cultivo diluciones decimales sucesivas de una suspensión inicial de esporas para posteriormente realizar el conteo de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g). El análisis estadístico comparativo de las muestras se realiza en función de logaritmo en base 10 del número de colonias registrado para cada muestra.

Se determinó el género de los hongos en 100 granos de arroz de la muestra compuesta de cada posición del silo. Los granos se esterilizaron superficialmente con una dilución de hipoclorito de sodio al 1% en agua destilada estéril y se ubicaron en placas de Petri (10 granos por placa) con papel filtro humedecido en el fondo de cada placa. Los granos se incubaron a 25 °C durante 5 días en alternancia de luz-oscuridad. Se aislaron los hongos emergentes a partir del grano para la determinación macro y micromorfológica de los géneros presentes (Barnett y Hunter, 1972; Domsch, et al., 1980; Mew y Gonzáes, 2002; Klich, 2002; Leslie y Summerell

2006). En el caso de *Fusarium*, para obtener una aproximación de la identificación se realizó la amplificación y secuenciación de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2K, usando los primers ITS1 e ITS4 (Nilsson, 2012).

En la zafra 2016/2017 se analizaron las siguientes micotoxinas: aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, OTA, ZEA y DON, utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), métodos 970.45, 995.15, 991.31, 994.08, 986.17 (AOAC International, 2016a, 2016b, 2016c, 2016d, 2016e).

En 2017/2018 se consideró importante conocer la existencia de micotoxinas sin dirigir el análisis a una en particular y se realizó el análisis de micotoxinas por multimétodo por LC-MSMS (cromatografía líquida masa-masa). Las micotoxinas analizadas fueron: 3 +15 acetyldeoxynivalenol, aflatoxina B1, aflatoxina B1 + B2 + G1 + G2, aflatoxina B2, aflatoxina G1, aflatoxina G2, cytochalasina E, deoxynivalenol (DON), fumonisina B1 + B2, nivalenol, ochratoxina-A (OTA), T2 & toxina HT2 y Zearalenona.

A partir de los 100 g de cada submuestra se detectaron los insectos adultos presentes (Trochez, 1987; Fourar-Belaifa, et al., 2011; Hagstrum, et al., 2013; USDA, 2015).

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software JMP® 2012 y el efecto del almacenamiento se evaluó comparativamente entre periodos de muestreo y entre posiciones del silo (ANOVA).

RESULTADOS

La capacidad germinativa al final del período de almacenamiento presentó valores por encima del 90% en ambos años (Tabla 1). En 2017 no se registraron cambios, mientras que en 2018 esta variable no disminuyó al final del periodo en la parte inferior, pero en la parte superior la capacidad germinativa disminuyó en 3% aproximadamente.

TABLA 1. Capacidad germinativa (%) del grano de arroz según posición en silo y zafra al inicio y fin del almacenamiento. D.E: desvío estándar. $\alpha = 0,05$, valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes.

		Silo abajo	D.E	Silo arriba	D.E
2016/2017	Inicial	97,7 ^a	0,3	98,0 ^a	0,0
	Final	98,0 ^a	1,0	99,7 ^b	1,0
2017/2018	Inicial	86,3 ^a	5,7	98,0 ^a	1,0
	Final	95,7 ^b	1,2	94,7 ^b	1,5

La variable humedad de grano fluctuó a lo largo del periodo de almacenamiento. Se evidenció una pérdida de humedad del grano en la parte superior del silo, pero no en la zona inferior.

TABLA 2. Valores de contenido de humedad del grano (H%) promedio en los diferentes momentos de muestreo de acuerdo con la zafra 2016/2017 y 2017/2018 y la posición en el silo. D.E: desvío estándar. $\alpha=0,05$, valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes.

	Humedad de grano (%) 2017/2018				Humedad de grano (%) 2016/2017		
	Media	D.E	Media	D.E	Media	Media	D.E
Mayo	13,4 ^b	0,1			12,9 ^a	0,2	
Junio			12,8 ^b	0,2			13,2 ^b
Julio	13,2 ^{bc}	0,2			12,9 ^a	0,3	
Agosto	13,0 ^c	0,1			12,6 ^{ab}	0,1	
Setiembre			12,9 ^b	0,0			13,5 ^a
Octubre	14,0 ^a	0,1			12,3 ^{bc}	0,1	
Diciembre	13,1 ^c	0,1	13,1 ^a	0,1	12,0 ^c	0,1	12,9 ^c
Enero	13,3 ^{bc}	0,2	13,0 ^{ab}	0,0	12,1 ^c	0,3	12,8 ^d

La actividad de agua y humedad solo aumentó significativamente en la parte inferior del silo en el primer mes respecto al final (desde 0,70 a 0,72) y en el 5° mes de 13,4 a 14%, respectivamente (Tablas 2 y 3), lo que no se reflejó en un incremento de la población microbiana al final del periodo en 2017, luego de 8,5 meses de almacenamiento. Un comportamiento similar ocurrió en 2018.

TABLA 3. Valores de actividad de agua del grano promedio en los diferentes momentos de muestreo de acuerdo con la zafra 2016/2017 y 2017/2018 y la posición en el silo. D.E: desvío estándar. $\alpha = 0,05$, valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes.

Mes	Abajo				Arriba			
	Actividad de agua del grano 2016/2017		Actividad de agua del grano 2017/2018		Actividad de agua del grano 2016/2017		Actividad de agua del grano 2017/2018	
	Media	D.E	Media	D.E	Media	D.E	Media	D.E
Mayo	0,70 ^b	0,00			0,64 ^b	0,00	0,70 ^b	0,01
Junio			0,67 ^c	0,00				
Julio	0,62 ^d	0,00			0,66 ^a	0,01		
Agosto	0,62 ^d	0,01			0,62 ^{bc}	0,02		
Setiembre			0,73 ^a	0,06			0,75 ^a	0,00
Octubre	0,68 ^{bc}	0,01			0,60 ^c	0,01		
Diciembre	0,67 ^c	0,01	0,71 ^b	0,01	0,61 ^{bc}	0,00	0,66 ^c	0,01
Enero	0,72 ^a	0,01	0,70 ^b		0,64 ^{bc}	0,00	0,68 ^c	0,00

El recuento microbiano en arroz cáscara disminuyó arriba y abajo al final del almacenamiento. En ambos años se observó la misma tendencia (Figura 1).

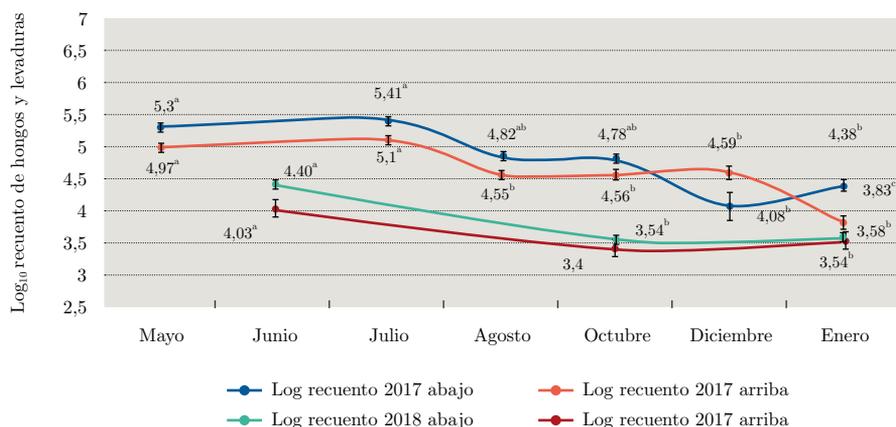


Figura 1. Valores de Logaritmo del recuento de hongos y levaduras del grano en las muestras de la parte superior e inferior del silo durante la zafra 2016/2017. Valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes (test de Tukey, $\alpha = 0,05$).

En ambos años se detectaron hongos asociados a la etapa de cultivo, como *Fusarium* (9%) (Figura 2). A este aislamiento se le realizó la comparación de la secuencia obtenida región ITS1-5.8SrADN-ITS2K con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Dentro de los resultados obtenidos con mayor homología (97%, cobertura 75%), se encontraron las especies *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* y *Gibberella zeae* (teleomorfo de *Fusarium graminearum*), las cuales son frecuentemente encontradas contaminando granos de cereales, si bien no es posible asignar con exactitud la identificación a nivel de especie de *Fusarium*. También se detectaron otros hongos patógenos de semillas y granos de cereales como *Alternaria* sp. (10%), *Bipolaris* sp. (3%), *Curvularia* sp. (13%), *Macrodochium* sp. (5%), *Phoma* sp. (2%), *Rhizopus* sp. (20%), y *Tilletia* sp. (2%), y hongos asociados a la etapa de almacenamiento de granos, como *Aspergillus* sp. (24%) y *Penicillium* sp. (12%).



Figura 2. A) *Fusarium* sp. B) *Aspergillus* sp. (fotos Sánchez, A.). C) Detalle de hifas sobre grano, micrografía tomada con microscopio de barrido SEM (UdelaR, Facultad de Ciencias).

En cuanto a la detección de micotoxinas solo se detectó deoxinivalenol en ambas zafras y zearalenona en la zafra 2017/2018 (Tabla 4).

TABLA 4. Concentración (ppb) promedio de toxinas detectadas de acuerdo con la zona del silo y períodos de almacenamiento. ¹valores < representan los límites de detección y cuantificación.

	Zafra 2016/2017 ¹		Zafra 2017/2018 ¹	
	Silo arriba	Silo abajo	Silo arriba	Silo abajo
DON (Deoxinivalenol) (ppb)	122	113	29,3	<20
ZEA (Zearalenona) (ppb)	<30	<30	12,9	<15
OTA (Ocratoxina A) ppb	<2,2	<2,2	<1,0	<1,0
AFLA (Aflatoxinas:B1-B2; G1- G2) ppb	<2,6	<2,6	<1,0	<1,0
3 + 15 acetildeoxynivalenol ppb	-	-	<20,0	<20,0
nivalenol ppb	-	-	<50,0	<50,0
fumonisina B1 + B2 ppb	-	-	<20,0	<20,0
citochalasina E ppb	-	-	<2,0	<2,0
T2 y HT2 -toxina ppb	-	-	<10,0	<10,0

Los insectos se identificaron mediante claves y presuntivamente pudieron asignarse a nivel de especie a *Sitophilus oryzae* (*Curculionidae*) (“gorgojo del arroz”) y *Rhyzopertha dominica* (“barrenador o taladrillo de los granos”) (*Bostrichidae*), los cuales se encontraron en ambas posiciones del silo (Figuras 3 y 4) y su emergencia se registró en diciembre y enero (Figura 5).



Figura 3. A) Adulto de *Sitophilus oryzae*. B) y C) daño en grano ocasionado por *S. oryzae* (fotos Sánchez, A.).

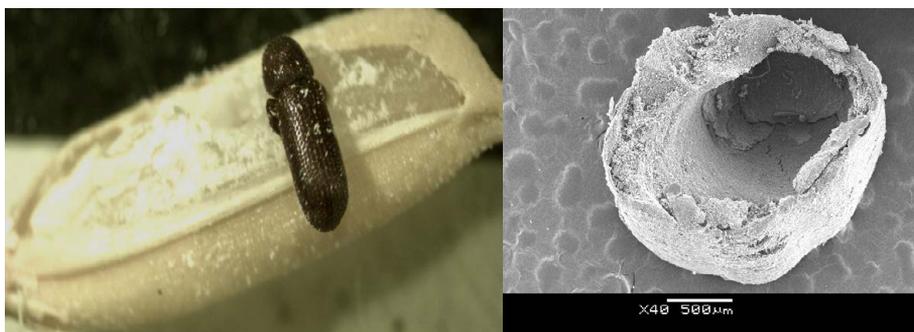


Figura 4. A) Adulto de *Rhyzopertha dominica* (foto Sánchez, A.).
B) Galería de alimentación de *R. dominica*, micrografía tomada con microscopio de barrido SEM (UdelaR, Facultad de Ciencias).

El recuento de adultos fue en promedio de 1 arriba y 11 abajo cada 100 g en 2017. En 2018, los respectivos valores, arriba y abajo, en diciembre, fueron de 4 y 9 adultos, mientras que en enero de 2019 correspondieron a 3 y 2 adultos cada 100 g, respectivamente. El gorgojo del arroz es el que se presentó entre un 70-90% respecto al resto de los otros insectos. El taladrillo *Rhyzopertha dominica* se presentó en un porcentaje menor, 29%, y no se detectó en 2017. Se detectaron otros insectos denominados plagas secundarias (se alimentan de grano previamente deteriorado por plagas primarias como *Sitophilus* y *Rhyzopertha*), como *Plodia* sp. y *Tribolium* sp. Estos últimos aparecieron en la zona inferior del silo y en el último muestreo de enero de 2019.



Figura 5. Valores de temperatura de las muestras de la parte superior del silo y de abajo durante los meses de almacenamiento y número de insectos emergidos. Los valores de temperatura recuadrados pertenecen a la zafra 2017/2018.

El comportamiento de la temperatura ocurrió a la inversa de lo sucedido con la humedad del grano, aumentando hacia el final del almacenamiento en ambas posiciones y zafras (Figura 5).

DISCUSIÓN

Las condiciones de manejo del ambiente silo permitieron a través de las variables estudiadas mantener la vitalidad del grano, ya que no se perdió capacidad germinativa, que superó el 95% al final del periodo de almacenamiento.

En las dos zafras se mantuvo la humedad indicada para el arroz paddy, de 13%. Aun en un breve lapso, en 2017, cuando subió a 14% y aumentó la actividad de agua, no se incrementó la población microbiana. Abadía y Bartosik (2013) reafirman la importancia de este parámetro y sugieren que si la temperatura del grano de arroz se mantiene a 25 °C y a 13% de humedad, podría almacenarse durante aproximadamente 17 meses, mientras que si la humedad aumenta a 14%, el periodo se acortaría a 7 meses.

La humedad tampoco influyó en la actividad de agua del grano. El primer indicador potencial de deterioro de un alimento es la actividad de agua, es decir, el agua de constitución disponible para reacciones enzimáticas y crecimiento microbiano. Si bien los valores variaron al comienzo y fin del período de almacenamiento para las dos zafras estudiadas (Tabla 2), se encontraron en un rango promedio de a_w 0,6 a 0,7, en el cual el crecimiento de hongos es mínimo. Estos valores no promueven el crecimiento de *Aspergillus* sp. ni de *Penicillium* sp., cuyas actividades acuosas mínimas a las que pueden desarrollarse se sitúan en valores de a_w por encima de 0,70 (Mannaa y Kim, 2017).

El valor de recuento de microorganismos se encuentra en valores normales (varió entre 10^3 y 10^5 UFC/g), ya que los niveles de propágulos de hongos encontrados en granos y harinas de calidad alimentaria pueden variar entre aproximadamente 10^2 y 10^5 UFC/g, dependiendo del tipo de grano y las condiciones de cultivo, cosecha, secado y almacenamiento (incluido el tiempo de almacenamiento) (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1986).

Los hongos detectados fueron los que habitualmente se reportan en granos y en el de arroz específicamente. Los tres géneros que se detectaron en este trabajo fueron de naturaleza micotoxigénica, como *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Asimismo, en relación con los géneros de hongos asociados al cultivo, también se detectaron generos reportados en bibliografía como *Alternaria* sp., *Curvularia* sp., *Tilletia* sp. y *Microdoquium* sp. (Martínez, et al., 2018).

Generalmente, la infección por *Fusarium* sp. aparece en el campo, como la de *Aspergillus* sp., aunque este género puede crecer a más bajas actividades de agua, por lo que es común que prevalezca en condiciones de almacenamiento. El género *Penicillium* aparece con menor frecuencia infectando arroz paddy y se relaciona más estrechamente con la fase de almacenamiento (Majeed, et al., 2018; Bertuzzi, et al., 2019).

En relación con las micotoxinas, su presencia puede estar influenciada por múltiples factores como tipo de grano, variedades, manejo de cultivo y postcosecha.

En este trabajo, en las dos zafas solo se detectó DON en concentraciones cuantificables (29 a 122 ppb). Los valores no revisten significancia de acuerdo con el límite admitido por Codex Alimentarius (2018) para cereales en grano trigo, maíz y cebada, que corresponde a 2.000 ppb., y de la “Regulación Europea para cereales sin procesamiento”, que acepta un límite mínimo de 1250 ppb (Cheli, et al., 2014). La presencia de DON puede atribuirse a la infección a campo, donde *Fusarium* se desarrolla con aw cercanas a 1. En el grano permanecen las toxinas, aunque el hongo no se detecte, y también puede suceder a la inversa. De los hongos de almacenamiento se aisló *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp., aunque no se detectaron aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, ni OTA.

Bertuzzi et al. (2019) obtuvieron un patrón similar al obtenido en este trabajo en el sentido de que las aflatoxinas, el deoxinivalenol y ocratoxina A no revistieron importancia. También se registraron en niveles por debajo de los de reporte o detección. Estos autores tomaron como referencia los valores mínimos admitidos por la Unión Económica Europea (Cheli, et al., 2014).

El aumento de la temperatura hacia el final del periodo de almacenamiento promovió el desarrollo de insectos. Sin embargo, la densidad de insectos no excede valores alcanzados en estudios de almacenamiento de otros cereales como trigo (Toews, et al., 2005; Flinn, et al., 2010). Se ha reportado que la morfología y composición de la cáscara de arroz le confiere una mayor protección frente a microorganismos e insectos en comparación con otros cereales como trigo, maíz o cebada (Ashamo, 2006).

La temperatura a la que la masa de granos llegó en los dos silos y en ambos años está dentro del rango óptimo de desarrollo de estos insectos, que va de 25 °C a 35 °C.

Las especies que aparecieron, *Sitophilus oryzae* y *Rhyzopertha dominica*, son cosmopolitas y aparecen durante el estacionamiento de granos como maíz, trigo y cebada, etcétera. Trematerra et al. (2004) realizaron prospecciones de silos y plantas de procesamiento de arroz con trampas y reportaron una prevalencia de *Sitophilus oryzae* L. (72,3%) sobre *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (8,6%). Aunque la metodología de captura fue diferente, en este trabajo también se constató una predominancia de *S. oryzae* (70-90%) sobre *R. dominica* (29%).

Cabe señalar que el resultado presentado en cuanto a número de insectos da un valor aproximado de la densidad de población. Para determinar la proporción de grano dañado sin signos de ataque (“infestación no visible o escondida”), se deberían disectar los granos, utilizando técnicas de tinción, gravimetría y rayos X, etcétera (Xmgwei, 1998).

CONCLUSIONES

Las condiciones de almacenamiento no afectaron la capacidad germinativa del grano de arroz cáscara, que se mantuvo viable a lo largo del período.

Las condiciones de humedad del grano y temperatura no promovieron el desarrollo fúngico ni la presencia de micotoxinas.

Los insectos se detectaron en los últimos meses de almacenamiento, lo que se asocia a aumento de la temperatura de grano.

Por esto se concluye que las condiciones de almacenamiento no afectaron la sanidad del grano de arroz cáscara desde el punto de vista fúngico, contenido de micotoxinas e insectos.

RECONOCIMIENTOS

Se agradece al LATU (Laboratorio Tecnológico del Uruguay) por la financiación del Proyecto Almacenamiento, componente del Programa de Industrialización de Arroz de Latitud.

REFERENCIAS

- Abadía, B. y Bartosik, R. 2013. *Manual de buenas prácticas en postcosecha de granos: hacia el agregado de valor en origen de la producción primaria*. Buenos Aires: INTA.
- AOAC International, 2016a. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 20a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 970.45, first action 1970-final action 1988.
- AOAC International, 2016b. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 20a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 995.15, first action 1995-final action 1999.
- AOAC International, 2016c. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 20a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 991.31, first action 1991-final action 1994.
- AOAC International, 2016d. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 20a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 994.08, first action 1994-final action 1997.
- AOAC International, 2016e. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 20a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 986.17, first action 1986-final action 1990.
- American Public Health Association, 2015. Yeast and moulds. En: American Public Health Association. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Cap. 21. Washington: APHA.
- Ashamo, M.O., 2006. Relative susceptibility of some local and elite rice varieties to the rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) En: *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 4(1), pp.249-252.
- Barnett, H.L. y Hunter, B., 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Minneapolis: Burgess Publishing Company.
- Bertuzzi, T., Romani, M., Rastelli, S. y Giorni, P., 2019. Mycotoxins and related fungi in italian paddy rice during the growing season and storage. En: *Toxins*, 11(3), pp.151.
- Cahagnier, B., Lesage, L. y Richard-Molard, D., 1993. Mould growth and conidiation in cereal grains as affected by water activity and temperature. En: *Letters in Applied Microbiology*, 17(1) pp. 7-13.
- Cheli, F., Battaglia, D., Gallo, R., y Dell'Orto, V., 2014. EU legislation on cereal safety: An update with a focus on mycotoxins. En: *Food Control*, 37, pp.315-325.
- Codex Alimentarius, 2018. *General standard for contaminants and toxins in food and feed CXS 193-1995. Adopted in 1995, revised in 1997, 2006, 2008*,

- 2009, amended in 2010, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019 [En línea]. Roma: Codex Alimentarius. [Consulta: 3 de setiembre 2019]. Disponible en: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B193-1995%252FCXS_193e.pdf
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1986. *Microorganisms in Foods, 2. Sampling for microbiological analysis. Principles and specific applications* [En línea]. 2a ed. [s.l.]: Blackwell Scientific Publications. [Consulta: 2 de setiembre de 2019]. Disponible en: <https://seafood.oregonstate.edu/sites/agscid7/files/nsic/sampling-for-microbiological-analysis-principles-and-specific-applications-icmsf.pdf>
- Christensen, C.M. y Kaufmann, H., 1965. Deterioration of stored grains by fungi. En: *Annual Review of Phytopathology*, 3, pp.69-84.
- De Lucia, M. y Assennato, D., 1993. *La ingeniería en el desarrollo. Manejo y tratamiento de granos poscosecha* [En línea]. Roma: FAO. [Consulta: 20 de Agosto de 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/x5041s/x5041s00.htm>
- Dell'Orto, T.H. y Arias Velázquez, C.J., 1985. *Insectos que dañan granos productos almacenados*. Santiago: FAO. (Tecnología Poscosecha, 4). [Consulta: 2 de setiembre de 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/x5053S/x5053s00.htm>
- Domsch, K.H., Gams W. y Anderson, T.H., 1980. *Compendium of soil fungi*. Vol. 2. Londres: Academic Press.
- Flinn, P. W., Hagstrum, D. W., Reed, C. y Phillips, T.W., 2010. Insect population dynamics in commercial grain elevators. En: *Journal of Stored Products Research*, 46(1), pp.43-47.
- Food and Agricultural Organization, 1994. *Grain storage techniques. Evolution and trends in developing countries* [En línea]. Roma: FAO. (FAO Agricultural Services Bulletin, N° 109). [Consulta: 2 de setiembre de 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/T1838E/T1838E1f.htm>
- Fourar-Belaifa, R., Fleurat-Lessard, F. y Bouznad, Z., 2011. A systemic approach to qualitative changes in the stored-wheat ecosystem: prediction of deterioration risks in unsafe storage conditions in relation to relative humidity level, infestation by *Sitophilus oryzae* (L.), and wheat variety. En: *Journal of Stored Products Research*, 47, 1, pp.48-61.
- Gutiérrez, S.A., Mazzanti De Castañón, M.A. y Cúndom, M.A., 2002. Hongos presentes en semillas de arroz del noreste de Argentina. En: *Fitopatología*, 37, pp.156-163
- Hagstrum, D., Klejdysz, T., Subramanyam y Bhadriraju Nawrot, J., 2013. *Atlas of stored-product insects and mites*. Washington: AACC, INC. 589 p.
- International Seed Testing Association, 2019. *International rules for seed testing. Validated seed health testing methods* [En línea]. Bassersdorf: ISTA. Method 7-010, 2019. [Consulta: 3 de setiembre]. Disponible en: <https://www.seedtest.org/upload/cms/user/ISTARules2019SHmethods7-010.pdf>
- International Organization for Standardization, 2004. ISO 21807: *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Determination of water activity*. Ginebra: ISO.

- Jian, F. y Jayas, S., 2012. Ecosystem approach to grain storage. En: *Agriculture Research*, 1(2), pp.148–156
- KarunakaraK., E.R., Murthy, R., Manonmani, H.K., 2009. Incidence of fusarium toxins in rice from Karnataka, India. En: *Research Journal of Toxins*, 1, pp.1-7.
- Klich, M.A., 2002. *Identifcation of common Aspergillus species*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Leslie, J. y Summerell, B., 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Iowa: Blackwell publishing.
- Lima, C.L., Orsi, R.B., Dilkin, P. y Correa, B., 2000. Mycoflora and aflatoxigenic species in derivatives of milled rice. En: *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20, pp.37-39.
- Lorini, I., Krzyzanowski, F., de Barros França-Neto, J. y Henning, A., 2009. *Principais pragas e métodos de controle em sementes durante o armazenamento*. Brasilia: Abrasem.
- Majeed, S., De Boevre, M., De Saeger, S., Rauf, W., Tawab, A., Fazal-e-Habib e Iqbal, M., 2018. Multiple mycotoxins in rice: occurrence and health risk assessment in children and adults of Punjab, Pakistan. En: *Toxins*, 10(2), p. 77.
- Mannaa, M. y Kim, K.D., 2017. Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grain storage. En: *Mycobiology*, 45(4), pp.240–254.
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho G. y Sanchis, V., 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. En: *Food and Chemical Toxicology*, 60, pp.218–237.
- Martínez, S., Bao, L. y Escalante, F., 2018. *Manual de identificación de enfermedades y plagas en el cultivo de arroz*. Montevideo: INIA. (Boletín de Divulgación, N°116).
- Mew, T.W. y Gonzales, P., 2002. *A handbook of rice seedborne fungi*. Los Baños: International Rice Research Institute. 83p.
- Neninger, L.H., Hidalgo, E.I., Barrios, L.M. y Pueyo, M., 2003. Hongos presentes en semillas de arroz (*Oryza sativa*L.) en Cuba. En: *Fitosanidad*, 7, pp.7-11.
- Nilsson, R., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Ryberg, M., Kristiansson, E., Schoch, C., Nylander, J., Bergsten, J., Porter, T., Jumpponen, A., Vaishampayan, P., Ovaskainen, O. Hallenberg, N., Bengtsson-Palme, J., Eriksson, K., Larsson, K-H., Larsson, E. y Koeljal, U., 2012. Five simple guidelines for establishing basic authenticity and reliability of newly generated fungal ITS sequences. En: *MycKeys*, 4, pp.37-63.
- Pincioli, M., Gribaldo, A., Vidal, A., Bezus, R. y Sisterna, M., 2013. Mycobiota evolution during storage of paddy, brown and milled rice in different genotypes. En: *Summa Phytopathologica*, 39(3), pp.157-16.
- Queheille, N., 2018. Inocuidad: un atributo decisivo para el arroz [En línea]. En: *Arroz*, setiembre 2018. pp.54-56. [Consulta: 3 de setiembre de 2019]. Disponible en: <http://www.aca.com.uy/wp-content/uploads/2017/08/INOCUIDAD.pdf>
- Richardson, J.M., 1996. Seed mycology. En: *Mycological Research*, 100(4), pp.385-392.
- Salgado, L., 2018. Arroz: situación y perspectivas. En: OPYPA. *Anuario OPYPA*. Montevideo: MGAP. pp. 215-227. [Consulta: 29 agosto 2019]. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y->

- políticas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-opypa/2018
- Shiratori, N., Kobayashi, N., Tulayakul, P., Sugiura, Y., Takino, M., Endo, O. y Sugita-Konishi, Y., 2017. Occurrence of *Penicillium brocae* and *Penicillium citreonigrum*, which produce a mutagenic metabolite and a mycotoxin citreoviridin, respectively, in selected commercially available rice grains in Thailand. En: *Toxins*, 9(6), E194.
- Toews M., Thomas, P. y Payton, M., 2005. Estimating populations of grain beetles using probe traps in wheat-filled concrete silos. En: *Environmental Entomology*, 34(3), pp.712-718.
- Tonon, S.A., Marucci, R.S., Jerke, G. y García, A., 1997. Mycoflora of paddy and milled rice produced in the region Northeastern Argentina and Southern Paraguay. En: *International Journal of Food Microbiology*, (37), pp.231-235.
- Trematerra, P.P., Sciarretta, M.C.Z. y Lazzari, A.S.M.N., 2004. Spatio-temporal analysis of insect pests infesting a paddy rice storage facility. En: *Neotropical Entomology*, 33(4), pp.469-479.
- Trochez, A., 1987. *Manual de reconocimiento de insectos asociados con productos almacenados*. Bogotá: IICA. (Serie Miscelánea, 31).
- Uruguay XXI, 2019. *Informe mensual de comercio exterior, Agosto de 2019* [En línea]. Montevideo: Uruguay XXI. [Consulta: 13 de Setiembre, 2019]. Disponible en: <https://www.uruguayxxi.gub.uy/es/centro-informacion/informes-de-comercio-exterior/>
- USDA, 2015. *Stored grain reference*. Washington: USDA. 74p.
- Xmgwei, H., Xianchang, T. y Jianchun, W., 1998. The comparison of five determination methods for hidden insect infestation. En: *Proceedings of the 7th International World Conference on Stored-product Protection*. Vol. 2. Beijing: Sichuan Publishing House of Science and Technology. pp.14-19.
- Zorrilla, G., Martínez, S. y Saravia, H., eds, 2017. *Arroz 2017*. Montevideo: INIA. (INIA Serie Técnica, 233). 132 p. ISBN 978-9974-38-381-4.

Design of a sustainable, intelligent and interconnected food container following Cradle to the Cradle principles and using Life Cycle Analysis for the evaluation of environmental impacts

Diseño de un envase para alimentos sostenible, inteligente e interconectado siguiendo los principios de la cuna a la cuna y utilizando el Análisis del Ciclo de Vida para la evaluación de impactos ambientales

Projeto de um contêiner de alimentos sustentável, inteligente e interconectado, seguindo os princípios do berço ao berço e usando a Análise do Ciclo de Vida para avaliar os impactos ambientais

RECIBIDO: 7/9/2019 → APROBADO: 26/11/2019 ✉ mariainescabot@hotmail.com

✉ CABOT, MARÍA I. (1); LUQUE, AMALIA (1); DE LAS HERAS, ANA (1); AGUAYO, FRANCISCO (1)

(1) DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DEL DISEÑO, ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR, UNIVERSIDAD DE SEVILLA, SEVILLA, ESPAÑA.

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo es ayudar a combatir las pérdidas de alimentos en la cadena productiva, uno de los principales problemas de la industria alimentaria actual, incorporando conceptos de sostenibilidad. Según la FDA, cada año se arrojan alrededor de 1.300 millones de toneladas de alimentos. Los alimentos se desperdician principalmente a nivel de los hogares, por lo que se elige el diseño sostenible de un envase inteligente interconectado para uso doméstico. Para lograr esto, se exploran diferentes tecnologías, materiales, metodologías y marcos innovadores. En cuanto a los materiales, se estudiaron plásticos biodegradables, reciclados, reciclables y bioplásticos y se investigó la tecnología inteligente a utilizar, en este

caso sensores. Respecto a las metodologías, se hace un estudio del Análisis del Ciclo de Vida (ACV) y la filosofía Cradle to Cradle (C2C). Los sistemas inteligentes de envasado son una opción para contribuir a minimizar el desperdicio de alimentos. El uso correcto de herramientas como el ACV, junto con los principios del C2C y la investigación sobre materiales y tecnologías pueden ayudar a los diseñadores a alcanzar una solución óptima que minimice los impactos ambientales.

PALABRAS CLAVE: Economía circular, impacto ambiental, ecodiseño, envases inteligentes, industria alimentaria.

ABSTRACT

The main objective of this work is to help combat food losses in the production chain, which is one of the main problems of the food industry today, incorporating also sustainability concepts. According to the FDA each year about 1,300 million tons of food are thrown. Food is wasted mainly at household levels, which is why the choice of the sustainable design of an intelligent interconnected packaging for domestic use is made. To achieve this, the exploration of different technologies, materials, methodologies and innovative frameworks is carried out. Regarding materials, the possibility of using biodegradable, recycled, recyclable and bioplastics was studied, along with the research of the intelligent technology to use, which ended up being sensors. As to methodologies, Life Cycle Analysis (LCA) and Cradle to Cradle philosophy (C2C) are studied. Intelligent packaging systems are an option to contribute to minimization of food waste. The correct use of tools such as the LCA, along with the principles of the C2C, and the research on materials and technologies to be used can help designers to reach an optimal solution, minimizing environmental impacts.

KEYWORDS: Circular economy, environmental impact, ecodesign, smart packaging, food industry.

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho é ajudar a combater as perdas de alimentos na cadeia produtiva, um dos principais problemas da atual indústria de alimentos, incorporando também conceitos de sustentabilidade. De acordo com a FDA, cerca de 1,3 bilhões de toneladas de alimentos são lançadas a cada ano. Os alimentos são desperdiçados principalmente no nível doméstico, por isso foi escolhido o design sustentável de um contêiner inteligente interconectado para uso doméstico. Para isso, diferentes tecnologias, materiais, metodologias e estruturas inovadoras são exploradas.

Com relação aos materiais, foram estudados plásticos biodegradáveis, reciclados, recicláveis e bioplásticos e investigada a tecnologia inteligente a ser utilizada, neste caso sensores. Com relação às metodologias, foi realizado um estudo da filosofia do Ciclo de Vida (ACV) e da filosofia Cradle to Cradle (C2C).

Sistemas de embalagem inteligentes são uma opção para ajudar a minimizar o desperdício de alimentos. O uso correto de ferramentas como a ACV, juntamente com os princípios do C2C e a pesquisa de materiais e tecnologias pode ajudar os projetistas a alcançar uma solução ideal que minimiza os impactos ambientais.

PALAVRAS-CHAVE: Economia circular, impacto ambiental, design ecológico, embalagens inteligentes, indústria de alimentos.

INTRODUCTION

The problem of food waste

According to Food and Agriculture Organization, “food waste” can be defined as food that is appropriate for human consumption but is discarded before it is spoiled, as a result of negligence or conscious decision to throw away food (Heising, et al., 2017).

Expert advisors to the United Nations estimate that, around the world today, about 30% of the food grown is lost due to deterioration (Russell, 2014). Others are encouraged to say that even 40% of all food intended for human consumption in developed countries ends up being a waste (Heising, et al., 2017). In tons, according to the 2011 FDA report, about 1.3 billion tons of food is thrown away every year (Dobrucka and Cierpiszewski, 2014).

Food waste quantification by category of food in households has been studied by Williams and Wikström (2010), who showed that fruits and vegetables, prepared foods and dairy products are the ones that contribute the most to waste when expressed based on weight (Heising, et al., 2017).

Prevention of avoidable food waste generation along the supply chain represents the most advantageous option within the food waste hierarchy (Heising, et al., 2017) and optimal packaging for each food can help reduce all these numbers.

Promptly in middle and high income countries, food is wasted mainly at retail and consumption levels (Russell, 2014), and this is the reason why this research work is aimed at smart packaging at the domestic level.

The entire value chain has a responsibility to explain that sustainability is not synonymous of recycling, recyclability, recycled content, biodegradability and other buzzwords, but that main efficiency of supply chain resources should be the top priority (Russell, 2014).

Sustainability and packaging

Improving sustainability requires knowledge of complete value chains; focus on one section is insufficient since solving a problem in one place can result in the creation of a different problem in another (Russell, 2014). Specially in terms of packaging, since, due to their inherent dependencies, life cycles of the product/packaging combinations are more complex than the individual life cycles for the products (Abramovici, 2013), as can be seen in Figure 1.

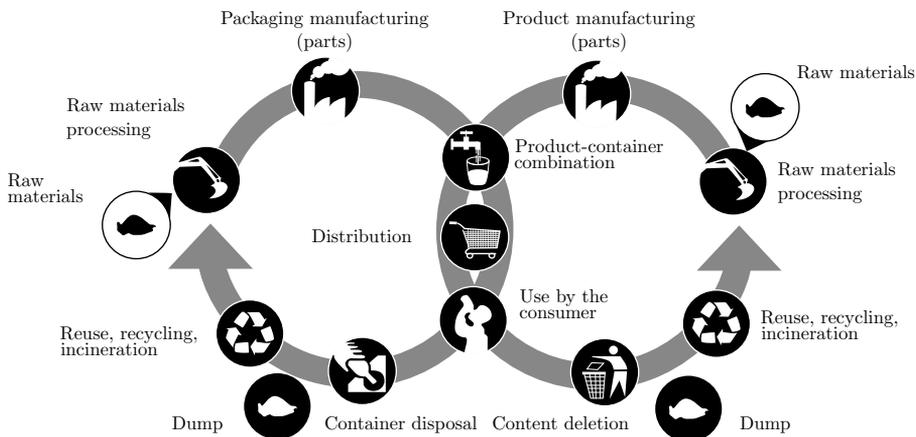


Figure 1. Life cycles of the product, the container and their superposition.

There are many attributes that can contribute to a more sustainable food package, such as it being produced from recycled material, or that it minimizes the use of water, generates zero waste in landfills, has the potential to be reused, is made using renewable energy, does not generate air pollution, does not generate greenhouse gas emissions, protects human health, etcetera. In fact, all these attributes can be valid and valuable, however, no solution meets all sustainability criteria at the same time (Russell, 2014).

The main criterion with which it must comply is to offer, first and foremost, its content to the consumer in good condition (Russell, 2014) because by containing, protecting and preserving its contents, packaging contributes to important social aspects of sustainability, such as health and the need for food (Abramovici, 2013).

For example, when the shelf life of a cucumber can be extended from three days to more than two weeks simply by wrapping it in 1,5 g of packaging, the food supply chain becomes much more sustainable and means that the small amount of polyethylene used is a good candidate to be called 'sustainable packaging' (Russell, 2014).

A more comprehensive and integrated approach, which encompasses economic, social and environmental considerations, along with more efficient packaging designs that save materials and are recyclable, is the key to sustainable packaging (Lee and Xu, 2005).

In this context, Life Cycle Assessment (LCA) can be applied as a design support tool to highlight criticisms regarding environmental aspects and improvement solutions in the life cycle of packages, thus promoting the use of greener products (Siracusa, et al., 2014).

For decades, the dominant environmental problems in the packaging area have been optimization of materials and possibilities of recycling, and not the reduction of food losses. However, for all the above, it is concluded that the principle of avoiding food losses should be included in the packaging design if the overall environmental impact of the food packaging system aims to be reduced.

The ideal is to find new packaging solutions that not only reduce the impact of the packaging itself, but also reduce the losses of the food it contains. However, it should be borne in mind that, in some cases, it may be necessary to increase the environmental impact of the new packaging to reduce food losses.

It is important to analyze whether there is a risk that food losses increase when the design of the package changes, for example, when it is sought to reduce the amount of packaging material. The total environmental impact will surely increase if this decision implies an increase in food losses, even if the impact of the packaging decreases.

Environmental impact is generally higher for products of animal origin such as meat and milk than for vegetable products.

Regarding the environmental impact of the food/environmental impact of the container, the following comparison can be made: a refined food product with an animal origin such as cheese has a high environmental impact per kilogram. The polyethylene cheese package has a relatively low environmental impact per kilogram of cheese. This means that large increases in cheese packaging could be justified for a new package that reduces the losses of this product. The F/T ratio (environmental impact of the food/environmental impact of the container) is much lower for ketchup, a refined article with vegetable origin, for which the packaging solution has a high environmental impact. The low F/T ratio indicates that it is probably as important to find packaging systems with less environmental impact than to develop packages that reduce ketchup losses (Williams and Wikström, 2010).

Moreover, consumer behavior has probably the greatest potential to reduce food losses, and packaging can influence their behavior through the provision of information and/or technical solutions. Printed information on how to store the contents, how to improve interpretation of expiration dates, etcetera, may affect this parameter, so it is important to carry out research on the extent to which losses can be influenced by the communication power of the packaging.

Smart packaging in the food industry

New packaging solutions allows to improve the economic aspect of food waste and the interest in active and intelligent packaging is increasing. This is reflected in the number of patent applications and patents granted in recent years (Barska and Wyrwa, 2017).

One of the major causes of waste is fixed expiration dates, since consumer's willingness to pay for a food product generally decreases if there are fewer days left before the expiration date. This means that as soon as a new batch of product with a longer shelf life enters the supermarket, consumers will probably buy these new products instead of the older ones, and after the expiration date the supermarket will have to discard those products (Heising, et al., 2017).

Therefore, there are studies that propose the establishment of a dynamic expiration date, with a potentially dynamic price, that is, lowering the price as the expiration date approaches. In this system, the price of the food is automatically

adapted from an electronic signal of a quality sensor, depending on the expected remaining useful life, influencing the purchase decision of consumers and, as an expected result, should have a lower number of expired products before sale and consumption, thus reducing avoidable food waste (Heising, et al., 2017). This is possible with smart packaging. Deterioration of the intrinsic quality attributes of food products must be studied in depth to determine which smart packaging concept is the most useful for implementing and monitoring or ensuring good product quality.

Smart containers are systems used to detect, perceive and record any changes within the package (Mohebi and Marquez, 2015) during their life cycle and communicate this information related to the quality or safety of the packaged product (Heising, et al., 2017) in order to improve safety and quality as well as to warn about possible problems during transport and storage of food (Mohebi and Marquez, 2015). These use properties or components of the food or some material of the container as indicators of the history and quality of the product. Unlike active packaging, smart ones do not intend to release components into the food (Biji, et al., 2015).

These containers are based on two systems. The first one is based on the measurement of the conditions outside the packaging, while the second one measures directly the quality of the food products inside the packaging and can come into direct contact with the food, therefore, additional safety and quality controls are required (Barska and Wyrwa, 2017).

The appearance of intelligent packaging systems has contributed to a significant change in the existing perception of packaging, since they transform traditional functions of communication into intelligent communications (Barska and Wyrwa, 2017), thus forming an extension of the function of communication of traditional packaging (Biji, et al., 2015).

If this technology were combined with low impact packaging systems, there would be an increase in the environmental sustainability of the food packaging and preservation solution. In addition to this, if the food contained were produced using processes and products with low environmental impact, all packaged food would be more sustainable (Siracusa, et al., 2014).

Objective

The objective of this research work is the design of an intelligent interconnected container of rigid plastic, whose main specification is the storage of climacteric fruits in the refrigerator of a standard household and monitor the ethylene content. At the same time, it aims to inform consumers, through Bluetooth connection, that the fruit it contains is at its optimal date of consumption, thus avoiding food waste.

This package is designed in a way that can be transported from home to the supermarket every time a purchase is made, which means savings in disposable plastic containers used in the packaging of this type of products. It is made of plastic in order to adapt, since it is in this material that most of the innovations for packaging are made. Its resistance property is prioritized, as it is key to achieving the desired useful life.

Sensors will be the chosen technology for the intelligent part of the package, since they are the most successful technology for the detection of volatile compounds such as ethylene. Compared to indicators, sensors are faster, more precise and reliable, and they also provide necessary information on the quality of food in real time. The chosen sensors are called MOSFET and it is of special relevance that the reaction with ethylene has reversibility, since the container will be reused.

For its design, Cradle to Cradle principles are considered and after the container is designed, Life Cycle Analysis is performed in order to look for the process optimization points.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Evaluation of materials to use

Bioplastics and biodegradable plastics

To declare that a product is more sustainable it is not enough to know what raw material is used for its manufacture, it is also necessary to understand where and how that raw material is produced. Then there are confusing terms like 'bioplastic'. This may mean what is best described as 'bio-based' plastic produced from renewable raw material sources or it may mean 'biodegradable' plastic. The former refers only to the origin of the raw materials from which plastics are manufactured, while the latter is about its end of life. The key point is that biologically-based plastics may not be biodegradable (for example, biologically based polyethylene) and a biodegradable plastic may not be biologically based (for example, fossil-based aliphatic-aromatic copolyesters that are used to make biodegradable films) The main challenge for raw materials of biological origin is that conversions are required to move from biological raw materials to useful molecules. Usually, that requires energy (about twice the energy for polyethylene obtained from sugarcane than for synthetic polyethylene), and if that energy is supplied by fossil fuels, which it usually is, then emissions from CO₂ can be increased instead of decreased (Russell, 2014).

In addition, the environmental advantages of the new biological materials are sometimes less than the expected due to comparatively high energy consumption in one or more of the production stages. This is also due in part to the fact that these materials have a less favorable barrier and mechanical properties, resulting in greater material inputs (Hermann, et al., 2010).

As for biodegradable plastics, although the biodegradability that supports compostability according to national standards such as UNE-EN 13432 (Asociación Española de Normalización y Certificación, 2001) is a useful property for specific applications in locations where industrial composting facilities exist, it is not a universal solution for the sustainable management of packaging waste or a viable solution to problems such as garbage, which is a problem of social behavior and should be addressed as such (Russell, 2014).

Recycled raw material and recyclable containers

If recycled polymers were used, impacts due to the production phase would decrease proportionally. On the other hand, if packages are produced to be recyclable after disposal, impacts due to the end of life would be reduced (Siracusa, et al., 2014).

Collecting and recycling used containers helps preserve the financial and energy inputs that came in to create the material and reduce environmental burdens by not requiring the creation of new packaging material, but only to the point where collection, classification, cleaning and reprocessing is cheaper, requires less energy and causes less unwanted emissions than virgin packaging production. In addition, the more dispersed or contaminated the packaging material is, the less sustainable its mechanical recycling will be (Russell, 2014).

When considering a Life Cycle Analysis, it is clear that single-layer packaging is more desirable from an environmental point of view, since, in principle, it uses less material and energy in its manufacture. But we must also consider that multilayer packaging is having a great impact on the market because it provides the product a longer shelf life and therefore needs less energy for its conservation and distribution (Lee and Xu, 2005). This is what will be prioritized in this study.

In addition, it is essential to obtain containers and films with good gas barrier properties for the packaging of perishable products such as food and beverages, and for this the need to manufacture this type of packaging is often imperative.

A bilaminar plastic container was then chosen, with PET in the outer layer and HDPE in the inner layer. As an adhesive that joins both layers, the commercially known copolymer Surlyn is used since a correct behavior was observed in the research work carried out by Guerrero and Arroyo (2003).

The chosen criteria were costs, availability and properties (high hardness, washability, aptitude for food contact, low oxygen permeability and low water vapor permeability).

Methods

Cradle to Cradle (C2C)

Cradle to Cradle (C2C) is an innovation framework used since the 1990s in order to design products and services that are beneficial in economic, health and environmental terms to achieve a sustainable world (Ankrah, et al., 2015).

Conceived by architect William McDonough and chemist Michael Braungart, it proposes to replace eco-efficiency with eco-efficacy and has as its mother premise that a closed cycle system does not need to be eco-efficient (reduce the use of resources and waste) because the more waste is generated, more nutrients are available to produce new products (Kausch and Klosterhaus, 2016).

A comparison between eco-efficiency with eco-efficacy can be seen in Figure 2.

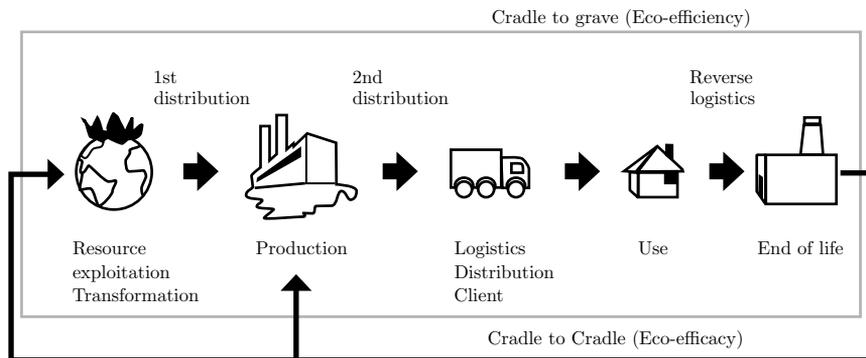


Figure 2. Comparison between eco-efficiency (Cradle to grave) and eco-efficiency (Cradle to Cradle).

It is proposed that eco-efficiency is a reactionary approach that does not address the need for a fundamental redesign of industrial material flows and is primarily a strategy for damage management and the reduction of guilt. Cradle to Cradle is based on the premise that making small changes in a system that is fundamentally incorrect and can never achieve anything ‘good’, it will only reduce the ‘bad things’ just a little (Hesselbach and Herrmann, 2011).

In C2C the assumption that industry inevitably destroys the natural environment is rejected, recognizing the potential within the economy of abundance, the power of ingenuity, creativity and prudence, imagining systems that, together with their technical functionality, purify water, the atmosphere and the soil, helping nature create environmental value (Peralta-Álvarez, et al., 2011).

The two cycles of C2C

C2C states that, for the flows generated by the industry, two possible metabolic pathways associated with a technosphere and a naturesphere are established and must be considered in the design of industrial products and systems (Peralta-Álvarez, et al., 2011).

Biological nutrients are metabolized and regenerated by the naturesphere (Peralta-Álvarez, et al., 2011) and are defined as: “A material used by living organisms or cells to carry out vital processes such as growth, cell division, carbohydrate synthesis and other complex functions. They are materials that can be biodegraded safely” (Hesselbach and Herrmann, 2011).

Technical nutrients, which make up the technosphere, are defined as: “A material that remains in a closed cycle manufacturing, reuse and recovery system called technical metabolism, maintaining its value through infinite product life cycles.” (Hesselbach and Herrmann, 2011)

Metabolisms in C2C

Three metabolisms are recognized for the products.

The first is infra-recycling (or downcycling), where the materials and the product lose quality and the only thing that is achieved is to postpone its disposal or its

arrival to landfills, slowing down its destructive cycle. It reveals a poor design of life cycle and material flow (Peralta-Álvarez, et al., 2011).

The second metabolism is supra-recycling (or upcycling), where it is possible to transform materials or an unused product, destined to be waste, into another of equal or greater utility or value, since they are designed to close cycles and maintain its status as a source. These routes give rise to more valuable materials becoming privileged for the ecodesign of products and industrial ecology (Peralta-Álvarez, et al., 2011). This is what the Cradle to Cradle philosophy points to, where mere recycling is not enough (Toxopeus, et al., 2015).

The last metabolism that arises is the cascade model, where the materials are kept within a technical cycle for a certain amount of iterations, while losing the properties before returning to the biological cycle (Toxopeus, et al., 2015). Paper recycling is a typical example of the waterfall model within the Cradle to Cradle design paradigm.

It must be decided at an early stage whether a material will be used in a technical context or in a biological context (NL Agency, 2011) and biological and technical nutrients should not be mixed. Otherwise, the product created does not fit the biological nor technical metabolism. Such a product can never be truly recycled, but simply degraded to a product of lower quality and value (Hesselbach and Herrmann, 2011).

Non-renewable materials should flow to industrial systems to act as nutrients in the manufacture of new products (Toxopeus, et al., 2015).

C2C Principles

The Cradle to Cradle paradigm is based on three fundamental principles.

The first is about conception of garbage as food; instead of the eco-efficient approach of trying to reduce the amount of waste, the approach should be to design systems with products that other processes can take as nutrients (Hesselbach and Herrmann, 2011).

The products and components should be designed to facilitate the disassembly of the material and the materials should be intelligently combined keeping their integrity intact after their useful life (Ankrah, et al., 2015).

This principle also incorporates the issue of toxicity of the material, with the aim of ensuring that the materials used in the production of components are not less toxic but directly non-toxic and non-hazardous and, when it is impossible, to obtain non-toxic replacements, measures must be taken to keep toxic materials in a continuous closed circuit (Ankrah, et al., 2015).

The second principle is the use of sustainable energy; the energy demanded from industrial activity should be obtained from renewable sources preferably, such as energy from the sun or other forms of renewable energy that are mainly driven by the sun's radiation: wind, geothermal, hydroelectric and bioenergetic (Ankrah, et al., 2015).

Within the design paradigm, it is assumed that these renewable energy sources are widely and abundantly available without practical restrictions (Toxopeus, et al., 2015).

The third principle is based on celebrating diversity and its objective is to avoid uniform solutions (one-size-fits-all) and, instead, to design products and systems with local environments, economies and cultures in mind, under the premise: “Industries that respect diversity are related to local flows of materials and energy, and to local social, cultural and economic forces, rather than seeing themselves as autonomous entities, disconnected from the culture or landscape that gives them surrounds” (Hesselbach and Herrmann, 2011).

To improve the resistance of a system, diversity is necessary. Focusing on a criterion could cause instability and imbalance in a broader context (Toxopeus, et al., 2015).

Life Cycle Analysis (LCA)

LCA is a methodology developed in the 1970's to measure the impact of a product, service or process throughout its life cycle (from when raw materials are obtained until their end of life and subsequent management). It is based on the collection and analysis of the inputs and outputs of the system (natural resources, emissions, waste and by-products) to obtain quantitative data of its potential impacts on the environment, in order to determine strategies for minimization or reduction (Guzmán Vargas and Gutiérrez Fernández, 2016). The LCA considers inputs (raw materials and energy) and products (emissions to air, soil and water) in each phase of the life cycle of the product and states that all the stages involved in the life cycle of a product/activity have a responsibility for its environmental consequences. At the same time, LCA does not result in a rating of what is “more sustainable”, but offers a platform to compare alternatives (NL Agency, 2011).

Once a project has been completed, the value of an LCA lies in the opportunity to assess the environmental impact of the finished design and integrate this knowledge into new or follow-up projects. In fact, one of the purposes of LCA in ecological design is the identification of critical environmental points. This analysis helps product developers prioritize areas for improvement after the LCA (NL Agency, 2011).

To the extent that by the application of LCA opportunities for improvement are identified and effectively implemented in the product, an improvement in the environmental performance of that product will also have been achieved (Romero Rodríguez, 2010).

LCA phases

LCA develops in four phases.

The first phase is the definition of the objectives and scope, covering the overall objectives of the LCA, its purpose, the product involved, the scope or magnitude of the analysis (system limits), the functional unit, the necessary data and the type of critical review to be performed (Sanz, et al., 2008). In the case study, the objective is defined as the identification and quantification of the different

environmental impacts throughout the life cycle of the container to contribute to achieve an ecodesign. The functional unit is a smart plastic interconnected bilayer PET/HDPE container of 5000 cm³ volume for (mainly climacteric) fruit packaging in the refrigerator. As for the materials, 2148,91 g of PET, 987,71 g of HDPE and 235,24 g of Surllyn per container will be used.

Regarding the scope of the study, it includes the extrusion of PET and HDPE granules, the coextrusion of the laminates obtained, the thermoforming of the final container, coupling of the sensors in the container, distribution of the containers in the Spanish territory, use of the container, and its disposal at the end of its useful life.

Phase two is the inventory analysis. It involves the elaboration of a quantified list of all the incoming and outgoing flows of the system throughout its useful life, which are extracted from the natural environment or emitted to it, calculating the energy and material requirements of the system and the energy efficiency of its components, as well as the emissions produced in each of the processes and systems (Sanz, et al., 2008).

A very important factor is the quality of the data, which in general is collected from various sources. Usually, the favorite source for researchers is the one that involves people who work in the sector and their respective registries (Cappelletti, et al., 2010).

In the case of this article, as it constitutes a theoretical study, SimaPro software of the Pre consultants (Netherlands) was used as the main source for the life cycle inventory.

The third phase consists of the impact assessment. According to the inventory list, a classification and evaluation of the inventory results is made, and its results are related to observable environmental effects (Sanz, et al., 2008).

In the evaluation phase, the results of the inventory (inflows and outflows of flows to the environment) are classified according to the category(ies) of environmental impact to which they contribute. The characterization includes three main aspects: the consumption of natural resources, human health and the quality of the ecosystem (Rivela, et al., 2013). Ecoindicator 99 is used, so the scope of this LCA also covers the following impacts: climate change, depletion of the ozone layer, acidification / eutrophication (combined), carcinogenesis, respiratory organic compounds, inorganic respiratory compounds, radiation ionizing, ecotoxicity, land use, mineral resources and fossil resources.

Subsequently, models are applied to obtain an environmental indicator in each impact category, unifying to a single reference unit all the substances classified within each category through the use of equivalence factors (Rivela, et al., 2013).

The last phase of LCA is the interpretation of results.

The LCA method is dynamic, and the four stages in which it is performed are related to each other, so that as results are obtained, data, hypotheses, system limits or objectives can be modified or improved, which requires a recalculation of the study (Sanz, et al., 2008).

RESULTS AND DISCUSSION

Application of C2C to the case study

To comply with principle 1, where any output from one system must be the input of another, since the material cannot be recycled because it is a bilayer container, and as the study is carried out in Spain, incineration with energy recovery will be sought, so that that energy constitutes an input for another or the same process. As for the sensors, the considered option is to keep them in a closed cycle agreed with the producer.

In addition, materials used in production should not be toxic or dangerous. This is a compromise for the present package since, after the LCA was performed, high values were observed in that aspect. It is emphasized that electronic components comply with Directive 2002/95/EC (European Union, 2003) on restrictions on the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment.

A meticulous analysis could also be made regarding the chosen plastics and the adhesive selected to bond them, in order to zero any potential dangerous or toxic substance that may appear in the system.

It is highlighted that, as part of the eco-design (fundamental pillar of the C2C methodology), the packaging in question is dismantlable, which will facilitate its disposal at the end of the useful life.

In order to comply with the use of sustainable energy, it is proposed that renewable energy could be used to meet the energy requirements of most processes in the life cycle of the packaging system, thus reducing global warming and the use of fossil fuels (Siracusa, et al., 2014).

SimaPro Software does not contemplate the use of renewable energies so, for the phase of use of the container, an electric energy mix obtained from non-renewable sources corresponding to the Spanish territory was considered. For the extrusion, co-extrusion and thermoforming phases, the corresponding options are available in the Software.

A study can be done on how the values obtained would change if wind, water or solar energy were used instead of electric energy obtained from non-renewable sources, for example. At this point it is relevant to discuss the use of "renewable energy credits", which can be purchased by any company, also by packaging producers. In addition, these credits are more likely to be purchased by companies at the converter level of plastic (producers, for example, of PET containers from granules), and less by large-scale producers of petrochemical materials (for example, PET granules), since the former, being closer to final consumers, have a greater potential interest in improving the environmental profile of their packaging (Hermann, et al., 2010).

Regarding the technology used, it is important not to ignore that at the moment investigations of design and manufacture of different gas sensors that can work without power supply are being carried out, especially coupled to RFID tags, although none of them are yet in the market.

In terms of energy efficiency, the activity time of the sensors could be managed, trying to minimize it either by optimizing the operation of the chosen sensors, or

by choosing sensors that operate for a shorter time. A meticulous study could also be done on the consumption of available sensors in order to choose the one that consumes the least by providing the same functions. In this work, sensors that have a saving mode were used, which greatly relieves the electric consumption load that falls on the sensor. At this point the option of using conductive polymers is suggested, since their operating temperature is low ($<122^{\circ}\text{F}$), so, in principle, they would spend less than the chosen sensors. Likewise, this is presented as an idea since there is no research on this type of sensors for the measurement of ethylene in fruits and at the same time the same low operating temperatures make them extremely sensitive to moisture.

The third principle, celebrating diversity, has as its main objective to avoid uniform solutions (one-size-fits-all). In the case study, the package was designed for climacteric fruits, contemplating their behavior and compounds emitted during ripening, so it is not a solution for all types of fruit.

Also, it was considered that all raw material suppliers are Spanish, so that it contributes to the increase of local employment, in addition to the fact that if the production plant were installed it would be installed in Spain, since the study was done assuming this, generating training and employment opportunities.

LCA Results

After performing the LCA, a great impact on the “resources” category of used plastics is observed, which was previously suspected because, as specific physicochemical properties are looked for in the container, bioplastic materials could not be used for this type of packaging.

A high impact of electronic components in general and especially in the category of human health is also observed, which in turn is the second category with the greatest impact of the product. This high contribution is probably due to the composition of the elements, which is why the electronic sector is urged to focus its research and development towards that area, in order to create components that are less harmful to the environment.

PET is seen as the element with the greatest global impact, which reinforces the idea of orienting the selection of plastics for the packaging towards a more environmental and not so economic profile, in order to contribute in this area.

Unlike other Life Cycle Analysis observed in literature referring to non-intelligent packaging, the transport phase does not imply a high environmental impact. This shows that when an intelligent system is added to the packaging, the environmental load is relocated, going from transport to intelligent system. In this observation lies the main contribution of the present research, since the vast majority of LCAs observed in literature are referred to non-intelligent packaging, as for example the one carried out in Madival et al., 2009.

These assessments are shown in Figure 3.

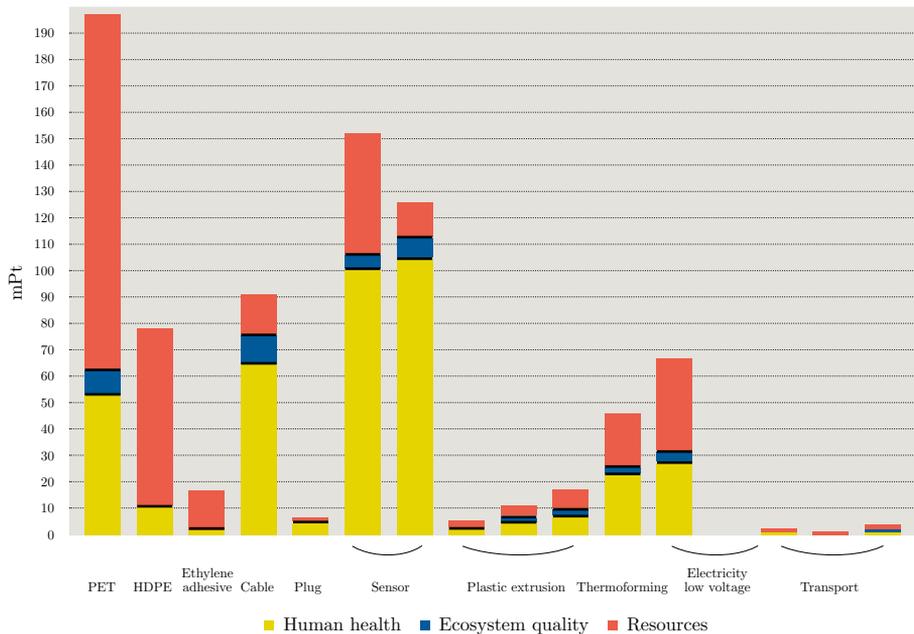


Figure 3. Standardized impacts per component for the different components of the interconnected smart container using SimaPro software.

CONCLUSIONS

Intelligent packaging systems are an option to contribute to the minimization of food waste, which is one of the main problems in the food industry today. Tools to assess sustainability such as Life Cycle Analysis can help evaluate environmental impact of the proposed solution.

In addition, this work seeks to encourage product designers to do so in a more sustainable way, following eco-design criteria when launching projects. The necessary tools are provided, and special emphasis is placed on tracking the product 'from cradle to cradle'.

It is observed that the choice of intelligent packaging technology and the characteristics of the package in general (chosen material, thickness, dimensions) intrinsically depend on the food to be controlled, whose properties and behavior must be studied meticulously in order to find the optimal packaging solution for each food.

In the case study, the greatest environmental impact is found in the production of PET, and then on the electronic components.

ACKNOWLEDGEMENTS

I thank my tutors and my Master teachers for all the shared knowledge. A special thanks goes to my family and friends. And, last but not least, an infinite thanks to the University of the Republic, Uruguay, who was in charge of my professional training and to the University of Seville, which gave me the opportunity to continue training.

REFERENCES

Abramovici, M. and Stark, R., 2013. *Smart product engineering*. Berlin: Springer. ISBN: 978-3-642-30817-8

Asociación Española de Normalización y Certificación, 2001. UNE-EN 13432: *Envases y embalajes. Requisitos de los envases y embalajes valorizables mediante compostaje y biodegradación. Programa de ensayo y criterios de evaluación para la aceptación final del envase o embalaje*. Madrid: AENOR.

Ankrah, N.A., Manu, E. and Booth, C., 2015. Cradle to cradle implementation in business sites and the perspectives of tenant stakeholders. In: *Energy Procedia* 83, pp.31-40

Barska, A. and Wyrwa, J., 2017. Innovations in the food packaging market – intelligent packaging – a review. In: *Czech Journal of Food Sciences*, 35, pp.1-6.

Biji, K.B., Ravishankar, C.N., Mohan, C.O. and Srinivasa Gopal, T.K., 2015. Smart packaging systems for food applications: a review. In: *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), pp.6125–6135.

Cappelletti, G.M., Nicoletti, G.M. and Russo, C., 2010. Life cycle assessment (LCA) of Spanish-style green table olives. In: *Italian Journal of Food Science*, 22(1), pp.3-14.

Dobrucka, R. and Cierpiszewski, R., 2014. Active and intelligent packaging food – research and development – a review. In: *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 64(1), pp.7–15.

European Union. Directive 2002/95/EC, of January 27, 2003. *Official Journal of the European Union*, February 13, 2003. L 37/19.

Guerrero, C. and Arroyo, E., 2003. Morfología y propiedades de politereftalato de etilen-glicol y polietileno de alta densidad. In: *Ciencia UANL*, VI(2), pp.203–211.

Guzman Vargas, L. and Gutierrez Fernandez F., 2016. Análisis del ciclo de vida de la producción de leche cruda como herramienta para determinar los impactos a la salud humana, a la calidad del ecosistema y a los recursos. Caso de estudio, finca San Francisco, vereda Patera Centro, Municipio de Ubaté - Cundinamarca. In: *Revista de Tecnología: Journal of Technology*, 15(1), pp.105-116.

Heising, J. K., Claassen, G. D. H. and Dekker, M., 2017. Options for reducing food waste by quality- controlled logistics using intelligent packaging along the supply chain. In: *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(10), pp.1672–1680. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1315776>

Hermann, B.G., Blok, K. and Patel, M.K., 2010. Twisting biomaterials around your little finger: environmental impacts of bio-based wrappings. In: *International Journal of Life Cycle Assessment*, 15(4), pp.346–358.

Hesselbach, J. and Herrmann, C., 2011. Globalized solutions for sustainability in manufacturing. In: *Proceedings of the 18th CIRP International Conference on Life Cycle Engineering, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Germany, May 2nd - 4th, 2011*. Berlin: Springer

Kausch, M.F. and Klosterhaus, S., 2016. Response to «Are Cradle to Cradle certified products environmentally preferable? Analysis from an LCA approach». In: *Journal of Cleaner Production*, 113, pp.715-716.

Lee, S.G. and Xu, X., 2005. Design for the environment: life cycle assessment and sustainable packaging issues. In: *International Journal of Environmental Technology and Management*, 5(1), pp.14.

Madival, S., Auras, R., Singh, S.P. and Narayan R., 2009. Assessment of the environmental profile of PLA, PET and PS clamshell containers using LCA methodology. In: *Journal of Cleaner Production*, 17(2009), pp.1183–1194.

Mohebi, E. and Marquez, L., 2015. Intelligent packaging in meat industry: an overview of existing solutions. In: *Journal of Food Science and Technology*, 52(7), pp.3947–3964.

NL Agency, 2011. *Usability of life cycle assessment for cradle to cradle purposes - position paper*. Utrecht: Ministry of Infrastructure and the Environment.

Peralta-Álvarez, M.E., Aguayo-González, F. and Lama-Ruíz, J.R., 2011. Ingeniería sostenible de la cuna a la cuna: una arquitectura de referencia abierta para el diseño C2C. In: *Revista DYNA*, 86, pp.199-212.

Rivela, B., Cuerda, I., Olivieri, F., Bedoya, C. and Neila, J., 2013. Life cycle assessment for ecodesign of ecological roof made with Intemper TF ecological water-tank system. In: *Materiales de Construcción*, 63(309), pp.131-145.

Romero Rodríguez, B.I., 2010. El análisis del ciclo de vida y la gestión ambiental. In: *Dyna*, 1, pp.23-24.

Russell, D.A.M., 2014. Sustainable (food) packaging – an overview. In: *Food Additives & Contaminants Part A*, 31(3), pp.396–401.

Sanz, J., Requena, S., Manuel, L., Gracia, N., Navarro, H. and Gil, J., 2008. Análisis del ciclo de vida (ACV) en la producción de vino. In: *Agricultura, Revista Agropecuaria*, 911, pp.760-765.

Siracusa, V., Ingrao, C., Lo Giudice, A., Mbohwa, C. and Dalla Rosa, M., 2014. Environmental assessment of a multilayer polymer bag for food packaging and preservation: An LCA approach. In: *Food Research International*, 62, pp.151–161.

Toxopeus, M.E., De Koeijer, B.L.A. and Meij, A.G.G.H., 2015. Cradle to cradle: effective vision vs. efficient practice? In: *Procedia CIRP*, 29, pp.384-389.

Williams, H. and Wikström, F., 2010. Environmental impact of packaging and food losses in a life cycle perspective: a comparative analysis of five food items. In: *Journal of Cleaner Production*, 19(1), pp.43–48.