



Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela para Graduados



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
Y ANTIMICROBIANA DE POLIFENOLES
OBTENIDOS DEL TEGUMENTO DE MANÍ**

Ing. Agr. Mariana Larrauri

Tesis

Para optar al Grado Académico de
Doctor en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 2016

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE POLIFENOLES OBTENIDOS DEL TEGUMENTO DE MANÍ

Ing. Agr. Mariana Larrauri

Comisión Asesora de Tesis

Director: Dra. Valeria Nepote _____

Co-Director: Dr. Nelson R. Grosso _____

Asesor: Dr. Enrique I. Lucini _____

Tribunal Examinador de Tesis

Dr. Enrique I. Lucini _____

Dr. Damián Maestri _____

Dra. Alejandra Pérez _____

Presentación Formal Académica

6 de Diciembre de 2016

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Valeria Nepote y el Dr. Rubén Grosso, quienes me dieron la oportunidad de convertirme en su becaria y me abrieron las puertas de su grupo de trabajo. Siempre con la palabra justa y el apoyo necesario para seguir adelante, tanto profesional como personalmente. Muchas Gracias!

Al Dr. Enrique Lucini por acompañarme en el día a día mientras trabajamos en el laboratorio. Siempre dispuesto a brindar un consejo y una sonrisa.

Quisiera agradecer al Dr. Julio Zygodlo y la Dra. Paula Zunino con quienes trabajé durante mis primeros años en el laboratorio de Química Orgánica.

A la Dra. Mirta Demo, Dra. Ma. Mercedes Oliva y Evangelina Carezzano por recibirme en Rio IV y guiarme en el conocimiento de las bacterias.

A mis colegas de la cátedra de Producción de Leche y al Laboratorio de Lactología.

Quisiera agradecer infinitamente a Claudia Asensio, quien además de ser mi compañera de trabajo, es una excelente amiga y la persona que me hizo emprender este apasionante camino de la investigación. ¡En estos años hemos compartido más que sueños, viajes y momentos... una hermosa amistad!

A Patricia Quiroga, quien me enseñó desde usar una balanza hasta como lavar un tubo de ensayo. Y a Paula, por su ayuda en los ensayos microbiológicos. Dos amigas que siempre están incondicionalmente para acompañarme.

A mis compañeros del laboratorio con quienes comparto mis días, ayudándonos entre todos y haciendo que las horas de trabajo transcurran entre amigos y siempre con una rica torta de por medio. Antonella, Boris, Cecilia, Guille, Pablo y Francisco.

A mis amigas de la vida: Natalia, Valeria, Eliana, Vanesa, Noelia, Carla y Soledad, quienes con su loca amistad hacen que mi vida sea simplemente perfecta.

A José, por su amor.

A mis papas, Clide y Valentín, por su apoyo incondicional durante estos años y por enseñarme a ser responsable, perseverante y luchar por mis sueños.

Dedicatoria

A mis papas por sus consejos, comprensión y amor.

*Si quieres ir rápido, camina solo,
Si quieres llegar lejos, ve acompañado.*

Proverbio africano

RESUMEN

El tegumento de maní es rico en sustancias fenólicas con propiedades antioxidantes, por lo que constituye una excelente materia prima para su explotación como fuente de antioxidantes naturales de grado alimentario. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad antioxidante y antimicrobiana de polifenoles obtenidos del tegumento de maní y su aplicación en diferentes matrices alimenticias para incrementar su vida útil. Se trabajó con tegumento de maní de la variedad *Runner* obtenido por blanchado y tostado industrial. A partir de estos tegumentos se obtuvieron dos extractos: Blanchado Crudo (BC) y Tostado Crudo (TC) por extracción sólido-líquido (etanol al 70%). Sobre los extractos crudos se realizó una partición con solventes (acetato de etilo y agua) y se obtuvieron cuatro fracciones: Blanchado-Acetato de Etilo (BAE) y Blanchado-Agua (BA), y Tostado-Acetato de Etilo (TAE) y Agua (TA). La fracción BAE se purificó por cromatografía en columna empacada con Sephadex LH-20. Se obtuvieron tres fracciones purificadas de diferentes colores: Amarillo (A), Violeta (V) y Marrón (M). Sobre los tegumentos se determinó composición química general, y sobre los extractos y fracciones se determinó: rendimiento de extracción, contenido de fenoles y flavonoides totales, pruebas antioxidantes (actividad secuestrante de radical DPPH, actividad quelante del ión ferroso, capacidad para capturar radicales hidroxilos y el anión superóxido, y prueba de oxidación acelerada a 60 °C en aceite de girasol) y actividad antimicrobiana y antifúngica. Sobre las fracciones purificadas se identificaron y cuantificaron los compuestos por HPLC-ESI-MS/MS. Se realizaron estudios de almacenamiento en dos productos alimenticios con el agregado de los extractos: almendras tostadas con cubiertas comestibles de carboximetil celulosa (CMC) y leche de soja con microcápsulas. Sobre las muestras de almendra se realizaron determinaciones químicas y sensoriales. Sobre las muestras de leche de soja se evaluaron los efectos del agregado del extracto y microcápsulas mediante análisis químicos, microbiológicos y sensoriales. El tegumento de maní presentó entre 16-18% de compuestos fenólicos. El tegumento blanchado resultó con mayores rendimientos de extracción de fenoles y flavonoides que el tostado. La partición con solventes permitió obtener extractos con mayores contenidos de fenoles en las fracciones de acetato de etilo. La purificación por columna separó fracciones con diferentes contenidos de fenoles, flavonoides y composición. La fracción V presentó el mayor contenido de fenoles y A, de flavonoides. Todos los extractos y fracciones mostraron actividad antioxidante en las diferentes pruebas. Las fracciones con mayor contenido de fenoles se asociaron a mayor actividad DPPH, anión superóxido e ion ferroso. Las fracciones A, V y M presentaron diferentes mecanismos antioxidantes lo que probablemente se asocia a las diferencias en su composición química. En la prueba de oxidación acelerada, los extractos y fracciones purificadas presentaron similar actividad antioxidante en aceite de girasol. En general, los extractos y fracciones resultaron con escasa actividad antimicrobiana y antifúngica. En el estudio de almacenamiento de las muestras de almendra, el uso de CMC como cubierta comestible con el agregado de extractos de tegumento de maní y BHT protegió a las almendras del deterioro oxidativo y disminuyó la intensidad de los atributos sensoriales negativos. En leche de soja, BAE mostró un efecto protector frente a la oxidación de los lípidos y al crecimiento microbiano, incrementando el contenido de fenoles y la actividad antioxidante del producto final. BAE al ser encapsulado mostró efecto protector sobre el producto sin cambio de color protegiendo a los polifenoles de la degradación. Los extractos y fracciones pueden ser utilizados en diferentes matrices alimenticias como antioxidantes naturales.

Palabras Clave: tegumento de maní, polifenoles, antioxidantes, almendras, leche de soja.

ABSTRACT

Peanut skins are rich in phenolic compounds with antioxidant properties that can be a source of natural antioxidant to be used in food for increasing its shelf life and stability. The objective of this study was to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of polyphenols obtained from peanut skins and their application in different foods to increase their shelf life. Peanut skins were obtained by blanching and roasting processes from *Runner* peanuts (Argentina). Crude extracts (BC and TC) were obtained by solid-liquid extraction from peanut skins using ethanol 70%. BC and TC were partitioned in two fractions with ethyl acetate (BAE and TAE) and water (BA and TA). BAE was separated by column chromatography packed with Sephadex LH-20 in three colored fractions: yellow (A), purple (V) and brown (M). Chemical composition, yield of extraction, total phenol, and flavonoid contents, antioxidant activity (DPPH radical, hydroxyl radical, and superoxide anion scavenging activities; ferrous ion chelating activity; accelerated oxidation test on sunflower oil at 60 °C) and antimicrobial and antifungal activities were evaluated on extracts and purified fractions. Different phenolic compounds were identified on purified fractions by HPLC-ESI-MS/MS. In addition, storage studies were performed on two food products with the addition of peanut skin extract: roasted almonds with carboxymethyl cellulose (CMC) edible coatings and soymilk with microcapsules. Chemical and sensory analysis were determined on almond products. In the case of soymilk products, the effect of peanut skin extract addition was evaluated by chemical (total titratable acidity, hydroperoxides, fatty acid composition, volatile compounds, total phenol content, and DPPH radical scavenging activity), microbiological (total count of mesophilic microorganisms) and sensory descriptive analysis of products during storage. Peanut skins had 16-18% total phenolics. Skins obtained by blanching process showed higher extraction yields, total phenol and flavonoid contents than those obtained by roasting. Acetate ethyl fractions had higher phenol content than water fractions after the solvent partition of crude extracts. Different composition, total phenol, and flavonoid contents were found in the different fractions separated by chromatographic column. The V fraction had higher phenol content and fraction A had higher flavonoid content than the other fractions. In general, fractions with higher phenol contents were associated with higher DPPH radical and superoxide anion scavenging, and ferrous ion chelating activities. The A, V, and M fractions showed different antioxidant mechanisms, probably associated with their chemical differences. Peanut skin extracts and fractions showed similar antioxidant effect on accelerated oxidation test with sunflower oil. Those compounds showed low antimicrobial and antifungal activities. In the storage study of almond products, CMC coating and peanut skin extract showed effect preventing oxidation reactions and rancid flavors development. In the soymilk essay, peanut skin extract had effect preventing lipid deterioration and microbial growth, increasing phenolic content, antioxidant activity and color intensity of the final product. However, the same extract when incorporated encapsulated also showed protective effect on the product, but without the disadvantage of the change in color. These microcapsules also have the advantage of protecting polyphenols degradations, allowing their release during digestion product without significantly affecting the appearance. According to the results, extracts, and purified fractions obtained from peanut skins can be added in food matrices as natural antioxidants reducing oxidative deterioration of lipids.

Keywords: peanut skins, polyphenols, antioxidants, almonds, soymilk

Tabla de Contenidos

Agradecimientos	iii
Dedicatoria.....	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT.....	vi
Tabla de Contenidos	vii
Lista de Tablas	xiv
Lista de Figuras.....	xvii
Lista de Abreviaturas	xx
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL	1
EL MANI.....	1
OXIDACIÓN DE LIPIDOS	3
AUTO-OXIDACIÓN.....	3
<i>Iniciación</i>	3
<i>Propagación</i>	3
<i>Terminación</i>	4
OXIDACIÓN FOTOSENSIBLE	4
OXIDACIÓN ENZIMÁTICA	5
LOS ANTIOXIDANTES	5
ANTIOXIDANTES SINTETICOS	7
ANTIOXIDANTES NATURALES	8
COMPUESTOS FENÓLICOS	9
COMPUESTOS FENÓLICOS Y LA SALUD.....	13
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	14
METODOS <i>TAH</i>	15
ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	15
METODOS <i>TES</i>	16
Actividad secuestrante de radicales libres mediante el uso del radical libre DPPH	16
Fenoles totales: método Folin-Ciocalteu (F-C).....	17
Actividad quelante del ion ferroso	17
Capacidad de captura de radicales hidroxilos	17
Actividad secuestrante del anion superoxido.....	18

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	19
ALIMENTOS FUNCIONALES.....	19
ANALISIS SENSORIAL DE LOS ALIMENTOS	21
LOS SENTIDOS	21
La vista	22
El oído	22
El olfato	23
El gusto.....	23
El tacto.....	24
ATRIBUTOS SENSORIALES.....	24
El color	24
El olor	25
El aroma.....	25
El gusto o sabor básico	25
El sabor.....	25
La textura.....	25
LOS JUECES EVALUADORES	26
LAS PRUEBAS SENSORIALES.....	27
Pruebas afectivas	27
Pruebas discriminativas	27
Pruebas descriptivas	28
Hipótesis	29
Objetivo General.....	29
Objetivos Específicos	29
BIBLIOGRAFÍA	30
CAPITULO II: OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE TEGUMENTO DE MANÍ	37
INTRODUCCIÓN.....	37
MATERIALES	39
MÉTODOS	39
Composición química	39
Obtención de los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní	40
Rendimiento de extracción	41
Contenido de fenoles totales	41
Contenido de flavonoides totales	41

ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
Composición química	43
Rendimiento de extracción, contenido de fenoles y flavonoides de los extractos y fracciones	44
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48
CAPITULO III: PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE FRACCIONES DE POLIFENOLES DEL TEGUMENTO DE MANÍ.....	51
INTRODUCCIÓN	51
MATERIALES Y MÉTODOS	54
MATERIALES	54
MÉTODOS	54
Purificación de fracciones de tegumento de maní por Cromatografía en Columna	54
Rendimiento en peso seco.....	55
Contenido de fenoles totales y flavonoides totales	55
Identificación y cuantificación de las fracciones purificadas (A, V y M) por HPLC-ESI-MS/MS	55
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
Purificación y caracterización de fracciones de tegumento de maní por cromatografía en columna.....	57
Identificación y cuantificación de compuestos en las fracciones purificadas (A, V y M) por HPLC-ESI-MS/MS	59
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63
CAPITULO IV: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS Y LAS FRACCIONES PURIFICADAS	66
INTRODUCCIÓN	66
MATERIALES Y MÉTODOS	69
MATERIALES	69
MÉTODOS	69
Actividad Antioxidante in Vitro de los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní	69
Actividad secuestrante de radicales libres por DPPH.....	69

Actividad quelante de ion metálico (ion ferroso)	70
Capacidad de capturar radicales hidroxilos	71
Capacidad de capturar anión superóxido	72
Actividad antioxidante de los extractos y fracciones de tegumento de maní en aceite de girasol.....	72
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	73
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
Actividad Antioxidante <i>in Vitro</i> de los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní	74
Actividad antioxidante de los extractos y fracciones de tegumento de maní en aceite de girasol.....	77
Análisis de componentes principales y conglomerados	79
CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	85
CAPITULO V:ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS Y LAS FRACCIONES PURIFICADAS DE TEGUMENTO DE MANÍ.....	89
INTRODUCCIÓN.....	89
MATERIALES Y MÉTODOS	92
MATERIALES	92
Extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní	92
Medios de cultivos líquidos	92
Medios de cultivos sólidos	92
Cepas Bacterianas	92
Aislamiento, conservación y propagación	93
Inóculo Fúngico	93
MÉTODOS	94
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	94
Ensayos de actividad antimicrobiana de extractos y fracciones de tegumento de maní ..	94
a) Preparación de los extractos y fracciones de tegumento de maní.....	94
b) Preparación del inóculo bacteriano	94
c) Determinación de la actividad antimicrobiana y concentración inhibitoria mínima (CIM) de extractos y fracciones de tegumento de maní por la técnica de difusión en disco.....	95

d) Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de extractos y fracciones de tegumento de maní por el método de dilución	95
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	96
Ensayos de actividad antifúngica de extractos y fracciones de tegumento de maní	96
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	96
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	97
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	97
Aislamiento, conservación e identificación de cepas.....	97
Ensayos de actividad antimicrobiana de extractos y fracciones de tegumento de maní ..	98
a) Determinación de la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones de tegumento de maní por la técnica de difusión en disco.....	98
b) Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extractos y fracciones de tegumento de maní por la técnica de difusión en disco.....	100
c) Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de extractos y fracciones de tegumento de maní	102
ACTIVIDAD ANTIFUNGICA	104
Ensayos de actividad antifúngica de extractos y fracciones de tegumento de maní	104
CONCLUSIONES	105
BIBLIOGRAFÍA	106
CAPITULO VI: UTILIZACIÓN DE EXTRACTOS DE TEGUMENTO DE MANÍ COMO ANTIOXIDANTE NATURAL APLICADO EN CUBIERTAS COMESTIBLES COMO CONSERVANTE EN ALMENDRAS	109
INTRODUCCIÓN	109
MATERIALES Y MÉTODOS	111
MATERIALES	111
MÉTODOS	111
Composición química general	111
Composición de ácidos grasos	112
Preparación de las muestras y tratamientos	113
Almacenamiento y muestreo	113
Análisis químicos.....	113
Análisis de volátiles de oxidación (AV)	115
Análisis sensorial	116
Pruebas de aceptabilidad.....	116

Pruebas descriptivas.....	117
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	121
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	122
Composición química general	122
Composición de ácidos grasos	122
Análisis químicos.....	123
Análisis de volátiles de oxidación (AV).....	126
Pruebas de aceptabilidad.....	128
Pruebas descriptivas.....	130
Análisis de componentes principales	134
CONCLUSIONES	136
BIBLIOGRAFÍA	137
CAPITULO VII: CAMBIOS QUÍMICOS, BIOLÓGICOS Y SENSORIALES DE LECHE DE SOJA CON EL AGREGADO DE EXTRACTOS Y MICROCÁPSULAS DE POLIFENOLES DE TEGUMENTO DE MANÍ	142
INTRODUCCIÓN.....	142
MATERIALES Y MÉTODOS	145
MATERIALES	145
MÉTODOS	145
Elaboración de la leche de Soja	145
Elaboración de las microcápsulas	145
Preparación de las muestras y tratamientos	146
Almacenaje y muestreo.....	146
Análisis químicos.....	146
<input type="checkbox"/> Acidez Total Titulable (ATT)... ..	146
<input type="checkbox"/> Hidroperóxidos (HP).	146
<input type="checkbox"/> Contenido de fenoles.	147
<input type="checkbox"/> Actividad secuestrante de radicales libres por DPPH.	147
<input type="checkbox"/> Extracción de Lípidos.	147
<input type="checkbox"/> Análisis de ácidos grasos.	148
<input type="checkbox"/> Análisis de volátiles de oxidación (AV).....	148
Análisis microbiológico.....	148
Análisis sensoriales.....	149
Pruebas descriptivas.....	149

ANÁLISIS ESTADÍSTICO	152
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	153
Análisis químicos.....	153
Análisis de ácidos grasos	157
Análisis de volátiles de oxidación (AV)	159
Indicadores microbiológicos.....	162
Análisis Sensorial	164
Análisis de componentes principales y análisis de correlación	167
CONCLUSIONES	170
BIBLIOGRAFÍA	171
CONCLUSIONES GENERALES.....	175

Lista de Tablas

Tabla 1.1	Ventajas y desventajas de los antioxidantes sintéticos y naturales utilizados en los alimentos.....	9
Tabla 2.1	Rendimiento de extracción, contenido de fenoles totales y contenido de flavonoides totales de extractos crudos de tegumento de maní blanchado (BC) y tostado (TC)	45
Tabla 2.2	Rendimiento de extracción, contenido de fenoles totales y contenido de flavonoides totales de las fracciones obtenidas por partición con solventes de tegumento de maní blanchado y tostado: Blanchado Acetato de Etilo (BAE), Tostado Acetato de Etilo (TAE), Blanchado Acuoso (BA) y Tostado Acuoso (TA)	49
Tabla 3.1	Rendimiento de extracción, contenido de fenoles totales y contenido de flavonoides totales del extracto Blanchado Crudo (BC), la fracción Blanchado Acetato de Etilo (BAE) y las fracciones purificadas por cromatografía en columna Amarillo (A), Violeta (V) y Marrón (M) de tegumento de maní blanchado	57
Tabla 3.2	Porcentaje relativo de los componentes identificados en las fracciones purificadas de tegumento de maní (Amarillo, Violeta y Marrón) analizados por HPLC-ESI-MS/MS	59
Tabla 4.1	Valores de los IC ₅₀ de la actividad secuestrante de radicales libres (DPPH), actividad quelante del ión ferroso, capacidad de capturar el radical hidroxilo y el anión superóxido de extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní	75
Tabla 4.2	Composición de ácidos grasos y contenido de tocoferoles del aceite de girasol utilizado	77
Tabla 4.3	Índice de peróxidos de las muestras en aceite de girasol durante el almacenamiento a 60 °C	78

Tabla 4.4	Rendimiento de extracción, fenoles totales, flavonoides totales, índice de peróxido (IP) y los IC ₅₀ de la actividad secuestrante de radicales libres (DPPH), actividad quelante del ión ferroso, capacidad de capturar el radical hidroxilo y el anión superóxido de los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní agrupados según el análisis de conglomerados	82
Tabla 5.1	Bacterias aisladas de alimentos utilizados para los test de actividad antimicrobiana	93
Tabla 5.2	Características culturales de Microorganismo GRAM + y -	97
Tabla 5.3	Determinación de la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní sobre microorganismos por técnica de difusión en disco	99
Tabla 5.4	Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní sobre microorganismos por técnica de difusión en disco	101
Tabla 5.5	Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní sobre microorganismos por técnica de difusión en disco	103
Tabla 6.1	Escala hedónica usada para las pruebas de aceptabilidad de muestras de almendra recubiertas	116
Tabla 6.2	Definición de atributos sensoriales evaluados sobre las muestras de almendras	118
Tabla 6.3	Intensidades de referencias estándares y de muestra <i>warm up</i> utilizados en las pruebas sensoriales descriptivas de muestras de almendras	119
Tabla 6.4	Composición química general de las almendras crudas	123
Tabla 6.5	Composición de ácidos grasos del aceite de almendras	123

Tabla 6.6	Escala de intensidad de los atributos sensoriales evaluados en los tratamientos de almendras tostadas (día 0 de almacenaje)	131
Tabla 6.7	Coefficientes de correlación de Pearson ($P < 0,01$) para las variables químicas y sensoriales en las muestras de almendras durante el almacenamiento.....	134
Tabla 7.1	Definición de atributos sensoriales evaluados sobre las muestras de leche de soja	150
Tabla 7.2	Intensidades de referencias estándares y de <i>warm up</i> utilizados en las pruebas sensoriales descriptivas de muestras de leche de soja	151
Tabla 7.3	Indicadores químicos (índice de acidez e hidroperóxidos), contenido de fenoles totales y actividad secuestrante de radicales libres (DPPH) de las muestras de leche de soja al inicio del almacenamiento (día 0)....	154
Tabla 7.4	Composición de ácidos grasos de leche de soja	157
Tabla 7.5	Compuestos volátiles identificados por MEFS (cuentas electrónicas x 10^6) por mL de leche de soja (día cero de almacenamiento)	160
Tabla 7.6	Escala de intensidad de los atributos sensoriales evaluados en los tratamientos de leche de soja (día 0 de almacenamiento)	164
Tabla 7.7	Coefficientes de correlación de Pearson significativos ($*p < 0,05$; $** p < 0,01$), para las variables químicas, microbiológicas y sensoriales de las muestras de leche de soja almacenadas	169

Lista de Figuras

Figura 1.1	Estructura de la cadena de productiva del maní	2
Figura 1.2	Mecanismo de auto-oxidación	4
Figura 1.3	Antioxidantes sintéticos utilizados en la industria alimentaria.....	7
Figura 1.4.	Ácidos Fenólicos	10
Figura 1.5	Estructura básica de los flavonoides	10
Figura 1.6	Estructura química del resveratrol. A. <i>trans</i> -resveratrol; B. <i>cis</i> -resveratrol	12
Figura 2.1	Composición química porcentual del tegumento de maní var. Runner (Blanchado y Tostado)	43
Figura 3.1	Estructura química de compuestos fenólicos: quercetina, ácido gálico y resveratrol	52
Figura 4.1	Gráfico de coordenadas de la primera y segunda componente del análisis de componentes principales. Variables: rendimiento de extracción (Rto.), fenoles totales, flavonoides totales, índice de peróxido (IP), y los IC ₅₀ para el radical DPPH, ion ferroso (Fe ⁺²), radical hidroxilo (OH) y anión superóxido (O ₂)	80
Figura 4.2	Dendograma proveniente del análisis de conglomerados de los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní considerando las variables: rendimiento de extracción, fenoles totales, flavonoides totales, índice de peróxido (IP), y el IC ₅₀ del radical DPPH, ion ferroso, radical hidroxilo y anión superóxido	81
Figura 6.1	Indicadores químicos evaluados en las muestras de almendra durante los 126 días de almacenaje a 40 °C. A. Índice de peróxidos (IP); B. Dienes Conjugados (DC)	125

Figura 6.2	Volátiles de oxidación de las muestras de almendra durante los 126 días de almacenaje a 40 °C. A. Hexanal; B. Nonanal	127
Figura 6.3	Porcentajes de respuestas para cada punto de la escala hedónica de 9 puntos proveniente del estudio de aceptabilidad de las muestras de almendra. A. Atributo <i>color</i> ; B. Atributo <i>sabor</i>	128
Figura 6.4	Intensidades de los atributos sensoriales de las muestras de almendra durante el almacenamiento de 126 días a 40 °C. A. Color de la piel; B. Oxidado; C. Cartón	132
Figura 6.5	Gráfico de Coordenadas de la primera y segunda componente del análisis de componentes principales. Variables: índice de peróxido (IP), dienos conjugados (DC), porcentaje de área de hexanal y nonanal y los atributos sensoriales de las pruebas descriptivas	135
Figura 7.1	Cambios en los indicadores químicos durante el almacenamiento. A. Acidez. B. Hidroperóxidos. C. Fenoles totales. D. % de inhibición del DPPH	154
Figura 7.2	Variación en el índice de yodo en las muestras de leche de soja durante el almacenamiento.....	158
Figura 7.3	Volátiles de oxidación de las muestras de leche de soja durante el almacenamiento a 4°C. A. Hexanal. B. 1-Octen-3-ol	161
Figura 7.4	Recuento de mesófilos totales en las muestras de leche de soja durante el almacenamiento.....	163
Figura 7.5	Cambios en los atributos sensoriales de las muestras de leche de soja almacenadas. A. Color gris. B. Gusto ácido. C. Gusto amargo. D. Sabor oxidado	166

Figura 7.6 Gráfico de Coordenadas de la primera y segunda componente del análisis de componentes principales. Variables: Acidez, hidroperóxidos, fenoles totales, actividad DPPH, índice de yodo, compuestos volátiles (hexanal y 1-octen-3-ol), recuento de mesófilos totales (UFC/mL) y atributos sensoriales del análisis descriptivo (color gris, gusto ácido, gusto amargo, sabor oxidado) 167

Lista de Abreviaturas

$^{\circ}\text{C}$ = grados centígrados

$\mu\text{g/mL}$ = microgramo/mililitro

μL = microlitro

μm = micrómetro

μmol = micro molar

16:0 = Ácido Palmítico

18:0 = Ácido Estéarico

18:1 = Ácido Oleico

18:2 = Ácido Linoleico

18:3 = Ácido Linolénico

$^1\text{O}_2$ = Oxígeno singlete

A = Amarillo

$A_{(\text{DPPH})}$ = absorbancia de la solución de DPPH con el extracto o fracción de tegumento de maní.

$A_{(\text{muestra})}$ = absorbancia de la reacción con el extracto o fracción de tegumento de maní.

$A_{0(\text{DPPH})}$ = absorbancia de la solución de DPPH.

$A_{b(\text{control})}$ = absorbancia de la reacción.

$A_{b(\text{DPPH})}$ = absorbancia de metanol con el extracto o fracción de tegumento de maní.

AC = Análisis de Conglomerados

AC = Agar Cetrimide

ACP = Análisis de Componentes Principales

AG = Ácidos grasos

AMH = Agar Mueller - Hilton

AMS = Agar Manitol Salado

ATCC = American Type Culture Collection

ATT = Acidez total titulable

AV = Análisis de volátiles de oxidación

BA = Blanchado Acuoso

BAE = Blanchado Acetato de Etilo

BC = Blanchado Crudo

BHA = Butil-hidroxianisol

BHT = Butil-hidroxitolueno

CAA = Código alimentario argentino

CBM = Concentración Bactericida Mínima

CIM = Concentración Inhibitoria Mínima

CMC = Carboximetil celulosa

CMH = Caldo Mueller – Hilton

CP = Componentes Principales

CTS = Caldo Tripticasa Soya

CTS = Agar Tripticasa Soya

Da = dalton

DPPH = radical 2,2-difenyl-1-picrilhidrazil

EAG = Equivalente Acido Gálico

EDE = Energía de disociación del enlace

EDTA = Etilen diamino tetra acético

EDTA = Ácido etilen-diamino-tetra acético

EE = Error estándar

EMAG = Esteres metílicos de ácidos grasos

EMB = Agar de Levine con Eosina Azul de Metileno

EQ = Equivalente Quercetina

ERO = Especies Reactivas al Oxígeno

F-C = Follin-Ciocalteau

FDA = Food and Drug Administration

Fe²⁺ = Ion ferroso

g/L = gramos/litro

g = gramos

GC = Cromatógrafo de gases

GC-MS = Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa

GRAS = Generally Recognized As Safe

H₂O₂ = Peróxido de hidrógeno

HCl = ácido clorhídrico

HP = Hidroperóxidos

HPLC = Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

hs = horas

IC₅₀ = concentración inhibitoria 50%

L/min = litro/minuto

LDL = lipoproteínas de baja densidad

m/z = relación masa/carga

M = Marrón

M = molar

MC = Microcápsula control

MCBAE = Microcápsula suplementada con la fracción BAE

MEFS = Micro-extracción en fase sólida

meq O₂ / kg = mili equivalente de oxígeno / kilogramo

mg/g = miligramo/gramo

mg/g = miligramo/gramo

MGLM = Modelos generalizados, lineales y mixtos

min = minuto

mL = mililitro

mL/min = mililitro/minuto

mm = milímetro

mM = milimolar

MOA = Manufacturas de Origen Agropecuario

MRSA = estafilococo resistente a la Meticilina

MS = Masa

N° = número

NBT = Cloruro de nitroazul de tretazolio

nc = no cuantificado

nd = no detectado

nm = nanómetro

O₂ = Anión superóxido

OH⁻ = Radical hidroxilo

p/p = porcentaje peso/peso

p/v = porcentaje peso/volumen

PDA = Agar Dextrosa

PG = Propil galato

PI = potencial de ionización

PICM = Porcentaje de Inhibición del Crecimiento del Micelio

R[•] = radicales libres

ROO[•] = radical peróxido

ROOH = hidroperóxido

TA = Tostado Acuoso

TAE = Tostado Acetato de Etilo

TAH = Transferencia de átomos de hidrogeno

TBHQ = Terbutil-hidroxiquinona

TC = Tostado Crudo

TES = Transferencia de un electrón simple

TG = Triglicéridos

U/mL = Unidades/mililitro

UFC = Unidades Formadoras de Colonias

UV = Ultravioleta

v/v = porcentaje volumen/volumen

V = Violeta

CAPITULO I

INTRODUCCION GENERAL

EL MANÍ

El maní (*Arachis hypogaea L.*) es uno de los principales cultivos oleaginosos del mundo. Es una importante fuente de proteína alimentaria en muchos países del mundo (Gaafar *et al.*, 2015).

Argentina es uno de los mayores productores y exportadores de maní junto con India, China, Nigeria y Estados Unidos. La Unión Europea es uno de los principales consumidores de maní, con un consumo per cápita de 5 kg/año (USDA, 2015).

La producción argentina de maní se destina principalmente a la exportación. La provincia de Córdoba produce cerca del 90% del total nacional, seguido de las provincias de San Luis y La Pampa y algunas producciones marginales en departamentos de Salta y Jujuy. La siembra para la campaña 2014 / 2015 fue de 425.628 hectáreas, con una cosecha de 1.011 millones de toneladas (Blengino, 2015). Del total producido en el país, aproximadamente un 15% se destina a la industria, un 80% a la exportación, un 2% para semillas y otros usos y un 3% para acumulación de stocks (**Figura 1.1**) (Blengino, 2015).

El maní producido tiene distintos destinos; luego de la cosecha se lo traslada a las plantas seleccionadoras, donde se obtienen principalmente dos categorías de maní: el maní *confitería* y el *industria*. El maní confitería es un producto clasificado dentro de las MOA (Manufacturas de Origen Agropecuario) y su principal destino es la elaboración de snacks y confituras. El maní confitería en su mayoría se exporta como tal o como *maní blanchado*, otra parte se utiliza para producir maní partido, pasta de maní, maní tostado, etc. (Blengino, 2015).

El *maní blanchado* es un producto que deriva de la eliminación del tegumento. De esta manera se obtiene un grano pelado que se utiliza con diversos fines industriales, como por ejemplo para elaborar maní frito salado, maní tostado, grana de maní, pasta y manteca de maní, etc. Como residuo del procesamiento del blanchado queda un 3% que corresponde al tegumento del grano del maní. Actualmente este residuo es destinado para la alimentación de ganado a pesar de su alto contenido en compuestos activos que incluyen flavonoides,

ácidos fenólicos, fitosteroles, alcaloides, y estilbenos (Nepote *et al.*, 2002; 2004). Por su parte, numerosos autores han publicado efectos terapéuticos derivados de la utilización de extractos polifenólicos obtenidos del tegumento de maní, como antioxidante, antibacteriano, antifúngico e antiinflamatorio (O'Keefe y Wang, 2006; Pizzolitto *et al.*, 2013; Oldoni *et al.*, 2016).



Figura 1.1. Estructura de la cadena de productiva del maní (Blengino, 2015).

OXIDACIÓN DE LÍPIDOS

La oxidación lipídica es una causa importante en la pérdida de calidad de los productos alimenticios. La industria alimentaria presta mucha atención a este proceso de degradación ya que los productos formados influyen directamente en el sabor y el valor nutricional de los alimentos y, algunos, pueden generar efectos perjudiciales para la salud humana (Shahidi y Zhong, 2007).

La oxidación lipídica puede ocurrir a través de tres mecanismos principales: auto-oxidación, oxidación fotosensible y oxidación catalizada por enzimas.

AUTO-OXIDACIÓN

El proceso de auto-oxidación es de suma importancia cuando se trata de productos alimenticios. La auto-oxidación es una reacción en cadena mediada por radicales libres en la cual los ácidos grasos insaturados son atacados por el oxígeno molecular para formar radicales libres y una serie de otros productos de oxidación que afectan severamente el sabor, la textura, la seguridad y la calidad nutricional de los alimentos. La auto-oxidación se produce en tres etapas: *iniciación* (formación de radicales libres), *propagación* (reacción en cadena de los radicales libres) y *terminación* (formación de especies no radicales) (**Figura 1.2**) Ballard (2008).

Iniciación

La *iniciación* está marcada por la formación de radicales libres a través de la abstracción de un átomo de hidrógeno causado por un agente oxidante (metales de transición, oxígeno singlete y radicales libres). La abstracción de un átomo de hidrógeno desde un ácido graso insaturado conduce a la formación de radicales libres (R^{\bullet}) que reaccionan rápidamente con el oxígeno molecular para formar un radical peróxido (ROO^{\bullet}).

Propagación

La *propagación* implica una rápida aceleración de la reacción en cadena iniciada en la iniciación. Durante la propagación, los ROO^{\bullet} pueden atacar a otro ácido graso insaturado y formar un hidroperóxido ($ROOH$) y nuevos R^{\bullet} . Los $ROOH$ son productos primarios de la oxidación altamente inestables, pero no contribuyen por sí mismos a los sabores y olores indeseables comúnmente asociados con los alimentos rancios. Sin embargo, debido a su

inestabilidad, los ROOH continúan su reacción en cadena y son nuevamente degradados en productos secundarios, tales como aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes. Son estos productos secundarios los responsables del olor y sabor desagradable desarrollado en los alimentos oxidados.

Terminación

La *terminación* es la etapa en la cual los radicales libres comienzan a unirse entre sí para formar especies más estables, no radicales, completando así un ciclo de oxidación de lípidos. Sin embargo, puede haber reiniciación haciendo que el ciclo se repita.

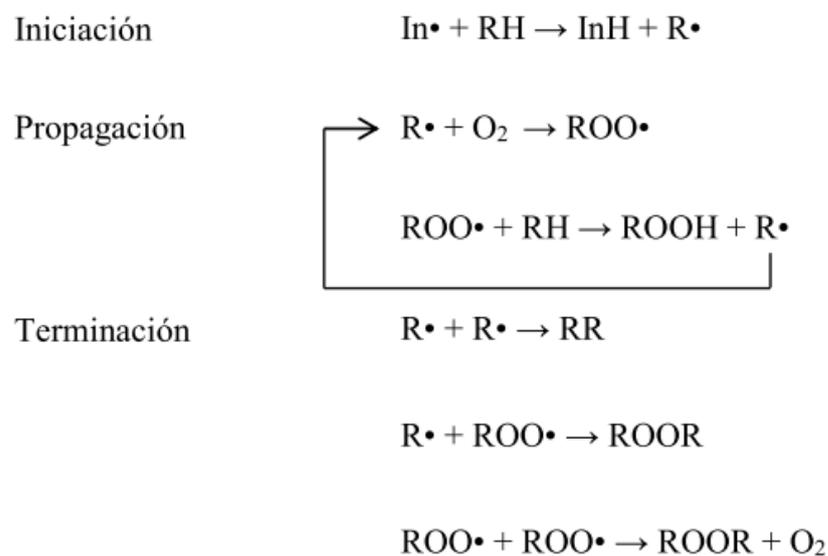


Figura 1.2. Mecanismo de auto-oxidación.

OXIDACIÓN FOTOSENSIBLE

La foto-oxidación es un proceso por el cual la oxidación ocurre por la acción de un agente fotosensibilizante en presencia de luz. Los fotosensibilizadores más comunes en los alimentos incluyen colorantes, clorofila y riboflavina. Durante la foto-oxidación un fotosensibilizador absorbe la luz ultravioleta y llega a un estado excitado. El fotosensibilizador excitado es capaz de transferir esa energía a un átomo basal de oxígeno formando, de este modo, una especie altamente reactiva del oxígeno: el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$). Este oxígeno puede atacar directamente los ácidos grasos insaturados haciendo que la foto-oxidación ocurra a un ritmo mucho más rápido que la auto-oxidación (Zeb, 2015). La

preferencia de los consumidores por envases transparentes para conservar los alimentos crea las condiciones ideales para la exposición de los mismos a la luz, de esta manera se aumenta la probabilidad de daño oxidativo (Vandamme *et al.*, 2015).

OXIDACIÓN ENZIMÁTICA

La oxidación de lípidos también puede ocurrir por enzimas que catalizan las reacciones que conducen a la generación de radicales libres. El radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son los responsables de la oxidación en este tipo de reacciones enzimáticas. Por ejemplo, la enzima superóxido dismutasa cataliza una reacción que transforma el $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y O_2 . En la reacción de Fenton, los iones metálicos tales como el hierro, reaccionan con el H_2O_2 para formar el radical hidroxilo altamente reactivo ($\cdot OH$). El $\cdot OH$ puede atacar directamente al doble enlace de los lípidos para iniciar el proceso de oxidación (Amiot *et al.*, 1992; Hollman *et al.*, 2011).

LOS ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son ampliamente utilizados en la industria alimentaria como aditivos y conservantes para proporcionar protección contra la degradación oxidativa de los alimentos provocada por la acción de los radicales libres. Desde la antigüedad, diferentes especias se han incorporado a los alimentos para mejorar su sabor y conservarlos por más tiempo, y con ello aumentar las propiedades antioxidantes (Wu *et al.*, 2009).

La creciente demanda actual de alimentos procesados o semi-procesados ha llevado a un rápido crecimiento de productos *listos para el consumo*. Muchos de los ingredientes presentes en estos tipos de productos contienen ácidos grasos insaturados susceptibles a la oxidación, especialmente bajo condiciones de estrés oxidativo. Con el objetivo de prolongar la vida útil de los alimentos se emplean antioxidantes sintéticos como el butil-hidroxitolueno (BHT), butil-hidroxianisol (BHA), terbutil-hidroquinona (TBHQ), propil galato (PG) y agentes quelantes que se unen a los metales presentes como el ácido etilen-diamino-tetra acético (EDTA). Dichos compuestos, de origen sintético, pueden resultar tóxicos tanto para el organismo como para el medio ambiente (Mielnik *et al.*, 2003).

Por lo tanto, el desarrollo y obtención de aditivos de origen natural es una alternativa innovadora para conservar los alimentos, incorporar ingredientes bioactivos y generar un alimento funcional (Chemat *et al.*, 2015). Vitaminas (ácido ascórbico y α -tocoferol), hierbas

y especias (romero, tomillo, orégano, salvia, albahaca, pimienta, clavo de olor, canela y nuez moscada) y extractos de plantas (té y uva) contienen compuestos antioxidantes que pueden captar eficazmente los radicales libres y quelar metales de transición para retrasar el daño oxidativo y, por consiguiente, reducir los malos olores y sabores extraños (Brewer, 2011).

Un *antioxidante* se define como una sustancia que, presente en bajas concentraciones en comparación con la concentración de un sustrato oxidable, retrasa significativamente o previene la oxidación de dicho sustrato (Brewer, 2011). Ballard (2008) establece que un antioxidante eficaz debe:

- a) competir eficazmente con la especie oxidante;
- b) poder ser reparado fácilmente por el sistema biológico. Es decir, deber ser estable ya que, si el antioxidante se destruye en cada encuentro con las especies oxidantes, el sustrato alcanzará rápidamente un estado en el que ya no estará protegido por el antioxidante;
- c) encontrarse en el mismo microambiente que las especies oxidantes;
- d) ser poco reactivo con el sustrato y no alterar sus características propias. Los productos no deben ser tóxicos para el sistema y no deben formar parte en la reacción;
- e) resistir el procesado de los alimentos y ser de un costo aceptable.

Los antioxidantes, naturales o sintéticos, difieren en su eficacia cuando son incorporados en los alimentos en función de sus características químicas y en la ubicación física dentro del mismo (proximidad a los fosfolípidos, interfaces de emulsión o en la fase acuosa) (Brewer, 2011). Por ejemplo, los antioxidantes naturales presentan afinidades complejas en las interfaces aire-aceite y aceite-agua que afectan significativamente su actividad en los alimentos. Los antioxidantes *polares* son muy eficientes cuando son incorporados en alimentos altamente lipídicos o aceites, ya que tienden a acumularse en la interface aire-aceite. Esta ubicación, donde la concentración de oxígeno es muy alta, permite que las reacciones posteriores de oxidación sean mayores. Por el contrario, los antioxidantes *no polares* presentan mayor actividad en emulsiones, ya que se ubican en las gotas de aceite y pueden acumularse en la interface aceite-agua donde ocurre la interacción entre los hidroperóxidos y los pro-oxidantes de la fase acuosa (Ballard, 2008).

ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

Los antioxidantes sintéticos más populares son compuestos fenólicos como el BHT, BHA, TBHQ y el PG (**Figura 1.3**). Estos antioxidantes sintéticos son comúnmente utilizados para aplicaciones farmacológicas y alimentarias.

El Código Alimentario Argentino (CAA) establece un límite máximo en la incorporación de estos antioxidantes sintéticos a los alimentos del 0,02% (CAA 2014). En Estados Unidos, por ejemplo, el uso de estos antioxidantes sintéticos está regulado por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, Food and Drug Administration) y se pueden utilizar solos o combinados siempre y cuando no se exceda el 0,02% (2 ppm) del producto final en alimentos como carne de vaca, aves, huevos y sus derivados, entre otros (Brewer, 2011).

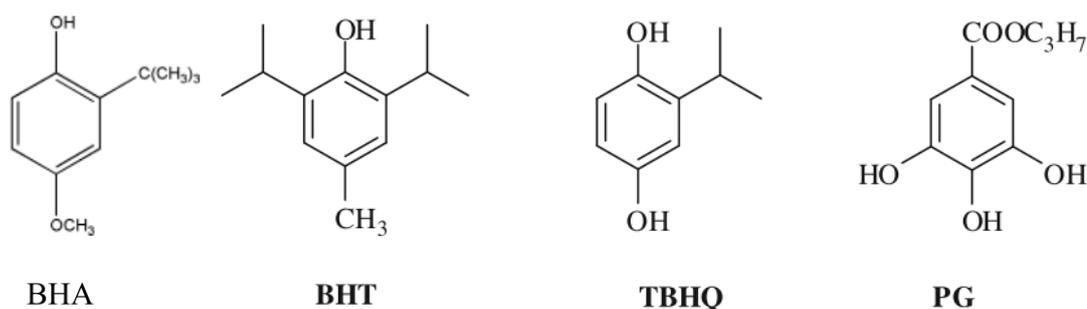


Figura 1.3. Antioxidantes sintéticos utilizados en la industria alimentaria.

El antioxidante más adecuado para su uso en aceites vegetales es el TBHQ. El BHA y BHT son bastante estables al calor y se utilizan para estabilizar grasas en productos horneados y fritos. El PG presenta la desventaja de ser sensible a altas temperaturas y de formar coloraciones oscuras cuando se une a los iones de hierro (Gülçin, 2012).

Actualmente los antioxidantes sintéticos están siendo ampliamente estudiados desde el punto de vista toxicológico lo que impone una cierta precaución en su uso como conservantes en los alimentos (Chen *et al.*, 1992; Sfahlan *et al.*, 2009). En este contexto, los productos naturales aparecen como una alternativa más saludable y segura que los antioxidantes sintéticos (**Tabla 1.1**).

ANTIOXIDANTES NATURALES

En los últimos años muchas investigaciones se han centrado en la identificación de fuentes de antioxidantes naturales que puedan ser utilizados para sustituir a sus equivalentes sintéticos. Los antioxidantes naturales se consideran seguros para los consumidores debido a que se encuentran naturalmente en materiales vegetales y se han utilizado durante siglos por el hombre (Kmiecik *et al.*, 2015).

Aunque los compuestos sintéticos siguen siendo los antioxidantes más elegidos en la industria alimentaria, existen numerosos antioxidantes naturales como los tocoferoles (vitamina E y sus derivados) y extractos de hierbas y especias como el romero, salvia, tomillo y orégano que han demostrado ser altamente eficientes como agentes antioxidantes y antimicrobianos y están siendo utilizados por la industria (Larrauri *et al.*, 2013; Asensio *et al.*, 2014; Quiroga *et al.*, 2014; Olmedo *et al.*, 2015). Muchos extractos, oleorresinas y aceites esenciales de numerosas plantas y especias son reconocidos mundialmente como alimentos GRAS (GRAS, Generally Recognized As Safe) que pueden ser usados para aromatizar y conservar alimentos debido a su efecto no tóxico en el organismo (Prakash *et al.*, 2015).

Los antioxidantes naturales no sólo reducen la oxidación y degradación de los alimentos, sino que también se ha demostrado que su consumo desempeña un papel importante en la prevención de una serie de enfermedades crónicas tales como enfermedades cardíacas, distintos tipos de cáncer y enfermedades neurológicas como el Alzheimer y el Parkinson (Chu *et al.*, 2002; Youdim *et al.*, 2002).

Tabla 1.1. Ventajas y desventajas de los antioxidantes sintéticos y naturales utilizados en los alimentos (Gülçin, 2012).

Antioxidantes Sintéticos	Antioxidantes Naturales
<i>Económicos.</i>	<i>Costosos.</i>
<i>Ampliamente utilizados.</i>	<i>Uso restringido a determinados alimentos.</i>
<i>Mediana y alta actividad antioxidante.</i>	<i>Amplio rango de actividad antioxidante.</i>
<i>Creciente preocupación por su seguridad.</i>	<i>Consideradas sustancias inocuas.</i>
<i>Prohibición de algunos compuestos.</i>	<i>Aumento del uso y expansión de las posibles aplicaciones.</i>
<i>Baja solubilidad en agua.</i>	<i>Amplia gama de solubilidades.</i>
<i>Poco interés en las investigaciones.</i>	<i>Alto interés en las investigaciones.</i>
<i>Algunos compuestos se almacenan en el tejido adiposo.</i>	<i>Completamente metabolizables.</i>

COMPUESTOS FENÓLICOS

La actividad antioxidante de muchos compuestos naturales se atribuye a la presencia de polifenoles en los tejidos de las plantas siendo importantes para el crecimiento y desarrollo de las mismas al proporcionar un mecanismo de defensa contra las infecciones y lesiones. Los polifenoles están presentes en una amplia variedad de vegetales, tales como en semillas de oleaginosas, cereales, hortalizas, hojas, raíces, especias y hierbas y bebidas como el té y el vino (Chandrasekara *et al.*, 2012).

Shan *et al.* (2005) dividen a los antioxidantes fenólicos vegetales en cuatro grupos: (i) ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido caféico, ácido cumárico); (ii) flavonoides (quercetina y catequina); (iii) estilbenos (resveratrol); y (iv) aceites volátiles (eugenol, carvacrol, timol y mentol).

Los **ácidos fenólicos** actúan generalmente como antioxidantes que capturan radicales libres (**Figura 1.4**). Estos compuestos tienen la capacidad de donar electrones, lo que estaría relacionado con el retraso en rancidez de los sustratos (Medina *et al.*, 2007).

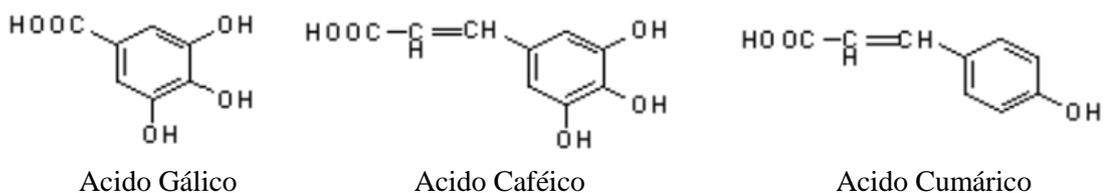


Figura 1.4. Ácidos Fenólicos

Los *flavonoides* constituyen la clase más grande de compuestos polifenólicos y se pueden dividir en varias subclases incluyendo flavanoles (catequina y galato-catequina), flavanonas, flavonas (luteolina), antocianidinas y flavonoles (quercetina, miricetina, kaempferol). La característica común de los flavonoides es la estructura básica flavan15-carbono (**Figura 1.5**). Estos átomos de carbono están dispuestos en tres anillos (A, B y C) y las diferentes clases de flavonoides difieren en el nivel de saturación del anillo C. Asimismo, los compuestos individuales dentro de cada clase difieren en el patrón de sustitución de los anillos A y B que influyen en la estabilidad del radical fenoxilo y, por consiguiente, en las propiedades antioxidantes de las sustancias (Cai *et al.*, 2004).

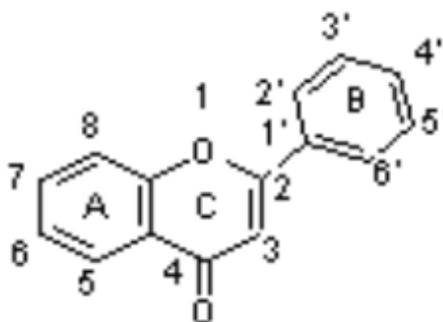


Figura 1.5. Estructura básica de los flavonoides.

El potencial de los compuestos fenólicos para captar radicales libres depende del número y posición relativa de los grupos -OH libres presentes en la molécula. Asimismo, la fuerza de enlace del hidrógeno juega un papel importante en la actividad antioxidante de los mismos. El patrón de sustitución del anillo B es especialmente importante para la capacidad de estabilización de radicales libres en los flavonoles como la quercetina. Los flavonoides con varios grupos hidroxilos son los antioxidantes más eficaces. Los flavonoides, además, pueden actuar como agentes quelantes de metales de transición (Fe^{2+} , Cu^{2+}) mediante la

disposición espacial de sus grupos funcionales con átomos capaces de formar enlaces de coordinación con los metales, haciéndolos menos oxidativos (Shan *et al.*, 2005).

Muchos de los flavonoides son pigmentos y se localizan naturalmente en los cloroplastos de las células vegetales desempeñando un papel foto protector frente al $\cdot\text{O}_2$ (Brewer, 2011).

Las antocianinas son glucósidos polihidroxi o polimetoxi derivados del catión flavilio. La hidrólisis de las mismas produce una aglicona, las antocianidinas. Antocianinas y antocianidinas presentan la misma coloración debido a la extrema movilidad de los electrones dentro de la estructura molecular (dobles enlaces) en respuesta a la luz del espectro visible (400 a 700 nm). Estos pigmentos son bastante solubles en agua y los cuatro grupos -OH están unidos a los anillos aromáticos. El pH influye significativamente sobre los pigmentos de las antocianinas. Los grupos -OH pueden donar un H^+ o un H^\bullet (en condiciones ácidas) a los lípidos para protegerlos de la oxidación (Gris *et al.*, 2011).

Las proantocianidinas también contienen múltiples grupos -OH que pueden donar moléculas de hidrógeno y quelar metales. La capacidad de capturar radicales libres aumenta a medida que el número de -OH fenólicos es mayor. Algunos fenoles pueden polimerizarse a polifenoles y unirse a diferentes minerales. Las proantocianidinas se pueden producir como oligómeros o polímeros de flavonoides monoméricos; polihidroxi flavan-3-oles como la catequina y epicatequina (Xia *et al.*, 2013).

Las procianidinas poliméricas son mejores antioxidantes que los monómeros correspondientes, catequina y epicatequina. Estos compuestos se pueden combinar para formar ésteres, tales como catequina / epicatequina galato, o unirse con azúcares y proteínas para formar glicósidos y proteínas polifenólicas. La glicosilación de flavonoides en el grupo 3 -OH generalmente disminuye la actividad antioxidante debido a la reducción del número de grupos fenólicos. Las proantocianidinas que se encuentran en diferentes frutas (manzanas, cerezas, frambuesas, moras, frutillas); en hojas (té) y semillas (uva, sorgo, soja) han demostrado una alta actividad antioxidante con potenciales efectos terapéuticos (Brannan, 2008; Bak *et al.*, 2010; Gris *et al.*, 2011).

El *resveratrol* (*trans*-3,5,4'-tri-hidroxiestilbeno) se ha identificado como el mayor estilbeno activo dentro de las fitoalexinas. El resveratrol se encuentra presente en los

materiales biológicos como isómeros *trans* y *cis* y en un amplio rango de concentraciones (**Figura 1.6**) (Careri *et al.*, 2003).

El resveratrol se detectó por primera vez en *Vitis vinífera* donde se acumula en las hojas como respuesta de defensa de la planta frente a una lesión mecánica, a la exposición a la luz UV, al cloruro de aluminio o al ataque de hongos, principalmente *Botrytis cinerea* y *Plasmospora vitícola* (Kolouchová-Hanzlíková *et al.*, 2004).

El creciente interés en el estudio del resveratrol presente en el vino surgió cuando estudios epidemiológicos encontraron una correlación inversa entre el consumo de vino tinto y la incidencia de enfermedades cardiovasculares, fue la llamada la *paradoja francesa* (Renaud *et al.*, 2004).

El resveratrol presenta propiedades antibacterianas y antifúngicas en los alimentos, induce a la hipo-agregación de plaquetas en ratas; protege al hígado de la peroxidación lipídica, inhibe la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) modulando su metabolismo y muestra efectos protectores contra las enfermedades cardiovasculares (Kolouchová-Hanzlíková *et al.*, 2004). Los isómeros *trans* y *cis* presentan potencial actividad contra el cáncer por inhibir a la proteína tirosina quinasa.

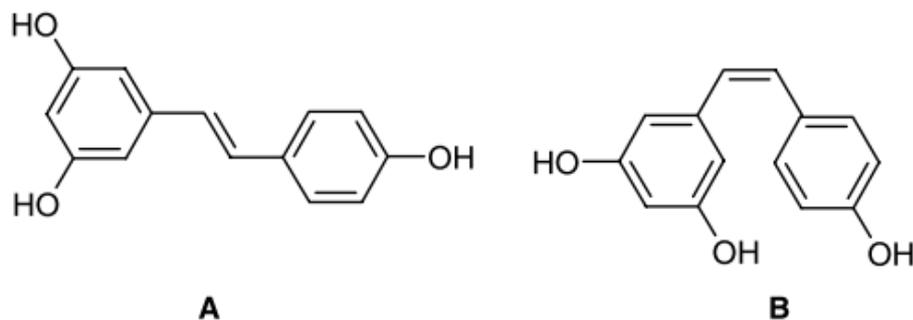


Figura 1.6. Estructura química del resveratrol. **A.** *trans*-resveratrol; **B.** *cis*-resveratrol

COMPUESTOS FENÓLICOS Y LA SALUD

La capacidad de utilizar el oxígeno ha proporcionado a los seres humanos el beneficio de poder metabolizar grasas, proteínas y carbohidratos para obtener energía. El oxígeno es un átomo altamente reactivo que es capaz de convertir a moléculas que son potencialmente perjudiciales llamadas *radicales libres*. Los radicales libres son capaces de atacar las células sanas del cuerpo haciendo que pierdan su estructura y función. El daño celular causado por los radicales libres contribuye al envejecimiento celular y a enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas, declinación del sistema inmunológico, disfunción cerebral, entre otras (Lobo *et al.*, 2010).

Los radicales libres son estructuras químicas que tienen un electrón desapareado, por lo que buscan y capturan electrones de otras sustancias con el fin de neutralizarse a sí mismos. Aunque en el ataque inicial, el radical libre puede ser neutralizado, se forman nuevos radicales libres durante el proceso, generando una reacción en cadena. Afortunadamente, la formación de radicales libres se puede controlar de manera natural por medio de los antioxidantes. Cuando la disponibilidad de antioxidantes es limitada, se genera el daño u estrés oxidativo (Percival, 1998).

El *estrés oxidativo* se puede definir como una alteración en el equilibrio prooxidante-antioxidante, dando lugar a un daño potencial (Ballard, 2008). Reductor y oxidante son términos químicos, mientras que antioxidante y pro-oxidante tienen significado en el contexto de un sistema biológico. Un *pro-oxidante* es una sustancia tóxica que puede causar daño oxidativo a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que resulta en varios eventos y/o enfermedades patológicas. Pro-oxidante es sinónimo de *especie reactiva*. Por lo tanto, un pro-oxidante es un oxidante de importancia patológica. Un antioxidante puede reducir eficazmente a un pro-oxidante, y sus productos, para que presenten una baja o nula toxicidad en el organismo (Prior y Cao, 1999).

El concepto “*especies reactivas de oxígeno*” (EROS) abarca todas las moléculas que contienen oxígeno altamente reactivo, incluyendo los radicales libres. Los distintos tipos de EROS incluyen: radical hidroxilo, radical anión superóxido, peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete, radical óxido nítrico, peróxido de hidrógeno, peróxidos de lípidos, entre otros. Estas moléculas son capaces de reaccionar con los lípidos de las membranas, ácidos nucleicos,

proteínas y enzimas, y otras moléculas pequeñas, lo que resulta en el daño celular. Las EROS se generan por una serie de vías: i) como consecuencia del metabolismo aeróbico normal: aproximadamente 90% del oxígeno utilizado por la célula es consumida por el sistema de transporte electrónico mitocondrial; ii) por la fagocitosis (linfocitos de la sangre) como parte del mecanismo por el cual bacterias y virus son atacados por los linfocitos y las proteínas extrañas (antígenos) se desnaturalizan; iii) por el metabolismo de xenobióticos, es decir, por la desintoxicación de sustancias tóxicas (Percival, 1998).

El *estrés oxidativo* se considera un precursor para el desarrollo de algunas enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardíacas, Alzheimer y Parkinson. Algunos flavonoides (resveratrol, quercetina, antocianinas y catequinas) han sido ampliamente estudiados por su potencial en la prevención de diversas enfermedades. Actúan como eliminadores de las ERO, evitando así el daño oxidativo a macromoléculas como ADN, proteínas y lípidos (Scalbert *et al.*, 2002; Zondag y Anderson, 2003; Bansode *et al.*, 2012; Quiñones *et al.*, 2012; Rangel-Huerta *et al.*, 2015).

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox como resultado de diversos mecanismos: capacidad para atrapar radicales libres, para quelar metales de transición y/o para extinguir al oxígeno singlete. También juegan un papel importante en la estabilización de la peroxidación lipídica y pueden inhibir diversos tipos de enzimas oxidantes. Todos estos múltiples mecanismos de acción antioxidante hacen de los compuestos fenólicos un objetivo interesante en la búsqueda de fitoquímicos beneficiosos para la salud, y también ofrecen la posibilidad de utilizar dichos compuestos, y sus extractos ricos en ellos, para extender la vida útil de aceites y/o alimentos ricos en lípidos (Shan *et al.*, 2005).

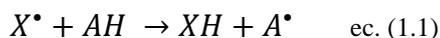
En las últimas décadas se han desarrollado diferentes métodos para evaluar la actividad y capacidad antioxidante de diferentes compuestos en los alimentos. Un método estandarizado de medición debe cumplir con los siguientes requisitos: (i) contar con una fuente de radicales biológicos que sea relevante; (ii) ser simple; (iii) contar con un mecanismo químico y un punto final de la reacción bien definido; (iv) presentar una alta reproducibilidad entre muestras de la misma serie y en el tiempo; (v) adaptarse a diferentes tipos de antioxidantes (hidrófilos y lipófilos) y usar diferentes fuentes de radicales libres; y

(vi) adaptarse a los análisis de rutina en el control de calidad de los alimentos (Prior *et al.*, 2005).

Los antioxidantes pueden desactivar los radicales libres por dos mecanismos principales: **TAH** (transferencia de átomos de hidrogeno) y **TES** (transferencia de electrones). Independientemente del mecanismo involucrado, el resultado final es el mismo, sólo que difieren en la cinética y el potencial de las reacciones secundarias. Los mecanismos TAH y TES pueden ocurrir simultáneamente y el mecanismo dominante en el sistema estará determinado por las propiedades y la estructura química del antioxidante, la solubilidad y por el coeficiente de partición. Asimismo, la energía de disociación del enlace (EDE) y el potencial de ionización (PI) son los dos factores principales que determinan el mecanismo y la eficacia de los antioxidantes (Ballard, 2008).

METODOS TAH

Los métodos basados en **TAH** miden la capacidad de un antioxidante para eliminar los radicales libres por la transferencia de átomos de hidrógeno (AH = cualquier donante H)



Este tipo de reacciones se consideran las más relevantes y en las que normalmente actúan los antioxidantes (Prior *et al.*, 2005).

El principal método antioxidante que emplea el mecanismo TAH es el ORAC (oxygen radical absorbance capacity)

ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

El ORAC mide la inhibición de los antioxidantes a las oxidaciones inducidas por los radicales peróxidos, por lo tanto, refleja la actividad antioxidante clásica por transferencia de átomos de H. Los valores ORAC generalmente se reportan como equivalentes de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox). El ensayo ORAC proporciona una fuente controlable de radicales peróxidos que modelan las reacciones de los antioxidantes con los lípidos, tanto en los alimentos como en sistemas fisiológicos (Shahidi y Zhong, 2007).

MÉTODOS *TES*

Los métodos basados en *TES* miden la capacidad potencial de un antioxidante para transferir un electrón y reducir un compuesto (metales, carbonilos y radicales). El oxidante cambia de color cuando se reduce y el grado de cambio de color se correlaciona con la concentración del antioxidante presente en la muestra (Prior *et al.*, 2005).

Los principales métodos antioxidantes que emplean el mecanismo *TES* son la actividad secuestrante de radicales libres por DPPH, el método Folin-Ciocalteu para medir contenido de fenoles totales, la actividad quelante de ión ferroso, la capacidad de capturar radicales hidroxilos, la actividad secuestrante del anión superóxido, entre otros.

ACTIVIDAD SECUESTRANTE DE RADICALES LIBRES MEDIANTE EL USO DEL RADICAL LIBRE DPPH

El radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) es uno de los pocos radicales orgánicos estables de color violeta oscuro. La capacidad antioxidante se evalúa mediante la medición, por espectrofotometría visible a 517 nm, de la pérdida de color del radical DPPH[•] luego de la reacción con un antioxidante (AH). Ante un sustrato capaz de donar átomos de hidrógenos, como un antioxidante, los radicales DPPH[•] se convierten en moléculas no radicalarias, lo que va acompañado de disminución de la absorbancia del cromóforo formado.



Los resultados se pueden expresar como porcentaje de inhibición o actividad anti-radicalaria (%RSA) o como Concentración Inhibitoria 50 (IC₅₀) que corresponde a la concentración del antioxidante necesario para reducir la concentración inicial del radical DPPH[•] al 50% en un período de tiempo determinado. Un valor bajo de IC₅₀ representa una mayor actividad secuestrante del radical DPPH[•] (Molyneux, 2004).

FENOLES TOTALES: MÉTODO FOLIN-CIOCALTEAU (F-C)

El método F-C ha sido durante muchos años utilizado para cuantificar los fenoles totales presentes en extractos naturales. Sin embargo, existen controversias sobre su especificidad, es decir, si mide sólo fenoles, o fenoles más agentes reductores como metales. El mecanismo básico es una reacción de óxido-reducción por lo que se considera un método antioxidante.

El método F-C es preciso, sencillo y sensible. Sin embargo, la reacción es lenta a pH ácido y, según se mencionó, podría carecer de especificidad (Charles, 2013).

ACTIVIDAD QUELANTE DEL ION FERROSO

Los agentes quelantes pueden estabilizar los metales de transición y reducir su disponibilidad como catalizadores para inhibir la producción de los primeros radicales libres y, por consiguiente, suprimir la peroxidación lipídica tanto en los alimentos como en los sistemas biológicos (Su *et al.*, 2007).

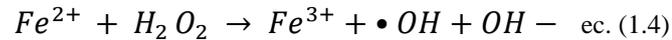
El ensayo para determinar la actividad quelante del ion ferroso (Fe^{2+}) se basa en la quelación del mismo con 2,2'-bipiridilo para producir un complejo de color rojo. En presencia de agentes quelantes (antioxidantes), la formación del complejo se interrumpe y el color rojo, disminuye (Sanchez-Vioque *et al.*, 2012).

Las ventajas de este método son su simpleza y la posibilidad de procesar muchas muestras en un corto período de tiempo (Charles, 2013).

CAPACIDAD DE CAPTURA DE RADICALES HIDROXILOS

El radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) es uno de los oxidantes más activos. Cuando el $\cdot\text{OH}$ se genera en exceso y las defensas celulares son deficientes, los radicales libres generan reacciones en cadena y afectan proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que dañan a las células. Los sistemas vivos presentan complejos enzimáticos con actividad antioxidante (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasas) que pueden bloquear la liberación del $\cdot\text{OH}$ e inhibir reacciones de propagación. Asimismo, son muy importantes los complejos no-enzimáticos como los antioxidantes (Valentao *et al.*, 2002; Charles, 2013).

El radical $\cdot\text{OH}$ es generado por la reacción de Fenton:



ACTIVIDAD SECUESTRANTE DEL ANION SUPEROXIDO

El anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) es un oxidante relativamente débil producido por reacciones enzimáticas de auto-oxidación y por transferencias de electrones de reacciones no enzimáticas generando oxígeno molecular univalente. Se forma en los primeros estadios de oxidación y luego se puede descomponer y formar especies oxidantes más fuertes, tales como H_2O_2 y $\cdot\text{OH}$. Por lo tanto, la actividad secuestrante del $\text{O}_2^{\cdot-}$ se convierte en uno de los métodos más importantes en el proceso de eliminación de radicales libres por parte de los antioxidantes (Li *et al.*, 2012).

Es importante destacar que la actividad de los antioxidantes en los alimentos no sólo depende de la reactividad química del mismo (eliminación de radicales libres o quelación de metales), sino también de factores relacionados a la ubicación física, la interacción con otros componentes del alimento, las condiciones ambientales de producción y almacenaje. En muchos casos, los resultados de los métodos antioxidantes *in vitro* sólo son válidos para las condiciones durante el ensayo y dichas condiciones, por lo general, no pueden ser reproducidas y aplicadas fielmente en los sistemas alimentarios. Por ejemplo, la actividad de los antioxidantes en los alimentos depende en gran medida de su capacidad para particionarse entre los lípidos y el agua. Debido a que muchos de los métodos se realizan en ausencia de lípidos, el impacto de la partición antioxidante no se evalúa, lo que posiblemente conduce a una pobre correlación entre los resultados de ensayos *in vitro* y el rendimiento real del antioxidante en el alimento (Ballard 2008).

A pesar de los inconvenientes asociados con los métodos actuales de medición de actividad antioxidante, la industria alimentaria utiliza métodos estándares muy eficientes para evaluar el deterioro oxidativo. Estos métodos de evaluación incluyen, por ejemplo, el índice de peróxidos (IP), valor de *p*-anisidina, ensayos de oxidación acelerada y el análisis sensorial. Este último sigue siendo el método más fiable para evaluar la aceptabilidad y preferencia de los productos por parte de los consumidores (Ballard 2008).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La incorporación de conservantes sintéticos es un método convencional para mejorar la seguridad alimentaria. Sin embargo, hoy en día los organismos de salud y los consumidores se encuentran cada vez más preocupados por los residuos químicos presentes en los alimentos y tienden a elegir productos naturales, saludables y seguros. La adición de compuestos fenólicos que actúan como antimicrobianos naturales se considera una buena alternativa para reducir los riesgos en la salud y las pérdidas económicas debido a contaminaciones microbiológicas y, además, ayudan a extender la vida útil de los alimentos procesados (Côté *et al.*, 2011).

Por su parte, numerosos estudios han demostrado la presencia de compuestos bioactivos en distintos residuos agroindustriales que representan un uso potencial en la industria alimenticia. Su reutilización disminuiría los riesgos ambientales causados por su eliminación y, además, proporcionaría una fuente de rentabilidad para las poblaciones que viven alrededor de las regiones industriales al adjudicarle valor agregado a los residuos (Anastasiadi *et al.*, 2012). Diferentes extractos naturales exhiben un espectro amplio de actividad antimicrobiana frente a agentes patógenos presentes en los alimentos como hongos y bacterias (Adámez *et al.*, 2012).

Diferentes tipos de residuos pueden ser utilizados como fuente de materia prima para extraer compuestos naturales con actividad antimicrobiana, como por ejemplo semillas de uva (Adámez *et al.*, 2011); bagazo de guayaba y tomate, orujos de uva, residuos vegetales derivados del repollo, remolacha y nabo (Prado Martín *et al.*, 2012); tegumento de pistacho (Bisignano *et al.*, 2013), entre otros.

ALIMENTOS FUNCIONALES

En la última década, la medicina preventiva ha experimentado un gran avance, sobre todo en los países desarrollados. La nutrición juega un papel crucial en la prevención de enfermedades crónicas. Los *alimentos funcionales* se relacionan con el concepto de consumir alimentos no sólo por su aporte nutricional necesario para la vida, sino también como fuente de bienestar físico y mental, lo que contribuye a la prevención y reducción de factores de riesgo de ciertas enfermedades y/o mejorar ciertas funciones fisiológicas (Lobo *et al.*, 2010).

Un alimento puede considerarse como funcional si demuestra que beneficia una o más funciones vitales del organismo, más allá de los nutrientes propios de ese alimento. Los efectos pueden ser: mantener o promover un estado de bienestar o salud; reducir el riesgo de un proceso patológico o una enfermedad (Lobo *et al.*, 2010).

Las plantas medicinales ofrecen una rica fuente de componentes que proporcionan beneficios para la salud. Estos componentes son conocidos como *fitoquímicos*. Los alimentos que contienen fitoquímicos son conocidos como *nutracéuticos*. El término deriva de la combinación de las palabras nutrición y farmacéutico (Dahiya, 2013). Por lo tanto, nutracéutico se define como un alimento o partes del mismo que proporciona beneficios médicos o en la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de una enfermedad. Estos incluyen a los nutrientes aislados de un alimento, suplementos dietéticos, productos naturales, hierbas, especias y productos procesados como cereales, sopas y bebidas (Dillard y Bruce, 2000).

El creciente interés en los nutracéuticos por parte de los consumidores se relaciona con estudios epidemiológicos que indican que una dieta o un componente específico de la misma se asocian con un menor riesgo de padecer una determinada enfermedad. Los principales ingredientes nutracéuticos activos en las plantas son los compuestos fenólicos y los flavonoides que actúan como potentes antioxidantes y agentes quelantes de metales, además de poseer propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, hepatoprotectoras, antitrombóticas, antivirales y anticancerígenas (Lobo *et al.*, 2010).

Los nutracéuticos, tanto de origen vegetal como animal, tienen potenciales oportunidades en la industria alimentaria para llevar a cabo nuevos alimentos que atiendan a las necesidades futuras.

Las fuentes alimentarias utilizadas como nutracéuticos son todas naturales y se pueden clasificar como: i) fibra dietética; ii) probióticos; iii) prebióticos; iv) ácidos grasos poliinsaturados; v) vitaminas; vi) polifenoles; vii) especias (Dahiya, 2013).

ANALISIS SENSORIAL DE LOS ALIMENTOS

El campo de la evaluación sensorial creció rápidamente en la segunda mitad del siglo XX, junto con la expansión de las industrias de alimentos y los productos procesados listos para el consumo. La *evaluación sensorial* se compone de un conjunto de técnicas precisas para medir la respuesta de los consumidores a los alimentos y reduce al mínimo la posible desviación por los efectos de la marca del producto que pueden influir sobre la percepción del consumidor. Por lo tanto, se trata de aislar las propiedades sensoriales de los alimentos y proporcionar información importante y útil para la industria alimenticia y científicos sobre las características sensoriales de sus productos (Lawless y Heymann, 2013).

El punto de partida para determinar la calidad de los alimentos se relaciona con las interacciones que se producen entre sus propiedades físico-químicas y los órganos receptores sensoriales de los consumidores. Estas interacciones dan lugar a experiencias sensoriales primarias que resultan básicas para percepciones más complejas de calidad y/o aceptabilidad (Cardello, 1998).

El surgimiento del comercio de los productos alimenticios y el aumento constante en la producción, inspiró a realizar pruebas sensoriales más formales. A lo largo de los años se han desarrollado pruebas sensoriales que han sido formalizadas, estructuradas y codificadas y, actualmente, se continúan generando nuevos métodos y perfeccionando los ya existentes. Las pruebas sensoriales desarrolladas en las empresas son una herramienta que permite establecer la importancia de un alimento elaborado o, incluso, su propia aceptabilidad. Es por ello que los principales usos se ubican dentro del control de calidad, el desarrollo de productos y la investigación (Carbonell-Barrachina, 2007).

LOS SENTIDOS

Toda la experiencia sensorial está mediada a través de receptores especializados asociados a una modalidad sensorial. Comúnmente se afirma que existen cinco sentidos: vista, oído, gusto, olfato y tacto, clasificación propuesta por primera vez por Aristóteles. Por su parte, para cada modalidad sensorial, existen dos dimensiones básicas: una cualitativa y otra cuantitativa. Por ejemplo, dentro del sentido del gusto se pueden experimentar las diferentes sensaciones cualitativas del salado, dulce, amargo y ácido. Asimismo, en el sentido de la vista se puede experimentar el color rojo, verde o azul. Estas sensaciones

diferentes dentro de cada modalidad son llamadas *cualidades sensoriales*. Sin embargo, también se pueden experimentar diferencias en la magnitud o intensidad de cada una de estas sensaciones. Por lo tanto, la salinidad puede ser de baja, media o alta intensidad, y las luces pueden variar desde tenues hasta brillantes. La comprensión de cómo los objetos interactúan con los órganos de los sentidos para obtener sensaciones específicas de calidad e intensidad, es la base de nuestra comprensión de cómo los factores intrínsecos de los alimentos contribuyen a la percepción del consumidor respecto a la calidad de los mismos (Cardello, 1998).

La vista

En los seres humanos, la visión juega un papel importante en la percepción de la calidad de los alimentos debido a que, muchas veces, la apariencia visual de los mismos determina si se selecciona el producto para la compra o el consumo. A nivel biofísico, la percepción visual es el resultado de la estimulación de los receptores de la retina del ojo por la radiación electromagnética. En el caso de la visión del color, hay tres receptores distintos en la retina del ojo diferencialmente sensibles al espectro de longitudes de onda: rojo, verde y azul. Las tres propiedades físicas de la luz, es decir, longitud de onda, intensidad y pureza se asocian con tres dimensiones psicológicas: tono, brillo y saturación, respectivamente. Su efecto combinado es lo que llamamos *color*. El tamaño, forma y textura de la superficie son otros atributos visuales importantes en los alimentos (Cardello, 1998).

El oído

La audición resulta de la estimulación de los receptores en la cóclea del oído por las ondas sonoras y pueden ser transmitidas a través del aire, agua, hueso o cualquier otro medio elástico. En algunos casos no se considera que la audición esté relacionada con la calidad, pero los sonidos producidos al morder y masticar un alimento tienen efectos significativos sobre la percepción de la calidad de los mismos. La amplitud, longitud de onda y pureza de las ondas sonoras corresponden a tres dimensiones psicológicas básicas: volumen, tono y timbre (Meilgaard *et al.*, 2006).

El olfato

Olor es la sensación resultante de la estimulación de los receptores en el epitelio olfativo de la nariz por compuestos transportados por el aire. Estos compuestos llegan a la superficie del receptor a través de las fosas nasales o retronasal a través de la boca. Durante la masticación de los alimentos, y otros movimientos de la mandíbula, el aire en la boca pasa a la cavidad nasal a través de la nasofaringe. Este hecho explica la confusión común del olor de una comida con su *sabor* (Cardello, 1998; Meilgaard *et al.*, 2006).

El gusto

El gusto, al igual que el olfato, es un sentido químico. El gusto resulta de la estimulación de los quimiorreceptores situados en la lengua, paladar, faringe, laringe y otras áreas de la cavidad oral. Las papilas gustativas se componen de grupos de células con quimiorreceptores. La interacción de los productos químicos con la superficie de las microvellosidades ubicadas en el extremo apical de estas células del gusto, es el evento físico que conduce a la transformación del gusto. El aspecto anatómico más estudiado del sentido del gusto es la lengua (Meilgaard *et al.*, 2006).

Actualmente existen cuatro cualidades gustativas básicas: salado, dulce, ácido y amargo. Para cada una de estas cualidades del gusto se pueden identificar un conjunto de estímulos responsables de generar estas sensaciones.

Algunos investigadores argumentan a favor de la existencia de un quinto gusto básico: el sabor *umami* y se describe como delicioso. El gusto umami está comúnmente asociado al glutamato monosódico. Otras sensaciones que se asocian a menudo con el gusto son el *picante* y la *astringencia*, aunque son sensaciones táctiles o parte del sentido químico común. Estas sensaciones son distintas al sabor y al olor y, en realidad, están asociadas al dolor y/o irritación causada por los productos químicos ingeridos cuando entran en contacto con la piel o la membrana mucosa (Cardello, 1998; Meilgaard *et al.*, 2006).

El tacto

El grupo de percepciones descritas como el sentido del tacto se pueden dividir en somestesia y cinestesia. La *somestesia* está relacionada a la percepción de la presión, el dolor y la temperatura y está mediada por receptores localizados en la piel. La *cinestesia* es la percepción de la posición y movimiento de las extremidades mediada por receptores ubicados en los músculos, tendones y articulaciones (Cardello, 1998).

La superficie sensitiva de los labios, la lengua, la cara y las manos es mayor que la que encontramos en otras áreas del cuerpo, lo que permite detectar pequeñas diferencias respecto a la textura, tamaño, temperatura y sensación en la boca de los alimentos (Meilgaard *et al.*, 2006).

ATRIBUTOS SENSORIALES

En la evaluación sensorial de los alimentos los sentidos son los instrumentos que suministran una información valiosa y específica sobre el producto que se está analizando. Las propiedades sensoriales son los atributos de los alimentos que se detectan a través de los sentidos y son: color, olor, aroma, gusto, sabor y textura (Anzaldúa-Morales, 1994).

El color

Vemos una comida antes de consumirla. Como dice el refrán: *el primer sabor es siempre con los ojos* (Zellner *et al.*, 2014).

El color es la percepción cerebral que resulta de la detección de la luz después de interactuar con un objeto. El color percibido de un objeto se ve afectado por tres características: la composición física y química del objeto, la composición espectral de la fuente de luz que ilumina el objeto, y la sensibilidad espectral del ojo del espectador.

El color de un objeto puede variar en tres dimensiones: *matiz*, esto es normalmente lo que el consumidor se refiere como el color del objeto (verde); *brillo* del objeto (la luz que impacta sobre un verde oscuro); y *saturación*, también llamada pureza o croma del color (verde puro frente a un verde grisáceo) (Lawless y Heymann, 2013).

El olor

El olor es la percepción por medio de la nariz de sustancias volátiles liberadas por los alimentos. Una característica fundamental del olor es la intensidad o potencia. Por su parte, la relación entre el olor y el tiempo es muy importante, ya que el olor es una propiedad sensorial que presenta dos atributos antagónicos: la persistencia, es decir que luego de haberse retirado la sustancia olorosa la persona continúa percibiendo el olor; y la otra característica está relacionada con la mente, ya que las personas se acostumbran a los olores después de un cierto tiempo. Esto puede impedir la percepción de otros atributos presentes en el alimento (Anzaldúa-Morales, 1994).

El aroma

El aroma es la percepción de las sustancias olorosas o aromáticas de un alimento después de haberse puesto en la boca. Dichas sustancias se disuelven en la mucosa del paladar y la faringe, y llegan a los centros sensores del olfato a través de las trompas de Eustaquio. Cuando los alimentos están en la boca, los componentes volátiles percibidos por la nariz, por vía retronasal determinan el *aroma* (Anzaldúa-Morales, 1994).

El gusto o sabor básico

El gusto hace mención sólo a las cualidades salado, dulce, ácido y amargo a partir de compuestos solubles en agua y que son detectados por la lengua (Zellner, 2013).

El sabor

Un alimento estimula muchos sentidos como la visión (el color), el olfato (olor), gusto (sabor), la textura, la temperatura, la audición (el sonido del crujir de una galleta). Las aportaciones de todos estos sentidos comprenden lo que llamamos *sabor* (Zellner, 2013).

La textura

La textura es la propiedad sensorial de los alimentos que es detectada por los sentidos del tacto, la vista y el oído y que se manifiesta cuando el alimento experimenta una deformación. Es importante destacar que no es posible referirse a *la textura de un alimento* como una única característica, sino que hay que referirse a los atributos de textura, o las características o propiedades de la textura.

La textura presenta tres tipos de atributos: mecánicos, geométricos y de composición. Los atributos *mecánicos* dan una referencia del comportamiento mecánico del alimento ante la deformación. Los atributos *geométricos* están relacionados con la forma u orientación de las partículas de un alimento (fibrosidad, granulosis, porosidad, esponjosidad). Los atributos de *composición* indican la presencia de algún componente en el alimento, como la humedad, carácter graso, harinosidad, etc. (Anzaldúa-Morales, 1994).

LOS JUECES EVALUADORES

Los principales actores necesarios para el desarrollo y la aplicación de las diferentes pruebas sensoriales, son los *jueces*, los cuales utilizan sus sentidos como herramientas de trabajo. Los jueces deben ser seleccionados y entrenados según el o los productos que se pretenda evaluar.

Es fundamental proporcionar las condiciones estructurales básicas para la sala de catación o cabinas y para el sitio de preparación de las muestras. También se debe tener un especial cuidado al momento de elegir la prueba sensorial, formulario, número de muestras, cantidades, alimentos adicionales que van a servir de vehículo para ingerir la muestra, recipientes que van a contener las muestras, entre otros.

Todo esto brinda la seguridad y reproducibilidad de los resultados para, posteriormente, lograr un análisis estadístico que brinde diferencias significativas.

Existen diferentes tipos de jueces según la prueba sensorial que se quiera llevar a cabo: juez experto, juez entrenado, juez semientrenado o de laboratorio y juez consumidor. Los *jueces expertos y entrenados* son empleados en el control de calidad, desarrollo de nuevos productos o cuando se realizan cambios en las formulaciones. Los *jueces semientrenados o de laboratorio y consumidores* se emplean para determinar la reacción del consumidor hacia un determinado producto (Meilgaard *et al.*, 2006).

LAS PRUEBAS SENSORIALES

Las pruebas sensoriales aplicadas a la industria de los alimentos permiten obtener respuesta a determinados aspectos vinculados a la calidad del producto que se pretende evaluar.

Las pruebas sensoriales se pueden dividir básicamente en tres grupos: i) *pruebas afectivas* para conocer el grado de preferencia, gusto o disgusto y de satisfacción que pueda presentar un consumidor por un producto determinado; ii) *pruebas discriminativas* para determinar si existen o no diferencias entre dos o más productos; iii) *pruebas descriptivas* para evaluar cuali y cuantitativamente las muestras y medir las diferencias que puedan presentarse entre ellas.

Pruebas afectivas

El principal objetivo de las pruebas afectivas es medir una respuesta personal (preferencia y/o aceptación) de los actuales y/o potenciales consumidores de un producto (Meilgaard *et al.*, 2006).

En las pruebas afectivas se le suministra al juez consumidor una opción entre productos alternativos y se analiza si existe una preferencia respecto a dicha opción en la mayoría de ellos. Para la evaluación propiamente dicha se utiliza una escala hedónica de 9 puntos, en donde en el centro de la escala se encuentra una categoría neutra y hacia los extremos se ubican adverbios que representaban pasos o cambios psicológicamente iguales. Esta escala permite que los resultados sean susceptibles de un análisis estadístico. Generalmente, una prueba de este tipo requiere entre 75 y 150 jueces consumidores que sean usuarios regulares o potenciales del producto a evaluar. Las pruebas afectivas también proporcionan una oportunidad para buscar segmentos de consumidores que le agraden diferentes estilos de un mismo producto, por ejemplo, diferentes colores o sabores (Lawless y Heymann, 2013).

Pruebas discriminativas

Las pruebas discriminativas se utilizan cuando se quiere determinar si dos muestras son notablemente diferentes. En algunos casos, dos muestras pueden ser químicamente diferentes y los consumidores pueden no percibir sensorialmente dicha diferencia. Las industrias alimenticias explotan esta posibilidad cuando se reformula un producto mediante

el uso de nuevos ingredientes y, al mismo tiempo, no quieren que el consumidor detecte la diferencia. También se emplean cuando se reformula un producto para hacer una *nueva versión mejorada* en donde el objetivo que se persigue es que el consumidor *si* detecte la diferencia entre las formulaciones. Las pruebas discriminativas permiten detectar diferencias y estimar su tamaño (Lawless y Heymann, 2013).

Pruebas descriptivas

Las pruebas descriptivas permiten cuantificar las intensidades percibidas en las características sensoriales de un producto. A través de las pruebas descriptivas se pueden realizar los cambios necesarios para lograr que el producto contenga los atributos exigibles y con mayor aceptación por parte del consumidor.

Para realizar un análisis descriptivo es necesario contar con jueces expertos que sean capaces de caracterizar todas las notas de sabor presentes en un alimento, y las intensidades percibidas de dichas notas, usando una escala de categorías simples y según el orden de aparición.

Las pruebas descriptivas han demostrado ser la herramienta más completa e informativa de la evaluación sensorial. Es aplicable para caracterizar una amplia variedad de cambios en los productos y responder a numerosas preguntas provenientes de la etapa de desarrollo de los productos alimenticios. La información obtenida se puede procesar por medio de herramientas estadísticas como la regresión y correlación (Lawless y Heymann, 2013).

Hipótesis

Los extractos fenólicos y fracciones purificadas del tegumento de maní argentino ricos en flavonoides, resveratrol y procianidinas presentan mayor actividad antioxidante y antimicrobiana que los extractos crudos, convirtiendo a estas fracciones polifenólicas en un aditivo con destacadas propiedades funcionales en lo referente a la conservación de alimentos de consumo humano.

Objetivo General

Estudiar la composición química y las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de fracciones de compuestos fenólicos de extractos obtenidos del tegumento de maní y evaluar dichas propiedades después de su aplicación en alimentos.

Objetivos Específicos

- Φ Obtener extractos de tegumento de maní mediante procesos químicos convencionales (disolventes líquidos), determinar los rendimientos de extracción y los contenidos de compuestos fenólicos totales.
- Φ Separar y purificar fracciones ricas en flavonoides, resveratrol y procianidinas a partir de los extractos obtenidos y analizar la composición química de dichas fracciones.
- Φ Determinar la actividad antioxidante de los extractos y las fracciones purificadas.
- Φ Determinar la actividad antifúngica y antimicrobiana de los extractos y las fracciones purificadas.
- Φ Evaluar el efecto conservante sobre las propiedades químicas y sensoriales de muestras de almendras almacenadas con el agregado de cubiertas comestibles y extractos de tegumento de maní.
- Φ Evaluar el efecto conservante sobre las propiedades químicas, microbiológicas y sensoriales de muestras de leche de soja almacenadas con el agregado de extractos de tegumento de maní y microencapsulados.

BIBLIOGRAFÍA

- Adámez J., Gamero Samino E., Valdés Sánchez E., González-Gómez D. 2012. In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera L.*). *Food Control*. 24: 136–141.
- Anzaldúa-Morales, A. 1994. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica. Ed). Zaragoza, España. Acribia. 220 pp.
- Amiot M.J., Tacchini M., Aubert S., Nicolas J. 1992. Phenolic composition and browning susceptibility various apple cultivars at maturity. *Journal of Food Science*. 57: 958–962.
- Anastasiadi M., Pratsinis H., Kletsas D., Skaltsounis A.-L., Haroutounian S.A. 2012. Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*. 48: 316–322.
- Asensio C.M., Gallucci N., Oliva M.D.L.M., Demo M.S., Grosso N.R. 2014. Sensory and bio-chemical preservation of ricotta cheese using natural products. *International Journal of Food Science and Technology*. 49: 2692–2702.
- Bak I., Lekli I., Juhasz B., Varga E., Varga B., Gesztelyi R., Szendrei L., Tosaki A. 2010. Isolation and analysis of bioactive constituents of sour cherry (*Prunus cerasus*) seed kernel: an emerging functional food. *Journal of Medicinal Food*. 13: 905–10.
- Ballard T.S. 2008. Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidant Compounds from Peanut Skins. Tesis Doctoral. Blacksburg, Virginia. Estados Unidos. 156 pp.
- Bansode R.R., Randolph P., Hurley S., Ahmedna M. 2012. Evaluation of hypolipidemic effects of peanut skin-derived polyphenols in rats on Western-diet. *Food Chemistry*. 135: 1659–66.
- Bisignano C., Filocamo A., Faulks R.M., Mandalari G. 2013. In vitro antimicrobial activity of pistachio (*Pistacia vera L.*) polyphenols. *Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Letters*. 341: 62–67.

- Blengino C. 2015. Maní: Informe Sectorial N° 2. Dirección de Agroalimentos de la Nación- Area de estudios sectoriales. Activo a Julio 2016. Disponible en internet en: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/otros/mani/informes/2014_05May.pdf.
- Brannan R.G. 2008. Effect of grape seed extract on physicochemical properties of ground, salted, chicken thigh meat during refrigerated storage at different relative humidity levels. *Journal of Food Science*. 73: 36–40.
- Brewer M.S. 2011. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Institute of Food Technologist - Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 10: 221–247.
- CAA. 2014. Capítulo XVIII, Aditivos alimentarios. Código Alimentario Argentino. ANMAT, Ministerio de Salud, Argentina. Publicado en internet, disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp. Activo abril 2016.
- Cai Y.Z., Luo Q., Sun M., Corke H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*. 74: 2157–2184.
- Carbonell-Barrachina A. 2007. Application of sensory evaluation of food to quality control in the Spanish food industry. *Polish Journal of Food and Nutrition*. 57: 71–76.
- Careri M., Corradini C., Elviri L., Nicoletti I., Zagnoni I. 2003. Direct HPLC analysis of quercetin and *trans*-resveratrol in red wine, grape and winemaking byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 5226–5231.
- Cardello A.V. 1998. Perception of food quality. En: *Food storage stability*. Taub I.A. y Singh R.P. CRC Press. Estados Unidos. pp 1-39.
- Chandrasekara A., Naczki M., Shahidi F. 2012. Effect of processing on the antioxidant activity of millet grains. *Food Chemistry*. 133: 1–9.
- Charles D.J. 2013. *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*. Springer. New York - Estados Unidos. 589 pp.

- Chemat F., Fabiano-Tixier A.S., Vian M.A., Allaf T., Vorobiev E. 2015. Solvent-free extraction of food and natural products. *Trends in Analytical Chemistry*. 71: 157–168.
- Chen C., Pearson A.M., Gray J.I. 1992. Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chemistry*. 43: 177–183.
- Chu Y.-F., Sun J., Wu X., Liu R.H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 6910–6916.
- Côté J., Caillet S., Doyon G., Dussault D., Sylvain J.-F., Lacroix M. 2011. Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts. *Food Control*. 22: 1413–1418.
- Dahiya K. 2013. Plant biochemistry and physiology nutraceuticals and their impact on human health. *Journal of Plant Biochemistry and Physiology*. 1(4): 1-4.
- Dillard C.J. y Bruce German J. 2000. Phytochemicals: Nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 1744–1756.
- Gaafar A.A., Mahmoud K.M., Salama Z.A. 2015. Antioxidant potential activity and cytotoxicity effects of different parts of peanuts (*Arachis hypogea L.*). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 6: 19–32.
- Gris E.F., Mattivi F., Ferreira E.A., Vrhovsek U., Pedrosa R.C., Bordignon-Luiz M.T. 2011. Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian *Vitis vinifera* red wines. *Food Chemistry* 126: 213–220.
- Gülçin I. 2012. Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*. 86: 345–391.
- Hollmann F., Arends I.W.C.E., Buehler K., Schallmey A., Bühler B. 2011. Enzyme-mediated oxidations for the chemist. *Green Chemistry*. 13: 226-265.
- Kmiecik D., Korczak J., Rudzińska M., Gramza-Michałowska A., Heś M., Kobus-Cisowska J. 2015. Stabilisation of phytosterols by natural and synthetic antioxidants in high temperature conditions. *Food Chemistry*. 173: 966–971.
- Kolouchová-Hanzlíková I., Melzoch K., Filip V., Šmidrkal J. 2004. Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. *Food Chemistry*. 87: 151–158.

- Larrauri M., Barrionuevo M.G., Riveros C., Mestrallet M.G., Zunino M.P., Zygodlo J.A., Grosso N.R., Nepote V. 2013. Effect of peanut skin extract on chemical stability and sensory properties of salami during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93: 1751–1757.
- Lawless H.T. y Heymann H. 2013. *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*. (2 Ed). New York, USA. Springer. 596 pp.
- Li R., Yu H., Xing R., Liu S., Qing Y., Li K., Li B., Meng X., Cui J., Li P. 2012. Isolation, identification and characterization of a novel antioxidant protein from the nematocyst of the jellyfish *Stomolophus meleagris*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 51: 274–278.
- Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. 4: 118–126.
- Medina I, Gallardo JM, Gonzalez MJ, Lois S, Hedges N. 2007. Effect of molecular structure of phenolic families as hydroxycinnamic acids and catechins on their antioxidant effectiveness in minced fish muscle. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 55(10): 3889–95.
- Meilgaard M.C., Carr B.T., Civille G.V. 2006. *Sensory Evaluation Techniques*. (4 Ed). Boca Raton, Florida, USA. Taylor & Francis. 416 pp.
- Mielnik M.B., Aaby K., Skrede G. 2003. Commercial antioxidants control lipid oxidation in mechanically deboned turkey meat. *Meat Science*. 65: 1147–1155.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*. 26: 211–219.
- Nepote V., Grosso N.R., Guzman C. 2002. Extraction of antioxidant components from peanut skins. *Grasas y Aceites*. 53: 391–395.
- Nepote V., Grosso N.R., Guzman C. 2004. Radical scavenging activity of extracts of Argentine peanut skins (*Arachis Hipogaea*) in relation to its trans-resveratrol content. *The Journal of the Argentine Chemical Society*. 92: 41–49.

- O’Keefe S.F. y Wang H. 2006. Effects of peanut skin extract on quality and storage stability of beef products. *Meat science*. 73: 278–286.
- Oldoni T.L.C., Melo P.S., Massarioli A.P., Moreno I. a. M., Bezerra R.M.N., Rosalen P.L., da Silva G.V.J., Nascimento A.M., Alencar S.M. 2016. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. *Food Chemistry*. 192: 306–312.
- Olmedo R.H., Asensio C.M., Grosso N.R. 2015. Thermal stability and antioxidant activity of essential oils from aromatic plants farmed in Argentina. *Industrial Crops and Products*. 69: 21–28.
- Percival M. 1998. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*. 10: 1-4.
- Pizzolitto R.P., Dambolena J.S., Zunino M.P., Larrauri M., Grosso N.R., Nepote V., Dalcero A.M., Zygadlo J.A. 2013. Activity of natural compounds from peanut skins on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. *Industrial Crops and Products*. 47: 286–290.
- Prado Martin J.G., Porto E., Corrêa C.B., Matias de Alencar S., Micotti da Gloria E., Ribeiro Cabral I.S., Aquino L.M. 2012. Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes. *Journal of Natural Products*. 5: 27–36.
- Prakash B., Kedia A., Mishra P.K., Dubey N.K. 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. *Food Control*. 47: 381–391.
- Prior R.L. y Cao G. 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*. 27: 1173–1181.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4290–4302.
- Quiñones M. y Aleixandre A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*. 27: 76–89.

- Quiroga P.R., Asensio C.M., Nepote V. 2014. Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sunflower seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. DOI 10.1002/jsfa.6744
- Rangel-Huerta O., Pastor-Villaescusa B., Aguilera C., Gil A. 2015. A systematic review of the efficacy of bioactive compounds in cardiovascular disease: Phenolic Compounds. *Nutrients*. 7: 5177-5216.
- Renaud S.C., Gueguen R., Conard P., Lanzmann-Petithory D., Orgogozo J.M., Henry O. 2004. Moderate wine drinkers have lower hypertension related mortality: a prospective cohort study in French men. *American Journal of Clinical Nutrition*. 80: 621–625.
- Sánchez-Vioque R., Rodríguez-Conde M.F., Reina-Ureña J.V., Escolano-Tercero M.A., Herraiz-Peñalver D., Santana-Méridas O. 2012. In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus L.*). *Industrial Crops and Products*. 39: 149–153.
- Scalbert A., Morand C., Manach C., Rémésy C. 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 56: 276–282.
- Sfahlan A.J., Mahmoodzadeh A., Hasanzadeh A., Heidari R., Jamei R. 2009. Antioxidants and antiradicals in almond hull and shell (*Amygdalus communis L.*) as a function of genotype. *Food Chemistry*. 115: 529–533.
- Shahidi F. y Zhong Y. 2007. Measurement of antioxidant activity in food and biological systems. En: *Antioxidant Measurement and Applications*. ACS Symposium Series. American Chemical Society. Washington, DC, Estados Unidos. 36–66 pp.
- Shan B., Cai Y.Z., Sun M., Corke H. 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 7749–7759.
- Su L., Yin J.-J., Charles D., Zhou K., Moore J., Yu L. (Lucy). 2007. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food Chemistry*. 100: 990–997.

- USDA 2015. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Nutrient database for standard reference, release 24. Nutrient Data Laboratory home page. Disponible en: http://www.ars.usda.gov/main/site_main.htm?modecode=80-40-05-25. Activo Julio 2016.
- Valentao P., Fernandes E., Carvalho F., Andrade P.B., Seabra R.M., Bastos L. 2002. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus L.*) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50: 4989–4993.
- Vandamme J., Nikiforov A., Dujardin K., Leys C., De Cooman L., Van Durme J. 2015. Critical evaluation of non-thermal plasma as an innovative accelerated lipid oxidation technique in fish oil. *Food Research International*. 72: 115–125.
- Wu N., Fu K., Fu Y.-J., Zu Y.-G., Chang F.-R., Chen Y.-H., Liu X.-L., Kong Y., Liu W., Gu C.-B. 2009. Antioxidant activities of extracts and main components of Pigeonpea [*Cajanus cajan (L.) Millsp.*] leaves. *Molecules*. 14: 1032–43.
- Xia E., He X., Li H., Wu S., Li S., Deng G. 2013. Biological activities of polyphenols from grapes. *Polyphenols in Human Health and Disease*. 1: 47–58.
- Youdim K.A., McDonald J., Kalt W., Joseph J.A. 2002. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13: 282–288.
- Zeb A. 2015. Chemistry and liquid chromatography methods for the analyses of primary oxidation products of triacylglycerols. *Free Radical Research*. 49: 549–564.
- Zellner D.A. 2013. Color-odor interactions: A review and model. *Chemosensory Perception*. 6: 155–169.
- Zellner D.A., Loss C.R., Zearfoss J., Remolina S. 2014. It tastes as good as it looks! The effect of food presentation on liking for the flavor of food. *Appetite*. 77: 31–35.
- Zondag M. y Anderson A. 2003. Peanuts: a source of medically important resveratrol. *Natural Product Radiance*. 2: 182–189.

CAPITULO II

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE TEGUMENTO DE MANÍ

INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes en general son compuestos que, en bajas concentraciones, retardan el comienzo o disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales autooxidables interfiriendo en el mecanismo fundamental de formación de radicales libres. Estos compuestos se encuentran presentes en los tejidos vivos evitando los procesos oxidativos (St. Angelo, 1996).

Numerosos estudios han reportado varias plantas medicinales comestibles (orégano, menta, albahaca, uva, te, entre otras) que poseen altas cantidades de antioxidantes como terpenos, fenoles, flavonoides y metabolitos secundarios como esteroides y saponinas, que pueden ser utilizadas para la prevención de enfermedades relacionadas al daño oxidativo (Kong *et al.*, 2012).

Los polifenoles se encuentran en una amplia variedad de frutas, vegetales, cereales, semillas de oleaginosas, raíces, hojas y bebidas, como maní, uva, te y vino (Shon *et al.*, 2003; Jáuregui Muñoz *et al.*, 2007). Estos compuestos que presentan actividad antioxidante, han sido ampliamente investigados en células cultivadas, animales y seres humanos (Que *et al.*, 2007).

Los antioxidantes naturales presentan ventajas relacionadas a efectos sobre la salud humana. Particularmente los compuestos fenólicos son utilizados para proteger al organismo de padecer enfermedades cardiovasculares y cáncer, y retardar los procesos de envejecimiento (Roleira *et al.*, 2015; Rangel-Huerta *et al.*, 2015; Oldoni *et al.*, 2016). Por el contrario, los antioxidantes sintéticos han demostrado ser perjudiciales para la salud y tienen un efecto acumulativo (Sun *et al.*, 2011; Prakash *et al.*, 2015), por lo tanto, los científicos exploran nuevas alternativas naturales más seguras.

Subproductos de la industria, como el tegumento de maní, poseen compuestos polifenólicos que podrían explotarse comercialmente para su uso como fuente de antioxidantes naturales, por lo que resulta fundamental conocer procesos eficientes de extracción de este tipo de compuestos. Por otro lado, el método industrial con cual se procesa

el tegumento de maní afecta la cantidad de compuestos fenólicos que pueden extraerse posteriormente (Davis *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2006). Yu *et al.* (2006) estudiaron el efecto de tres metodologías diferentes para remover el tegumento del grano de maní (pelado directo, blanchado y tostado), que luego fue extraído utilizando distintos solventes, y determinaron el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de los extractos. Los citados autores publicaron valores de compuestos fenólicos entre 90-125 mg/g de tegumento seco tostado. Por su lado, Wang *et al.* (2007) determinaron el contenido de fenoles totales en extractos acuosos de tegumento de maní deslipidizado. El contenido hallado fue de 90 mg fenoles/g extracto seco y, además, los extractos mostraron una fuerte actividad antioxidante frente al radical DPPH (2,2-difenyl-1-picrilhidrazil).

Nepote *et al.*, 2005 estudiaron el efecto de varios parámetros en la extracción de polifenoles del tegumento de maní, tales como relación etanol/agua, tamaño de partícula y número de extracciones. En dicho estudio se determinaron las condiciones óptimas de extracción (tegumento de maní sin triturar, etanol:agua 70-30 v-v como solvente, agitación durante 10 minutos y tres etapas de extracción) basándose en la cantidad de compuestos fenólicos totales extraídos. El máximo rendimiento de fenoles totales observados en dichas condiciones fue de 118 mg fenoles/g de tegumento.

El presente capítulo tiene como **objetivo general** extraer sustancias de tipo polifenólicas y evaluar su rendimiento de extracción, contenido de fenoles y flavonoides totales utilizando diferentes solventes. La finalidad es determinar con que sistema de extracción se logran los mayores rendimientos de compuestos polifenólicos que presenten un elevado potencial de actividad antioxidante.

Los **objetivos específicos** fueron obtener extractos crudos de tegumento de maní proveniente de dos procesos industriales (blanchado y tostado), purificarlos mediante fraccionamiento con diferentes solventes y determinar rendimientos de extracción, contenidos de compuestos fenólicos totales y de flavonoides de los extractos crudos y las fracciones obtenidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Se trabajó con tegumento de maní argentino tipo “Runner” (cosecha 2012) obtenido a partir de granos sometidos a dos procesos industriales: blanchado (horneado a 90 °C durante 10 minutos) y tostado (procesado a 150 °C durante 20 minutos).

El tegumento de maní, blanchado y tostado, fue provisto por la empresa Lorenzati, Ruetsch y Cia SA, Ticino, Prov. Córdoba, Argentina. El tegumento se almacenó a 4 °C en bolsas plásticas selladas hasta su uso.

MÉTODOS

Composición química

En cada una de las muestras de tegumento (blanchado y tostado) se realizaron las siguientes determinaciones:

- Φ **Humedad.** Se secaron 5 g de tegumento molido en mortero manual en estufa a 60 °C hasta peso constante (Grosso y Guzmán, 1995), y se determinó el porcentaje de humedad por diferencia de peso, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{g \text{ muestra húmeda} - g \text{ muestra seca}}{(g \text{ muestra húmeda})} \times 100 \text{ (ec. 2.1.)}$$

- Φ **Materia grasa.** Se realizó mediante extracción sólido-líquido utilizando equipos Soxhlet, con n-hexano como solvente, por un período de 12 horas. La materia grasa se calculó por diferencia de peso de las muestras antes y después de la extracción (Grosso y Guzmán, 1995), según la fórmula:

$$\% \text{ Aceite} = \frac{g \text{ aceite}}{g \text{ muestra}} \times 100 \text{ (ec. 2.2.)}$$

- Φ **Proteínas.** Se determinó el porcentaje de nitrógeno por el método de Kjeldhal en 0,5 g de muestra de tegumento. Para convertir el porcentaje de nitrógeno en porcentaje de proteínas se utilizó el factor 5,46, siendo este factor el utilizado para maní y todos sus productos derivados (AOAC, 1990).

Φ **Cenizas.** Las muestras de tegumento se incineraron en horno mufla a 550 °C durante 6 hs. El porcentaje de cenizas se determinó por la diferencia de peso antes y después de la incineración (AOAC, 1990), utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{g después de la incineración}}{\text{g antes de la incineración}} \times 100 \text{ (ec. 2.3.)}$$

Obtención de los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní

Los tegumentos obtenidos mediante los procesos mencionados anteriormente se deslipidizaron durante 12 horas por el método Soxhlet utilizando n-hexano como solvente y, posteriormente, se secaron bajo campana y a temperatura ambiente por 24 horas (Nepote *et al.*, 2004a). A partir de cada una de las muestras deslipidizadas, se obtuvieron dos extractos: blanchado crudo (BC) y tostado crudo (TC). Se realizó una extracción sólido-líquido utilizando etanol-agua (70-30 v-v) como solvente de extracción. Se pesaron 10 g de cada tipo tegumento y se mezclaron con 200 mL de solvente, durante 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad. La solución obtenida se filtró utilizando equipo de filtrado al vacío y papel de filtro Whatman N° 3. Al residuo sólido se le realizó una nueva extracción bajo las mismas condiciones. Posteriormente se evaporó completamente el solvente de los extractos en evaporador rotatorio, bajo vacío a 35 °C.

Sobre los extractos crudos obtenidos (BC y TC), se realizaron purificaciones mediante particiones con solventes de diferente polaridad según Nepote *et al.* (2004a) y Pizzolitto *et al.* (2013). El extracto seco (8 g) se suspendió en 55 mL de agua destilada y se particionó en ampolla de decantación con 90 mL de n-hexano. La fase que contenía el n-hexano se descartó y la fase que contenía el extracto acuoso se particionó nuevamente con 500 mL de acetato de etilo. Se obtuvieron cuatro fracciones: blanchado acetato de etilo (BAE) y tostado acetato de etilo (TAE) a las cuales se les evaporó el solvente en evaporador rotatorio y bajo vacío a 35 °C para obtener los extractos secos. Mientras que a las fracciones blanchado acuoso (BA) y tostado acuoso (TA) se liofilizaron durante 12 horas para eliminar el agua. Todas las fracciones se guardaron en frascos color caramelo a -18 °C hasta su uso.

Rendimiento de extracción

Se determinó el rendimiento de extracción mediante el peso de materia seca extraída en relación al tegumento inicial, según la siguiente fórmula (Nepote *et al.*, 2004a):

$$\text{Rendimiento de extracción} = (g \text{ extracto seco}) / (g \text{ tegumento seco}) \text{ (ec. 2.4.)}$$

Contenido de fenoles totales

Se determinó el contenido de fenoles totales de los extractos crudos (BC y TC) y de las fracciones purificadas (BAE, BA, TAE y TA) por el método de Folin-Ciocalteu adaptado para un volumen de 10 mL, según Waterman y Mole (1994) y Nepote *et al.* (2005). Se trabajó con una dilución conocida en etanol-agua (70-30 v-v) de cada uno de los extractos secos (500 µ/mL). La curva de calibración se obtuvo con soluciones de ácido gálico (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) en etanol-agua (70-30 v-v). Para ello se colocó en un tubo de ensayo 8,4 mL de agua destilada y 100 µL de la dilución de cada extracto, se agregó 500 µL del reactivo Folin-Ciocalteu y se dejó reposar durante 3 a 6 minutos. Posteriormente se agregó 1 mL de solución saturada de carbonato de sodio, y se dejó reposar durante 1 hora en oscuridad. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 760 nm.

Se determinó el contenido de fenoles totales de la muestra en base a una curva de calibración construida con distintas concentraciones de ácido gálico. Los resultados se expresaron como equivalente de ácido gálico (mg EAG/g muestra seca).

Contenido de flavonoides totales

Se determinó el contenido de flavonoides totales según el método desarrollado por Luximon-Ramma *et al.* (2005). Se trabajó con una dilución conocida en etanol-agua (70-30 v-v) de cada uno de los extractos secos (1.5 mg/mL). La curva de calibración se obtuvo con soluciones de distinta concentración de quercetina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) en etanol-agua (70-30 v-v).

El procedimiento realizado fue el siguiente: se colocó en un tubo de medio ensayo 1.5 mL de la dilución de cada extracto y se agregó igual volumen de una solución al 2% de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2 g en 100 mL etanol). La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar en

oscuridad durante 10 minutos. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro UV-visible a 367 nm.

Por extrapolación a la curva de calibración con quercetina, se determinó el contenido de flavonoides totales de la muestra y los resultados se expresaron como equivalente quercetina (mg EQ/g muestra seca).

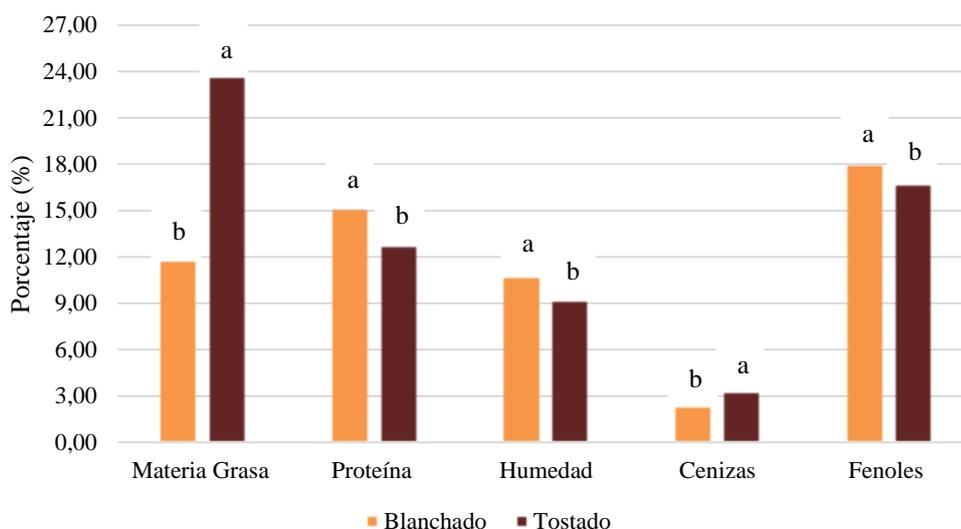
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron estadísticamente con el programa InfoStat versión 2013p (Di Rienzo *et al.*, 2013). Se calcularon medias y desvíos estándar. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA, $\alpha = 0.05$) y test a posteriori (DGC) para encontrar diferencias significativas entre las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química

El tegumento de maní blanchado presentó el mayor porcentaje de proteínas, humedad y fenoles. Por su parte, el tegumento de maní tostado presentó el mayor porcentaje de materia grasa y cenizas (**Figura 2.1**).



* Media seguida por diferentes letras, indican diferencias significativas entre las muestras (ANOVA, test DGC, $\alpha = 0,05$).

Figura 2.1. Composición química porcentual del tegumento de maní tipo Runner.

Según Woodroof (1983) el tegumento de maní americano, en general, presenta la siguiente composición química: humedad 9,01%, albuminoides 12,68%, lípidos 11,76%, extracto libre de nitrógeno 34,9% y cenizas 11,19%. Por su parte, Nepote (2003) encontró en tegumento de maní blanchado argentino la siguiente composición química: humedad 9,15%, lípidos 14,57%, proteínas 11,03%, cenizas 2,85% y fenoles totales 13,24%. Comparando los valores de la **Figura 2.1**. con los encontrados por Woodroof (1983), se observó que los porcentajes de lípidos fueron mayores para el tegumento argentino, esto se debe a que los procesos industriales (blanchado y tostado) implican arrastre de partículas de maní que poseen altos porcentajes de grasas. Además, la humedad del tegumento fue superior a la encontrada por dicho autor. Por otro lado, el porcentaje de cenizas fue menor en los tegumentos evaluados.

En cuanto al contenido de fenoles totales, los valores que se observan en la **Figura 2.1.** son superiores a los valores encontrados por Nepote (2003). Estos porcentajes pueden variar según el año y época de cosecha y condiciones de blanchado y tostado industrial. Por ejemplo, Davis *et al.* (2010) encontraron mayor proporción de fenoles totales en extractos de tegumento de maní tostado a 166°C respecto al tegumento sin tostar (121 y 73,44 mg EAG/g extracto respectivamente). El mayor contenido de humedad en el tegumento blanchado se debe a que la temperatura de este proceso es muy baja (90 °C) y el material no pierde tanta humedad, en cambio en un proceso de tostado que se realiza a más de 150 °C, el tegumento pierde mayor contenido de humedad y podría perderse algo de nitrógeno, afectando el contenido de proteínas. Por lo tanto, es razonable encontrar menor porcentaje de humedad y proteínas en un tegumento de maní tostado lo que a su vez lleva a que dicho material presente mayor porcentaje de cenizas y lípidos.

En función de la composición química analizada en ambos tegumentos, es importante destacar que, debido a la alta concentración de lípidos presentes en los mismos, es conveniente deslipidizar los tegumentos antes de realizar los procesos de obtención de los extractos. Además, esta caracterización química permite conocer la materia prima de la cual se parte para la extracción de los compuestos polifenólicos.

Rendimiento de extracción, contenido de fenoles y flavonoides de los extractos y fracciones

El rendimiento de extracción de materia seca fue mayor en el extracto crudo blanchado (179,93 mg/g) que en el extracto crudo tostado (167,27 mg/g). Además, BC presentó un mayor contenido de fenoles totales (672,40 mg EAG/g) y similar contenido de flavonoides totales (19,97 mg EQ/g) que TC (416,92 mg EAG/g y 20,64 mg EQ/g, respectivamente) (**Tabla 2.1**). Francisco y Resurreccion (2009) encontraron, en tegumento de maní americano tipo Runner, un contenido de fenoles totales comprendido entre 101,43 – 280,42 mg EAG/g. Por su parte, Yu *et al.* (2005) publicaron valores similares a estos últimos en extractos etanólicos de tegumento de maní americano (90-125 mg EAG/g). El contenido de fenoles totales en los extractos BC y TC fue superior al encontrado por estos autores, pero similar a lo publicado en tegumento de maní argentino por Nepote *et al.* (2004a; 2004b; 2005). Las diferencias en el contenido de fenoles totales entre el tegumento de maní americano y argentino se podrían explicar por efectos genéticos y del medio ambientales (Young *et al.*, 2005).

Tabla 2.1. Rendimiento de extracción y contenidos de fenoles totales y flavonoides totales de extractos crudos de tegumento de maní blanchado (BC) y tostado (TC).

Muestra	Rendimiento de Extracción (mg/g) ^a	Fenoles Totales (mg EAG ^b /g)	Flavonoides Totales (mg EQ ^c /g)
TC	167,27 ± 3,56 b	416,92 ± 12,26 b	20,64 ± 0,35 a
BC	179,93 ± 2,67 a	672,40 ± 9,38 a	19,97 ± 4,60 a

* Media seguida por diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras (ANOVA, test DGC, $\alpha = 0,05$). ^(a) (mg extracto seco/g tegumento seco); ^(b) EAG: Equivalente de Acido Gálico; ^(c) EQ: Equivalente Quercetina.

El contenido de flavonoides totales hallado en BC y TC fue menor al encontrado en extractos etanólicos de tegumento de maní americano por Wang *et al.* (2007). Estos autores publicaron valores cercanos a 65 mg EQ/g extracto de tegumento de maní seco. Es importante mencionar que el contenido de flavonoides totales presente en el tegumento puede variar de acuerdo a la disolución de estos componentes a nivel celular dentro de la matriz vegetal (Xiaodi *et al.*, 2015).

Tabla 2.2. Rendimiento de extracción y contenidos de fenoles totales y flavonoides totales de las fracciones obtenidas por partición con solventes de los extractos crudos tegumento de maní blanchado y tostado: blanchado acetato de etilo (BAE), tostado acetato de etilo (TAE), blanchado acuoso (BA) y tostado acuoso (TA).

Muestra	Rendimiento de Extracción (mg/g) ^a	Fenoles Totales (mg EAG ^b /g)	Flavonoides Totales (mg EQ ^c /g)
TA	148,31 ± 3,15 a	295,06 ± 1,44 d	16,65 ± 0,28 c
BA	97,76 ± 4,30 b	558,96 ± 8,65 c	21,56 ± 0,31 a
TAE	18,96 ± 0,40 d	673,84 ± 9,38 b	19,97 ± 0,68 b
BAE	82,17 ± 4,30 c	716,14 ± 8,77 a	13,07 ± 0,06 d

* Media seguida por diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras (ANOVA, test DGC, $\alpha = 0,05$). ^(a) (mg extracto seco/g tegumento seco); ^(b) EAG: equivalente de ácido gálico; ^(c) EQ: equivalente quercetina

Las fracciones acuosas (BA y TA) y las fracciones de acetato de etilo (BAE y TAE) purificadas a partir de los extractos crudos presentaron diferencias significativas en el rendimiento de extracción, contenido de fenoles y contenido de flavonoides totales. El rendimiento en materia seca de las fracciones acuosas (97,76 para BA y 148,31 mg/g para TA) fue mayor que en las fracciones de acetato de etilo para ambos tegumentos (82,17 para BAE y 18,96 mg/g para TAE).

Por el contrario, las fracciones de acetato de etilo mostraron mayor contenido de fenoles totales (716,14 mg EAG/g para BAE y 673,84 mg EAG/g para TAE) que las fracciones acuosas (558,96 mg EAG/g para BA y 295,06 mg EAG/g para TA). El contenido de flavonoides en la muestra de tegumento tostado fue mayor en la fracción de acetato de etilo (19,97 mg EQ/g para TAE) que en la acuosa (16,65 mg EQ/g para TA). La fracción acuosa obtenida a partir de tegumento blanchado presentó mayor contenido de flavonoides totales (21,56 mg EQ/g para BA) que la fracción de acetato de etilo (13,07 mg QE/g para BAE).

Los compuestos fenólicos se disuelven en una mayor proporción en acetato de etilo y dicho comportamiento se evidencia en el contenido de fenoles totales.

Estos resultados sugieren que el proceso industrial, blanchado o tostado, afecta de manera diferente al tegumento de maní en cuanto al rendimiento de materia seca, contenido de fenoles y flavonoides totales.

El mayor rendimiento de fenoles totales en el tegumento de maní blanchado indica que el extracto puede tener una mayor actividad antioxidante y, además, el contenido de fenoles totales se incrementa a medida que se purifica el extracto, tal como se observa en la fracción de acetato de etilo.

CONCLUSIONES

El tegumento de maní presenta alto contenido de materia grasa, por lo tanto, es importante desengrasarlo para continuar con el proceso de extracción y purificación de extractos y fracciones de tegumento de maní con alto contenido de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante.

El tegumento de maní obtenido por un proceso industrial de blanchado permite mayor extracción de fenoles y flavonoides.

La partición con acetato de etilo aumenta la concentración de fenoles.

En función de los resultados obtenidos, la fracción BAE presenta una mayor potencialidad antioxidante por concentrar en mayor medida a los polifenoles del extracto crudo.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC 1990. Official Methods of Analysis of the AOAC. Washington, DC, USA. Association of Official Analytical Chemists. pp.
- Davis J.P., Dean L.L., Price K.M., Sanders T.H. 2010. Roast effects on the hydrophilic and lipophilic antioxidant capacities of peanut flours, blanched peanut seed and peanut skins. *Food Chemistry*. 119: 539–547.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. 2013. InfoStat, versión 2013p. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Francisco M.L.L.D. y Resurreccion a. V. a. 2009. Total phenolics and antioxidant capacity of heat-treated peanut skins. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22: 16–24.
- Grosso N.R. y Guzmán C.A. 1995. Chemical Composition of aboriginal peanut (*A. hypogaea*) seeds from Perú. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 43: 102-105.
- Jáuregui Muñoz A.M., Giusti A.F., Ramos Escudero F., Alvarado-Ortiz Ureta C. 2007. Evaluación de la actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en vinos producidos en Perú. *Revista Soc Quim Perú*. 1: 30–40.
- Kong K.W., Mat-Junit S., Aminudin N., Ismail A., Abdul-Aziz A. 2012. Antioxidant activities and polyphenolics from the shoots of *Barringtonia racemosa* (L.) Spreng in a polar to apolar medium system. *Food Chemistry*. 134: 324–332.
- Luximon-Ramma A., Bahorun T., Crozier A., Zbarsky V., Datla K.P., Dexter D.T., Aruoma E.I. 2005. Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. *Food Research International*. 38: 357–367.
- Nepote V., Grosso N.R., Guzman C. 2005. Optimization of extraction of phenolic antioxidant from peanut skins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 33–38.
- Nepote V., Grosso N.R., Guzman C. 2004a. Radical scavenging activity of extracts of Argentine peanut skins (*Arachis Hipogaea*) in relation to its trans-resveratrol content. *The Journal of the Argentine Chemical Society*. 92: 41–49.

- Nepote V., Mestrallet M.G., Grosso N.R., 2004b. Natural antioxidant effect from peanut skin in honey-roasted peanuts. *Journal of Food Science*. 69(7): 295–300.
- Nepote V. 2003. Purificación y caracterización de compuestos antioxidantes del tegumento de maní argentino. Desarrollo del proceso de obtención a nivel laboratorio y piloto. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. 240 pp.
- Oldoni T.L.C., Melo P.S., Massarioli A.P., Moreno I. a. M., Bezerra R.M.N., Rosalen P.L., da Silva V.J.G., Nascimento A.M., Alencar S.M. 2016. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. *Food Chemistry*. 192: 306–312.
- Pizzolitto R.P., Dambolena J.S., Zunino M.P., Larrauri M., Grosso N.R., Nepote V., Dalcero A.M., Zygodlo J.A. 2013. Activity of natural compounds from peanut skins on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. *Industrial Crops & Products*. 47: 286–290.
- Prakash B., Kedia A., Mishra P.K., Dubey N.K. 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. *Food Control*. 47: 381–391.
- Que F., Mao L. y Zheng X. 2007. In vitro and vivo antioxidant activities of daylily flowers and the involvement of phenolic compounds. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. 16(1): 196–203.
- Rangel-Huerta O., Pastor-Villaescusa B., Aguilera C., Gil A. 2015. A Systematic Review of the Efficacy of Bioactive Compounds in Cardiovascular Disease: Phenolic Compounds. *Nutrients*. 7: 5177-5216.
- Roleira F.M.F., Tavares-da-Silva E.J., Varela C.L., Costa S.C., Silva T., Garrido J., Borges F. 2015. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry*. 183: 235–258.
- Shon M.-Y., Kim T.-H., Sung N.-J. 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus of Hymenochaetaceae*) extracts. *Food Chemistry*. 82: 593–597.

- St. Angelo A. J. 1996. Lipid Oxidation in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 36(3): 175-224.
- Sun L., Zhang J., Lu X., Zhang L., Zhang Y. 2011. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki L.*) leaves. *Food and chemical toxicology*. 49: 2689–96.
- Wang J., Yuan X., Jin Z., Tian Y., Song H. 2007. Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of peanut skins extract. *Food Chemistry*. 104: 242–250.
- Waterman P. G. y Mole S. 1994. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Cientific Publications, Oxford, UK.
- Woodroof J. G. 1983. *Peanuts, Production, Processing, Products*. 3th Edition. Avi Publishing Company, Inc. U.S.A.
- Xiaodi S., Jingyan L., Shuming W., Lei Z., Lijuan Q., Tianfu H., Qianyu W., Kow-Ching C.S., Shuntang G. 2015. Flavor characteristic analysis of soymilk prepared by different soybean cultivars and establishment of evaluation method of soybean cultivars suitable for soymilk processing. *Food Chemistry*. 185: 422-429
- Young N.D., Sanders T.H., Drake M.A., Osborne J., Civille G. V. 2005. Descriptive analysis and US consumer acceptability of peanuts from different origins. *Food Quality and Preference*. 16: 37–43.
- Yu J., Ahmedna M., Goktepe I. 2005. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chemistry*. 90: 199–206.
- Yu J., Ahmedna M., Goktepe I., Dai J. 2006. Peanut skin procyanidins: Composition and antioxidant activities as affected by processing. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19: 364–371.

CAPITULO III

PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE FRACCIONES DE POLIFENOLES DEL TEGUMENTO DE MANÍ

INTRODUCCIÓN

En la industrialización de los productos derivados del maní como maní blanchado o manteca de maní, se elimina el tegumento que recubre al grano. El tegumento constituye un subproducto de la industria con un valor comercial muy bajo (Sarnoski *et al.*, 2012). Sin embargo, puede transformarse en una excelente materia prima de la cual obtener compuestos fenólicos. Dichos compuestos fenólicos presentan alta actividad antioxidante y podrían aprovecharse como aditivos para aumentar la conservación de los alimentos de manera natural (O'Keefe y Wang, 2006; Yu *et al.*, 2010; Larrauri *et al.*, 2013; Larrauri *et al.*, 2016).

Los compuestos fenólicos son uno de los grupos más numerosos de sustancias no energéticas que podemos encontrar en los alimentos de origen vegetal. En los últimos años, numerosos estudios de investigación han demostrado que el consumo de polifenoles puede mejorar la calidad de vida de las personas y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Renaud *et al.*, 2004). Actualmente existe un gran interés en la producción de polifenoles y/o sus extractos para utilizarlos como aditivos en alimentos e ingredientes bioactivos en la industria cosmética y farmacéutica (Anastasiadi *et al.*, 2012).

Los polifenoles se caracterizan químicamente por contener un anillo aromático que puede estar unido a dos o más grupos hidroxilos y se clasifican en función del número de anillos fenólicos y de los elementos estructurales unidos a esos anillos y, también, en base al origen biosintético (Echavarría *et al.*, 2009). Entre los polifenoles se encuentran los ácidos fenólicos, estilbenos (resveratrol) y flavonoides; éstos últimos, a su vez presentan una considerable variabilidad de estructuras (**Figura 3.1.**). Dentro de los flavonoides existen 6 subclases diferentes como flavonas, antocianinas, flavanonas, flavonoles, isoflavonas y flavanoles (flavanol oligomero y proantocianidinas). Las proantocianidinas a su vez se subdividen en 16 subclases diferentes que incluyen procianidinas, oligomeros del tipo flavan-3-ols, catequina y epicatequina (Rangel-Huerta *et al.*, 2015).



Figura 3.1. Estructura química de compuestos fenólicos: quercetina, ácido gálico y resveratrol.

Los polifenoles poseen la capacidad para modular la actividad de diversas enzimas, y para modificar mecanismos de señalización y procesos celulares. Esta capacidad puede ser posible debido a sus características fisicoquímicas que les permiten participar en diferentes reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción. Sus propiedades antioxidantes justifican muchos de sus efectos beneficiosos (Quiñones *et al.*, 2012).

Las técnicas cromatográficas son fundamentales para separar, purificar, identificar y cuantificar los compuestos presentes en las matrices vegetales. Entre las mismas, la cromatografía en columna constituye una técnica de purificación simple para aislar compuestos de una mezcla compleja. Se necesita un soporte sólido adsorbente (fase estacionaria) y un eluyente (fase móvil) que, por efecto de la gravedad, mueve la muestra a través de la columna, en donde los compuestos que se encuentran disueltos en la fase móvil, se separan en la columna y se eluyen y recogen en fracciones. El Sephadex LH-20 es un gel hidroxipropilado de dextrosa que ha sido desarrollado especialmente para la filtración de productos naturales y para su uso en cromatografía en columna (Pearson Murphy y Diez d' Aux, 1975; Appeldoorn *et al.*, 2009).

Por su parte, la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) es una técnica cromatográfica que permite acortar notablemente los tiempos de análisis y, cuando se adapta a detectores apropiados, facilita la identificación y cuantificación de compuestos en general, siendo la técnica indicada para separar e identificar fenoles. Para desarrollar un método de identificación por HPLC en compuestos fenólicos es necesario optimizar una amplia

variedad de condiciones, tanto de la fase móvil (solvente, fuerza iónica, pH, par iónico, etc.) como de la columna (Lee, 2000).

Francisco y Resurreccion (2009) y Sarnoski *et al.* (2012) identificaron y cuantificaron compuestos fenólicos en extractos de tegumento de maní. Estos autores observaron que el tegumento de maní es rico en sustancias polifenólicas como: ácidos fenólicos (ácido clorogénico, ácido cafeico y ácido felúrico), flavonoides (epigallocatequina, epicatequina, catequina galato, epicatequina galato) y estilbenos (resveratrol).

Los compuestos fenólicos presentes en el tegumento de maní serían los responsables de la actividad antioxidante de los extractos (Nepote *et al.*, 2002; 2004; 2005). En este trabajo se propone como novedoso realizar estudios profundos de la composición y de las propiedades antioxidantes de fracciones separadas y purificadas utilizando cromatografía en columna y su aplicación como antioxidantes naturales en alimentos.

El presente capítulo tiene como **objetivo general** purificar por cromatografía en columna extractos crudos de tegumento de maní e identificar y cuantificar los compuestos en las fracciones obtenidas mediante cromatografía líquida de alta presión. La finalidad es poder determinar si las fracciones enriquecidas en compuestos puros presentan mejor comportamiento antioxidante que los extractos sin purificar.

Los **objetivos específicos** fueron purificar por cromatografía en columna extractos de tegumento de maní y realizar la identificación y cuantificación de los compuestos presentes en las fracciones purificadas por medio de cromatografía líquida de alta presión.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Se trabajó con tegumento de maní argentino tipo “Runner” (cosecha 2012) obtenido por blanchado industrial. En este proceso el grano de maní fue sometido a horneado a 90 °C durante 10 minutos.

El tegumento de maní blanchado fue provisto por la empresa “Lorenzati, Ruetsch y Cia SA”, Ticino, Córdoba, Argentina. El tegumento se almacenó a 4 °C en bolsas plásticas selladas hasta su uso posterior.

MÉTODOS

Purificación de fracciones de tegumento de maní por cromatografía en columna

A partir de la fracción Blanchado Acetato de Etilo (BAE), obtenido según se indica en el Capítulo II, se realizó una purificación por cromatografía en columna según lo descrito por Pizzolitto *et al.* (2013) y Nepote *et al.* (2005). Esta fracción fue la que presentó el mayor contenido de fenoles totales (716,14 mg EAQ/g) y mostró una alta actividad antioxidante frente al radical DPPH ($IC_{50} = 1,51 \mu\text{g/mL}$). Para el fraccionamiento y la purificación se utilizó una columna de vidrio de 10 mm de diámetro interno y 33,5 mm de largo empacada con Sephadex LH-20 como fase estacionaria. Como fase móvil se utilizaron diferentes solventes (etanol, acetona, agua) con un flujo de elución de $0,5 \pm 0,05 \text{ mL/min}$.

Se separaron tres fracciones de diferentes colores que se identificaron como Amarillo (A), Violeta (V) y Marrón (M). Para la primera fracción obtenida (denominada A) se utilizaron 440 mL de etanol; para la segunda (V) se emplearon otros 355 mL de etanol. Las fracciones se recolectaron individualmente en botellas de vidrio color caramelo y luego se les evaporó el solvente en evaporador rotatorio y bajo vacío a 35 °C para obtener las fracciones secas.

La última fracción (M) se obtuvo luego de pasar 235 mL de acetona-agua (90-10 v-v) como solvente de elución. La fracción se recolectó en botella de vidrio color caramelo y se liofilizó para obtener la fracción seca.

Todas las fracciones se conservaron a -18 °C en frascos color caramelo hasta su uso.

Rendimiento en peso seco

Se determinó el rendimiento de extracción mediante el peso de materia seca extraído en relación al tegumento inicial, según el procedimiento descrito en el Capítulo II.

Contenido de fenoles totales y flavonoides totales

Se determinaron los contenidos de fenoles y flavonoides totales de la fracción BAE y de las fracciones purificadas en la columna cromatográfica (A, V y M) según procedimientos descritos en el Capítulo II.

Identificación y cuantificación de las fracciones purificadas (A, V y M) por HPLC-ESI-MS/MS

Las fracciones purificadas por cromatografía en columna (A, V y M) se analizaron por cromatografía líquida de alta presión según lo descrito por Francisco y Resurreccion (2009) y Agüero *et al.* (2011). Se utilizó un equipo Agilent, Serie 1200 LC (Agilent, USA) acoplado a MicrOTOF Q II (Bruker Daltonics, USA). El sistema HPLC contó con un micro desgasificador de vacío, bomba binaria, inyector automático de muestras, compartimento para columna termostaticada y detector de diodos. Para el análisis estructural de los componentes presentes en las fracciones se utilizó espectrometría de masa equipada con fuente de iones, electrospray y analizador qTOF para MS y MS/MS. Se utilizó una columna Phenomenex Luna C18 termostaticada a 40 °C de 250 x 4,6 mm (5µm) con una velocidad de flujo de 0,4 mL/min. Los solventes empleados fueron ácido fórmico al 0,5% (v-v) como solvente A y metanol como solvente B. El gradiente de solvente fue el siguiente: 20% de B al inicio, se aumentó al 50% en 3 minutos y se mantuvieron las condiciones durante 5 minutos; posteriormente se aumentó B al 80% en 5 minutos, manteniendo estas últimas condiciones durante 17 minutos. El volumen inyectado fue de 40 µL. La detección ESI-MS

se llevó a cabo en modo ion negativo con la adquisición de masa entre 100 y 1500 Da. Se utilizó nitrógeno como gas de secado (7 L/min, 180 °C) y nebulizador (3,5 Bar).

Para las determinaciones MS/MS la fragmentación se logró con Auto MS2. Los análisis DAD se llevaron a cabo en el rango entre 200 y 700 nm.

La identificación de los componentes presentes en las fracciones de tegumento de maní se realizó mediante la comparación con el tiempo de retención del respectivo compuesto puro, los datos de masa y las propiedades espectrales (UV, ESI-MS y MS/MS) disponibles en la literatura.

Los resultados se expresaron en porcentaje relativo (%) en las distintas fracciones analizadas (A, V y M).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó según lo indicado en el Capítulo II.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación y caracterización de fracciones de tegumento de maní por cromatografía en columna

Las tres fracciones purificadas en la columna cromatográfica (A, V y M) a partir de la fracción BAE mostraron diferencias significativas en el rendimiento de extracción, contenido de fenoles y flavonoides totales. De las fracciones purificadas, la fracción M presentó mayor rendimiento de extracción (67,26 mg/g) en comparación con las fracciones A (6,23 mg/g) y V (8,69 mg/g) (**Tabla 3.1**).

Tabla 3.1. Rendimiento de extracción, contenido de fenoles totales y contenido de flavonoides totales del extracto Blanchado Crudo (BC), la fracción Blanchado Acetato de Etilo (BAE) y las fracciones purificadas por cromatografía en columna Amarillo (A), Violeta (V) y Marrón (M) de tegumento de maní blanchado.

Muestra	Rendimiento de Extracción (mg/g) ^a	Fenoles Totales (mg EAG ^b /g)	Flavonoides Totales (mg EQ ^c /g)
BC	179,93 ± 2,67 a	672,40 ± 9,38 d	19,97 ± 4,60 b
BAE	82,17 ± 4,30 b	716,14 ± 8,77 c	13,07 ± 0,06 c
A	6,23 ± 1,27 d	179,70 ± 1,44 e	36,22 ± 1,89 c
V	8,69 ± 0,52 d	866,12 ± 10,09 a	10,74 ± 0,25 c
M	67,26 ± 0,76 c	763,73 ± 10,40 b	12,40 ± 0,59 c

* Media seguida por diferentes letras, indican diferencias significativas entre las muestras (ANOVA, test DGC, $\alpha = 0,05$). ^(a) (mg extracto seco/g tegumento seco); ^(b) EAG: equivalente de ácido gálico; ^(c) EQ: equivalente quercetina.

Por otro lado, la fracción V presentó el mayor contenido de fenoles totales (866,12 mg EAG/g). Incluso presentó un valor superior al contenido de fenoles encontrado en la fracción BAE (716,14 mg EAG/g) y BC (672,40 EAG/g).

En cuanto al contenido de flavonoides totales, la fracción A presentó el mayor valor (36,22 mg EQ/g); valor superior al encontrado en la fracción BAE (13,07 mg EAG/g) y BC (19,97 mg EQ/g).

En algunas de las fracciones se observó que la concentración de fenoles y/o flavonoides se incrementó con el proceso de purificación. Por ejemplo, la concentración de fenoles aumentó desde el extracto BC hasta la fracción V y M (672,40 mg EAG/g en BC < 716,14 mg EAG/g en BAE < 763,73 mg EAG/g en M y 866,12 mg EAG/g en V). Por su parte, la concentración de flavonoides también aumentó desde el extracto BC (19,97 mg EQ/g) hasta la fracción A (36,22 mg EQ/g).

Las fracciones A y V fueron las primeras fracciones en eluir de la columna con etanol, y en las cuales se encontraron la mayor proporción de fenoles y flavonoides. Por su parte, la mezcla de solventes acetona-agua permitió separar la fracción M, eluir los fenoles y flavonoides remanentes y algunos compuestos no identificados.

Identificación y cuantificación de compuestos en las fracciones purificadas (A, V y M) por HPLC-ESI-MS/MS

Tabla 3.2. Porcentaje relativo de los componentes identificados en las fracciones purificadas de tegumento de maní (Amarillo, Violeta y Marrón) analizados por HPLC-ESI-MS/MS

Tiempo Retención (min)	Compuesto	[M-H]-	MS ² [M-H]-	Fracción		
				Amarillo	Violeta	Marrón
6,7	Ácido Quínico ^a	191	0	0,32	0,17	nd
10,7	Procianidina dimero tipo B ^b	577	289	14,15	1,51	nd
11,3	Catequina ^a	289	245	nc	23,73	nc
11,4	Ácido gálico ^a	169	0	nc	nd	nd
11,5	Procianidina dimero A ^{b(1)}	575	449. 289. 285	4,81	3,28	20,31
11,6	Epicatequina ^a	289	245	nc	20,28	3,88
12,3	Proantocianidina dimero ^{b(1)}	573	289	12,34	1,64	nd
12,6	Proantocianidina dimero ^b	573	447. 289. 285	nc	1,99	nd
12,8	Procianidina dimero A ^{b(2)}	575	449. 285. 289	nc	nc	52,70
13,0	Proantocianidina dimero ^{b(2)}	573	289. 447. 283	24,33	nd	nd
13,7	Procianidina dimero tipo A ^b	575	289. 449. 245	31,49	nc	nc
14,0	Resveratrol hexosido ^b	389	227	0,37	4,50	nd
17,2	Isoramnetina hexosido ^b	477	315	nc	nd	nd
18,1	Isoquercetina ^a	463	301	0,26	2,38	nd
18,4	Ácido cumárico ^a	163		nc	nd	nd
19,2	Resveratrol ^a	227	185	1,14	3,28	nd
19,6	Isoramnetina hexosido ^b	477	315	0,18	1,56	nd
19,8	Quercetina hexosido ^b	463	301	0,63	2,89	nd
20,3	Isoramnetina rutinoside ^b	623	315	0,45	1,14	nd
20,4	Isoramnetina hexosido ^b	477	315	1,04	3,03	nd
23,4	Quercetina ^a	301	179	6,68	22,45	23,09
27,2	Isoramnetina ^b	315	300	1,74	6,09	nd
28,1	Apigenina ^a	269	225	nc	nd	nd
33,6	Crisina ^a	253	209	nc	nd	nd

Procedimientos de identificación: ^a Co-análisis relativo a un compuesto puro con igual tiempo de retención y valores de masa; ^b Comparación de los MS. MS/MS y valores UV con la literatura.

Abreviaciones: nd = no detectado; nc = no cuantificado.

En la **Tabla 3.2** se muestran los compuestos identificados por HPLC-ESI-MS/MS en las fracciones purificadas de tegumento de maní (A, V y M). La mayor parte de los compuestos presentes en las fracciones son polifenoles identificados como ácidos fenólicos, flavonoides y estilbenos y otros compuestos no fenólicos como los ácidos quínico y cumárico. En la fracción A se encontraron 24 componentes diferentes, en la fracción V se identificaron 18 compuestos y en la fracción M, 6 componentes. Algunos compuestos identificados en las fracciones figuran con igual nombre, pero presentan diferentes tiempos de retención. Esto se debe a que el Masa identificó dichos compuestos como *tipos* diferentes dentro del compuesto, por lo que tienen distinta estructura molecular y diferente tiempo de retención.

La fracción A se caracterizó por presentar un ácido fenólico (ácido gálico), 16 flavonoides (catequina, epicatequina, quercetina, isoquercetina, isoramnetina, apigenina, crisina, procianidinas y proantocianidinas) y un estilbeno (resveratrol). El componente mayoritario en esta fracción fue procianidina dimero tipo A (31,49%); seguido de proantocianidina dimero (24,33%) y procianidina dimero tipo B (14,15%). Posiblemente los compuestos con mayor abundancia relativa en la fracción A (procianidina dímero tipo A y proantocianidina dímero) sean los responsables del color amarillo observado.

La fracción V se caracterizó por presentar 2 ácidos orgánicos diferentes (ácido quínico y ácido cumárico), 7 flavonoides (catequina, epicatequina, quercetina, isoquercetina, isoramnetin, procianidinas y proantocianidinas) y un estilbeno (resveratrol). Los componentes mayoritarios en esta fracción fueron catequina (23,73%); quercetina (22,45%) y epicatequina (20,28%), responsables del color violeta que caracteriza a la fracción.

En la fracción M se identificaron cuatro componentes (procianidina dimero A, catequina, epicatequina y quercetina). Los componentes mayoritarios en esta fracción fueron procianidina dimero A $MS^2[M-H]- 449.285.289$ (52,70%); quercetina (23,09%) y procianidina dimero A $MS^2[M-H]- 449.289.285$ (20,31%).

Las fracciones A y V mostraron una gran variedad de compuestos fenólicos y entre ellos uno de los más destacados que es el resveratrol, siendo la fracción V la que presentó el mayor porcentaje relativo (3,28%). Así mismo, las fracciones V y M mostraron un alto contenido de procianidinas y la fracción M fue la que presentó el mayor contenido de procianidina dimero A $MS^2[M-H]- 449.285.289$ con un porcentaje relativo de 52,70%. Las

fracciones V y M mostraron el mayor contenido de epicatequina (20,28% y 3,88%, respectivamente) y quercetina (22,45% y 23,09%, respectivamente).

Yu *et al.* (2005) identificaron en tegumento de maní crudo diferentes compuestos; entre ellos ácidos fenólicos como ácido clorogénico, ácido cafeico y ácido felúrico; flavonoides como epigallocatequina, epicatequina, catequina galato y epicatequina galato; y stilbenos como resveratrol. En las fracciones de tegumento de maní los ácidos clorogénico y felúrico no fueron detectados. La epicatequina se presentó como un componente mayoritario en la fracción A y el resveratrol principalmente en la fracción V.

Francisco y Resurrección (2009) encontraron en tegumento de maní americano de tres variedades comerciales (Virginia, Español y Runner) la presencia de ácido quínico, ácido cumárico y resveratrol. En el presente estudio se trabajó con tegumento tipo Runner donde se identificaron los mismos componentes en las fracciones A y V. Por su parte, catequinas, procianidinas y proantocianidinas fueron identificadas por Ma *et al.* (2014) en extracto metanólico de tegumento de maní blanchado; estos flavonoides se detectaron en mayor proporción en la fracción A.

Ballard *et al.* (2010) reportó la presencia de resveratrol en extractos de tegumento de maní obtenidos por extracción asistida por microondas. En el presente estudio el resveratrol se detectó solo en las fracciones purificadas A y V. Esto está indicando que el resveratrol es altamente soluble en etanol por lo que se extrae completamente con dicho solvente.

Es de destacar que, si bien las fracciones A y V se obtuvieron con el mismo solvente, existen diferencias muy marcadas en algunos de sus componentes. Los casos más llamativos son:

- catequina y epicatequina detectada pero no cuantificada en la fracción A y en alta concentración en la fracción V.
- proantocianidinas dímero con alta concentración en la fracción A y no detectada en la fracción V.
- quercetina en mayores concentraciones en V y M con respecto a la fracción A.

CONCLUSIONES

El mayor contenido de fenoles se concentra en la fracción purificada V, mientras que el mayor contenido de flavonoides en la fracción A.

En la primera fracción obtenida de la columna cromatográfica que corresponde a la fracción A, se separaron la mayor variabilidad de estructuras químicas de tipo fenólicas.

Compuestos como ácidos fenólicos, flavonoides y estilbenos se encuentran principalmente en las fracciones A y M.

Estructuras químicas como catequina, epicatequina, resveratrol y quercetina están presentes en mayor proporción en la fracción V.

Estos resultados evidencian que a medida que se avanza en las etapas de purificación se incrementa el contenido de fenoles. La mayor concentración se presenta en la fracción V. Además, dicha fracción de acuerdo a su composición química, tiene un elevado potencial antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

- Agüero M.B., Svetaz L., Sánchez M., Luna L., Lima B., López M.L., Zacchino S., Palermo J., Wunderlin D., Egly Feresin D., Tapia A. 2011. Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC-MS and GC-MS characterization and antifungal activity. *Food and Chemical Toxicology*. 49: 1970–1978.
- Anastasiadi M., Pratsinis H., Kletsas D., Skaltsounis A.-L., Haroutounian S. a. 2012. Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*. 48: 316–322.
- Appeldoorn M.M., Sanders M., Vincken J.-P., Cheynier V., Le Guernevé C., Hollman P.C.H., Gruppen H. 2009. Efficient isolation of major procyanidin A-type dimers from peanut skins and B-type dimers from grape seeds. *Food Chemistry*. 117: 713–720.
- Ballard T.S., Mallikarjunan P., Zhou K., O’Keefe S. 2010. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*. 120: 1185–1192.
- Echavarría B.Z., Franco A.S., Martínez A.M. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano. *Vitae*. 16: 126–131.
- Francisco M.L. dL. y Resurreccion A.V. a. 2009. Development of a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. *Food Chemistry*. 117: 356–363.
- Larrauri M., Demaría M.G., Ryan L.C., Asensio C.M., Grosso N.R., Nepote V. 2016. Chemical and Sensory Quality Preservation in Coated Almonds with the Addition of Antioxidants. *Journal of Food Science*. 81: 208–215.
- Larrauri M., Barrionuevo M.G., Riveros C., Mestrallet M.G., Zunino M.P., Zygadlo J.A., Grosso N.R., Nepote V. 2013. Effect of peanut skin extract on chemical stability and sensory properties of salami during storage. *Journal of the science of food and agriculture*. 93: 1751–7.

- Lee H. S. 2000. HPLC analysis of phenolic compounds. In L. M. L. Nollet (Ed.), Food analysis by HPLC (2nd ed.). New York: Marcel Dekker Inc.
- Ma Y., Kosińska-Cagnazzo A., Kerr W.L., Amarowicz R., Swanson R.B., Pegg R.B. 2014. Separation and characterization of phenolic compounds from dry-blanched peanut skins by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1356: 64–81.
- Nepote V., Grosso N.R., Guzman C. 2005. Optimization of extraction of phenolic antioxidant from peanut skins. *Journal of the science of food and argentine*. 85: 33–38.
- Nepote V., Grosso N.R., Guzman C. 2004. Radical scavenging activity of extracts of Argentine peanut skins (*Arachis Hipogaea*) in relation to its trans-resveratrol content. *The Journal of the Argentine Chemical Society*. 92: 41–49.
- Nepote V., Grosso N.R., Guzman C. 2002. Extraction of antioxidant components from peanut skins. *Grasas y Aceites*. 53(4): 391–395.
- O’Keefe S.F. y Wang H. 2006. Effects of peanut skin extract on quality and storage stability of beef products. *Meat science*. 73: 278–86.
- Pearson Murphy B.E. y Diez d’Aux R.C. 1975. The use of sephadex LH-20 column chromatography to separate unconjugated steroids. *Journal of Steroid Biochemistry*. 6: 233–237.
- Pizzolitto R.P., Dambolena J.S., Zunino M.P., Larrauri M., Grosso N.R., Nepote V., Dalcero A.M., Zygadlo J.A. 2013. Activity of natural compounds from peanut skins on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. *Industrial Crops & Products*. 47: 286–290.
- Quiñones M.A. y Aleixandre A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*. 27: 76–89.
- Rangel-Huerta O., Pastor-Villaescusa B., Aguilera C., Gil A. 2015. A Systematic Review of the Efficacy of Bioactive Compounds in Cardiovascular Disease: Phenolic Compounds. *Nutrients*. 7: 5177-5216.

- Renaud S.C., Gueguen R., Conard P., Lanzmann-Petithory D., Orgogozo J.M. & Henry O. 2004. Moderate wine drinkers have lower hypertension related mortality: a prospective cohort study in French men. *American Journal of Clinical Nutrition*. 80: 621–625.
- Sarnoski P.J., Johnson J. V., Reed K. a., Tanko J.M., O’Keefe S.F. 2012. Separation and characterisation of proanthocyanidins in Virginia type peanut skins by LC-MSn. *Food Chemistry*. 131: 927–939.
- Yu J., Ahmedna M., Goktepe I. 2010. Potential of peanut skin phenolic extract as antioxidative and antibacterial agent in cooked and raw ground beef. *International Journal of Food Science and Technology*. 45: 1337–1344.
- Yu J., Ahmedna M., Goktepe I. 2005. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chemistry*. 90: 199–206.

CAPITULO IV

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS Y LAS FRACCIONES PURIFICADAS

INTRODUCCIÓN

Las plantas contienen una amplia variedad de metabolitos secundarios con diversidad estructural. Las características estructurales de estos metabolitos están fuertemente relacionadas con su función. Los principales grupos de metabolitos secundarios en las plantas son los compuestos fenólicos, terpenos, esteroides y alcaloides (Nabavi *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2010; Asensio *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2012).

La oxidación de grasas y aceites durante el procesamiento y almacenamiento de productos alimenticios provoca cambios en las características nutricionales, organolépticas y en la calidad integral de los mismos. La oxidación se manifiesta a través de la decoloración y la generación de sabores indeseables; aunque detectar la alteración de los componentes principales, como lípidos, no siempre resulta evidente. La oxidación genera, como productos secundarios, sustancias potencialmente tóxicas por lo cual la incorporación de antioxidantes que protejan a los alimentos del deterioro oxidativo se considera una práctica tecnológica de alto impacto para prevenir este proceso (Ballard, 2008).

Los antioxidantes naturales han sido objeto de un creciente interés por parte de los consumidores debido a sus efectos beneficiosos sobre la salud en reemplazo de los antioxidantes sintéticos que, si bien presentan menor costo de obtención y son altamente eficientes, han demostrado efectos tóxicos y peligrosos para la salud (Sarmadi y Ismail, 2010).

Para que un antioxidante pueda inhibir eficazmente a un radical libre debe ser capaz de producir radicales fenoxilo en los cuales el electrón desapareado se ubica alrededor de la estructura aromática del anillo y se estabiliza por una alta energía de resonancia, es decir, los radicales antioxidantes se estabilizan según la ubicación de los radicales fenoxilo. Asimismo, la eficacia antioxidante está directamente relacionada con la estabilización de la resonancia de los radicales fenoxilo (Frankel, 2012).

Los compuestos fenólicos con electrones donantes en las posiciones *orto* y *para* son más eficaces que aquellos que tienen los electrones donantes en la posición *meta*. Los fenoles *orto* y *para*-dihídrico presentan una alta actividad antioxidante debido a su capacidad para donar átomos de hidrógeno y formar estructuras del tipo de las semiquinonas. Los antioxidantes fenólicos son más eficaces cuando todas las posiciones *orto* y *para* son sustituidas y, cuando uno o dos de los sustituyentes *orto*, es un grupo ramificado como el *ter-butilo*. Por su parte, cuando el sustituyente *para* es un metilo etilo o *n*-butil fenol, el antioxidante fenólico es más eficaz. Los sustituyentes que son capaces de donar electrones presentan mayor actividad que aquellos sustituyentes que son aceptores de electrones (Frankel, 2012).

La actividad de los antioxidantes en los alimentos no sólo depende de la reactividad química del mismo (como la capacidad para eliminar radicales libres o la capacidad para quelar diferentes metales), sino también de factores tales como la ubicación física, la interacción con otros componentes del alimento y las condiciones ambientales de conservación y procesamiento (Prakash *et al.*, 2015). Es importante mencionar que en determinadas circunstancias los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* son válidos solo para las condiciones de reacción de las sustancias utilizadas en el ensayo y dichas condiciones no son representaciones exactas de lo que ocurre en el alimento. Por ejemplo, la actividad de los antioxidantes en un alimento depende en gran medida de la capacidad para particionarse entre los lípidos y el agua (Ballard, 2008). Muchos de los ensayos *in vitro* se realizan en condiciones de ausencia de lípidos en donde el impacto de la partición del antioxidante no se evalúa y conduce a una pobre correlación entre los resultados de los ensayos *in vitro* y el rendimiento real del antioxidante en los alimentos (Vandamme *et al.*, 2015).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos está dada por la capacidad que poseen de eliminar los radicales libres, como el radical hidroxilo y el anión superóxido, y para actuar como agentes quelantes de iones metálicos (Wang *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2007; Bazytko *et al.*, 2014). Numerosos autores han realizado estudios sobre uvas, té, frutos secos, cereales y extractos de plantas donde se mencionan los potenciales beneficios para la salud de los compuestos fenólicos de origen natural (Bursal y Köksal, 2011; Meng *et al.*, 2012; Chandrasekara *et al.*, 2012; Bazytko *et al.*, 2014). Por lo tanto, el uso de productos naturales

puede ser explotado para el descubrimiento de nuevos agentes bioactivos que podrían servir para el desarrollo de conservantes de alimentos de origen natural.

El presente capítulo tiene como **objetivo general** determinar la actividad antioxidante mediante diferentes métodos *in vitro* de los extractos y fracciones purificadas obtenidas del tegumento de maní.

Los **objetivos específicos** fueron evaluar la actividad antioxidante de los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní (blanchado y tostado) por medio de técnicas *in vitro* y por la aplicación de los mismos en un sistema de lípidos puros (aceite refinado de girasol).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Para los experimentos realizados en este Capítulo, se trabajó con los extractos crudos (BC y TC), las fracciones purificadas por solventes (BAE, TAE, BA y TA) y las fracciones purificadas por cromatografía en columna (A, V y M) obtenidas según lo descrito en las metodologías correspondientes a los Capítulos II y III.

Para el ensayo de oxidación acelerada se utilizó aceite refinado de girasol con agregado de Vitamina E según el rotulado del producto (Natura, Aceitera General Deheza, General Cabrera, Córdoba, Argentina).

MÉTODOS

Actividad Antioxidante in Vitro de los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní

Actividad secuestrante de radicales libres por DPPH

Se determinó la actividad secuestrante de radicales libres según Nepote *et al.* (2004a).

Se trabajó con una dilución conocida en etanol-agua (70:30, v/v) de cada una de las muestras (300 µg/mL). Se tomaron diferentes alícuotas de la dilución (5, 25 y 50 µL) y se agregaron a 1,5 mL de una solución metanólica del radical DPPH (20 µg/mL) para obtener una concentración final de 1, 5 y 10 µg/mL, respectivamente. La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 5 minutos en oscuridad. Posteriormente se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 517 nm. Se utilizó el antioxidante sintético butil hidroxitolueno (BHT) como control positivo. El porcentaje de inhibición del radical DPPH por los extractos y fracciones purificadas se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de DPPH} = \left(1 - \frac{A_{(DPPH)} - A_{b(DPPH)}}{A_{0(DPPH)}} \right) \times 100 \text{ (ec. 4.1.)}$$

donde: $A_{(DPPH)}$ es la absorbancia de la solución de DPPH con el extracto o fracción de tegumento de maní

$A_{b(DPPH)}$ es la absorbancia de metanol con el extracto o fracción de tegumento de maní.

$A_{0(DPPH)}$ es la absorbancia de la solución de DPPH.

Se calculó la concentración inhibitoria 50% (IC₅₀) a partir de la curva obtenida de la gráfica del porcentaje de inhibición vs la concentración final de la muestra (Quiroga *et al.*, 2011).

Actividad quelante de ion metálico (ion ferroso)

Se determinó la actividad quelante del ion ferroso (Fe²⁺) según la metodología propuesta por Yamaguchi *et al.* (2000) y Bursal y Köksal (2011).

El procedimiento realizado fue el siguiente: se diluyó la muestra en etanol-agua (70:30 v/v) a diferentes concentraciones (10 – 100 µg/mL). Se tomó 0,25 mL de la dilución y se mezcló con igual volumen de una solución acuosa de FeSO₄ (1 mM). Las muestras y el FeSO₄ se prepararon en sodio dodecil sulfato al 1%. Posteriormente se agregó 0,5 mL de buffer Tris-HCl (pH 7,4) y 0,5 mL de 2,2-bipiridil (0,1% en 0,2 M de HCl). Por último, se adicionó a la reacción 0,4 mL de hidroxilamina-HCl (10% p/v), 2,5 mL etanol y 0,6 mL de agua Milli Q. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 522 nm. Se utilizó EDTA como control positivo. La capacidad quelante frente al ion ferroso de los extractos y fracciones purificadas se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad Quelante} = \left(1 - \frac{A_{(muestra)}}{A_{(control)}} \right) \times 100 \text{ (ec. 4.2.)}$$

donde: A_(muestra) es la absorbancia de la reacción con el extracto o fracción de tegumento de maní.

A_{b(control)} es la absorbancia de la reacción.

Se calculó la concentración inhibitoria 50% (IC₅₀) a partir de la curva obtenida de la gráfica del porcentaje de inhibición vs la concentración final de la muestra (Quiroga *et al.*, 2011).

Capacidad de capturar radicales hidroxilos

Se determinó la capacidad de capturar radicales hidroxilos (OH^\cdot) según lo descrito por Gao *et al.* (2010) con modificaciones.

Se diluyó la muestra en etanol-agua (70:30 v/v) a diferentes concentraciones (10 – 100 $\mu\text{g/mL}$). Se tomó 0,10 mL de la dilución y se mezcló con 0,2 mL de buffer fosfato (35 mM, pH 7,4), 0,2 mL de deoxiribosa (10 mM) y 0,2 mL de EDTA (170 mM). Posteriormente se agregó 0,1 mL de H_2O_2 (10 mM), 0,1 mL de ácido ascórbico (2 mM) y 0,1 mL de cloruro férrico (1 mM). La mezcla se agitó en vortex y se incubó en baño de agua a 37 °C durante 90 minutos. Luego del tiempo de incubación se agregó 1 mL de ácido tricloroacético (1% v/v) y 1 mL de ácido tiobarbitúrico (1% v/v). Por último, se llevó a baño de agua hirviendo durante 15 minutos. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 532 nm. Se utilizó ácido ascórbico como control positivo. La capacidad para capturar el radical hidroxilo por los extractos y fracciones purificadas se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Capturar Rad. Hidroxilo} = \left(1 - \frac{A_{(muestra)}}{A_{(control)}} \right) \times 100 \text{ (ec. 4.3.)}$$

donde: $A_{(muestra)}$ es la absorbancia de reacción con el extracto o fracción de tegumento de maní.

$A_{(control)}$ es la absorbancia de la reacción.

Se calculó la concentración inhibitoria 50% (IC_{50}) a partir de la curva obtenida de la gráfica del porcentaje de inhibición vs la concentración final de la muestra (Quiroga *et al.*, 2011)

Capacidad de capturar anión superóxido

Se determinó la capacidad de capturar el anión superóxido (O_2^-) según Okamura *et al.* (1993).

La muestra se diluyó en agua Milli Q a diferentes concentraciones (10 – 100 $\mu\text{g/mL}$). Se tomó 0,5 mL de la dilución y se agregó a 1,0 mL de una mezcla de xantina (0,4 mM) y NBT (0,24 mM) en buffer fosfato (0,1 M; pH 8,0); además se agregó 1,0 mL de la enzima xantina oxidasa (0,049 U/mL) disuelta en buffer fosfato (pH 8,0). La reacción se incubó en baño de agua a 37 °C durante 40 minutos. Posteriormente, se agregó 2,0 mL de sodio dodecil sulfato (69 mM). Se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 560 nm. Se utilizó BHT como control positivo. La capacidad para capturar el anión superóxido por los extractos y fracciones purificadas se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Capturar Anión Superóxido} = \left(1 - \frac{A_{(muestra)}}{A_{(control)}} \right) \times 100 \text{ (ec. 4.4.)}$$

donde: $A_{(muestra)}$ es la absorbancia de reacción con el extracto o fracción de tegumento de maní.

$A_{(control)}$ es la absorbancia de la reacción.

Se calculó la concentración inhibitoria 50% (IC_{50}) a partir de la curva obtenida de la gráfica del porcentaje de inhibición vs la concentración final de la muestra (Quiroga *et al.*, 2011).

Actividad antioxidante de los extractos y fracciones de tegumento de maní en aceite de girasol

La actividad antioxidante de los extractos crudos (BC y TC), las fracciones purificadas con solventes (BAE, TAE, BA y TA) y las fracciones purificadas por cromatografía en columna (A, V y M) se determinó mediante un ensayo de oxidación acelerada (Quiroga *et al.*, 2011).

Las muestras se prepararon mezclando 0,2 % (p/p) de cada extracto o fracción purificada en 7 mL de aceite refinado de girasol. Un equipo de ultrasonido fue empleado para agitar las partículas de las muestras en el aceite. Se utilizó BHT (0,02%, p - p) como control positivo y aceite de girasol sin el agregado de aditivos como muestra control. El

Código Alimentario Argentino (CAA, 2012) establece un máximo de 0,02% de BHT y otros antioxidantes sintéticos en los aceites vegetales, razón por la cual se utilizó dicha concentración. Las muestras fueron almacenadas en un horno de laboratorio a 60 ± 1 °C durante 4 días y se determinó la oxidación de los lípidos mediante el índice de peróxidos (IP) (AOAC 1990) cada 24 horas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con el programa InfoStat versión 2013p (Di Rienzo *et al.*, 2013). Se calcularon medias y error estándar. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA, $\alpha = 0,05$) y test posterior de DGC para encontrar diferencias significativas entre las muestras.

Se estimaron coeficientes de Pearson para establecer correlaciones entre las variables dependientes. El análisis de componentes principales (ACP) se realizó en la matriz de correlación de los datos estandarizados de todas las variables evaluadas en este capítulo y en los capítulos II y III para los diferentes extractos y fracciones (rendimiento de extracción, fenoles y flavonoides totales, IC₅₀ para las técnicas de actividad antioxidante, índice de peróxido). El propósito del ACP fue explorar las asociaciones entre las variables y entre los diferentes extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní. Se realizó un análisis de conglomerados (AC) para obtener grupos de extractos/fracciones de tegumento de maní con características similares. Las similitudes entre las muestras se calcularon sobre la base de la distancia euclidiana; y los grupos de los extractos/fracciones con características similares se obtuvieron utilizando el promedio de vinculación o el método de agrupamiento de pares no ponderado utilizando una media aritmética (UPGMA). Medias, desvíos estándar, ANOVA y test de rango múltiple DGC se llevaron a cabo en las variables de los extractos/fracciones de los grupos obtenidos a partir del análisis de conglomerados (Nepote *et al.*, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad Antioxidante *in Vitro* de los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní

En la **Tabla 4.1.** se muestran los valores de IC₅₀ correspondientes a la actividad quelante del ion ferroso y a la actividad secuestrante de radicales libres por DPPH, radical hidroxilo y anión superóxido de los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní. Estas técnicas son comúnmente utilizadas para medir la actividad antioxidante en extractos (Wang *et al.*, 2007; Costa de Camargo *et al.*, 2015). En general, valores altos de IC₅₀ indican una baja actividad del compuesto frente al ion o radical (Echavarría *et al.*, 2009).

Al comparar los extractos crudos de tegumento de maní blanchado y tostado, se observó que BC presentó mayor actividad (menor IC₅₀) frente a la actividad quelante del ion ferroso (59,59 mg/mL), el radical hidroxilo (9,58 mg/mL) y el anión superóxido (20,75 mg/mL) que el extracto TC (73,00; 15,37 y 29,01 mg/mL para cada test indicado, respectivamente) (**Tabla 4.1.**) Ambos extractos crudos (BC y TC) mostraron actividades similares frente al radical DPPH.

En cuanto a las fracciones purificadas con solventes a partir de los extractos crudos, BAE y TAE presentaron mayor actividad frente al radical DPPH e ion ferroso que las fracciones acuosas BA y TA. La fracción TA mostró mayor actividad frente al radical hidroxilo que la fracción TAE; lo contrario ocurrió con el tegumento blanchado, ya que la fracción BAE presentó mayor actividad frente al radical hidroxilo que la fracción BA. Por último, la fracción TAE presentó mayor actividad en la capacidad para capturar el anión superóxido que la fracción TA y, en el tegumento blanchado, la fracción BA mostró mayor actividad en la capacidad para capturar el anión superóxido que la fracción BAE (**Tabla 4.1.**).

Tabla 4.1. Valores de los IC₅₀ de la actividad secuestrante de radicales libres (DPPH), actividad quelante del ion ferroso, capacidad de capturar el radical hidroxilo y el anión superóxido de extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní.

Muestras ^a	IC ₅₀ (µg / mL) ^b			
	Actividad secuestrante DPPH	Actividad quelante del ion ferroso (Fe ²⁺)	Capacidad de capturar el radical hidroxilo	Capacidad de capturar el anión superóxido
TC	2,33±0,38 d	73,00±0,52 c	15,37±0,38 a	29,01±0,46 d
BC	2,01±0,08 d	54,59±1,69 d	9,58±1,24 c	20,75±2,90 e
TA	5,62±0,17 a	108,54±6,76 a	10,47±1,36 c	41,25±7,23 c
BA	3,03±0,08 c	74,67±2,11 c	16,40±0,89 a	49,62±6,08 c
TAE	2,09±0,16 d	30,12±1,74 f	12,53±0,46 b	18,01±2,51 e
BAE	1,51±0,02 e	54,69±0,83 d	8,97±0,54 c	70,31±1,41 b
A	2,54±0,20 c	104,78±2,66 b	4,13±0,28 d	158,68±5,29 a
V	0,98±0,03 f	47,48±0,96 d	13,01±0,64 b	51,04±0,59 c
M	1,04±0,06 f	25,75±3,18 f	1,79±0,92 d	34,41±3,22 d
BHT ^c	3,68±0,03 b			
EDTA ^d		104,38±4,57 a-b		
Acido ascórbico			9,61±0,54 c	47,03±0,07 c

^a Abreviaturas. TC = extracto tostado crudo; BC = extracto blanchado crudo; TA = fracción tostado acuoso; BA = fracción blanchado acuoso; TAE = fracción tostado acetato de etilo; BAE = fracción blanchado acetato de etilo; A = fracción amarilla; V = fracción violeta; M = fracción marrón.

^b IC₅₀ es el valor de actividad secuestrante/quelante de la muestra para inhibir el 50% del radical/ion. ^c BHT = butil hidroxitolueno. ^d EDTA = etilen diamino tetra acético. Los valores se expresan como media ± EE (n = 3). Valores con igual letra en la misma columna no presentan diferencias significativas (ANOVA y DGC test, *p* = 0,05)

Con respecto a las fracciones purificadas por cromatografía en columna, las fracciones V y M presentaron mayor actividad frente al radical DPPH, ion ferroso y anión superóxido que la fracción A. Posiblemente esta mayor actividad de las fracciones A y M se deba a los compuestos mayoritarios presentes en dichas fracciones como catequina, quercetina, epicatequina y resvertarol (fracción V) y procianidina dimero A y quercetina (fracción M). La fracción M mostró mayor actividad frente a la capacidad para capturar el radical hidroxilo que las fracciones A y V.

En general, los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní presentaron mayor actividad frente al radical DPPH que el antioxidante sintético BHT utilizado como

control positivo, con la excepción de la fracción TA. También presentaron mayor actividad quelante del ion ferroso que EDTA (agente quelante sintético usado como referencia comparativa), con excepción de las fracciones TA y A. En cuanto a la capacidad para capturar el radical hidroxilo, las fracciones V y M mostraron mayor actividad que el ácido ascórbico utilizado como referencia. En relación a la capacidad de capturar el anión superóxido, los extractos TC y BC y las fracciones TAE y M presentaron mayores actividades que el ácido ascórbico usado como control positivo.

Según estos resultados, los extractos y fracciones purificadas podrían tener un efecto protector de tipo antioxidante previniendo o disminuyendo la oxidación lipídica en alimentos con alto contenido graso.

En trabajos anteriores, Nepote *et al.* (2002; 2004a; 2005) publicaron resultados similares en la actividad secuestrante de radicales libres (DPPH) en extractos crudos y fracciones purificadas con acetato de etilo de tegumento de maní argentino. Wang *et al.* (2007) reportaron valores de IC₅₀ frente al radical DPPH de 30,8 mg/mL en extractos etanólicos de tegumento de maní americano.

Algunos autores estudiaron la actividad quelante y secuestrante del hierro, radical hidroxilo y anión superóxido en diferentes extractos de tegumento de maní. Gaafar *et al.* (2015) publicaron una actividad quelante de metales del 76,71% en extractos etanólicos de tegumento de maní (concentración 100 mg/mL). Costa de Camargo *et al.* (2015) publicaron valores de 884,2 μ mol de equivalente de catequina/peso seco frente a la capacidad de capturar el radical hidroxilo de extractos de tegumento de maní irradiados (éter di etílico:acetato de etilo, 1:1). Por su parte, Wang *et al.* (2007) reportaron un valor de IC₅₀ de 25,4 mg/mL para la capacidad de capturar el anión superóxido en extractos etanólicos de tegumento de maní americano (etanol:agua, 50:50).

Actividad antioxidante de los extractos y fracciones de tegumento de maní en aceite de girasol

La eficiencia antioxidante de los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní sobre un alimento se determinó mediante un ensayo de oxidación acelerada en aceite de girasol refinado. La composición de ácidos grasos y tocoferoles del aceite utilizado se muestra en la **Tabla 4.2**. El CAA (2012) permite el agregado de tocoferoles naturales o sintéticos al aceite de girasol en una concentración que no exceda la necesaria para el efecto deseado. El índice de peróxido (IP) se utilizó como indicador en las etapas iniciales de la oxidación de lípidos ya que constituye un parámetro útil para medir la calidad de la grasa y el aceite (Hasiewicz-Derkacz *et al.*, 2015). Los valores de peróxidos en las muestras de aceite de girasol durante el almacenaje se muestran en la **Tabla 4.3**.

Tabla 4.2. Composición de ácidos grasos y contenido de tocoferoles del aceite de girasol utilizado.

Ácidos Grasos	Porcentajes (g / 100 g)
Monoinsaturado	83,68
Oleico (18:1)	81,63
Palmitoleico (16:1)	0,09
Eicosenoico (20:1)	0,96
Poliinsaturado	3,79
Linoleico (18:2)	3,60
Linolénico (18:3)	1,92
Saturado	9,85
Palmítico (16:0)	3,68
Esteárico (18:0)	4,32
Behénico (22:0)	1,00
Contenido de Tocoferol (Vitamina E)	0,060

Tabla 4.3. Índice de peróxidos de las muestras en aceite de girasol durante el almacenaje a 60 °C.

Muestra ^a	Día 1 *	Día 2 *	Día 3 *	Día 4 *
Control	2,66±0,10a	7,25±3,00a	21,02±2,30b	62,04±11,00b
TC	3,46±0,40b	4,94±0,40a	20,05±0,50b	34,33±5,90a
BC	3,04±0,10b	3,89±0,30a	15,95±0,70a	39,68±0,30a
TA	3,79±0,30b	5,04±0,10a	25,87±1,30b	62,45±2,40c
BA	4,01±0,30b	6,2±0,10a	24,34±1,80b	47,63±3,30b
TAE	3,37±0,60b	3,21±0,70a	23,6±1,80b	36,43±1,60a
BAE	2,57±0,10a	4,05±0,30a	20,13±2,40b	30,2±1,50a
A	3,14±0,10b	4,49±0,20a	20,07±0,60b	30,62±1,00a
V	2,4±0,10a	4,5±0,00a	21,86±1,50b	29,8±0,00a
M	2,4±0,10a	4,53±0,10a	21,82±0,60b	37,23±4,00a
BHT	2,59±0,20a	3,82±0,40a	24,88±2,20b	37,99±4,20a

^a Abreviaturas. TC = extracto tostado crudo; BC = extracto blanchado crudo; TA = fracción tostado acuoso; BA = fracción blanchado acuoso; TAE = fracción tostado acetato de etilo; BAE = fracción blanchado acetato de etilo; A = fracción amarilla; V = fracción violeta; M = fracción marrón.

*Medias y EE, n=3. Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas entre las muestras (ANOVA y DGC test, $p = 0,05$).

El valor inicial de IP (día 0) del aceite de girasol fue 1,88 meq O₂/kg. Posteriormente, el IP aumentó durante el almacenamiento en todas las muestras. Al día 4 de almacenaje, el aceite de girasol control y la muestra con el agregado de la fracción TA mostraron el mayor IP, seguido de la muestra BA. La muestra con el extracto BC y las demás fracciones presentaron bajos valores de IP al final del almacenamiento (día 4). En el CAA (2012) se establece un límite máximo permitido de IP de 10 meq O₂/kg para los productos de maní. Según el presente estudio, valores superiores a 10 meq O₂/kg se alcanzaron a partir del día 3 de almacenaje para todas las muestras.

Nepote *et al.* (2002, 2004b) publicaron la actividad antioxidante del extracto crudo de tegumento de maní argentino en aceite de girasol y en la aplicación de dicho extracto en un producto alimenticio como maní tostado con miel. En ambos estudios el tratamiento control presentó valores superiores a los tratamientos con el agregado del extracto de tegumento de maní. Inclusive en el estudio con aceite de girasol, los extractos mostraron un IP inferior al antioxidante sintético BHT. Larrauri *et al.* (2013) reportaron un efecto protector

del extracto crudo de tegumento de maní frente a la oxidación lipídica en salame luego de 42 días de almacenamiento proporcional a la concentración del extracto. El tratamiento control presentó los mayores valores de IP, seguido por el tratamiento de menor concentración del extracto (0,02%), luego por el tratamiento con mayor concentración del extracto (0,1%) y, por último, el tratamiento con BHT mostró los menores valores de IP.

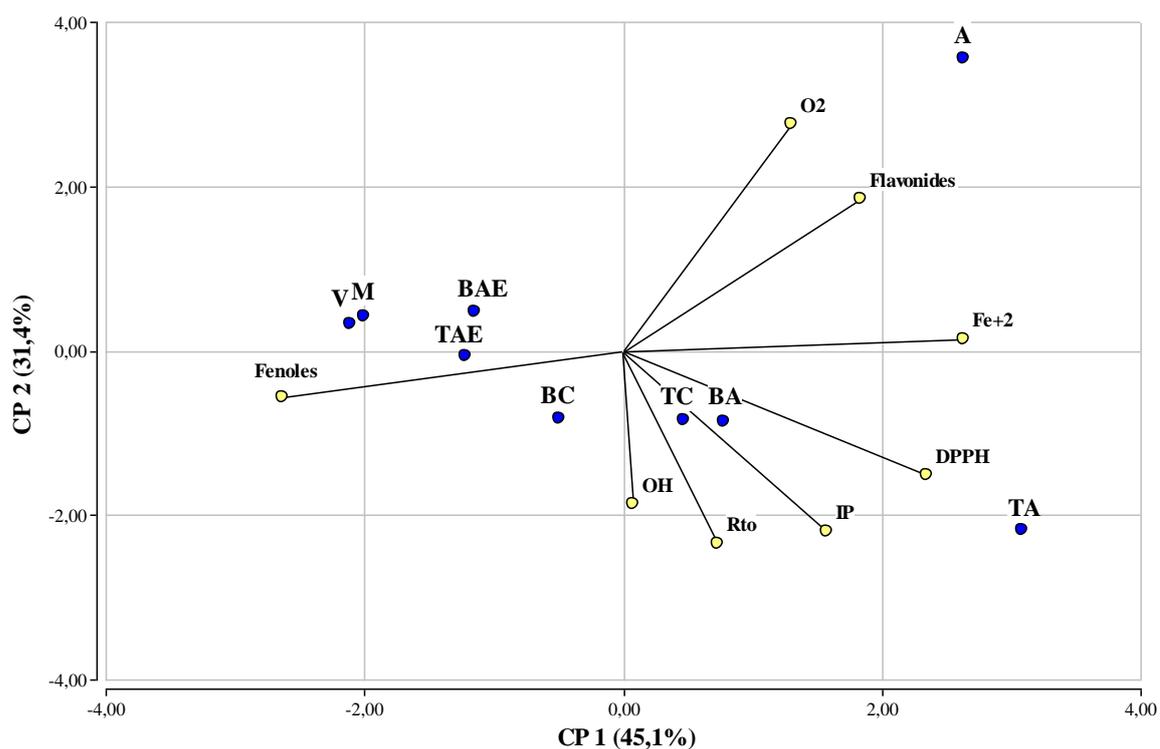
Los resultados obtenidos en el presente estudio indican de los extractos (TC y BC) y las fracciones purificadas (BAE, A, V y M) mostraron similar actividad antioxidante en aceite de girasol respecto al tratamiento con el antioxidante sintético BHT.

Análisis de componentes principales y conglomerados

El gráfico de coordenadas obtenido a partir de las dos primeras componentes principales (CP) del análisis de componentes principales (ACP) se muestra en la **Figura 4.1**. Las variables se representaron mediante vectores y los tratamientos mediante puntos. Las dos primeras CP del ACP explicaron 77% de la variabilidad total de los tratamientos. Este porcentaje se considera aceptable para establecer correlaciones entre las variables. En el ACP, la dispersión de los puntos indica una alta variabilidad entre los tratamientos: ángulos entre los vectores menores a 90° indican asociaciones positivas entre las variables y ángulos cercanos a 180° indican asociaciones negativas entre las variables.

En el ACP de la **Figura 4.1**, la variable fenoles totales se ubicó en el lado izquierdo del gráfico y se asoció con las fracciones purificadas V, M, BAE y TAE. Estas fracciones se agruparon en el análisis de conglomerados debido a su similitud teniendo en cuenta todas las variables evaluadas. Las demás variables y tratamientos se ubicaron en el lado derecho del gráfico.

Las variables contenido de flavonoides totales y el IC₅₀ del radical DPPH e ion ferroso formaron ángulos cercanos a 180° con el contenido de fenoles totales, lo que indicó una asociación negativa entre ellas. Esta asociación indica que a mayor contenido de fenoles disminuyen los valores de IC₅₀ y, por lo tanto, mayor actividad antioxidante.

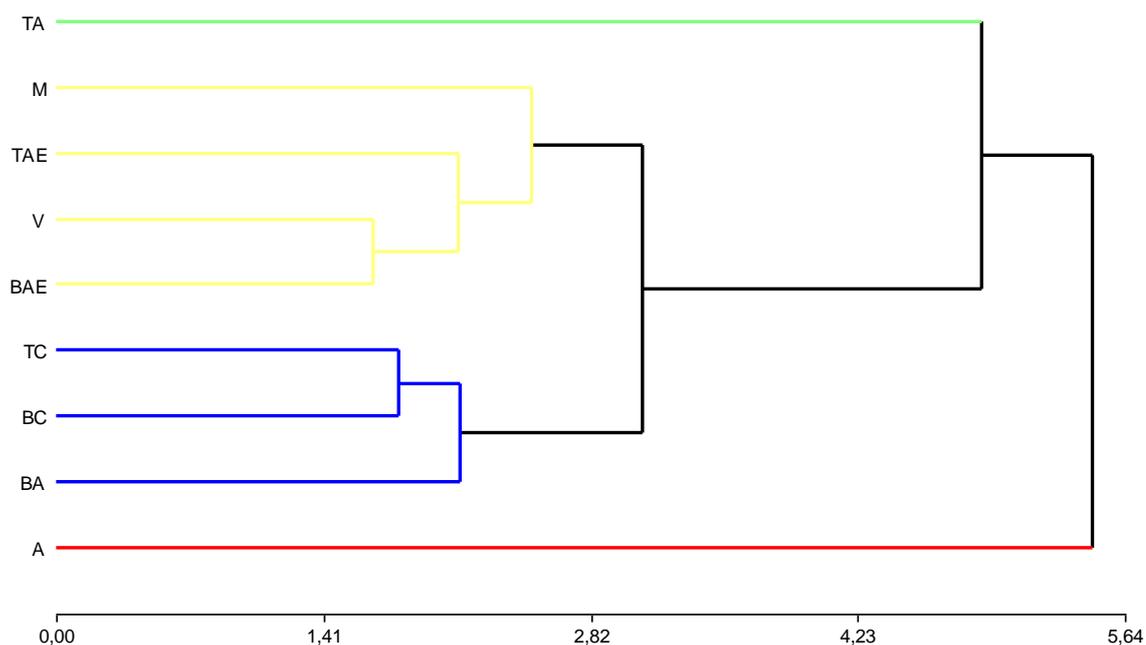


Abreviaturas. TC = extracto tostado crudo; BC = extracto blanchado crudo; TA = fracción tostado acuoso; BA = fracción blanchado acuoso; TAE = fracción tostado acetato de etilo; BAE = fracción blanchado acetato de etilo; A = fracción amarilla; V = fracción violeta; M = fracción marrón.

Figura 4.1. Gráfico de coordenadas de la primera y segunda componente del análisis de componentes principales. Variables: rendimiento de extracción (Rto.), fenoles totales, flavonoides totales, índice de peróxido (IP), y los IC_{50} para el radical DPPH, para el ion ferroso (Fe+2), radical hidroxilo (OH) y anión superóxido (O2). Tratamientos: extractos crudos (BC y TC) y fracciones purificadas (TAE, BAE, TA, BA, A, V y M) de tegumento de maní.

Los tratamientos V, M, BAE y TAE también se asociaron negativamente con la variable contenido de flavonoides totales, pero positivamente con el IC_{50} del radical DPPH e ion ferroso, indicando una alta actividad de dichos compuestos frente a las variables mencionadas. La fracción A se asoció principalmente con un alto contenido de flavonoides totales y con un alto IC_{50} para la capacidad para capturar el anión superóxido (baja actividad frente al anión superóxido). La fracción TA se asoció con altos valores de IP e IC_{50} del radical DPPH. Los extractos y fracciones BC, TC y BA se agruparon entre sí y se asociaron con altos valores de rendimiento de extracción, IP e IC_{50} del radical hidroxilo.

El coeficiente de correlación de Pearson entre las variables evaluadas presentó un resultado similar a la asociación observada en el gráfico (**Figura 4.1.**). Se encontraron correlaciones positivas y significativas entre el contenido de flavonoides totales y el IC₅₀ para el anión superóxido ($r = 0,66$); entre los IC₅₀ para el radical DPPH y el ion ferroso ($r = 0,74$), y entre el IC₅₀ del radical DPPH y el IP ($r = 0,76$). Se detectaron correlaciones negativas entre el contenido de fenoles totales y variables como contenido de flavonoides totales ($r = -0,76$), IC₅₀ del ion ferroso ($r = -0,88$) y el IC₅₀ del radical DPPH ($r = -0,70$).



^a Abreviaturas. TC = extracto tostado crudo; BC = extracto blanchado crudo; TA = fracción tostado acuoso; BA = fracción blanchado acuoso; TAE = fracción tostado acetato de etilo; BAE = fracción blanchado acetato de etilo; A = fracción amarilla; V = fracción violeta; M = fracción marrón.

Figura 4.2. Dendrograma proveniente del análisis de conglomerados de los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní considerando las variables: rendimiento de extracción, fenoles totales, flavonoides totales, índice de peróxido (IP), y el IC₅₀ del radical DPPH, ion ferroso, radical hidroxilo y anión superóxido.

En la **Tabla 4.4.** se muestran las medias de las variables estudiadas en los grupos formados a partir del análisis de conglomerados presentados en la **Figura 4.2.** Las muestras se asociaron en 4 grupos: grupo 1 formado por BAE, TAE, M y V; grupo 2 integrado por BC, TC y BA; grupo 3 formado por TA y el grupo 4 lo conformó la muestra A. Los rendimientos de extracción más altos se encontraron en el grupo 2 (BC, TC y BA) y grupo 3 (TA). Las fracciones purificadas (BAE, TAE, V y M) que forman el grupo 1, presentaron

mayor contenido de fenoles totales y menores IC₅₀ para el radical DPPH y el ion ferroso. El grupo 4 (A) presentó el menor contenido de fenoles totales, pero el mayor contenido de flavonoides totales e IC₅₀ de anión superóxido.

Tabla 4.4. Rendimiento de extracción, fenoles totales, flavonoides totales, índice de peróxido (IP) y los IC₅₀ de la actividad secuestrante de radicales libres (DPPH), actividad quelante del ion ferroso, capacidad de capturar el radical hidroxilo y el anión superóxido de los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní agrupados según el análisis de conglomerados (**Figura 4.2**).

Variable	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
	(BAE, TAE, M, V) ^a n = 3 x 4	(BC, TC, BA) ^a n = 3 x 3	(TA) ^a n = 3 x 1	(A) ^a n = 3 x 1
Rendimiento de extracción	44,27±9,40 a	148,32±12,81 b	148,31±1,82 b	6,22±0,74 a
Fenoles totales	754,96±21,73 d	549,43±37,07 c	295,06±0,83 b	179,7±0,83 a
Flavonoides totales	14,05±1,07 a	20,73±0,80 b	16,65±0,16 a	36,22±1,09 c
IC₅₀ DPPH	1,40±0,14 a	2,46±0,19 b	5,62±0,17 c	2,54±0,20 b
IC₅₀ ion ferroso	39,51±3,70 a	67,42±3,31 b	41,25±7,23 c	104,77±2,66 c
IC₅₀ hidroxilo	9,08±1,38 b	13,79±1,15 b	10,47±1,36 b	4,12±0,28 a
IC₅₀ anión superóxido	43,44±5,93 a	33,13±4,71 a	41,25±7,23 a	158,68±5,29 b
IP (día 4)	33,42±1,42 a	40,55±2,75 b	62,45±2,38 c	30,62±1,02 a

^a Abreviaturas. TC = extracto tostado crudo; BC = extracto blanchado crudo; TA = fracción tostado acuoso; BA = fracción blanchado acuoso; TAE = fracción tostado acetato de etilo; BAE = fracción blanchado acetato de etilo; A = fracción amarilla; V = fracción violeta; M = fracción marrón.

*Media y EE (n=3). Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas entre las muestras (ANOVA y DGC test, $p = 0,05$).

Los grupos 1 y 4 presentaron el menor valor de IP en el ensayo de oxidación acelerada. Las fracciones de acetato de etilo (BAE y TAE) y las fracciones purificadas (V y M) que forman el grupo 1, presentaron el mayor contenido de fenoles totales y el menor IC₅₀ para el radical DPPH, ion ferroso y anión superóxido y, además, el menor valor de IP en el ensayo de oxidación acelerada. El DPPH es un radical que es capturado por sustancias con alto potencial antioxidante. Este tipo de sustancias se encuentran en mayor proporción en las fracciones del grupo 1, este comportamiento posiblemente se deba a los compuestos

presentes en las mismas como quercetina, catequina, epicatequina, resveratrol y procianidinas. Por lo tanto, se puede considerar que las muestras del grupo 1 son los extractos y fracciones de tegumento de maní con las mejores propiedades antioxidantes y, efectivamente, este tipo de sustancias muestran una mayor actividad antioxidante en el ensayo de oxidación acelerada (test de oven). Los resultados evidencian que las fracciones purificadas presentan diferentes mecanismos antioxidantes lo que probablemente se asocia a las diferencias respecto a la composición química.

CONCLUSIONES

La partición con acetato de etilo y la separación de fracciones en columna cromatográfica incrementan el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante en las fracciones V y M.

La fracción purificada V tiene mejor actividad antioxidante que el extracto crudo.

Las fracciones V y M presentan mayor contenido de fenoles totales y se asocian a mayor actividad del radical DPPH, anión superóxido y actividad quelante del ion ferroso.

La fracción A, a pesar de tener bajo contenido de fenoles, muestra una alta actividad en el indicador radicales hidroxilos.

En función de los resultados observados, la fracción V es la que presenta una mayor actividad antioxidante. Por la tanto, se espera que cuando dicha fracción se evalúe en un producto alimenticio muestre una buena propiedad conservante.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC 1990. Official Methods of Analysis of the AOAC. Washington, DC, USA. Association of Official Analytical Chemists. pp.
- Asensio C.M., Nepote V., Grosso N.R. 2012. Sensory Attribute Preservation in Extra Virgin Olive Oil with Addition of Oregano Essential Oil as Natural Antioxidant. *Journal of Food Science*. 77(9): 294 – 301.
- Ballard T.S. 2008. Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidant Compounds from Peanut Skins. Tesis Doctoral. Blacksburg, Virginia. Estados Unidos. 156 pp.
- Bazytko A., Parzonko A., Jez W., Osińska E., Kiss A.K. 2011. Inhibition of ROS production, photoprotection, and total phenolic, flavonoids and ascorbic acid content of fresh herb juice and extracts from the leaves and flowers of *Tropaeolum majus*. *Industrial Crops and Products*. 55: 19–24.
- Bursal E. y Köksal E. 2011. Evaluation of reducing power and radical scavenging activities of water and ethanol extracts from sumac (*Rhus coriaria L.*). *Food Research International*. 44: 2217–2221.
- Chandrasekara A., Naczek M., Shahidi F. 2012. Effect of processing on the antioxidant activity of millet grains. *Food Chemistry*. 133: 1–9.
- CAA. 2012. Capítulo VII, Alimentos Grasos. (Artículo 523bis - Res 2012, 19.10.84). En: *Código Alimentario Argentino. Ley 18.284 (18.7.1969)*. Ed SRL De la Canal y Asociados. 164-165 pp.
- Costa de Camargo A., Bismara Regitano-d'Arce M.A., Gallo C.R., Shahidi F. 2015. Gamma-irradiation induced changes in microbiological status, phenolic profile and antioxidant activity of peanut skin. *Journal of Functional Foods*. 12: 129–143.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. 2013. *InfoStat, versión 2013p*. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

- Echavarría B.Z., Franco A.S., Martínez A.M. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano. *Vitae*. 16: 126–131.
- Frankel E.N. 2012. *Lipid oxidation*. WoodHead Publishing. Filadelfia, Estados Unidos. 470 pp.
- Gaafar A.A., Mahmoud K.M., Salama Z.A. 2015. Antioxidant potential activity and cytotoxicity effects of different parts of peanuts (*Arachis hypogea L.*). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 6: 19–32.
- Gao T., Bi H., Lu J. 2010. Structure elucidation and antioxidant activity of a novel α -(1→3),(1→4)-D-glucan from *Aconitum kusnezoffii* Reichb . *International journal of biological macromolecules*. 46: 85–90.
- Hasiewicz-Derkacz K., Kulma A., Czuj T., Prescha A., Żuk M., Grajzer M., Marcin Łukaszewicz M., Szopa J. 2015. Natural phenolics greatly increase flax (*Linum usitatissimum*) oil stability. *BMC Biotechnology*. 15(62): 1-14
- Kong K.W., Mat-Junit S., Aminudin N., Ismail A., Abdul-Aziz A. 2012. Antioxidant activities and polyphenolics from the shoots of *Barringtonia racemosa* (L.) Spreng in a polar to apolar medium system. *Food Chemistry*. 134: 324–332.
- Larrauri M., Barrionuevo M.G., Riveros C., Mestrallet M.G., Zunino M.P., Zygodlo J.A., Grosso N.R., Nepote V. 2013. Effect of peanut skin extract on chemical stability and sensory properties of salami during storage. *Journal of the science of food and agriculture*. 93: 1751–7.
- Meng J.F., Fang Y.L., Qin M.Y., Zhuang X.F., Zhang Z.W. 2012. Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (*Vitis davidii Foex*) in Chongyi County (China). *Food Chemistry*. 134: 2049–2056.
- Nabavi S.F., Ebrahimzadeh M.A., Nabavi S.M., Eslami B. 2010. Antioxidant activity of flower, stem and leaf extracts of *Ferula gummosa Boiss*. *Grasas y aceites*. 61: 244–250.
- Nepote V., Grosso N.R., Guzman C. 2002. Extraction of antioxidant components from peanut skins. *Grasas y Aceites*. 53: 391–395.

- Nepote V., Grosso N.R., Guzman C. 2004a. Radical scavenging activity of extracts of Argentine peanut skins (*Arachis Hipogaea*) in relation to its trans-resveratrol content. *The Journal of the Argentine Chemical Society*. 92: 41–49.
- Nepote V., Mestrallet M.G., Grosso N.R. 2004b. Natural Antioxidant Effect from Peanut Skins in Honey-roasted Peanuts. *Journal of Food Science*. 69: 295–300.
- Nepote V., Grosso N.R., Guzman C. 2005. Optimization of extraction of phenolic antioxidant from peanut skins. *Journal of the science of food and argentine*. 85: 33–38.
- Nepote V., Olmedo R.H., Mestrallet M.G., Grosso N.R. 2009. A study of the relationships among consumer acceptance, oxidation chemical indicators, and sensory attributes in high-oleic and normal peanuts. *Journal of Food Science*. 74: 1–8.
- Okamura H., Mimura A., Yakou Y., Niwano M., Takahara Y. 1993. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry*. 33: 557–561.
- Prakash B., Kedia A., Mishra P.K., Dubey N.K. 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. *Food Control*. 47: 381–391.
- Quiroga P.R., Riveros C.G., Zygadlo J.A., Grosso N.R., Nepote V. 2011. Antioxidant activity of essential oil of oregano species from Argentina in relation to their chemical composition. *International Journal of Food Science & Technology*. 46: 2648–2655.
- Sarmadi B.H. y Ismail A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*. 31: 1949–1956.
- Su L., Yin J.-J., Charles D., Zhou K., Moore J., Yu L. (Lucy). 2007. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food Chemistry*. 100: 990–997.
- Vandamme J., Nikiforov A., Dujardin K., Leys C., De Cooman L., Van Durme J. 2015. Critical evaluation of non-thermal plasma as an innovative accelerated lipid oxidation technique in fish oil. *Food Research International*. 72: 115–125.
- Wang J., Yuan X., Jin Z., Tian Y., Song H. 2007. Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of peanut skins extract. *Food Chemistry*. 104: 242–250.

Yamaguchi F., Ariga T., Yoshimura Y., Nakazawa H. 2000. Antioxidative and Anti-Glycation Activity of Garcinol from *Garcinia indica* Fruit Rind. Journal Agriculture of Food Chemistry. 48: 180–185.

CAPITULO V

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS Y LAS FRACCIONES PURIFICADAS DE TEGUMENTO DE MANÍ

INTRODUCCIÓN

Los alimentos contienen nutrientes primarios que son un sustrato ideal para el crecimiento y desarrollo de microorganismos; los mismos, pueden alterar un alimento al multiplicarse, nutrirse, modificar sus enzimas, desdoblar determinadas sustancias que le confieren sabores u olores desagradables o sintetizar compuestos nuevos (Frazier y Westhoff, 1985). Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* elabora una enterotoxina que causa intoxicaciones; *Micrococcus luteus* produce pigmentos y coloraciones anormales en la superficie de los alimentos en los que crece; *Bacillus cereus* genera proteólisis.

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa patógena y tóxica que causa graves problemas en la salud como el síndrome urémico hemolítico, gastroenteritis, infecciones urinarias y meningitis en el neonato, entre otras enfermedades, por lo que debe estar ausente en todos los alimentos que se consumen. Por su parte, alimentos contaminados con *Samonella spp.* sirven de medio de cultivo para que la bacteria pueda multiplicarse en el mismo y aumentar la posibilidad de que el consumidor se infecte por la enterotoxina y citotoxina producida por la bacteria. Los alimentos implicados con mayor frecuencia en brotes de salmonelosis son distintitos tipos de carnes, carnes de aves y productos derivados y lácteos, sobre todo si se mantienen sin refrigerar durante mucho tiempo. *Pseudomonas aeruginosa* produce diversas sustancias que influyen desfavorablemente en el sabor de los alimentos y algunas especies, son capaces de producir pigmentos en los mismos. Además, su tendencia aerobia les permite un crecimiento rápido y generar productos de oxidación y mucosidad en la superficie de los alimentos (Frazier y Westhoff, 1985).

En cuanto a los hongos evaluados, *Aspergillus* y *Penicillum* son dos géneros de hongos muy abundantes que generan la proliferación de moho en los alimentos, algunas especies sintetizan micotoxinas que resultan muy peligrosas para la salud. *Penicillum*

presenta un rápido crecimiento en la superficie de frutas, pan y quesos generando posibles problemas para la salud, por lo que es aconsejable descartar alimentos que muestren la presencia de moho (Frazier y Westhoff, 1985; Côté *et al.*, 2011). Por esta razón se consideró la utilización de dichos microorganismos para la evaluación de las pruebas antimicrobianas de los extractos y fracciones purificadas del tegumento de maní.

Los aceites esenciales y extractos constituyentes de plantas, hierbas y especias han demostrado actividad antimicrobiana frente a diversos patógenos y microorganismos causantes del deterioro en los alimentos (Larrauri *et al.*, 2013; Agüero *et al.*, 2014; Asensio *et al.*, 2015). Esta característica les confiere un excelente potencial como agentes antimicrobianos y antifúngicos para ser utilizados como conservantes naturales en alimentos.

Diferentes autores han publicado sobre los efectos antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos y antiinflamatorios de extractos de tegumento de maní (O'Keefe y Wang, 2006; Wang *et al.*, 2007; Sarnoski *et al.*, 2012). Investigaciones realizadas por el INTI Argentina observaron que el extracto de tegumento de maní inhibía el crecimiento de bacterias como *E. coli* 25922 y *S. aureus* 29737, presentando cierto potencial como agente antimicrobiano. (Reñones *et al.*, 2010). Por su parte, Pizzolitto *et al.* (2013) concluyeron que el tegumento de maní blanchado presenta actividad sobre *Fusarium verticillioides* y la producción de Fumonisina B1, micotoxina de interés en los alimentos debido a su elevada estabilidad durante la elaboración de los mismos.

La adición de conservantes artificiales es un método convencional para mejorar la seguridad alimentaria. Sin embargo, actualmente los consumidores se encuentran cada vez más preocupados por los residuos químicos de estos conservantes artificiales en los alimentos y tienden a elegir alimentos más naturales, saludables y seguros en donde es fundamental la aplicación de nuevos métodos de conservación para extender la vida útil del producto y para garantizar su seguridad microbiológica (Iturriaga *et al.*, 2012). Por lo tanto, explotar sustancias naturales con actividad biológica ha sido y es objeto de interés en la búsqueda de productos ecológicamente seguros (Dambolena *et al.*, 2012).

El presente capítulo tiene como *objetivo general* determinar la actividad antimicrobiana y antifúngica de los extractos y fracciones purificadas obtenidas del tegumento de maní.

Los *objetivos específicos* fueron evaluar la actividad antimicrobiana y antifúngica de los extractos y las fracciones purificadas de tegumento de maní blanchado y tostado.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní

Se trabajó con los extractos crudos del tegumento de maní (BC y TC), las fracciones purificadas por solventes (BAE, TAE, BA y TA) y las fracciones purificadas por cromatografía en columna (A, V y M) obtenidas según los procedimientos descritos en los Capítulos II y III.

Medios de cultivos líquidos

- Caldo Mueller – Hilton (CMH)
- Caldo Tripticasa – Soya (CTS)
- Caldo Papa Glucosado para hongos

Medios de cultivos sólidos

- Agar Mueller – Hilton (AMH)
- Agar Tripticasa – Soya (CTS)
- Agar Manitol Salado (AMS)
- Agar de Levine con Eosina Azul de Metileno (EMB)
- Agar Cetrimide (AC)

Cepas Bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas fueron provistas por el Laboratorio de Microbiología General del Departamento de Microbiología e Inmunología – Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales (Universidad Nacional de Río Cuarto) aisladas de alimentos y tipificadas según las normas de la “International Commission on Microbiological Specifications for Food” (2000) (**Tabla 5.1**).

Tabla 5.1: Bacterias aisladas de alimentos utilizados para los test de actividad antimicrobiana.

Bacterias Gram Positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 <i>Micrococcus luteus</i> <i>Bacillus cereus</i>
Bacterias Gram Negativas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Salmonella typhi</i> <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853

Aislamiento, conservación y propagación

Las cepas bacterianas fueron sembradas en estrías por agotamiento en placas de Petri con medios selectivos y diferenciales, con el fin de obtener microorganismos puros. Esta técnica permite obtener colonias aisladas en un cultivo puro. Posteriormente, se realizó la coloración de Gram (tinción diferencial). Se utilizó AMS para *S. aureus* MRSA, *S. aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* ATCC 29213; EMB para *E. coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhi* y ATS para *M. luteus*, *B. cereus* y Agar Cetrimide para *P. aeruginosa* ATCC 27853. Las cepas aisladas se repicaron en CTS, se incubaron a 37 °C durante 24 h y se conservaron en tubos con ATS inclinado a 4 °C.

Inóculo Fúngico

Se utilizaron los siguientes hongos: *Aspergillus flavus* CCC116-83 y BXC01 y *Penicilium oxalicum* 083296 que fueron provistos e identificados por la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Universidad Nacional de Rosario) y el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (Buenos Aires), respectivamente. *A. flavus* (BXC01) fue aislado de muestras de semillas de maíz de la provincia de Córdoba e identificado según sus características morfológicas en la cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (Universidad Nacional de Córdoba) (Camilleti *et al.*, 2014).

Los hongos aislados se conservaron durante un mes en agar papa dextrosa (PDA) a 4 °C.

MÉTODOS

Confección de preparados y coloración de Gram

La observación de los caracteres morfológicos de los microorganismos se efectuó mediante preparaciones fijadas y teñidas de las colonias aisladas. La tinción de Gram permitió diferenciar microorganismos basándose en la naturaleza química de las paredes celulares. Se identificaron bacterias Gram Positivas (púrpura-violeta) y bacterias Gram Negativas (rojizo-rosadas).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Ensayos de actividad antimicrobiana de extractos y fracciones de tegumento de maní

a) Preparación de los extractos y fracciones de tegumento de maní

Se disolvieron 100 mg/mL de cada uno de los extractos crudos y fracciones purificadas de tegumento de maní en etanol al 70%. Se utilizó agua destilada estéril y se homogenizó con vortex hasta obtener una solución transparente. Se conservaron en eppendorf estériles hasta su uso.

b) Preparación del inóculo bacteriano

A partir de las cepas aisladas y conservadas en tubos con ATS, se replicaron en CTS y se incubaron los inóculos a 37 °C durante 18 horas. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas factor 10 hasta obtener una suspensión con una turbidez aproximada a 0,5 en la escala de Mc Farland (absorbancia a 625 nm entre 0,08 – 0,10 con $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). (Longbottom *et al.*, 2004; Fallah *et al.*, 2015).

Para cuantificar las bacterias viables se utilizó el método de recuento en placa, para lo cual se realizaron diluciones seriadas en base 10 de la suspensión bacteriana en agua peptonada. Luego se inocularon 100 µL de cada dilución en dos placas de Petri conteniendo ATS y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Se eligieron aquellas diluciones en las cuales se podían contar entre 30 y 300 colonias y se estimó las bacterias viables en términos de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) (ICMSF, 2000).

c) Determinación de la actividad antimicrobiana y concentración inhibitoria mínima (CIM) de extractos y fracciones de tegumento de maní por la técnica de difusión en disco

Se realizaron diluciones factor 2 de los extractos y fracciones de tegumento de maní en etanol al 70% y se embebieron, con 10 μ L de cada dilución, discos de papel de filtro Wattman N° 3 de 5 mm de diámetro estériles. Los discos se colocaron en placas de Petri con AMH previamente inoculados con 100 μ L de inóculo y se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente para que difunda en el agar. Posteriormente, las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas y se midió el halo de inhibición de crecimiento (De Feo *et al.*, 1998; Gachkar *et al.*, 2007).

d) Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de extractos y fracciones de tegumento de maní por el método de dilución

Se colocó 1 mL de CTS en tubos de hemólisis y se agregó 1 mL de cada extracto y fracción purificada diluida en DMSO. A partir de este tubo se realizaron diluciones factor 2. Luego se agregó a cada tubo 1 mL del microorganismo a probar a una concentración de 10⁸ UFC/mL. Se incubaron los tubos a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente se determinó la CIM visualmente, considerando CIM a la última dilución en la cual no se observó crecimiento microbiano. A partir de los tubos sin crecimiento con los que se determinó la CIM, se sembró 100 μ L en superficie con espátula de Drigalsky sobre placas de Petri con AMH. Se incubaron las placas a 37 °C durante 24 horas. Se consideró como CIM la mínima cantidad de sustancia que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo y como CBM la máxima dilución en la cual no se observó crecimiento bacteriano (Oliva *et al.*, 2011; 2012).

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Ensayos de actividad antifúngica de extractos y fracciones de tegumento de maní

Los hongos se sembraron bajo campana de flujo laminar en placas de Petri de 9 cm de diámetro con 20 mL de medio de cultivo líquido estéril (caldo papa glucosado). Los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní se diluyeron en etanol - agua (70:30, v/v) y se agregaron al medio de cultivo en diferentes concentraciones para obtener un gradiente. Se diluyeron los extractos y fracciones en etanol hasta alcanzar una concentración final de etanol inferior a 1% v/v (Lucini *et al.*, 2006). Se realizaron dos controles: un control negativo, placas de Petri medio APG sin ningún agregado, y un control testigo sin el agregado de extractos o fracciones, pero con etanol – agua (70:30, v/v) de manera de confirmar la ausencia de efectos del solvente en el ensayo. Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento y se incubaron a 25 °C durante 10 días en cámara de cultivo. Posterior a la incubación se midió el diámetro del micelio con un calibre. La actividad antifúngica de las diferentes concentraciones de los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní se expresó como porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio (PICM) y se calculó según la siguiente fórmula (Camiletti *et al.*, 2014):

$$PICM = \frac{\text{Diámetro promedio Control} - \text{Diámetro promedio Tratamiento}}{\text{Diámetro promedio Control}} \times 100 \quad (\text{ec. 5.1.})$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó según lo indicado en el Capítulo II.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Aislamiento, conservación e identificación de cepas

Se realizó la tinción de Gram de todos los microorganismos corroborando la morfología y características estructurales propias de la pared de cada uno. En la **Tabla 5.2.** se muestran los resultados obtenidos de la tinción de Gram.

Tabla 5.2: Características culturales de Microorganismo GRAM + y -

Microorganismo	Medio de cultivo	Característica de la colonia	Gram
<i>S. aureus</i> MRSA	AMS	Man +: Opaca, rodeada de una zona amarilla	+
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	AMS	Man +: Opaca, rodeada de una zona amarilla	+
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	AMS	Man +: Opaca, rodeada de una zona amarilla	+
<i>B. cereus</i>	ATS	Irregular de borde filamentosos color crema	+
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	ATS	Amarilla	+
<i>E. coli</i> ATCC 25922	EMB	Lac +: rojo oscuras con brillo metálico	-
<i>Salmonella typhi</i>	EMB	Lac -: Incolora	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	AC	Pigmento verde	-

Referencias: AMS = agar manitol salado; EMB = agar de Levine con eosina azul de metileno; ATS = agar tripticasa soya; AC = agar cetrímid.

Ensayos de actividad antimicrobiana de extractos y fracciones de tegumento de maní

a) Determinación de la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones de tegumento de maní por la técnica de difusión en disco

Para determinar la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní se realizó la técnica de difusión de disco. Los resultados obtenidos de los extractos y fracciones purificadas del tegumento de maní blanchado y tostado se presentan en la **Tabla 5.3**.

Todos los extractos y fracciones purificadas presentaron actividad sólo sobre bacterias Gram positivas. El diámetro de los halos de inhibición fue variado dependiendo del microorganismo y extracto o fracción analizada. En los extractos y fracciones de tegumento de maní blanchado, el menor halo de inhibición se observó con el extracto BC sobre *S. aureus* ATCC 29213 (0,83 cm) y el mayor con el extracto BAE sobre *M. luteus* (1,30 cm). La fracción A fue la única que no presentó actividad frente a los microorganismos estudiados (**Tabla 5.3**).

En cuanto a los extractos y fracciones de tegumento de maní tostado, el menor halo de inhibición se observó con el extracto TAE sobre *S. aureus* ATCC 29213 (0,70 cm) y el mayor con el extracto TA sobre *M. luteus* (1,37 cm) (**Tabla 5.3**).

Yu *et al.* (2010) realizaron un estudio en carne picada con incorporación de extractos polifenólicos obtenidos del tegumento de maní y observaron que los extractos reducen el número de bacterias Gram positivas cuando los mismos son utilizados como agente antimicrobiano. En el mismo estudio, *S. aureus* resulta más sensible a la actividad de los extractos mientras que bacterias Gram negativas como *E. Coli* y *Salmonella typhi* son resistentes a los extractos probados. En general, las bacterias Gram negativas son menos sensibles a la acción de los compuestos naturales que las bacterias Gram positivas (Iturriaga *et al.*, 2012). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo, ya que las bacterias Gram negativas incluidas en el estudio (*E. Coli*, *Salmonella typhi* y *P. aeruginosa* ATCC 27853) no fueron inhibidas por los extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní evaluados.

Tabla 5.3: Determinación de la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní sobre microorganismos utilizando la técnica de difusión en disco.

EXTRACTOS Y FRACCIONES DE TEGUMENTO DE MANÍ									
Halo de inhibición (cm)									
Microorganismo	BC*	BA*	BAE*	A*	V*	M*	TC*	TA*	TAE*
<i>S. aureus</i> MRSA	1.03±0.21 a	1.03±0.10 a	0.98±0.22 a	Sin halo de inhib.	0.85±0.06 a	1.05±0.13 a	0.95±0.10 a	0.88±0.15 a	1.10±0.14 a
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.00±0.10 b	1.00±0.02 b	1.10±0.08 a	Sin halo de inhib.	0.87±0.09 b	1.13±0.09 a	0.95±0.05 b	0.85±0.05 b	1.10±0.03 a
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.83±0.10 b	0.88±0.05 b	0.98±0.10 a	Sin halo de inhib.	Sin halo de crec.	0.98±0.05 a	0.80±0.04 b	0.85±0.07 b	0.70±0.02 b
<i>B. cereus</i>	1.05±0.05 a	0.95±0.05 a	0.90±0.10 a	Sin halo de inhib.	0.90±0.10 a	1.10±0.02 a	0.75±0.05 a	0.85±0.05 a	1.00±0.03 a
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	1.18±0.19 a	1.15±0.18 a	1.30±0.12 a	Sin halo de inhib.	1.25±0.18 a	1.17±0.31 a	1.13±0.17 a	1.00±0.14 a	1.37±0.12 a
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Sin halo de inhib.								
<i>Salmonella typhi</i>	Sin halo de inhib.								
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Sin halo de inhib.								

Abreviaturas. BC = extracto blanchado crudo; BA = fracción blanchado acuoso; BAE = fracción blanchado acetato de etilo; A = fracción amarilla; V = fracción violeta; M = fracción marrón; TC = extracto tostado crudo; TA = fracción tostado acuoso; TAE = fracción tostado acetato de etilo; inhib.= inhibición.

* Media seguida por diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras (ANOVA, test DGC, $\alpha = 0,05$).

Con respecto a las tres cepas probadas del género *S. aureus*, se observó que sobre la cepa MRSA todos los extractos y fracciones mostraron halos de inhibición, siendo TAE quien presentó el de mayor tamaño (1,10 cm). Sobre *S. aureus* ATCC 29213 las fracciones BAE y M presentaron el mayor halo de inhibición (0,98 cm en ambos casos) seguido de los demás extractos y fracciones que no presentaron diferencias significativas entre ellos. Sobre *S. aureus* ATCC 25923 las fracciones M, TAE y BAE fueron las que presentaron los mayores halos de inhibición (1,13 cm; 1,10 cm y 1,10 cm, respectivamente). La fracción M presentó en su composición quercetina y procianidina, Estos compuestos han demostrado efectos antimicrobianos sobre las bacterias *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, entre otras, según Adámez *et al.* (2012)

Cuando se evaluaron los extractos y fracciones sobre *B. cereus* todos presentaron el mismo comportamiento, sin diferencias significativas entre ellos, a excepción de la fracción TC que presentó el menor halo de inhibición (0,75 cm).

Asimismo, todos los extractos y fracciones presentaron halos de inhibición, sin diferencias significativas entre los mismos, cuando se evaluaron sobre *M. luteus*. La fracción V está compuesta principalmente por flavonoides como quercetina, catequina, epicatequina y estilbenos como el resveratrol. Dichos polifenoles presentan actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Baydar *et al.*, 2006).

La fracción V presentó actividad sobre algunas de las bacterias Gram positivas evaluadas (*S. aureus* MRSA, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus*, *M. luteus*) con halos de inhibición menores a 1 cm, excepto para *M. luteus* que fue de 1,25 cm.

b) Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extractos y fracciones de tegumento de maní por la técnica de difusión en disco

Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), como medida cuantitativa de la sensibilidad de un microorganismo a agentes antimicrobianos. Se decidió trabajar solo con las siguientes cepas: *S. aureus* MRSA, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* y *M. luteus* ya que las bacterias Gram Negativas no fueron inhibidas por los extractos y fracciones. Por otro lado, en función de los resultados obtenidos en el ensayo antimicrobiano previo, se determinó la CIM sólo con aquellos extractos y fracciones que obtuvieron halos de

inhibición superiores a 1 cm. Es decir, se trabajó con el extracto BC y las fracciones BA, BAE, M y TAE. Los resultados obtenidos se observan en la **Tabla 5.4**.

Tabla 5.4. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní sobre microorganismos utilizando la técnica de difusión en disco.

Extractos y fracciones de tegumento de maní					
	CIM (mg/mL)				
Microorganismo	BC	BA	BAE	TAE	M
<i>S. aureus</i> MRSA	50	50	25	25	50
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	25	50	25	25	50
<i>B. cereus</i>	6,25	6,25	3,12	3,12	6,25
<i>M. luteus</i>	3,12	3,12	3,12	3,12	6,25

Abreviaturas. BC = extracto blanchado crudo; BA = fracción blanchado acuoso; BAE = fracción blanchado acetato de etilo; TAE = fracción tostado acetato de etilo; M = fracción marrón.

Todos los extractos y fracciones presentaron actividad sobre los microorganismos ensayados. Las fracciones BAE y TAE fueron las que mostraron el menor valor de CIM. *M. luteus* fue el microorganismo que presentó el menor valor de CIM para casi todos los extractos y fracciones (3,12 mg/mL) a excepción de la fracción M que presentó una CIM de 6,25 mg/mL (**Tabla 5.4**).

Las fracciones BAE y TAE sobre *S. aureus* MRSA y *S. aureus* ATCC 25923 mostraron una CIM de 25 mg/mL y sobre *B. cereus* una CIM de 3,12 mg/mL. Los demás extractos y fracciones mostraron una CIM de 50 mg/mL para *S. aureus* MRSA y *S. aureus* ATCC 25923 y una CIM de 6,25 mg/mL para *B. cereus* (**Tabla 5.4**).

Mbaveng *et al.* (2012) utilizaron el extracto metánolico de *Dorstenia mannii* para determinar la CIM en levaduras y bacterias. Dicho extracto presenta compuestos polifenólicos del grupo de los flavonoides (dorsmaninas y 6,8- diprenileriodictiol). El

extracto de *D. mannii* mostró actividad en bacterias Gram negativas presentando una CIM de 1024 µg/mL para *P. aeruginosa* y 256 µg/mL para *E. Coli*. En el presente estudio, las bacterias Gram negativas estudiadas no fueron inhibidas por los flavonoides presentes en los extractos y fracciones purificadas (quercetina, caquina y epicatequina principalmente). Estos resultados proporcionan información relacionada al uso de extractos naturales (polifenoles) como posibles antimicrobianos naturales.

c) Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de extractos y fracciones de tegumento de maní

A partir de las concentraciones sin crecimiento observadas en la CIM, se determinó la concentración bactericida mínima (CBM). Se consideró CBM a la máxima dilución en la cual no se observó crecimiento bacteriano (Oliva *et al.*, 2011; 2012).

El término *bactericida* hace referencia a aquellos compuestos capaces de producir la muerte de una bacteria mientras que *bacteriostático* está relacionado con aquellos compuestos que no producen la muerte de la bacteria, sino que impiden el crecimiento y reproducción de la mismas. La capacidad bacteriostática de un compuesto es de suma importancia en la industria alimenticia, ya que permite inhibir el desarrollo de microorganismos contaminantes de alimentos (Frazier, 1985).

Los resultados obtenidos de la CBM se muestran en la **Tabla 5.5**.

Tabla 5.5. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní sobre microorganismos utilizando la técnica de difusión en disco.

Extractos y fracciones de tegumento de maní					
CBM (mg/mL)					
Microorganismo	BC	BA	BAE	TAE	M
<i>S.aureus</i> MRSA	No presenta				
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	No presenta				
<i>B. cereus</i>	50	No presenta	No presenta	No presenta	No presenta
<i>M. luteus</i>	No presenta				

Abreviaturas. BC = extracto blanchado crudo; BA = fracción blanchado acuoso; BAE = fracción blanchado acetato de etilo; TAE = fracción tostado acetato de etilo; M = fracción marrón.

En función de los datos observados en la **Tabla 5.5.** los extractos y fracciones presentaron actividad bacteriostática sobre los microorganismos ensayados y sólo el extracto BC presentó actividad bactericida sobre *B. cereus*.

ACTIVIDAD ANTIFUNGICA

Ensayos de actividad antifúngica de extractos y fracciones de tegumento de maní

Los extractos y fracciones no presentaron actividad antifúngica frente a las cepas de hongos probados. El micelio de los hongos creció en la placa de Petri luego de la incubación de manera tal que resultó imposible medir el tamaño de los mismos.

CONCLUSIONES

Los extractos y fracciones de tegumento de maní poseen actividad antimicrobiana evaluadas por la técnica de difusión en disco sobre bacterias Gram positivas como *S. aureus* MRSA, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213 *M. luteus* y *B. cereus*; mientras que las bacterias Gram Negativas como *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* y *P. aeruginosa* ATCC 27853 no se inhibe el crecimiento por la presencia de los extractos y fracciones purificadas del tegumento de maní.

El extracto TC y la fracción TA muestran la menor actividad antimicrobiana sobre los microorganismos probados. Las fracciones purificadas por cromatografía en columna, A y V, no presentan actividad antimicrobiana sobre los microorganismos evaluados.

La mayoría de los extractos y fracciones presentan el menor valor de CIM sobre *M. luteus*.

Los extractos y fracciones purificadas BC, BA, BAE, TAE y M tienen el menor valor de CIM.

El extracto BC y las fracciones BAE, BA, TAE y M presentan actividad bacteriostática sobre las diferentes cepas evaluadas, y solo el extracto BC presenta actividad bactericida sobre *B. cereus*.

Los extractos y fracciones purificadas no presentan actividad antifúngica sobre los hongos *Aspergillus flavus* (CCC116-83 y BXC01) y *Penicilium oxalicum* (083296).

La aplicación de extractos del tegumento de maní (BC BA, BAE, TAE y M) constituyen una alternativa de conservante natural que puede prolongar la vida útil de un alimento por disminuir la proliferación de microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adámez J.D., Samino E.G., Valdés Sánchez E., González-Gómez D. 2012. In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera L.*). *Food Control*. 24: 136-141.
- Agüero M.B., Svetaz L., Baroni V., Lima B., Luna L., Zacchino S., Saavedra P., Wunderlin D., Egly Feresin G., Tapia A. 2014. Urban propolis from San Juan province (Argentina): Ethnopharmacological uses and antifungal activity against *Candida* and dermatophytes. *Industrial Crops and Products*. 57: 166–173.
- Asensio C.M., Grosso N.R., Juliani R.H. 2015. Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. *LWT- Food Science and Technology*. 60: 664–671.
- Baydar N.G., Sagdic O., Ozkan G., Cetin S. 2006. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera L.*) seed extracts. *International Journal of Food Science and Technology*. 41: 799–804.
- Camiletti B.X., Asensio C.M., Pecci M.D.L.P.G., Lucini E.I. 2014. Natural control of corn post harvest fungi *Aspergillus flavus* and *Penicillium sp.* using essential oils from plants grown in Argentina. *Journal of Food Science*. 79: 2499–2506.
- Côté J., Caillet S., Doyon G., Dussault D., Sylvain J.-F., Lacroix M. 2011. Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts. *Food Control*. 22: 1413–1418.
- Dambolena J.S., López A.G., Meriles J.M., Rubinstein H.R., Zygadlo J.A. 2012. Inhibitory effect of 10 natural phenolic compounds on *Fusarium verticillioides*. A structure-property-activity relationship study. *Food Control*. 28: 163–170.
- De Feo V., Ricciardi A., Biscardi D. 1998. Chemical composition and antibacterial screening of the essential oil from *Minthostachys verticillata* (Griseb.). *Journal of Essential Oil Research*. 10: 61-65.
- Fallah F., Emadi F., Ayatollahi A., Taheri S., Karimi Yazdi M.K., Rad P.K. 2015. The antimycobacterial activity of the extract of *Ferula gummosa*. *International Journal of Mycobacteriology*. 4: 166-172.

- Frazier W.C. y Westhoff D.C. 1985. Microbiología de los alimentos. 4ta Ed. ACRIBIA S.A. Zaragoza, España. 681pp
- Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A., Rasooli I. 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chemistry. 102: 898–904.
- ICMSF 2000. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganismos de los Alimentos. Su significado y métodos de enumeración. ACRIBIA S.A. (Eds.). Zaragoza, España. 454 pp.
- Iturriaga L., Olabarrieta I., De Marañón I.M. 2012. Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. International journal of food microbiology. 158: 58–64.
- Larrauri M., Barrionuevo M.G., Riveros C., Mestrallet M.G., Zunino M.P., Zygodlo J. A. Grosso N.R., Nepote V. 2013. Effect of peanut skin extract on chemical stability and sensory properties of salami during storage. Journal of the science of food and agriculture. 93: 1751–1777.
- Longbottom C.J., Carson C.F., Hammer K. a, Mee B.J., Riley T. V. 2004. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 54: 386–392.
- Lucini E.I., Zunino M.P., López M.L., Zygodlo J.A. 2006. Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* berk. Phytopathology. 154: 441–446.
- Mbaveng A.T., Kuete V., Ngameni B., Beng V.P., Ngadjui B.T., Marion Meyer J.J., Lall N. 2012. Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from the twigs of *Dorstenia mannii* (Moraceae). BMC Complementary and Alternative Medicine. 12(83): 1-6.
- O’Keefe S.F. y Wang H. 2006. Effects of peanut skin extract on quality and storage stability of beef products. Meat science. 73: 278–286.

- Oliva M.D.L.M., Carezzano E., Gallicci M.N., Demo M. 2011. Antimycotic effect of the essential oil of *Aloysia triphylla* against *Candida* species obtained from human pathologies. *Natural Products Communications*. 6: 1–5.
- Oliva M.M., Carezzano E., Gallucci N., Freytes S., Zygadlo J., Demo M. 2012. Growth inhibition and morphological alterations of *Staphylococcus aureus* caused by the essential oil of *Aloysia triphylla*. *Natural Products Communications*. 7: 1–2.
- Pizzolitto R.P., Dambolena J.S., Zunino M.P., Larrauri M., Grosso N.R., Nepote V., Dalcero A.M., Zygadlo J.A. 2013. Activity of natural compounds from peanut skins on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. *Industrial Crops & Products*. 47: 286–290.
- Reñones L., Dattilo M., Zampatti M., Zannoni V., Murano M., Samter P., Storino A., Planes E., Dománico R. 2010. Tegumento de Maní: posible solución a un problema ambiental. INTI - Instituto Nacional de Tecnología Industrial. 1–2.
- Sarnoski P.J., Johnson J. V., Reed K. A., Tanko J.M., O’Keefe S.F. 2012. Separation and characterisation of proanthocyanidins in Virginia type peanut skins by LC-MSn. *Food Chemistry*. 131: 927–939.
- Wang J., Yuan X., Jin Z., Tian Y., Song H. 2007. Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of peanut skins extract. *Food Chemistry*. 104: 242–250.
- Yu J., Ahmedna M., Goktepe I. 2010. Potential of peanut skin phenolic extract as antioxidative and antibacterial agent in cooked and raw ground beef. *International Journal of Food Science and Technology*. 45: 1337–1344

CAPITULO VI

UTILIZACIÓN DE EXTRACTOS DE TEGUMENTO DE MANÍ COMO ANTIOXIDANTE NATURAL APLICADO EN CUBIERTAS COMESTIBLES COMO CONSERVANTE EN ALMENDRAS

INTRODUCCIÓN

Las almendras son un alimento energético y altamente nutritivo. Contienen minerales como fósforo, potasio, magnesio, calcio, hierro y zinc y vitaminas del tipo A, E, B1 y B2. Por otra parte, son muy apreciados por su sabor y también se utilizan en medicamentos y cosméticos (Moayedi *et al.*, 2011).

El principal país productor de almendras en el mundo es Estados Unidos (alrededor del 37%), seguido por España (11%), Australia (7%), Irán (5%), Marruecos (5%) e Italia (5%). El consumo mundial de almendras se ha incrementado en los últimos años debido a la demanda creciente por parte de la Unión Europea, Canadá, Rusia, China, India y Estados Unidos (USDA, 2013).

Las almendras son un alimento muy versátil ya que pueden ser utilizadas tanto en preparaciones dulces como saladas. Asimismo, se pueden consumir crudas y/o tostadas o aplicarlas a los alimentos en forma de harina, leche, mantequilla, helado, caramelo, etc. En su composición, las almendras tienen un alto contenido de aceite con una alta proporción de ácido oleico, por lo que su consumo ayuda a prevenir las enfermedades del corazón (Boue *et al.*, 2009). Sin embargo, son susceptibles a reacciones de oxidación y, por lo tanto, a que se tornen rancias durante el almacenamiento. Estas reacciones generan olores, sabores y colores desagradables y, además, conllevan a la pérdida de nutrientes (vitaminas liposolubles, ácidos grasos esenciales, carotenoides, aminoácidos, etc.) (McClements y Decker, 2010). La calidad y la estabilidad de las almendras no sólo depende de su composición inicial, sino también de las prácticas de manejo durante el crecimiento del

cultivo, la recolección, y los métodos de post cosecha como el procesamiento, envasado y almacenamiento (Buranasompoba *et al.*, 2007).

Las cubiertas comestibles se han desarrollado como una alternativa en el campo del envasado y la conservación de alimentos (Embuscado y Huber, 2009; Riveros *et al.*, 2013). Las características de la cubierta comestible y sus funciones dependen del tipo de biopolímeros utilizado (proteínas, polisacáridos, lípidos), de su composición química y la composición estructural. Estas funciones afectan directamente a la preservación de la calidad del alimento en el cual son aplicadas. Básicamente, toda cubierta comestible actúa como una barrera entre el alimento y el medio ambiente a la entrada de sustancias extrañas (Embuscado y Huber, 2009). La capacidad de incorporar ingredientes activos, como antioxidantes, es otra propiedad importante en la utilización de cubiertas, puesto que estos aditivos (naturales o sintéticos) pueden mantener y mejorar la calidad del alimento a partir de un incremento en su tiempo de vida útil (Embuscado y Huber, 2009; Rojas Graü *et al.*, 2009; Baldwin *et al.*, 2011).

Los recubrimientos más comunes utilizados en las almendras son el chocolate, el azúcar y canela (almendras confitadas). Algunas cubiertas comestibles, como la proteína de suero y la goma laca, también han demostrado tener la aceptación de los consumidores (Lee *et al.*, 2002; Baldwin *et al.*, 2011).

La carboximetil celulosa es un polisacárido derivado de la celulosa. Es un polímero industrial que presenta una amplia gama de aplicaciones como en la floculación de agua, detergentes, textiles, papeles, alimentos y medicamentos. Recientemente se ha empleado en cubiertas comestibles para mejorar la vida útil de diferentes alimentos (Baldwin *et al.*, 2011; Tongdeesoontorn *et al.*, 2011; Riveros *et al.*, 2013; 2015).

El presente capítulo tiene como **objetivo general** incorporar los extractos de tegumento de maní en una cubierta comestible utilizada para conservar un alimento altamente lipídico como las almendras tostadas. La finalidad es evaluar los cambios químicos y sensoriales ocurridos durante el período de almacenamiento.

Los **objetivos específicos** fueron evaluar la conservación química y sensorial de almendras tostadas recubiertas con una película elaborada a base de carboximetil celulosa y con el agregado de antioxidantes naturales y sintéticos durante el almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Para el estudio de la actividad conservante sobre almendras, se utilizó para el ensayo la fracción purificada Blanchado Acetato de Etilo (BAE) obtenida según los procedimientos descritos en el Capítulo III.

Se utilizaron almendras crudas (*Prunus amygdalus* Batsch) de la variedad Non Pareil (cosecha 2014) producidas en San Martín de los Andes, Mendoza, Argentina.

MÉTODOS

Composición química general

Sobre las almendras crudas se determinaron los siguientes porcentajes:

- Φ **Humedad.** Se secaron 5 g de almendras crudas molidas en estufa a 110 °C durante 2 h (AOAC, 2010) y se determinó el porcentaje de humedad por diferencia de peso, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{g \text{ muestra húmeda} - g \text{ muestra seca}}{(g \text{ muestra húmeda})} \times 100 \quad (\text{ec. 6.1.})$$

- Φ **Materia grasa.** Se realizó la extracción de los lípidos de almendra cruda utilizando equipos Soxhlet, con n-hexano como solvente, por un período de 12 horas. La materia grasa se calculó por diferencia de peso de las muestras antes y después de la extracción (Grosso y Guzmán, 1995), según la fórmula:

$$\% \text{ Aceite} = \frac{g \text{ aceite}}{g \text{ muestra}} \times 100 \quad (\text{ec. 6.2.})$$

- Φ **Proteínas.** Se determinó el porcentaje de nitrógeno por el método de Kjeldhal en almendra cruda. Para convertir el porcentaje de nitrógeno en porcentaje de proteínas se utilizó el factor 6.25 (AOAC, 2010).

Φ **Cenizas.** Se incineró una muestra de almendra cruda en horno mufla a 550 °C durante 6 horas. El porcentaje se determinó con el peso después de la incineración en relación con el peso antes de la misma (AOAC, 2010), utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{g después de la incineración}}{\text{g antes de la incineración}} \times 100 \quad (\text{ec. 6.3.})$$

Φ **Hidratos de Carbono.** El contenido de hidratos de carbono totales en las almendras crudas se calculó en forma teórica mediante la siguiente fórmula (Grosso *et al.*, 2000):

$$\% \text{ Hidratos de Carbono} = 100 - \% \text{ proteínas} - \% \text{ lípidos} - \% \text{ cenizas} \quad (\text{ec. 6.4.})$$

Composición de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos de aceite de almendra se analizó por cromatografía gaseosa (GC) de acuerdo a lo descrito por Grosso *et al.* (2000). A partir del aceite de almendra, se prepararon los ésteres metílicos de los ácidos grasos por transmetilación con una solución de ácido sulfúrico en metanol (30 g/L). Los ésteres metílicos se analizaron en un cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 600 (Waltham, Mass., U.S.A.) equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se utilizó una columna capilar SACTM-5 (C # 24156, Supelco) de 30 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de fase). El gas portador fue nitrógeno (1 mL/min) y se empleó el siguiente programa de temperaturas: temperatura inicial 180 °C, con un aumento de 4 °C/min hasta 240 °C (10 min). Los tiempos de retención relativos se consideraron en relación al del palmitato de metilo y el contenido de cada uno de los ácidos grasos identificados se expresó como valor porcentual en relación al contenido total de los mismos (Riveros *et al.*, 2010).

Preparación de las muestras y tratamientos

Las almendras fueron tostadas a 130 °C en estufa de circulación de aire forzada durante 45 minutos. Posteriormente se recubrieron con carboximetil celulosa (CMC) empleada como cubierta comestible. Los tratamientos fueron los siguientes: almendras tostadas: sin recubrimiento (C), almendras recubiertas con CMC (CMC), almendras recubiertas con CMC y suplementadas con extracto de tegumento de maní (BAE) y almendras recubiertas con CMC y suplementadas con BHT (BHT).

La cubierta de CMC se preparó mezclando 0,5% de este compuesto, 1,9% de glicerol y 97,6% de agua destilada. La solución se agitó vigorosamente durante 30 min en agitador magnético hasta obtener una mezcla homogénea y se utilizó para los tratamientos con cubiertas comestibles en una proporción final del producto del 4,5%. El proceso de recubrimiento se realizó utilizando un bol de acero inoxidable que se mantuvo en rotación durante 5 minutos hasta que la cubierta se distribuyó uniformemente sobre el producto (Riveros *et al.*, 2013). La fracción BAE de tegumento de maní y el antioxidante sintético BHT, utilizado como referencia, se agregaron a la cubierta en una concentración del 0,2% (Larrauri *et al.*, 2016) y 0,02 % (CAA 2014), respectivamente, antes de recubrir las almendras para obtener los tratamientos BAE y BHT. Posteriormente, todos los tratamientos se secaron en estufa a 130 °C durante 20 minutos.

Almacenamiento y muestreo

Cada tratamiento de almendras tostadas (C, CMC, BAE y BHT) se almacenó en bandejas descartables de polipropileno envueltas en papel film de PVC a 40 °C durante 126 días. Las muestras fueron extraídas los días 0, 21, 42, 84 y 126 para evaluar los cambios en los indicadores químicos (índice de peróxidos y dienos conjugados), sensoriales (análisis descriptivo) y de oxidación (volátiles por GC-MS capturados por fibras de fase sólida).

Análisis químicos

El aceite de almendra utilizado en los análisis químicos, se obtuvo por prensado en frío, a partir de las muestras de almendra almacenadas. Para el prensado se utilizó una prensa hidráulica de 20 toneladas (HE-DU, Hermes I. Dupraz S.R.L., Córdoba, Argentina). Sobre

los aceites de las muestras, se determinaron los siguientes indicadores de deterioro oxidativo: índice de peróxidos (IP) y dienos conjugados (DC).

Φ **Índice de Peróxidos (IP)**. Se determinó el índice de peróxidos según la metodología propuesta por la AOAC (2010). Se pesó $0,5 \pm 0,05$ g de aceite y se mezcló con 30 mL de cloroformo/ácido acético 2:3 (v/v). Luego se agregó 0,5 mL de una solución saturada de yoduro de potasio, se agitó vigorosamente y se dejó reposar en oscuridad durante 1 min. Posteriormente se agregó 30 mL de agua destilada y 0,5 mL de almidón al 1% (p/v) utilizado como indicador. El yodo formado se tituló con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N. El IP se expresó en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de aceite (meqO_2/kg) y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$IP = \frac{S \times N \times 1000}{g \text{ muestra}} \quad (\text{ec. 6.5})$$

donde: S es el volumen de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumido en la titulación.

N es la normalidad de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Φ **Dienos Conjugados (DC)**. Se pesó $0,2 \pm 0,05$ g de aceite y se disolvió en 6 mL de n-hexano. Posteriormente se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 232 nm. Se utilizó n-hexano como blanco. El resultado obtenido se expresó como coeficiente de extinción E (1%, 1 cm) y se calculó según la siguiente fórmula (Quiroga, 2013):

$$E_{(1\%, 1\text{cm})} = \frac{\left(\frac{A_{(\text{dienos})} \times 6}{\text{dilución}} \right)}{(m \times 100)} \quad (\text{ec. 6.6})$$

donde: $A_{(\text{dienos})}$ es la absorbancia de la solución diluida.

m es el peso aceite en gramos.

6 son los mL de n-hexano.

dilución: $(\text{mL solución original aceite-hexano}) / (\text{mL solución original a-h} + \text{mL n-hexano agregado})$.

Análisis de volátiles de oxidación (AV)

La extracción de compuestos volátiles de las muestras de almendras almacenadas se realizó por la técnica de micro extracción en fase sólida (MEFS) y se analizó por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masa (CG-MS), según lo descrito por Quiroga *et al.* (2014). Las condiciones de la técnica MEFS fueron las siguientes: se pesaron 2 gr de muestra de almendra molida y se colocaron en un vial herméticamente cerrado dentro de un equipo termostatzado a 60 °C para acelerar el equilibrio de los compuestos volátiles entre la muestra y el espacio de cabeza. Se utilizó una fibra recubierta con divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) 50/30 μ (StableFlex, Supelco). Luego de 10 minutos de calentamiento de la muestra a 60 °C se expuso la fibra al espacio de cabeza (30 min). Posteriormente, se retiró del vial y se insertó en el puerto inyector del GC donde fue desorbida inmediatamente.

El equipo de GC-MS utilizado para la detección de los compuestos volátiles fue un Perkin Elmer Clarus 600 acoplado a un detector de masas de trampa de iones (Perkin Elmer, Shelton, Connecticut, USA). Se empleó una columna capilar ELITE 5MS (30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno, 0,25 micras de espesor). El programa de temperaturas fue el siguiente: 10 minutos a 50 °C y luego una rampa de calentamiento de 4 °C/minuto hasta llegar a 280 °C, manteniendo esta temperatura por 5 minutos. Se utilizó helio como gas portador a un flujo de 1 mL/min y la ionización se realizó por impacto electrónico a 70 eV. La temperatura del inyector fue de 270 °C y el tiempo para la desorción de la fibra fue de 10 min en el modo *splitless* (1,5 min sin división del período) (Quiroga, 2013).

La identificación de los compuestos volátiles en las muestras de almendra se realizó en modo de barrido completo (m/z 40 a 550) a través de una combinación de la biblioteca de espectros de masa NIST, la comparación entre sus tiempos de retención y los datos de espectros de masas de bibliografía publicada, y los tiempos de retención de cromatografía de gases de los compuestos estándar. La cuantificación de los picos se realizó en función de la respuesta del detector de masa (cuentas electrónicas) por gramo de muestra (almendra molida) (Quiroga *et al.*, 2014; Larrauri *et al.*, 2016).

Para la caracterización de sabores desagradables que resultan de la peroxidación lipídica se utilizaron indicadores como el hexanal y nonanal (Belitz *et al.*, 2009; Mexis *et*

al., 2009). Se evaluaron los cambios en el contenido de estos dos compuestos en las muestras que se iban tomando durante el almacenamiento (Quiroga *et al.*, 2014).

Análisis sensorial

Pruebas de aceptabilidad

Las muestras de almendras se evaluaron mediante pruebas afectivas de aceptabilidad para conocer la opinión de los consumidores sobre el producto. Se trabajó con un panel de consumidores (n = 100) de la provincia de Córdoba (Argentina) que fueron elegidos según los siguientes criterios: (i) edad entre 18 y 65 años, (ii) no fumador, (iii) sin alergias a los alimentos y (iv) personas que consumían almendra o sus productos derivados al menos 1 vez por semana (Asensio, 2013).

Para la evaluación de los tratamientos se prepararon bolsitas de polipropileno codificadas con un número de 3 dígitos elegidos al azar que contenían 2 almendras cada una. Se presentaron 4 muestras en forma aleatoria (C, CMC, BAE y BHT). Los panelistas debían observar el color y luego evaluar el sabor de la muestra. Los panelistas fueron instruidos para consumir la muestra en su totalidad y enjuagar la boca con agua entre las muestras para minimizar cualquier efecto residual. Se utilizó una escala hedónica de 9 puntos para los atributos color y sabor en donde 1 = me disgusta muchísimo y 9= me gusta muchísimo (Meilgaard *et al.*, 2006; Asensio *et al.*, 2013) (**Tabla 6.1**).

Tabla 6.1. Escala hedónica usada para las pruebas de aceptabilidad de muestras de almendra recubiertas.

VALOR	ESCALA	MUESTRA N°	
		COLOR	SABOR
9	Me gusta muchísimo		
8	Me gusta mucho		
7	Me gusta bastante		
6	Me gusta ligeramente		
5	Ni me gusta, ni me disgusta		
4	Me disgusta ligeramente		
3	Me disgusta bastante		
2	Me disgusta mucho		
1	Me disgusta muchísimo		

Pruebas descriptivas

Las muestras de almendra con aplicación de las cubiertas comestibles y los antioxidantes fueron evaluadas mediante pruebas descriptivas con la finalidad de determinar cuanti y cualitativamente los atributos sensoriales y sus cambios durante el almacenamiento.

Las muestras fueron evaluadas por un panel sensorial entrenado compuesto por un total de 9 jueces (7 mujeres y 2 hombres) con 6 años de experiencia en la evaluación de productos derivados de maní y almendra. Se utilizó un método de análisis descriptivo *híbrido* que combina el análisis descriptivo cuantitativo (Tragon Corp., Redwood City, Calif., EE.UU.) y el análisis de espectro TM (Espectro Sensorial, Inc., Chatham, NJ, EE.UU.), utilizando una escala lineal no estructurada de 150 mm (Meilgaard *et al.*, 2006). Los jueces fueron seleccionados, entrenados y calibrados según la propuesta de Grosso y Resurreccion (2002).

Los atributos sensoriales evaluados y sus definiciones se presentan en la **Tabla 6.2**. Para cada uno de ellos se utilizaron referencias a las cuales se le determinaron la intensidad correspondiente en la escala de 150 mm (**Tabla 6.3**) según lo consensuado por los jueces durante los entrenamientos (Riveros *et al.*, 2013). Además, para cada atributo se utilizó almendra tostada como referencia para todos los atributos. Esta muestra se denominó *warm up* (Quiroga, 2013). Las evaluaciones sensoriales se realizaron en el Laboratorio de Análisis Sensorial (ICTA, FCEFyN – UNC). Los jueces evaluaron las muestras en cabinas individuales, bajo luz fluorescente y a temperatura ambiente. Para la realización de la prueba se colocaron 10 g de muestra en vasos de plástico con tapa y se codificaron con números de 3 dígitos elegidos al azar. Para el análisis de las muestras se utilizó un diseño de bloques completos al azar. Las definiciones de los atributos y la planilla con las intensidades asignadas a las referencias y a la muestra *warm up* (**Tablas 6.2 y 6.3**) se entregaron a los jueces en cada sesión de entrenamiento y evaluación de las muestras en las cabinas individuales. Los jueces probaron todas las referencias y la muestra *warm up* antes de evaluar la intensidad de los atributos de las muestras de almendras provenientes del almacenaje (Riveros *et al.*, 2013; Asensio, 2013).

Tabla 6.2. Definición de atributos sensoriales evaluados sobre las muestras de almendras (Gou *et al.*, 2000).

Atributo	Definición
<i>Apariencia</i>	
<i>Color de la piel</i>	Color percibido en el tegumento (superficie) de la almendra con piel.
<i>Color interno</i>	Color percibido en el cotiledón (interior) luego de morder la almendra.
<i>Brillo</i>	Cantidad de luz reflejada por la superficie.
<i>Facilidad de pelado</i>	Fuerza requerida para pelar la almendra sin romperla.
<i>Porcentaje de pelado</i>	Luego del pelado observar cuanta piel queda adherida a la almendra.
<i>Textura</i>	
<i>Dureza</i>	Fuerza necesaria para comprimir y romper un alimento con los molares.
<i>Crujiente</i>	Magnitud de sonido generado al masticar una muestra con los molares.
<i>Arenosidad</i>	Sensación de arenosidad en la boca mientras se está masticando
<i>Desmigajado</i>	Cómo se desprenden las partículas al morder 2 veces la almendra.
<i>Sabor</i>	
<i>Intensidad de tostado</i>	Sabor y aroma asociado con una almendra tostada en punto medio.
<i>Cartón</i>	Elementos aromáticos asociados con cartón húmedo.
<i>Oxidado</i>	Sabor y aroma asociado con aceite o grasa rancia o vieja.
<i>Factor sensación</i>	
<i>Astringente</i>	Sabor percibido en la lengua, asociado a una sensación entre la sequedad intensa y el amargor.
<i>Gusto</i>	
<i>Dulce</i>	Gusto percibido en la lengua asociado a una solución de sacarosa.
<i>Salado</i>	Gusto percibido en la lengua asociado a una solución de cloruro de sodio.
<i>Amargo</i>	Gusto percibido en la lengua asociado a una solución amarga como la cafeína.
<i>Ácido</i>	Gusto percibido en la lengua asociado a una solución ácida como el ácido cítrico.

Tabla 6.3. Intensidades de referencias estándares y de muestra *warm up* utilizados en las pruebas sensoriales descriptivas de muestras de almendras (Gou *et al.*, 2000; Quiroga *et al.*, 2014).

Atributos	Referencias estándares	Intensidad de atributos (escala 1-150 mm)	Intensidad <i>warm up</i>
<i>Color de la piel</i>	Poroto ¹	10	52
	Café ²	120	
<i>Color interno</i>	Almendra tostada ³		43
<i>Brillo</i>	Poroto	20	8
<i>Dureza</i>	Nuez ⁴	40	83
<i>Crujiente</i>	Copo de maíz ⁵	110	75
<i>Arenosidad</i>	Manzana ⁶	100	60
<i>Desmigajado</i>	Alfajor de maicena ⁷	100	35
<i>Sabor almendra tostada</i>	Almendra tostada ³	50	55
<i>Sabor Cartón</i>	Cartón	30	10
<i>Sabor Oxidado</i>	Girasol tostado ⁸	100	0
<i>Astringente</i>	Te ⁹	34	15
<i>Gusto dulce</i>	Sacarosa		
	0,05 %	20	20
	0,08 %	50	
	0,15 %	100	
<i>Salado</i>	Cloruro de Sodio		
	0,05 %	20	5
	0,08 %	50	
	0,15 %	100	

Tabla 6.3 (Continuación). Intensidades de referencias estándares y de muestra *warm up* utilizados en las pruebas sensoriales descriptivas de muestras de almendras (Gou *et al.*, 2000; Quiroga *et al.*, 2014).

<i>Amargo</i>	Cafeína		
	0,05 %	20	15
	0,08 %	50	
	0,15 %	100	
<i>Ácido</i>	Ácido cítrico		
	0,05 %	20	5
	0,08 %	50	
	0,15 %	100	

¹ Porotos “Egran”, Córdoba, Argentina. ² Café Nescafé® clásico sabor intenso. Importado y fraccionado por Nestlé Argentina. ³ Almendra tostada a punto medio a 200 °C durante 18 min. ⁴ Nuez obtenida comercialmente en “Grandiet”, Córdoba, Argentina. ⁵ Copos de maíz “Granix”, Buenos Aires, Argentina. ⁶ Manzana Red Delicious. ⁷ Alfajor de maicena obtenido comercialmente en Panaderías Del Pilar, Córdoba, Argentina. ⁸ Girasol pelado tostado almacenado durante 126 días a 40 °C. ⁹ Té Taragúí, Corrientes, Argentina.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente con el programa InfoStat versión 2013p (Di Rienzo *et al.*, 2013). Se calcularon medias y desvíos estándar. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA, $\alpha = 0,05$) y test posterior de DGC para encontrar diferencias significativas entre los datos del análisis químico y sensorial de las muestras de almendras durante el almacenamiento.

Se estimaron coeficientes de Pearson para establecer correlaciones entre las variables dependientes. El análisis de componentes principales (PCA) se realizó en la matriz de correlación de los datos estandarizados de las variables químicas y sensoriales. El propósito del ACP fue explorar las asociaciones entre los tratamientos y las variables químicas y sensoriales evaluadas (Nepote *et al.*, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química general

En la **Tabla 6.4.** se muestra la composición química general de las almendras crudas. Gayol *et al.* (2009) publicaron valores similares a los encontrados durante el presente estudio en almendras cosechadas en Argentina.

Tabla 6.4. Composición química general de las almendras crudas.

Composición	Porcentajes (g / 100 g)*
Humedad	2,62 ± 0,07
Lípidos	55,25 ± 0,20
Proteínas	25,64 ± 0,21
Carbohidratos	16,81 ± 0,15
Cenizas	2,30 ± 0,09

*Valores expresados como Media ± DE (n=3)

Composición de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos del aceite de almendra se presenta en la **Tabla 6.5.** Los resultados muestran un elevado porcentaje de ácidos grasos insaturados indicaría que las almendras son un alimento susceptible a la oxidación lipídica. Mexis y Kontominas (2010) estudiaron la composición química de almendras crudas. Dichos autores encontraron valores de 8,15 g/100 de ácidos grasos saturados; 19,04 g/100 de ácidos grasos poliinsaturados y 71,89 g/100 de ácidos grasos monoinsaturados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio.

Tabla 6.5. Composición de ácidos grasos de las almendras.

Ácidos Grasos	Porcentajes (g / 100 g)*
Monoinsaturado	71,65
Oleico (18:1)	71,25 ± 0,36
Palmitoleico (16:1)	0,40 ± 0,01
Poliinsaturado	19,77
Linoleico (18:2)	19,77 ± 0,14
Saturado	8,58
Palmítico (16:0)	6,74 ± 0,06
Esteárico (18:0)	1,84 ± 0,58

*Valores expresados como Media ± DE (n=3).

Análisis químicos

Los indicadores químicos analizados, índice de peróxidos (IP) y dienos conjugados (DC) se incrementaron en todas las muestras durante el almacenaje (**Figura 6.1**).

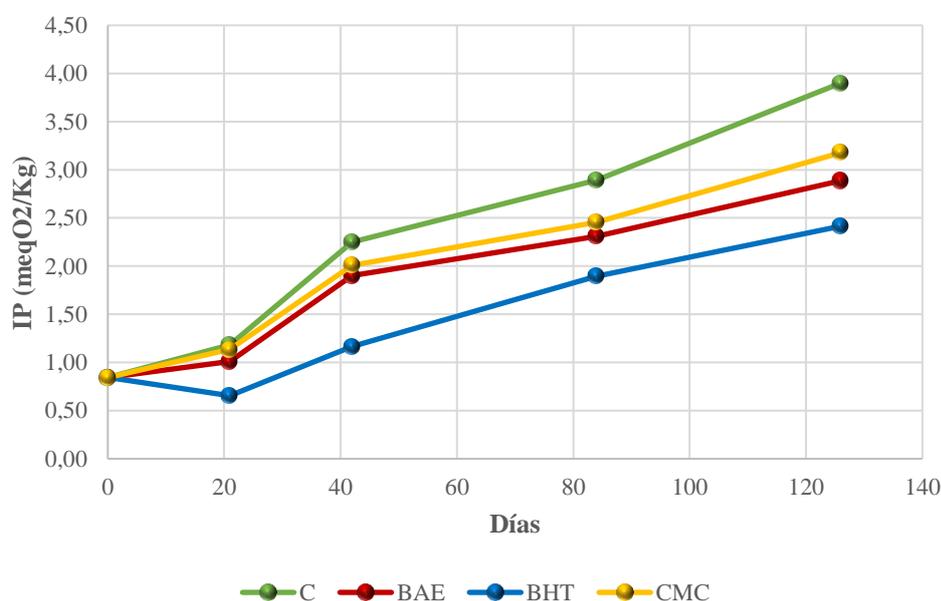
Las muestras de almendra presentaron diferencias significativas en sus valores de IP durante el almacenaje. Los cambios en los IP se muestran en la **Figura 6.1-A**. Inicialmente (día 0) todas las muestras presentaron un bajo IP (0,58 meqO₂/kg). Se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos a partir del día 21 de almacenaje. Al final del almacenamiento (día 126), la muestra control (C) presentó el mayor IP (3,90 meqO₂/kg) y las almendras con BHT mostraron el menor IP (2,00 meqO₂/kg). Los tratamientos con CMC

y BAE exhibieron valores intermedios de IP (2,69 y 2,57 meqO₂/kg, respectivamente), sin diferencias significativas entre ellas.

En cuanto a DC, las muestras mostraron un incremento desde 0,00 (día 0) hasta 9,55 (día 126), sin presentar diferencias significativas entre las mismas (**Figura 6.1, B**).

La almendra de acuerdo a la composición química de su aceite (Mexis y Kontominas, 2010) es un producto muy estable con muy baja velocidad de oxidación durante el almacenamiento. Por lo tanto, los resultados reflejan durante los 126 días un nivel de oxidación primaria de sus lípidos muy bajo, lo cual se explica con los valores de IP observados. A pesar de eso, se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos mostrando un efecto protector de la cubierta comestible tal como se reporta en otras investigaciones (Riveros *et al.*, 2013; 2015). Este efecto protector se incrementa en los tratamientos con el agregado de los antioxidantes naturales (BAE) y sintéticos (BHT). En el caso del indicador DC, los niveles detectados también fueron muy bajos y no se llegaron a evidenciar diferencias significativas entre los tratamientos.

A



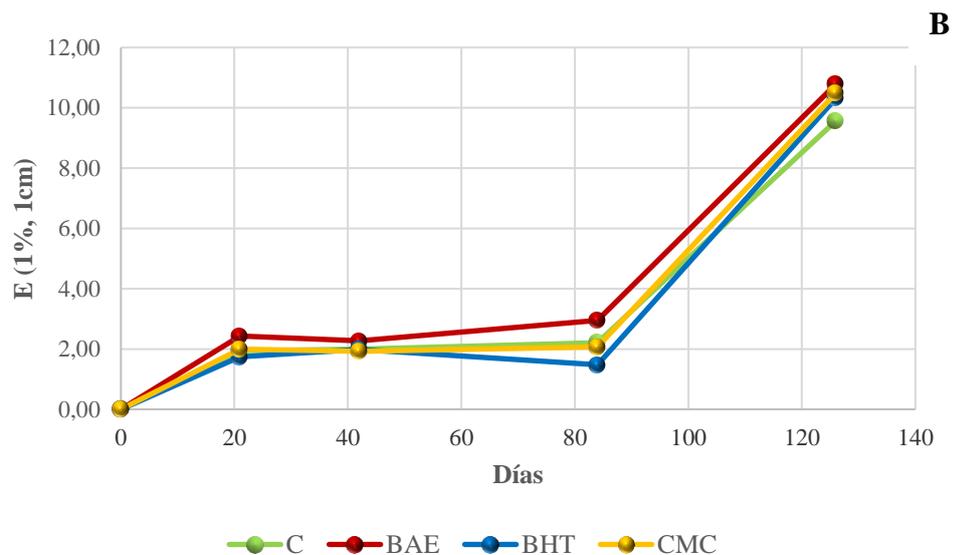


Figura 6.1. Indicadores químicos evaluados en las muestras de almendra durante los 126 días de almacenaje a 40 °C. **A.** Índice de peróxidos (IP); **B.** Dienos Conjugados (DC).

Tratamientos: C = almendras tostadas sin recubrimiento; CMC = almendras recubiertas con CMC; BAE = almendras recubiertas con CMC y suplementadas con BAE; BHT = almendras recubiertas con CMC y suplementadas con BHT.

Diferentes autores hacen referencia a los efectos protectores de cubiertas comestibles en alimentos. Gayol *et al.* (2009) realizaron un estudio en almendras recubiertas con arropo de tuna y algarrobo, y encontraron un efecto protector de las cubiertas al finalizar el período de almacenaje de 60 días. Riveros *et al.* (2013) estudiaron diferentes cubiertas comestibles aplicadas sobre maní tostado. Estos autores publicaron que las cubiertas comestibles ayudan a mantener los atributos sensoriales del producto por más tiempo y, además, la cubierta elaborada con CMC presentó el mayor efecto protector en el maní tostado. Baldwin y Wood (2006) estudiaron el uso de cubiertas comestibles para preservar nueces de pecan, demostrando que la cubierta a base de CMC presenta un alto potencial para extender la vida útil de las nueces. Este efecto protector de la cubierta comestible con CMC se puede observar en el estudio de almacenamiento realizado en el presente estudio ya que los valores de IP de los tratamientos de almendras tostadas recubiertas fueron menores al tratamiento control.

Por su parte, los extractos de tegumento de maní exhiben propiedades antioxidantes al incluirse en diferentes productos como aceite de girasol, maní tostado con miel y salame (Nepote *et al.*, 2002; 2004; Larrauri *et al.*, 2013). En el presente estudio, el extracto de tegumento de maní se incluyó en una cubierta comestible para potenciar el efecto protector de la misma en un alimento altamente lipídico susceptible a la degradación como las almendras tostadas. Asimismo, se logró fortalecer las propiedades antioxidantes del producto al incluir un extracto que en su composición química presenta polifenoles como el resverarol y procianidinas.

Análisis de volátiles de oxidación (AV)

Se identificaron por GC-MS diferentes compuestos volátiles en las muestras de almendra almacenadas. Los volátiles de oxidación hexanal y nonanal fueron los principales componentes que mostraron incrementos durante el almacenamiento en las muestras (**Figura 6.2, A y B**). La importancia en medir y cuantificar estos aldehídos se relaciona a que son indicadores de reacciones de oxidación de lípidos en los alimentos y generan sabores rancios en los mismos. Inicialmente, todos los tratamientos de almendra presentaron similares contenidos de hexanal y nonanal (áreas de los picos de 219×10^6 a 373×10^6 para el hexanal y de 67×10^6 a 94×10^6 para el nonanal). Las diferencias significativas en las áreas de los picos entre los tratamientos de almendra se encontraron a partir del día 84 (**Figura 6.2, A y B**). La muestra C presentó las mayores áreas de los compuestos detectados. Por su parte, las muestras BHT y BAE mostraron los valores más bajos de dichos volátiles de oxidación. Estos resultados evidencian que el uso de cubierta comestible y la adición del extracto del tegumento de maní BAE ejercen un efecto preservante disminuyendo el desarrollo de compuestos volátiles derivados de la oxidación de los lípidos.

Lee *et al.* (2014) estudiaron el perfil de volátiles de oxidación en almendras tostadas durante el almacenaje a dos temperaturas (20 y 35 °C) en donde el porcentaje de hexanal aumentó en todas las muestras. Asimismo, Xiao *et al.* (2014) encontraron una asociación positiva entre el contenido de hexanal, nonanal y otros aldehídos en muestras de almendras, con el aumento en el tiempo de tostado de las mismas. Un comportamiento similar se observó en el presente estudio ya que el contenido de hexanal aumentó durante el almacenamiento de todos los tratamientos de almendras.

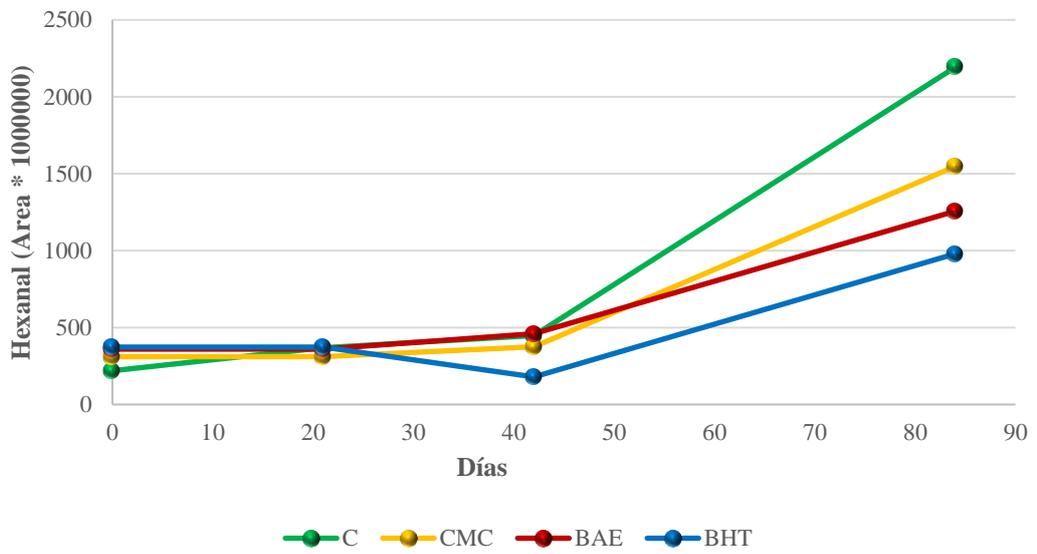
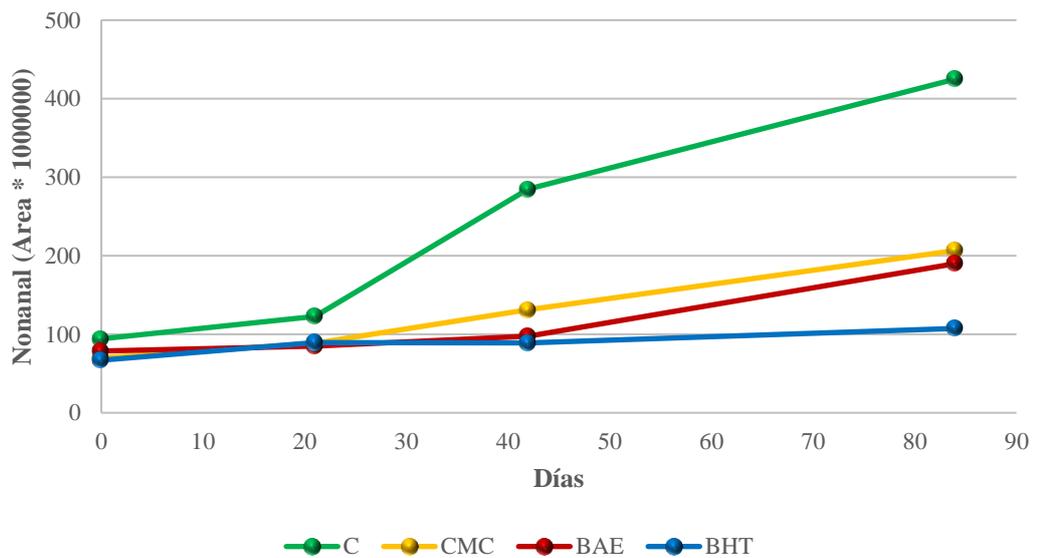
A**B**

Figura 6.2. Volátiles de oxidación de las muestras de almendra durante los 126 días de almacenaje a 40 °C. **A.** Hexanal; **B.** Nonanal.

Tratamientos: C = almendras tostadas sin recubrimiento; CMC = almendras recubiertas con CMC; BAE = almendras recubiertas con CMC y suplementadas con BAE; BHT = almendras recubiertas con CMC y suplementadas con BHT.

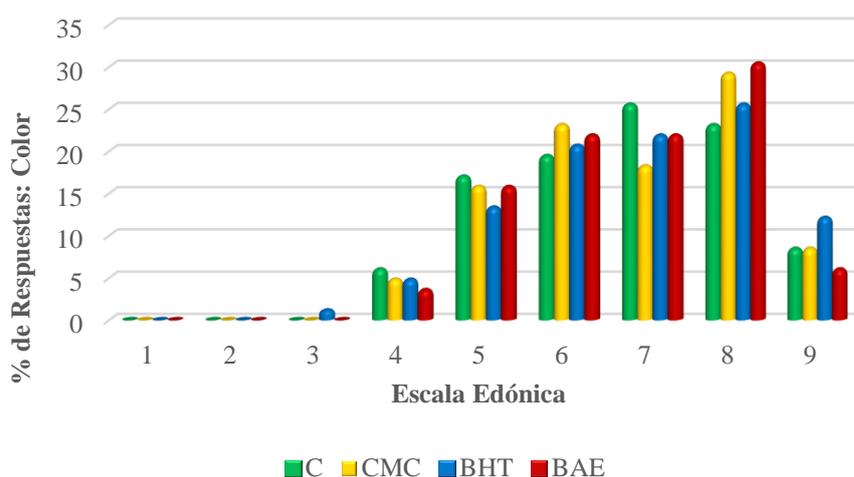
Pruebas de aceptabilidad

Los resultados de la prueba de aceptabilidad por parte de consumidores se muestran en la **Figura 6.3**. Con respecto al atributo *color* (**Figura 6.3, A**), la mayor proporción de los consumidores otorgaron 8 puntos (me gusta mucho) a las muestras CMC, BHT y BAE, mientras que para la muestra C, el valor 7 de la escala hedónica (me gusta bastante) fue el más seleccionado por los consumidores.

Por otra parte, para la aceptabilidad del atributo *sabor* (**Figura 6.3, B**), la mayoría de los consumidores otorgaron 7 puntos (me gusta bastante) a las muestras BHT y BAE, respecto a las muestras C y CMC, que la mayoría seleccionó 6 puntos (me gusta ligeramente).

Aunque se observaron estas diferencias en los porcentajes de consumidores en cada valor de la escala hedónica de las diferentes muestras, las mismas no mostraron diferencias significativas en sus aceptabilidades promedio. El promedio general fue de $6,77 \pm 1,38$ para el color y de $6,61 \pm 1,61$ para el sabor de las muestras. En consecuencia, el agregado de la cubierta comestible no afectó de manera significativa la aceptabilidad del producto por parte de los consumidores.

A



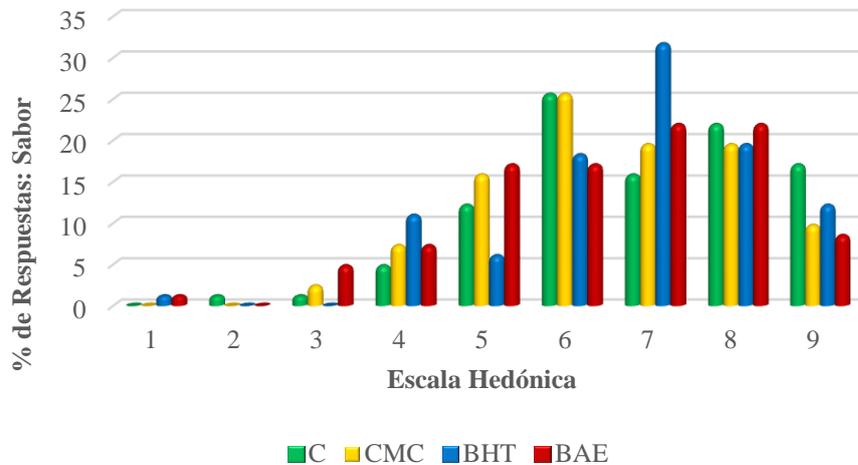


Figura 6.3. Porcentajes de respuestas para cada punto de la escala hedónica de 9 puntos de la prueba de aceptabilidad de las muestras de almendra. **A.** Atributo *color*; **B.** Atributo *sabor*.

Tratamientos: C = almendras tostadas sin recubrimiento; CMC = almendras recubiertas con CMC; BAE = almendras recubiertas con CMC y suplementadas con BAE; BHT = almendras recubiertas con CMC y suplementadas con BHT.

Las pruebas de aceptabilidad son fundamentales para las industrias alimenticias a la hora de evaluar el impacto de un nuevo producto en el mercado ya que influye directamente en la intención de compra por parte de los consumidores. Por lo tanto, el nivel general de gusto por el producto debe ser tan alta como sea posible. Un estudio realizado por Granato y Ellendersen (2009) sobre galletas libres de gluten con la adición de almendras demostró un 85% de aceptación de este producto por parte de los consumidores. Tey *et al.* (2014) estudiaron la aceptabilidad y los efectos del consumo regular de diferentes frutos secos (almendras y avellanas). Los resultados determinaron que la almendra presentó el mayor valor de aceptación para el atributo *gusto* (95%). Asimismo, se observó una mejora en los perfiles de lípidos en sangre luego de la inclusión en la dieta de ambos frutos secos, por lo que su consumo ayudaría a reducir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.

En el presente estudio se utilizó una escala hedónica de 9 puntos para medir cuanto agrada el producto a los consumidores. Dicha escala no determina porcentaje de aceptación, pero se puede estimar que aquellos consumidores que muestran una respuesta de 5 o más puntos en la escala hedónica, aceptan el producto (Grosso y Resurreccion, 2002). En función

de ello, se calcularon los porcentajes de aceptación para las distintas muestras evaluadas y BAE obtuvo el mayor valor para el atributo color (96%) y la muestras con cubiertas comestibles (CMC y BAE) el mayor valor para el atributo sabor (93 y 90%, respectivamente). Dichos valores de aceptación son superiores a los obtenidos por Granato y Ellendersen (2009).

Pruebas descriptivas

Los diferentes atributos sensoriales evaluados para las muestras de almendra (día 0 de almacenamiento) se muestran en la **Tabla 6.6**. En general, todas las muestras se caracterizaron por presentar una alta intensidad (medido en escala de 150 mm) de color de la piel (86,4 – 91,2), dureza (82,8 – 87,1) y crujiente (74,9 – 76,2). Por su parte, el atributo intensidad de tostado presentó valores entre 51,2 y 55,2. Los atributos negativos como oxidado y cartón no se detectaron en las muestras el día 0 de almacenaje (producto fresco).

El atributo color de la piel fue el único que mostró diferencias significativas entre las muestras. La muestra control (C) tuvo una valoración de intensidad menor (86,4) que la muestra con cubierta y extracto de tegumento de maní (BAE, 91,2). Las muestras con cubierta comestible (CMC, BHT y BAE) presentaron intensidades de color de la piel similares puesto que el recubrimiento con CMC genera un producto de almendra tostada más oscuro.

Tabla 6.6. Escala de intensidad de los atributos sensoriales evaluados en los tratamientos de almendras tostadas (día 0 de almacenaje).

Atributos Sensoriales	Almendras tostadas (Escala de intensidad 0-150 mm)							
	C	*	CMC	*	BHT	*	BAE	*
<i>Color de la piel</i>	86,4 ± 2,7	a	89,4 ± 2,5	ab	89,4 ± 3,7	ab	91,2 ± 5,4	b
<i>Color Interno</i>	42,8 ± 5,3		44,1 ± 5,8		44,9 ± 8,1		43,6 ± 5,7	
<i>Brillo</i>	9,4 ± 3,1		8,5 ± 1,6		7,7 ± 2,1		8,9 ± 3,4	
<i>Dulce</i>	20,0 ± 3,1		20,6 ± 2,0		21,1 ± 1,9		19,4 ± 3,5	
<i>Salado</i>	5,0 ± 0,0		5,5 ± 1,6		5,3 ± 0,9		5,0 ± 0,0	
<i>Acido</i>	7,0 ± 4,5		7,0 ± 4,8		6,0 ± 2,1		7,0 ± 4,2	
<i>Amargo</i>	12,4 ± 2,5		11,6 ± 2,0		12,7 ± 3,4		11,9 ± 4,0	
<i>Intensidad de tostado</i>	51,2 ± 8,5		53,7 ± 7,2		55,2 ± 7,9		52,2 ± 7,9	
<i>Cartón</i>	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	
<i>Oxidado</i>	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	
<i>Astringencia</i>	14,0 ± 4,2		13,2 ± 2,4		14,5 ± 3,2		13,4 ± 3,2	
<i>Dureza</i>	82,8 ± 9,1		83,2 ± 4,8		87,1 ± 5,8		85,3 ± 7,9	
<i>Crujiente</i>	75,0 ± 7,1		75,4 ± 3,8		76,2 ± 2,0		74,9 ± 5,3	

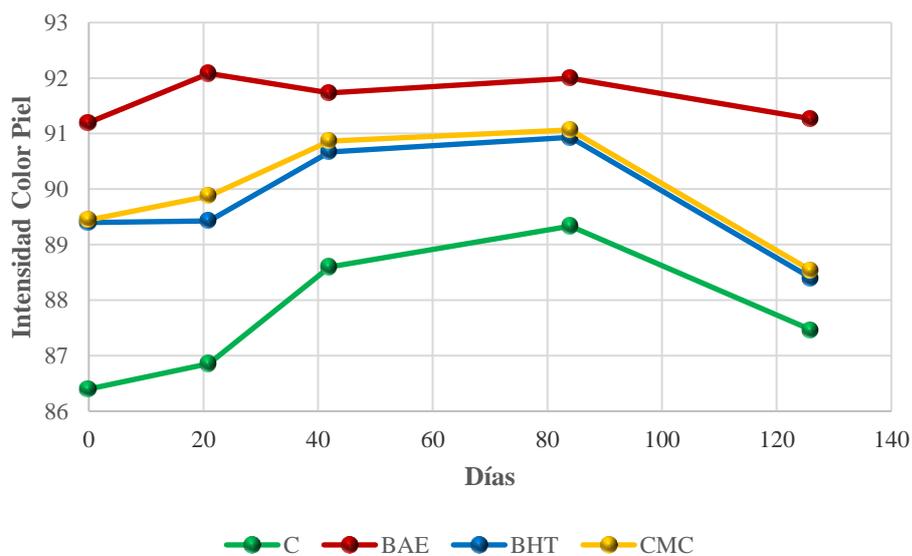
Tratamientos: C = almendras tostadas sin recubrimiento; CMC = almendras recubiertas con CMC; BAE = almendras recubiertas con CMC y suplementadas con BAE; BHT = almendras recubiertas con CMC y suplementadas con BHT.

*Medias y DE (n=3). Diferentes letras en las filas indican diferencias significativas entre las muestras (ANOVA y DGC test, $p = 0,05$).

Los cambios en los atributos sensoriales de las muestras de almendra durante los 126 días de almacenaje se muestran en la **Figura 6.4**. En general, presentaron pocos cambios en la mayoría de los atributos sensoriales. Las muestras tuvieron diferencias en el atributo color de la piel (**Figura 6.4, A**) en el día 0 del almacenaje, donde la muestra BAE presentó los valores más altos. Dicho atributo mostró un incremento en todas las muestras hasta el día 80 donde, posteriormente, comenzó a disminuir hacia el día 126.

Oxidado y cartón fueron los únicos atributos que mostraron aumentos significativos durante el almacenaje, un comportamiento similar fue observado en trabajos anteriores sobre productos de maní (Nepote *et al.*, 2004; 2006a; b) donde la intensidad de dichos atributos aumentó durante el almacenamiento. El atributo oxidado se calificó como diferente entre las muestras a partir del día 20 de almacenaje (**Figura 6.4, B**). La muestra control (C) presentó la mayor intensidad de oxidado respecto a los demás tratamientos. Las muestras CMC, BHT y BAE no tuvieron diferencias significativas en la intensidad del atributo oxidado durante el almacenamiento. El atributo cartón aumentó durante el almacenamiento en todas las muestras, sin diferencias significativas entre las mismas (**Figura 6.4, C**). Estos atributos (oxidado y cartón) se relacionan al desarrollo de compuestos volátiles derivados de la oxidación de los lípidos (hidroperóxidos, aldehídos, cetonas) y repercuten de manera negativa en la aceptabilidad general de un alimento.

A



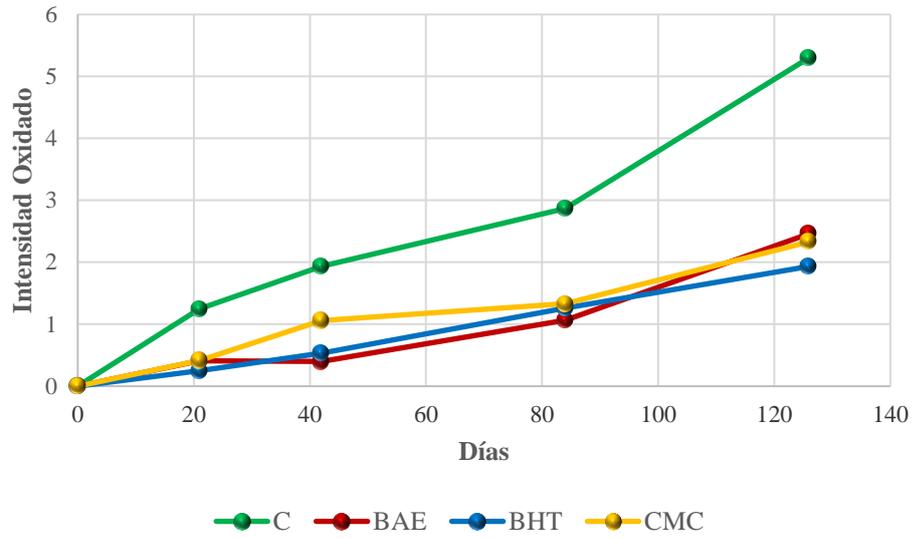
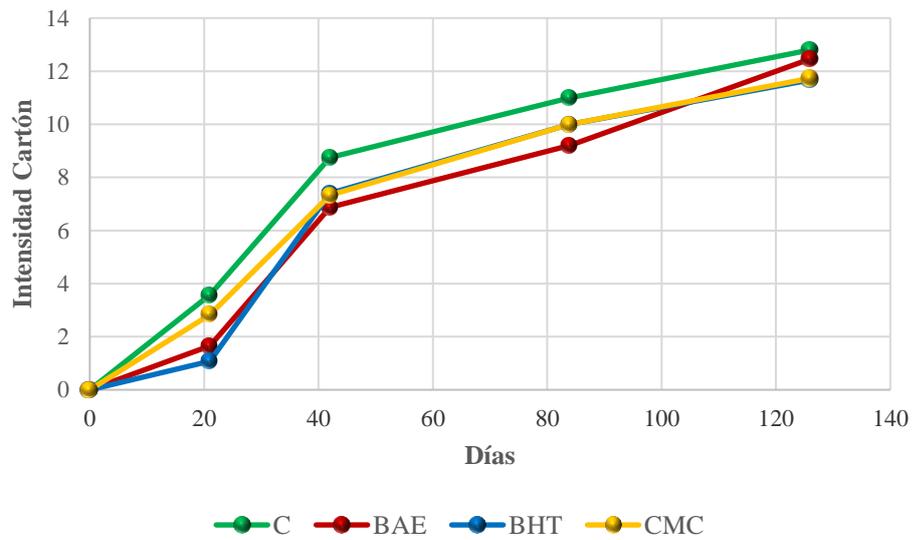
B**C**

Figura 6.4. Intensidades de atributos sensoriales de las muestras de almendra durante los 126 días de almacenaje a 40 °C. **A.** Color de la piel; **B.** Oxidado; **C.** Cartón.

Tratamientos: C = almendras tostadas sin recubrimiento; CMC = almendras recubiertas con CMC; BAE = almendras recubiertas con CMC y suplementadas con BAE; BHT = almendras recubiertas con CMC y suplementadas con BHT.

Análisis de componentes principales

El gráfico obtenido a partir de las dos primeras componentes principales (CP) del ACP se muestra en la **Figura 6.5**. Las variables se representaron mediante vectores y los tratamientos mediante puntos. Las variables estudiadas fueron: IP, DC, áreas de hexanal y nonanal y los atributos sensoriales del análisis descriptivo evaluados en las muestras de almendra durante el almacenaje. Las dos primeras CP del ACP explicaron el 84,2 % de la variabilidad total de los tratamientos. Este porcentaje se considera aceptable para establecer correlaciones entre las variables. Las variables IP, DC, hexanal, nonanal y sabores oxidado y cartón se encuentran en el cuadrante derecho del gráfico, lo que indica una asociación positiva entre estos parámetros relacionados al deterioro del producto. La muestra C presentó los mayores valores de dichas variables por lo que se ubicó dentro del mismo cuadrante. Las muestras BHT y BAE se encuentran en el sector opuesto a los indicadores de deterioro por lo que tienen baja asociación señalando este efecto que estas dos muestras son las que sufrieron un menor proceso de deterioro durante el almacenaje. Este resultado a su vez evidencia que los antioxidantes BHT y BAE ayudan a preservar el producto durante el almacenaje.

Las variables analizadas, todas relacionadas con el deterioro lipídico, se manifestaron en mayor proporción en la muestra control, mientras que en los tratamientos con el antioxidante natural (BAE) y el sintético (BHT) presentaron menores valores.

En la **Tabla 6.7** se muestran los coeficientes de correlación de Pearson para las variables químicas y sensoriales evaluadas. Se encontraron correlaciones positivas entre las variables químicas (DC, IP, hexanal, nonanal) y las variables sensoriales (cartón y oxidado).

Tabla 6.7. Coeficientes de correlación de Pearson ($P < 0.01$) para las variables químicas y sensoriales en las muestras de almendras durante el almacenaje.

	IP	DC	Hexanal	Nonanal
DC	0,67			
Hexanal	0,85	0,81		
Nonanal	0,76	0,71	0,82	
Cartón	0,76	0,74	0,88	0,69

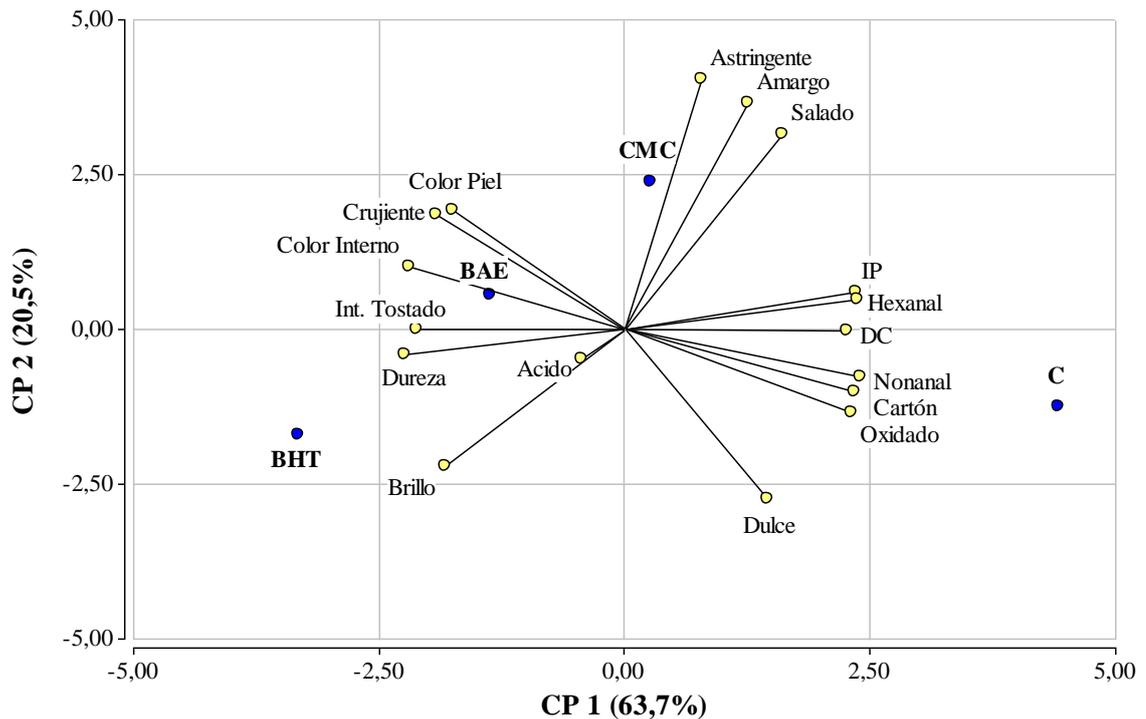


Figura 6.5. Gráfico de coordenadas de la primera y segunda componente del análisis de componentes principales. Variables: índice de peróxido (IP), dienos conjugados (DC), porcentaje de área de hexanal y nonanal y los atributos sensoriales de las pruebas descriptivas. Tratamientos: C = almendras tostadas sin recubrimiento; CMC = almendras recubiertas con CMC; BAE = almendras recubiertas con CMC y suplementadas con BAE; BHT = almendras recubiertas con CMC y suplementadas con BHT.

Investigaciones previas en productos de maní publicaron correlaciones positivas entre las variables químicas y sensoriales (Nepote *et al.*, 2006a; b; Olmedo *et al.*, 2009). Grosso y Resurreccion (2002) informaron una correlación positiva entre el sabor oxidado y el contenido de hexanal en maní tostado y maní recubierto. Estos autores utilizaron ecuaciones de regresión para definir las relaciones entre la aceptación del producto por parte de los consumidores en las pruebas sensoriales y el contenido de hexanal en las muestras como indicador químico.

Quiroga *et al.* (2014) encontraron una asociación positiva en semillas de girasol tostadas entre el contenido de hexanal e indicadores químicos de oxidación (IP y *p*-anisidina) con atributos sensoriales negativos (oxidados y cartón).

CONCLUSIONES

Las almendras tostadas sin recubrimiento muestran un incremento en los indicadores de oxidación lipídica (IP y DC) y en la intensidad de los atributos sensoriales negativos (oxidado y cartón) durante el almacenamiento.

El uso de CMC como cubierta comestible con el agregado de extractos de tegumento de maní (BAE) y BHT protege a las almendras contra el deterioro oxidativo.

El BHT presenta la mayor actividad antioxidante en las almendras tostadas, seguido del extracto de tegumento de maní (BAE).

La incorporación de una cubierta comestible más la adición de un antioxidante natural contribuye significativamente al aumento de vida útil para el período y las condiciones de conservación evaluadas.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC 2010. Official Methods of Analysis of the AOAC. Washington, DC, USA. Association of Official Analytical Chemists. pp.
- Asensio C.M., 2013. Utilización de aceites esenciales de variedades de orégano como conservante antimicrobiano, antioxidante y de las propiedades sensoriales de alimentos: quesos cottage, ricota y aceite de oliva. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. 228 pp
- Asensio C.M., Nepote V., Grosso N.R. 2013. Consumers' acceptance and quality stability of olive oil flavoured with essential oils of different oregano species. *International Journal of Food Science and Technology*. 48: 2417–2428.
- Baldwin E.A. y Wood B. 2006. Use of edible coating to preserve pecans at room temperature. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 41: 188–192.
- Baldwin E.A, Hagenmaier R., Bai J. 2011. Edible coatings and films to improve food quality. CRC Press. Boca Raton, Florida, Estados Unidos, 2da. edición. 460 pp.
- Boue S.M., Cleveland T., CarterWientjes C., Shih B.Y., Bhatnagar D., McLachlan J.M., Burow M.E. 2009. Phytoalexin enriched functional foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 57: 2614–2622.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2009. *Food Chemistry*. Springer. Berlin, Alemania. 4ta. Ed. 1070 pp.
- Buranasompoba A., Tang J., Powersa J.R., Reyes J., Clark S., Swanson B.G. 2007. Lipoxygenase activity in walnuts and almonds. *LWT-Food Science and Technology*. 40: 893–899.
- CAA. 2014. Capítulo XVIII, Aditivos alimentarios. Código Alimentario Argentino. ANMAT, Ministerio de Salud, Argentina. Publicado en internet, disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp. Activo abril 2016.

- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. 2013. InfoStat, versión 2013p. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Embuscado M.E. y Huber K.C. 2009. Edible films and coatings for food applications. Springer Media. New York, Estados Unidos. 416 pp.
- Gayol M.F., Soliani S., Quiroga P.R., Nepote V., Grosso N.R. 2009. Effect of prickly pear and algarrobo pod syrup coatings on consumer acceptance and stability of roasted almonds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 89: 2415–2420.
- Gou P., Diaz I., Guerrero L., Valero A., Arnau J., Romero A. 2000. Physico-chemical and sensory property changes in almonds of *Desmayo Largueta* variety during toasting. *Food Science and Technology International*. 6: 1–7.
- Granato D. y Ellenderson L. 2009. Almond and peanut flours supplemented with iron as potential ingredients to develop gluten-free cookies. *Ciência e Tecnologia de Alimentos - Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 29(2): 395-400
- Grosso N.R. y Guzmán C.A. 1995. Chemical Composition of aboriginal peanut (*A. hypogaea*) seeds from Perú. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 43: 102-105.
- Grosso N.R., Nepote V., Guzmán C.A. 2000. Chemical composition of some wild peanut species (*Arachis L.*) seeds. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 48(3): 806-809.
- Grosso NR, Resurreccion AVA. 2002. Predicting consumer acceptance ratings of cracker-coated and roasted peanuts from descriptive analysis and hexanal measurements. *Journal of Food Science*. 67: 1530–1537.
- Larrauri M., Barrionuevo M.G., Riveros C., Mestrallet M.G., Zunino M.P., Zygodlo J., Grosso N.R., Nepote V. 2013. Effect of peanut skin extract on chemical stability and sensory properties of salami during storage. *Journal of the science of food and agriculture*. 93: 1751–1757.
- Larrauri M., Demaría M.G., Ryan L.C., Asensio C.M., Grosso N.R., Nepote V. 2016. Chemical and sensory quality preservation in coated almonds with the addition of antioxidants. *Journal of Food Science*. 81: 208–215.

- Lee S.Y., Dangaran K.L., Guinard J.X., Krochta J.M. 2002. Consumer acceptance of whey-protein- coated as compared with shellac coated chocolate. *Journal of Food Science*. 67: 2764–2769.
- Lee J., Xiao L., Zhang G., Ebeler S.E., Mitchell A.E. 2014. Influence of storage on volatile profiles in roasted almonds (*Prunus dulcis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 11236–11245.
- McClements D.J. y Decker E.A. 2010. Lípidos. En: Samodaran S., Parkin K.L., Fennema O.R., editors. *Fennema química de los alimentos*. 3th ed. España: Editorial Acribia. p 155–214.
- Meilgaard M., Civille G.V., Carr B.T. 2006. *Sensory evaluation techniques*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, Estados Unidos, 2da. Edición. 416 pp.
- Mexis S.F., Badeka A. V., Kontominas M.G. 2009a. Quality evaluation of raw ground almond kernels (*Prunus dulcis*): Effect of active and modified atmosphere packaging, container oxygen barrier and storage conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10: 580–589.
- Mexis S.F. y Kontominas M.G. 2010. Effect of oxygen absorber, nitrogen flushing, packaging material oxygen transmission rate and storage conditions on quality retention of raw whole unpeeled almond kernels (*Prunus dulcis*). *LWT-Food Science and Technology*. 43: 1-11.
- Moayedi A., Rezae K., Moini S., Keshavarz B. 2011. Chemical compositions of oils from several wild almond species. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 88:503–8.
- Nepote V., Grosso N.R., Guzman C. 2002. Extraction of antioxidant components from peanut skins. *Grasas y Aceites*. 53: 391–395.
- Nepote V., Mestrallet M.G., Grosso N.R. 2004. Natural antioxidant effect from peanut skins in honey-roasted peanuts. *Journal of Food Science*. 69: 295–300.
- Nepote V., Mestrallet M.G, Accietto R.H., Galizzi M., Grosso N.R. 2006a. Chemical and sensory stability of roasted high-oleic peanuts from Argentina. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 86: 944–952.

- Nepote V., Mestrallet M.G., Grosso N.R. 2006b. Oxidative stability in fried-salted peanuts elaborated with high-oleic and regular peanuts from Argentina. *International Journal of Food Science and Technology*. 41: 900–909.
- Nepote V., Olmedo R.H., Mestrallet M.G., Grosso N.R. 2009. A study of the relationships among consumer acceptance, oxidation chemical indicators, and sensory attributes in high-oleic and normal peanuts. *Journal of Food Science*. 74: 1–8.
- Olmedo R.H., Asensio C., Nepote V., Mestrallet M.G., Grosso N.R. 2009. Chemical and sensory stability of fried-salted peanuts flavored with oregano essential oil and olive oil. *Journal of Science and Food Agriculture*. 89: 2128–2136.
- Quiroga P.R. 2013. Evaluación de aceites esenciales y monoterpenos como agentes conservantes de las propiedades químicas y sensoriales de los alimentos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. 157 pp.
- Quiroga P.R., Asensio C.M., Nepote V. 2014. Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sunflower seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 95: 471–479.
- Riveros C.G., Mestrallet M.G., Gayol M.F., Quiroga P.R., Nepote V., Grosso N.R. 2010. Effect of storage on chemical and sensory profiles of peanut pastes prepared with high-oleic and normal peanuts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90: 2694–2699.
- Riveros C.G., Mestrallet M.G., Quiroga P.R., Nepote V., Grosso N.R. 2013. Preserving sensory attributes of roasted peanuts using edible coatings. *International Journal of Food Science and Technology*. 48: 850–859.
- Riveros C.G., Nepote V., Grosso N.R. 2015. Thyme and basil essential oils included in edible coatings as a natural preserving method of oilseed kernels. *Journal of Science and Food Agriculture*. Article published online: DOI: 10.1002/jsfa.7080.
- Rojas Graü M.A., Oms Oliu G., Soliva Fortuny R., Martín Belloso O. 2009. The use of packaging techniques to maintain freshness in fresh-cut fruits and vegetables: a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 44: 875–889.

- Tey S.L., Delahunty C., Gray A., Chisholm A., Brown R.C. 2014. Effects of regular consumption of different forms of almonds and hazelnuts on acceptance and blood lipids. *European Journal of Nutrition*. Article published online: DOI 10.1007/s00394-014-0808-7
- Tongdeesoontorn W., Mauer L.J., Wongruong S., Sriburi P., Rachtanapun P. 2011. Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch- based films. *Chemistry Central Journal*. 5: 6–13.
- USDA Foreign Agricultural Service. 2013. Demand for U.S. Nuts is Booming. GAIN Report Number: RSATO 1311. Publicado en internet, disponible en: http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/DEMAND%20FOR%20U.S.%20NUTS%20IS%20BOOMING%20%20%20_St.%20Petersburg_Russian%20Federation_8-27-2013.pdf. Activo Marzo 2016.
- Xiao L., Lee J., Zhang G., Ebeler S.E., Wickramasinghe N., Seiber J., Mitchell A.E. 2014. HS-SPME GC/MS characterization of volatiles in raw and dry-roasted almonds (*Prunus dulcis*). *Food Chemistry*. 151: 31–39

CAPITULO VII

CAMBIOS QUÍMICOS, BIOLÓGICOS Y SENSORIALES DE LECHE DE SOJA CON EL AGREGADO DE EXTRACTOS Y MICROCAPSULAS DE POLIFENOLES DE TEGUMENTO DE MANÍ

INTRODUCCIÓN

La soja es una fuente importante de proteínas, péptidos bioactivos y, además, contiene altos niveles de minerales y aminoácidos. Actualmente la soja se perfila como una importante materia prima para la elaboración de *alimentos funcionales*, aquellos cuyo consumo no sólo aporta nutrientes, sino que además generan beneficios adicionales en la salud (Cuenca y Quicazán, 2004).

En los últimos años existe un creciente interés en el desarrollo de nuevas *bebidas funcionales*. La fortificación de bebidas ofrece una alternativa conveniente para contribuir a una mejor calidad nutricional de los consumidores y a un mayor equilibrio en la dieta diaria (Rocha-Parra *et al.*, 2016). Por ejemplo, las bebidas fortificadas con polifenoles derivados de la uva han recibido considerable interés por sus efectos beneficiosos sobre la salud: antioxidante, anticancerígeno, antiinflamatorio, hipotensor, propiedades anticoagulantes (Arranz *et al.*, 2012). Estos beneficios se atribuyen a las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos presentes en las uvas.

La leche de soja es uno de los productos más populares derivados de la industrialización de la soja y corresponde a la suspensión acuosa de los sólidos solubles extraídos de los porotos remojados, molidos y filtrados (Schillinger *et al.*, 2001).

Algunos autores han observado la presencia de características sensoriales indeseables en la textura de las bebidas de soja, como la heterogeneidad y la consistencia aceitosa (N'Kouka *et al.*, 2004; Potter *et al.*, 2007). A pesar de la importancia de las características texturales, el principal factor que limita el consumo de la leche de soja se relaciona con su sabor, comúnmente se conoce como *sabor a poroto* (Xiaodi *et al.*, 2015). Este *sabor a*

poroto se relaciona a la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados inducidos por la enzima lipoxigenasa (Achouri *et al.*, 2007).

En consecuencia, una manera de intentar resolver el problema de *sabor a poroto* es desarrollar variedades de soja con bajo contenido en lipoxigenasa y/o tratar de enmascarar el sabor indeseable mediante la elaboración de bebidas con diferentes aromas, como la vainilla, el chocolate o la adición de jugos de frutas (Villegas *et al.*, 2009).

Actualmente, el consumo de compuestos naturales y bioactivos se encuentra ampliamente difundido. Asimismo, estos compuestos son generalmente propensos a la degradación, tanto durante el almacenamiento como en el procesado de los alimentos, ya que muchos de ellos son física, química y/o enzimáticamente inestables, lo que lleva a su degradación o transformación, con la consiguiente pérdida de bioactividad. Además, en algunos casos, presentan colores, sabores, olores y/o texturas desagradables que resultan poco apetecibles para los consumidores (Días *et al.*, 2015).

Las microcapsulas aplicadas en la industria alimentaria surgen como una alternativa para proteger a los compuestos naturales y bioactivos de los factores ambientales, promover un manejo más eficiente y sencillo, controlar su liberación dentro del organismo y/o enmascarar el sabor, color u olor de los mismos (Tang y Li, 2013). Las microcápsulas protegen del medio circundante al material contenido en el núcleo para evitar que reaccione con otros componentes del alimento y disminuya su biodisponibilidad en el organismo. También aumentan la solubilidad, dispersabilidad y fluidez de los compuestos del núcleo. Por ejemplo, los compuestos fenólicos, que son moléculas antioxidantes muy potentes, presentan problemas en su biodisponibilidad, ya que se transforman, después de la ingestión, en derivados metilados, glucuronato y metabolitos sulfatados (Dias *et al.*, 2015)

Para aumentar la aceptabilidad de las bebidas de leche de soja fortificadas con compuestos naturales es fundamental contar con una mejor comprensión de su composición química, física y las características sensoriales y, además, cómo cada una de estas variables influye en la respuesta final del consumidor.

El presente capítulo tiene como *objetivo general* la adición de extractos y fracciones purificadas de tegumento de maní y microcápsulas en un alimento con alta actividad agua y evaluar los cambios químicos, biológicos y sensoriales ocurridos durante el período de almacenamiento.

Los *objetivos específicos* fueron analizar los cambios químicos, de actividad antioxidante, microbiológicos y sensoriales en muestras de leche de soja elaborada con el agregado de microcápsulas de polifenoles de tegumento de maní durante el almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Para los experimentos de este capítulo, se trabajó con la fracción purificada Blanchado Acetato de Etilo (BAE) obtenida según el procedimiento descrito en el Capítulo II.

La leche de soja se elaboró a partir de porotos de soja (*Glycine max L.*, hilo de color amarillo) adquiridos en GrandDiet, Córdoba, Argentina.

MÉTODOS

Elaboración de la leche de Soja

La elaboración de la leche de soja se realizó según Schillinger *et al.* (2001) y Xiaodi *et al.* (2015) a partir de porotos de soja (*Glycine max*). Se remojaron 125 g de granos de soja en 300 mL de agua a temperatura ambiente durante 12 horas. Los granos remojados se llevaron a ebullición (100 °C durante 5 minutos) para desactivar la enzima lipoxigenasa. Posteriormente, 250 g de granos de soja hervidos se mezclaron con 600 mL de agua y se molieron en una licuadora durante 3 minutos a velocidad alta. La suspensión resultante se filtró por medio de tamiz y gasa para separar las partículas sólidas suspendidas en el líquido. La leche de soja se pasteurizó a 90 °C durante 10 minutos y se enfrió a 30 °C rápidamente utilizando un baño de hielo.

Elaboración de las microcápsulas

Las microcápsulas se realizaron según lo publicado por Asensio *et al.* (2015a). La estructura externa (pared) de las microcápsulas se preparó con carbohidratos y el núcleo de las mismas con aceite neutro de maní. La fracción BAE de tegumento de maní se disolvió en el material del núcleo a una concentración del 10% p/p. La pared se preparó mezclando 32,8% de maltodextrina, 65,5% de carboximetil celulosa y 1,6% de lecitina de soja. La relación entre el núcleo y la pared fue de 1:1,5. Las emulsiones se prepararon en un homogeneizador y posteriormente se congelaron a -80 °C para luego ser liofilizadas. Se prepararon dos microcápsulas: control (MC) y suplementada con la fracción BAE (MCBAE). Se utilizó un microscopio Confocal 3D para estudiar su geometría, forma y tamaño.

Preparación de las muestras y tratamientos

La fracción de tegumento de maní (BAE) y las microcápsulas (MC y MCBAE) se agregaron a la leche de soja en una concentración del 0,05%.

Los tratamientos de leche de soja fueron los siguientes: control (C), leche de soja enriquecida con: BAE (BAE), microcápsulas control (MC) y microcápsulas con BAE (MCBAE).

Almacenaje y muestreo

Cada tratamiento de leche de soja (C, BAE, MC y MCBAE) se almacenó en frascos de vidrio estériles de 100 mL a 4 °C durante 30 días. Las muestras fueron extraídas los días 0, 15 y 30, y se realizaron análisis químicos (acidez total titulable, hidroperóxidos), contenido de fenoles totales, actividad secuestrante de radicales libres por DPPH, composición de ácidos grasos, determinación de compuestos volátiles), análisis microbiológicos (recuento de mesófilos totales) y sensoriales (análisis descriptivo).

Análisis químicos

- Φ **Acidez Total Titulable (ATT).** Se determinó la acidez total titulable o acidez láctica según la metodología propuesta por la AOAC (2010). Se realizó una determinación volumétrica sobre 10 mL de leche de soja con una solución de hidróxido de sodio 0,1 N. Se agregaron 0,5 mL de fenolftalína al 0,1% como indicador de pH de la reacción. La valoración se da por finalizada cuando aparece una coloración rosa fácilmente perceptible. La coloración desaparece progresivamente, pero se considera obtenido el viraje, cuando el tinte rosa persiste durante unos segundos. La cantidad de ácido láctico producido durante la fermentación se calculó mediante la siguiente fórmula (Asensio *et al.*, 2014):

$$\text{Porcentaje de Acido Láctico (\%)} = (V) \text{ NaOH} \times 0,009 \times 0,1 \text{ N} \times 100 \quad (\text{ec. 7.1})$$

donde: V es el volumen de NaOH requerido para neutralizar la acidez.

- Φ **Hidroperóxidos (HP).** La determinación de los hidroperóxidos se realizó según Wan *et al.* (2014) con algunas modificaciones. Se mezcló 1 mL de muestra con 10 mL de cloroformo – metanol (70:30 v - v) y se agitó en shaker durante 30 min.

Posteriormente, se centrifugó a 4 °C durante 10 minutos a 10,000 rpm de velocidad. La determinación de los hidroperóxidos se realizó tomando 1 mL de la fase de cloroformo y se mezcló con 1 mL de una solución de tiocianato de amonio 32,7 mM y cloruro de hierro (II) 36 mM. Se dejó reposar 5 minutos y se midió la absorbancia en espectrofotómetro UV – visible a 500 nm. Por extrapolación a la curva de calibración con cloruro de hierro (III) se determinó el contenido de hidroperóxidos de la muestra y los resultados se expresaron como $\mu\text{EqO}_2/\text{kg}$ (μ equivalente de O_2/kg grasa).

- Φ **Contenido de fenoles.** Se determinó el contenido de fenoles totales de las muestras de leche de soja por el método de Folin-Ciocalteu, según lo descrito en el Capítulo II. Los resultados se expresaron en mg EAG/L.
- Φ **Actividad secuestrante de radicales libres por DPPH.** Se determinó la actividad secuestrante de radicales libres de las muestras de soja almacenadas utilizando el radical diphenil picril hidrazil (DPPH) según lo descrito en el Capítulo IV. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición del radical DPPH, para una concentración de muestra de 10 $\mu\text{g mL}$.
- Φ **Extracción de Lípidos.** Se colocaron 50 mL de leche de soja en un erlenmeyer y se agregó 50 mL de cloroformo – metanol (2:1 v - v). La mezcla se agitó en un shaker durante 12 horas. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 4 °C en durante 20 minutos a 10,000 rpm. A continuación, se tomó el sobrenadante y se evaporó completamente el solvente en evaporador rotatorio, bajo vacío a 35 °C (Asensio, 2013). A partir de la materia grasa obtenida se prepararon los ésteres metílicos de ácidos grasos.
- Φ **Esteres metílicos de ácidos grasos (EMAG).** Los ésteres metílicos se prepararon a partir de los ácidos grasos extraídos de la leche de soja por transesterificación con una solución de ácido sulfúrico en metanol (30 g/L) según lo propuesto por Riveros *et al.* (2010). La metodología fue la siguiente: se pesaron $0,5 \pm 0,05$ g de aceite en un balón de vidrio y se agregaron 5 mL de KOH (0,5 N). Se sometieron estas muestras a reflujo durante 5 minutos, se agregaron 15 mL de una solución de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{H}_2\text{SO}_4$ y se dejó durante 3 minutos. Posteriormente, la muestra se enfrió y se añadieron 10 mL de n-

hexano, se agitó vigorosamente y trasvasó a una ampolla de decantación. La extracción se repitió dos veces, añadiendo 10 mL de n-hexano en cada una de ellas. Se recuperó la fase superior y se llevó a un erlenmeyer con 3 g de Na₂SO₄ anhidro. Se filtró con papel de filtro y se evaporó el solvente en evaporador rotatorio, bajo vacío a 35 °C. La muestra se recolectó en un eppendorf y se conservó a -18 °C hasta el momento de la medición.

Φ **Análisis de ácidos grasos.** Los ésteres metílicos se analizaron en un cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 600 (Waltham, Mass., U.S.A.) equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se utilizó una columna capilar SACTM-5 (C # 24156, Supelco) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de fase. La separación, identificación y cuantificación de los ésteres metílicos de ácidos grasos se realizó según Asensio *et al.* (2015b) y Martin *et al.* (2016). Los resultados se expresaron en porcentajes relativos (g/100 g). El índice de yodo se calculó mediante la siguiente fórmula (Riveros *et al.*, 2010):

$$IY = (\% C18: 1 \times 0,8601) + (\% C18: 2 \times 1,7321) + (\% C20: 1 \times 0,7854) \text{ ec. 7.2}$$

Φ **Análisis de volátiles de oxidación (AV).** La extracción de compuestos volátiles de las muestras de leche de soja se realizó por la técnica de micro extracción en fase sólida (MEFS) y se analizó por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masa (CG-MS), según lo descrito en el capítulo VI con modificaciones en las condiciones de la técnica de MEFS. Para este estudio, se colocaron 5 mL de muestra de leche de soja en un vial dentro de un equipo termostatzado a 40 °C para acelerar el equilibrio de los compuestos volátiles entre la muestra y el espacio de cabeza (Achouri *et al.*, 2006). Los resultados se expresaron en área de pico cuantificados como cuentas electrónicas (x 10⁶) /mL de leche de soja).

Análisis microbiológico

Φ **Recuento de microorganismos mesófilos totales.** Para cuantificar el crecimiento bacteriano en las muestras de leche de soja almacenadas, se utilizó el método de recuento en placa. Se tomó 1 mL de muestra y se realizaron diluciones seriadas en

base 10 en agua peptonada. Luego se inocularon 100 µL de cada dilución en dos placas de Petri con ATS y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Se eligieron aquellas diluciones en las cuales se podían contar entre 30 y 300 colonias y se estimó las bacterias viables en términos de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) (ICMSF, 1983; Asensio, 2013) según la siguiente fórmula:

$$UFC/mL = N^{\circ} \text{ colonias} \times Fd \times Fa \quad (\text{ec. 7.3})$$

donde: Fd es el factor de dilución.

Fa es el factor de alícuota.

Análisis sensoriales

Pruebas descriptivas

Las muestras de leche de soja almacenadas, se evaluaron mediante pruebas descriptivas para definir y cuantificar las propiedades (atributos) de las mismas sobre el producto fresco y los cambios ocurridos durante el almacenaje.

Las muestras fueron evaluadas por un panel sensorial entrenado compuesto por un total de 9 jueces (7 mujeres y 2 hombres). Se utilizó una escala lineal no estructurada de 15 cm (Hwang y Hong, 2013). Los jueces fueron seleccionados, entrenados y calibrados según Grosso y Resurreccion (2002).

El listado de los atributos sensoriales evaluados y sus definiciones se presentan en la **Tabla 7.1**. Para cada uno de ellos se utilizó un producto como referencia al cual se le asignó una intensidad dentro de la escala de 150 mm (**Tabla 7.2**) según lo consensuado por los jueces durante los entrenamientos (N´Kouka *et al.*, 2004). Además, para todos los atributos se utilizó leche de soja como referencia (*warm up*). Las evaluaciones sensoriales se realizaron en el Laboratorio de Análisis Sensorial (ICTA, FCEFyN – UNC). Los jueces evaluaron las muestras en cabinas individuales, bajo luz fluorescente y a una temperatura de 10 °C. Para la realización de la prueba, se colocaron 30 mL de muestra en vasos de poliestireno expandido cubiertos con papel aluminio y se codificaron con números de 3 dígitos elegidos al azar. Las muestras permanecieron durante dos horas a temperatura ambiente antes de realizar la prueba. Los jueces consumieron copos de maíz y agua para enjuagarse la boca entre las muestras con un lapso de 5 minutos entre las mismas.

Los jueces probaron todas las referencias y la muestra *warm up* antes de evaluar la intensidad de los atributos de las muestras de leche de soja (N'Kouka *et al.*, 2004; Hwang y Hong, 2013).

Tabla 7.1. Definición de atributos sensoriales evaluados sobre las muestras de leche de soja (Hwang y Hong, 2013).

Atributo	Definición
<i>Apariencia</i>	
<i>Heterogeneidad</i>	Presencia de algún componente separado visiblemente.
<i>Color gris</i>	Intensidad del color gris.
<i>Aroma</i>	
<i>Papa Cocida</i>	Olor asociado con papa cocida.
<i>Vainilla</i>	Aroma asociado al extracto de vainilla.
<i>Flavor</i>	
<i>Poroto Cocido</i>	Sabor asociado a porotos de soja cocidos.
<i>Poroto Crudo</i>	Sabor asociado a porotos de soja crudos.
<i>Sabor almidón</i>	Sabor asociado a harina de trigo cruda.
<i>Sabor Leche</i>	Sabor asociado a leche de vaca fresca.
<i>Oxidado</i>	Sabor y aroma asociado con aceite o grasa rancia o vieja.
<i>Gusto</i>	
<i>Dulce</i>	Gusto percibido en la lengua asociado a una solución de sacarosa.
<i>Salado</i>	Gusto percibido en la lengua asociado a una solución de cloruro de sodio.
<i>Amargo</i>	Gusto percibido en la lengua asociado a una solución amarga como la cafeína.

Tabla 7.1 (Continuación). Definición de atributos sensoriales evaluados sobre las muestras de leche de soja (Hwang y Hong, 2013).

<i>Ácido</i>	Gusto percibido en la lengua asociado a una solución ácida como el ácido cítrico.
Textura	
<i>Consistencia</i>	Velocidad a la cual la muestra fluye en la lengua.
<i>Aceitoso</i>	Textura de revestimiento que la muestra deja en la boca.

Tabla 7.2. Intensidades de referencias estándares y de *warm up* utilizados en las pruebas sensoriales descriptivas de muestras de leche de soja.

Atributos	Referencias estándares	Intensidad de atributos (escala 1-15 cm)	Intensidad <i>warm up</i>
<i>Heterogeneidad</i>	Aceite ¹	0	4.2
	Ricota ²	15	
<i>Gris</i>	Blanco	0	2
	Gris oscuro	15	
<i>Papa cocida</i>	Papa ³	9.75	4.9
<i>Vainilla</i>	Vainilla ⁴	12.25	1
<i>Poroto cocido</i>	Soja cocida ⁵	8.5	5.4
<i>Poroto crudo</i>	Soja cruda ⁶	10.6	9
<i>Almidón</i>	Solución harina maíz/agua ⁷	11	4.4
<i>Sabor Oxidado</i>	Girasol tostado ⁸	12	0
<i>Dulce</i>	Sacarosa		
	2 %	5	4.4

Tabla 7.2 (Continuación). Intensidades de referencias estándares y de *warm up* utilizados en las pruebas sensoriales descriptivas de muestras de leche de soja.

<i>Salado</i>	Cloruro de Sodio		
	0,03 %	5	0.5
<i>Amargo</i>	Cafeína		
	0,03 %	5	0.5
<i>Ácido</i>	Ácido cítrico		
	0,02 %	5	2.2
<i>Consistencia</i>	Crema de leche ⁹	8.3	2
<i>Aceitoso</i>	Crema de leche batida ¹⁰	10.20	3.1

¹ Aceite de girasol Natura, AGD, Córdoba, Argentina. ² Ricota La Serenesima, Mastelone Hnos. S.A., Argentina. ³ Papa cocida en agua hirviendo durante 30 minutos. ⁴ Extracto de vainilla Alicante, Cafés La Virginia S.A., Argentina. ⁵ Soja cocida: 300 g de porotos de soja remojados durante 3 h y cocidos en 200 mL de agua hirviendo por 1 hora. ⁶ Soja cruda: 300 gr de porotos de soja remojados durante 3 h y triturados con 200 mL de agua. ⁷ Harina de maíz al 20%. ⁸ Girasol pelado tostado almacenado durante 126 días a 40 °C. ⁹ Crema La Serenesima, Mastelone Hnos. S.A., Argentina. ¹⁰ Crema La Serenesima batida durante 5 minutos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados fueron analizados estadísticamente con el programa InfoStat versión 2013p (Di Rienzo *et al.*, 2013). Se calcularon medias y desvíos estándar. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA, $\alpha = 0,05$) y test posterior de DGC para encontrar diferencias significativas entre los datos del análisis químico y sensorial de los tratamientos de leche de soja durante el almacenamiento. Además, se estimaron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$; Test DGC) a partir de Modelos Generalizados, Lineales y Mixtos (MGLM).

Se estimaron coeficientes de Pearson para establecer correlaciones entre las variables dependientes. El análisis de componentes principales (PCA) se realizó en la matriz de correlación de los datos estandarizados de las variables químicas, antioxidantes, microbiológicas y sensoriales. El propósito del ACP fue explorar las asociaciones entre los tratamientos y las variables evaluadas (Nepote *et al.*, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis químicos

En la **Tabla 7.3.** se muestran los siguientes indicadores químicos como acidez total titulable, hidroperóxidos, fenoles totales y actividad secuestrante de radicales libres analizados en las muestras de leche de soja correspondientes al día cero de almacenaje. La leche de soja con la adición de BAE y MC presentaron los valores más bajos de acidez (0,05 y 0,04%, respectivamente) respecto a las muestras C y MCBAE, aunque esta diferencia no es muy marcada. Cuenca y Quicazán (2004) reportaron valores de acidez en leche de soja de 0,06% similares a los valores hallados en las muestras evaluadas. Los hidroperóxidos no mostraron diferencias significativas entre las muestras.

La muestra BAE presentó el mayor contenido de fenoles totales (825,26 mg EAG²/L) y mayor actividad secuestrante del radical DPPH. Esto se debe a que los polifenoles se encuentran de forma libre y son ellos los responsables de la mayor actividad antioxidante observada en la muestra. Por su parte, las muestras C, MC y MCBAE presentaron los valores más bajos de actividad frente al DPPH (2,59; 9,11 y 2,38%, respectivamente). Para las muestras con el agregado de los polifenoles encapsulados (MCBAE), la concentración de los mismos y la actividad secuestrante de radicales libres fueron inferiores a las muestras con los polifenoles agregados en forma libre (BAE). Esto se debe a que los compuestos polifenólicos se encuentran recubiertos mediante una pared que los protege y se controla su liberación en sitios específicos de acción.

Tabla 7.3. Indicadores químicos (índice de acidez e hidroperóxidos), contenido de fenoles totales y actividad secuestrante de radicales libres (DPPH) de las muestras de leche de soja al inicio del almacenaje (día cero).

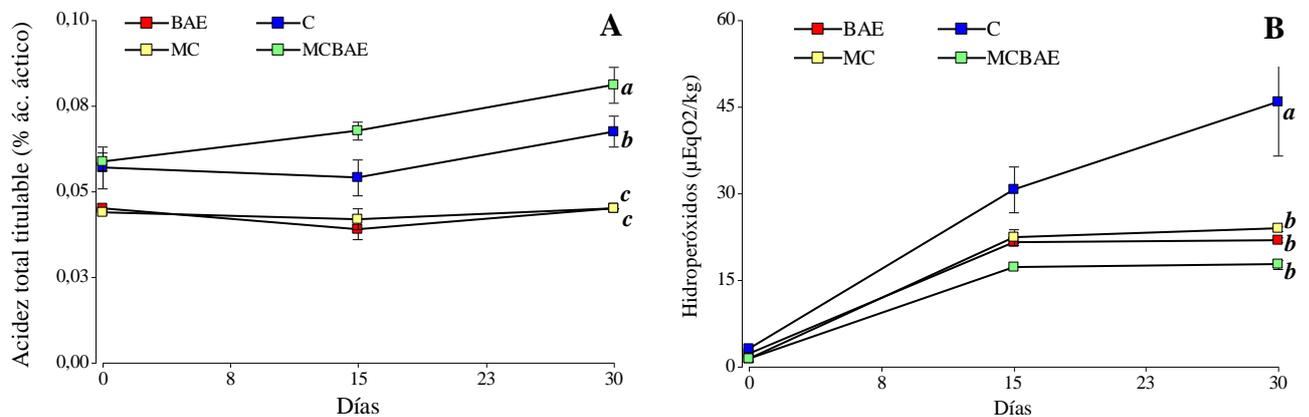
Muestra	Índice de acidez ¹	Hidroperóxidos ($\mu\text{eqO}_2 / \text{KG}$)	Fenoles totales ($\text{mg EAG}^2 / \text{L}$)	Actividad secuestrante DPPH ³
C	0,06±0,01 a	3,15±0,46 a	271,30±6,86 c	2,59±1,45 b
BAE	0,05±0,01 b	2,3±2,26 a	825,26±10,07 a	64,66±2,85 a
MC	0,04±0,03 c	1,45±1,04 a	233,86±7,29 c	9,11±1,20 b
MCBAE	0,06±0,01 a	1,45±1,04 a	411,74±12,18 b	2,38±1,04 b

Tratamientos: C = Control; BAE = Blanchado acetato de etilo; MCBAE = Microcápsula con BAE; MC = Microcápsula control.

¹ Expresado en porcentaje de ácido láctico; ² EAG = Equivalente en ácido gálico; ³ Expresado en porcentaje de actividad secuestrante (% RSA). Los valores se expresan como media ± DE (n = 3).

Estimación de diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$; Test DGC) a partir de MGLM. Valores con igual letra en la misma columna no presentan diferencias significativas

Durante el almacenaje de las muestras se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en todos los parámetros analizados (**Figura 7.1**).



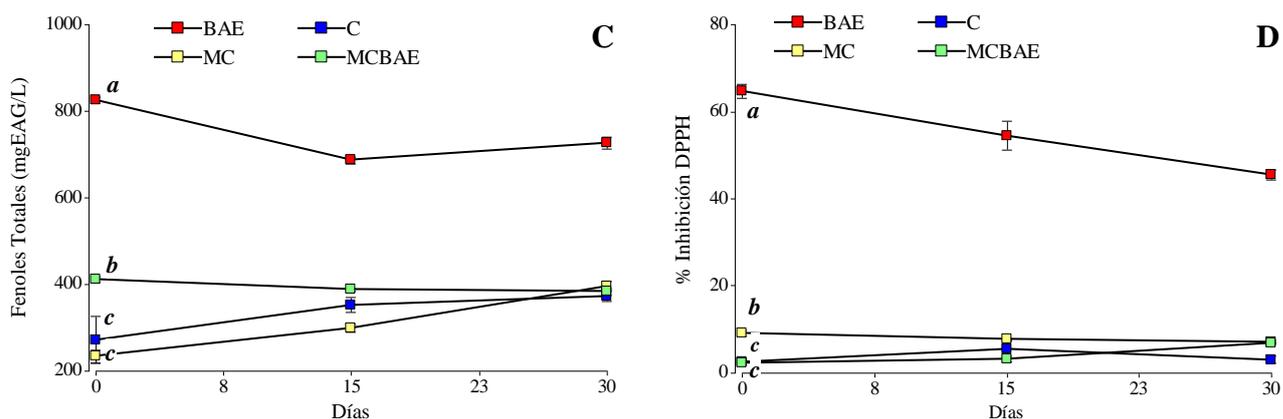


Figura 7.1. Cambios en las intensidades de los atributos sensoriales de las muestras de leche de soja durante el almacenaje.

A. Color gris. **B.** Gusto ácido. **C.** Gusto amargo. **D.** Sabor oxidado.

Tratamientos: C = Leche de soja control; BAE = leche de soja con el agregado del extracto blanchado acetato de etilo; MCBAE = Agregado de microcápsula con BAE; MC = agregado de microcápsula control.

Letras diferentes indican diferencias significativas globales entre muestras ($\alpha = 0,05$; Test DGC) estimadas a partir de MGLM.

Las muestras MCBAE y C presentaron los valores más elevados de acidez titulable durante todo el almacenaje, mientras que las muestras BAE y MC mostraron los valores más bajos, sin diferencias significativas entre las mismas (**Figura 7.1-A**). Achouri *et al.* (2007) encontraron valores de acidez al día 30 de almacenaje entre 0,60 y 0,70% similares a los del presente estudio. Este indicador, muchas veces, está relacionado a interacciones químicas que ocurren en la leche de soja debidas a diferentes procesos como lipólisis, proteólisis, a causa del desarrollo microbiológico y a la presencia de enzimas. La adición de polifenoles no controla la formación de acidez en el producto evaluado.

En cuanto a la acumulación de hidroperóxidos en las muestras, se observó que la muestra C tuvo, en promedio durante todo el almacenaje, mayor contenido de hidroperóxidos en comparación con los demás tratamientos. La mejor respuesta de los tratamientos con la adición del extracto evidencia un efecto protector de los polifenoles del tegumento de maní, libres o encapsulados, sobre los lípidos de la leche de soja (**Figura 7.1-B**).

Otros compuestos fenólicos, como carvacrol y timol, presentes en aceites esenciales de orégano han reportado protección lipídica. Por ejemplo, Asensio *et al.* (2015c) realizaron un estudio de almacenaje en queso cottage con el agregado de antioxidantes naturales. Las

muestras que contenían aceite esencial de orégano presentaron los menores valores de hidroperóxidos con respecto a la muestra control. Este efecto protector hace hincapié en la importancia del uso de antioxidantes naturales en el control de la oxidación de lípidos en los productos lácteos. Por su parte, la presencia de lípidos en la leche de soja incrementa la importancia en la investigación de sus productos de oxidación y la manera de prevenirlos. En el presente estudio se trabajó con leche de soja que presenta lípidos muy saturados susceptibles a la degradación. Los resultados evidencian que el agregado de polifenoles del tegumento de maní manifiesta una elevada actividad antioxidante previniendo la formación de hidroperóxidos (BAE y MCBAE)

En el contenido de fenoles totales se observaron diferencias significativas entre las muestras almacenadas (**Figura 7.1-C**). La muestra BAE presentó la mayor concentración, seguida de la muestra MCBAE. Las muestras sin el agregado de fracciones de tegumento de maní (C y MC) mostraron bajos valores de fenoles totales. Similares resultados fueron encontrados por Zhao y Shah (2014) en leche de soja enriquecida con extractos de té verde, negro y oolong. El agregado de fenoles incrementa el contenido de fenoles del producto y, además, se observa que no existe una caída en el contenido de los mismos durante el almacenamiento, por lo que dichos compuestos no se degradan con el tiempo, aunque pueden perder cierta actividad antioxidante.

La muestra BAE mostró los mayores porcentajes de actividad secuestrante frente al DPPH durante el almacenaje; por el contrario, la muestra C y las muestras con el agregado de las microcápsulas (MC y MCBAE) presentaron la menor actividad (**Figura 7.1-D**). El comportamiento de esta variable fue similar al observado para la variable fenoles totales, lo cual permite confirmar la relación entre ellas.

Isailović *et al.* (2012) encapsularon un extracto acuoso de carqueja (*Tridentatum P.*) rico en polifenoles. El proceso de microencapsulado protegió al extracto de la liberación al medio y además conservó la actividad antioxidante del mismo por más tiempo. Sun-Waterhouse *et al.* (2013) encapsularon polifenoles bioactivos, tales como, quercetina y vainillina, y ambos compuestos mostraron un excelente comportamiento antioxidante para aplicaciones en bebidas frías o calientes. En el presente estudio se observó que el encapsulado permite la liberación de compuestos fenólicos (procianidinas, quercetina,

catequina, epicatequina y resveratrol principalmente) de manera lenta y, a medida que se van liberando, van ejerciendo su acción antioxidante.

Análisis de ácidos grasos

En la **Tabla 7.4** se muestra la composición de ácidos grasos de la leche de soja elaborada. Sarkar *et al.* (2014) publicaron valores similares a los encontrados en el presente estudio en aceite de soja fortificado con antioxidantes. Xiaodi *et al.* (2015) encontraron una composición de ácidos grasos similar a la detectada en este estudio, en donde se utilizaron porotos de soja de hilo de color amarillo recomendados para la elaboración de leche de soja y tofu.

Tabla 7.4. Composición de ácidos grasos de leche de soja.

Ácidos Grasos	Porcentajes (g / 100 g)*
Monoinsaturado	26,40
Oleico (18:1)	26,40 ± 1,05
Poliinsaturado	58,53
Linoleico (18:2)	50,17 ± 1,91
Linolénico (18:3)	8,36 ± 0,57
Saturado	15,24
Palmítico (16:0)	10,96 ± 0,64
Esteárico (18:0)	4,28 ± 0,40
Relación Saturado/Insaturado	0,27 ± 0,01
Relación Oleico/Linoleico	0,52 ± 0,04
Índice de Yodo	111,42 ± 2,50

*Valores expresados como media ± DE (n=3).

Se observaron diferencias significativas en los porcentajes de los diferentes ácidos grasos de las muestras durante el almacenaje. El índice de yodo mostró marcadas diferencias significativas entre las muestras al día 30 de almacenamiento (**Figura 7.2**). Este índice está relacionado con el grado de insaturación de los ácidos grasos de las muestras. La muestra que resultó con menor índice de yodo fue control, mientras que las encapsuladas (MC y MCBAE) y la BAE resultaron con valores superiores de este índice, sin diferencias significativas entre ellas a los 30 días de almacenamiento. Estos resultados indicarían una tendencia a la degradación de ácidos grasos insaturados más marcada en la muestra control, lo cual puede se relaciona a un mayor deterioro de los lípidos debido a la oxidación de los mismos. Los ácidos grasos poli-insaturados (linoleico y linolénico) tienen carácter esencial, por lo que poseen enorme importancia biológica y nutricional.

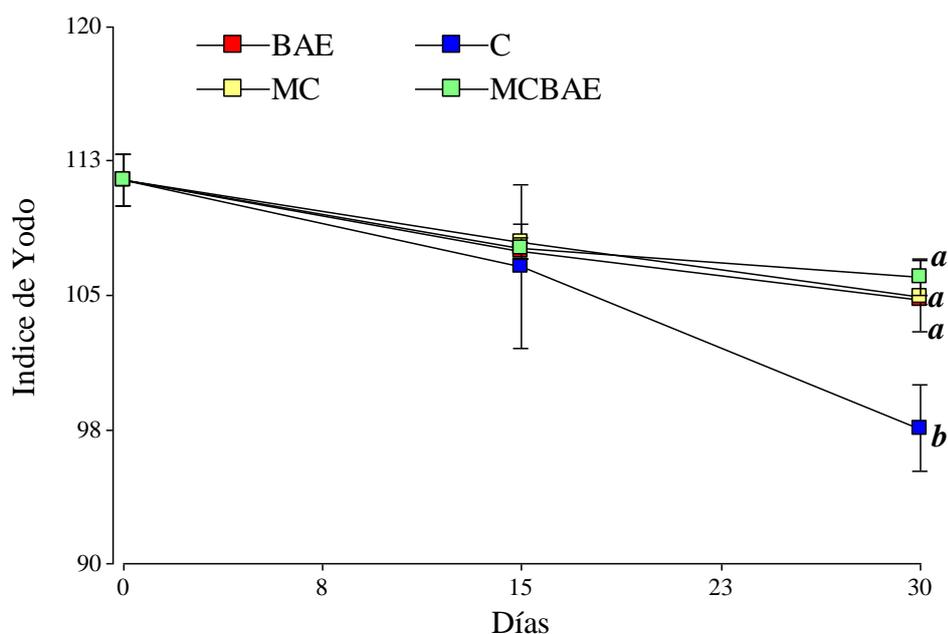


Figura 7.2. Variación en el índice de yodo en las muestras de leche de soja durante el almacenaje. Tratamientos. C = Leche de soja control; BAE = leche de soja con el agregado del extracto blanchado acetato de etilo; MCBAE = Agregado de microcápsula con BAE; MC = agregado de microcápsula control.

Letras diferentes indican diferencias significativas globales entre muestras ($\alpha = 0,05$; Test DGC) estimadas a partir de MGLM.

Análisis de volátiles de oxidación (AV)

En la **Tabla 7.5** se muestran los diferentes compuestos volátiles identificados en las muestras de leche de soja almacenadas. En general, el porcentaje relativo de los compuestos volátiles fue aumentando con el tiempo de almacenaje. Los volátiles tales como aldehídos, alcoholes y furanos se forman como producto de las oxidaciones lipídicas y las reacciones de Maillard (Achouri *et al.*, 2007).

El hexanal aumentó en todos los tratamientos de leche de soja durante el período de almacenaje. La muestra C fue la que presentó la mayor área de pico ($195,05 \times 10^6$) al final del almacenamiento (30 días) (**Figura 7.3-A**). El hexanal es uno de los compuestos volátiles más estudiados en leche de soja ya que se relaciona con el *sabor a poroto* y, además, es un indicador de la oxidación de los lípidos presentes. El hexanal es producido por la oxidación del 18:2 que es el precursor primario de los sabores desagradables en la leche de soja, y por el 18:3 que produce compuestos volátiles como el 2-hexenal y 3-hexenol (Achouri *et al.*, 2006). Las muestras que menores valores de hexanal mostraron fueron BAE y MCBAE. Este resultado indicaría un efecto antioxidante del extracto del tegumento de maní BAE siendo más efectivo cuando este compuesto fue encapsulado.

Se identificaron durante el almacenaje de las muestras compuestos volátiles como el hexanal, 1-Octen-3-ol y ácido acético. Dichos compuestos, sumados a otros volátiles (trans-2-hexenal, 1-hexanol, pentanol, benzaldehído y trans, trans-2,4-decadienal) se consideran inaceptables por parte de los consumidores ya que definen el *sabor a poroto* en la leche de soja y se encuentran relacionados a atributos sensoriales negativos como flavor a poroto crudo, hierbas, hongos, amargo, almendras amargas y picante (Xiaodi *et al.*, 2015). En la **Figura 7.3-B** se muestra la variación de 1-Octen-3-ol durante el almacenaje y se puede observar que las muestras de leche de soja con el agregado del extracto BAE sin encapsular fueron las que exhibieron mayores áreas de picos.

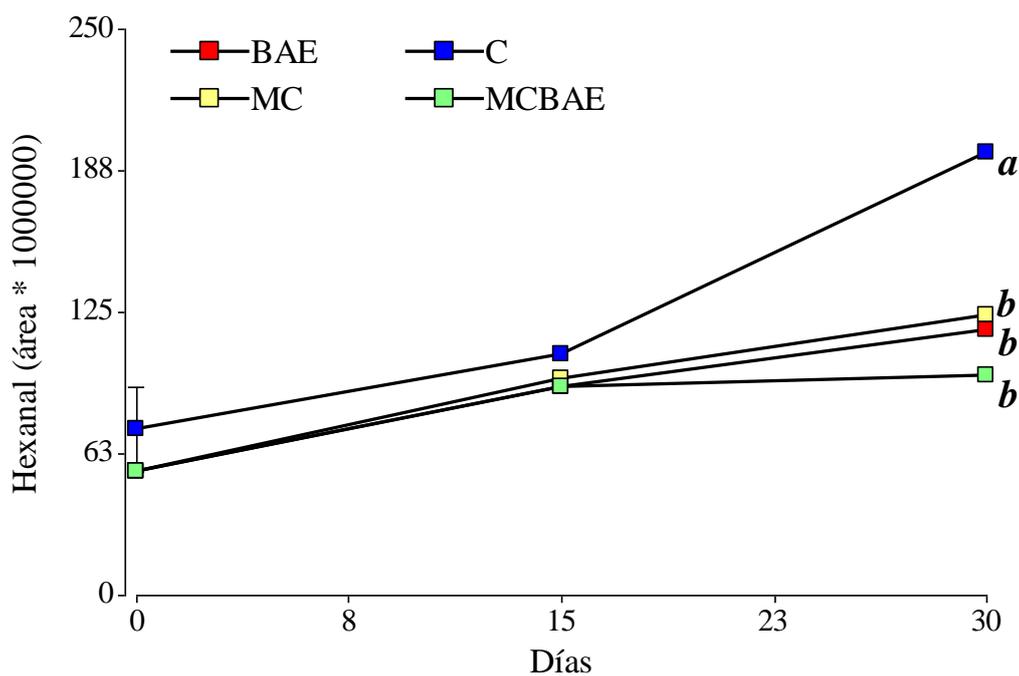
Por otra parte, se identificaron compuestos como el 3-metil-butiraldehído, octenal trans-2 y trans-2-nonenal que se consideran aceptables por parte de los consumidores ya que definen el flavor a *no poroto* y se encuentran relacionados a atributos sensoriales positivos como sabor a chocolate, pepino verde, brócoli y frutas (Xiaodi *et al.*, 2015) (**Tabla 7.5**).

Tabla 7.5. Compuestos volátiles identificados por MEFS (cuentas electrónicas x 10⁶) por mL de leche de soja el día cero de almacenamiento.

Compuesto	Cuentas electrónicas (x 10⁶)*
<i>Aldehídos</i>	
Hexanal	36,61 ± 26,34
Nonanal	164,80 ± 1,57
<i>Alcoholes</i>	
1-Butanol	130,15 ± 5,12
2-Heptanol	117,34 ± 4,61
1-Octen-3-ol	244,22 ± 1,59
<i>Alquenos</i>	
Nonane	84,69 ± 2,70
Decane	111,31 ± 4,84
Undecane	53,59 ± 2,80
Dodecane	136,36 ± 7,62
Tridecane	80,19 ± 3,24
Tetradecane	150,19 ± 3,92
Pentadecane	230,59 ± 1,78
Hexadecane	73,20 ± 2,61
Octadecane	219,17 ± 2,02
<i>Ácidos</i>	
Ácido Acético	101,45 ± 9,25

*Valores expresados como media ± DE

A



B

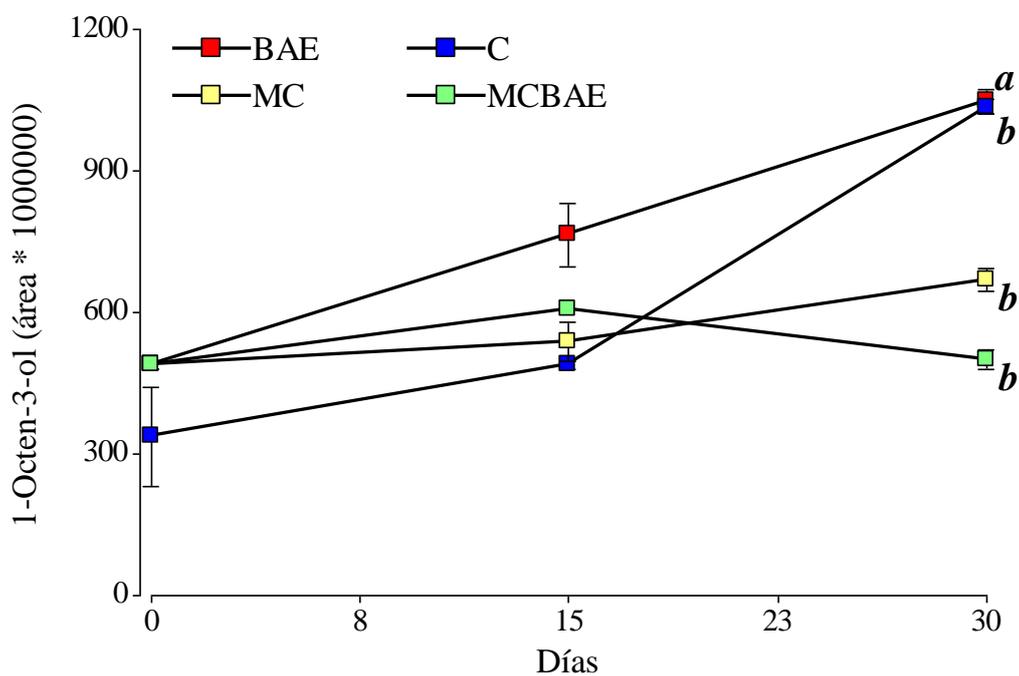


Figura 7.3. Volátiles de oxidación de las muestras de leche de soja durante el almacenaje a 4 °C. **A.** Hexanal. **B.** 1-Octen-3-ol.

Tratamientos. C = Leche de soja control; BAE = leche de soja con el agregado del extracto blanchado acetato de etilo; MCBAE = Agregado de microcápsula con BAE; MC = agregado de microcápsula control.

Letras diferentes indican diferencias significativas globales entre muestras ($\alpha = 0,05$; Test DGC) estimadas a partir de MGLM.

Indicadores microbiológicos

La calidad microbiológica de la leche de soja es un factor importante que contribuye a los cambios químicos en el producto durante el almacenamiento (Achouri *et al.*, 2007).

En la **Figura 7.4** se muestran los cambios en el recuento total de microorganismos mesófilos de las muestras de leche de soja almacenadas. Los resultados mostraron mayor crecimiento bacteriano en la muestra C, seguida por MC, BAE y MCBAE. Las muestras con el agregado de los polifenoles de maní mostraron actividad antimicrobiana, siendo mayor en la muestra encapsulada.

Los fenoles tienen como mecanismo de acción antimicrobiana la inhibición enzimática por parte de los compuestos oxidados mediante reacciones de grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas. Los flavonoides forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas y algunos inhiben la germinación de esporas de hongos y causan daño a los sistemas de membrana (Domingo y López-Brea, 2003). En el presente estudio se identificaron compuestos fenólicos como ácido gálico, y flavonoides como quercetina, catequina, epicatequina y procianidinas responsables del bajo recuento bacteriano obtenido en las muestras.

Los compuestos fenólicos, en muchos casos, pueden ejercer un efecto antimicrobiano hacia ciertas bacterias mediante su unión a proteínas de la superficie, dañando los lípidos de la membrana y, como consecuencia, generando peróxido de hidrógeno. Asimismo, los compuestos fenólicos también pueden promover el crecimiento de algunas bacterias mediante la creación de un medio ambiente más anaeróbico (Gaudreau *et al.*, 2014). En el capítulo V se observó la baja actividad antimicrobiana de todos los extractos y fracciones de tegumento de maní. Sin embargo, en la leche de soja el extracto BAE, libre y encapsulado, exhibe un efecto protector frente al crecimiento de microorganismos.

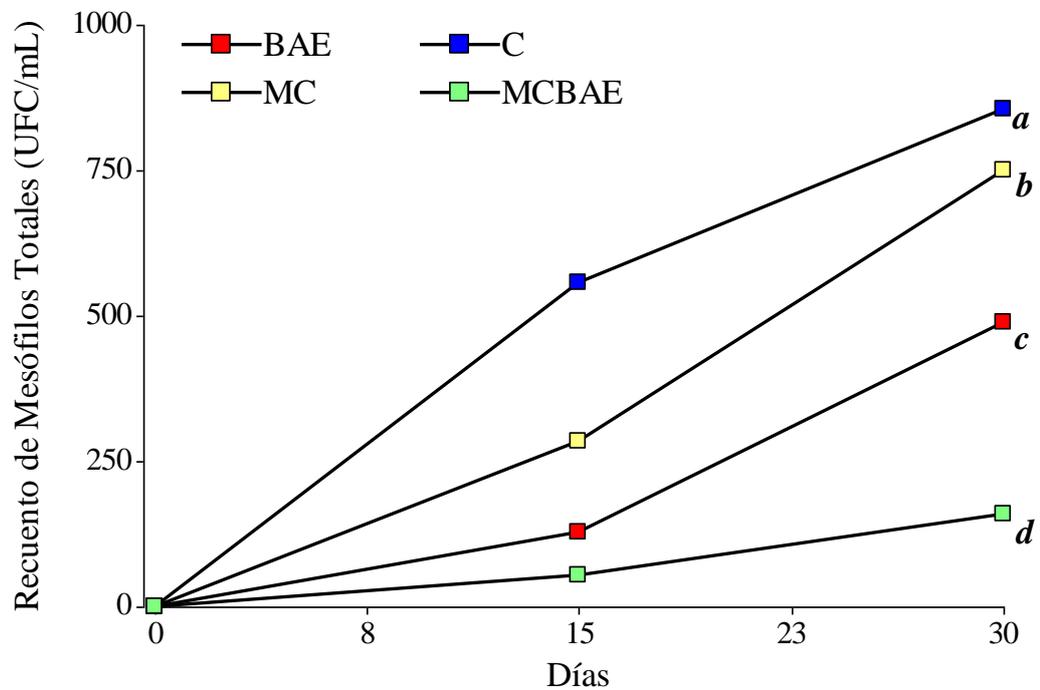


Figura 7.4. Recuento de mesófilos totales en las muestras de leche de soja durante el almacenaje. Tratamientos. C = Leche de soja control; BAE = leche de soja con el agregado del extracto blanchado acetato de etilo; MCBAE = Agregado de microcápsula con BAE; MC = agregado de microcápsula control. Letras diferentes indican diferencias significativas globales entre muestras ($\alpha = 0,05$; Test DGC) estimadas a partir de MGLM.

Análisis Sensorial

Las intensidades de los diferentes atributos sensoriales evaluados para las muestras frescas de leche de soja (día 0 de almacenamiento) se muestran en la **Tabla 7.6**. Se encontraron diferencias significativas entre las muestras en algunos de los atributos evaluados. La muestra de leche de soja con el agregado del extracto de tegumento de maní sin encapsular (BAE) presentó al día cero mayores intensidades para los atributos color gris y sabor vainilla, y menores intensidades de los atributos sabor a papa cocida, poroto cocido y almidón, respecto a las otras muestras (C, MC y MCBAE). El gusto dulce fue levemente superior para las muestras BAE y MCBAE, en comparación con las otras (C y MC). No se detectó diferencias significativas en el atributo sabor oxidado en el día 0 de almacenaje.

Tabla 7.6. Intensidad de los atributos sensoriales evaluados en las muestras de leche de soja (día 0 de almacenaje).

Atributos Sensoriales	Leche de Soja (Escala de intensidad 0-15 cm)			
	C	BE	MC	MCBAE
<i>Heterogeneidad</i>	4,47±0,31	4,16±0,09	4,15±0,03	4,46±0,09
<i>Color gris</i>	2,31±0,08c	6,71±0,04a	2,23±0,03c	2,63±0,13b
<i>Sabor papa cocida</i>	5,26±0,10a	4,39±0,14b	5,09±0,41a	5,31±0,19a
<i>Sabor vainilla</i>	0,89±0,08c	1,84±0,09a	1,10±0,13b	1,01±0,07b
<i>Sabor poroto cocido</i>	5,48±0,48a	4,62±0,60b	5,58±0,20a	5,30±0,28a
<i>Sabor poroto crudo</i>	8,83±0,64b	8,83±0,38b	8,79±0,04b	9,50±0,25a
<i>Sabor almidón</i>	4,38±0,06a	3,93±0,28b	4,89±0,06a	4,16±0,04a
<i>Sabor oxidado</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
<i>Gusto dulce</i>	4,21±0,81a	3,11±0,02b	4,89±0,06a	3,31±0,07b
<i>Gusto salado</i>	0,50±0,00	0,50±0,00	0,50±0,00	0,50±0,00
<i>Gusto amargo</i>	2,11±0,20	2,06±0,09	2,26±0,10	2,09±0,11
<i>Gusto ácido</i>	0,53±0,05	0,56±0,07	0,54±0,01	0,50±0,00
<i>Consistencia</i>	2,13±0,13	2,18±0,11	2,11±0,09	2,31±0,07
<i>Textura aceitosa</i>	3,07±0,04	3,07±0,04	3,14±0,06	3,04±0,01

Tratamientos: C = Leche de soja control; BAE = leche de soja con el agregado del extracto blanchado acetato de etilo; MCBAE = Agregado de microcápsula con BAE; MC = agregado de microcápsula control. Media ± DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas globales entre muestras ($\alpha = 0,05$; Test DGC) estimadas a partir de MGLM.

Durante el almacenaje sólo los atributos color gris, gustos ácido y amargo y sabor oxidado mostraron cambios significativos entre las muestras con el tiempo de almacenaje (**Figura 7.5**).

Al final del almacenaje, el atributo color gris mostró los mayores valores de intensidad en las muestras BAE (8,21). Las muestras MC, C y MCBAE presentaron los valores más bajos de intensidad del atributo gris (2,36; 2,70 y 2,56, respectivamente) (**Figura 7.5-A**).

La muestra con el agregado de las cápsulas control (MC) presentó las mayores intensidades de gusto ácido en comparación con las otras muestras (**Figura 7.5-B**), mientras que para el atributo gusto amargo, el tratamiento con agregado de BAE resultó con intensidad superior al final del almacenaje (**Figura 7.5-C**).

Para el atributo sabor a oxidado, las intensidades fueron en general bajas para todas las muestras. A los 30 días de almacenamiento, las muestras C y MC resultaron con valores superiores en comparación con las muestras con extracto (BAE y MCBAE) (**Figura 7.5-D**).

Potter *et al.* (2007) realizaron un estudio en leche de soja enriquecida con jugo de arándanos. Las bebidas con jugo de arándanos recibieron puntuaciones significativamente más altas para el atributo color respecto a la muestra control. La muestra de leche de soja con el extracto BAE también recibieron las puntuaciones más altas en el atributo color, lo que indica que el agregado de estos compuestos afecta la apariencia (color) del producto terminado.

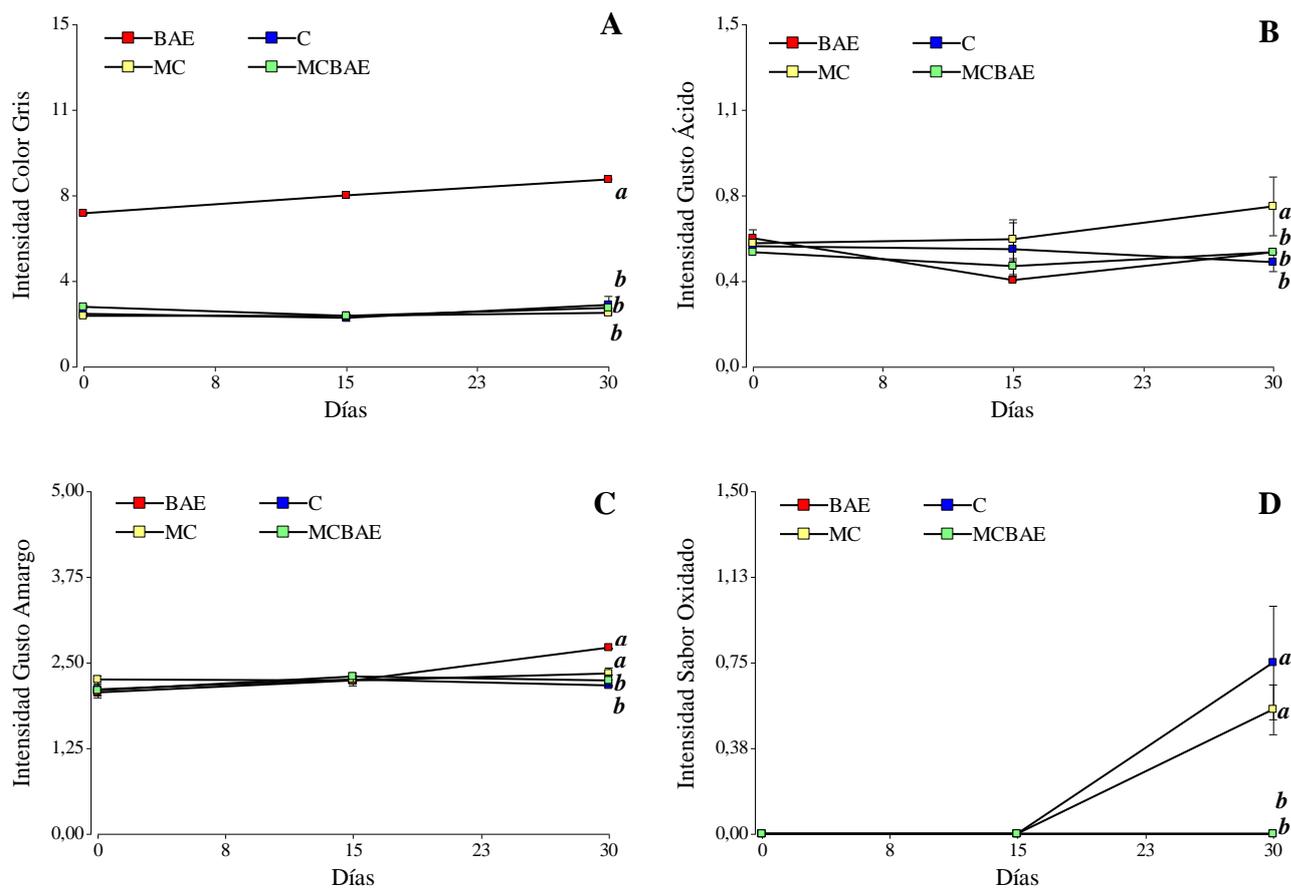


Figura 7.5. Cambios en las intensidades de los atributos sensoriales de las muestras de leche de soja durante el almacenaje.

A. Color gris. **B.** Gusto ácido. **C.** Gusto amargo. **D.** Sabor oxidado.

Tratamientos: C = Leche de soja control; BAE = leche de soja con el agregado del extracto blanchado acetato de etilo; MCBAE = Agregado de microcápsula con BAE; MC = agregado de microcápsula control.

Letras diferentes indican diferencias significativas globales entre muestras ($\alpha = 0,05$; Test DGC) estimadas a partir de MGLM.

Análisis de componentes principales y análisis de correlación

El gráfico obtenido a partir de las dos primeras componentes principales (CP) del ACP considerando las variables químicas, microbiológicas y sensoriales más representativas, sobre las muestras de leche de soja (C, MC, BAE y MCBAE) durante el almacenaje, se muestra en la **Figura 7.6**. Las variables se representaron mediante vectores y los tratamientos mediante puntos. Las dos primeras CP del ACP explicaron el 82,9% de la variabilidad total de los tratamientos. Este porcentaje se considera aceptable para establecer correlaciones entre las variables. Además, el análisis estadístico se complementó con el análisis de correlación entre dichas variables dependientes (**Tabla 7.7**).

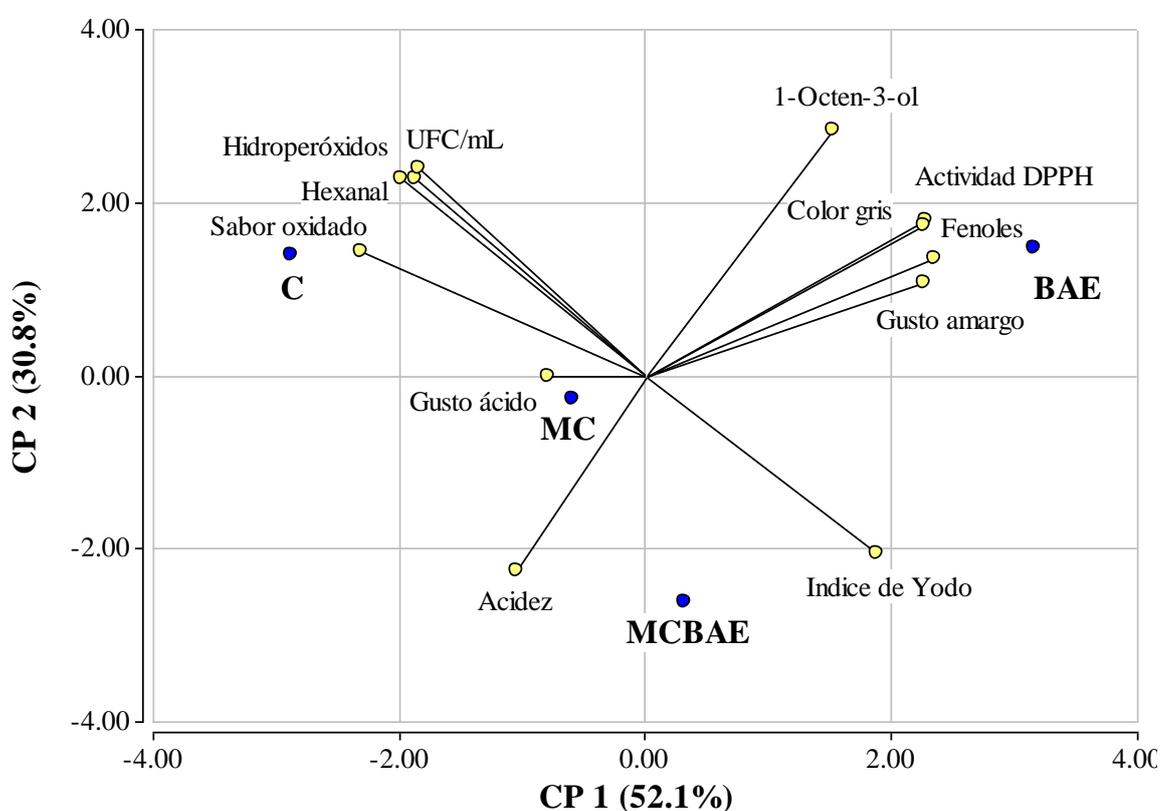


Figura 7.6. Gráfico de coordenadas de la primera y segunda componente del análisis de componentes principales. Variables: acidez, hidroperóxidos, fenoles totales, actividad DPPH, índice de yodo, compuestos volátiles (hexanal y 1-octen-3-ol), recuento de mesófilos totales (UFC/mL) y atributos sensoriales del análisis descriptivo (color gris, gusto ácido, gusto amargo, sabor oxidado).

Tratamientos: C = Leche de soja control; BAE = leche de soja con el agregado del extracto blanchado acetato de etilo; MCBAE = Agregado de microcápsula con BAE; MC= agregado de microcápsula control.

Las variables UFC/mL, hidroperóxidos, hexanal y sabor oxidado se encuentran fuertemente correlacionadas de manera positiva (**Figura 7.6**), situadas a la izquierda del gráfico, con coeficientes de correlación altamente significativos ($r > 0,6$; **Tabla 7.7**). La muestra C presentó mayores valores de dichos indicadores por lo tanto se encontró asociado a las mimas, indicando un mayor deterioro químico, microbiológico y sensorial. Por otra parte, dichas variables se encuentran opuestas a la variable índice de yodo, ubicada a la izquierda en el gráfico (**Figura 7.6 y Tabla 7.7**), que indica un menor grado de oxidación y deterioro de los ácidos grasos. Esta última variable se asocia positivamente a la muestra MCBAE que presentó una mejor conservación durante el almacenaje. Este tratamiento tuvo, además, menores valores de las variables UFC/mL, hidroperóxidos, hexanal y sabor a oxidado.

Por otra parte, las variables fenoles totales, actividad DPPH, color gris, gusto amargo y 1-octen-3-ol, se encuentran asociadas positivamente (**Figura 7.6 y Tabla 7.7**) y relacionadas con el tratamiento BAE. Esto permite afirmar que el extracto del tegumento de maní aporta color a la leche de soja debido a la coloración oscura propia de dicho extracto y a la presencia de los polifenoles de manera libre, lo cual también aporta una mayor actividad secuestrante de radicales libres al producto.

Correlaciones similares fueron encontradas por De Almeida Callou *et al.* (2010) en leche de soja enriquecida con jugo de uva y frutilla. Harvolsen *et al.* (2001) encontraron mayor actividad antioxidante en leches de soja con el agregado de frutos rojos, debido principalmente al contenido de ácidos fenólicos y flavonoides tales como antocianinas. Kuskoski *et al.* (2005) informaron una alta actividad DPPH en leches de soja que contenían jugo de uva, frutilla y guayaba y que se correlacionaron positivamente con el contenido de fenoles totales, así como los niveles de antocianinas presentes.

La característica polar de los compuestos fenólicos les permite actuar mejor como antioxidantes en una fase acuosa y, por lo tanto, la capacidad antioxidante de la leche de soja está relacionada con la concentración y el tipo de compuestos fenólicos presente (Boroski *et al.*, 2012).

Tabla 7.7. Coeficientes de correlación de Pearson significativos (* p < 0,05; ** p < 0,01), para las variables químicas, microbiológicas y sensoriales de las muestras de leche de soja almacenadas.

	Acidez	Actividad DPPH	Fenoles	Hidroperóxidos	Color gris	Sabor oxidado	Gusto amargo	Índice de Yodo	UFC / mL	Hexanal
Actividad DPPH	-0,48**									
Fenoles		0,92**								
Color gris	-0,44*	0,93**	0,92**							
Sabor Oxidado				0,62**						
Gusto Amargo					0,36*					
Indice de Yodo				-0,83**	-0,70**					
UFC /mL				0,80**	0,79**			-0,59*		
Hexanal				0,76**	0,74**			-0,69*	0,90**	
1-Octen-3-ol				0,60**	0,48*	0,49*	0,43*	-0,73*	0,61*	0,75**

CONCLUSIONES

El agregado del extracto del tegumento de maní sin encapsular presenta un mayor contenido de fenoles y actividad antioxidante lo cual protege al producto frente a los procesos de oxidación de sus lípidos. Sin embargo, la adición de los polifenoles de maní cambia el color natural del producto lo cual lo modifica sensorialmente pudiendo afectar, de esta manera, la aceptabilidad por parte de los consumidores.

La leche de soja con extracto del tegumento del maní encapsulado (MCBAE) presenta una mejor conservación que se manifiesta con un mayor valor del índice de yodo, menor formación de hidroperóxidos y desarrollo de microorganismos. Además, la preparación de microcápsulas permite que no se altere la apariencia sensorial del producto (color).

BIBLIOGRAFÍA

- Achouri A., Boye J.I., Zamani Y. 2006. Identification of volatile compounds in soymilk using solid-phase microextraction-gas chromatography. *Food Chemistry*. 99: 759–766.
- Achouri A., Boye J.I., Zamani Y. 2007. Changes in soymilk quality as a function of composition and storage. *Journal of Food Quality*. 30: 731–744.
- AOAC 2010. *Official Methods of Analysis of the AOAC*. Washington, DC, USA. Association of Official Analytical Chemists. pp.
- Arranz S., Chiva-Blanch G., Valderas-Martínez P., Medina-Remón A., Lamuela-Raventós R.M., Estruch R. 2012. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients*. 4: 759–781.
- Asensio C.M., 2013. Utilización de aceites esenciales de variedades de orégano como conservante antimicrobiano, antioxidante y de las propiedades sensoriales de alimentos: quesos cottage, ricota y aceite de oliva. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. 228 pp
- Asensio C.M., Gallucci N., Oliva M.D.L.M., Demo M.S., Grosso N.R. 2014. Sensory and bio-chemical preservation of ricotta cheese using natural products. *International Journal of Food Science and Technology*. 49: 2692–2702.
- Asensio C.M., Grosso A.L., Grosso N.R., Nepote V. 2015a. Microcápsulas de compuestos naturales con actividad antioxidante para la industria alimenticia. XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Buenos Aires, Argentina.
- Asensio C.M., Grosso N.R., Juliani H.R. 2015b. Quality characters, chemical composition and biological activities of oregano (*Origanum spp.*). Essential oils from Central and Southern Argentina. *Industrial Crops and Products*. 63: 203–213.
- Asensio C.M., Grosso N.R., Rodolfo Juliani H. 2015c. Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. *LWT - Food Science and Technology*. 60: 664–671.

- Boroski M., Giroux H.J., Sabik H., Petit H. V., Visentainer J. V., Matumoto-Pintro P.T., Britten M. 2012. Use of oregano extract and oregano essential oil as antioxidants in functional dairy beverage formulations. *LWT - Food Science and Technology*. 47: 167–174.
- Cuenca M.M. y Quicazán M.C. 2004. Comparación de la fermentación de bebida de soya y leche de vaca utilizando un cultivo láctico comercial. *Revista de Ingeniería y Competitividad*. 5(2): 16–22.
- De Almeida Callou K.R., Sadigov S., Lajolo F.M., Genovese M.I. 2010. Isoflavones and antioxidant capacity of commercial soy-based beverages: Effect of storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 4284–4291.
- Dias M.I., Ferreira I.C.F.R., Barreiro M.F. 2015. Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food and Function*. 6: 1035–1052.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. 2013. InfoStat, versión 2013p. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Domingo D., López-Brea M. 2003. Plantas con actividad antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*. España. 16(4): 385–393.
- Gaudreau H., Champagne C.P., Remondetto G.E., Bazinet L., Subirade M. 2014. Effect of catechins on the growth of oxygen-sensitive probiotic bacteria. *Food Research International*. 66: 514-520.
- Grosso NR, Resurreccion AVA. 2002. Predicting consumer acceptance ratings of cracker-coated and roasted peanuts from descriptive analysis and hexanal measurements. *Journal of Food Science*. 67: 1530–1537.
- Harvolsen B.L., Holte K., Myhrstad M.A.C., Barikmo I., Hvattum E., Remberg S.F., Wold A.B., Haffner K., Baugerod H., Andersen L.F., Moskaug J., Jacobs D., Blomhoff R.A., 2001. Systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal of Nutrition*. 132: 461–471.

- Hwang S.H. y Hong J.H. 2013. Sensory drivers of goso flavor in soymilk: Understanding a complex traditional Korean sensory attribute. *Food Quality and Preference*. 29: 113–125.
- ICMSF 1983. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microorganismos de los Alimentos. Técnicas de análisis microbiológicos*. ACRIBIA S.A. (Eds.). Zaragoza, España. pp.
- Isailović B., Kalušević A., Žuržul N., Đorđević V., Alves V.D., Sousa I., Moldão-Martins M., Bugarski B., Nedović V.A. 2012. Microencapsulation of natural antioxidants from *Pterospartum tridentatum* in different alginate and inulin systems. *Proceedings of 6th Central European Congress on Food - CEFood Congress*. 1075–1081.
- Kuskoski E.M., Asuero A.G., Troncoso A.M., Mancini-Filho J., Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. 4: 726–732.
- Martín M.P., Nepote V., Grosso N.R. 2016. Chemical, sensory, and microbiological stability of stored raw peanuts packaged in polypropylene ventilated bags and high barrier plastic bags. *LWT - Food Science and Technology*. 68: 174–182.
- N´Kouka K.D., Klein B.P., Lee S.-Y. 2004. Developing a lexicon for descriptive analysis of soymilks. *Journal of Food Science*. 69: 259–263.
- Nepote V., Olmedo R.H., Mestrallet M.G., Grosso N.R. 2009. A study of the relationships among consumer acceptance, oxidation chemical indicators, and sensory attributes in high-oleic and normal peanuts. *Journal of Food Science*. 74: 1–8.
- Potter R.M., Dougherty M.P., Halteman W.A., Camire M.E. 2007. Characteristics of wild blueberry-soy beverages. *LWT - Food Science and Technology*. 40: 807–814.
- Riveros C.G., Mestrallet M.G., Gayol M.F., Quiroga P.R., Nepote V., Grosso N.R. 2010. Effect of storage on chemical and sensory profiles of peanut pastes prepared with high-oleic and normal peanuts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90: 2694–2699.

- Rocha-Parra D., García-Burgos D., Munsch S., Chirife J., Zamora M.C. 2016. Application of Hedonic Dynamics using Multiple-Sip Temporal-Liking and Facial Expression for evaluation of a new beverage. *Food Quality and Preference*. 52: 153–159.
- Sarkar A., Golay P.A., Acquistapace S., Craft B.D. 2014. Increasing the oxidative stability of soybean oil through fortification with antioxidants. *International Journal of Food Science and Technology*. Disponible on-line: doi:10.1111/ijfs.12671
- Schillinger U., Becker B., Vignolo G., Holzapfel W.H. 2001. Efficacy of nisin in combination with protective cultures against *Listeria monocytogenes* Scott A in tofu. *International Journal of Food Microbiology*. 71: 159–168.
- Sun-Waterhouse D., Wadhwa S.S., Waterhouse G.I.N. 2013. Spray-Drying microencapsulation of polyphenol bioactives: A comparative study using different natural fibre polymers as encapsulants. *Food and Bioprocess Technology*. 6: 2376–2388.
- Tang C.H. y Li X.R. 2013. Microencapsulation properties of soy protein isolate and storage stability of the correspondingly spray-dried emulsions. *Food Research International*. 52: 419–428.
- Villegas B., Carbonell I., Costell E. 2009. Acceptability of milk and soymilk vanilla beverages: demographics consumption frequency and sensory aspects. *Food Science and Technology International*. 15(2): 203–210.
- Wan Z.L., Wang J.M., Wang L.Y., Yuan Y., Yang X.Q. 2014. Complexation of resveratrol with soy protein and its improvement on oxidative stability of corn oil/water emulsions. *Food Chemistry*. 161: 324–331.
- Xiaodi S., Jingyan L., Shuming W., Lei Z., Lijuan Q., Tianfu H., Qianyu W., Kow-Ching C.S., Shuntang G. 2015. Flavor characteristic analysis of soymilk prepared by different soybean cultivars and establishment of evaluation method of soybean cultivars suitable for soymilk processing. *Food Chemistry*. 185: 422–9.
- Zhao D. y Shah N.P. 2014. Antiradical and tea polyphenol-stabilizing ability of functional fermented soymilk-tea beverage. *Food Chemistry*. 158: 262-269.

CONCLUSIONES GENERALES

La ejecución de la presente tesis permitió realizar estudios profundos y detallados sobre la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en las distintas fracciones obtenidas del tegumento de maní argentino la cual muestra diferencias en la composición con respecto a las variedades utilizadas en Estados Unidos y China (principales productores y exportadores de maní a nivel mundial), y que las condiciones climáticas (precipitaciones y temperatura) y las de suelo también son muy diferentes.

Por otra parte, se logró conocer la actividad antioxidante y antimicrobiana de diferentes fracciones ricas en determinadas estructuras químicas de polifenoles provenientes de extractos del tegumento del maní.

Si bien las propiedades de los polifenoles están ampliamente demostradas, en este trabajo de tesis se presentan resultados sobre las propiedades conservantes (antioxidantes y antimicrobianas) de fracciones de estos compuestos separados por cromatografía en columna midiendo diferentes tipos de índices. Además, en este estudio se presentan resultados sobre la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos y fracciones obtenidas cuando son aplicadas en diferentes tipos de alimentos aptos para consumo humano, como aquellos con elevado contenido graso como las frutas secas (almendras) y con alta actividad agua, como la leche de soja.

Por otra parte, la adición de extractos y fracciones de tegumento de maní en diferentes procesos biotecnológicos como cubiertas comestibles y microencapsulados demuestra que estos compuestos son fácilmente incorporados en diversas matrices alimenticias.

A continuación, se detallan las principales conclusiones alcanzadas a lo largo de la presente tesis respecto a los extractos y fracciones de tegumento de maní argentino:

- Φ El proceso industrial para producir maní blanchado y tostado deja como subproducto tegumento de maní. Tales procesos, afectan de manera diferente a los extractos y fracciones purificadas de polifenoles. Los extractos de tegumento obtenido por proceso de blanchado presentan mayores contenidos de fenoles y flavonoides, los cuales se asocian a una mayor actividad antioxidante debido a que han sufrido un

menor deterioro térmico dado a que este proceso industrial se lleva a cabo a muy baja temperatura.

- Φ La partición con solventes y la purificación en columna cromatográfica de los extractos son métodos que permiten incrementar el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante. Las fracciones de acetato de etilo (separadas por partición con agua) tienen mayores proporciones de fenoles totales debido a que presentan una mayor solubilidad en dicho solvente haciendo más eficiente su extracción. A partir de la purificación en columna, la fracción V presenta el mayor contenido de fenoles y la fracción A el mayor contenido de flavonoides.
- Φ En las fracciones purificadas A y V se encuentran principalmente compuestos como ácidos fenólicos, flavonoides y estilbenos (resveratrol) y en la fracción purificadas M, flavonoides. De manera tal que el proceso de purificación del extracto de tegumento de maní por cromatografía en columna permite incrementar los contenidos de fenoles y/o flavonoides totales en diferentes fracciones.
- Φ Las fracciones purificadas, por partición por solventes y por columna, muestran mejor actividad antioxidante que los extractos crudos. Las fracciones con contenido de fenoles totales más altos están asociadas a mayor actividad del radical DPPH, anión superóxido y actividad quelante del ion ferroso. Asimismo, las fracciones purificadas presentan diferentes mecanismos antioxidantes debido a que tienen diferencias en la composición química.
- Φ Los extractos y fracciones de tegumento de maní poseen actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas, pero no sobre bacterias Gram negativas, excepto las fracciones purificadas A y V que no tienen actividad antimicrobiana. Los extractos y fracciones purificadas no presentan actividad antifúngica sobre los hongos evaluados.
- Φ El uso de CMC como cubierta comestible con el agregado de extractos de tegumento de maní y BHT protege a las almendras tostadas del deterioro oxidativo debido a que disminuye las intensidades de los atributos sensoriales negativos (oxidado y cartón).
- Φ El extracto de tegumento de maní incorporado en leche de soja aporta protección frente a la oxidación de los lípidos, al crecimiento microbiano y al deterioro sensorial debido a que incrementa el contenido de fenoles y la actividad antioxidante del producto final. Sin embargo, el color se ve afectado ligeramente. Cuando el extracto

es incorporado de manera encapsulada, también muestra efecto protector sobre el producto, con la ventaja de que no afectan al color natural de la leche de soja. El encapsulado permite la liberación de compuestos polifenólicos (procianidinas, quercetina, catequina, epicatequina y resveratrol) de manera lenta y, a medida que se van liberando, ejercen su acción antioxidante.

- Φ Los resultados de este trabajo de tesis ponen en evidencia que los extractos y fracciones purificadas ricas en sustancias polifenólicas y preparadas a partir del tegumento de maní argentino constituyen agentes antioxidantes naturales que pueden ser utilizadas en diferentes matrices alimenticias disminuyendo el deterioro oxidativo de los lípidos y prolongando la vida útil.

El tegumento es un residuo de la industria del blanchado de maní y constituye una fuente potencial para producir antioxidantes naturales para su uso en la industria alimentaria como sustituto de los antioxidantes sintéticos. Fomentar el uso de estos compuestos naturales permitirá incrementar el valor agregado de un subproducto que actualmente no posee importantes aplicaciones ya que sólo se destina a la alimentación animal. Aportes de estas características permiten desarrollar conocimientos sobre nuevas aplicaciones y usos para elaborar nuevos productos con potencial demanda en el mercado de los alimentos y contribuir al progreso regional fomentando la aplicación de nuevas tecnologías en la industria alimenticia que, indirectamente, promueva una mayor producción agrícola del maní.

La presente tesis dio lugar a las siguientes publicaciones en revistas científicas:

- **Larrauri M.**, Zunino M.P., Zygadlo J.A., Grosso N.R., Nepote V. 2016. Chemical characterization and antioxidant properties of fractions separated from extract of peanut skin derived from different industrial processes. *Industrial Crops and Products*. 94: 964-971.
- **Larrauri M.**, Demaría M.G., Ryan L.C., Asensio C.M., Grosso N.R., Nepote V. 2016. Chemical and sensory quality preservation in coated almonds with the addition of antioxidants. *Journal of Food Science*. 81: 208-215.
- **Larrauri M.**, Barrionuevo M.G., Riveros C., Mestrallet M.G., Zunino M.P., Zygadlo J.A., Grosso N.R., Nepote V. 2012. Effect of peanut skin extract on chemical stability and sensory properties of salami during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. DOI 10.1002/jsfa.5965.

Se obtuvo la siguiente producción tecnológica con título de propiedad intelectual:

- **Patente de Invención: Procedimiento para obtener fracciones de extractos con alta actividad antioxidante y antirradicalaria a partir del tegumento de *Arachis Hipogaea* (var. Runner) producidos por proceso de blanchado.** 2016. Grosso N.R., Nepote V., Zunino M.P., Pizzolitto R.P., Dambolena J.S., **Larrauri M.** Tipo de solicitud: Nacional. Número de Solicitud: 2014012298. Boletín: 868. Publicación: AR096639A1.

Se realizó con los siguientes proyectos de investigación:

- 2014–2016. **Evaluación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de polifenoles del tegumento de maní y otros compuestos naturales como conservante de alimentos.** Subsidiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica – UNC. Resolución 203/2014. Director: Dra. Valeria Nepote. Monto: \$ 12.000.
- 2013-2015. **Conservación de la calidad de alimentos con alto contenido graso con especial referencia a granos de oleaginosas de importancia regional. Utilización de productos naturales como antioxidantes y antimicrobianos.** Subsidiado por CONICET (PIP N° 11220120100371CO, Res. 4316/13, fecha resol: 14/11/2013). Director: Dr. Nelson Rubén Grosso. Monto: \$ 225.000.

- 2012-2014. **Evaluación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de polifenoles del tegumento de maní como conservante de alimentos.** Subsidiado por la Secretaria de Ciencia y Técnica – UNC. Resolución 162/2012. Director: Dra. Valeria Nepote. Monto: \$ 8.500.
- 2010-2013. **Aplicación de Polifenoles del Tegumento de Maní como Conservante de Alimentos: Evaluación de sus Propiedades Antioxidantes y Antimicrobianas.** Subsidiado por CONICET (PIP N° 11220090100114 Res. 1337/10, fecha de resol: 01/06/2010). Director: Dr. Nelson Rubén Grosso.