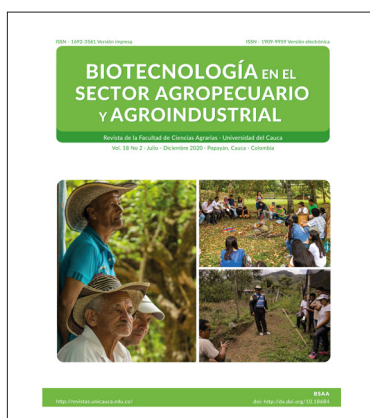




Universidad
del Cauca



FOTOS DE PORTADA
Flickr-Unsplash-Archivo propio



Dirección Revista
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad del Cauca
Calle 5 No.4-70 Popayán, Colombia
Teléfono: 311 768 15 72
e_mail de contacto, suscripciones e intercambio:
biotecnofaca@unicauca.edu.co
biotecnofaca2009@gmail.com
Página web e inscripciones:
<http://revistas.unicauca.edu.co/>
Revista Biotecnología en el Sector
Agropecuario y Agroindustrial
publica un volumen cada año con dos ediciones:
Primera: Enero-Junio
Segunda: Julio-Diciembre
- VRI-Vicerrectoría de Investigaciones
Universidad del Cauca

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias Universidad del Cauca

ISSN-1692-3561
Versión Impresa



ISSN-e 1909-9959
Versión Electrónica

Universidad
del Cauca

Vol. 20 No 1 · Enero-Junio 2022

Héctor Samuel Villada Castillo- PhD.
Editor

COMITÉ EDITORIAL

<p>Silvio Andres Mosquera M. Sc. Universidad del Cauca Departamento de Agroindustria</p> <p>Sandra Morales Velasco M.Sc. Universidad del Cauca Departamento de Ciencias Agropecuarias</p> <p>Consuelo Montes M. Sc. Universidad del Cauca Departamento de Ciencias Agropecuarias</p> <p>Diana Paola Navia, Ph.D. Universidad San Buenaventura Cali, Colombia</p> <p>Jhon Wilder Zartha S.-M. Sc. Universidad Pontificia Bolivariana (UPB)</p> <p>Michael Peters - Ph.D. Universidad de Giessen - CIAT</p>	<p>Ángel Pérez - Ph. D. Universidad de Holguín de Cuba</p> <p>José Ángel Gómez Ruiz - Ph.D Universidad Autónoma de Madrid, España</p> <p>Henry Armando Jurado Gámez-Ph.D. Universidad de Nariño</p> <p>Jaime Ricardo Rosero Noguera-Ph.D. Universidad Nacional - Sede Medellín</p>
---	--

COMITÉ CIENTÍFICO

<p>Nelson Vivas Quila - Ph. D. Universidad del Cauca Departamento de Ciencias Agropecuarias</p> <p>Misael Cortés Rodríguez-Ph. D. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín</p> <p>Alfredo Ayala Aponte Ph. D. Universidad del Valle Escuela de Ingeniería de Alimentos</p> <p>Raúl Rodríguez Herrera, Ph. D. Plant Breeding 1999. Texas A&M University-USA.</p> <p>Vijaya Raghavan-Ph. D. Universidad de McGill de Canadá</p>	<p>Aidé Sáenz Galindo, PhD. Universidad Autónoma de Coahuila. Mexico</p> <p>Francisco J. Moreno Andújar-Ph.D. Instituto de fermentaciones industriales Madrid, España</p> <p>Maria del Mar Villamiel G. Ph.D. Universidad Complutense de Madrid</p>
--	--

Asistente Editorial
Willian Enrique Sotelo Ortiz
Diseño y Diagramación
Olga Nohelia Benavides Imbachí
Área de Desarrollo Editorial
Universidad del Cauca



UNIVERSIDAD DEL CAUCA

Rector
José Luis Diago Franco

Vicerrector Académico
Luis Guillermo Jaramillo Echeverry

Vicerrectora Administrativa
Cielo Pérez Solano

Vicerrector De Investigaciones
Héctor Samuel Villada Castillo

Vicerrector De Cultura Y Bienestar
Deibar René Hurtado

Secretaría General
Laura Ismenia Castellanos Vivas

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Decano
Jesús Eduardo Bravo Gómez

Secretaría General
Tania Maritza Pabón Ruíz

Jefe Departamento Agroindustria
Sandra Patricia Godoy Bonilla

Jefe Departamento Ciencias Agropecuarias
Roman Ospina

Coordinador Programa Ingeniería Forestal
Jorge Andrés Ramírez

Coordinador Programa De Ingeniería Agroindustrial
Carlos Andrés Chantre

Coordinador Programa De Ingeniería Agropecuaria
Diego Vergara Collazos

Coordinador Programa De Tecnología Agroindustrial
Raquel Eugenia de la Cruz Noguera

Universidad del Cauca Facultad de Ciencias Agrarias Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial

ALCANCE

La Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial es una publicación con periodicidad semestral, arbitrada, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad del Cauca, que acepta trabajos originales e inéditos producto de investigación en el campo de la ciencia, la ingeniería y la tecnología, que tengan un impacto en el sector agrario regional, nacional e internacional en temas como agroindustria alimentaria y no alimentaria, ciencias agrícolas y pecuarias, ciencias forestales, energía y medio ambiente, biotecnología, equipos y procesos, administración industrial, en idiomas español e inglés (si se postula en inglés, debe adjuntarse certificación de traducción realizada por una institución reconocida).

POLÍTICAS EDITORIALES

Compromiso de tipo formal

Con la remisión del manuscrito postulado para evaluación y publicación, el (los) autor(es) acepta(n) la totalidad de las condiciones estipuladas en las directrices de publicación.

Compromiso de tipo ético

Los autores deben establecer, por escrito (ver formato), un compromiso de tipo ético en cuanto a la originalidad y carácter inédito del manuscrito postulado, incluyendo los datos personales de cada uno de los autores: nacionalidad, escolaridad, correo electrónico institucional, teléfono, dirección postal y filiación institucional o, en su defecto, la dirección web donde pueden ser consultados, enlaces a bases de datos como CvLac, Google scholar, Researchgate, etc. La revista se abstendrá de aceptar y publicar manuscritos que presenten conflictos de intereses conocidos que puedan afectar su credibilidad; si estos conflictos no son declarados, el manuscrito será rechazado.

Derechos de autor

Con el envío de los trabajos, el (los) autor (es) conceden “Derechos de Autor” a la revista, por lo que los trabajos no pueden tener derechos otorgados a terceros, a la fecha de envío. La con-

cesión de Derechos de autor significa la autorización para que la revista pueda hacer uso del manuscrito, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica- tecnológica: en ningún caso, dichos derechos afectarán la propiedad intelectual que es propia de el (los) autor (es). Si se requiere una modificación en la autoría de un manuscrito luego de su postulación (y antes de su publicación), los proponentes deben informarlo por escrito adjuntando las razones de tal decisión: el comité editorial será la instancia que tomará la decisión final.

PROCESO GENERAL

Envío de manuscritos

El texto completo de los trabajos en formato Word, más la carta de presentación y la información de los evaluadores sugeridos (dos pares nacionales o internacionales), deben remitirse por intermedio de la plataforma Open Journal System (OJS) (<http://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/index>), luego del registro como usuario o, en caso excepcional, por correo electrónico (biotecnofaca@unicauca.edu.co o biotecnofaca2009@gmail.com)

Evaluación

El Comité Editorial someterá los manuscritos a un software anti plagio y se encargará de la revisión inicial, se reservará el derecho de rechazar un manuscrito (decisión definitiva e inapelable) que presente deficiencias en estructura y redacción y que no cumpla con las áreas temáticas, las normas de publicación y referencias pertinentes o sugerir modificaciones con el objeto de lograr una mejor calidad (<https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/about/submissions>). Los trabajos aceptados se evaluarán a doble ciego, por árbitros expertos en el área de conocimiento, quienes emitirán un concepto detallado sobre la pertinencia y atractivo científico y tecnológico, la rigurosidad del tratamiento del tema, el ajuste a las normas de la revista y su contribución al desarrollo de la ciencia, la ingeniería y la tecnología. Por ningún motivo se permitirá la evaluación simultánea de más de dos manuscritos por un autor proponente; si dos manuscritos se son aceptados, serán publicados en ediciones diferentes.

Si el concepto de los dos árbitros es negativo, el manuscrito se rechaza. Si se presenta un concepto positivo y uno negativo, se acude a un tercer árbitro que determinará la condición del documento en evaluación: si es rechazado, el manuscrito y las observaciones de los árbitros se remiten a los autores para que consideren su sometimiento a otra publicación. Si el manuscrito es aceptado con modificaciones menores o mayores, éste y las observaciones de los árbitros se remiten a los autores para que éstos envíen una versión revisada y corregida en máximo 20 días, acompañada de una carta dirigida al Editor-Jefe (ver formato) enumerando detalladamente los cambios realizados con base en las observaciones de los árbitros: será el Editor-Jefe quien decida sobre la aceptación de la versión corregida. Pasados los 20 días, el editor, a discreción, tratará el manuscrito como caducado, por lo que deberá ser presentado nuevamente siguiendo el proceso indicado.

Los árbitros deben contar con título de maestría como mínimo, árbitros nacionales deben estar inscritos en la base de pares evaluadores de COLCIENCIAS, poseer CvLAC, ORCID, Google Scholar actualizados y acreditar publicaciones en el área específica durante los dos últimos 2 años previos al proceso de evaluación.

TIPOS DE MANUSCRITOS

Artículos de investigación científica

Documento que presenta, de manera detallada, los resultados de investigación científica original que signifiquen un aporte original al conocimiento en las áreas de acción de la revista. Se acepta un máximo de 5.500 palabras y 8 figuras y/o cuadros, entre 25 y 40 referencias, y su estructura es:

1. INTRODUCCIÓN, 2. MÉTODO, 3. RESULTADOS, 4. CONCLUSIONES y 5. REFERENCIAS.

Artículo corto

Documento breve que presenta resultados originales preliminares o parciales de una investigación científica o tecnológica, que por lo general requieren de una pronta difusión. Se acepta

un máximo de 4.000 palabras y 5 figuras y/o cuadros, mínimo 15 referencias, y su estructura es: 1. INTRODUCCIÓN, 2. MÉTODO, 3. RESULTADOS, 4. CONCLUSIONES y 5. REFERENCIAS.

Artículo de reporte de caso

Documento que presenta los resultados de un estudio sobre una situación particular del sector, con el fin de dar a conocer las experiencias técnicas y metodológicas que constituyen un aporte al desarrollo, que incluye una revisión sistemática comentada de la literatura sobre casos análogos. Se acepta un máximo de 5.500 palabras y 8 figuras y/o cuadros, mínimo 20 referencias y está constituido por: 1. INTRODUCCIÓN, 2. MÉTODO, 3. RESULTADOS, 4. CONCLUSIONES y 5. REFERENCIAS.

Artículos de reflexión

Documento que presenta resultados de investigación sobre un tema específico bajo una óptica analítica, interpretativa y crítica del(los) autor(es) con base en fuentes originales, se acepta un máximo de 4.000 palabras y 6 figuras y/o cuadros, mínimo 30 referencias. La estructura es: 1. RESUMEN, 2. INTRODUCCIÓN, 3. DESARROLLO DEL TEMA, 4. CONCLUSIONES y 5. REFERENCIAS.

Artículo de revisión (Review)

Su publicación será producto de la invitación a investigadores reconocidos en áreas del campo de acción de la revista. Corresponde a una revisión analítica y crítica de literatura sobre un campo en ciencia o tecnología en el que se analizan, sistematizan e integran los resultados de investigaciones publicadas para mostrar los avances científicos y las tendencias de desarrollo, más los aportes de los proponentes. Se acepta un máximo de 8.000 palabras y 6 figuras y/o cuadros, mínimo 50 referencias y está compuesto por: 1. RESUMEN, 2. INTRODUCCIÓN, 3. DESARROLLO DEL TEMA, 4. CONCLUSIONES y 5. REFERENCIAS.

Cartas al editor

Son comunicaciones cortas, con posiciones críticas, analíticas o interpretativas sobre los manuscritos publicados previamente en la revista, temas o asuntos de interés profesional para los lectores, que a juicio del Comité editorial constituyen un aporte importante a la discusión del tema por parte de la comunidad científica de referencia.

Editorial

Documento escrito por el editor, un miembro del comité editorial o un investigador invitado sobre orientaciones en el dominio temático de la revista, sobre aportes a los investigadores en cuestiones de presentación y estructura de sus artículos, con reflexiones sobre la presentación de documentos escritos, su normatividad, su importancia y otros.

En cualquiera de los casos, el número de palabras permitidas incluye los resúmenes en español e inglés, figuras, cuadros, agradecimientos, referencias, etc.

SECCIONES DEL MANUSCRITO

Las partes que componen en documento son (ver artículo ejemplo):

La **INTRODUCCIÓN** debe resaltar la importancia de la investigación, presentar la literatura relacionada y entregar antecedentes necesarios para comprender la hipótesis de los autores. Al final, se debe hacer alusión a la pregunta de investigación o hipótesis, culminando con los objetivos del trabajo propuesto.

El **MÉTODO** debe tener suficiente información que permita a otro investigador replicar el ensayo y lograr los mismos resultados, además de contener la localización y condiciones del lugar donde se adelantó experimento, el diseño experimental, el análisis estadístico y las referencias de los métodos ya publicados.

Los **RESULTADOS** deben presentar en forma clara objetiva e imparcial los hallazgos y nuevos conocimientos que arrojó la investigación como respuesta al objetivo planteado, apoyados con cuadros y figuras, con el análisis estadístico y de los alcances de otros investigadores que igualmente la discusión.

Las **CONCLUSIONES** se describen de forma clara y precisa, derivadas del análisis de los resultados y con base en los objetivos planteados.

Los **AGRADECIMIENTOS** se incluyen si el autor(es) lo desea (n), redactados en forma sobria y que no supere 4 líneas.

Las **REFERENCIAS** deben contener todos los documentos utilizados. Todas las citas presentadas en el manuscrito deben coincidir con la lista de referencias del final, nunca debe referenciarse un autor que no haya sido citado en el texto y viceversa. Mínimo el 70% de ellas deben ser recientes (de los últimos tres años) y corresponder a artículos de investigación científica de corriente principal que puedan respaldar lo escrito, minimizando el uso de literatura gris (máximo el 10% de ellas, si se considera necesario) y la auto citación que no puede superar el 15%.

FORMATO GENERAL

En tamaño carta (21,59 cm de ancho y 27,94 cm de alto) con interlineado sencillo a una columna, escrito en Arial recta (excepto los nombres científicos que van en cursiva) de 11 puntos, márgenes de 3 cm en el borde superior, 2 cm en el inferior y 2,5 cm en las márgenes laterales. No se permite el uso de cajas de texto

Las cifras decimales se separan con coma. Si se hace uso de siglas, la primera mención en el documento debe considerar el significado completo, luego de ello, se usa la sigla como tal. No utilice puntos después de las unidades de medida (g, mm, m, km, ha, l, etc.). Si se usan números seguidos de un símbolo, separar con un espacio entre uno y otro, ej: 100 m, 250 km. Para los valores de significancia estadística, usar letra p en minúscula. Si se requieren coordenadas geográficas usar 6°18' N, y 53°33' W.

Cuadros y figuras

Deberán ubicarse luego de su respectiva citación en el texto y procesarse en el formato original, con buen contraste y resolución (calidad mínima de 300 dpi) para evitar policromías y facilitar la diagramación. En caso de requerir un pie de tabla/figura o fuente de consulta, debe estar escrito en Arial 8 puntos normal. El título de los cuadros va en la parte superior (**Cuadro 1.** Título descriptivo.) y el de las Figuras en la parte inferior (**Figura 1.** Título descriptivo.), no debe superar dos líneas, en Arial recta normal 9. Se deben usar líneas horizontales para separar la información del cuadro y cada columna debe tener encabezado (en negrilla, con mayúscula inicial). El tamaño de fuente al interior de un cuadro es arial 9 puntos normal.

Existen dos opciones para su citación:

Ejemplo 1:

... en la figura 1 se visualiza un comportamiento....;

Ejemplo 2:

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 1).....

Título del manuscrito

Debe estar en español e inglés y hacer referencia al contenido de una forma clara y concisa, escrito en Arial 24 puntos, negrilla y centrado. Puede ser tan extenso como se considere y constar de dos partes, separadas entre sí por dos puntos. En nota al pie, antes de las filiaciones institucionales y, precedido de un asterisco, indicar el título del proyecto que originó el manuscrito, la entidad financiadora y la fecha de culminación (día, mes, año), si corresponde.

Información del autor (es)

Los autores se nombran según la importancia y contribución en la investigación y/o en la preparación del manuscrito, separados entre sí por punto y coma y enumerados con superíndice. Incluir los apellidos y nombres completos (si los posee), separados entre sí por un guión medio. En nota al pie de página (Arial 8 puntos, en la parte inferior de la primera página y justificada) se indicará la filiación de cada autor, la palabra Correspondencia (en negrilla) y dos puntos, en la que debe aparecer el correo institucional del autor elegido para el envío de correspondencia.

Ejemplos:

Para autores:

MORAN-ZEMANATE, JUAN-PATRICIO¹; GOBERT-ALAI, MARC-ANDREW²;
REYES P., CARLOS A.³

Para filiación institucional:

* Título del proyecto de origen: "Evaluación de los procesos agroindustriales desarrollados en zonas rurales del Departamento del Cauca". Financiación: Entidad aportante. Culminación: 26 de enero de 2019.

1 Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de investigación Ciencia y Tecnología de Biomoléculas de Interés Agroindustrial (CYTBIA). Máximo título profesional alcanzado. Ciudad, País. <https://orcid.org/0000-0003-1154-6765>
Correspondencia: gfvssp@unicauca.edu.co

Resumen

La palabra RESUMEN debe justificarse al margen izquierdo, en mayúscula y negrilla, iniciando la escritura luego de dos interlíneas en un solo párrafo justificado, entre 250 y 300 palabras e incluirá Introducción, justificación, objetivos, metodología, resultados y conclusiones de la investigación haciendo énfasis en los logros alcanzados. Debe ser conciso, escrito en español e inglés (ABSTRACT).

Palabras clave

Se ubican luego de cada resumen. El título en mayúscula, negrilla, en español (PALABRAS CLAVE) e inglés (KEYWORDS) seguido de dos puntos. Incluir, por lo menos diez (10) palabras separadas entre sí por punto y coma, cada una de las cuales inicia con mayúscula. Se pueden tomar del cuerpo del texto y de las referencias usadas, se pueden repetir palabras encontradas en el título, usar acrónimos y varias versiones de un término en diferentes idiomas.

Ejemplo:

PALABRAS CLAVE: *Bactris gasipaes*; Maduración; Pos cosecha; Reología; Senescencia.

Títulos

Los de primer nivel para partes principales del manuscrito en arial 11 puntos, mayúscula sostenida y negrilla); los de segundo nivel con mayúscula inicial, negrilla y sin punto final, separados del texto por dos interlíneas. Los de tercer nivel con mayúscula inicial, negrilla y un punto seguido, continuando el texto en el mismo renglón luego de un espacio.

Ejemplo:

MÉTODO

Materiales

Material vegetal. El material vegetal usado.....

Expresiones matemáticas

Deben ser escritas dejando dos espacios sobre, debajo y entre cada una de ellas y se debe utilizar el editor de ecuaciones de MS Word. Deben seguir un formato uniforme, justificarse al margen izquierdo y usar la expresión (Ec.1) con números arábigos consecutivos justificada al margen derecho (para mayor facilidad, insertarlas en un cuadro de dos columnas, sin bordes), citándolas en el sitio indicado. El significado de las variables y sus respectivas unidades deben aparecer luego de que se utilicen por primera vez, usando el Sistema Internacional de Unidades (SI).

Ejemplo:

$$\beta - \text{caroten} = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3 \times VH}{\epsilon \times l \times SM} \quad (\text{Ec. 1})$$

A is the absorbance at 452 nm, MW is the molecular weight of β -carotene (536,8 g/mol), DF is the dilution factor, VH is the volume of hexane (0,003 L), ϵ is the molar extinction coefficient of β -carotene in hexane (145.300 L/mol cm, Rodríguez- Amaya, 2001), l is the path length (1 cm) and SM is the weight of starchy matrix in dry basis (0,04902 g).

Citaciones

Las citas dentro del texto siguen el formato (autor/es, año). Se podrán incluir trabajos aceptados, pero aún no publicados, especificando el nombre de la revista seguido de la expresión “en prensa/in press” o con su DOI correspondiente.

Dependiendo del número de autores que posea la publicación citada, se usará el siguiente formato:

Ejemplos:

Un autor:

Gómez (2020) encontró diferencias significativas en o

La estructura celular se vio afectada por la aplicación de (Gómez, 2020)

Dos autores:

Rawlings and Betece (2020) o (Rawlings and Betece, 2020)

Tres o más autores:

Malone *et al.*, (2020) o (Malone *et al.*, 2020)

Si se usan varias referencias que sirven de soporte a un tema particular, se consideran éstas en orden cronológico.

Ejemplo:

Los materiales biodegradables presentan beneficios.....(Arboleda, 2018; Atkins and Fred, 2019; Martínez *et al.* 2020).

Para autor corporativo se coloca el nombre de la organización. La primera ocasión que se usa una organización, se considera con el nombre completo y entre paréntesis la sigla. En adelante, se cita solamente con la sigla.

Ejemplo:

La primera vez:

...según la ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO,2016)....

Para la segunda y demás veces:

....la consolidación de la cultura alimentaria (FAO, 2016) permite....

La cita de una cita es usada cuando se tiene acceso a una fuente de información a través de otra. Por ejemplo, si se está consultando un libro de Stephen Hawking y este cita una opinión o afirmación de Roger Penrose, entonces:

Ejemplo:

Penrose (citado por Hawking, 2010) piensa que las matemáticas (...)

Lista de referencias

La referencias consultadas se presentan en orden alfabético incluyendo los nombre y apellidos completos (si el manuscrito consultado así lo permite) de TODOS los autores (omitiendo el uso de *et al*, en mayúscula sostenida), con sangría francesa de 1,25 cm a partir de la segunda línea de cada una de ellas. Si se usa más de una referencia del mismo(s) autor(es), estas deben ir en orden cronológico y, si corresponden al mismo año, se deben diferenciar con letras minúsculas, lo cual también será aplicado en las citaciones.

Para la referenciación de números o volúmenes de alguna publicación es necesario usar números arábigos y no romanos. Los nombre de las revistas no se deben abreviar. Se debe incluir el DOI (Digital Object Identifier) de todas las referencias que lo posean, en formato vínculo (<https://doi.org/10.6036/7171>) que permita el acceso directo al documento con un click. No se debe poner un punto al final de un DOI o de una URL. Se deben indicar los numeros de página de inicio y finalización (completos) de un recurso (por ejemplo p. 238-250 y no p. 238-50). En revistas que publican una versión online porovisional sin paginación (*online first*) o revistas con publicación cointunua, es suficiente indicar "*online first*" o un número que se asigna por el editor (por ejemplo e196234 o art. 14) o no poner nada.; en ambos casos, puee ser suficiente con el volumen y número de la edición. Al usar referencias electrónicas, no usar las expresiones "Recuperado de", "Internet", "Online", "Disponible en".

Artículo científico sin DOI

DE BARROS-FERNANDES, REGIANE-VICTÓRIA; COSTA-GUIMARÃES, ISABELA; RODRIGUES-FERREIRA, CHRISTIANE L.; ALVARENGA B., DIEGO; VILELA-BORGES,

SORAIA; DE SOUZA, AMANDA-UMBELINA. Microencapsulated Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil as a biopreservative in minas frescal cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 41, n. 1, 2019, p. 127-145.

Artículo científico con DOI

DE BARROS-FERNANDES, REGIANE-VICTÓRIA; COSTA-GUIMARÃES, ISABELA; RODRIGUES-FERREIRA, CHRISTIANE L.; ALVARENGA B., DIEGO; VILELA-BORGES,

SORAIA; DE SOUZA, AMANDA-UMBELINA. Microencapsulated Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil as a biopreservative in minas frescal cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 41, n. 1, 2019, e12759.

<https://doi.org/10.1111/jfpp.12759>

Libro con autor

PASTOR-SIMSON, SHARON; STRAUS, MARTHA C. Post-harvest technology of horticultural crops. 1 ed. Jaipur (India): Oxford Book Company, 2010, 306 p, ISBN XXXXXX.

Libro en versión electrónica

PASTOR-SIMSON, SHARON; STRAUS, MARTHA C. Post-harvest technology of horticultural crops. 1 ed. Jaipur (India): Oxford Book Company, 2010, 306 p. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12759>

Capítulo de libro

KOPER, OLGA B.; RAJAGOPALAN, SHYAMALA; WINECKI, SLAWOMIR; KLABUNDE, KENNETH

J. Nanoparticle metal oxides for chlorocarbon and organophosphonate remediation. En FRYXELL, GLEN E.; CAO, GUOZHONG; Environmental applications of nanomaterials. London (United Kingdom): Imperial College Press, 2007, 520 p.

Reporte de un organismo o Gobierno

COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. La situación de la provisión de alimentos en un mundo moderno. Bogotá (Colombia): 1997, 20 p.

Seminarios y conferencias

ROMERO, FERNANDO. Sensación, pensamiento y método. Seminario Internacional sobre Gestión de Calidad y Productividad como estrategia de desarrollo (Cartagena, Colombia, 1990). Memorias, Bogotá (Colombia): 1990. p. 65-87.

Normas técnicas

UNITED STATES OF AMERICA. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS

(AOAC). ASTM D1434–82: Standard test method for determining gas permeability characteristics of plastic film and sheeting. Pennsylvania (USA): 2009, 22 p.

Tesis y trabajos de grado

LÓPEZ-VALENCIA, YVETH. Estudio de la cinética de deshidratación osmótica para la conservación de lisa (*Mugil cephalus*) [Tesis Ingeniería Pesquera]. Arequipa (Perú): Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Facultad de Ciencias Biológicas, 2017, 154 p.

Patentes

MOREIRA, G.; MATOS, T. Embalagem biodegradável de amido de inhame. US 6.444.567, Clases 343, 356. Sao Paulo (Brasil): 2001.

Material electrónico

INTERNET ENGINEERING TASK FORCE (IETF). RFC: 3979: Intellectual property rights in IETF Technology. March 2005. <http://www.ietf.org/rfc/rfc3979.txt> [consultado julio 4 de 2009].

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Inocuidad de los alimentos. 2019. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> [consultado septiembre 2 de 2019].

ASHWELL, M. ILSI Europe Concise Series. Concepts of functional foods. 2002. http://www.ilsa.org/Europe/Publications/C2002Con_Food.pdf [consultado mayo 13 de 2009].

EDITORIAL

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

- 18 **Polifenoles totales de *Ganoderma lucidum* cultivado en residuos de *Pandala talaumanariñensis* y *Avena sativa***
MUESES-MAFLA, ROBINSON-BYRON;
BENAVIDES-CALVACHE, OLGA-LUCIA
- 27 **Producción, calidad de leche y análisis económico de vacas holstein suplementadas con ensilaje de botón de oro (*Tithonia diversifolia*) o ensilaje de maíz**
ANGULO-ARIZALA, JOAQUÍN; NEMOCÓN-COBOS, ANA-MARÍA;
POSADA-OCHOA, SANDRA-LUCÍA; MAHECHA-LEDESMA, LILIANA
- 41 **Estudio del biodiesel obtenido a partir de aceite de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo)**
BASTO-FLOREZ, LUIS-EDUARDO; MILLÁN-ALVARADO, SEBASTIAN-AUGUSTO; MEDINA-CABALLERO, LUISA-FERNANDA;
MORA-VERGARA, LIA-ZAMARA; CABALLERO-HERNÁNDEZ, YULEISI-TATIANA
- 54 **Digestibilidad de hidrolizados enzimáticos de vísceras de origen animal en *Piaractus brachypomus*, Cuvier 1818**
PEREA-ROMÁN, CRÍSPULO; GARCES-CAICEDO, YENY-JUDITH;
MORALES-BRAVO, YERIKA-JESLANNY;
JIMENEZ-CHAMORRO, MARLY-ANDREINA;
HOYOS-CONCHA, JOSÉ-LUÍS; VIVAS-QUILA, NELSON-JOSÉ
- 68 **Evaluación de la bioaccesibilidad de cadmio en formulaciones de chocolatería por digestión gastrointestinal *in vitro***
MURILLO-MÉNDEZ, CRISTIAN-JAHIR;
MOLINA-VELASCO, DANIEL-RICARDO;
LÓPEZ-GIRALDO, LUIS-JAVIER;
SALAZAR-BELEÑO, ANA-MILENA
- 84 **Caracterización bromatológica de residuos de frutas**
FLÓREZ-MONTES, CILIANA; ROJAS-GONZÁLEZ, ANDRÉS-FELIPE;
RODRÍGUEZ-BARONA, SNEYDER

- 97 **Influencia de las enzimas coagulantes de la leche sobre la composición lipídica y propiedades organolépticas de quesos semi-madurados**
USGAME-FAGUA, KAREN-GINETH*; GARCÍA-TORRES, ANGÉLICA-MARÍA;
ROJAS-MORALES, CARLOS-IVÁN; MEDINA-VARGAS, OSCAR-JULIO
- 113 **Digestibilidad, cinética ruminal y metabolitos sanguíneos en corderos alimentados con *Samanea saman* y *Cordia dentata***
GUTIERREZ-OVIEDO, FABIAN; PARDO-GUZMÁN, JAIRO;
CASTAÑEDA-SERRANO, ROMÁN AMBUILA-CHAMIZO-NURY-MARCELA;
CÓRDOBA-CERÓN, EDUARD-ESTEVEN;
MONTES-ROJAS, CONSUELO;
ANAYA-FLOREZ, MARIA-DEL SOCORRO
- 124 **Efecto del abono a base de hoja de coca en *Pisum sativum* L. en el Cauca, Colombia***
AMBUILA-CHAMIZO, NURY-MARCELA; CÓRDOBA-CERÓN, EDUARD-ESTEVEN;
MONTES-ROJAS, CONSUELO; ANAYA-FLOREZ, MARIA-DEL SOCORRO
- 136 **Obtención de nanoemulsiones de *Cúrcuma longa* l. y su aplicación en bebida acuosa**
CHICA-BARCO, VANESSA; MARTÍNEZ-CORREA, HUGO A.;
PEREZ-MUNIVE, ADRIANA M.
- 152 **Propóleos de Nariño: Propiedades fisicoquímicas y actividad biológica**
SALAMANCA-GROSSO, GUILLERMO;
OSORIO-TANGARIFE, MÓNICA-PATRICIA;
CABRERA-MONCAYO, JESUS ANTONIO
- 165 **Obtención de “Snacks” de piña (*Ananas comosus*) mediante las técnicas combinadas de Ventana de Refractancia y Fritura con Aire Caliente**
GONZÁLEZ-HOYOS, LINA-VANESSA; ARROYO-RINCÓN, ANA-MARÍA;
TOBAR-SUAREZ, ALEXANDER; POLANÍA-RIVERA, ANNA-MARÍA;
AYALA-APONTE, ALFREDO; DÍAZ-ORTIZ, ALBERTO
- 179 **Lipasa de semillas de *Pachira speciosa* inmovilizadas en esferas de quitosano: un sistema bio-catalítico reusable**
VALENZUELA-JARAMILLO, IVON-ESHER ; MENDOZA-MEZA, DARY
- 194 **Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico**
SUÁREZ-CONTRERAS, LILIANA-YANET;
PEÑARANDA-FIGUEREDO, FREDDY-ARMANDO

- 207 Evaluación fisicoquímica y microbiológica de ahuyama (*Cucurbita moschata*)
troceada en fresco con recubrimiento y polietileno**
RUCO-SÁNCHEZ, CRISTINA; SANTIAGO-CAMPO, CARLOS-HOLMES;
PAZ-PEÑA, SANDRA-PATRICIA; MOSQUERA-SÁNCHEZ, SILVIO-ANDRÉS

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- 221 El huevo de gallina y su procesamiento industrial: una revisión**
RAMÍREZ-CRESPO, LINA MARCELA; CORTÉS-RODRÍGUEZ, MISAEL;
MICANGUER-CARLOSAMA, ADRIANA

ÍNDICE TEMÁTICO

En Colombia es estratégico seguir avanzando en la articulación de los procesos de investigación a los programas de extensión rural, dado que hace muchos años se consideró en todos los países como un servicio que debía impartir el Estado. Así mismo, se considera que en el campo colombiano es importante la asistencia técnica que se retroalimenta de un componente investigativo que permita mejorar la competitividad y productividad; obedeciendo a este fin, en el marco normativo ya se cuenta con la Ley 1876 del 29 de diciembre de 2017 por la cual se crea el Sistema Nacional de Innovación Agropecuaria (SNIA) y, para efectos del esquema de asistencia técnica, se crea el concepto de extensión agropecuaria que define como un proceso de acompañamiento mediante el cual se gestiona el desarrollo de capacidades de los productores agropecuarios, su articulación con el entorno y el acceso al conocimiento, tecnologías, productos y servicios de apoyo, con el fin de hacer competitiva y sostenible su producción, al tiempo que contribuye a mejorar de la calidad de vida familiar.

La extensión agropecuaria facilita la gestión de conocimiento, el diagnóstico y solución de problemas, en los niveles de la producción primaria, la postcosecha, la transformación y la comercialización; el intercambio de experiencias y la construcción de capacidades individuales, colectivas y sociales se debe relacionar con aspectos como la superación de la pobreza, la reforma agraria en función de la concentración y tenencia de la tierra, la disponibilidad de alimento, el hambre y la sustentabilidad ambiental; según el Censo Nacional Agropecuario, tan sólo el 10% de los campesinos para el año 2014, contaban con asistencia técnica por parte del gobierno, siendo ésta es una de las causas por las que existe poca rentabilidad en los cultivos, sumado a la precariedad en las estrategias de comercialización de los productos. En el marco del acuerdo de paz, se aprobó la ley SNIA que busca potencializar y diseñar acciones de investigación, desarrollo tecnológico, formación y capacitación para sector agropecuario, con miras a lograr avances futuros en el sector rural en Colombia.

Sumado a lo anterior, se deben reconocer las situaciones que dificultan la definición de programas y proyectos de extensión rural, entre ellas la ausencia de datos estadísticos que den cuenta de la situación rural, la presencia de múltiples actores concentrados en zonas del país menos prioritarias o zona marginadas, baja articulación y actualización entre los actores prestadores de los servicios de extensión y acompañamiento técnico, falta de profesionales aptos para prestar los servicios, baja cobertura y mala calidad en la prestación de los servicios, el desconocimiento del Estado de los servicios de extensión y su importancia para el desarrollo humano rural integral debido a la falta de procesos y planificación a largo plazo, la evaluación y seguimiento, que en muchos casos, ha llevado hacer un mal uso del suelo con zonas subutilizadas con una alta productiva alimentaria y destinadas para la ganadería extensiva.

El país debe identificar y ordenar a los actores involucrados, articular y evitar la duplicidad de esfuerzos y reconocer el capital humano capacitado para la implementación de los servicios de extensión. Esto contribuye a entregar pautas para fortalecer un aspecto relacionado con la necesidad de cumplir con garantías en la calidad del servicio. Se debe entonces, afirmar que la extensión rural tenga un enfoque territorial que permita el acercamiento eficiente con y para las comunidades y encontrar las estrategias para garantizar la gratuidad del servicio de extensión en los municipios más dispersos.

La extensión rural bajo un enfoque territorial, implica comprender que los procesos de inclusión económica de los territorios rurales no sólo están representados en criterios de competitividad, sino también en las ventajas comparativas que pueden surgir de las particularidades locales y/o regionales. Según esto, las políticas públicas enfocadas en la prestación del servicio de extensión deben propender por espacios de capacitación de los asistentes técnicos y extensionistas para que desarrollen habilidades y competencias que los conviertan en promotores del desarrollo humano rural integral, lo que supone que deben ser capaces de valorar las capacidades locales, la gestión y apropiación del conocimiento y de adelantar un proceso de acompañamiento técnico no invasivo para la toma de decisiones productivas y organizativas, bien sea a nivel individual o asociativo.

Se espera que la extensión agropecuaria del SNIA permita llevar avances de tecnología, información y procesos de aprendizaje a las familias rurales colombianas que lo requieran, y que todos los sectores productivos puedan beneficiarse como oferentes o beneficiarios, generando una mayor productividad económica. Hablar de los servicios de extensión y de innovación rural en Colombia, representa un reto y una responsabilidad que permea a todas las universidades del país, siendo crítico frente a situaciones que han marcado la historia, como el problema de las rentas y la tenencia de la tierra, que refleja contextos de desigualdad en todo el territorio nacional, el cual puede ser tratado desde los sistemas de extensión y de innovación rural. Si se tiene en cuenta la actual situación causada por la pandemia, la reactivación de la economía el sector rural es la estrategia para avanzar en la posibilidad de tener un desarrollo humano rural integral que integre la investigación con el servicio extensión rural y, porqué no, una reforma agraria esperada por los colombianos, articulados a proyectos de largo aliento para sector rural que busquen garantizar una paz duradera a las poblaciones campesinas.

Gustavo Adolfo Alegría Fernández
Profesor Universidad del Cauca
Esp. Nutrición Animal–Esp. Formulación Proyectos
Magister en Agroecología
PhD ©. Medio Ambiente y Sociedad
Universidad Pablo de Olavide
Sevilla-España

Polifenoles totales de *Ganoderma lucidum* cultivado en residuos de *Pandala talaumanariñensis* y *Avena sativa**

Total polyphenols of *Ganoderma lucidum* cultivated in wastes of *Pandala talaumanariñensis* and *Avena sativa*

MUESES-MAFLA, ROBINSON-BYRON¹; BENAVIDES-CALVACHE, OLGA-LUCIA²

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 4 Abril 2020.

Aprobado para publicación: 12 Noviembre 2021.

* Título Proyecto de origen: "Determinación de principios activos medicinales del hongo *Ganoderma lucidum* cultivado sobre residuos sólidos y su uso en la producción de un alimento funcional". Financiación: Vicerrectoría de Investigaciones VIPRI Universidad de Nariño (Colombia). Culminación: 2020

1 Universidad de Nariño, Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Grupo de Investigación en Biotecnología Agroindustrial y Ambiental (Biota). Ingeniero Agroindustrial. Pasto, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-3036-7191>

2 Universidad de Nariño, Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Directora Grupo de Investigación en Biotecnología Agroindustrial y Ambiental (Biota). Ingeniera Química, M.Sc. Químicas, M.Sc. Agrarias. Pasto, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-6327-5832>

Correspondencia: byronmueses14@udenar.edu.co, olgalucia@udenar.edu.co

Cómo citar este artículo: MUESES-MAFLA, ROBINSON-BYRON; BENAVIDES-CALVACHE, OLGA-LUCIA. Polifenoles totales de *Ganoderma lucidum* cultivado en residuos de *Pandala talaumanariñensis* y *Avena sativa*. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 20, n. 1, 2022, p. 18-26. Doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1491>

RESUMEN

Ganoderma lucidum es un hongo medicinal con gran demanda en el mercado mundial, reconocido por poseer numerosos compuestos bioactivos con potencial antioxidante, principalmente por sus polifenoles, triterpenos y polisacáridos. En el presente estudio se determinó el contenido de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu y la evaluación de grupos funcionales estructurales mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en extractos etanólicos y acuosos del cuerpo fructífero de *G. lucidum* obtenidos del cultivo en sustrato lignocelulósico de aserrín de *Pandala talaumanariñensis* y paja de *Avena sativa*. El contenido de polifenoles totales fue mayor en los extractos acuosos ($32,44 \pm 0,7023$ mg EAG/g) lo que indicaría que otros compuestos bioactivos de *G. lucidum* con actividad antioxidante podrían ser arrastrados en el agua caliente, enriqueciendo el extracto. Los espectros IR de *G. lucidum* presentaron bandas de absorción en el rango de $3372,59$ a $670,27$ cm^{-1} , las cuales resultaron comparables con información espectral IR de productos comerciales del género *Ganoderma*. Los resultados encontrados muestran un interesante potencial de *G. lucidum* como fuente de antioxidantes naturales que pueden usarse en la industria alimentaria y medicinal, dado su contenido de polifenoles totales.

ABSTRACT

Ganoderma lucidum is a medicinal fungus that has a worldwide demand due to its numerous bioactive components such as polyphenols, triterpenes, and polysaccharides, which have antioxidant potentials. This study assessed the total polyphenol content through the Folin-Ciocalteu method and analyzed structural functional groups using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). Ethanollic and aqueous solutions were extracted from fruiting bodies of *G. lucidum* growing in lignocellulosic substrates of sawdust and straw obtained from *Pandala talaumanariñensis* and *Avena sativa*, respectively. The total polyphenol content was higher in the aqueous solutions ($32,44 \pm 0,7023$ mg GAE/g), which would indicate that other bioactive compounds of *G. lucidum* can be extracted with hot water, enriching this solution. The IR spectra of *G. lucidum* showed absorption bands between the $3372,59$ to $670,27$ cm^{-1} range, which were similar to IR spectral information of the genus *Ganoderma*. These results demonstrate an interesting potential of *G. lucidum* as a source of natural antioxidants that can be used for the food and medicinal industry, given its total polyphenol content.

PALABRAS CLAVE:

Basidiomycete; Actividad antioxidante; Folin Ciocalteu; FTIR.

KEYWORDS:

Basidiomycetes; Antioxidant activity; Folin Ciocalteu; FTIR.

INTRODUCCIÓN

Las especies de *Ganoderma* son hongos basidiomycetes degradantes de la madera con cuerpos fructíferos duros (Boh *et al.*, 2007). *Ganoderma lucidum* también conocido como Reishi o Lingzhi es una especie de la clase Agaricomycetes, que pertenece a la familia Ganodermataceae del orden Polyphorales (Pinya *et al.*, 2019), esta especie es rica en compuestos bioactivos con potencial medicinal, principalmente triterpenoides, polisacáridos, nucleótidos, esteroides, ácidos grasos, proteínas y glicopéptidos (Cór *et al.*, 2018).

Las especies de *Ganoderma* no están clasificadas como hongos comestibles, ya que tienen un sabor amargo y dureza en sus cuerpos fructíferos y no tienen la textura carnosa característica de los hongos comestibles, pero su importante valor económico se debe a sus propiedades medicinales (Hapuarachchi *et al.*, 2018). Actualmente, *G. lucidum* es utilizado como materia prima para la producción de alimentos funcionales (Uddin *et al.*, 2019) y de las diferentes partes de su cuerpo fructífero, micelio o esporas se pueden encontrar en el mercado, diversos productos, tales como cápsulas blandas, inyecciones, tabletas, bebidas (Liu & Zhang, 2018), polvo, té (Sangeetha *et al.*, 2019), extractos, suplementos dietéticos (Wu *et al.*, 2017), café, productos de esporas, jarabes, pastas de dientes, jabones y lociones, también se comercializan alimentos y suplementos farmacológicos que mejoran el sistema inmunológico y mejoran las funciones metabólicas (Hapuarachchi *et al.*, 2018). Recientemente, los efectos farmacológicos del género *Ganoderma* han atraído una atención considerable por parte de la comunidad científica mundial (Zhao *et al.*, 2019), en especial por el contenido de polisacáridos y triterpenoides de *G. lucidum*, que han sido reconocidos como una fuente natural prometedora de compuestos inmunomoduladores, anticancerígenos y antioxidantes (Liu & Zhang, 2019) además, numerosos autores han evidenciado que los triterpenos y polisacáridos son los principales componentes fisiológicamente activos de *G. lucidum* (Hu *et al.*, 2018) y se ha demostrado que los extractos de *G. lucidum* en varios solventes son eliminadores de radicales libres, anti-diabéticos y antioxidantes (Sharif *et al.*, 2017).

Los efectos de eliminación de radicales libres por *G. lucidum* están relacionados con su mecanismo terapéutico para prevenir y tratar enfermedades, como bronquitis crónica, hipertensión, hiperlipidemia, diabetes, hepatitis, patología tumoral y envejecimiento. Por lo tanto, la función principal de los productos de *G. lucidum* es inhibir las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lin & Deng, 2019) mediante la actividad de varios de sus compuestos como los fenólicos (Oludemi *et al.*, 2018). Por consiguiente, el objetivo de esta investigación fue evaluar el contenido de polifenoles totales de extractos etanólicos y acuosos del cuerpo fructífero deshidratado y molido de *Ganoderma lucidum* que fue conservado en refrigeración por un periodo de seis años, así como la determinación de grupos funcionales estructurales mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR); lo anterior para la evaluación de la estabilidad química de bioactivos presentes en *G. lucidum*.

MÉTODO

Localización

El trabajo se realizó en el laboratorio e invernadero del Grupo de Investigación en Biotecnología Agroindustrial y Ambiental (BIOTA) de la Universidad de Nariño en la ciudad de San Juan de Pasto, Colombia, ubicada a una altura de 2.527 m.s.n.m, con una temperatura promedio de 12 °C, y precipitación anual de 1.059 mm (IDEAM Pasto).

Material fúngico

Se emplearon basidiomas de *Ganoderma lucidum* (cepa WC806 UPenn) deshidratados, molidos y conservados en refrigeración, obtenidos del cultivo en el invernadero del Grupo BIOTA (año 2014), en sustrato lignocelulósico con la siguiente composición en base seca: 78 % aserrín de *Pandala talaumanariñensis*, 20 % paja de *Avena sativa*, 1 % de sacarosa y 1 % de CaCO_3 , siendo la humedad de los sustratos de cultivo del 70 %.

Preparación de los extractos

Los extractos se prepararon de acuerdo a la metodología de Santillán *et al.* (2017). Para la obtención de los extractos etanólicos (EE) se adicionaron 2 g de muestra seca del basidioma en polvo, en 100 mL de etanol al 90 % durante 24 h con agitación magnética en oscuridad y temperatura ambiente, se filtró y aforó a 100 mL con etanol al 90 %. Los extractos acuosos (EA) se prepararon agregando 2 g de muestra seca del basidioma en polvo, en 100 mL de agua destilada en ebullición, de igual forma se filtró y aforó a 100 mL con agua destilada. Se prepararon tres muestras por cada extracto que fueron simbolizadas como EE_n ($n=1,2$ o 3) y EA_n ($n=1,2$ o 3), las cuales cada una fueron evaluadas por triplicado.

Contenido de polifenoles totales

La cuantificación de polifenoles totales se realizó por el método de Folin Ciocalteu (F-C), utilizando Na_2CO_3 al 20 % p/v como buffer, la curva de calibración se elaboró utilizando una solución de ácido gálico a 1000 ppm y, a partir de esta solución, se prepararon soluciones de 50, 100, 300, 500 y 700 ppm de ácido gálico (GA) en agua destilada tipo II. En un matraz se agregó 1 mL de muestra, 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, 4 mL de solución de Na_2CO_3 y se aforó a 10 mL con agua destilada, se calentó a 50 °C en baño María por 10 min y se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro marca Thermo scientific genesys 10 UV (Santillán *et al.*, 2017). Las muestras se analizaron de igual forma sustituyendo el patrón GA por 1 mL del extracto a evaluar. El resultado promedio de las lecturas se expresó en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg GAE/g).

Espectros FTIR

G. lucidum en polvo fue mezclado uniformemente con cristal KBr, la mezcla se presionó manualmente hasta formar la tableta y la medición se realizó en un espectrofotómetro IR Affinity 1S. El espectro FTIR es generalmente aceptable cuando se logra una transmisión del 60 al 70 % (Choong *et al.*, 2013).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el software Statgraphics® Centurion XVI. Los valores de polifenoles totales para los extractos se evaluaron con el ANOVA unidireccional y el de Tukey. Los valores de P inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Al realizar la evaluación del contenido de polifenoles totales, según el ANOVA unidireccional, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,1217$) entre la media del contenido de polifenoles totales (mg GAE/g) y el tipo de extracto, con un nivel del 95,0 % de confianza. En la figura 1 se observa que no existen dichas diferencias, no obstante, la concentración de polifenoles totales de *G. lucidum* en los extractos acuosos (EA) fue más alta frente a los extractos etanólicos (EE), tal como se evidencia en el Cuadro 1.

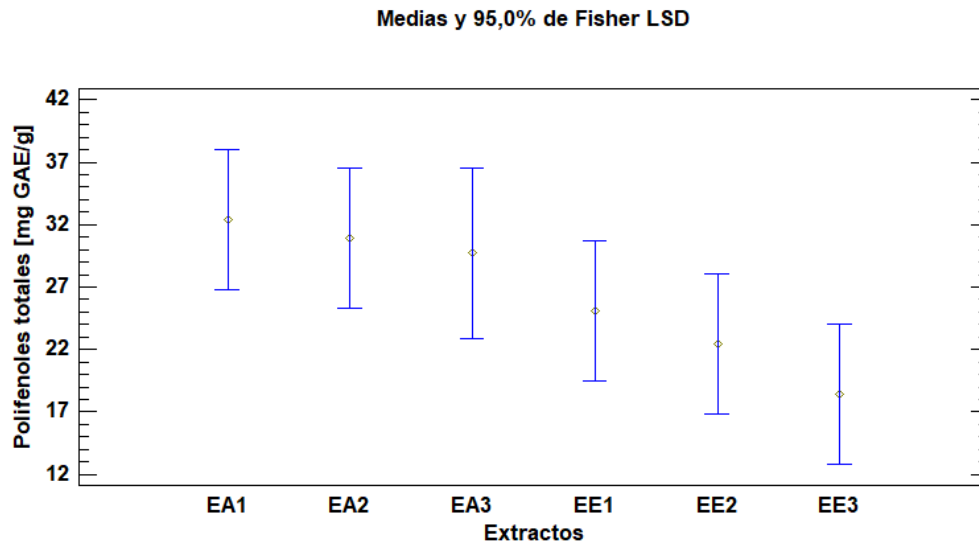


Figura 1. Gráfico de medias de polifenoles totales expresado en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra.

Cuadro 1. Valores promedio de polifenoles totales según el tipo de extracto

No. de Muestra	EA (mg GAE/g)	EE (mg GAE/g)
1	32,44 ± 0,70	25,11 ± 9,24
2	30,96 ± 3,38	22,44 ± 8,17
3	29,71 ± 2,12	18,39 ± 6,90

Los resultados encontrados en este estudio para los extractos acuosos fueron superiores a los de otras investigaciones. Rašeta *et al.* (2016) determinaron el contenido de polifenoles totales en extractos acuosos de cuerpos fructíferos de *G. applanatum* de $21,07 \pm 0,42$ mg GAE/g y $11,38 \pm 0,67$ mg GAE/g para *G. lucidum*. En cuanto a extractos alcohólicos de hongos del género *Ganoderma*, se reportan valores mayores a los de la presente investigación. Mishra *et al.* (2014) reportaron un valor de $28,27$ mg GAE/g en peso seco en extractos metanólicos de *G. lucidum*, mientras que Huerta *et al.* (2016) reportaron $49,15 \pm 0,17$ mg GAE/g en extractos etanólicos de *G. curtisii*.

El tipo de solvente tiene una influencia significativa en la dinámica del proceso de extracción y la composición química del extracto (Veljović *et al.*, 2019). Pese a no encontrar diferencias estadísticamente significativas según el tipo de solvente empleado en este estudio, se evidenció una mayor concentración de polifenoles totales en los extractos con agua caliente, contrariamente a que los polifenoles son más solubles en disolventes orgánicos polares como el etanol y metanol (Sudheer *et al.*, 2019). Esto apunta a que en los extractos acuosos obtenidos se pudieron arrastrar otros compuestos como los polisacáridos, comúnmente asociados a los polifenoles, ya que los macrohongos poseen triterpenos y polisacáridos en sus estructuras especializadas para la formación de esporas (Santillán *et al.*, 2017), siendo estos últimos altamente solubles en agua caliente (Veljović *et al.*, 2019).

La actividad antioxidante en basidiomicetes se ha relacionado con la presencia de compuestos de bajo peso molecular (polifenoles), pero también se atribuye al contenido de triterpenos y polisacáridos de alto peso molecular (Santillán *et al.*, 2017). Lo anterior indica que, tanto el disolvente utilizado como la temperatura, influyen en la extracción de polifenoles como de otros compuestos del basidioma de *G. lucidum* y de esta forma la actividad antioxidante en extractos acuosos del hongo, puede ser mayor en comparación con su valor en extractos puros.

Lee y Lim (2019) encontraron valores más altos en el contenido de polifenoles totales en extractos acuosos de *G. lucidum* ($33,1 \pm 1,9$ mg GAE/g) que en el extracto de polisacáridos de *G. lucidum* ($5,8 \pm 0,6$ mg GAE/g), dada la pérdida de compuestos activos como consecuencia del proceso de purificación.

Por otra parte, el aumento del contenido de polifenoles totales en el extracto obtenido por ebullición en agua del cuerpo fructífero de *G. lucidum*, responde a la liberación de compuestos fenólicos, además del arrastre de compuestos insolubles, dada la descomposición celular y de enzimas oxidativas por el efecto térmico, por lo cual, para la preservación del contenido fenólico es recomendable que el proceso de extracción bajo condiciones de ebullición acuosa se realice por un tiempo inferior a cinco minutos (Minh *et al.*, 2019).

En este estudio, los extractos acuosos del basidioma de *G. lucidum* se obtuvieron por ebullición durante tres minutos, reportando un valor máximo de $32,44 \pm 0,7023$ miligramos Equivalente de ácido gálico por gramo de muestra en base seca (mg GAE/g), destacando de esta forma que el agua es un excelente solvente de extracción, no solo por disminuir costos del proceso y la contaminación derivada del uso de solventes orgánicos, sino también por la generación de extractos con elevada concentración de compuestos fenólicos. Esto, es además ventajoso en la preparación de té e infusiones de carácter alimentario, pues asegura el consumo de compuestos bioactivos con actividad antioxidante que hacen parte de *G. lucidum* y que son beneficiosos para la salud humana (Santa Rosa, 2016).

De hecho, los extractos acuosos en caliente de *G. lucidum* concentran mejor los polisacáridos y diversos estudios han concluido que estos compuestos son potentes antioxidantes (Wu & Wang, 2009). Además, *G. lucidum* tiene alta actividad captadora de radicales libres, la cual está asociada a la presencia de compuestos triterpénicos que son utilizados como mecanismo de defensa contra sustancias oxidantes (Wang *et al.*, 2019).

Espectro FTIR de *Ganoderma lucidum*

En el espectro infrarrojo de *G. lucidum* (Figura 2) se observan las siguientes bandas: $3372,59$ cm^{-1} ; $2927,99$ cm^{-1} ; $1651,09$ cm^{-1} , $1563,33$ y también se observan varios picos seguidos entre 1500 cm^{-1} y 1000 cm^{-1} .

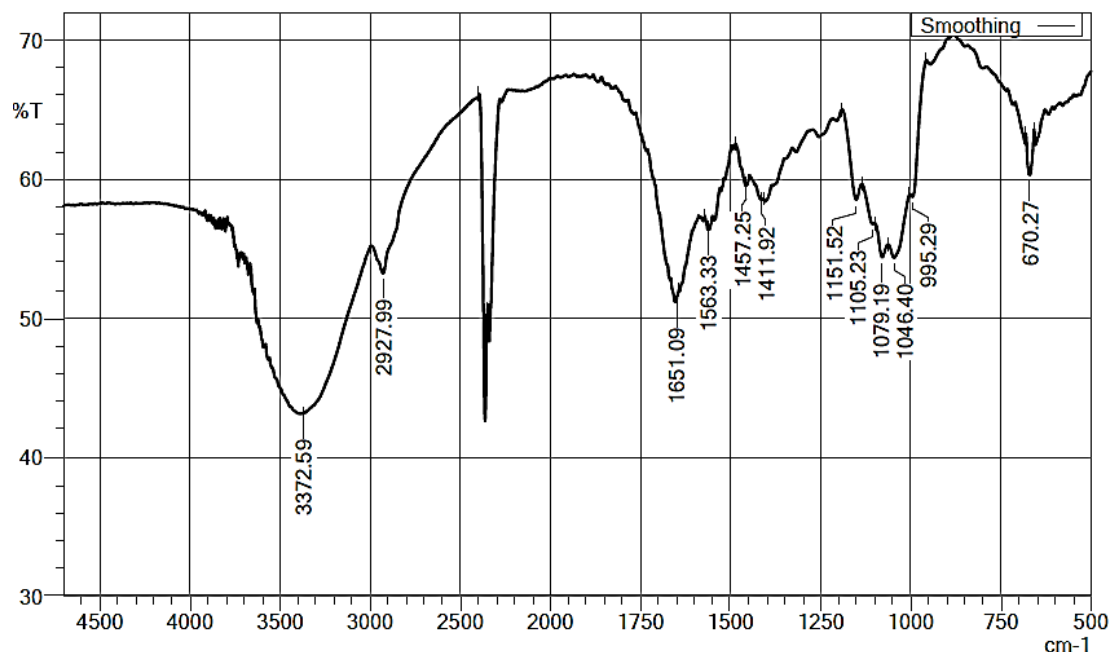


Figura 2. Espectro FTIR de *Ganoderma lucidum*

El espectro FTIR de este estudio es similar al encontrado por Choong *et al.* (2013) a partir de un producto comercial con Lingzhi 100 % natural, lo que indica que los compuestos bioactivos de las muestras empleadas en esta investigación se conservaron sin sufrir degradación durante el proceso de refrigeración del polvo de *G. lucidum* durante 6 años. El espectro FTIR del producto comercial con Lingzhi presentó bandas anchas y fuertes en la región de 3400–3300 cm^{-1} que pueden asignarse al modo de estiramiento O–H, mientras que el pico a 2925 cm^{-1} corresponde al estiramiento C–H. Igualmente, se ha reportado el pico a 2923 cm^{-1} como estiramiento de C–H en extractos crudos de *G. lucidum* (Sangeetha *et al.*, 2019). En el espectro desde 1750 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} se encontraron picos que corresponden a amida de proteína, en el que para el producto comercial con Lingzhi se reporta un pico a 1639 cm^{-1} asignado a la amida I de proteínas y un pico a 1556 cm^{-1} asignado a la amida II (Choong *et al.*, 2013).

En el espectro FTIR de esta investigación se observa un pico fuerte a 3372,59 cm^{-1} (Figura 2) que corresponde al estiramiento O–H/C–H del grupo ácido carboxílico. Los grupos alquilo (C–H) y carbonilo (C=O) se observaron a 2927,99 cm^{-1} y 1651,09 cm^{-1} , respectivamente y los picos en las regiones de 1780–800 cm^{-1} son correspondientes a amida I, amida II y proteínas.

Bandas entre 1000 y 1100 cm^{-1} indican la presencia de polisacáridos, más exactamente la banda 1080 cm^{-1} , la cual se asigna al estiramiento de CO en β -glucanos y carbohidratos (Kozarski *et al.*, 2012). En el presente estudio, en el espectro FTIR se observa una banda a 1079,19 cm^{-1} , la cual indicaría la presencia de β -glucano; similar resultado fue encontrado por Ma *et al.*, (2018) en muestras de micelios de *Ganoderma* liofilizadas que presentaron la banda en 1078 cm^{-1} , relacionada al estiramiento de β -glucanos. Además, en la región de 1780–800 cm^{-1} se puede observar una banda fuerte en 1651,09 cm^{-1} que podría corresponder a la absorción de compuestos aromáticos, probablemente de los polifenoles. Kozarski *et al.*, (2012) encontraron una banda fuerte en 1635 cm^{-1} en compuestos aislados de *G. lucidum*, la cual indicó la presencia de compuestos fenólicos, pese a que esa región es característica de las proteínas, la banda relativamente intensa se superpuso con las vibraciones de estiramiento fenólicas.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación indican que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el contenido de polifenoles de los extractos acuosos y etanólicos de *G. lucidum*, sin embargo, los extractos acuosos presentaron mayor contenido de polifenoles totales.

La concentración de polifenoles totales en extractos acuosos y etanólicos de *G. lucidum*, al igual que las bandas del espectro de absorción FTIR, resultaron comparables con los resultados de otras investigaciones por lo que se verifica la presencia de compuestos polifenólicos y de otros compuestos bioactivos como los polisacáridos (β -glucanos), lo que demuestra que la refrigeración del hongo deshidratado y molido en un periodo de seis años, influye positivamente en la estabilidad química de dichos compuestos.

REFERENCIAS

- BOH, M.B.; BEROVIC, J.; ZHANG.; BIN, L. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology Annual Review*, v. 13, n. 7, 2007, p. 265-301.
[http://doi.org/10.1016/S1387-2656\(07\)13010-6](http://doi.org/10.1016/S1387-2656(07)13010-6)
- CÖR, D.; KNEZ, Ž.; HRNČIČ, M.K. Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of *Ganoderma lucidum* terpenoids and polysaccharides: A review. *Molecules*, v. 23, n. 3, 2018, p. 1–21.
<https://doi.org/10.3390/molecules23030649>

- CHOONG, Y.K.; SUN, S.Q.; ZHOU, Q.; LAN, J.; LEE, H.L.; CHEN, X.D. Verification of *Ganoderma* (Lingzhi) commercial products by Fourier Transform infrared spectroscopy and two-dimensional IR correlation spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, v. 1069, n. 1, 2013, p. 60–72.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2013.11.049>
- HAPUARACHCHI, K.; ELKHATEEB, W.; KARUNARATHNA, S.; CHENG, C.; BANDARA, A.; KAKUMYAN, P.; HYDE, K.; DABA, G.; WEN, T. Current status of global *Ganoderma* cultivation, products, industry and market. *Mycosphere*, v. 9, n. 5, 2018, p. 1025–1052. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/9/5/6>
- HU, G.; ZHAI, M.; NIU, R.; XU, X.; LIU, Q.; JIA, J. Optimization of Culture Condition for Ganoderic Acid Production in *Ganoderma lucidum* Liquid Static Culture and Design of a Suitable Bioreactor. *Molecules*, v. 23, n. 10, 2018, e2563.
<https://doi.org/10.3390/molecules23102563>
- HUERTA, A.I.; MOLINA T.J.; GARNICA, M.G.; YAHUACA, G. Total Polyphenols and Antioxidant Activity of *Ganoderma curtisii* extracts. *Journal of Medicinal Plants Studies*, v. 4, n. 4, 2016, p. 136–141.
- KOZARSKI, M.; KLAUS, A.; NIKŠIĆ, M.; VRVIĆ, M.M.; TODORVIĆ, N.; JAKOVLJEVIĆ, D.; VAN GRIENSVEN, L.D. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 26, 2012, p. 144–153.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.02.004>
- LEE, H.R.; LIM, H. BIN. Antimutagenic and antioxidative effects of polysaccharides isolated from the water extract of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 9, n. 4, 2019, p.1–7.
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2019.90401>
- LIN, Z.; DENG, A. Antioxidative and Free Radical Scavenging Activity of *Ganoderma* (Lingzhi). In: Lin Z., Yang B. (eds) *Ganoderma and Health. Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1182, 2019, p. 271–297.
https://doi.org/10.1007/978-981-32-9421-9_12
- LIU, S.R.; ZHANG, W.R. Hyperproduction of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* using a solid seed grown in fine-powder of wheat bran and *in vitro* evaluation of the antioxidant activity of the exopolysaccharides produced. *Food Science and Biotechnology*, v. 27, n. 4, 2018, p. 1129–1136.
<https://doi.org/10.1007/s10068-018-0343-z>
- LIU, S.R.; ZHANG, W.R. Optimization of submerged culture conditions involving a developed fine powder solid seed for exopolysaccharide production by the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Food Science and Biotechnology*, v. 28, n. 4, 2019, p. 1135–1145. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0536-5>
- MA, Y.; HE, H.; WU, J.; WANG, C.; CHAO, K.; HUANG, Q. Assessment of Polysaccharides from Mycelia of genus *Ganoderma* by Mid-Infrared and Near-Infrared Spectroscopy. *Scientific Reports*, v. 8, n. 10, 2018, p. 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-18422-7>
- MINH, N.P.; NHAN, T.N.; PHA, L.P.; NGOC, N.H.; THAO, T.P. Effect of Technical Variables on the Total Phenolic and Antioxidant Activity in Cooking of Canned White Lingzhi (*Ganoderma Lucidum*) Fruit. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 11, n. 3, 2019, p. 708–711.
- MISHRA, K.K.; PAL, R.S.; ARUNKUMAR, R.; BHATT, C. Comparative study of antioxidant activities of cultivated and comparative study of antioxidant activities of cultivated and wild *Ganoderma lucidum* (W.CURT.FR.). P.karst aphylophoromycetidae from north western indian himalayas, *The Bioscan*, v. 9, n. 4, 2014, p. 1601–1605.
- OLUDEMI, T.; BARROS, L.; PRIETO, M.A.; HELENO, S.A.; BARREIRO, M.F.; FERREIRA, I.R. Extraction of triterpenoids and phenolic compounds from *Ganoderma lucidum*: optimization study using the response surface methodology. *Food & Function*, v. 9, n. 1, 2018, p. 209–226.
<https://doi.org/10.1039/c7fo01601h>
- PINYA, S.; FERRIOL, P.; TEJADA, S.; SUREDA, A. Mushrooms reishi (*Ganoderma lucidum*), shiitake (*Lentinula edodes*), maitake (*Grifola frondosa*). In *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, 2019, p. 517–526.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00068-0>

- RAŠETA, M.; KARAMAN, M.; JAKŠIĆ, M.; ŠIBUL, F.; KEBERT, M.; NOVAKOVIĆ, A.; POPOVIĆ, M. Mineral composition, antioxidant and cytotoxic biopotentials of wild-growing *Ganoderma* species (Serbia): *G. lucidum* (Curtis) P. Karst vs. *G. applanatum* (Pers.) Pat. International Journal of Food Science and Technology, v. 51, n. 12, 2016, pp. 2583–2590.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.13243>
- SANGEETHA, B.; KRISHNAMOORTHY, A.S.; AMIRTHAM, D.; SUNDARA-SHARMILA, D.J.; RENUKADEVI, P.; MALATHI, V. FT-IR Spectroscopic Characteristics of *Ganoderma lucidum* Secondary Metabolites. Journal of Applied Science and Technology, v. 38, n. 6, 2019, p. 1–8.
<https://doi.org/10.9734/cjast/2019/v38i630453>
- SANTA ROSA, C. Toxicidade oral aguda do extrato aquoso de *Ganoderma lucidum*: avaliação pré-clínica dos efeitos neurocomportamentais, hematológicos e estresse oxidativo [Ms.c Mestre em Ciências Farmacêuticas]. Belém-PA (Brasil): Universidade Federal Do Pará, programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, 2016, 63 p.
- SANTILLÁN, M.Á.; CASTAÑEDA O.A.; ÁLVAREZ D.A.; VALENZUELA G.R.; ROMERO B.L.; TORRES J.M. Estudio preliminar de la actividad antioxidante de tres especies del género *Ganoderma* (Polyporaceae) nativas del estado de Hidalgo, México. Scientia Fungorum, v. 46, 2017, p. 37–45.
<https://doi.org/10.33885/sf.2017.46.1175>
- SHARIF, S.; SHAHID, M.; MUSHTAQ, M.; AKRAM, S.; RASHID, A. Wild mushrooms: A potential source of nutritional and antioxidant attributes with acceptable toxicity. Preventive Nutrition and Food Science, v. 22, n. 2, 2017, p. 124–130.
<https://doi.org/10.3746/pnf.2017.22.2.124>
- SUDHEER, S.; ALZORQI, I.; MANICKAM, S.; ALI, A. In Mérillon JM., Ramawat K. (eds) Bioactive Molecules in Food. Bioactive Compounds of the Wonder Medicinal Mushroom “*Ganoderma lucidum*”. Reference Series in Phytochemistry, 2019, p. 1863–1893.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_45
- UDDIN, M.; TALUKDER, R.I.; SARKAR, M.K.I.; RAHMAN, T.; PERVIN, R.; RAHMAN, M.; AKTHER, L. Effect of Solvents on Phytochemicals Content and Antioxidant Activity of *Ganoderma lucidum*. The Open Microbiology Journal, v. 13, n. 1, 2019, p. 10–15. <https://doi.org/10.2174/1874285801913010010>
- VELJOVIĆ, S.; NIKIĆEVIĆ, N.; NIKŠIĆ, M. Medicinal Fungus *Ganoderma lucidum* as Raw Material for Alcohol Beverage Production. Woodhead Publishing, v. 7, 2019, p. 161–197.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815269-0.00006-4>
- WANG, C.; LIU, X.; LIAN, C.; KE, J.; LIU, J. Triterpenes and Aromatic Meroterpenoids with Antioxidant Activity and Neuroprotective Effects from *Ganoderma lucidum*. Molecules, v. 24, n. 23, 2019, p. 1–11.
<https://doi.org/10.3390/molecules24234353>
- WU, D.T.; DENG, Y.; CHEN, L.X.; ZHAO, J.; BZHELYANSKY, A.; LI, S.P. Evaluation on quality consistency of *Ganoderma lucidum* dietary supplements collected in the United States. Scientific Reports, v. 7, n. 1, 2017, p. 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-06336-3>
- WU, Y.; WANG, D. A New Class of Natural Glycopeptides with Sugar Moiety Dependent Antioxidant Activities Derived from *Ganoderma lucidum* Fruiting Bodies. Journal of Proteome Research, v. 7, 2009, p. 241–245.
<https://doi.org/10.1021/pr800554w>
- ZHAO, C.; ZHANG, C.; XING, Z.; AHMAD, Z.; LI, J.S.; CHANG, M.W. Pharmacological effects of natural *Ganoderma* and its extracts on neurological diseases: A comprehensive review. International Journal of Biological Macromolecules, v. 121, 2019, p. 1160–1178. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.076>

Producción, calidad de leche y análisis económico de vacas holstein suplementadas con ensilaje de botón de oro (*Tithonia diversifolia*) o ensilaje de maíz*

Milk production and quality and economic analysis of Holstein cows, supplemented with wild sunflower silage (*Tithonia diversifolia*) or maize silage

ANGULO-ARIZALA, JOAQUÍN¹; NEMOCÓN-COBOS, ANA-MARÍA²; POSADA-OCHOA, SANDRA-LUCÍA³; MAHECHA-LEDESMA, LILIANA⁴

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 17 julio 2020.

Aprobado para publicación: 18 abril 2021.

* Proyecto de investigación de origen: "Evaluación de recursos alimenticios alternativos en sistemas de lechería especializada". Financiación: Departamento Académico de Haciendas y Sostenibilidad del grupo GRICA (convocatoria ES84180130 2018-2019) Universidad de Antioquia. Finalización: diciembre 15 de 2020

1 Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias (GRICA). Dr. Ciencias Animales. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-3352-8795>

2 Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias (GRICA). Zootecnista. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-4300-6843>

3 Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias (GRICA). Dr. Ciencias Animales. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-4615-0552>

4 Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias (GRICA). Dr. Agricultura y Medio Ambiente. Medellín, Colombia. <http://orcid.org/0000-0003-3377-8399>

Correspondencia: joaquin.angulo@udea.edu.co

RESUMEN

La ganadería de leche del trópico alto colombiano utiliza una alta relación de forraje concentrado en la dieta diaria, la cual, en la mayoría de los casos, deja márgenes económicos poco favorables al productor siendo necesaria la búsqueda de alternativas para la alimentación que ayuden a solventar esta problemática. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la producción, calidad de la leche y hacer un análisis económico de vacas Holstein, suplementadas con ensilaje de botón de oro (EBO) o ensilaje de maíz (EMA). Se seleccionaron 10 vacas Holstein con características homogéneas y se conformaron dos grupos: un grupo fue suplementado con el tratamiento EMA y el otro con EBO, en un diseño de sobrecambio. Se evaluó la producción de leche/vaca/día sin ajustar y ajustada al 4 % de grasa, la calidad composicional de la leche (% y kg/vaca/día), la eficiencia alimenticia (EA), la eficiencia energética (EE) y se realizó un análisis económico. No hubo diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) en el consumo de materia seca de ensilaje entre tratamientos, pero sí en la producción de leche, los kg de grasa y proteína/vaca/día, y en la EA ($p < 0,05$), con diferencia a favor de EBO. Así mismo, el costo de producción del litro de leche y la diferencia ventas-costos por vaca/día estuvieron a favor del tratamiento EBO. Los resultados sugieren que el EBO es una alternativa viable productiva y económicamente, en la suplementación de vacas lactantes en el trópico alto colombiano.

ABSTRACT

The dairy farming in the Colombian highland tropic uses a high ratio of concentrate forage in the daily diet, which, in most cases, leaves unfavorable economic margins for the producer, making it necessary to search alternatives for feeding that help to solve this problem. The aim of this work was to evaluate the milk production and quality, and to make an economic analysis of Holstein cows, supplemented with wild sunflower silage (EBO) or corn silage (EMA). Ten Holstein cows with homogeneous characteristics were selected and two groups were formed: one group was supplemented with EMA treatment and the other with EBO, in an over-exchange design. The milk production/cow/day without adjusting and adjusted to 4 % fat, the compositional quality of the milk (% and kg/cow/day), the feed efficiency (EA), the energy efficiency (EE) and an economic analysis was carried out. There were no statistically significant differences ($p > 0,05$) in the consumption of silage dry matter between treatments, but there were in the milk production, the kg of fat and protein/cow/day, and in the EA ($p < 0,05$), with a difference in favor of EBO. Likewise, the cost of production per liter of milk and the difference between sales and costs per cow/day were

PALABRAS CLAVE:

Análisis económico; Arbustos; Calidad de leche; Conservación de forraje; Ensilaje; Producción de leche; Producción sostenible; Productividad; Sostenibilidad; Suplementación animal

KEYWORDS:

Economic analysis; Shrubs; Milk quality; Forage conservation; Silage; Milk production; Sustainable production; Productivity; Sustainability; Animal supplementation.

Cómo citar este artículo: ANGULO-ARIZALA, JOAQUÍN; NEMOCÓN-COBOS, ANA-MARÍA; POSADA-OCHOA, SANDRA-LUCÍA; MAHECHA-LEDESMA, LILIANA. Producción, calidad de leche y análisis económico de vacas holstein suplementadas con ensilaje de botón de oro (*Tithonia diversifolia*) o ensilaje de maíz. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 20, n. 1, 2022, p. 27-40. Doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1535>

in favor of the EBO treatment. The results suggest that EBO is a productive and economically viable alternative in the supplementation of lactating cows in the Colombian highland tropic.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción bovina en Colombia basan la alimentación animal en el consumo de forrajes bajo pastoreo, lo cual tiene alta dependencia de la variabilidad climática, toda vez que durante la época seca se reduce la oferta de alimento, por lo que es necesario identificar, evaluar y aplicar alternativas como el ensilaje, encaminadas a la conservación de forrajes durante la época en la que se concentra la producción vegetal, en pro de asegurar alimento de buena calidad durante todo el ciclo productivo. El ensilaje representa una de las prácticas de mayor popularidad en los sistemas de producción de lechería especializada, usado tanto para la sustitución o complementación de los alimentos balanceados (Lazzarini *et al.*, 2019; Ramírez-Rivera *et al.*, 2019). Durante el proceso de ensilado, los carbohidratos solubles del forraje se fermentan y con la participación de bacterias ácido-lácticas, se reduce el pH del medio, con lo cual se inhibe el desarrollo de microorganismos indeseables, conservando calidad y palatabilidad del material (Borreani *et al.*, 2018). Considerando el potencial nutricional de algunas especies forrajeras del trópico tales como *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Cratylia argentea*, entre otras (Castro-Montoya and Dickhoefer, 2018), el ensilaje es una alternativa viable para diversificar el plan de alimentación y para mejorar la productividad y el margen de rentabilidad.

El ensilaje de maíz es un alimento muy utilizado en los sistemas de producción lechera, con un valor energético y proteico que fluctúa entre 2,5 y 2,79 Mcal EM/kg materia seca (MS) y 6,3 a 12,5 % proteína bruta (PB), respectivamente (Agrosavia, 2013). La inestabilidad en el precio y su competencia con la alimentación humana, inducen a buscar alternativas económicas y sostenibles que no perjudiquen la producción ni la calidad de la leche. Existen otras especies forrajeras, aún poco evaluadas para la nutrición de bovinos, pero extremadamente adaptadas a las condiciones edafoclimáticas tropicales, con potencial para la alimentación de rumiantes y con metabolitos secundarios que pueden influenciar beneficios nutricionales y mitigación de emisiones de metano entérico (Sandoval-Pelcastre *et al.*, 2020). Dentro de estas especies se destaca el botón de oro (*Tithonia diversifolia*) que se caracteriza por su rápido crecimiento y la acumulación de nitrógeno en sus hojas, como las leguminosas. En el ensilaje de botón de oro, Betancourt *et al.*, (2017) registraron 22,1 % PB, 16,4 % de Fibra Neutro Detergente (FND) y 43,9 % de carbohidratos no estructurales (CNE). En los últimos años, con la introducción de bancos forrajeros y sistemas silvopastoriles en los sistemas de producción de leche, la utilización de esta planta ha aumentado (Braun *et al.*, 2016), no obstante, existe poca información sobre los resultados productivos derivados de su empleo en forma ensilada. El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción y calidad composicional de la leche, y hacer un análisis económico de la producción de leche de vacas Holstein consumiendo dos tipos de ensilaje, de maíz (*Zea mays*) o ensilaje de botón de oro (*Tithonia diversifolia*).

MÉTODO

Localización

El trabajo experimental se desarrolló en la hacienda La Montaña (Universidad de Antioquia), ubicada en el municipio de San Pedro de los Milagros (15 °C y 2.350 m.s.n.m.), en una zona de bosque húmedo montano bajo (bh-MB).

Tratamientos

Se evaluó la respuesta productiva de los animales suplementados con la misma cantidad de materia seca proveniente de dos ensilajes, botón de oro (*Tithonia diversifolia*) (EBO) y maíz (*Zea mays*) (EMA) (ensilaje comercial). La dieta base estuvo compuesta por pasto *Rye-grass sp.* de 30 días de rebrote, en pastoreo, maíz extruido y alimento balanceado. La suplementación se hizo en función de los requerimientos nutricionales de cada animal. El ensilaje fue ofrecido una sola vez en el día a las vacas, antes del ordeño de la tarde, en el corral de espera.

Preparación ensilaje de botón de oro

Se utilizaron plantas enteras de botón de oro de 70 días de edad, cosechadas a 60 cm de altura, se pre-marchitaron por 24 horas acorde con la metodología descrita por Navarro *et al.*, (2006), se picaron utilizando una pica pasto comercial, a un tamaño de 4 cm aproximadamente, y se almacenaron en canecas de 130 kg de capacidad. Para la preparación, se dispusieron capas de forraje en las canecas, seguidas de la adición de una mezcla líquida preparada previamente, denominada aditivo, estaba compuesta por el inóculo activado y melaza diluida: cada capa fue compactada manualmente. El inóculo se preparó de la siguiente manera: se mezcló 1 L del inóculo BIO-RENOVA® (*Lactobacillus paracasei spp*, *streptomyces scabies*, *Saccharomyces cerevisiae spp*) en concentraciones superiores a 100.000.000 unidades formadoras de colonia por mililitro de solución (10^8 UFC/mL) con 1 L de activador de la misma referencia y 18 L de agua, esa mezcla se denominó inóculo activado. Por cada litro de la mezcla anterior (inóculo activado), se adicionaron 15 kg de melaza y 15 L de agua, según recomendación del fabricante. El aditivo anterior sirvió para la preparación de una tonelada de ensilaje de botón de oro. El ensilaje fue ofrecido a los animales después de un mes de fermentación.

Características de los animales

Se utilizaron 10 vacas Holstein-Friesian. Se conformaron dos grupos de animales, cada uno de cinco unidades experimentales, buscando la mayor homogeneidad posible en producción promedio de leche en los últimos siete días (PL), porcentaje de proteína y grasa láctea, días en leche (DEL), número de partos y peso vivo (PV). La evaluación tuvo una duración total de 50 días, con dos periodos de 25 días cada uno, con 10 días de adaptación a la dieta y 15 días de evaluación. En el primer periodo, la mitad de las unidades experimentales recibieron el tratamiento EBO y, posteriormente, durante el segundo período, recibieron el tratamiento EMA. La otra mitad de las unidades experimentales recibió los tratamientos en orden inverso. Las características de los animales de cada tratamiento se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Características de los animales y asignación de secuencias de evaluación.

Grupo	Peso	Número de Partos ¹	Días en Leche	Producción de leche (L/vaca/día) ²	Grasa Láctea	Proteína láctea	Secuencia
	(kg)				(%) ²	(%) ²	
1	544,30 ± 27,15	2,9 ± 1,05	160,7 ± 35,10	28,9 ± 2,55	3,35 ± 0,45	3,0 ± 0,20	EBO-EMA
2	540,95 ± 38,15	2,9 ± 1,05	158,85 ± 35,3	28,7 ± 3,35	3,15 ± 0,50	3,0 ± 0,20	EMA-EBO

¹ Mediana

² Promedio de los últimos siete días antes de ingresar al experimento.

Manejo nutricional

Se obtuvo la ración de cada animal a partir de los requerimientos de proteína cruda y energía neta de lactancia (EN_L) descritos por el NRC (National Research Council, NRC, 1989) (en promedio 2,8 kg proteína; 29 Mcal EN_L ; 108,5 g Ca y 69 g P por vaca por día) y la composición química (determinada por NIRS) de los alimentos disponibles (Cuadro 2). El contenido de EN_L de los alimentos se calculó a partir de las siguientes ecuaciones (Buxadé, 1995):

Cuadro 2. Contenido nutricional de los componentes de la dieta.

Ítem	Rye-grass	Ensilaje Maíz	Maíz Extruido	Alimento Balanceado	Ensilaje Botón
% MS	11,8	22,7	85,0	88,0	15,0
% PB	26,0	13,1	7,1	14,0	22,4
ENL (Mcal/kg)	1,45	1,4	1,92	1,8	1,3
% FDN	41,9	62,3	12,2	18,8	37,7
% Ca	1,06	1,2	0,03	1,78	2,73
% P	0,3	0,9	0,25	0,34	0,4

MS: materia seca; PB: proteína bruta; ENL: energía neta de lactancia; FDN: fibra detergente neutra; Ca: calcio; P: fósforo.

$$EN_L \text{ Concentrado} = 0,677 \times ED - 0,359 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

ENL es la energía neta de lactancia del concentrado; ED es la energía digestible del concentrado, en Kcal.

$$3,8 \text{ Mcal EB} = 3,22 \text{ Kcal ED} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

EB es la energía bruta del concentrado, en Mcal; ED es la energía digestible del concentrado, en Kcal.

$$EN_L \text{ Gramíneas} = 2,86 - 0,0262 \times FDN \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde:

ENL es la energía neta de lactancia de la gramínea; FDN es la fibra en detergente neutro de la gramínea.

$$EN_L \text{ No Gramíneas} = 2,23 - 0,0216 \times FDN \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

ENL es la energía neta de lactancia de la no gramínea; FDN es la fibra en detergente neutro de la no gramínea.

El suministro de ensilaje fresco fue de 4 kg/animal/día para EBO y 3 kg/animal/día para EMA, equivalentes a un aporte igual de materia seca de 450 g/animal/día. El menor contenido de materia seca del ensilaje de botón de oro respecto al ensilaje de maíz, conllevó al suministro de 1 kg adicional de material fresco del primero. La cantidad de ensilaje ofertada fue definida con base en la disponibilidad existente de forraje. Los animales permanecieron en pastoreo de pasto Rye-grass y fueron manejados en pastoreo rotacional con 1 día de ocupación por franja y 30 días de descanso. Se realizó aforo de pastura antes del ingreso de los animales a pastoreo y se siguió el método del doble muestreo (Haydock and Shaw, 1975). La cantidad de materia seca promedio ofertada por animal por día de pasto en el potrero fue de 22,5 kg (se consideró un 30 % de desperdicio), de alimento balanceado 3,26 kg y de maíz extruido 1,96 kg. El alimento balanceado y el maíz extruido se ofertaron durante los dos ordeños (05 horas y 14 horas). Los ensilajes (EBO y EMA) solo se suministraron 30 minutos antes del ordeño de la tarde. El alimento balanceado fue preparado en la planta de concentrado de la misma finca en donde

se desarrolló el experimento y estaba compuesto por maíz extruido (29 %), maíz amarillo (45 %), melaza (4,8 %), DDGS Golden (6,7 %), harina de pescado (2,9 %), torta de Soja (4,8 %) y 6,8 % de otros ingredientes (fuente de calcio, sodio, fósforo, y sal mineralizada).

VARIABLES EVALUADAS

Consumo de materia seca total. Correspondió a la suma del consumo de materia seca de forraje, ensilaje, maíz extruido y alimento balanceado. Al interior de cada período se realizaron dos pruebas individuales de consumo voluntario de materia seca de forraje (Rye-grass) en pastoreo, utilizando una adaptación del método de doble muestreo (Haydock and Shaw, 1975) de forma individual dentro del potrero. Para ello, a cada animal se le asignaron 64 m² durante 24 horas, esta área consideró un 40 % adicional para suplir desperdicio, siendo únicamente movilizados para el ordeño. En el potrero, la separación entre los animales se realizó con cinta eléctrica; se determinó la disponibilidad de forraje al ingreso y salida de cada área, calculando el consumo individual de forraje verde por diferencia. Simultáneamente, se tomaron muestras del pasto para determinar el contenido de humedad y hallar el consumo de materia seca. El consumo de los restantes alimentos (ensilaje de botón de oro, ensilaje de maíz y alimento balanceado) se determinó a partir de la ingestión individual y su contenido de materia seca.

Producción y calidad de leche. La producción de leche individual fue diariamente (am–pm) cuantificada usando medidores True-test Durespo, (Itagüí, Colombia). Al inicio y al final de cada periodo experimental, en ambos ordeños (am – pm) se tomó una muestra de leche por animal, es decir dos muestras de leche por día, las cuales fueron enviadas al laboratorio de calidad de leche de la Universidad de Antioquia para determinar proteína, grasa, lactosa, nitrógeno ureico en leche (NUL y sólidos totales (valores expresados en %) mediante el empleo de MilkoScan FT+ (transformación de Fourier a partir de infrarrojo) (Foss, Hillerød, Dinamarca). La producción de grasa, proteína, lactosa y sólidos totales (kg) se obtuvo del producto entre la producción de leche (kg) y su composición analizada (%).

La calidad sanitaria se evaluó a partir del recuento de células somáticas (RCS) valores expresados en miles de células por mililitro (mL) por citometría de flujo (Fossomatic™ FC, Foss Electric, Hillerød, Dinamarca).

Eficiencia alimenticia y eficiencia energética. Con base en el desempeño productivo y el consumo de materia seca total, se determinó la eficiencia alimenticia (EA) expresada en kg de leche producida, corregida al 4 % de grasa por cada kg de materia seca consumida. Igualmente, la eficiencia energética (EE) se valoró a partir de la relación consumo de EN_L/ producción de leche corregida al 4 % de grasa.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se colectaron bajo un diseño de sobrecambio bajo secuencia AB/BA para los tratamientos EBO y EMA, asignados de forma aleatoria a dos grupos de vacas (G1 y G2) con periodos de adaptación y evaluación definidos. Los datos se analizaron empleando un modelo mixto mediante la librería lmer del programa lme4 (Bates *et al.*, 2015), en el software estadístico R-Project. Para las variables correspondientes a la calidad composicional de la leche (grasa, proteína, nitrógeno ureico en leche y lactosa), y la determinación del consumo de forraje (base seca), el análisis consideró como efectos fijos el tratamiento (EBO y EMA) y como efectos aleatorios (bloques) el factor animal y período. La calidad higiénica de la leche (células somáticas) se analizó en un modelo generalizado que consideró los mismos efectos fijos y aleatorios previamente descritos bajo distribución Poisson con función de enlace log. Con relación a las variables productivas (kg de leche por día y corregida por grasa), dado que se obtuvo registro diario de producción de leche durante cada período de evaluación, además del tratamiento, se consideró como efecto fijo el día de evaluación y la interacción tratamiento por día y como efectos aleatorios, el animal y el período. En ambos casos, el análisis consideró un error tipo I de 0,05 y evaluación de residuales bajo pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (test Bartlett). En caso de rechazo de la hipótesis de igualdad de promedios, se empleó la prueba de Tukey para la separación de medias.

Análisis económico

Para el cálculo del costo de producción del ensilaje de botón de oro se tuvieron en cuenta los costos de fertilización y la mano de obra requerida durante el periodo de recuperación de las plantas, además, se midió el tiempo requerido para la elaboración del ensilaje, incluyendo corte, acarreo, picado del material y proceso de ensilado, y se consideró el costo de los materiales requeridos como canecas plásticas y el inóculo BIO-RENOVA®. Igualmente, se sumó el consumo de energía eléctrica correspondiente a la pica pasto. Para el ensilaje de maíz, el costo que se utilizó fue el valor de compra comercial.

También, se calculó el costo de producción del litro de leche para cada tratamiento, teniendo en cuenta la depreciación de infraestructura y equipos (máquina de ordeño y tanque de enfriamiento), la mano de obra correspondiente a los ordeñadores y el costo de materiales y servicios a terceros requeridos para llevar a cabo el ordeño (Álvarez-Cardona and Zapata-Sánchez, 2011). Para completar el costo, se tuvo en cuenta la ración de alimento compuesta por alimento balanceado, maíz extruido, pasto rye-grass y ensilaje de maíz o botón de oro dependiendo del tratamiento, alimentos a los cuales se les realizó una estimación del costo de producción para determinar el valor por kilogramo y así sumarlo a los costos de producción del litro de leche. Estos valores se dividieron entre la producción diaria del animal para obtener el costo por litro de leche.

Para calcular el pago por litro de leche, se tuvo en cuenta la composición de la leche y el sistema de pago de leche cruda al proveedor, establecido por la resolución 000017 del 2012 del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR, 2012), obtenido para cada animal.

El precio de venta del litro de leche se multiplicó por los litros producidos por vaca por día, para obtener los ingresos totales por vaca/día por venta de leche. Finalmente se restó el precio de venta de leche por vaca/día y el costo de producción de leche por vaca por día. Esta diferencia se extrapoló a una estimación por 50 vacas en producción promedio que puede tener un hato y a un cálculo por mes.

RESULTADOS

Consumo de materia seca total

Los resultados de consumo de materia seca y de nutrientes de cada tratamiento se presentan en el Cuadro 3. Se encontró un consumo de materia seca del pasto, de materia seca total, de proteína bruta (PB) y de energía neta de lactancia similar entre tratamientos ($p > 0,05$).

Cuadro 3. Consumo de materia seca y nutrientes en cada tratamiento.

Variables	Tratamientos		p-valor
	EBO	EMA	
Consumo de materia seca (kg/día)			
Rye-grass	13,52 ± 1,43	13,49 ± 1,43	0,85
Ensilaje	0,45	0,45	-
Maíz extruido	1,96 ± 0,78	1,96 ± 0,78	-
Alimento balanceado	3,26 ± 0,79	3,26 ± 0,79	-
Total	19,40 ± 1,24	19,04 ± 1,23	0,36
Consumo de nutrientes			
PB (kg/día)	4,27 ± 0,36	4,14 ± 0,36	0,13
ENL (Mcal/día)	30,15 ± 1,76	29,59 ± 1,73	0,28

EBO: ensilaje de botón de oro; EMA: ensilaje de maíz; PB: proteína bruta; ENL: energía neta de lactancia; p valor $\leq 0,05$ indica diferencia estadística significativa entre tratamientos para la variable especificada en cada columna.

Al comparar los consumos en materia seca, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre vacas suplementadas con EBO y EMA, a pesar de las diferencias encontradas en el contenido de FDN entre ensilajes (Cuadro 2), siendo el contenido de EMA mayor que el de EBO. La oferta de ambos ensilajes justo antes de cada ordeño y la cantidad ofrecida, pudo incidir en que las vacas tuvieran un consumo total de ambos ensilajes, independiente de su contenido de FDN. El contenido de FDN encontrado en el EMA (67 %) fue superior a lo reportado por Morand y Balbi (2020) (46-58 %); estos autores mencionan que el contenido nutricional del ensilaje de maíz puede variar dependiendo de las condiciones agroclimáticas, la edad de cosecha, el material utilizado, entre otras. El bromatológico obtenido para EMA en este trabajo, además de indicar su alto contenido de FDN, muestra la incertidumbre en calidad, a la que puede enfrentarse un productor al depender de un ensilaje comercial, lo cual va a estar afectado por las condiciones y necesidades al momento de adquirirlo, lo cual no le permite asegurar siempre la calidad deseada.

En el botón de oro, Rivera *et al.* (2021) han reportado presencia de taninos en concentraciones que oscilan entre 5,4 y 37,7 g/kg de MS de taninos totales, dependiendo de la parte de la planta utilizada. Estos metabolitos secundarios han sido relacionados con bajo consumo del forraje (Vasta *et al.*, 2019), sin embargo, el consumo encontrado por autores como Mejía-Díaz *et al.*, (2017), muestran que el contenido de taninos y saponinas del botón de oro no afectan negativamente su consumo; estos autores reportan un consumo de 0,58 kg MS/animal/día de esta forrajera al ser ramoneada por vacas Holstein en sistemas silvopastoriles y encontraron consumos hasta de 2,2 kg MS/animal/día, equivalentes a una inclusión del 27 % de la dieta, atribuyendo las limitaciones en el consumo, a la oferta de esta planta en el potrero y no a su palatabilidad. De igual forma, Holguín-Castaño *et al.* (2018) empleando ovinos, compararon el consumo voluntario y el desempeño productivo de ensilaje basados en *Cenchrus purpureus* solo, y con el reemplazo del 33 % de botón de oro, sin encontrar diferencia significativa en la ingestión de materia seca. En el presente trabajo no se cuantificó el contenido de estos metabolitos secundarios, no obstante, de acuerdo con el consumo obtenido, la cantidad que pudiera estar presente no tuvo efecto negativo sobre el consumo del ensilaje.

El consumo de pasto en el presente experimento coincide con el reportado por Mejía-Díaz *et al.*, (2017) en un sistema silvopastoril de ramoneo de botón de oro y pasto kikuyo, al ser evaluado por el método agronómico (13,3 kg/animal/día) pero levemente inferior al ser evaluado con cromo como indicador externo (14,7 kg/animal/día).

Producción y calidad de leche

En el Cuadro 4 se puede observar la producción de leche por vaca por día, la producción de leche corregida al 4 % de grasa y la eficiencia alimenticia (EA), las cuales fueron mayores ($p \leq 0,05$) en las vacas suplementadas con botón de oro (EBO) mientras que no hubo diferencia en la eficiencia energética (EE) entre tratamientos ($p > 0,05$). Hubo efecto significativo del día de muestreo en la producción de leche y no hubo interacción día x tratamiento.

Cuadro 4. Variables productivas obtenidas en cada tratamiento durante el experimento.

Tratamiento	Leche kg	Leche 4%G	EA (kg leche/kg MS)	EE (Mcal/kg leche)
EBO	27,89	25,20	1,34 a	0,88
EMA	27,413	24,03	1,26 b	0,834
Rcme	2,598	0,42	0,037	0,001
p-valor T	0,05	0,0007	0,0034	0,12
P-valor Día	0,002	0,016		
P-valor TxD	0,98955	0,999		
P-valor Peso ¹	0,309	0,179	0,678	0,513
p-valor NP ¹	0,277	0,494	0,104	0,109
p-valor CC ¹	0,32	0	0,84	0,521
P-valor Pdn4% ¹	0,006	0		
P-valor Gc ¹	0,023	0,003		

Rcme: raíz del cuadrado medio del error; EA: eficiencia alimenticia (kg de leche producida, corregida al 4 % de grasa/ kg de materia seca consumida); EE: eficiencia energética: consumo de EN_L/ producción de leche corregida al 4 % de grasa; D: día; NP: número de partos; cc: condición corporal; Pdn 4 %: producción de leche corregida al 4 %; Gc: % grasa; pvalor T $\leq 0,05$ indica diferencia estadística significativa entre tratamientos para la variable especificada cada columna. ¹Covariables.

La calidad de la leche fue similar entre tratamientos ($p > 0,05$) (Cuadro 5). Sin embargo, al analizar la grasa y la proteína de la leche en kilogramos producidos, teniendo en cuenta, tanto la producción de leche sin corregir al 4 % de grasa como la corregida, los resultados fueron mayores en el tratamiento EBO ($p \leq 0,05$) (Cuadro 6).

Cuadro 5. Variables de calidad de leche obtenidas en cada tratamiento durante el experimento.

Tratamiento	Grasa (%)	Proteína (%)	NUL (mg/dL)	Lactosa (%)	RCS (1000/mL)
EBO	3,510	3,046	14,010	4,786	73,674
EMA	3,308	3,060	13,982	4,795	78,750
Rcme	0,494	0,065	1,242	0,006	5,080
p-valor T	0,435	0,636	0,964	0,155	0,507
p-valor Del ¹	0,148	0,238		0,810	0,653
p-valor NP ¹		0,816		0,664	
p-valor Pc ¹		0,000			
p-valor MUNC ¹			0,125		
p-valor Pdn4% ¹				0,000	
p-valor Lactc ¹				0,309	
p-valor RSCsc ¹²					0,046
p-valor kg Lc ¹					0,640

Rcme: raíz del cuadrado medio del error; T: tratamiento; Del: días en leche; NP: número de partos; Pc: proteína inicial; NUL: nitrógeno ureico en leche inicial; Pdn 4%: producción de leche corregida al 4 %; Lactc: lactosa inicial; RSCsc: recuento de células somáticas inicial; Lc: lactosa inicial; p valor $T \leq 0,05$ indica diferencia estadística significativa entre tratamientos para la variable especificada cada columna. ¹Covariables. ²Modelo generalizado $\text{Chi}^2 > P$

Cuadro 6. Calidad composicional de la leche (en kg).

Variable	Tratamientos		p-valor
	EBO	EMA	
(kg) Grasa LNC	0,8889 a	0,861 b	< 0,0001
(kg) Grasa LC	0,8157 a	0,8036 b	0,0054
(kg) Proteína LNC	0,8234	0,8131	0,4888
(Kg) Proteína LC	0,7641	0,7297	0,0805
(kg) Lactosa LNC	1,2907	1,2788	0,5166
(Kg) Lactosa LC	1,2055	1,1573	0,2323

EBO: ensilaje botón de oro; EMA; ensilaje de maíz; Prot: Proteína; Lac: Lactosa; LNC: Leche no corregida por grasa; LC: Leche corregida al 4 % de grasa. P valor $T \leq 0,05$ indica diferencia estadística significativa entre tratamientos para la variable especificada cada columna.

Considerando que las vacas suplementadas con ensilaje de botón de oro produjeron más litros de leche por kilogramo de materia seca consumida, teniendo el mismo consumo energético y proteico que las vacas suplementadas con ensilaje de maíz, los resultados indican una mejor eficiencia en el uso y partición de nutrientes en las vacas suplementadas con ensilaje de botón de oro. De acuerdo con Norris *et al.* (2018), las diferencias en el uso y partición de nutrientes entre dietas podrían estar relacionadas con el efecto de los taninos en la eficiencia de uso de energía y proteína, derivadas de la disminución en las emisiones de metano y mejor aprovechamiento proteico en duodeno, respectivamente. Jamarun *et al.* (2020) reportaron que la inclusión del 64 % de *T. diversifolia* influyó positivamente en la calidad composicional de la proteína en cabras cruzadas de la raza Etawa. Así mismo, Cardona-Iglesias *et al.* (2019a) demostró mediante modelos de simulación de emisiones de metano que el consumo de *T. diversifolia* en sistemas silvopastoriles de trópico de altura puede reducir hasta un 8,8 % la cantidad de CH_4 por litro de leche, comparado con un sistema de monocultivo de gramíneas. Lo anterior se puede soportar por el efecto de los metabolitos secundarios que modifican la fermentación ruminal y la población de metanógenos, protozoarios o desvían los iones hidrógeno de los metanógenos (Vasta *et al.*, 2019), por consiguiente, menores pérdidas en metano implican menores pérdidas energéticas. De acuerdo con Galindo-Blanco *et al.* (2018), los compuestos secundarios del botón de oro participan activamente en la dinámica ruminal, contribuyendo a la reducción de protozoos y archaeas metanógenas (Borreani *et al.*, 2018), esta condición favorece mayor acumulación de nitrógeno ruminal,

lo cual, aunado a un mejor perfil de ácidos grasos volátiles cuando las vacas pastorean botón de oro, posibilitan a un mejor desempeño productivo. Así mismo, se debe considerar el efecto que podría haber ejercido la diferencia a favor del contenido de FDN en EBO, lo cual estaría relacionado con una mayor digestibilidad comparado con el EMA utilizado. La diferencia en el contenido de calcio y fósforo entre ensilajes también podría esperarse que ejerciera una diferencia en la producción de leche. Según Yanapa-Sanga (2019), la concentración de calcio y fósforo en la dieta ha sido relacionada con el nivel sérico de estos minerales, y en el caso del calcio, con una correlación positiva y significativa con la producción de leche, más no con el de fósforo. En el presente trabajo, EBO presentó un mayor contenido de Calcio y un menor contenido de fósforo que EMA; aunque en el balance, ambas dietas llenaron requerimientos de los animales en cuanto a Calcio y Fósforo.

Mahecha *et al.* (2007) suplementando vacas mestizas F1 Holstein x cebú con forraje de botón de oro como reemplazo parcial del concentrado hasta niveles del 35 %, no encontraron diferencias significativas en la calidad composicional de la leche. Así mismo, Arias-Gamboa *et al.* (2018) encontró que la sustitución del 25 % de la materia seca del alimento concentrado por forraje de botón de oro, no afectó la composición de la leche en vacas Jersey (en porcentaje), pero generó un ahorro del 9,06 % por la disminución de los costos de la suplementación. Sin embargo, al igual que en el presente trabajo, Cardona-Iglesias *et al.* (2019b) reportaron diferencia significativa en la calidad de la leche de vacas Holstein, con porcentajes de proteína (3,0 vs 2,89 %), nitrógeno ureico en leche (12,3 vs 14,7 mg/dL) y recuento de células somáticas (67,26 vs 125,35 x1000/mL), en un sistema silvopastoril de kikuyo (*Cenchrus clandestinum*) y arbustos de botón de oro versus un monocultivo de kikuyo con fertilización nitrogenada, donde la dieta forrajera estuvo conformada por 17,5 % botón de oro y 82,5 % pasto kikuyo; el sistema silvopastoril también favoreció la producción de leche.

Análisis económico

El análisis económico favoreció al tratamiento EBO tanto en el costo por litro de leche, como en los costos totales de producción y venta de leche por vaca día, reflejándose en una mayor diferencia ventas-costos a favor de EBO (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis económico de los tratamientos.

Tratamiento	Costo del kg de ensilaje fresco \$ (USD)	Costo suplementación/ animal/día \$ (USD)	Costo de producción de 1 L de leche (\$)	Producción de leche, kg/vaca/día	Costo de producción leche diaria por vaca \$ (USD)	Precio venta de kg de leche \$ (USD)	Precio venta de leche producida por animal por día \$ (USD)	Diferencia venta-costos \$/vaca/día (USD/vaca/día)	Diferencia ventas-costos /x 50 vacas/mes
EBO	1381 (0,04)	7.671 (2,39)	838 (0,26)	27,89	23.358 (7,28)	\$ 1.163 (0,36)	32.406 (10,11)	9.048 (2,82)	13.571.663 (4.232)
EMA	3502 (0,11)	8.028 (2,50)	856 (0,27)	27,413	23.488 (7,32)	\$ 1.163 (0,36)	31.935 (9,96)	8.447 (2,63)	12.670.545 (3.951)

¹ Precio al que sale la elaboración del ensilaje en la finca, obteniendo el forraje del mismo predio.

² Precio comercial de la factura a la que se compra el ensilaje de maíz puesto en finca.

Si se extrapolan los resultados económicos encontrados a un hato promedio de 50 vacas, la suplementación con EBO representa una diferencia económica de \$ 901.118 (281 USD), como resultado de una mayor producción de leche y una disminución del 4,5 % en el costo de la suplementación por animal por día. Estos resultados muestran al ensilaje de botón de oro como una alternativa viable productiva y económicamente en la suplementación de vacas lactantes Holstein en trópico alto, y tiene gran importancia considerando que el cultivo de botón de oro es muy rústico, tiene una demanda mínima de agroquímicos y mano de obra para su mantenimiento, es un culti-

vo perenne, se adapta a diferentes pisos térmicos y calidad de suelos, y no compite con la alimentación humana (Londoño *et al.*, 2019; Sandoval-Pelcastre *et al.*, 2020).

La estrategia de suministro de ensilajes ha soportado los sistemas de producción de lecherías en Argentina, contribuyendo a la disminución de la dependencia de alimentos concentrados (de mayor costo) y posibilitando el mantenimiento de la producción en épocas climáticas adversas (Lazzarini *et al.*, 2019). A pesar de que en Colombia se puede pastorear durante todo el año, la dependencia de alimentos balanceados disminuye el margen de rentabilidad de los sistemas de leche especializados, por los resultados derivados del presente estudio, el uso de ensilaje de botón de oro podría constituirse en una alternativa para la producción a bajo costo.

Para una mayor eficiencia en su utilización, se recomienda aumentar el período de pre-marchitamiento del botón de oro destinado para ensilaje, con el fin de obtener un mayor contenido de materia seca, tal como lo recomiendan Sánchez-Ledezma e Hidalgo-Ardón (2018).

CONCLUSIÓN

El ensilaje de botón de oro (EBO) es una alternativa de suplementación que puede ser elaborada por el productor en la misma finca y es viable productiva y económicamente para la suplementación de vacas lactantes en trópico alto, en las cantidades evaluadas en el estudio, en donde presentó resultados a favor comparado con el ensilaje de maíz comercial utilizado. Se necesita explorar la respuesta con mayores inclusiones de EBO en la dieta.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento Académico de Haciendas, sostenibilidad del grupo GRICA y fondos de movilidad de la Universidad de Antioquia, a los trabajadores de la Hacienda La Montaña por el apoyo en el trabajo de campo y al Dr. Wilson Barragán por el soporte estadístico.

REFERENCIAS

- AGROSAVIA. Alimento. Retrieved January 19, 2020, from Reporte de análisis Maíz forrajero (*Zea mais*) Grano, Hoja y Tallo. 2013. <https://alimento.agrosavia.co/Estadisticas/ReporteAnalisis> [Consultado Enero 23 de 2019].
- ÁLVAREZ-CARDONA, ALBERTO; ZAPATA-SÁNCHEZ, BLANCA. Costos y métodos de costeo. Aplicación y análisis para el sector agropecuario. 1 ed. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, 2011, 244 p.
- ARIAS-GAMBOA, LUIS M.; ALPÍZAR-NARANJO, ANDRES; CASTILLO-UMAÑA, MIGUEL Á.; CAMACHO-CASCANTE, MARIA I.; ARRONIS-DÍAZ, VICTORIA; PADILLA-FALLAS, JOSE E. Producción, calidad bromatológica de la leche y los costos de suplementación con *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, en vacas Jersey. Pastos y Forrajes, v. 41, n. 4, 2018, p. 258–264.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942018000400005
- BATES, DOUGLAS; MÄCHLER, MARTIN; BOLKER, BEN; WALKER, STEVEN. Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. Journal of Statistical Software, v. 67, n. 1, 2015, p. 1–48.
<https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>

- BETANCOURT, JAIME A.; NUÑEZ, LUZ A.; CASTAÑO, J.; GASTON A. Suministro De Ensilaje De *Tithonia Diversifolia* Sólo O Mezclado Con Afrecho De Yuca En La Dieta De Pollos De Engorde. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, v. 20, n. 2, 2017, p. 203–213.
<https://www.redalyc.org/pdf/939/93952506005.pdf>
- BORREANI, GIORGIO; TABACCO, ERNESTO; SCHMIDT, R.J.; HOLMES, B.J.; MUCK, R.E. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 5, 2018, p. 3952–3979.
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>
- BRAUN, ANDREA; VAN-DIJK, SUZANNE; GRULKE, MARKUS. Incremento de los Sistemas Silvopastoriles en America del Sur. Ed. Katalin Solymosi. Asunción (Paraguay): Banco Interamericano de Desarrollo, 2016, 461 p.
<https://publications.iadb.org/publications/spanish/document/Incremento-de-los-Sistemas-Silvopastoriles-en-America-del-Sur.pdf>
- BUXADÉ, CARLOS. Zootecnia. Bases de producción animal. Tomo II. Reproducción y alimentación. Madrid (España): Mundi-prensa, 1995, 344 p.
- CARDONA-IGLESIAS, J. LEONARDO; MAHECHA-LEDESMA, LILIANA; ANGULO-ARIZALA, JOAQUIN. Estimación de metano en vacas pastoreando sistemas silvopastoriles con *Tithonia diversifolia* y suplementadas con grasas poliinsaturadas. *Revista Científica FVC-LUZ*, v. 29, n. 2, 2019a, p. 107–118.
<http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/46223/articulo4.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- CARDONA-IGLESIAS, J. LEONARDO; MAHECHA-LEDESMA, LILIANA; ANGULO-ARIZALA, JOAQUIN. Consumo y productividad en vacas holstein pastoreando un sistema silvopastoril vs monocultivo de kikuyo y suplementadas con grasas insaturadas. *Revista Científica De La Facultad De Ciencias Veterinarias De La Universidad Del Zulia*, v. 29, n. 1, 2019b, p. 20–33.
<https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/29616>
- CASTRO-MONTOYA, JOAQUIN; DICKHOEFER, UTA. Effects of tropical legume silages on intake, digestibility and performance in large and small ruminants: A review. *Grass and Forage Science*, v. 73, n. 1, 2018, p. 26–39.
<https://doi.org/10.1111/gfs.12324>
- GALINDO-BLANCO, JUANA L.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, IDALMIS; GONZÁLEZ-IBARRA, NIURCA; GARCÍA-LÓPEZ, ROBERTO; HERRERA-VILAFRANCA, MAGALY. Sistema silvopastoril con *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray: efecto en la población microbiana ruminal de vacas. *Pastos y Forrajes*, v. 41, n. 4, 2018, p. 273–280.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942018000400006
- HAYDOCK, K.; SHAW, N. The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v. 15, n. 76, 1975, p. 663.
<https://doi.org/10.1071/EA9750663>
- HOLGUIN-CASTAÑO, VILMA; ORTÍZ-GRIALES, SANIN; HUERTAS, ALEXANDRA; FANDIÑO, CLEMENCIA; MORA-DELGADO, JAIRO. Consumo voluntario y ganancia de peso en corderos alimentados con ensilaje de *Cenchrus purpureus* Schum y *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray Voluntary intake and weight gain in lambs fed with silage of *Cenchrus purpureus* Schum and *Tithonia diversifolia*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, v. 9, n. 2, 2018, p. 181–191.
<https://doi.org/10.22490/21456453.2175>
- JAMARUN, NOVESAR; PAZLA, R.; ZAIN, MARDIATI; ARIEF, ARIEF. Milk quality of *Etawa* crossbred dairy goat fed combination of fermented oil palm fronds, *Tithonia* (*Tithonia diversifolia*) and Elephant Grass (*Pennisetum Purpureum*). *Journal of Physics: Conference Series*, v. 1469, n. 1, 2020, p.1-9.
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1469/1/012004>
- LAZZARINI, BELEN; BAUDRACCO, JAVIER; TUÑON, G.; GASTALDI, LAURA; LYONS, NICOLÁS; QUATTROCHI, H.; LOPEZ-VILLALOBOS, N. Review: Milk production from dairy cows in Argentina: Current state and perspectives for the future. *Applied Animal Science*, v. 35, n. 4, 2019, p. 426–432.
<https://doi.org/10.15232/aas.2019-01842>
- LONDOÑO C., JUAN D.; MAHECHA, LILIANA; ANGULO, JOAQUIN. Desempeño agronómico y valor nutritivo de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A Gray para la alimentación de bovinos. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, v. 11, n. 1, 2019, p. 1-14.
<https://doi.org/10.24188/recia.v0.n0.2019.693>

- COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Bogotá (Colombia), Res. 000017 de 2012.
[https://www.minagricultura.gov.co/ministerio/direcciones/Documents/d.angie/Res 000017 de 2012.pdf](https://www.minagricultura.gov.co/ministerio/direcciones/Documents/d.angie/Res%2000017%20de%202012.pdf) [consultado marzo 2020]
- MAHECHA, LILIANA; ESCOBAR, JUAN P.; SUÁREZ, JUAN F.; RESTREPO, LUIS F. *Tithonia diversifolia* (hems.) Gray (botón de oro) como suplemento forrajero de vacas F1 (Holstein por Cebú). *Livestock Research for Rural Development*, v. 19, 2007.
<http://www.lrrd.org/lrrd19/2/mahe19016.htm>
- MEJIA-DIAZ, ESTEFANÍA; MAHECHA-LEDESMA, LILIANA; ANGULO-ARIZALA, JOAQUIN. Consumo de materia seca en un sistema silvopastoril de *Tithonia diversifolia* en trópico alto. *Agronomía Mesoamericana*, v. 28, n. 2, 2017, p. 389-403.
<https://doi.org/10.15517/ma.v28i2.23561>
- MORAND, VICTORIO; BALBI, CELSA. Maíz para silo de planta entera: efecto de genotipo y altura de corte en la producción y calidad para alimentación animal. *Información Tecnológica*, v. 31, n. 3, 2020, p. 231-240.
<https://doi.org/10.4067/s0718-07642020000300231>
- NAVARRO D., HUMBERTO; SIEBAL S., ENRIQUE; CELIS R., SERGIO. Manual de producción de leche para pequeños y medianos productores. Documento 148. Osorno (Chile): Ministerio de Agricultura, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Integración (INIA), 2006, p. 79-90.
<http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR33823.pdf>
- NORRIS, AARON B.; CROSSLAND, WHITNEY; TEDESCHI, LUIS; FOSTER, JAMIE L.; MUIR, JAMES P.; PINCHAK, WILLIAM E.; FONSECA, MOZART. Inclusion of *Quebracho tannin* extract in a high-roughage cattle diet alters digestibility, nitrogen balance, and energy partitioning. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, v. 6, n. 2018, p. 1-11.
<https://doi.org/doi/10.1093/jas/skaa047/5734507>
- UNITED STATES OF AMERICA. NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). "Nutrient requirements of dairy cattle. 6th ed. Washington, D.C. (United States Of America): National Academy Press, 1989.
- RAMÍREZ-RIVERA, E.J.; RODRÍGUEZ-MIRANDA, J.; HUERTA-MORA, I.R.; CÁRDENAS-CÁGAL, A.; JUÁREZ-BARRIENTOS, JUAN M. Tropical milk production systems and milk quality: a review. *Tropical Animal Health and Production*, v. 51, n. 6, 2019, p. 1295-1305.
<https://doi.org/10.1007/s11250-019-01922-1>
- RIVERA, JULIAN E.; CHARÁ, JULIAN; GÓMEZ-LEYVA, JUAN F.; RUÍZ, TOMAS; BARAHONA, ROLANDO. Variabilidad fenotípica y composición fitoquímica de *Tithonia diversifolia* A. Gray para la producción animal sostenible. *Livestock Research for Rural Development*, v. 30, 2021.
<http://www.lrrd.org/lrrd30/12/rive30200.html>
- SÁNCHEZ-LEDEZMA, WILLIAM; HIDALGO-ARDÓN, CARLOS. Potencial forrajero de nueve híbridos de maíz en la zona alta lechera de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, v. 29, n. 1, 2018, p. 153-164.
<https://doi.org/10.15517/ma.v29i1.27732>
- SANDOVAL-PELCASTRE, A.; RAMÍREZ-MELLA, MONICA; RODRÍGUEZ-ÁVILA, NORMA L.; CANDELARIA-MARTÍNEZ, BERNARDINO. Árboles Y Arbustos Tropicales Con Potencial Para Disminuir La Producción De Metano En Rumiantes. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, v. 23, n. 33, 2020, p. 1-16.
https://www.researchgate.net/publication/342433653_Revisión_Review_ARBOLES_Y_ARBUSTOS_TROPICALES_CON_POTENCIAL_PARA_DISMINUIR_LA_PRODUCCION_DE_METANO_EN_RUMIANTES_TROPICAL_TREES_AND_SHRUBS_WITH_POTENTIAL_TO_REDUCE_THE_PRODUCTION_OF_METHANE_IN_RUMINANT?enrichId=rgreq-12ec0e94f15ebd77c53dbfeecf7e8ea7-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzM0MjQzMzY1MztBUzo5MDYxMTY3NDU2NjY1NjBAMTU5MzA0NjQ3NTA5OA%3D%3D&el=1_x_2&_esc=publicationCoverPdf
- VASTA, VALENTINA; DAGHIO, MATTEO; CAPPUCCI, ALICE; BUCCIONI, ARIANNA; SERRA, A; VITI, CARLO; MELE, MARCELLO. Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 5, 2019, p. 3781-3804.
<https://doi.org/10.3168/jds.2018-14985>

YANAPA-SANGA, ALFREDO. Niveles séricos de calcio, fósforo y magnesio en vacas brown swiss según número de partos y nivel de producción [Tesis Médico Veterinario y Zootecnista]. Puno (Perú): Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2019. 67 p.
<http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/12710>

Estudio del biodiesel obtenido a partir de aceite de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo)*

Study of biodiesel from Sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis* Linneo)

BASTO-FLOREZ, LUIS-EDUARDO¹; MILLÁN-ALVARADO, SEBASTIAN-AUGUSTO²;
MEDINA-CABALLERO, LUISA-FERNANDA³; MORA-VERGARA, LIA-ZAMARA⁴;
CABALLERO-HERNÁNDEZ, YULEISI-TATIANA⁵

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 16 de Julio 2020

Aprobado para publicación: 4 de Noviembre 2021

* Título del Proyecto de origen: "Estudio del biodiesel obtenido a partir de aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo)".
Financiación: Instituto Universitario de la Paz. Culminación: abril 2019.

- 1 Instituto Universitario de la Paz (UNIPAZ), Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Grupo de Investigación en Innovación, Desarrollo Tecnológico y Competitividad en Sistemas de Producción Agroindustrial (GIADAI). Esp. Tecnológico en control de calidad de biocombustibles líquidos. Barrancabermeja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-9550-3812>
- 2 Instituto Universitario de la Paz (UNIPAZ), Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Grupo de Investigación en Innovación, Desarrollo Tecnológico y Competitividad en Sistemas de Producción Agroindustrial (GIADAI). Esp. Tecnológico en control de calidad de biocombustibles líquidos. Barrancabermeja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-2600-8724>
- 3 Instituto Universitario de la Paz (UNIPAZ), Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Grupo de Investigación en Innovación, Desarrollo Tecnológico y Competitividad en Sistemas de Producción Agroindustrial (GIADAI). Ingeniera Química. Barrancabermeja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-0804-9450>
- 4 Instituto Universitario de la Paz (UNIPAZ), Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Grupo de Investigación en Innovación, Desarrollo Tecnológico y Competitividad en Sistemas de Producción Agroindustrial (GIADAI). Esp. en Ingeniería de Saneamiento Ambiental. Barrancabermeja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-0300-2813>
- 5 Instituto Universitario de la Paz (UNIPAZ), Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Grupo de Investigación en Innovación, Desarrollo Tecnológico y Competitividad en Sistemas de Producción Agroindustrial (GIADAI). MSc. en Ingeniería química. Barrancabermeja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-0877-3142>

Correspondencia: yuleisi.caballero@unipaz.edu.co

RESUMEN

El aceite de Sacha inchi (Plukenetia Volubilis Linneo) es un aceite vegetal que ha despertado gran interés en la producción de biodiesel debido a su baja temperatura de cristalización resultado del alto contenido de PUFAs (ácidos Grasos Poliinsaturados). En la presente investigación se planteó la producción de biodiesel a partir de este aceite, mediante reacciones de transesterificación en una relación aceite: metóxido de potasio de 5:1 v/v. Se realizó una caracterización fisicoquímica del aceite crudo y del biodiesel obtenido, según normas internacionales, y se comparó con la normatividad nacional: NTC 5444. Se realizó paralelamente, una evaluación de la estabilidad oxidativa del biodiesel en contacto con lámina de cobre durante 45 días. Se realizaron mezclas en diferentes proporciones con diésel convencional, con el objeto de evaluar alteración de las propiedades. El rendimiento de reacción para el biodiesel obtenido fue 59,72 %, estos parámetros evaluados se encontraron entre los rangos indicados en la norma. En cuanto a la estabilidad del biodiesel, se encontró evidencia de degradación al contacto con lámina de cobre, transcurridos 28 días. De igual manera, se evidenció que la mejor mezcla a emplear fue B20 (20 % biodiesel de sachá inchi + 80 % diésel), debido a que no presentó alteración significativa de las propiedades del diésel, lo que supone disminución de efectos negativos en motores diésel. Este trabajo proporciona información acerca de la producción de biodiesel de calidad deseable, a partir de aceite de Sacha inchi, con bajos efectos a motores diésel.

ABSTRACT

Sacha inchi oil (Plukenetia Volubilis Linneo) is a vegetable oil that has awakened great interest in Biodiesel production due to its inherent low crystallization temperature capacity because of high content on PUFAs (Polyunsaturated Fatty Acids). Present research proposed the manufacture of biodiesel using the oil through transesterification reactions, with a 5:1 v/v ratio of potassium methoxide. A physicochemical characterization of crude oil, and the biodiesel obtained was carried out according to international standards, as well as NTC 5444 national regulation. Parallel, a 45 days evaluation of the biodiesel oxidative stability when in contact with copper foil was carried out. Different mixtures of conventional diesel were handled in order to evaluate changes in its attributes. Obtained Biodiesel reaction efficiency was 59,72 %, such measurement being within the standard regulations parameters. Regarding the biodiesel stability, evidence of degradation was found in contact with copper foil, after 28 days. Similarly, it was evidenced that the best mixture to use was B20 (20 % sachá inchi biodiesel + 80 % diesel), because it did not show significant alteration on diesel properties, which could mean a reduction of negative

PALABRAS CLAVE:

Aceite vegetal; Sacha Inchi; Biocombustibles; Biodiesel; Estabilidad oxidativa; FAME; Transesterificación; Ácidos grasos poliinsaturados; Diésel.

KEY WORDS:

Vegetable oil; Sacha Inchi; Biofuels; Biodiesel; Oxidative stability; FAME; Transesterification; Polyunsaturated fatty acids; Diesel.

Cómo citar este artículo: BASTO-FLOREZ, LUIS-EDUARDO; MILLÁN-ALVARADO, SEBASTIAN-AUGUSTO; MEDINA-CABALLERO, LUISA-FERNANDA; MORA-VERGARA, LIA-ZAMARA; CABALLERO-HERNÁNDEZ, YULEISI-TATIANA. Estudio del biodiesel obtenido a partir de aceite de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo). Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 20, n. 1, 2022, p. 41-53. Doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v19.n2.2021.1879>

effects in diesel engines. This work provides information about the production of biodiesel of desirable quality, from Sacha inchi oil, with low impact on diesel engines.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas energéticos constituyen componentes amplios y complejos de la economía nacional (Bueno, 2019). En Colombia, la principal fuente de energía es de origen fósil, donde los combustibles obtenidos a partir de estos hidrocarburos se caracterizan por la emisión de gases tóxicos (CO_2 , CO, SO_2 y NOx) (Andrade *et al.*, 2017). Mitigar estos efectos en la atmósfera es el objetivo de las energías renovables (Dogaeu, 2020), siendo los biocombustibles una alternativa para sustituir total o parcialmente los combustibles convencionales (Lawam, 2018).

El biodiesel en Colombia representa gran potencial en la industria biocarburante (Colmenares *et al.*, 2020). Actualmente, es producido a partir de la transesterificación básica de triglicéridos obtenidos de semillas oleaginosas (Ogunkunle *et al.*, 2019) las cuales pueden ser explotadas en el país puesto que se cuenta con suelos aptos para este tipo de cultivo (Guil *et al.*, 2019). Además, este tipo de combustible no es tóxico, ya que no emite óxidos de azufre ni sustancias nocivas y es biodegradable (Yasar *et al.*, 2020).

En la actualidad, la principal materia prima para la producción de biodiesel es el aceite extraído de palma de aceite y, en Colombia, del híbrido OxG, un cruce entre *Elaeis oleifera* y *Elaeis guineensis* (Goh *et al.*, 2017). No obstante, uno de los problemas que la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) ha podido detectar es que, ante la alta concentración en la industria de palma de aceite, los cultivos en las plantaciones se están convirtiendo en monovarietales, limitando la resiliencia del cultivo ante las plagas, lo que traduce en un panorama de alto riesgo por la presencia de plagas devastadoras (Sundram *et al.*, 2017).

Por otro lado, aunque el aceite contiene antioxidantes naturales que contribuyen a la estabilidad oxidativa (Zhou *et al.*, 2019), presenta un alto contenido de ácidos grasos libres que en picos de cosecha aumentan, afectando directamente la calidad del combustible (Cong *et al.*, 2020). Además, el terreno en el que se cultivan estas plantas, con el paso de los años se convierte en tierras infértiles, áridas (Malins *et al.*, 2018) presentándose afectación de la biodiversidad (Ocampo *et al.*, 2018).

En la búsqueda de alternativas ante este panorama, se ha despertado interés por el aceite de sachá inchi, un cultivo estratégico en un país tropical con alta humedad, debido a la baja temperatura de cristalización del aceite por su contenido del 82,90 % en ácidos grasos poliinsaturados (Ramos *et al.*, 2016), comparado con otros cultivos de plantas oleaginosas tropicales (Zuleta *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2018; Kodahl *et al.*, 2020). La presente investigación evaluó el potencial uso del aceite de sachá inchi en mezcla con diésel, bajo estándares de calidad nacionales e internacionales, observándose resultados favorables para algunas concentraciones, dentro de los límites establecidos en la NTC-5444.

MÉTODO

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Investigaciones y de Cromatografía del Centro de Investigaciones Santa Lucía, del Instituto Universitario de la Paz, ubicado en la vereda El Zarzal en la ciudad de Barrancabermeja, kilómetro 14 de la vía a Bucaramanga. La temperatura ambiental corresponde a 29-40 °C y una humedad relativa de 85 %.

Descripción del proceso

Para la obtención del aceite de Sacha inchi se adecuó la materia prima posterior a la recolección de la semilla en el municipio del Carmen del Chucuri, Santander. Entre las características del cultivo, se tiene que el tiempo de cosecha es de 8 meses a una altura entre los 1.000 y 1.200 m, y requiere un terreno franco arenoso para su cultivo. Posteriormente, se procedió a separar las semillas y realizar limpieza para eliminar impurezas. Seguidamente, se procedió a disminuir el tamaño de estas empleando un molino manual y un secado a 105 °C durante 24 horas. Finalmente, la extracción del aceite se llevó a cabo por el método soxhlet, empleando hexano como solvente a 60 °C; la mezcla aceite-solvente fue separada empleando destilación al vacío. La caracterización del aceite se realizó mediante pruebas fisicoquímicas.

Una vez caracterizado el aceite, se llevó a cabo la producción de biodiesel mediante reacciones de transesterificación, empleando hidróxido de potasio como catalizador con una relación volumétrica de aceite:metóxido 5:1 durante 180 minutos a 55 °C, en agitación constante (300 rpm); por su parte, para la preparación del metóxido de potasio se emplearon 3,5 g KOH por cada 200 mL de metanol (Sanchez, 2014).

A continuación, el biodiesel obtenido se dejó en reposo durante 7 días, y se procedió a realizar la separación de la glicerina (fondos) y el sobrenadante (Biodiesel) a temperatura ambiente. El biodiesel obtenido fue caracterizado mediante pruebas fisicoquímicas.

El cálculo de del rendimiento se realizó aplicando la ecuación (1):

$$Rendimiento = \frac{\text{volumen de biodiesel}}{\text{volumen de aceite} + \text{volumen de metóxido}} \quad \text{Ec (1)}$$

Por otro lado, y atendiendo a la problemática de autooxidación que presenta el biodiesel, se evaluó la estabilidad oxidativa del biodiesel; para ello, se tomó como base la norma ASTM-D130, empleando una lámina de cobre con dimensiones aproximadas de 5 cm de longitud, 1 cm de ancho y 1 mm de espesor, adecuadas previamente. Muestras de biodiesel fueron puestas en contacto con las láminas y aisladas de luz y aire, seguidamente se evaluó el comportamiento de las muestras y la solución en periodos de tiempo de 0 a 28 días, por medio de pruebas fisicoquímicas como índice de peróxidos y acidez, asimismo, se evaluó el índice de yodo al inicio y final del tiempo de estudio.

Finalmente, se mezcló el biodiesel obtenido con diésel comercial en concentraciones de 5, 10, 20 y 50 % v/v, con el objeto de evaluar la influencia del biodiesel en las propiedades del diésel.

Parámetros fisicoquímicos

La calidad y propiedades del aceite empleado y el biodiesel producido se evaluaron mediante pruebas fisicoquímicas basadas en normas AOAC, ASTM y NTC señaladas a continuación:

La evaluación de la viscosidad se realizó mediante el método de prueba estándar para la viscosidad cinemática de líquidos transparentes y opacos (ASTM-D445). La gravedad API se determinó empleando un densímetro automático DMA 4500M (ASTM-D4052). El índice de cetano se halló según la norma ASTM-D4737-10, el índice de cetano se calculó por medio de una ecuación de 4 variables proporcionando un medio para estimar el número de cetano.

El contenido de agua se basó en la norma ASTM-D4377 y ASTM-D1533, se midió en un equipo 870KF Titrino plus y 899 Coulometer, respectivamente. La Temperatura del Punto de inflamación es una medida de la tendencia de un producto para formar una mezcla inflamable con aire bajo las condiciones controladas, empleando el equipo pensky martens copa cerrada según la ASTM-D93 método A. Finalmente, la oxidación se evaluó con base en la norma ASTM-D130.

El índice de yodo se determinó de acuerdo con la norma A.O.A.C.920.159, empleando reactivo de Wijs, en tanto que el índice de peróxidos según la metodología de la AOAC-965.33, valorando la solución de tiosulfato de sodio 0,01 N.

Para la espectroscopia UV-VIS se empleó el espectrofotómetro Genesys-10S con celdas de cuarzo, como muestra madre se empleó el biodiesel puro para determinar la longitud de onda de mayor absorbancia. Por su parte, el índice de acidez se evaluó siguiendo el procedimiento de la NTC-218, con etanol en caliente y la densidad fue evaluada empleando un picnómetro de Gay-Lussac según la NTC-336.

RESULTADOS

Caracterización del aceite

La extracción de aceite de la semilla de sacha Inchi en base seca, partiendo de 5,00±0,02 g de muestra, presentó un rendimiento de 83,62 %.

En el Cuadro 1 se presenta la caracterización fisicoquímica del aceite obtenido a partir de la semilla de Sacha inchi que arrojó un contenido de humedad de 0,34 %, significativamente elevado si se tiene en cuenta que este parámetro no debe superar 0,05 % según la norma ASTM-D675, razón por la cual fue necesario someterlo a un proceso de filtrado con Sulfato de Sodio Anhidro para eliminar dicho exceso, el cual puede influir en la formación de jabones y gomas durante la producción de biodiesel. El contenido de humedad también es alto en comparación con aceite de *Jatropha* (0,070 %) (Yate *et al.*, 2020) y aceite de palma (1,50 %) (Dos Santos *et al.*, 2019). El valor del índice de yodo indica las insaturaciones presentes en los ácidos grasos que conforman los triglicéridos del aceite, un valor de 192,33 g I₂/100 g, es elevado en comparación con el aceite de palma, soja y oliva, los cuales se encuentran alrededor de 55, 140 y 95 g I₂/100 g respectivamente, pero similar a lo reportado por Chasquibol *et al.* (2016) con 191,9 g I₂/100 g y por Follegatti *et al.* (2009) con 198 g I₂/100 g, confirmando que el aceite de Sacha inchi es de los más insaturados con 93 % del total (Ramos *et al.*, 2019). Un incremento en el índice de yodo conlleva a la disminución del punto de fusión, otorgándole al aceite mayor estabilidad en estado líquido, característica de interés para la producción de biodiesel.

Cuadro 1. Comparación de las propiedades fisicoquímicas del aceite de sacha Inchi.

Propiedad	Unidades	Aceite crudo de Sasha Inchi	Aceite crudo de marañón**	Aceite crudo de <i>Jatropha curcas</i> ***	Norma
Densidad a 20 °C	g/cm ³	0,9278	0,954*	0,885	ASTM-D4052
Densidad a 15 °C	kg/m ³	931,30	-	-	
Densidad a 60 °F	kg/m ³	930,90	-	-	
Gravedad API a 60 °F	°API	20,40	-	-	
Índice de yodo	g I ₂ /100 g	192,33	215	218	NTC-283
Índice de refracción	-	1,478	1,693	1,468	NTC-289
Número Ácido	mg KOH/g	4,335	12,1	1,63	ASTM-D664
Índice de Saponificación	mg KOH/g	187,92	47	165	NTC-335
Punto de Fusión	°C	5,00	-	-	NTC-213
Contenido de Agua KF	% Volumen	0,34	3,9	0,07	ASTM-D1533
Contenido de Agua KF (Filtrado con Sulfato de Sodio Anhidro)	% Volumen	0,12	-	-	ASTM-D1533

Por otro lado, el índice de saponificación (187,92 mg KOH/g) se encuentra en un valor similar a los aceites de palma, oliva y soja con 199,1, 196 y 191,0 mg KOH/g, respectivamente (Paucaro *et al.*, 2015), este índice está relacionado con la formación de jabones y el índice de acidez. Se observa que este valor se encuentra en los rangos especificados para los aceites empleados en la producción de biodiesel actualmente.

El índice de refracción fue de 1,478 valor similar al reportado por Aranda-Ventura (2019) con 1,48. El número ácido (4,335 mg KOH/g) representa la cantidad de ácidos grasos libres en el aceite, este valor es elevado, luego se puede esperar rancidez con el tiempo (Kiattiphum *et al.*, 2017), mientras que la densidad de 0,92 coincide con lo reportado por Paucaro y Castaño (2015).

Producción de biodiesel

Una vez caracterizado el aceite empleado como materia prima, se procedió a la producción de biodiesel; mediante norma EN14103 se determinaron los metilésteres de ácidos grasos (FAME) y la conversión en esteres metílicos, obteniéndose un rendimiento del 59,72 %, quedando en el biodiesel una concentración elevada (40,28 %) de triglicéridos propios del aceite que no reaccionaron como se muestra en la figura 1 y posibles trazas de metanol residual, glicerina libre y total que no fueron cuantificadas.

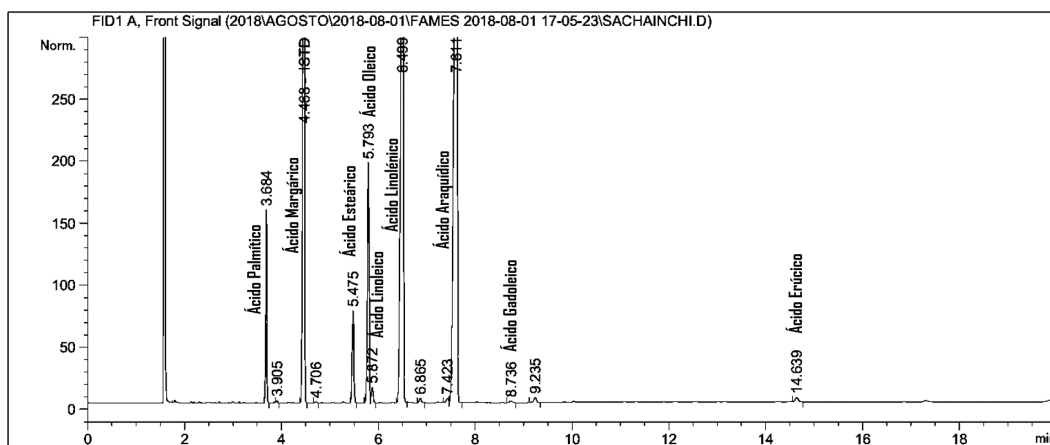


Figura 1. Cromatograma de biodiesel de sacha Inchi:

De acuerdo con los resultados obtenidos (Cuadro 2) se observa que, según la gravedad API (23 °API), el biodiesel obtenido se clasifica como crudo medio, el cual tienen un rango de densidad de 0,87 a 0,92 g/cm³, lo cual concuerda con la densidad obtenida. Por su parte, el punto de inflamación, que es la medida de temperatura a la cual el combustible comenzará a quemarse en contacto con una fuente de calor y, que por tanto, es un parámetro importante para la seguridad, transporte y almacenamiento, se encuentra en 63,5 °C superior al diésel fósil (52 °C) según el Ministerio De Minas Y Energía Y Ministerio De Ambiente Y Desarrollo Sostenible (Colombia, 2021), lo que significa que el biodiesel de Sasha inchi se podría almacenar en mezcla con el diésel, no obstante, el biodiesel de palma registra temperatura de inflamación superior a 120 °C (Colombia, 2021).

Por otro lado, una combustión de calidad ocurre con una ignición rápida seguida de un quemado total y uniforme del carburante, para ello se requiere un número de cetano de 43 para el diésel, sin embargo, el valor obtenido fue de 33, por lo cual, al mezclar el biodiesel obtenido, afectaría este parámetro (Arias *et al.*, 2011). El número de cetano pudo disminuir debido a la pérdida de ácidos grasos saturados y una alta proporción de ácidos grasos insaturados; igualmente, la literatura señala que el biodiesel de sacha inchi se caracteriza por poseer números de cetano bajos debido a un contenido de metilésteres poliinsaturados mayores al 60 % que lo hace propenso

a las reacciones de oxidación (Benjumea *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2019). El color se encuentra por debajo del límite establecido para diésel de 2 (Colombia, 2021), y es un indicativo del grado de refinación, además, un color claro puede relacionarse con menor posibilidad de oxidación.

Cuadro 2. Comparación de las propiedades fisicoquímicas del biodiesel producido a partir del aceite de Sacha inchi.

Propiedad	Unidades	Biodiesel de Sacha Inchi	Biodiesel de marañón *	Biodiesel de canola*	NTC 5444	Norma
Gravedad API	°API	23,0	-	-		ASTM-D4737-10
10 % vol recobrado	°C	253,7	-	-		
50 % vol recobrado	°C	283,4	-	-		
90 % vol recobrado	°C	336,6	-	-		
Índice de Cetano		33,0	40	53	51 mínimo	
Punto de Inflamación	°C	63,5	183	160	120 mínimo	ASTM-D93
Viscosidad	mm ² /s	7,874	10,66	7,22	1,9-6	ASTM-D445 a 40°C
Color		1,0	-	-		ASTM-D1500
Densidad 20 °C	g/cm ³	0,91025°C	0,9089	0,9056	0,86-0,90	ASTM-D4052
Índice de yodo	gI ₂ /100 g	54,22			120 mínimo	NTC-283
Índice de acidez	mg KOH/100 g	0,08	0,8	0,71		ASTM-D664
Contenido de éster	%(m/m)	59,72	55	85	96,5	EN14103

Finalmente, la viscosidad es de gran interés para los motores que emplean mezcla con biodiesel ya que suele ser elevado respecto al diésel comercial (1,9-5,0 mm²/s), como es el caso del B100 que, según la Resolución 40103 del 2021 se encuentra en un rango entre 3,5 y 5 mm²/s (Colombia, 2021), mientras que la viscosidad del biodiesel objeto de estudio (7,874 mm²/s) es elevada, lo que podría generar problemas en los sistemas de inyección e insuficiencia en el proceso de atomización y puede deberse al incremento de saturaciones y longitud de la cadena carbonada de los ácidos grasos libres (Niraj, 2017), evidenciando que no tendría un uso comercial puro. Para reducir la viscosidad se puede realizar mezclado del biodiesel en bajas proporciones con diésel convencional, mezclas de aceites que contienen diferentes composiciones de ácidos grasos o usar aditivos formulados para mejorar las propiedades de flujo a baja temperatura (Benavides *et al.*, 2021).

Evaluación de la estabilidad oxidativa

La estabilidad oxidativa del biodiesel se determinó mediante pruebas fisicoquímicas, relacionando el índice de acidez, índice de peróxidos e índice de yodo durante 28 días (Figura 2a y 2b).

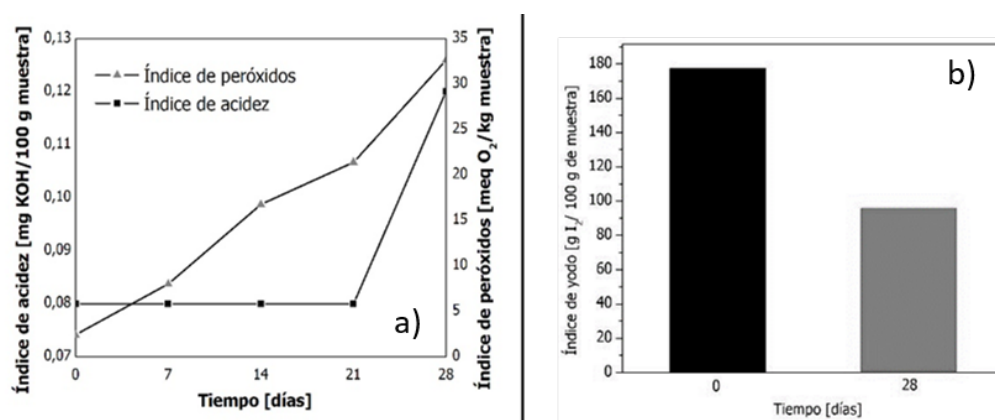


Figura 2. a) Índice de acidez e Índice de peróxidos. b) Índice de yodo.

Se observa un incremento constante del índice de peróxidos en el tiempo de estudio, asociado a la degradación que sufren los ácidos grasos insaturados en las fases iniciación, propagación y terminación, que dan lugar a hidroperóxidos (Chee *et al.*, 2020). Por su parte, la estabilidad del índice de acidez durante los primeros 21 días se puede asociar al tiempo de formación de complejos metálicos que impiden la interacción entre el metal y los hidroxiperóxidos formados durante el proceso de degradación de los ésteres metílicos, sin embargo, se puede presentar concentración de nuevos productos en la solución, que conllevan al aumento en la acidez como se evidencia a partir del día 21.

La disminución del índice de yodo se puede relacionar con la auto oxidación de los ésteres metílicos que se producen como consecuencia de las reacciones en cadena de radicales libres debido a los ácidos grasos insaturados durante las fases de iniciación, propagación y terminación. El radical lipídico se forma a partir del ataque de radicales, luz, calor o por las trazas de cobre, seguidamente reacciona con oxígeno generando un radical peroxilo (ROO-), que ataca la matriz base, dando lugar a la formación de hidroperóxidos lipídicos (ROOH) y un nuevo radical que inicia de nuevo la secuencia de propagación. Teniendo en cuenta que el índice de yodo evalúa la presencia de insaturaciones y éstas disminuyen en el proceso de degradación, su disminución concuerda con la teoría de oxidación y con el comportamiento del índice de acidez y peróxidos (Reddy *et al.*, 2018; Sia *et al.*, 2020). Con objeto de evaluar la degradación de los esteres metílicos de Sacha inchi se realizaron mediciones de absorbancia a través del tiempo, a 455 nm (longitud de onda de mayor absorbancia).

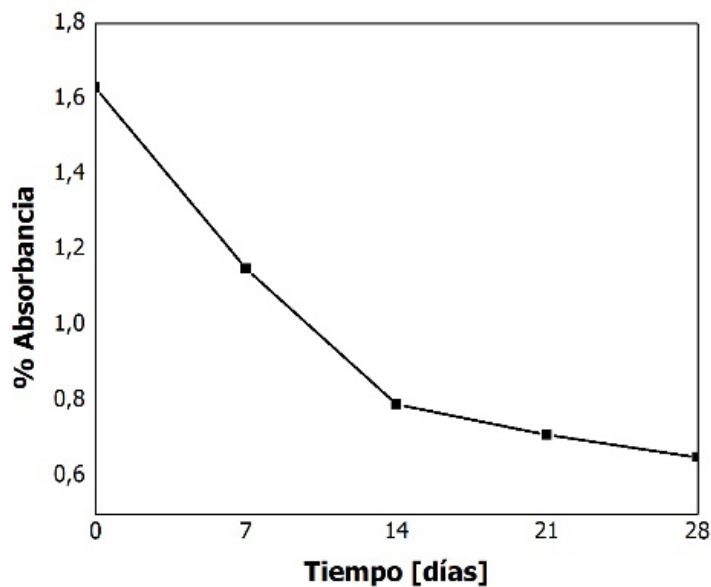


Figura 3. Porcentaje de Absorbancia.

En la Figura 3 se observa que la absorbancia disminuye ligeramente, lo cual se puede asociar a la tonalidad opaca que tomó la muestra a medida que aumentaba el tiempo de estudio, así como a la degradación de los ésteres metílicos en contacto con lámina de cobre.

Según lo establecido en la norma ASTM-D130 para determinar el índice de corrosión, en la Figura 4 se presentan las láminas de cobre que estuvieron sumergidas en el biodiesel, observándose que no hubo una variación significativa en ellas, encontrándose en la franja 1B de naranja oscuro (según la clasificación del cuadro 1 de ASTM-D13), evidenciando que no hay ocurrencia de un proceso de corrosión representativo en el tiempo de estudio, pero si la formación de mancha ligeras que se pueden asociar a complejos metálicos.

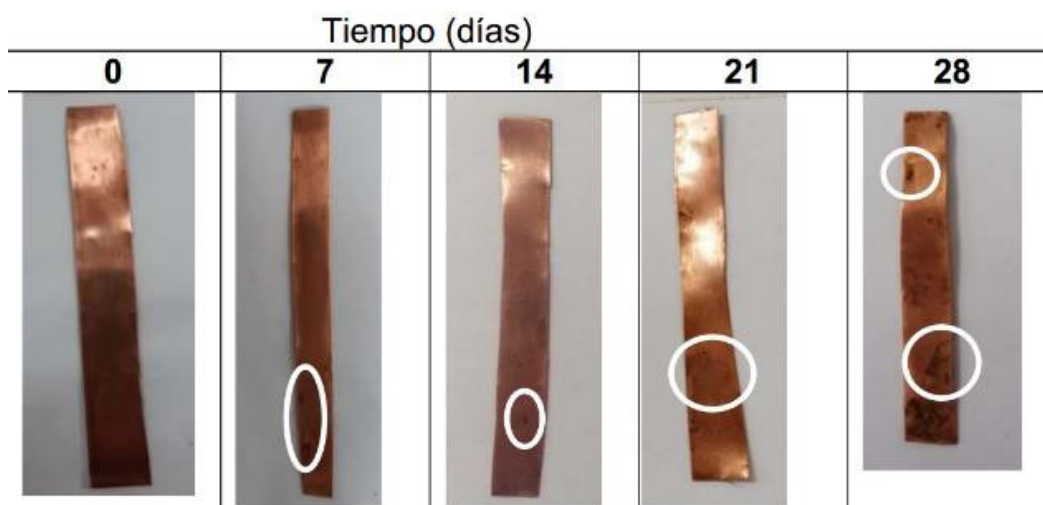


Figura 4. Corrosión en las láminas de cobre.

Mezcla diésel – biodiesel

Finalmente, se procedió a evaluar el comportamiento del diésel en mezcla con el biodiesel de aceite de Sacha inchi en diferentes porcentajes de mezcla, B5, B10, B20 y B50.

En la Figura 5, se observa el comportamiento de la densidad, gravedad API y viscosidad de la mezcla diésel-biodiesel en diferentes proporciones, observándose que, debido a que la densidad del biodiesel es mayor a la del diésel, esta aumenta gradualmente en relación con el incremento de la concentración en la mezcla. De igual manera, la viscosidad presenta un incremento progresivo esperado, debido a que la viscosidad del biodiesel es superior a la del diésel. Por su parte, las muestras presentan entre 32 y 29 °API, catalogándose como crudo mediano (Espitia *et al.*, 2019) y se resalta que los valores para estos parámetros en la mezcla se mantienen en el rango estipulado en la norma NTC 5444.

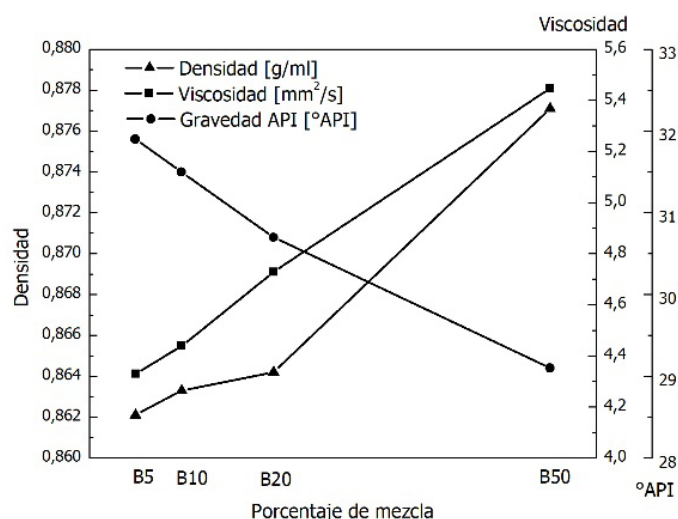


Figura 5. Densidad, Gravedad API y Viscosidad de la mezcla diésel-biodiesel

En la Figura 6a se observa el comportamiento del índice de acidez e índice de yodo de la mezcla diésel-biodiésel para diferentes concentraciones, encontrándose que la acidez aumentó de manera proporcional a la concentración de biodiésel en mezcla, debido a que la acidez de los ésteres metílicos es superior a la del diésel, como resultado de los ácidos grasos libres producto de la hidrólisis. Sin embargo, este parámetro se mantiene en el rango estipulado para la mezcla comercial, no obstante, debido a que el aumento de acidez puede indicar degradación oxidativa, se recomienda estudiar la influencia del tiempo y temperatura de almacenamiento (Niraj, 2017).

Por otro lado, se observa que los valores del índice de yodo de las muestras superan los parámetros establecidos en la NTC 5444, donde el máximo permitido es de 120 g I₂/100 g. Autores como Federico Ganduglia y su equipo de investigación para el manual de biocombustible del IICA del Perú (2009), plantean que a medida que los aceites poseen en su composición mayor proporción de ácidos grasos insaturados, presentan un menor número de cetano y menor estabilidad, lo que se traduce en un mayor Índice de Yodo, lo que define al aceite de Sacha inchi como uno de los aceites más insaturados.

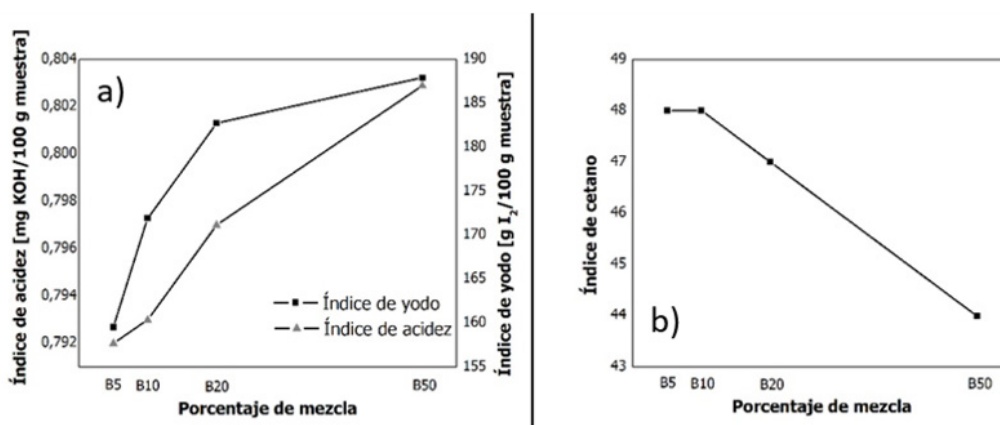


Figura 6. a) Índice de acidez e Índice de yodo y b) Índice de cetano para la mezcla diésel- biodiésel.

Finalmente, la Figura 6b muestra el comportamiento del índice de cetano para la mezcla diésel-biodiésel, observándose que este parámetro disminuye proporcional al incremento porcentual en la muestra. Un número de cetano por debajo de 47 está fuera de los parámetros establecidos para el biodiésel, y es indicativo de la baja calidad de ignición de un combustible diésel, lo que puede provocar el llamado “golpeteo diésel” que hace referencia a la demora en el inicio de la combustión. Los resultados anteriores conllevan a concluir que el biodiésel producido a partir del aceite de Sacha inchi bajo los parámetros de estudio, solo se podría mezclar con diésel hasta un 20 % v/v, sin alterar significativamente los parámetros de calidad del diésel.

CONCLUSIONES

El aceite obtenido de la semilla de Sacha inchi presenta elevada humedad que puede traer consecuencia en la producción de biodiésel por lo que se hizo necesario someter el aceite a secado para disminuir la posibilidad de formación de jabones en las reacciones de transesterificación y dificultar el proceso de producción de biodiésel.

El biodiésel obtenido a partir del aceite de Sacha inchi presentó bajo rendimiento en las reacciones de transesterificación, sin embargo, sus propiedades fisicoquímicas se encuentran entre los parámetros establecidos en la NTC 5444. De igual manera, se observa que en los 28 días de estudio se evidencia degradación del biodiésel en contacto con lámina de cobre, no obstante, se puede evaluar la influencia de antioxidantes que incrementen el tiempo de inducción del combustible y retrasen el proceso de degradación. Igualmente, se podría aumentar la proporción de ácidos grasos monoinsaturados y generar un balance entre la estabilidad oxidativa y las pro-

propiedades de flujo a baja temperatura y optimizar el perfil de ácidos grasos mezclando biodiesel de diferentes materias primas. Finalmente, en mezcla con diésel convencional, se puede concluir que el biodiesel a partir de aceite de Sacha inchi se podría mezclar hasta porcentajes inferiores al 20 %, sin modificar de forma significativa los parámetros de calidad del diésel.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Universitario de la Paz -UNIPAZ, a la Escuela de Ingeniería Agroindustrial y al Grupo de Investigación GIADAI, por el apoyo en la presente investigación.

REFERENCIAS

- ANDRADE-CASTAÑEDA, HERNÁN-JAIR; ARTEAGA-CÉSPEDES, CRISTHIAN-CAMILO; SEGURA-MADRIGAL, MILENA-ANDREA. Emisión de gases de efecto invernadero por uso de combustibles fósiles en Ibagué, Tolima (Colombia). *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, v. 18, n. 1, 2017, p. 102-112.
https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num1_art:561
- ARANDA-VENTURA, JOSÉ; VILLACRÉS-VALLEJO, JORGE; RIOS-ISERN, FELIPE. Composición química, características físico-químicas, trazas metálicas y evaluación genotóxica del aceite de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi). *Revista peruana de medicina integrativa*, v. 4, n. 1, 2019, p. 4-14.
<http://dx.doi.org/10.26722/rpmi.2019.41.103>
- ARIAS-PÉREZ, DANIEL-EDUARDO; TEUTA-RAMÍREZ, CÉSAR-AUGUSTO; PARRA-PLAZAS, JAIME. Caracterización de las propiedades del biodiesel de girasol bajo la Norma NTC de 100/04 y medición de poder calorífico. *Avances Investigación en Ingeniería*, v. 8, n. 2, 2011, p. 73-80.
<https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/avances/article/view/2709>
- BENAVIDES, ALIRIO-YOVANY; BENJUMEA, PEDRO-NE; AGUDELO, JOHN-RAMIRO. El fraccionamiento por cristalización del biodiesel de aceite de palma como alternativa para mejorar sus propiedades de flujo a baja temperatura. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, v. 43, 2008, p. 7-17.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-62302008000100001&lng=en&nrm=iso
- BENJUMEA-HERNÁNDEZ, PEDRO-NEL; AGUDELO-SANTAMARÍA, JOHN-RAMIRO; RIOS, LUIS-ALBERTO. Biodiésel: Producción, calidad y caracterización. Medellín (Colombia): Universidad de Antioquia, 2009, 152 p.
- BUENO-LÓPEZ, MAXIMILIANO. La evolución de los sistemas energéticos: retos y oportunidades para el sistema eléctrico colombiano. *Ámbito Investigativo*, v. 4, n. 3, 2019, p. 22-31.
- CASTAÑO, DIEGO-LEANDRO; VALENCIA, MARIA-DEL-PILAR; MURILLO, ELIZABETH; MENDEZ, JONH-JAIRO; ERAS-JOLI, JORDI. composición de ácidos grasos de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo) y su relación con la bioactividad del vegetal. *Revista chilena de nutrición*, v. 39, n. 1, 2012, p. 45-52.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182012000100005>
- CHASQUIBOL, N.A.; GÓMEZ-COCA, R.B.; YÁCONO, J.C.; GUINDA, Á.; MOREDA, W.; AGUILA, C.; CAMINO, M.C. Markers of quality and genuineness of commercial extra virgin sacha inchi oils. *Grasas y Aceites*, v. 67, n. 4, 2016, e169.
<https://doi.org/10.3989/gya.0457161>
- COLMENARES-QUINTERO, RAMÓN-FERNANDO; RICO-CRUZ, CAMILO-JOSÉ; STANSFIELD, KIM E.; COLMENARES-QUINTERO, JUAN-CARLOS. Assessment of biofuels production in Colombia. *Cogent Engineering*, v. 7, n. 1, 2020, e1740041.
<https://doi.org/10.1080/23311916.2020.1740041>

- COLOMBIA. MINISTERIO DE MINAS Y ENERGÍA Y MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Resolución 40103. Por la cual se establece los parámetros y requisitos de la calidad del combustible diésel (ACPM), los biocombustibles para uso en motores encendidos por compresión como componentes de mezcla en procesos de combustión y de sus mezclas y, de las gasolinas básicas y gasolinas oxigenadas con etanol anhidro combustible para uso en motores de encendido por chispa, y se adoptan otras disposiciones. Bogotá (Colombia): 2021, 15 p.
- DOGARU, LUCRETIA. The Main Goals of the Fourth Industrial Revolution. *Renewable Energy Perspectives. Procedia manufacturing*, v. 46, 2020, p. 397-401
<https://doi.org/10.1016/j.promfg.2020.03.058>
- DOS SANTOS, LETÍCIA-KAREN; RODRIGUES-HATANAKA, RAFAEL; DE OLIVEIRA, JOSÉ-EDUARDO; FLUMIGNAN, DANILO-LUIZ. Production of biodiesel from crude palm oil by a sequential hydrolysis/esterification process using subcritical water. *Renewable Energy*, v. 130, 2019, p. 633-640.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.102>
- ESPITIA-CUBILLOS, ANNY-ASTRID; DELGADO-TOBÓN, ARNOLDO-EMILIO; CAMARGO-VARGAS, SERGIO-ALEJANDRO. Estimación teórica del efecto de la temperatura en la densidad, viscosidad, poder calorífico, capacidad calorífica y gravedad API de biocombustibles. *Scientia et Technica*, v. 24, n. 2, 2019, p. 190-199.
- FOLLEGATTI-ROMERO, LUIS A.; PIANTINO, CARLA R.; GRIMALDI, RENATO; CABRAL, FERNANDO A. Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*) seeds. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 49, n. 3, 2009, p. 323-329.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.03.010>
- GANDUGLIA, FEDERICO. Manual de Biocombustibles. Buenos Aires (Argentina): IICA-ARPEL, 2009, 230 p.
- GE, JUN-CONG; KIM, HO-YOUNG; YOON, SAM-KI; CHOI, NAG-JUNG. Optimization of palm oil biodiesel blends and engine operating parameters to improve performance and PM morphology in a common rail direct injection diesel engine. *Fuel*, v. 260, 2020, e116326.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116326>
- GOH, K.J.; WONG, C.K.; NG, P.H.C. Oil Palm. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*,
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00176-3>
- GUIL-LAYNEZ, JOSÉ-LUIS; GUIL-GUERRERO, JOSÉ-LUIS; GUIL-LAYNEZ, ALVARO. Bioprospecting for seed oils in tropical areas for biodiesel production. *Industrial Crops and Products*, v. 128, 2019, p. 504-511.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.044>
- KODAH, NETE. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*) from lost crop of the Incas to part of the solution to global challenges?. *Planta*, v. 251, n. 4, 2020, p. 22.
<https://doi.org/10.1007/s00425-020-03377-3>
- KUMAR, NIRAJ. Oxidative stability of biodiesel: Causes, effects and prevention. *Fuel*, v. 190, 2017, p. 328-350.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.11.001>
- LAWAM-MUHAMMAD, USMAN; MUHAMMAD-SHAMSUDDIN, IBRAHIM; DANJUMA, ABDURRAHMAN; SULAIMAN-MUSAWA, RABI'U; HAFSAT-DEMBO, UMAR. Biofuels as the Starring Substitute to Fossil Fuels. *Petroleum Science and Engineering*, v. 2, n. 1, 2018, p. 44-49.
<https://doi.org/10.11648/j.pse.20180201.17>
- MALINS, C. Driving deforestation: The impact of expanding palm oil demand through biofuel policy. *Rainforest Foundation Norway Cerology*. 2018. https://www.cerology.com/wp-content/uploads/2018/02/Cerology_Driving-deforestation_Jan2018.pdf [consultado marzo 23 de 2021]
- OCAMPO-PEÑUELA, NATALIA; GARCÍA-ULLOA, JOHN; GHAZOUL, JABOURY; ETTER, ANDRES. Quantifying impacts of oil palm expansion on Colombia's threatened biodiversity. *Biological Conservation*, v. 224, 2018, p. 117-12.
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.05.024>
- OGUNKUNLE, OYETOLA; AHMED, NOOR A. review of global current scenario of biodiesel adoption and combustion in vehicular diesel engines. *Energy Reports*, v. 5, 2019, p. 1560-1579.
<https://doi.org/10.1016/j.egy.2019.10.028>

- PAUCARO-MENACHO, LUZ; SALVADOR-REYES, REBECA; GUILLÉN-SANCHEZ, JHOSELINE; CAPA-ROBLES, JUAN; MORENO-ROJO, CESAR. Estudio comparativo de las características físico-químicas del aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.), aceite de oliva (*Olea europaea*) y aceite crudo de pescado. *Scientia Agropecuaria*, v. 6, n. 4, 2015, p. 279-290.
<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.04.05>
- RAMOS-ESCUADERO, FERNANDO; MUÑOZ, ANA-MARÍA; RAMOS-ESCUADERO, MONICA; VIÑAS-OSPINA, ADRIANA; MORALES, MARIA-TERESA; ASUERO, AGUSTÍN G. Characterization of commercial Sacha inchi oil according to its composition: tocopherols, fatty acids, sterols, triterpene and aliphatic alcohols. *Journal Of Food Science and Technology*, v. 56, 2019, p. 4503–4515.
<https://doi.org/10.1007/s13197-019-03938-9>
- RAMOS-ESCUADERO, FERNANDO; PONCE-DAYER, LADY; BARNETT-MENDOZA, EDY; CELI-SAAVEDRA, LUIS; RAMOS-ESCUADERO, MÓNICA. Perfil de ácidos grasos de aceite de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) en comparación con otros aceites vírgenes comestibles. *Revista Campus*, v. 21, n. 21, 2016, p. 101-108.
- REDDY, A.N.R.; SALEH, A.A.; ISLAM, M.S.; RAHMAN, M.R.; MASJUKI, H.H. Experimental evaluation of fatty acid composition influence on *Jatropha* biodiesel physicochemical properties. *Journal of renewable and sustainable energy*, v. 10, n. 1, 2018, e013103.
<https://doi.org/10.1063/1.5018743>
- SAENGSORN, KIATTIPHUMI; JIMTAISONG, AMPA. Determination of hydrophilic–lipophilic balance value and emulsion properties of sacha inchi oil. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 7, n. 12, 2017, p. 1092-1096.
<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.10.011>
- SANCHEZ-TORRES, JOSÉ-ALCIDES. Determinación de la relación entre parámetros de proceso y rendimiento de obtención de biodiesel a partir de aceites de cocina usados, con base en meta-análisis [Tesis de Maestría en Diseño y Gestión de Procesos]. Bogotá (Colombia): Universidad de la Sabana, Facultad de ingeniería, 2014, 171 p.
- SIA, CHEE-BING; KANSEDO, JIBRAIL; TAN, YIE-HUA; LEE, KEAT-TEONG. Evaluation on biodiesel cold flow properties, oxidative stability and enhancement strategies: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v 24, 2020, e101514.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101514>
- SUNDRAM, SHAMALA; INTAN-NUR, A.M. South American Bud rot: A biosecurity threat to South East Asian oil palm. *Crop Protection*, v. 101, 2017, p. 58-67.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.07.010>
- WANG, SUNAN; ZHU, FAN; KAKUDA, YUKIO. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.): Nutritional composition, biological activity, and uses. *Food Chemistry*, v. 265, 2018, p. 316–328. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.055>
- YASAR, FEVZI. Comparison of fuel properties of biodiesel fuels produced from different oils to determine the most suitable feedstock type. *Fuel*, v. 264, 2020, e116817.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116817>
- YATE, ANDREA V.; NARVÁEZ, PAULO C.; ORJUELA, ALVARO; HERNÁNDEZ, ADRIANA; ACEVEDO, HELMER. A systematic evaluation of the mechanical extraction of *Jatropha curcas* L. oil for biofuels production. *Food and Bioproducts Processing*, v. 122, 2020, p. 72-81.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.04.001>
- ZHOU, JIEXIN; MA, YANLI; JIA, YIJIA; PANG, MINGJIE; CHENG, GUIGUANG; CAI, SHENGBAO. Phenolic profiles, antioxidant activities and cytoprotective effects of different phenolic fractions from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) fruits treated by ultra-high pressure. *Food Chemistry*, v. 288, 2019, p. 68-77.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.002>
- ZULETA, ERNESTO C.; RIOS, LUIS A.; BENJUMEA, PEDRO-N. Oxidative stability and cold flow behavior of palm, sacha-inchi, *jatropha* and castor oil biodiesel blends. *Fuel Processing Technology*, v. 102, 2012, p. 96-101.
<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.04.018>

Digestibilidad de hidrolizados enzimáticos de vísceras de origen animal en *Piaractus brachypomus*, Cuvier 1818*

Digestibility of enzymatic hydrolyzates from animal origin viscera in *Piaractus brachypomus*, Cuvier 1818

PEREA-ROMÁN, CRÍSPULO¹; GARCES-CAICEDO, YENY-JUDITH²; MORALES-BRAVO, YERIKA-JESLANNY³; JIMENEZ-CHAMORRO, MARLY-ANDREINA⁴; HOYOS-CONCHA, JOSÉ-LUÍS⁵; VIVAS-QUILA, NELSON-JOSÉ⁶

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 28 septiembre 2020.

Aprobado para publicación: 2 marzo 2021.

* Proyecto de investigación de origen: "Aprovechamiento de vísceras de pollo mediante hidrólisis enzimática como alternativa nutricional en piscicultura de aguas cálidas". Financiación: MINCIENCIAS con recursos provenientes del patrimonio autónomo fondo nacional de financiamiento para la ciencia, la tecnología y la innovación Francisco José de Caldas. Culminación: 17 de mayo de 2019 al 17 de noviembre de 2021.

- 1 Universidad del Cauca, Departamento de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agrarias, grupos de investigación ASUBAGROIN y NUTRIFACA. Doctor en Ciencias Agrarias. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-9604-4264>
- 2 Universidad del Cauca, Departamento de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agrarias, grupos de investigación ASUBAGROIN y NUTRIFACA. Magíster en Ciencias Agrarias. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-0491-3347>
- 3 Universidad del Cauca, Departamento de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agrarias, grupos de investigación ASUBAGROIN y NUTRIFACA. Ingeniera Agropecuaria. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-9669-9295>
- 4 Universidad del Cauca, Departamento de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agrarias, grupos de investigación ASUBAGROIN y NUTRIFACA. Ingeniera Agropecuaria. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-6610-7228>
- 5 Universidad del Cauca, Departamento de Agroindustria, Facultad de Ciencias Agrarias, grupo de investigación ASUBAGROIN. Doctor en Ingeniería de Alimentos. Popayán, Colombia. <http://orcid.org/0000-0001-9025-9734>
- 6 Universidad del Cauca, Departamento de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agrarias, grupo de investigación NUTRIFACA. Doctor en Ciencias Agrarias. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-0165-2863>

* Correspondencia: e-mail: cproman@unicauca.edu.co; cperear@unal.edu.co

RESUMEN

La alimentación representa el rubro principal en la producción piscícola, por lo anterior, se evaluó la digestibilidad mediante principio de aditividad de hidrolizados enzimáticos de origen animal en Cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) como alternativa nutricional. Para ello, se utilizó una dieta control y tres mezclas, en las mezclas se sustituyó el 30 % de la dieta control por hidrolizado de vísceras de pollo, cerdo y trucha respectivamente, las cuales se suministraron a 120 cachamas con peso promedio de $145,40 \pm 3,17$ g, los peces fueron distribuidos mediante un diseño completamente al azar (DCA) en 12 tanques cilindro cónicos y se sometieron a colecta de heces para determinación de la digestibilidad de nutrientes, energía y la absorción de minerales. Se presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para la digestibilidad aparente de proteína cruda, energía bruta, fibra cruda, absorción de cenizas, calcio, fósforo y energía digestible de acuerdo al tipo de hidrolizado evaluado y en relación con la dieta control. Los resultados evidenciaron que los hidrolizados presentan alto valor nutricional debido a que la digestibilidad de nutrientes y la energía fueron superior al 80 %, por consiguiente, los hidrolizados enzimáticos de vísceras de origen animal constituyen una alternativa proteica y energética en la alimentación de peces.

ABSTRACT

Feeding represents the core business in fish production, therefore, digestibility was evaluated by a principle of additivity of enzymatic hydrolyzates from animal origin in White Cachama (*Piaractus brachyomus*) as a nutritional alternative. For this purpose, we used a control diet and three mixtures. In the case of mixtures, 30 % of the control diet was replaced by hydrolyzed chicken, pork and trout viscera respectively; which were supplied to 120 juveniles of white Cachama with an average weight of $145,40 \pm 3,17$ g, fish were distributed by means of a complete randomized design (DCA) in 12 conical cylinder tanks and were collected for stool by sedimentation to determine the digestibility of nutrients, energy and mineral absorption. Significant differences ($p < 0,05$) were presented for the apparent digestibility of crude protein, crude energy, crude fiber, absorption of ash, calcium, phosphorus and digestible energy according to the type of enzymatic hydrolyzates evaluated and in relation to the control diet. The results showed that the hydrolyzates have a high nutritional value because

PALABRAS CLAVE:

Alternativa nutricional; Principio de aditividad; Vísceras de pollo; Vísceras de cerdo; Vísceras de trucha; Cachama blanca; Hidrólisis; Digestibilidad aparente; Alimento proteico; Alimento energético.

KEYWORDS:

Nutritional alternative; Additivity principle; Chicken viscera; Pig viscera; Trout viscera; White cachama; Hydrolysis, Apparent digestibility; Protein food; Energy food.

Cómo citar este artículo: PEREA-ROMÁN, CRÍSPULO; GARCES-CAICEDO, YENY-JUDITH; MORALES-BRAVO, YERIKA-JESLANNY; JIMENEZ-CHAMORRO, MARLY-ANDREINA; HOYOS-CONCHA, JOSÉ-LUÍS; VIVAS-QUILA, NELSON-JOSÉ. Digestibilidad de hidrolizados enzimáticos de vísceras de origen animal en *Piaractus brachyomus*, Cuvier 1818. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 20, n. 1, 2022, p. 54-67. Doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1606>

the digestibility of nutrients and energy were greater than 80 %. Therefore, enzymatic hydrolyzates from animal viscera are a protein and energy alternative in fish feed.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura genera más de 51.308 empleos directos, 153.923 empleos indirectos y contribuye con el 0,19 % del producto interno bruto (PIB) en Colombia. Para el año 2019, la producción piscícola en Colombia alcanzó las 165.444 t, de la cuales, la cachama aporta el 19 % según el Ministerio De Agricultura Y Desarrollo Rural (MADR, 2020). El departamento del Cauca cuenta con potencial para el desarrollo de la acuicultura, en especial la producción de Cachama blanca, sin embargo, el elevado precio de los concentrados ha limitado su producción.

En el sector piscícola, entre las mayores limitantes está la baja disponibilidad de materias primas de alta calidad para producción de concentrado tanto proteico como energética, debido a que representan entre 67 y 70 % del costo operacional; además, la falta de conocimiento de la digestibilidad de los nutrientes y energía de los alimentos, han desencadenado problemas en este sector, ya que en los últimos años su rentabilidad y crecimiento han venido disminuyendo; por esto, se hace necesario buscar alternativas nutricionales regionales más económicas, que puedan ser utilizadas en el balance de dietas para peces (Perea *et al.*, 2018; Corrêa *et al.*, 2020).

Una importante cantidad de residuos que corresponden a vísceras blancas son generados en el procesamiento de Trucha arcoíris, pollo de engorde y porcinos con 13,0, 9,5 y 4,15 % respectivamente, los que no están siendo aprovechados y su disposición inadecuada genera considerables impactos ambientales (Wei *et al.*, 2020; Dos santos *et al.*, 2021). Una solución es la utilización de estos residuos a través de la fabricación de hidrolizados o ensilajes que pueden ser utilizados en la formulación de dietas para la alimentación de peces, ya que presenta un alto contenido nutricional tanto proteico como energético (Banze *et al.*, 2017). Sin embargo, es importante conocer como los peces pueden aprovechar los nutrientes y la energía que presentan estas alternativas nutricionales usando, por ejemplo, la técnica de digestibilidad aparente para conocer y cuantificar la cantidad de nutrientes disponibles y que el animal es capaz de digerir (Perea *et al.*, 2017).

El uso de hidrolizados como alternativa nutricional en piscicultura se debe principalmente a la necesidad de encontrar materias primas con alto valor nutritivo y biológico; además de su contribución en la disminución de los costos de producción y en la reducción de los efectos adversos en el medio ambiente (Perea *et al.*, 2018). Alrededor del mundo se han realizado diversos estudios con subproductos de origen animal como son vísceras de pescado, aves y cerdo para la alimentación de muchas especies animales, principalmente en especies menores (Banze *et al.*, 2017; Montoya *et al.*, 2017; Tanuja *et al.*, 2017), un ejemplo de ello es el estudio realizado con harina de subproductos avícolas en la alimentación de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) (Campos *et al.*, 2018), también el uso de ensilado ácido de pescado en pacu (*Piaractus mesopotamicus*) y tambacu (*Colossoma macropomum* × *Piaractus mesopotamicus*) (Corrêa *et al.*, 2020); además, la inclusión de harina de ensilado biológico de desechos de pescado (tambaqui) en aves de postura (Guimarães *et al.*, 2019) y el uso de harina de ensilado carnico en *Clarias gariepinus* (Llanes *et al.*, 2017).

Por lo anterior, se evaluaron tres hidrolizados de vísceras de origen animal (trucha, cerdo y pollo) en la alimentación de juveniles de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) en fase de engorde donde hay mayor consumo de alimento y, por ende, mayores costos en la alimentación, mediante la determinación de la digestibilidad aparente de nutrientes (materia seca, proteína cruda, extracto etéreo y fibra cruda), absorción aparente de los minerales (cenizas, calcio, fósforo), digestibilidad de la energía bruta y energía digestible de cada uno de los hidrolizados, para destacar su potencial nutricional como alternativa en la alimentación piscícola.

MÉTODO

A continuación, se describen los materiales y métodos que se utilizaron para la evaluación de la digestibilidad aparente de hidrolizados de origen animal en la alimentación de Cachama blanca.

Localización

El estudio se llevó a cabo en la caseta de bioensayos en peces del laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad del Cauca, localizado en la vereda las Guacas del municipio de Popayán, Cauca entre los 02°45'08,91" Latitud Norte y 76°55'10,86" Longitud Oeste, a una altura promedio de 1.737 msnm, temperatura promedio de 19 °C y precipitación de 1.800 mm anuales.

Material biológico

En la investigación se utilizaron vísceras de Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), de pollos de engorde (*Gallus domesticus* L.) e intestinos de cerdo (*Sus scrofa domesticus*), las cuales fueron obtenidas de plantas de sacrificio locales, con el fin de garantizar el estado sanitario y de frescura necesarios para la preparación de los hidrolizados. En el ensayo se utilizaron 120 juveniles monosexo de Cachama blanca con un peso promedio de 145,40 ± 3,17 g, los cuales fueron suministrados por una piscifactoría local garantizando así un adecuado estado sanitario.

Preparación de los hidrolizados y las mezclas

Para la preparación de los hidrolizados, a la matriz hidrolizado de vísceras de trucha HVT (100 % de vísceras enteras de trucha), hidrolizado de vísceras de pollo HVP (80 % de vísceras blancas de pollo enteras + 20 % de vísceras de trucha enteras), hidrolizado de vísceras de cerdo HVC (70 % de vísceras blancas de cerdo molidas + 30 % de vísceras de trucha enteras), se le adicionaron 2,5 % ácido fórmico al 85 % p/v, 0,25 % benzoato de sodio y 0,1 % butilhidroxitolueno – BHT; posteriormente, los tratamientos se mezclaron para iniciar el proceso de hidrólisis y se almacenaron en recipientes plásticos cerrados en proporciones de 40 kg, con un espacio de cabeza del 30 % (Perea *et al.*, 2017), a temperatura ambiente, durante 12 días para HVT – HVP y 18 días de almacenamiento para HVC, tiempo en el cual finaliza la hidrólisis y se obtiene un producto estable química y nutricionalmente. En el HVP y HVC las vísceras de trucha se adicionaron para acelerar el proceso de hidrólisis, debido a la baja actividad enzimática en que presentan las vísceras de pollo y los intestinos de cerdo.

Para la evaluación de la digestibilidad de los hidrolizados mediante el principio de aditividad o método de sustitución (Cho *et al.*, 1982), se utilizó una dieta control T0 (sin inclusión de hidrolizados de origen animal) y tres mezclas a las cuales se le adicionaron hidrolizados como se describe a continuación: para el tratamiento T1 (70 % de T0 + 30 % de HVT), para el T2 (70 % de T0 + 30 % de HVP) y para el T3 (70 % de T0 + 30 % de HVC) (Cuadro 1).

Para la preparación de la dieta y las mezclas, todas las materias primas (harina de pescado, torta de soya, harina de maíz amarillo, mogolla de trigo, harina de yuca, harina de trigo, aceite vegetal, entre otras) fueron pasadas por un tamiz de 425 µm y se homogenizaron en una mezcladora SIMAG SM-401 durante 20 minutos. Posteriormente, se agregaron los restantes ingredientes, el óxido crómico–Cr₂O₃ a razón del 1 % del total formulado y se continuó mezclado durante 30 minutos, para su posterior extrusión a 123 °C en un extrusor doble tornillo marca Hake PolyLab, obteniendo pellets de 5 mm de longitud, 4,5 mm de diámetro y entre 8 y 10 % de humedad (Perea *et al.*, 2017).

Cuadro 1. Composición nutricional de la dieta y de los hidrolizados evaluados (g kg⁻¹ peso seco).

Ingredientes	T0	T1	T2	T3
Harina de pescado	222	700	700	700
Harina de trigo	39			
Salvado de maíz	160			
Harina de yuca	81,1			
Torta de soya	140			
Harina de maíz amarillo	90			
Mogolla de trigo	151,9			
Aceite vegetal	4,99			
Fosfato bicálcico	8,8			
Biomix ¹	20			
DL-metionina	3,9			
Triptófano	3,4			
Carboximetilcelulosa	10			
Sal	10			
Oxido crómico–Cr ₂ O ₃	10			
Hidrolizado de residuos de animales (HVT ² , HVP ³ y HVC ⁴ , respectivamente)	0,0	300	300	300
Total	1000	1000	1000	1000
Composición nutricional (g kg ⁻¹ peso seco)				
Variable	Dieta control	HVT	HVT	HVC
Proteína cruda	262	249,8	268,6	261,1
Extracto etéreo	94	595	485,2	509,5
Fibra cruda	23	1,4	5,2	3,1
Cenizas	102	6,6	44,9	26,3
Energía digestible (kcal/kg) ⁵	3101	6897,1	6032,3	6347,6
Calcio	15	10,4	4	5,5
Fósforo	10	34,0	18,2	15,5

¹Premezcla de vitaminas, minerales y aditivos – Biomix S.A© (Composición por kilogramo de producto): Vitamina A (800.000 UI); vitamina D3 (300.000 UI); vitamina E (11,0 g); vitamina K (2,2 g); vitamina B12 (0,01 g); tiamina (0,6 g); riboflavina (3,6 g); piridoxina (5,6 g); biotina (0,08 g); ácido pantoténico (6,8 g); niacina (5,6 g); ácido fólico (1,0 g); vitamina C (25,0 g); cloruro de colina (70,0 g); yodo (0,3 g); selenio (0,05 g); hierro (6,0 g); cobre (1,2 g); zinc (16,0 g); manganeso (7,0 g); cobalto (0,1 g); Antioxidante (30,0 g). ²HVT (100 % de vísceras enteras de trucha). ³HVP (80 % de vísceras blancas de pollo enteras + 20 % de vísceras enteras de trucha). ⁴HVC (70 % de vísceras blancas de cerdo molidas + 30 % de vísceras de trucha enteras). ⁵ED (Kcal/Kg MS) = 4151- (122* % Cen) + (23* % PB) + (38* % EE)-(64*FC).

Determinación de la digestibilidad *in vivo* de los hidrolizados

Se evaluó la digestibilidad aparente de la Materia Seca (DAMS), Proteína Cruda (DAPC), Extracto Etéreo (DAEE), Fibra Cruda (DAFC), Energía Bruta (DAEB), Absorción de Cenizas (AACEN), Absorción de Calcio (AACa), Absorción de Fósforo (AAP) y Energía Digestible Aparente (EDA), para lo cual los peces fueron evaluados en 12 tanques cilindro cónicos con capacidad de 250 L de volumen útil, incorporando 10 animales en cada uno, provistos de termostatos para mantener la temperatura en 26 °C, semejando las condiciones del agua de la piscifactoría donde se obtuvieron los peces; las heces se recolectaron una vez al día (7:00 h), por sedimentación a través del retiro de colectores adaptados en la parte inferior cónica de los tanques durante 20 días. Las heces húmedas recolectadas se centrifugaron a 4.500 rpm durante 20 minutos, posteriormente fueron empacadas en bolsas plásticas con cierre hermético y se almacenaron en un congelador a -18 °C (Puerta *et al.*, 2017).

A la dieta control, mezclas y muestras de heces se les determinó el contenido de Materia Seca (AOAC, 1990), Cenizas (AOAC, 1990), Proteína Cruda (Kjeldahl, 1883), Extracto Etéreo (AOAC, 1990), Fibra Cruda (AOAC, 1990), Energía Bruta con bomba calorimétrica de chaqueta CAL2k®, Calcio (AOAC, 2005) y Fósforo (AOAC, 1990). La cuantificación del óxido crómico se realizó por espectrofotometría de absorción atómica. La digestibi-

lidad de nutrientes y de los hidrolizados se determinó a través de las ecuaciones 1 y 2, como lo plantea Austreng (1978) y Cho *et al.* (1982) y la energía digestible aparente usando la ecuación 3 según Hidalgo y Valerio (2020).

$$\text{Digestibilidad de nutrientes (\%)} = 100 - 100 \left(\frac{\% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ en la mezcla}}{\% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ en las heces}} \times \frac{\% \text{ Nutrientes en las heces}}{\% \text{ Nutrientes en la mezcla}} \right) \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\text{Digestibilidad de hidrolizados (\%)} = \left(\frac{\text{Digestibilidad de la mezcla} - (\text{Digestibilidad del control} * \% \text{ inclusión del control})}{\% \text{ inclusión del hidrolizado}} \right) \quad (\text{Ec. 2})$$

$$\text{Energía digestible aparente (EDA)} = (\text{Energía bruta}) \times (\% \text{ de digestibilidad de la energía}) \quad (\text{Ec. 3})$$

Plan de manejo

Antes de la evaluación, los tanques, pisos, paredes y equipos fueron lavados y desinfectados con hipoclorito de sodio a razón de 100 ppm. Para el tratamiento profiláctico se preparó una mezcla de azul de metileno en concentración de 0,05 g L⁻¹ de agua, de esta solución se adicionaron 100 mL en cada tanque durante cinco días y se realizó un recambio de agua a razón de 80 % día (Perea *et al.*, 2017). Durante la evaluación se llevaron registros de recolección de heces, temperatura, consumo de alimento y biometría. La dieta y las mezclas extruidas se almacenaron en recipientes plásticos con tapa para evitar humedad. Los peces fueron alimentados tres veces al día (8:00 h, 12:00 h y 16:00 h), hasta la saciedad aparente (Perea *et al.*, 2018) y su manejo se realizó teniendo en cuenta lo estipulado en la ley 84 de 1989, en la cual se adopta el estatuto de protección de los animales para investigación en Colombia.

La calidad fisicoquímica del agua fue monitoreada cada 15 días por la metodología NANOCOLOR® con el PHOTOMETER PF-11, verificando su cumplimiento de acuerdo con los requerimientos de la especie. Los parámetros evaluados fueron oxígeno disuelto, pH, alcalinidad de carbonatos, demanda química de oxígeno, demanda biológica de oxígeno, amonio, nitritos y nitratos, también la temperatura con un termómetro digital de punzón.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para la evaluación de la digestibilidad aparente de cada uno de los nutrientes se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), evaluando cuatro tratamientos, tres mezclas con inclusión de hidrolizados de residuos animales (T1, T2 y T3) y la dieta control (T0) sin inclusión de hidrolizado; cada tratamiento contó con tres réplicas y cada réplica se tomó como una unidad experimental. Cada una de las variables fue analizada mediante la aplicación de un análisis de varianza ($p < 0,05$) aplicando el test de Duncan (1975) para la comparación de las medias, tomando un valor de ($\alpha < 0,05$) como diferencia significativa para destacar cuál o cuáles de los tratamientos presentaron un mejor comportamiento, empleando el programa SAS (Statistical Analysis System) versión 9,4.

RESULTADOS

Durante el periodo de evaluación, la sobrevivencia fue del 100 %, las condiciones fisicoquímicas del agua estuvieron acordes con las necesidades de la especie estudiada (Ramírez *et al.*, 2019); la temperatura promedio del agua registrada fue de $26,4 \pm 0,7$ °C; pH de $6,8 \pm 0,0$; oxígeno disuelto $5,1 \pm 0,0$ mg L⁻¹; demanda química de oxígeno (DQO) y demanda biológica de oxígeno (DBO₅) de $1,5 \pm 0,0$ y $3,98 \pm 0,1$ mg L⁻¹ respectivamente; la alcalinidad de carbonatos fue de $0,9$ mmol L⁻¹ $\pm 0,0$; nitritos $0,1 \pm 0,0$ mg L⁻¹; nitratos de $0,6$ mg L⁻¹ y el amonio $1,3 \pm 0,2$ mg L⁻¹.

Caracterización fisicoquímica y microbiológica de los hidrolizados

Los resultados obtenidos del seguimiento fisicoquímico y microbiológico de los hidrolizados se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de los hidrolizados de vísceras de pollo, cerdo y trucha.

Variable	Hidrolizado de pollo	Hidrolizado de cerdo	Hidrolizado de trucha
pH	3,37 ± 0,03	3,16 ± 0,01	3,51 ± 0,11
Acidez titulable (%)	3,37 ± 0,13	3,55 ± 0,06	3,16 ± 0,26
Consistencia (cm/30 s)	17,9 ± 0,12	10,3 ± 0,2	30,0 ± 0,0
Mesófilos aerobios (UFC ¹ /g)	0,0	0,0	0,0
Mohos y levaduras (UFC/g)	0,0	0,0	0,0
Coliformes totales (NMP ² /g)	0,0	0,0	0,0

¹UFC: Unidades Formadora de Colonia. ²NMP: Número Más Probable.

Los resultados obtenidos DEL pH fueron inferiores a 4,0 lo que permite la estabilidad del producto evitando el deterioro por la acción de microorganismos indeseables que generan putrefacción, garantizando un proceso adecuado de hidrólisis (Hoyos *et al.*, 2018). Los valores presentados en este estudio fueron inferiores a los encontrados por Llanes *et al.* (2019) con ensilado cárnico con valores de 4,7 y similares a los evaluados por Perea *et al.* (2017) con ensilaje de residuos de trucha para alimentación animal con valores de 3,26 y a los citados por Ozyurt *et al.* (2020) en ensilaje ácido de residuos de peces con 3,82 e inferiores a los citados por Bringas *et al.* (2018) en ensilado de subproductos de tilapia donde reportaron valores de 4,35.

En cuanto la acidez titulable, en este estudio se presentaron valores inferiores a 4,0 lo que permite una apropiada hidrólisis puesto que a un pH por debajo de 4,0 produce la suficiente acidez para impedir la proliferación de microorganismos indeseables que afecta la calidad de los hidrolizados (Hoyos *et al.*, 2018) como sucedió en este estudio al no presentar recuentos de microorganismos. Los resultados encontrados en el presente estudio fueron superiores a los citados por Perea *et al.* (2017) en ensilaje de residuos de trucha para alimentación animal en el que encontraron valores 3,10; y a los presentados por Bringas *et al.* (2018) con ensilaje fermentado de subproductos de tilapia en el cual citaron valor de 2,43.

Se observó que el hidrolizado de vísceras de cerdo presentó el valor más bajo de consistencia debido probablemente a la estructura de las vísceras, las cuales presentaron mayor dureza a pesar del proceso de molienda y al contenido de grasas saturadas que ostentan una consistencia sólida principalmente, por el contrario, para el hidrolizado de vísceras de trucha, la consistencia fue elevada, posiblemente por la rápida acción de enzimas proteolíticas presentes en las vísceras, debido a que es una especie de hábito alimenticio carnívora y a que los lípidos presentes son insaturados, lo cual hace que sean mayoritariamente líquidos.

Digestibilidad aparente de la dieta control y de los hidrolizados

Los resultados obtenidos en las variables de digestibilidad aparente de los nutrientes, energía y asimilación de minerales de la dieta y las mezclas se presentan en el Cuadro 3. Los tratamientos presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para las variables digestibilidad aparente de la proteína cruda, digestibilidad aparente de la energía bruta, absorción aparente de calcio y absorción aparente de fósforo.

Cuadro 3. Digestibilidad aparente de los nutrientes, energía y asimilación de minerales de la dieta y las mezclas en Cachama blanca (%).

Variable	T0 ¹	T1 ²	T2 ³	T3 ⁴	ANOVA Pr > F
Digestibilidad Aparente de la Materia Seca (DAMS)	91,76 ± 0,65 ^a	91,84 ± 0,78 ^a	91,41 ± 0,46 ^a	92,08 ± 0,58 ^a	0,6371
Digestibilidad Aparente del Extracto de Etéreo (DAEE)	86,51 ± 2,26 ^a	88,97 ± 0,13 ^a	88,42 ± 0,13 ^a	89,24 ± 0,21 ^a	0,0692
Digestibilidad Aparente de la Proteína Cruda (DAPC)	80,53 ± 1,45 ^b	84,20 ± 0,17 ^a	82,82 ± 0,36 ^a	83,97 ± 0,12 ^a	0,0013
Digestibilidad de la Energía Bruta (DAEB)	60,92 ± 2,95 ^b	68,44 ± 0,40 ^a	66,72 ± 0,24 ^a	68,70 ± 0,28 ^a	0,0007
Absorción Aparente de Cenizas (AACEN)	43,01 ± 2,72 ^a	43,27 ± 0,27 ^a	42,42 ± 0,39 ^a	43,84 ± 0,18 ^a	0,4761
Absorción Aparente de Calcio (AACa)	23,00 ± 5,08 ^b	38,69 ± 0,20 ^a	38,46 ± 0,00 ^a	38,86 ± 0,10 ^a	0,0001
Absorción Aparente de Fósforo (AAP)	49,53 ± 0,78 ^c	54,36 ± 0,13 ^a	53,22 ± 0,26 ^b	54,49 ± 0,13 ^a	0,0001

Letras diferentes en la misma fila, difieren estadísticamente ($p < 0,05$).

¹Dieta control sin inclusión de hidrolizados de origen animal – T0, ²Mezcla con 70 % dieta T0 y 30 % de hidrolizado de vísceras de trucha–T1, ³Mezcla con 70 % dieta T0 y 30 % de hidrolizado de vísceras de pollo–T2, ⁴Mezcla con 70% dieta T0 y 30% de hidrolizado de vísceras de cerdo–T3.

Pese a que las mezclas suministradas a los animales no se encontraban balanceadas debido a la metodología aplicada, se puede observar que no existen diferencias significativas en la digestibilidad aparente de la materia seca, extracto etéreo y absorción aparente de cenizas en comparación a la dieta control que estaba balanceada (Cuadro 3), indicando que los hidrolizados de origen animal poseen un alto valor nutricional; además, al convertirse en una materia prima para la alimentación animal, se disminuye el impacto negativo en el medio ambiente (Guimarães *et al.*, 2019). Sin embargo, para la digestibilidad aparente de la proteína cruda, energía bruta y absorción aparente del calcio y el fósforo, las mezclas obtuvieron estadísticamente mayores porcentajes de absorción de estos nutrientes por parte de los peces, debido a que estos componentes de origen animal poseen alta calidad nutricional y valor biológico frente a las materias primas vegetales.

El principio de aditividad o método de sustitución es una técnica importante en la valoración de la calidad nutricional de alimentos porque permite conocer específicamente la cantidad de cada uno de los nutrientes y la energía que el animal es capaz de asimilar de una materia prima que se incluye en una dieta, y con ello analizar en detalle el potencial nutricional que presenta. En el Cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos de la digestibilidad aparente de nutrientes, energía, y absorción de minerales de los hidrolizados de origen animal (pollo, cerdo y trucha) obtenidos mediante el principio de aditividad.

Cuadro 4. Digestibilidad aparente de nutrientes, energía y asimilación de minerales de hidrolizados de vísceras de origen animal en Cachama blanca (%).

Variable	HVP	HVC	HVT	ANOVA Pr > F
Digestibilidad Aparente de la Materia Seca–DAMS	92,02 ± 2,6 ^a	90,60 ± 1,5 ^a	92,85 ± 1,9 ^a	0,5339
Digestibilidad Aparente del Extracto de Etéreo–DAEE	94,7 ± 0,4 ^a	92,88 ± 0,4 ^b	95,60 ± 0,7 ^a	0,0001
Digestibilidad Aparente de la Fibra Cruda–DAFC	41,93 ± 1,0 ^a	39,13 ± 1,2 ^b	43,98 ± 0,9 ^a	0,0001
Digestibilidad Aparente de la Proteína Cruda–DAPC	92,74 ± 0,6 ^a	88,15 ± 1,2 ^b	91,99 ± 0,4 ^a	0,0001
Digestibilidad de la Energía Bruta–DAEB	85,98 ± 1,3 ^a	80,27 ± 0,8 ^b	86,85 ± 0,9 ^a	0,0001
Absorción Aparente de Cenizas–AACEN	51,08 ± 0,9 ^a	48,24 ± 1,3 ^b	52,99 ± 0,6 ^a	0,0001
Absorción Aparente de Calcio–AACa	61,68 ± 0,7 ^{ab}	60,93 ± 0,0 ^b	62,25 ± 0,3 ^a	0,0001
Absorción Aparente de Fósforo–AAP	60,82 ± 0,4 ^a	57,04 ± 0,9 ^b	61,27 ± 0,4 ^a	0,0008

Letras diferentes en la misma fila, representan diferencias significativas ($p < 0,05$).

¹Hidrolizado de vísceras de pollo–HVP, ²Hidrolizado de vísceras de cerdo–HVC, ³Hidrolizado de vísceras de trucha–HVT.

No se presentaron diferencias significativas en los valores de digestibilidad de la materia seca ($p < 0,05$) de acuerdo al hidrolizado de vísceras de origen animal evaluado (Cuadro 4), sin embargo, se presentaron diferencias significativas para la digestibilidad aparente del extracto etéreo, fibra cruda, proteína cruda, energía bruta y para absorción aparente de cenizas, calcio y fósforo ($p < 0,05$).

La digestibilidad aparente de la materia seca estuvo por encima del 90 % (Cuadro 4), debido a que los hidrolizados presentan un alto contenido de materia seca digestible, lo que se traduce en una cantidad considerable de nutrientes que potencialmente pueden ser aprovechados por el animal. La digestibilidad aparente de la materia seca de subproductos de origen animal es superior a la de materias primas de origen vegetal debido a la presencia de fibra en éstas últimas, la cual no es digerible en los peces Puerta *et al.* (2017). Los resultados encontrados en el presente estudio para la DAMS, fueron superiores a los citados en Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) por Fontinha *et al.* (2021) entre 73,8 y 81,4 % con harina de subproductos avícolas y a los referenciados en Cachama blanca por Puerta *et al.* (2017) 67,37 y 16,03 % con materias primas como *Thitonia diversifolia* y *Cratylia argentea* respectivamente.

La digestibilidad aparente del extracto etéreo estuvo por encima del 92 %, encontrándose que los hidrolizados de pollo y trucha fueron superiores al hidrolizado de cerdo (Cuadro 4), debido principalmente a la calidad de ácidos grasos poliinsaturados (oleico y linoleico principalmente) que presentan, los cuales son fácilmente aprovechados por la cachama, debido a los dobles enlaces que poseen (Perea *et al.*, 2017); además, el proceso de hidrólisis modifica las características de los nutrientes haciéndolos más disponibles, en este caso, el contenido de lípidos presentes en el hidrolizado ayuda a reducir la solubilización excesiva de la proteína que permite mejorar su calidad y facilita la estabilidad (Soares *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos en la DAEE son superiores a los registrados en dietas con inclusión de harina de subproductos avícolas, obtuvieron una digestibilidad entre 85,67 y 93,33 % por Hekmatpour *et al.* (2018) en *Sparidentex hasta*, y a los reportados por Llanes *et al.* (2019) con ensilaje químico en Tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*) con 86,5 %.

Los coeficientes de digestibilidad aparente de la fibra para los hidrolizados de pollo y trucha (> 41 %) fueron superiores al hidrolizado de cerdo (Cuadro 4); estos valores de DAFc podrían atribuirse a que son subproductos de origen animal los cuales no poseen fibra, el mínimo contenido encontrado se debe a los residuos de alimento (celulosa, hemicelulosa y lignina) que se encontraban en el tracto digestivo de los animales (Puerta *et al.*, 2017), por consiguiente, al realizar el proceso de hidrólisis de las vísceras se facilita el aprovechamiento de la fibra en peces omnívoros como la Cachama blanca (Mendoza *et al.*, 2013).

Los valores de digestibilidad aparente de la proteína cruda son elevados, superiores al 88 %, debido a la calidad nutricional del hidrolizado teniendo en cuenta que en el proceso de hidrólisis existe un efecto de ruptura de las proteínas, generando cadenas polipeptídicas de diferente longitud y aminoácidos libres que son fácilmente absorbidos en el intestino proximal de la cachama (López *et al.*, 2015). El hidrolizado de vísceras de cerdo presentó la menor DAPc, debido probablemente a la estructura de las vísceras que presentaron menor consistencia $10,3 \pm 0,2 \text{ cm s}^{-1}$ frente a $17,9 \pm 0,12 \text{ cm s}^{-1}$ para el hidrolizado de pollo y $30,0 \pm 0,0 \text{ cm s}^{-1}$ para el hidrolizado de trucha (Cuadro 2), lo que pudo generar menor cantidad de aminoácidos y péptidos libres durante el proceso de hidrólisis, disminuyendo la capacidad de un mayor aprovechamiento por la Cachama blanca (Davies *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos son superiores a los reportados por Paz *et al.* (2016) al evaluar la digestibilidad de dietas con harina de hidrolizado de pescado en arawana (*Osteoglossum bicirrhossum*) en el cual reportan 81,2 %, a los citados por López *et al.* (2015) en hidrolizados de vísceras de pescado en alevinos de Cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) con 85 %, a los reportados por Javaherdoust *et al.* (2020) al evaluar proteína hidrolizada de víscera de rainbow trout en el que citan 83–90 % y a los obtenidos por Banze *et al.* (2017) con ensilado ácido de vísceras de atún en *Rhamdia quelen* donde reportan 88,12 % para DAPc.

Los valores elevados encontrados en la absorción aparente de cenizas se deben a la utilización de ácidos orgánicos (fórmico) en el proceso de hidrólisis, los cuales mejoran el aprovechamiento de los minerales por el animal, debido a la solubilidad generada por a la acidez, por consiguiente, los altos coeficientes de absorción de cenizas obtenidas en los hidrolizados de pollo y trucha podrían estar relacionados con la menor acidez titulable obtenida (Paz *et al.*,

2016). Por otro lado, las materias primas con alto contenido de cenizas podrían afectar la digestibilidad de otros nutrientes (proteína) en la dieta, lo que influiría directamente en el crecimiento de los peces, por ello, es importante que el contenido de cenizas en un ingrediente se mantenga inferior al 12 %. Los valores de AACEN encontrados en este estudio, son inferiores a los obtenidos por Llanes *et al.* (2019) en Tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*) alimentadas con ensilaje biológico de residuos pesqueros encontrando valores de 60,85 % y a los obtenidos por Llanes *et al.* (2011) en Tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*) alimentados con ensilados químico y biológico de residuos de fileteado de tilapias (60,63 y 62,85 % respectivamente).

Los elevados valores de la absorción aparente del calcio y el fósforo (Cuadro 4), se pueden atribuir al efecto del ácido orgánico presente en los hidrolizados (ácido fórmico), el cual mejoró su disponibilidad por el efecto acidificante que solubilizó los minerales. Los resultados obtenidos son superiores a los reportados por Huan *et al.* (2018) con dietas combinadas sin harina de pescado mejorando la digestibilidad de tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) encontrando valores para la AACa de 36,13 % y de 55,70 % para la AAP, y similares a los reportados por Llanes *et al.* (2019) en Tilapias rojas (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*) quienes evaluaron crecimiento con dietas semihúmedas a base residuos pesqueros, con valores para la AACa de 51,55 % y de 65,12 % para la AAP.

En Cuadro 5 se puede apreciar la energía digestible aparente obtenida en juveniles de Cachama blanca, a partir de la fórmula establecida (Briones, 2019), resaltando que los hidrolizados de vísceras de animales presentan un alto contenido de energía digestible, la cual se aprovechó entre el 80,3 y 86,9 %.

Cuadro 5. Energía Digestible Aparente (EDA) de hidrolizados de vísceras de origen animal en Cachama blanca.

Tratamientos	Energía Bruta (Kcal kg ⁻¹ peso seco)	Digestibilidad de la energía (%)	Energía digestible Aparente (EDA ⁴) (Kcal kg ⁻¹ peso seco)
HVP ¹	5922,5 ± 207,7	86,0 ± 1,3 ^a	5092,0 ± 77,9
HVC ²	6585,5 ± 35,5	80,3 ± 0,8 ^b	5286,1 ± 53,1
HVT ³	6847,8 ± 38,1	86,9 ± 0,9 ^a	5947,3 ± 62,9

Letras diferentes en la misma fila, representan diferencias significativas (p < 0,05).

¹HVP (Hidrolizados de vísceras de pollo). ²HVC (Hidrolizado de vísceras de cerdo). ³HVT (Hidrolizado de vísceras de trucha). ⁴EDA= Energía bruta * % digestibilidad de la energía.

El contenido de energía digestible puede asociarse a las altas concentraciones de ácidos grasos polinsaturados presentes en los hidrolizados, los cuales son más fáciles de digerir que los saturados (Perea *et al.*, 2017), además, en la hidrólisis se generan polipéptidos de diferente longitud de cadena, aminopéptidos y aminoácidos libres, lo que implica que desde el punto de vista energético se optimizan los procesos de asimilación, debido a que se gasta menor energía en el fraccionamiento de la proteína y en producción de enzimas (López *et al.*, 2015). Los datos encontrados fueron superiores a los obtenidos por Llanes *et al.* (2019) en Tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*) a base de ensilados de residuos pesqueros (3.639,42 Kcal/kg de peso seco) y similares a los citados por Perea *et al.* (2017) donde evaluaron ensilajes de residuos piscícolas como alternativa para alimentación animal (5239 Kcal/kg de peso seco).

CONCLUSIONES

Los coeficientes de digestibilidad de la materia seca, extracto etéreo y proteína cruda de los hidrolizados de vísceras de pollo, cerdo y trucha fueron superiores al 88 %, lo cual demuestra la calidad nutricional de estos y la eficiencia de la Cachama blanca en el aprovechamiento de los nutrientes; además, los mejores hidrolizados de residuos de origen animal encontrados fueron el hidrolizado de vísceras trucha y el hidrolizado de vísceras pollo que no presentaron diferencias significativas entre ellos en la digestibilidad aparente de la materia seca, energía bruta, extracto etéreo, proteína cruda y la absorción de minerales, por consiguiente, pueden ser considerados como materias primas alternativas de alta calidad nutricional para la alimentación de peces.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias, grupos de investigación ASUBAGROIN y NUTRIFA-CA; Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación 8MINCIENCIAS) por la financiación de proyecto por medio de los recursos provenientes del patrimonio autónomo fondo nacional de financiamiento para la ciencia, la tecnología y la innovación Francisco José de Caldas; a la Asociación Productora y Comercializadora de Productos Acuícolas y Agrícolas de Silvia –(APROPESCA); a las empresas AGRICA S.A y PISCÍCOLA SALVAJINA SAT.

REFERENCIAS

- AUSTRENG, ERLAND. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. *Aquaculture*, v. 13, n. 3, 1978, p. 265-272.
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(78\)90008-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(78)90008-X)
- BANZE, JORGE-FILIPPE; OLIVEIRA-DA SILVA, MARIA-FERNANDA; SCHOFFEN-ENKE, DARIANE-BEATRIZ; FRACALOSSO, DÉBORA-MACHADO. Acid silage of tuna viscera: production, composition, quality and digestibility. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, v. 44 (vol. esp.), 2017, p. 24-34.
<https://doi.org/10.20950/1678-2305.2017.24.34>
- BRINGAS-ALVARADO, LORENA; ZAMORANO-OCHOA, ALBERTINA; ROJO-RODRÍGUEZ, JULIANA-BERENICE; GONZÁLEZ-FÉLIX, MAYRA-LIZETT; PÉREZ-VELÁZQUEZ, MARTÍN; CÁRDENAS-LÓPEZ, JOSÉ-LUIS; NAVARRO-GARCÍA, GERARDO. Evaluación del ensilado fermentado de subproductos de tilapia y su utilización como ingrediente en dietas para bagre de canal. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud Biotecnía*, v. 20, n. 2, 2018, p. 85-94.
<https://doi.org/10.18633/biotecnía.v20i2.604>
- BRIONES-ZAMBRANO, KEYLA-BENJA. Digestibilidad de ingredientes proteicos y requerimiento de proteína para el paco (*Piaractus brachypomus*) en la etapa de alevinos [Tesis Mg. Sc. Nutrición]. Lima (Perú): Universidad Nacional Agraria La Molina, 2019, 72 p.
- CAMPOS, INÉS; MATOS, ELISABETE; ARAGÃO, CLÁUDIA; PINTADO-ESTEVEZ, MARIA-MANUELA; VALENTE-PINHEIRO, LUÍSA-MARIA. Apparent digestibility coefficients of processed agro-food by-products in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, v. 24, n. 4, 2018, p. 1274–1286.
<https://doi.org/10.1111/anu.12665>
- CHO, C.Y.; SLINGER, S.J.; BAYLEY, H.S. Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 73, n. 1, 1982, p. 25-41.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90198-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90198-5)
- COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Cadena de la acuicultura. Bogotá (Colombia): Dirección de cadenas pecuarias, pesqueras y acuícolas, 2020, 4 p.
- CORRÊA, CAMILA-FERNANDES; DA SILVA-OLIVEIRA, THAÍS; LEONARDO, ANTÔNIO-FERNANDO; REIS-NETO, RAFAEL-VILHENA; ENKE-SHOFFEN, DARIANE-BEATRIZ. Acid fish silage in the diet of pacu and tambacu reared at cold suboptimal temperature. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 55, n. e01653, 2020, p. 1-8.
<https://doi.org/10.1590/s1678-3921.pab2020.v55.01653>
- DAVIES, SIMON-JOHN; GÜROY, DERYA; HASSAAN, MOHAMED-SHABAN; EL-AJNAF, S.M.; EL-HAROUN, EHAB. Evaluation of co-fermented apple-pomace, molasses and formic acid generated sardine based fish silages as fishmeal substitutes in diets for juvenile european sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) Production. *Aquaculture*, v. 521, 2020, p. 735087.
<https://doi.org/10.1111/anu.12969>

- DOS SANTOS-CARDOSO, MARJANA; GODOY, ANTONIO-CESAR; OXFORD, JARRED-HUGH; RODRIGUEZ, RÔMULO; DOS SANTOS-CARDOSO, MATHEUS; BITTENCOURT, FABIO; SIGNOR, ALTEVIR; BOSCOLO, WILSON-ROGÉRIO; FEIDEN, ALDI. Apparent digestibility of protein hydrolysates from chicken and swine slaughter residues for Nile Tilapia. *Aquaculture*, v. 530, 2021, p. 735720.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735720>
- DUNCAN, D.B. T tests and intervals for comparisons suggested by the data. *Biometrics*, v. 31, n. 2, 1975, p. 339-59.
- FONTINHA, FILIPA; MAGALHÃES, RUI; MOUTINHO, SARA; SANTOS, RAFAELA A.; CAMPOS, P.; SERRA, CLAUDIA-REIS; AIRES, TIAGO; OLIVA-TELES, AIRES; PERES, HELENA. Effect of dietary poultry meal and oil on growth, digestive capacity, and gut microbiota of gilthead seabream (*Sparus aurata*) Juveniles. *Aquaculture*, v. 530, n. 2020, 2021, p. 735879.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735879>
- GUIMARÃES, CRISTIANE-CUNHA; SILVA, ANTONIO-JOSÉ-INHAMUNS-DA; GUIMARÃES-CRUZ, FRANK-GEORGE; FERREIRA-RUFINO, JOÃO-PAULO; SILVA, ANDRÉ; COSTA, VALCELY. Digestibility and Physicochemical characteristics of tambaqui waste biological silage meal included in commercial layer diets. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 21, n. 3, 2019, p. 1-6.
<https://doi.org/10.1590/1806-9061-2018-0869>
- HEKMATPOUR, FATEMEH; KOCHANIAN, PREETA; MARAMMAZI, JASEM, G.H.; ZAKERI, MOHAMMAD; MOUSAVI, SEYED-MOHAMMAD. Inclusion of poultry by-product meal in the diet of *Sparidentex hasta*: effects on production performance, digestibility and nutrient retention. *Animal Feed Science and Technology*, v. 241, 2018, p. 173-83.
10.1016/j.anifeedsci.2018.02.010
- HIDALGO, VÍCTOR; VALERIO, HENRY. Digestibilidad y energía digestible y metabolizable del gluten de maíz, hominy feed y subproducto de trigo en cuyes (*Cavia porcellus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, v. 31, n. 2, 2020, e17816.
<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17816>
- HOYOS-CONCHA, JOSÉ-LUÍS; VILLADA-CASTILLO, HÉCTOR-SAMUEL; FERNÁNDEZ-QUINTERO, ALEJANDRO; BONILLA-MÉNDEZ, JEIMMY-ROCÍO. Chemical Characterization of Hydrolyzed Protein Meal Obtained from Trout (*Oncorhynchus mykiss*) By-Products Silage. *Indian Journal of Science and Technology*, v. 11, n. 16, 2018, p. 1-13.
10.17485/ijst/2018/v11i16/118634
- HUAN, DIANYU; LI, XIAOQIN; KABIR-CHOWDHURY, MOHIUDDIN-AMIRUL; YANG, HANG; LIANG, GAOYANG; LENG, XIANGJUN. Organic acid salts, protease and their combination in fish meal-free diets improved growth, nutrient retention and digestibility of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Aquaculture Nutrition*, v. 24, n. 18, 2018, p. 1813-1821.
<http://doi.org/10.1111/anu.12820>
- JAVAHERDOUST, SHAGHAYEGH; YEGANEH, SAKINEH; KERAMAT-AMIRKOLAIE, ABDOLSAMAD. Effects of dietary visceral protein hydrolysate of rainbow trout on growth performance, carcass composition, digestibility and antioxidant Enzyme in Juvenile *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Nutrition*, v. 26, n. 1, 2020, p. 134-44.
<https://doi.org/10.1111/anu.12975>
- KJELDAHL-THORSAGER, JOHAN-GUSTAV-CHRISTOFFER. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift für analytische Chemie*, v. 22, 1983, p. 366-382.
<https://doi.org/10.1007/BF01338151>
- LLANES-IGLESIAS, JOSÉ-ENRIQUE; TOLEDO-PÉREZ, JOSÉ; SAVÓN, LOURDES; GUTIÉRREZ, ODILIA. Evaluación nutricional de ensilajes de residuos pesqueros para la alimentación de tilapias rojas (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*). *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*, v. 28, n. 2, 2011, p. 15-20.
- LLANES-IGLESIAS, JOSÉ-ENRIQUE; TOLEDO-PÉREZ, JOSÉ; PORTALES, ANAISY; SARDUY, LUCIA. Reemplazo parcial de harina de pescado por ensilado cárnico en dietas extrusadas para *Clarias gariepinus*. *Cuban Journal of Agricultural Science*, v. 51, n.1, 2017, p. 71-77.

- LLANES-IGLESIAS, JOSÉ-ENRIQUE; PORTALES-GONZÁLEZ, ANAISY; TOLEDO-PÉREZ, JOSÉ. Posibilidades del ensilado cárnico en dietas extrusadas para *Clarias gariepinus*. Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras, v. 36, n. 2, 2019, p. 68-72.
- LÓPEZ-MACÍAS, JORGE; SALAZAR-RAMOS, DIANA-OMAIRA; IZQUIERDO-ROSETO, CESAR-ANDRÉS. Coeficientes de digestibilidad de la harina de hidrolizado de vísceras de Cachamba Blanca (*Piaractus brachyomus* Cuvier 1818), usada como fuente de proteína en la alimentación de sus alevinos. Acta Biológica Paranaense, v. 44, n. 1, 2015, p. 7-16.
<https://doi.org/10.5380/abpr.v44i1-2.43731>
- MENDOZA, MIGUEL-ÁNGEL; COMAS-CORREDOR, JAIR; ROMERO-HURTADO, CLARA-STEFANY. Estudio histológico del sistema digestivo en diferentes estadios de desarrollo de la cachama blanca (*Piaractus brachyomus*), Revista Médico Veterinario, v. 25, 2013, p. 21-38.
<https://doi.org/10.19052/mv.2296>
- MONTOYA-MEJÍA, MAGNOLIA; GARCÍA-ULLOA, MANUEL; HERNÁNDEZ-LLAMAS, ALFREDO; NOLASCO-SORIA, HÉCTOR; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, HERVEY. Digestibility, growth, blood chemistry, and enzyme activity of juvenile *Oreochromis niloticus* fed isocaloric diets containing animal and plant byproducts. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 46, n. 12, 2017, p. 873-882.
<https://dx.doi.org/10.1590/s1806-92902017001200001>
- OZYURT, CANER; KULEY BOGA, ESMEYRA; OZKUTUK, ALI SERHAT; UCAR, YILMAZ; DURMUS, MUSTAFA; OZYURT, GÜLSÜN. Bioconversion of discard fish (*Equulites klunzingeri* and *Carassius gibelio*) fermented with natural lactic acid bacteria; the chemical and microbiological quality of ensilage. Waste and Biomass Valorization, v. 11, 2020, p. 1435-1442.
<https://doi.org/10.1007/s12649-018-0493-5>
- PAZ A., MARIO; MENESES, JOHN; LÓPEZ, JORGE. Digestibility of diets with flour fish silage for the growing of arawana (*Osteoglossum bicirrhosum*). Revista MVZ Córdoba, v. 21, n. 1, 2016, p. 5177-5188.
- PEREA-ROMÁN, CRÍSPULO; HOYOS-CONCHA, JOSÉ-LUÍS; GARCÉS-CAICEDO, YENY-JUDITH; MUÑOZ-ARBOLEDA, LUZ-STELLA; GÓMEZ-PEÑARANDA, JOSÉ-ADER. Evaluación de procesos para obtener ensilaje de residuos piscícolas para alimentación animal. Ciencia en desarrollo, v. 8, n. 2, 2017, p. 47-58.
<https://doi.org/10.19053/01217488.v8.n2.2017.6174>
- PEREA-ROMAN, CRÍSPULO; GARCÉS-CAICEDO, YENY-JUDITH; MUÑOZ-ARBOLEDA, LUZ-STELLA; HOYOS-CONCHA, JOSÉ-LUÍS; GÓMEZ-PEÑARANDA, JOSÉ-ADER. Valoración económica del uso de ensilaje de residuos piscícolas en la alimentación de *Oreochromis* spp. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 16, n. 1, 2018, p. 43-51.
<http://dx.doi.org/10.18684/bsaa.v16n1.623>
- PUERTA-RICO, LUIS-FERNANDO; GARCÍA-GONZÁLEZ, JOSÉ-JAIME; PARRA-SUESCÚN, JAIME-EDUARDO; PARDO-CARRASCO, SANDRA-CLEMENCIA. Coeficientes de digestibilidad aparente de *Thitonia diversifolia* y *Cratylia argentea* en cachama blanca y efectos sobre las vellosidades intestinales, Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica, v. 20, n. 2, 2017, p. 375-383.
<https://doi.org/10.31910/rudca.v20.n2.2017.395>
- RAMÍREZ-MORA, JOSÉ-NOBEL; USECHE, MANUEL-CRISOSTOMO; NIÑO, PEDRO-ALEXANDER; LEAL, CARLOS; BALDISSEROTTO, BERNARDO. Production of cachama reciprocal hybrids in earth ponds. Ciência Rural, v. 49, n. 11, 2019, p. 1-6.
<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180113>
- SOARES, MARIANA; COSTA-REZENDE, PRISCILA; MACHADO-CORRÊA, NICOLE; SOUSA-ROCHA, JAMILLY; ARANA-MARTINS, MATEUS; COSTA-ANDRADE, THAÍS; MACHADO-FRACALLOSSI, DÉBORA; NASCIMENTO-VIEIRA, FELIPEDO. Protein hydrolysates from poultry by-product and swine liver as an alternative dietary protein source for the Pacific white shrimp. Aquaculture Reports, v. 17, n. 2020, p. 100344.
<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100344>

- TANUJA, SOMARAJAN; KUMAR-NAYAK, SUJIT; NAYAK, S.K. Effect of dietary intake of acid ensiled fish waste on the growth, feed utilization, hematology and serum biochemistry of rohu *Labeo rohita*, (Hamilton, 1822) fingerlings. *Indian Journal of Animal Research*, v. 51, n. 3, 2017, p. 501-505.
[10.18805/ijar.v0i0f.3792](https://doi.org/10.18805/ijar.v0i0f.3792)
- UNITED STATES OF AMERICA. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Method 920.39, 934.01 y 942.05. 15th ed. Arlington (United States of America): Helrich, Kenneth 1990, p. 30-64.
- UNITED STATES OF AMERICA. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International, Method 985.35. 18 th Ed. Revision # 1. Gaithersburg (United States of America): AOAC International, 2005, 15 p.
- WEI, YULIANG; LIANG, MENGQING; XU, HOUGUO. Fish protein hydrolysate affected amino acid absorption and related gene expressions of igf-1/akt pathways in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture Nutrition*, v. 26, n. 1, 2020, p. 145–55.
<https://doi.org/10.1111/anu.12976>

Evaluación de la bioaccesibilidad de cadmio en formulaciones de chocolatería por digestión gastrointestinal *in vitro**

Evaluation of cadmium bioaccessibility in chocolate formulations by *in vitro* gastrointestinal digestion

MURILLO-MÉNDEZ, CRISTIAN-JAHIR¹; MOLINA-VELASCO, DANIEL-RICARDO²;
LÓPEZ-GIRALDO, LUIS-JAVIER³; SALAZAR-BELEÑO, ANA-MILENA⁴

RESUMEN

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 28 octubre 2020.

Aprobado para publicación: 27 agosto 2021.

* Proyecto de investigación de origen: "Evaluación de la bioaccesibilidad de cadmio en formulaciones de chocolatería por digestión gastrointestinal *in vitro*". Financiación: Universidad Industrial de Santander. Culminación: noviembre 2019.

1 Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA). M.Sc. Química. Bucaramanga, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-5139-0163>

2 Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear. Doctor en Química. Bucaramanga, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-7897-2526>

3 Universidad Industrial de Santander, Escuela de Ingeniería Química, Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA). Doctor en Química, Ciencia y Tecnología de Alimentos. Bucaramanga, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-9267-7016>

4 Instituto Universitario de la Paz (UNIPAZ), Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Grupo de Investigación en Innovación, Desarrollo Tecnológico y Competitividad en Sistemas de Producción Agroindustrial (GIADAI). Esp. Aseguramiento de la Calidad e Inocuidad Agroalimentaria. Barrancabermeja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-7592-2550>

Correspondencia: cristian.murillo@unipaz.edu.co

Para estudiar la toxicidad del cadmio (Cd) presente en productos de chocolate es necesario conocer su concentración total y determinar la cantidad de Cd que es bioaccesible en el cuerpo humano. Este trabajo se enfocó en evaluar la bioaccesibilidad de Cd en formulaciones de chocolatería con concentraciones de componentes diferentes por digestión gastrointestinales in vitro. Esta digestión se realizó a través de un titulador automático con control de temperatura y control y monitoreo de pH mediante soluciones diluidas ácidas y alcalinas. Se correlacionaron las diferencias de bioaccesibilidad con los componentes principales (cacao, leche, azúcar y contenido de Cd total en el cacao) y, por último, se propuso una formulación de chocolate que tuvo el menor valor de bioaccesibilidad de Cd. Los resultados se expresaron mediante un modelo matemático, con predicciones de 94 % y errores de validación del modelo menores que 9 %. Se obtuvieron valores de bioaccesibilidad de Cd en las formulaciones de chocolate entre 7 y 32 % aproximadamente, donde los valores más bajos correspondieron a formulaciones de chocolate amargo (relación másica cacao:azúcar de 7:2). Se concluyó que el contenido de cacao y de azúcar en la formulación disminuyen los valores de bioaccesibilidad de Cd, mientras que el contenido de leche y la concentración de Cd total en el cacao aumentan los valores de bioaccesibilidad.

ABSTRACT

To study the toxicity of cadmium (Cd) present in chocolate products, it is necessary to know its total concentration and determine the amount of Cd that is bioaccessible in the human body. This work focused on evaluating the Cd bioaccessibility in chocolate formulations with concentrations of different components by gastrointestinal digestion in vitro. This digestion was carried out through an automatic titrator with temperature control and pH control and monitoring using dilute acid and alkaline solutions. Bioaccessibility differences were correlated with the main components (cocoa, milk, sugar, and total Cd content in cocoa) and, finally, a chocolate formulation was proposed that had the lowest Cd bioaccessibility value. The results were expressed using a mathematical model, with predictions of 94 % and model validation errors less than 9 %. Cd bioaccessibility values in the chocolate formulations were obtained between 7 and 32 %, approximately, where the lowest values corresponded to dark chocolate formulations (cocoa:sugar ratio 7:2). It was concluded that the cocoa and sugar content in the formulation decrease the Cd bioaccessibility values, while the milk content and the total Cd concentration in cocoa increase the bioaccessibility values.

PALABRAS CLAVE:

Cacao; Grasa; Leche; Digestión gástrica; Digestión pancreática; Modelo matemático, Superficie de respuesta; Valor mínimo.

KEYWORDS:

Cocoa; Fat; Milk; Gastric digestion; Pancreatic digestion; Mathematical model; Response surface; Minimum value.

Cómo citar este artículo: MURILLO-MÉNDEZ, CRISTIAN-JAHIR; MOLINA-VELASCO, DANIEL-RICARDO; LÓPEZ-GIRALDO, LUIS-JAVIER; SALAZAR-BELEÑO, ANA-MILENA. Evaluación de la bioaccesibilidad de cadmio en formulaciones de chocolatería por digestión gastrointestinal in vitro. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 20, n. 1, 2022, p. 68-83. Doi: <https://doi.org/10.18684/bsaa.v.n.2022.1746>

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol nativo de las regiones tropicales húmedas de la parte norte de Suramérica y de Centroamérica (Motamayor *et al.*, 2002). Posee numerosos componentes bioactivos como polifenoles, que son potentes antioxidantes para la salud humana; metilxantinas y componentes precursores de aroma, en menor proporción (Perea-Villamil *et al.*, 2009; Pico-Hernández *et al.*, 2019; Villamizar-Jaimes & López-Giraldo, 2017). La producción de cacao es una práctica agrícola que origina productos de exportación importantes para economías en desarrollo de países en África, Asia, Oceanía, Latinoamérica y el Caribe (Jiménez Tobón, 2015), sin embargo, la mayoría del cacao colombiano y, por ende, sus productos derivados como el chocolate, poseen concentraciones elevadas de cadmio.

El cadmio (Cd) es un metal pesado clasificado como contaminante ambiental, proveniente de residuos tanto de fuentes naturales como de prácticas industriales y de agricultura (Hernández-Martínez & Navarro-Blasco, 2012; Satarug *et al.*, 2017; Alves *et al.*, 2018). Como los metales pesados están presentes en productos alimenticios de consumo humano y animal, el contenido de Cd es un criterio indispensable a la hora de evaluar los niveles de toxicidad de los alimentos (Alexander *et al.*, 2009; Zhuravlev *et al.*, 2015; Satarug *et al.*, 2017). Se ha determinado su presencia en granos y en productos derivados del cacao, en la mayoría de los casos, la concentración en los granos cultivados en diferentes regiones de Latinoamérica supera el límite que estipula la Unión Europea (1,0 mg/kg) (European Food Safety Authority, 2011).

Se ha encontrado su presencia en granos de cacao producido en sistemas agroforestales y como de monocultivo, sin diferencias significativas en el contenido (Gramlich *et al.*, 2017). También realizaron la cuantificación con valores promedio superiores al máximo permitido por las normas europeas con 0,9 mg/kg (Chavez *et al.*, 2015; Arévalo-Gardini *et al.*, 2017; Gramlich *et al.*, 2018).

En Colombia, no hay una legislación para el control del Cd en el cacao (Jiménez-Tobón, 2015), pese a esto, altos contenidos podrían limitar la exportación del grano a clientes de la unión europea quienes aprecian los granos de cacao producidos por sus cualidades de fino y de aroma (International Cocoa Organization, 2019). Algunos reportaron concentraciones de 4,05 mg/kg en chocolates amargos (con 65 % de cacao) comprados en supermercados colombianos, valores muy superiores al límite permitido por la Unión Europea (0,8 mg/kg) (Echeverry & Reyes, 2016). Sin embargo, algunos productos de chocolate pueden tener concentraciones menores, como por ejemplo el chocolate de mesa en polvo y granulado proveniente de Chiquinquirá, Colombia, que se determinó por voltamperometría diferencial de pulso de redisolución anódica arrojando entre 0,214 y 0,260 mg/kg (Chaparro-Acuña *et al.*, 2017; Lo Dico *et al.*, 2018).

Aunque se ha determinado la cantidad total de Cd en diferentes matrices (Chandra *et al.*, 2014; Zhuang *et al.*, 2016; Bhat *et al.*, 2019), es importante destacar el papel de su bioaccesibilidad, que se define como la cantidad de sustancia que está disuelta en la parte digestiva y aprovechable para absorción (Peixoto *et al.*, 2016), por lo que algunas investigaciones se han enfocado en el estudio de la bioaccesibilidad de los metales pesados para diversas matrices de alimentos, como por ejemplo, los factores que afectan la bioaccesibilidad del Cd en bebidas achocolatadas donde encontraron que ésta varía según el tipo de muestra, siendo mayor en la formulación light con aproximadamente 11 % (Peixoto *et al.*, 2016; Francisco *et al.*, 2018). También se encontró que, en concentraciones de sales biliares mayores, la bioaccesibilidad del Cd aumenta 3 veces más y, tanto el pH como la presencia de lipasa en la digestión gastrointestinal *in vitro*, no varía significativamente la bioaccesibilidad del Cd (Peixoto *et al.*, 2016). Barraza y colaboradores determinaron la bioaccesibilidad gástrica humana en grano de cacao crudo y en licor de cacao y obtuvieron valores entre el 90 y 100 % en las digestiones gástricas *in vitro* para grano y licor de cacao (Barraza *et al.*, 2017).

Algunos autores determinaron la bioaccesibilidad de otros compuestos en productos de cacao, resaltando la selectividad de algunos compuestos en la digestión pancreática (Mounicou *et al.*, 2003), sin embargo, esto no

sucede con el Cd, donde pueden predominar altos valores de bioaccesibilidad en las fases de digestión, especialmente en la gástrica (Gültekin-Özgüven *et al.*, 2016; Toro-Uribe *et al.*, 2019).

Existen diversos trabajos de investigación en torno a la concentración total de Cd en cacao y sus productos; no obstante, son pocos los trabajos de investigación que estudian la bioaccesibilidad del cadmio en función de los componentes de la matriz, tal es el caso de las matrices como bebida de chocolate en polvo o en grano de cacao.

Por lo anterior, este trabajo se enfocó en el estudio y evaluación del efecto de los componentes principales, comúnmente usados en las formulaciones en chocolate (concentración inicial de cadmio, licor de cacao, azúcar y leche), sobre la bioaccesibilidad de cadmio por medio de digestión gastrointestinal *in vitro*.

MÉTODO

Reactivos y muestras

Las muestras de cacao fermentado y seco se obtuvieron del centro de acopio de cacao en el municipio de San Vicente de Chucurí, uno de los mayores productores en el Departamento de Santander. De allí, se seleccionaron de 6 a 10 muestras, con concentraciones de Cd entre 1 y 10 mg/kg y a una altitud entre 550 y 1400 m.s.n.m. También, se utilizaron como ingredientes de la preparación leche en polvo y azúcar refinada de marca comercial, libre de Cd. Los reactivos para el procedimiento de digestión gastrointestinal *in vitro* y la cuantificación de Cd fueron pepsina de mucosa gástrica porcina, pancreatina de páncreas porcino, soluciones estándar de sales biliares, carbonato de amonio y ácido nítrico concentrado; todos marca Merck, mientras que el agua usada en el desarrollo de la investigación fue ultrapura (0,056 $\mu\text{S}/\text{cm}$) tipo 1.

Diseño experimental para el efecto de los factores

Las coberturas de chocolate para las digestiones gastrointestinales *in vitro* se fabricaron basado en la Resolución 1511 del INVIMA (Ministerio de la Protección Social, 2011), aplicando un diseño 2^4 más puntos centrales, con cuatro factores que describen los componentes principales de la formulación de cacao (Cuadro 1), con un total de 96 experimentos, teniendo el valor de porcentaje de bioaccesibilidad de Cd como variable de respuesta. El diseño de experimentos se ejecutó y se analizó mediante el software Statistica.

Cuadro 1. Descripción de los factores y sus niveles para el diseño de experimentos.

Factores	Nivel mínimo	Nivel máximo	Respuesta
Licor de cacao, g	3	7	% bioaccesibilidad de Cd
Leche en polvo, g	0	4	
Azúcar, g	2	4	
Concentración de Cd en cacao, mg/kg	1,23	9,11	

Preparación de las formulaciones

Para la elaboración del licor de cacao, se tostaron los granos de cacao fermentados y secos a una temperatura de 120 °C durante 20 min. Luego, se retiró la cascarilla del grano de manera manual y se realizó una premolienda durante 2 min a 4 °C. Por último, se refinó el polvo de cacao resultante hasta obtener el licor. Una vez determinadas las cantidades de los ingredientes de las formulaciones por medio de los puntos del diseño experimental, se mezclaron manualmente las proporciones de licor de cacao, leche y azúcar y se refinaron hasta obtener una consistencia líquida y uniforme. Se suprimieron las etapas de atemperado y moldeado dado que solo afectan a la textura del producto.

Cuantificación de Cd total

Se cuantificó el contenido de Cd total presente en las coberturas de chocolate con base en el procedimiento propuesto por Echeverry y Reyes (2016). Se calcinaron aproximadamente 3 g de la muestra en una mufla a 600 °C durante 4 horas. Luego, se disolvieron en 10 mL de HCl 6 N y se llevaron a ebullición por 5 min. Por último, se filtró el contenido con papel filtro, se adicionaron 3 gotas de HNO₃ al 65 %, y se aforó a 25 mL. Las soluciones resultantes se analizaron por Espectrometría de Absorción Atómica (AAS) en llama utilizando un equipo PinAAcle 400 Perkin-Elmer provisto de gas de combustión aire-acetileno a una presión de 2,5 Pa y un flujo de 1 L/min. La absorbancia de las muestras se leyó directamente a una longitud de onda de 254 nm.

Digestión gastrointestinal *in vitro*

Los ensayos de digestión gastrointestinal *in vitro* se desarrollaron siguiendo el procedimiento descrito por Minkus *et al.* (2014) con modificaciones. Para la digestión gastrointestinal *in vitro*, se prepararon soluciones estándar electrolíticas (Cuadro 2) que simularon los fluidos de la digestión gástrica y digestión pancreática usando NaOH 1 M y HCl 6 M para ajustar y mantener el pH de las soluciones.

Cuadro 2. Composición de las soluciones utilizadas como fluidos de las digestiones.

Constituyentes	Composición de solución de fluido gástrico (SFG), mM	Composición de solución de fluido pancreático (SFP), mM
	pH 3,0	pH 7,0
KCl	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	0,9	0,8
NaHCO ₃	25	85
NaCl	47,2	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,1	0,33
(NH ₄) ₂ Cl	0,5	-

Para la digestión gástrica *in vitro*, se pesaron aproximadamente 5 g de cada formulación de chocolate y se mezclaron con 7,5 mL de SFG, se adicionaron 1,6 mL de solución de pepsina porcina de 25000 U/mL (se disolvió la pepsina en SFG), 5 µL de CaCl₂ 0,3 M y 0,8 mL de HCl 1 M para llegar a pH 3,0. Todo el procedimiento se realizó durante 2 horas con agitación constante, controlando la temperatura entre 36 y 37 °C y un valor de pH entre 2,9 y 3,1. Para la digestión pancreática *in vitro*, se adicionaron 11 mL de SFP a la solución resultante de la anterior digestión, luego se adicionaron 5 mL de solución de pancreatina de 800 U/mL (se disolvió la pancreatina con SFP), 2,5 mL de bilis al 0,5 %, 40 µL de CaCl₂ 0,3 M, 0,8 mL de NaOH 1 M para llegar a pH 7,0 y 0,3 mL de agua. El procedimiento tuvo una duración de 2 horas con agitación constante, controlando la temperatura entre 36 y 37 °C y un valor de pH entre 6,9 y 7,1.

La determinación del contenido de Cd bioaccesible se basó en la metodología propuesta por Barraza *et al.* (2017) con modificaciones: se adicionó la solución resultante de la digestión pancreática a un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. Luego, se adicionó el sobrenadante a un vaso precipitado de 100 mL, se agregaron 5 gotas de HNO₃ al 65 %, se agitó un poco hasta observar un precipitado y se filtró el contenido con papel filtro recogiendo el filtrado en un balón aforado de 50 mL. Por último, se aforó la solución a 50 mL y se analizó por AAS en llama utilizando como gas de combustión aire-acetileno a las mismas condiciones descritas para la cuantificación de cadmio total.

Determinación de la bioaccesibilidad del Cd

Se determinó la bioaccesibilidad del Cd (% Cd_{bio}) a partir de la Ecuación 1:

$$\% Cd_{bio} = \frac{[Cd_{bioaccesible}]}{[Cd_{total}]} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde [Cd bioaccesible] corresponde al contenido de Cd presente en la solución resultante de la digestión gastrointestinal sobre la cantidad de la formulación de chocolate utilizada en la digestión; y [Cd total] que es la concentración del Cd total de la formulación de chocolate.

Correlación de bioaccesibilidad de cadmio con componentes de formulaciones

Para determinar la correlación entre los componentes en las formulaciones de chocolate y la bioaccesibilidad de Cd, se usó un ANOVA a los resultados obtenidos. También, se evaluó por medio de superficie de respuesta, diagramas de Pareto y correlación de datos predichos con observados. Se realizó un ajuste de la ecuación que describió el porcentaje de bioaccesibilidad de Cd en función de los factores evaluados que fueron significativos (cacao, azúcar, leche en polvo y concentración de Cd en cacao).

Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo matemático de efectos lineales con interacciones como se presenta en la Ecuación 2.

$$Y = X_0 + X_A A + X_B B + X_C C + X_D D + X_{AB} AB + X_{AC} AC + X_{AD} AD + X_{BC} BC + X_{BD} BD + X_{CD} CD \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde Y es el porcentaje de bioaccesibilidad de Cd, X_n es el coeficiente de cada variable y A, B, C y D son las variables de cantidad de cacao, leche en polvo, azúcar y concentración de Cd en cacao respectivamente.

Finalmente, se procedió a determinar las concentraciones de los componentes de la formulación de chocolate que posea menor valor en la bioaccesibilidad de Cd.

RESULTADOS

Los resultados mostraron que el valor promedio del porcentaje de bioaccesibilidad de Cd fue de 19,61 % que y los valores máximo y mínimo fueron de 32,56 y 7,22 % respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de bioaccesibilidad de cadmio en las formulaciones de chocolate.

Experimento	Cacao, g	Leche, g	Azúcar, g	[Cd] en cacao, mg/kg	[Cd] total, mg/kg	[Cd] bioaccesible, mg/kg	Bioaccesibilidad de Cd, %
1	3,00	0,00	2,00	1,23	0,74	0,14	18,92
2	3,00	0,00	4,00	1,23	0,53	0,10	18,87
3	3,00	2,00	3,00	1,23	0,46	0,10	21,74
4	3,00	4,00	2,00	1,23	0,41	0,10	24,39
5	3,00	4,00	4,00	1,23	0,34	0,08	23,53
6	5,00	0,00	3,00	1,23	0,77	0,10	12,99
7	5,00	2,00	2,00	1,23	0,69	0,12	17,39
8	5,00	2,00	3,00	1,23	0,63	0,11	17,46
9	5,00	2,00	3,00	1,23	0,63	0,12	19,05
10	5,00	2,00	4,00	1,23	0,58	0,10	17,24
11	5,00	4,00	3,00	1,23	0,53	0,12	22,64
12	7,00	0,00	2,00	1,23	0,97	0,07	7,22
13	7,00	0,00	4,00	1,23	0,80	0,08	10,00
14	7,00	2,00	3,00	1,23	0,71	0,09	12,68
15	7,00	4,00	2,00	1,23	0,66	0,13	19,70
16	7,00	4,00	4,00	1,23	0,58	0,09	15,52
17	3,00	0,00	2,00	1,23	0,75	0,14	18,67
18	3,00	0,00	4,00	1,23	0,54	0,11	20,19
19	3,00	2,00	3,00	1,23	0,46	0,10	21,74
20	3,00	4,00	2,00	1,23	0,42	0,10	23,81
21	3,00	4,00	4,00	1,23	0,34	0,07	20,59
22	5,00	0,00	3,00	1,23	0,77	0,10	12,99
23	5,00	2,00	2,00	1,23	0,67	0,12	17,91
24	5,00	2,00	3,00	1,23	0,62	0,10	16,13
25	5,00	2,00	3,00	1,23	0,62	0,12	19,35
26	5,00	2,00	4,00	1,23	0,56	0,11	19,64
27	5,00	4,00	3,00	1,23	0,52	0,12	23,08
28	7,00	0,00	2,00	1,23	0,94	0,07	7,45
29	7,00	0,00	4,00	1,23	0,77	0,08	10,39
30	7,00	2,00	3,00	1,23	0,72	0,09	12,50
31	7,00	4,00	2,00	1,23	0,66	0,12	18,18
32	7,00	4,00	4,00	1,23	0,57	0,10	17,54
33	3,00	0,00	2,00	6,63	3,98	0,87	21,86
34	3,00	0,00	4,00	6,63	2,84	0,62	21,83
35	3,00	2,00	3,00	6,63	2,49	0,67	26,91
36	3,00	4,00	2,00	6,63	2,21	0,69	31,22
37	3,00	4,00	4,00	6,63	1,81	0,45	24,86
38	5,00	0,00	3,00	6,63	4,14	0,69	16,67
39	5,00	2,00	2,00	6,63	3,68	0,80	21,74
40	5,00	2,00	3,00	6,63	3,32	0,70	21,08
41	5,00	2,00	3,00	6,63	3,32	0,70	21,08
42	5,00	2,00	4,00	6,63	3,01	0,64	21,26
43	5,00	4,00	3,00	6,63	2,76	0,73	26,45
44	7,00	0,00	2,00	6,63	5,16	0,53	10,27
45	7,00	0,00	4,00	6,63	4,22	0,52	12,32
46	7,00	2,00	3,00	6,63	3,87	0,58	14,99
47	7,00	4,00	2,00	6,63	3,57	0,80	22,41
48	7,00	4,00	4,00	6,63	3,09	0,60	19,42
49	3,00	0,00	2,00	6,63	3,98	0,88	22,11
50	3,00	0,00	4,00	6,63	2,84	0,64	22,54
51	3,00	2,00	3,00	6,63	2,49	0,65	26,10

Experimento	Cacao, g	Leche, g	Azúcar, g	[Cd] en cacao, mg/kg	[Cd] total, mg/kg	[Cd] bioaccesible, mg/kg	Bioaccesibilidad de Cd, %
52	3,00	4,00	2,00	6,63	2,21	0,66	29,86
53	3,00	4,00	4,00	6,63	1,81	0,46	25,41
54	5,00	0,00	3,00	6,63	4,14	0,68	16,43
55	5,00	2,00	2,00	6,63	3,68	0,81	22,01
56	5,00	2,00	3,00	6,63	3,32	0,67	20,18
57	5,00	2,00	3,00	6,63	3,32	0,73	21,99
58	5,00	2,00	4,00	6,63	3,01	0,67	22,26
59	5,00	4,00	3,00	6,63	2,76	0,72	26,09
60	7,00	0,00	2,00	6,63	5,16	0,52	10,08
61	7,00	0,00	4,00	6,63	4,22	0,55	13,03
62	7,00	2,00	3,00	6,63	3,87	0,60	15,50
63	7,00	4,00	2,00	6,63	3,57	0,77	21,57
64	7,00	4,00	4,00	6,63	3,09	0,62	20,06
65	3,00	0,00	2,00	9,11	5,49	1,14	20,77
66	3,00	0,00	4,00	9,11	3,87	0,85	21,96
67	3,00	2,00	3,00	9,11	3,38	0,90	26,63
68	3,00	4,00	2,00	9,11	3,01	0,93	30,90
69	3,00	4,00	4,00	9,11	2,52	0,63	25,00
70	5,00	0,00	3,00	9,11	5,71	0,92	16,11
71	5,00	2,00	2,00	9,11	5,06	1,09	21,54
72	5,00	2,00	3,00	9,11	4,57	0,96	21,01
73	5,00	2,00	3,00	9,11	4,60	0,93	20,22
74	5,00	2,00	4,00	9,11	4,11	0,85	20,68
75	5,00	4,00	3,00	9,11	3,80	0,97	25,53
76	7,00	0,00	2,00	9,11	7,05	0,70	9,93
77	7,00	0,00	4,00	9,11	5,79	0,68	11,74
78	7,00	2,00	3,00	9,11	5,35	0,72	13,46
79	7,00	4,00	2,00	9,11	4,93	1,06	21,50
80	7,00	4,00	4,00	9,11	4,23	0,75	17,73
81	3,00	0,00	2,00	9,11	5,43	1,20	22,10
82	3,00	0,00	4,00	9,11	3,87	0,79	20,41
83	3,00	2,00	3,00	9,11	3,42	0,88	25,73
84	3,00	4,00	2,00	9,11	3,01	0,98	32,56
85	3,00	4,00	4,00	9,11	2,56	0,60	23,44
86	5,00	0,00	3,00	9,11	5,69	0,99	17,40
87	5,00	2,00	2,00	9,11	5,03	1,10	21,87
88	5,00	2,00	3,00	9,11	4,58	0,93	20,31
89	5,00	2,00	3,00	9,11	4,53	0,97	21,41
90	5,00	2,00	4,00	9,11	4,10	0,86	20,98
91	5,00	4,00	3,00	9,11	3,83	0,96	25,07
92	7,00	0,00	2,00	9,11	7,08	0,78	11,02
93	7,00	0,00	4,00	9,11	5,82	0,66	11,34
94	7,00	2,00	3,00	9,11	5,29	0,71	13,42
95	7,00	4,00	2,00	9,11	4,89	1,11	22,70
96	7,00	4,00	4,00	9,11	4,26	0,80	18,78

Estos valores muestran la influencia de la formulación sobre el porcentaje de bioaccesibilidad de Cd; por tal motivo, es importante determinar las cantidades de cacao, leche y azúcar, y la concentración de Cd en el cacao adecuadas para la elaboración de formulaciones de chocolate con menores valores de porcentaje de bioaccesibilidad.

Se aplicó un ANOVA a los valores obtenidos con la ecuación 2 para comparar la significancia de las variables en el modelo (Cuadro 4). Al comparar el valor p de cada variable se puede apreciar que solo la interacción BD, que corresponde a la cantidad de leche y a concentración de Cd en el cacao, no tiene efecto significativo (valor

$p > 0,05$). Asimismo, se observa que las variables correspondientes a la cantidad de cacao y de leche son las que mayor influencia posee en el modelo inicial propuesto, debido a su valor F.

Cuadro 4. Resultado ANOVA de las variables del modelo inicial planteado.

Factor	Suma de cuadrados (SS)	Valor F	Valor P
A: Cacao, g	1181,112	718,2899	0,000000
B: Leche, g	863,688	525,2495	0,000000
C: Azúcar, g	13,846	8,4206	0,004723
D: [Cd] cacao, mg/kg	178,712	108,6829	0,000000
AB	42,150	25,6334	0,000002
AC	12,383	7,5307	0,007399
AD	7,295	4,4363	0,038131
BC	77,877	47,3607	0,000000
BD	2,494	1,5169	0,221486
CD	11,962	7,2745	0,008432
Error	139,769		
Total SS	2622,307		

Los efectos estandarizados del modelo inicial se pueden observar en el diagrama de Pareto (Figura 1) en el que se visualiza que las variables cantidad de cacao y de leche son las de mayor incidencia en el modelo. Sin embargo, la cantidad de cacao (que posee la mayor influencia) tiene un efecto negativo en el porcentaje bioaccesibilidad de Cd, mientras que la cantidad de leche y la concentración de Cd en cacao posee un efecto positivo, observándose en el signo negativo y positivo de cada efecto estandarizado, respectivamente (Figura 1).

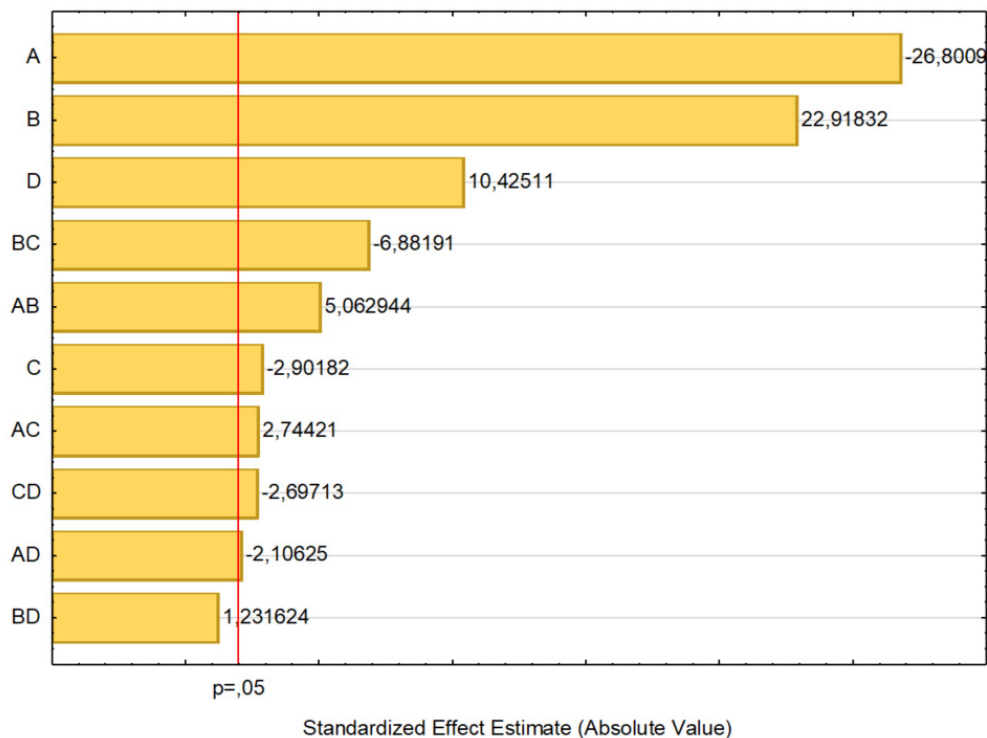


Figura 1. Diagrama de Pareto con los valores absolutos de los efectos estandarizados estimados para el modelo inicial planteado en la ecuación. Las variables A, B, C y D corresponden a cantidad de cacao, leche en polvo, azúcar y concentración de Cd en cacao respectivamente.

Efecto de la cantidad de cacao

Según los resultados, la cantidad de cacao en la formulación de chocolate aporta en el contenido de Cd total, por lo tanto, a mayor cantidad de cacao utilizado, mayor contenido de Cd total. Siguiendo la misma lógica, se esperaría que, a mayor cantidad de cacao, mayor contenido de Cd en la fase bioaccesible después de la digestión gastrointestinal; sin embargo, este efecto es contrario. Una de las razones por las que se presenta este efecto es por la presencia de grasa en el cacao: la presencia de componentes no polares (grasa) impide la liberación de metales y moléculas polares en la fase polar y disminuye la probabilidad de ser bioaccesibles después de la digestión gastrointestinal (Martini *et al.*, 2018). Además, en la digestión pancreática hay presencia de bilis, que contribuye a la disolución y degradación de las grasas y, por ende, puede producir compuestos más pequeños que pueden atrapar metales o moléculas polares de menor tamaño en forma de micelas o complejos insolubles en la digestión. Esto disminuye la cantidad de Cd libre en la solución restante de la digestión y disminuye la concentración de Cd bioaccesible después de la digestión gastrointestinal (Peixoto *et al.*, 2016; Barraza *et al.*, 2017).

Efecto de la cantidad de leche

Teniendo en cuenta la cantidad de leche en polvo que se utilizó para la elaboración del producto, a medida que este valor incrementa, el porcentaje de bioaccesibilidad también incrementa. Se corroboró que la leche en polvo no contribuye al contenido de Cd total a la formulación, sin embargo, el contenido de aminoácidos polares y de ácidos orgánicos es elevado. La presencia de un componente polar de gran proporción en las formulaciones de chocolate como la leche y, sumado a esto, el alto contenido de acidez presente en ella ayuda a liberar más iones de Cd²⁺ en la fase polar y aumentar la probabilidad de ser bioaccesible después de la digestión gastrointestinal (Cobbett & Goldsbrough, 2002).

Efecto de la cantidad de azúcar

A medida que la cantidad de azúcar usada en las formulaciones se incrementó, teniendo constantes las demás variables de la formulación, el porcentaje de bioaccesibilidad disminuyó. Aunque el efecto de la cantidad de azúcar es pequeño en comparación con el efecto de las otras variables (Figura 1), ésta es una variable significativa en el modelo inicial, lo que puede ser atribuido a la formación de complejos de Cd insolubles con la sacarosa y otros endulzantes en la fase intestinal de la digestión, reduciendo la concentración de Cd bioaccesible y, por ende, el porcentaje de bioaccesibilidad de Cd (Peixoto *et al.*, 2016).

Efecto de la concentración de Cd en el cacao

Al incrementar la concentración de Cd en el cacao, el porcentaje de bioaccesibilidad también incrementa, debido a que la matriz posee mayor cantidad de Cd que puede ser solubilizada y ser bioaccesible en las digestiones gastrointestinales.

Modelo matemático

De acuerdo con lo anterior, los datos se ajustaron a un nuevo modelo corregido de efectos lineales con interacciones, eliminando la interacción BD (cantidad de leche y [Cd] en cacao) la cual no fue significativa (Ecuación 3):

$$Y = 24,92 - 3,20A + 2,67B + 0,22C + 1,09D + 0,23AB + 0,25AC - 0,05AD - 0,64BC - 0,14CD \quad (\text{Ec. 3})$$

El modelo ajustado permitió explicar el comportamiento de los datos experimentales en un 94,01 %, observándose una tendencia lineal entre los datos experimentales y los obtenidos con el modelo ajustado (Figura 2).

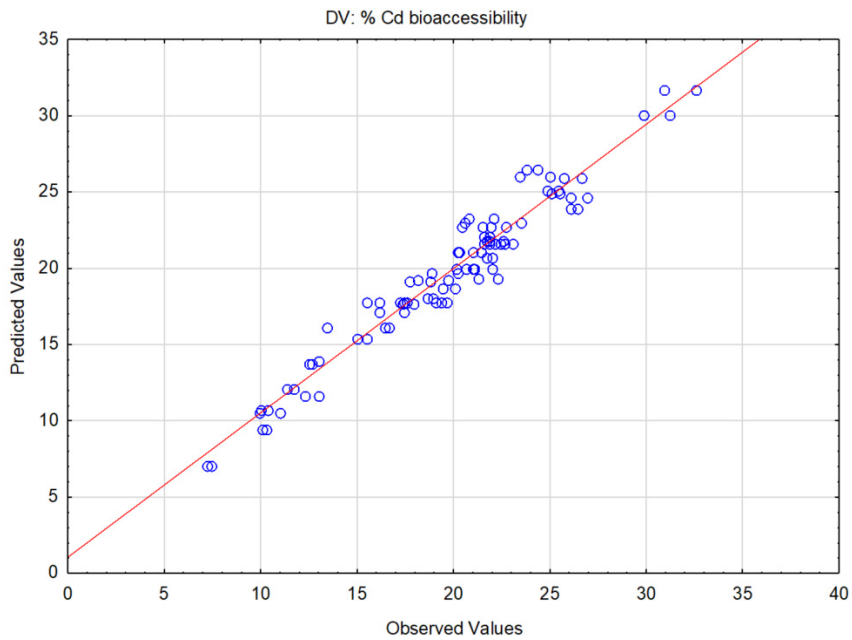


Figura 2. Valores observados con respecto a valores predichos con el modelo ajustado para el porcentaje bioaccesibilidad de Cd.

En la superficie de respuesta se puede observar una tendencia de los datos similares a la reportada en la gráfica de Pareto, con una disminución del porcentaje bioaccesibilidad Cd cuando la cantidad de cacao aumenta, y un aumento en el porcentaje bioaccesibilidad cuando las cantidades de leche aumentan (Figura 3).

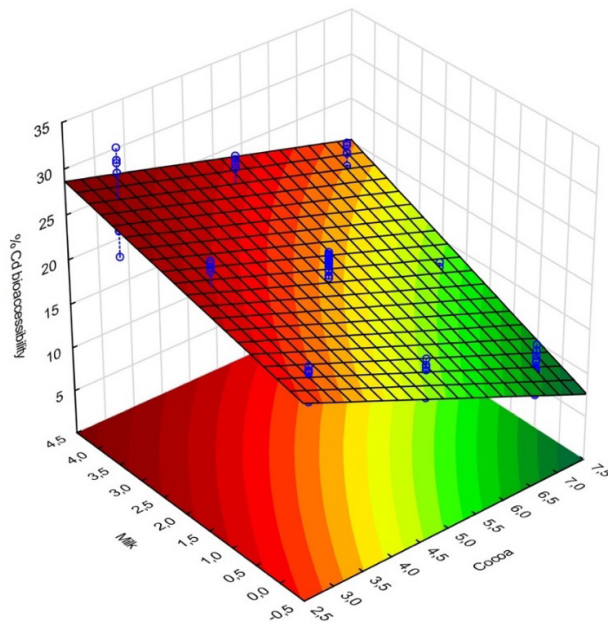


Figura 3. Superficie de respuesta del modelo ajustado graficando % de bioaccesibilidad de Cd en función de cantidad de leche y cacao, manteniendo las otras dos variables fijas a mitad del valor.

Valor mínimo de bioaccesibilidad

Una vez obtenido el modelo matemático para describir el comportamiento del porcentaje bioaccesibilidad de Cd en las formulaciones de chocolate, se obtuvieron los valores de las variables que corresponden a formulaciones con el valor mínimo de bioaccesibilidad de Cd de 7,07 %, donde se obtuvo una formulación con 7 g de cacao, 0 g de leche y 2 g de azúcar, utilizando un cacao de 1,23 mg/kg de Cd. Así mismo, otros valores mínimos se obtuvieron para formulaciones de chocolate con otras concentraciones de Cd en el cacao y mayor cantidad (Cuadro 5). También, se obtuvo el valor experimental de la formulación de chocolate propuesta por el modelo ajustado, obteniéndose un error de 2,08 %.

Cuadro 5. Puntos experimentales de valor mínimo de porcentaje de bioaccesibilidad de Cd utilizando cacao de [Cd] conocida.

Cacao, g	Leche, g	Azúcar, g	[Cd] en cacao, mg/kg	Bioaccesibilidad de Cd, %		Error, %
				Valor experimental	Valor predicho	
7	0	2	1,23	7,22	7,07	2,08
7	0	2	5,43	9,21	8,94	2,96
7	0	2	9,11	11,65	10,57	9,24

Estos resultados muestran que las formulaciones de chocolate, para cualquier concentración de Cd del cacao utilizado dentro del intervalo del modelo (Cuadro 1), que poseen menor valor de porcentaje de bioaccesibilidad de Cd corresponden a chocolate negro o amargo (*dark chocolate*) donde el alto contenido de grasa puede favorecer a la retención del Cd en la digestión gastrointestinal, y la ausencia de compuestos ácidos, como la leche, puede evitar la liberación del Cd en su forma bioaccesible.

Evaluación del modelo

La evaluación del modelo ajustado se adelantó con formulaciones diferentes a los puntos experimentales utilizados para el modelo, se calculó el error del valor preestablecido por el modelo para 10 formulaciones experimentales donde se obtuvieron errores de 8,84 % en promedio (Cuadro 6).

Cuadro 6. Puntos experimentales de formulaciones de chocolate para la validación del modelo ajustado.

Cacao, g	Leche, g	Azúcar, g	[Cd] en cacao, mg/kg	Bioaccesibilidad de Cd, %		Error, %
				Valor experimental	Valor predicho	
3	0	3	9,11	23,27	22,97	1,31
3	2	2	6,63	28,51	25,80	9,51
3	2	4	9,11	27,33	24,26	11,23
5	0	2	6,63	16,47	15,57	5,45
5	0	4	6,63	18,73	16,66	11,09
5	4	4	9,11	24,54	22,39	8,77
70	0	30	6,63	11,64	10,55	9,31
70	20	40	6,63	16,87	15,03	10,86
70	40	30	6,63	22,02	19,99	9,22
3087	0	1023	8,41	15,22	13,45	11,64

El modelo se ajustó para las variables, sin embargo, el modelo puede aplicarse para grandes cantidades de cacao, leche y azúcar (A, B y C respectivamente) siempre y cuando se mantengan las proporciones estipuladas para este modelo (Cuadro 1). Esta afirmación se sustenta en resultados obtenidos (Cuadro 6) para formulaciones de mayor masa; por ejemplo, para una formulación de 4 kg, los valores experimental y preestablecido de bioaccesibilidad de Cd fueron 15,22 y 13,45 %, respectivamente, diferencia que representa tan solo un 11,64 % de error.

Comparación con otros valores

Los valores obtenidos de porcentaje de bioaccesibilidad de Cd para esta investigación se compararon con resultados reportados por otros autores (Cuadro 7). Si bien, las matrices utilizadas en los otros trabajos no son las mismas, utilizan como base cacao en los productos elaborados.

Cuadro 7. Comparación del porcentaje de bioaccesibilidad de Cd con otros autores.

Valor	Bioaccesibilidad de Cd, %		
	Chocolate (Este trabajo)	Licor de cacao (Barraza <i>et al.</i> 2017)	Polvo de bebida de chocolate (Peixoto <i>et al.</i> 2016)
Promedio	19,61 ± 5,25	99,2 ± 4,13	6,5 ± 3,04
Menor	7,22	91,0	3,0
Mayor	32,56	106,2	11,1

Una de las diferencias en el valor de porcentaje de bioaccesibilidad de Cd de este trabajo con el trabajo de Barraza y colaboradores es debido a que solo consideraron la digestión gástrica como procedimiento para determinar la fracción de Cd bioaccesible. Una de las razones de esta consideración es que ellos mencionan la probabilidad de absorción de Cd antes de entrar a la fase pancreática, pero es una hipótesis aún por confirmar (Barraza *et al.*, 2017). También, modificaron las condiciones de la digestión para obtener altos porcentajes de bioaccesibilidad y maximizar los efectos de una posible intoxicación (Barraza *et al.*, 2017).

Los valores de bioaccesibilidad del trabajo de Peixoto y colaboradores son menores a los reportados ya que ellos utilizaron diferentes formulaciones de polvo de bebida, algunas de las cuales con adiciones de compuestos funcionales que contribuyeron a una reducción del porcentaje bioaccesibilidad de Cd. Además, optimizaron la cantidad de bilis y el pH en las digestiones gastrointestinales, incluyendo adiciones de compuestos dietarios como pectina y celulosa, que condujeron a menores valores de bioaccesibilidad de Cd (Peixoto *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

Se obtuvo un modelo matemático para correlacionar el porcentaje de bioaccesibilidad de cadmio con los componentes cacao, leche, azúcar y concentración de Cd total en el cacao; donde explicó el comportamiento de los datos experimentales con los datos preestablecidos en un 94,01 % y la evaluación del modelo mostró errores de 8,84 %, en promedio. En el modelo se encontró efecto significativo en todas las contribuciones lineales, observándose efectos negativos en la cantidad de cacao y azúcar, y efectos positivos en la cantidad de leche y la concentración de Cd en cacao. La contribución lineal de la cantidad de cacao y la cantidad de leche fueron las variables más significativas en el modelo. Se propuso una formulación con 77,8 % de cacao y 22,2 % de azúcar, que corresponde a un chocolate amargo, con un porcentaje de bioaccesibilidad de Cd de 7,07 %. Además, utilizando cacao de concentración de Cd dentro del intervalo del modelo, se propusieron formulaciones que corresponde a chocolate amargo (*dark chocolate*) que poseen porcentaje de bioaccesibilidad de Cd menores al 11 %. Los presentes resultados orientan al productor y comercializador a conocer las formulaciones de cacao pertinentes a disminuir la exposición y toxicidad de Cd, con granos de cacao que posean alto contenido de Cd provenientes de regiones del Santander.

REFERENCIAS

- ABT, EILEEN; SAM, JENNIFER-FONG; GRAY, PATRICK; ROBIN, LAUREN POSNICK. Cadmium and lead in cocoa powder and chocolate products in the US Market. *Food Additives & Contaminants: Part B*, v. 11, n. 2, 2018, p. 92–102.
<https://doi.org/10.1080/19393210.2017.1420700>
- ABT, EILEEN; ROBIN, LAUREN-POSNICK. Perspective on Cadmium and Lead in Cocoa and Chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 68, n. 46, 2020, p. 13008–13015.
<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08295>
- ALVES, RICARDO N.; MAULVAULT, ANA L.; BARBOSA, VERA L.; FERNANDEZ-TEJEDOR, MARGARITA; TEDIOSI, ALICE; KOTTERMAN, MICHIEL; VAN DEN HEUVEL, FREDERICUS H.M.; ROBBENS, JOHAN; FERNANDES, JOSÉ O.; RASMUSSEN, RIE-ROMME; SLOTH, JENS J.; MARQUES, ANTÓNIO. Oral bioaccessibility of toxic and essential elements in raw and cooked commercial seafood species available in European markets. *Food Chemistry*, v. 267, 2018, p. 15-27.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.045>
- ARÉVALO-GARDINI, ENRIQUE; ARÉVALO-HERNÁNDEZ, CESAR O.; BALIGAR, VIRUPAX C.; HE, ZHENLI L. Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of The Total Environment*, v. 605-606, 2017, p. 792-800.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122>
- BARRAZA, F.; SCHRECK, E.; LÉVEQUE, T.; UZU, G.; LÓPEZ, F.; RUALES, J.; PRUNIER, J.; MARQUET, A.; MAURICE, L. Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *Environmental Pollution*, v. 229, 2017, p. 950-963.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.080>
- BARRAZA, FIORELLA; SCHRECK, EVA; UZU, GAËLLE; LÉVEQUE, THIBAUT; ZOUITEN, CYRIL; BOIDOT, MATHIEU; MAURICE, LAURENCE. Beyond cadmium accumulation: Distribution of other trace elements in soils and cacao beans in Ecuador. *Environmental Research*, v. 192, 2021, p. 110241.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110241>
- BHAT, ZUHAIB F.; MORTON, JAMES D.; MASON, SUSAN L.; BEKHIT, ALAA EL-DIN A.; MUNGUREB, TANYARADZWA E. Pulsed electric field: Effect on in-vitro simulated gastrointestinal protein digestion of deer *Longissimus dorsi*. *Food Research International*, v. 120, 2018, p. 793-799.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.040>
- CHAPARRO-ACUÑA, SANDRA-PATRICIA; VARGAS-MORENO, PAOLA-ANDREA; SILVA-GÓMEZ, LEONARDO-ANDRÉS; CÁRDENAS, OSWALDO-ELIÉCER. Cadmium voltametric quantification in table chocolate produced in Chiquinquirá-Boyaca, Colombia. *Acta Agronómica*, v. 66, n. 2, 2017, p. 172-177.
<http://dx.doi.org/10.15446/acag.v66n2.5847>
- DE OLIVEIRA, VINICIUS-HENRIQUE; ULLAH, IHSAN; DUNWELL, JIM M.; TIBBETT, MARK. Bioremediation potential of Cd by transgenic yeast expressing a metallothionein gene from *Populus trichocarpa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 202, 2020, p. 110917.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110917>
- ECHEVERRY, A.; REYES, H. Determinación de la concentración de cadmio en un chocolate colombiano con 65 % de cacao y chocolates extranjeros con diferentes porcentajes de cacao. *Entre Ciencia e Ingeniería*, v. 19, 2016, p. 22-32.
<https://revistas.ucp.edu.co/index.php/entrecienciaeingenieria/article/view/452>
- FEBRIANTO, NOOR-ARIEFANDIE; XHU, FAN. Changes in the Composition of Methylxanthines, Polyphenols, and Volatiles and Sensory Profiles of Cocoa Beans from the Sul 1 Genotype Affected by Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 68, n. 32, 2020, p. 8658-8675.
<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02909>

- FRANCISCO, JOÃO; CARDOSO, CARLOS; BANDARRA, NARCISA; BRITO, PEDRO; HORTA, ANDRÉ; PEDROSA, RUI; GIL, MARIA M.; DELGADO, INÉS-MARGARIDA; CASTANHEIRA, ISABEL; AFONSO, CLÁUDIA. Bioaccessibility of target essential elements and contaminants from *Fucus spiralis*. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 74, 2018, p. 10-17.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.08.003>
- GRAMLICH, A.; TANDY, S.; ANDRES, C.; CHINCHEROS-PANIAGUA, J.; ARMENGOT, L.; SCHNEIDER, M.; SCHULIN, R. Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. *Science of The Total Environment*, v. 580, 2017, p. 677-686.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.014>
- GRAMLICH, A.; TANDY, S.; GAUGGEL, C.; LÓPEZ, M.; PERLA, D.; GONZALEZ, V.; SCHULIN, R. Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Science of The Total Environment*, v. 612, 2018, p. 370-378.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.145>
- GÜLTEKİN-ÖZGÜVEN, MINE; BERKTAŞ, IJLAL; ÖZÇELİK, BERAAT. Change in stability of procyanidins, antioxidant capacity and in-vitro bioaccessibility during processing of cocoa powder from cocoa beans. *LWT-Food Science and Technology*, v. 72, 2016, p. 559-565.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.065>
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, RAQUEL; NAVARRO-BLASCO, IÑIGO. Estimation of dietary intake and content of lead and cadmium in infant cereals marketed in Spain. *Food Control*, v. 26, n. 1, 2012, p. 6-14.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.024>
- INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics Cocoa Year 2016/17. Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, v. 43, n. 1, 2019, p. 1-147.
- KASA, NURSU-AYLIN; BÜYÜKPINAR, ÇAĞDAŞ; ERULAŞ, AHMET-FATİH; BAKIRDERE, SEZGIN. A sensitive and accurate analytical method for the determination of cadmium in food samples: Molybdenum coated T-shape slotted quartz tube flame atomic absorption spectrophotometry. *Food Chemistry*, v. 319, 2020, p. 126572.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126572>
- LEWIS, CALEB; LENNON, ADRIAN M.; EUDOXIE, GAIUS; SIVAPATHAM, PARAMASIVAM; UMAHARAN, PATHMANATHAN. Plant metal concentrations in *Theobroma cacao* as affected by soil metal availability in different soil types. *Chemosphere*, v. 262, 2021, p. 127749.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127749>
- LO DICO, GIANLUIGI-MARIA; GALVANO, FABIO; DUGO, GIACOMO; D'ASCENZI, CARLO; MACALUSO, ANDREA; VELLA, ANTONIO; GIANGROSSO, GIUSEPPE; CAMMILERI, GAETANO; FERRANTELLI, VINCENZO. Toxic metal levels in cocoa powder and chocolate by ICP-MS method after microwave-assisted digestion. *Food Chemistry*, v. 245, 2018, p. 1163-1168.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.052>
- MARTINI, SERENA; CONTE, ANGELA; TAGLIAZUCCHI, DAVIDE. Bioaccessibility, bioactivity and cell metabolism of dark chocolate phenolic compounds after in vitro gastro-intestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, v. 49, 2018, p. 424-436. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.09.005>
- MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALANCE, S. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, v. 5, n. 6, 2014, p. 1113-1124.
<https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; ANDREY, D.; BLAKE, C.; LOBINSKI, R. Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products. *Food Additives and Contaminants*, v. 20, n. 4, 2003, p. 343-352.
<http://dx.doi.org/10.1080/0265203031000077888>
- PEIXOTO, RAFAELLA R.A.; DEVESA, VICENTA; VÉLEZ, DINORAZ; CERVERA, M. LUISA; CADOREA, SOLANGE. Study of the factors influencing the bioaccessibility of 10 elements from chocolate drink powder. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 48, 2016, p. 41-47.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2016.02.002>

- PEIXOTO, RAFAELLA R.A.; OLIVEIRA, ANDREA; CADORE, SOLANGE. Risk assessment of cadmium and chromium from chocolate powder. *Food Additives & Contaminants: Part B*, v. 11, n. 4, 2018, p. 256–263.
<https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1499676>
- PICO-HERNÁNDEZ, SERGIO M.; JAIMES-ESTÉVEZ, JAIME; LÓPEZ-GIRALDO, LUIS J.; MURILLO-MÉNDEZ, CRISTIAN J. Supercritical extraction of bioactive compounds from Cocoa husk: study of the main parameters. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, v. 91, 2019, p. 95-105.
<http://dx.doi.org/10.17533/udea.redin.n91a09>
- RECKNAGEL, SEBASTIAN; KOCH, MATTHIAS; KÖPPEN, ROBERT; BUTTLER, SABINE; PENK, SIBYLLE; MAUCH, TATJANA; SOMMERFELD, THOMAS; WITT, ANGELIKA. Development of certified reference materials for the determination of cadmium and acrylamide in cocoa. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 412, n. 19, 2020, p. 4659-4668.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02719-0>
- SATARUG, SOISUNGWAN; VESEY, DAVID A.; GOBE, GLENDA C. Current health risk assessment practice for dietary cadmium: Data from different countries. *Food and Chemical Toxicology*, v. 106, 2017, p. 430-445.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.013>
- TORO-URIBE, SAID; LÓPEZ-GIRALDO, LUIS-JAVIER; ALVAREZ-RIVERA, GERARDO; IBÁÑEZ, ELENA; HERRERO, MIGUEL. Insight of Stability of Procyanidins in Free and Liposomal Form under an *in Vitro* Digestion Model: Study of Bioaccessibility, Kinetic Release Profile, Degradation, and Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 67, n. 7, 2019, p. 1990-2003.
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b00351>
- VILLAMIZAR-JAIMES, ARLEY-RENÉ; LÓPEZ-GIRALDO, LUIS-JAVIER. Cáscara de cacao fuente de polifenoles y fibra: simulación de una planta piloto para su extracción. *Respuestas*, v. 22, n. 1, 2017, p. 75-83.
<https://doi.org/10.22463/0122820X.821>
- ZHUANG, PING; ZHANG, CHAOSHENG; LI, YINGWEN; ZOU, BI; MO, HUI; WU, KEJUN; WU, JINGTAO; LI, ZHIAN. Assessment of influences of cooking on cadmium and arsenic bioaccessibility in rice, using an *in vitro* physiologically-based extraction test. *Food Chemistry*, v. 213, 2016, p. 206-214.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.066>

Bromatological characterization of fruit waste*

Caracterización bromatológica de residuos de frutas

FLÓREZ-MONTES, CILIANA¹; ROJAS-GONZÁLEZ, ANDRÉS-FELIPE ²; RODRÍGUEZ- BARONA, SNEYDER³

ABSTRACT

In Colombia, a high amount of fruit waste is currently generated. These causes a negative environmental impact due to its high organic load. However, this type of waste has compounds in its structure that can be used in order to reduce the environmental impact and to obtain added value. The main of this study was to characterize bromatologically sixteen residues of fruit processing in Colombia, in order to propose a possible use in the food industry. The bromatological characterization of the waste was carried out by means of the quantification of dry matter (ASTM E1756-08), ash

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 4 Noviembre 2020.

Aprobado para publicación: 10 Noviembre 2021.

* Proyecto de investigación de origen: "Valorización de residuos del procesamiento de frutas para la obtención de ingredientes alimenticios". Financiación: Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales. Culminación: 20 de diciembre de 2019

1 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Departamento de Ingeniería Química. M.Sc. Ingeniería Química, Manizales, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-9190-4037>

2 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Departamento de Ingeniería Química. Ph.D. Ingeniería Química, Manizales, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-6905-0802>

3 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Departamento de Ingeniería Química. Ph.D. Biología, Manizales, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-2290-2238>

Correspondencia: cflorezm@unal.edu.co

Cómo citar este artículo: FLÓREZ-MONTES, CILIANA; ROJAS-GONZÁLEZ, ANDRÉS-FELIPE; RODRÍGUEZ- BARONA, SNEYDER. Bromatological characterization of fruit waste. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 20, n. 1, 2022, p. 84-96. Doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1759>

(ASTM E1755-01), proteins (Kjeldahl method), crude fats (AOAC Official Method), total dietary fiber (AOAC 993.21) and carbohydrates. It was found that grape and soursop seeds, lulo peel and tree tomato stem presents the highest total dietary fiber with content percentages above 50 %. Also, tree tomato, soursop, tangerine and orange seeds are an important source of protein and crude fats, with values highest than 12 and 27 %, respectively. It was also found that pineapple, mango, soursop and grape peel have a carbohydrate content greater than 50%. As a conclusion, the results of this study demonstrate that fruit waste have a potential use in the food industry, due to their protein, crude fat, total dietary fiber and carbohydrates content.

RESUMEN

En Colombia, actualmente se genera una gran cantidad de residuos de frutas. Estos causan un impacto ambiental negativo debido a su alta carga orgánica. Sin embargo, este tipo de residuos presentan en su estructura compuestos que pueden ser aprovechados con el fin de disminuir el impacto ambiental y obtener un valor agregado. El objetivo de este estudio fue caracterizar bromatológicamente dieciséis residuos del procesamiento de frutas en Colombia, con el fin de proponer un posible uso en la industria alimentaria. La caracterización bromatológica de los residuos se realizó mediante la cuantificación de materia seca (ASTM E1756-08), cenizas (ASTM E1755-01), proteínas (método Kjeldahl), grasas brutas (Método Oficial AOAC), fibra dietética total (AOAC 993.21) y carbohidratos. Se encontró que las semillas de uva y guanábana, piel de lulo y vástago de tomate de árbol presentan el contenido de fibra dietética total más alto con porcentajes superiores al 50 %. Asimismo, las semillas de tomate de árbol, guanábana, mandarina y naranja son una fuente importante de proteínas y grasas crudas, con valores superiores al 12 y 27 %, respectivamente. También, se encontró que la piña, el mango, la guanábana y la cáscara de uva tienen un contenido de carbohidratos superior al 50%. En conclusión, los resultados de este estudio demuestran que los residuos de frutas tienen un uso potencial en la industria alimentaria, debido a su contenido de proteína, grasa cruda, fibra dietética total y carbohidratos.

KEYWORDS:

Agricultural waste;
Environmental impact; Food;
Green economy; Potential use.

PALABRAS CLAVE:

Desperdicio agrícola, impacto ambiental, alimento, economía verde, aprovechamiento.

LIST OF ABBREVIATIONS

Ash	ASH
Carbohydrates	C
Crude fat	CF
Dry matter	DM
Grape peel	GP
Grape seed	GS
Grape stalk	GSt
Lulo peel	LP
Mango peel	MP
Orange peel	OP
Orange seed	OS

Passion fruit peel	PPF
Pineapple peel	PP
Proteins	Pr
Soursop peel	SP
Soursop seed	SS
Tangerine peel	TP
Tangerine seed	TS
Total dietary fiber	TDF
Tree tomato peel	TTP
Tree tomato seed	TTS
Tree tomato stem	TTSt

INTRODUCTION

Currently, agro-industrial activities have grown due to the demand for raw materials and food products from the agricultural sector. This economic activity generates a large amount of agro-industrial waste throughout its production cycle (Gutiérrez *et al.*, 2020). In Colombia, one of the main economic activities is agriculture. Around 1.300 million tons of waste are generated in the country per year (Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, 2017), of which 5,5 % corresponds to agricultural residual biomass (72 million tons) (Marrugo *et al.*, 2019).

The final disposal of these wastes is usually inadequate, since they are taken to sanitary landfills or are incinerated (Chew *et al.*, 2019). This becomes an economic problem, as companies must bear the costs related to final disposal. Likewise, they generate a negative and indirect environmental impact due to the high concentration of organic matter (Chew *et al.*, 2019). Therefore, the use of this waste represents an opportunity for improvement at an economic level. This can be done by transforming agro-industrial waste to obtain other valuable products. Similarly, the use of waste materials helps mitigate negative environmental impacts, avoiding their inappropriate disposal.

Various investigations have focused on studying the use of agro-industrial waste. For many years, most of these studies were directed at the use of waste for power generation (Qian *et al.*, 2020). However, the analysis of the structural composition of biomass has shown that wastes from agribusiness, such as peels and seeds, contain compounds of great interest in their structure (Roda and Lambri, 2019). Fruit waste contains in their structure proteins, fibers, lipids and carbohydrates, which can be quantified through a bromatological analysis. By means of this analysis, it is possible to propose other types of applications for these wastes, such as obtaining compounds of interest, food for animals and even food for humans ((Roda and Lambri, 2019; Mojica-Gómez and Pérez-Mora, 2019).

In literature, studies have been found on the use of agro-industrial waste. For example, the obtaining of flour from the cocoa shell was investigated, finding a high fiber content (Ríos-Pérez *et al.*, 2020). The improvement in the quality of meat products with the incorporation of fruit peels and seeds has also been studied (Calderón-Oliver and López-Hernandez, 2020). Likewise, citrus residues are known to be rich in bioactive compounds (Russo *et al.*, 2021). On the other hand, fruit and vegetable residues can also be used for livestock nutrition (Tadesco *et al.*, 2021).

However, these investigations usually focus on the study of a specific component or a specific residue. Therefore, the bromatological characterization of a variety of fruit residues represents an important alternative in the analysis of the composition of this type of biomass. Thus, knowing the composition of fruit residues can provide a general overview for its use, knowing the benefits of proteins, fibers, fats and carbohydrates.

Proteins have a plastic function in human and animal body. These are necessary for cell and tissue renovation, and participate in enzyme, antibodies and hormone synthesis (Yu and Fukagawa, 2020). Fiber can be classified as soluble or insoluble. Soluble fiber promotes the formation of viscous gels, which slow gastric evacuation,

allowing the absorption of nutrients (Soliman, 2019). The insoluble fiber increases the volume of feces, which is related to the improvement in digestive disorders such as constipation (Johnson, 2020).

Within the lipids are vegetable fatty acids, which are mostly unsaturated (Xicoy *et al.*, 2019). This type of fatty acids has great advantages in health, as they provide energy to the body, allow easy assimilation of vitamins A, D, E and K, promote heart health and reduce blood cholesterol levels, that decreases the chances of suffering a heart disease (Hernandez-Rodas *et al.*, 2016). Carbohydrates are the most abundant biomolecules in nature, its main function is to provide energy to the body, but also have plastic and regulatory function (Ahnen *et al.*, 2020). The simplest carbohydrates are absorbed quickly, these are usually found in fruits, milk, honey, among others. On the other hand, the compound carbohydrates are absorbed slowly and are present in legumes, cereals, potatoes, etc. (Ahnen *et al.*, 2020).

According to the benefits that proteins, fibers, fats and carbohydrates have on human health, the following hypothesis is contemplated: the bromatological characterization of fruit waste generated in the agro-industry is a theoretical basis for the use of these in the food industry. Therefore, the aim of the present study was to characterize bromatologically 16 types of wastes (peels, seeds, stem and stalk) generated during the processing of fruits (passion fruit, pineapple, tree tomato, mango, lulo, tangerine, orange, soursop and grape) in the Caldas province, Colombia.

METHOD

The wastes used in this research were obtained from supermarkets and agroindustries in the Caldas province-Colombia-South America. Sixteen wastes were selected from peels (9), seeds (5), stem (1) and stalk (1). The environmental working conditions were 150 m.a.s.l., 18 °C and 80 %, of average altitude, temperature and relative humidity, respectively.

Chemicals and reagents

For bromatological characterization, potassium sulfate (AR/ACS Loba Chemie), cupric sulfate (AR/ACS Loba Chemie), sulfuric acid (95 % J.T. Baker), sodium hydroxide ($\geq 99,0\%$ EMSURE®), methyl red (AR/ACS Loba Chemie), petroleum ether (RA ACS J.T. Baker), ethanol (99,5 % Scharlau), acetone (99,5 % Panreac) and distilled water were used.

Pretreatment

The wastes preparation for the analysis was carried out following NREL/TP-510-42620 norm (Pesce and Fernandes, 2020). Once obtained and separated, the wastes were stored at -20 °C until use. These were manually cut to reduce its size and dried at 45 °C in a Terrigeno brand muffle up to constant weight. Once dry, the wastes were mill in a disk mill until it reaches a particle size of 1mm or less.

Bromatological analysis

To determine the bromatological composition of the wastes, it was necessary to evaluate the percentage of dry matter (DM), ash (ASH), proteins (Pr), crude fat (CF), total dietary fiber (TDF) and carbohydrates (C). The methodology applied for all the components is detailed below. All the analysis was made by triplicate.

Dry matter. For the dry matter determination ASTM E1756-08 standard (ASTM INTERNATIONAL, 2020a) was followed. Here 1 g of sample was weighted in a porcelain crucible and dried at 105 °C for 24h in a Terrigeno muffle. For dry matter (DM) percentage determination, equation 1 was used.

$$\%DM = \frac{\text{Dry waste weight}}{\text{Waste weight}} * 100\% \quad (\text{Eq. 1})$$

Ash. The ash determination was carried out following the ASTM E1755-01 standard (ASTM INTERNATIONAL, 2020b). 1 g of sample was weighted in a porcelain crucible and subjected to heating in a Terrigeno muffle, using the temperature ramp methodology for a heating rate of 10°C/min, as follows:

- Heat up to 105 °C and keep at this temperature for 12 min.
- Then warm up to 250°C and keep at this temperature for 30 min.
- Then warm up to 575°C and keep at this temperature for 3 hr.
- Cool to 105 °C and keep at this temperature until samples are removed.

For ash (ASH) percentage determination, equation 2 was used.

$$\%ASH = \frac{\text{Ashes weight}}{\text{Waste weight}} * 100\% \quad (\text{Eq. 2})$$

Proteins: Kjeldahl method. The protein percentage determination was performed in accordance with the AOAC standard (Vargas *et al.*, 2019). For this analysis, 1 g of waste was weighed in a Kjeldahl digestion flask. Glass beads, 10 g of potassium sulfate, 0,5 g of cupric sulfate and 20 mL of concentrated sulfuric acid were added. The flask was connected to the absorption trap that contains 250 mL of sodium hydroxide 15 %. The mixture was heated at 420 °C, approximately. Once the solution is clear, heating was continued for an additional 15-20 minutes. Then, the mixture was left to cool, and 200 mL of water were added. The flask was connected to the distillation apparatus and 100 mL of NaOH 30 % were slowly added. No less than 100 mL were distilled in a flask that contained 50 mL of a sulfuric acid 0,1 N, 4 to 5 drops of methyl red and 50 mL of distilled water. Excess acid was titrated with NaOH 0,1 N until it turns yellow.

For protein (Pr) percentage determination, equation 3 was used.

$$\%Pr = \frac{14 * \text{Equivalent concentration} * \text{Excess acid Volume} * 6,25}{\text{Waste weight} * 1000} * 100\% \quad (\text{Eq. 3})$$

Crude fat. Crude fat was extracted with Soxhlet according to AOAC Official Method (Lim and Abu, 2019). 2 to 5 g of waste was weighed in the filter paper cartridge and inserted into the extraction chamber. The extraction was carried out using at 95 °C petroleum ether as solvent for 6 to 8h. Once the extraction was complete, the solvent was recovered by distillation under vacuum. For crude fat (CF) percentage determination, equation 4 was used.

$$\%CF = \frac{\text{Round bottomed flask plus crude fat weight} - \text{Round bottomed flask weight}}{\text{Waste weight}} * 100\% \quad (\text{Eq. 4})$$

Total dietary fiber. The total dietary fiber quantification was made following the AOAC 993.21 standard (Kekana *et al.*, 2020). 500 mg of waste was weighed into beaker of 250 mL, and 25 mL of water were added. The suspensions were stirred at 80 rpm for 2 min. The mixture was covered with aluminum foil and let stand 90 min without stirring in a water bath at 37 °C. After this time, 100 mL of ethanol 95 % were added and kept 1h at room

temperature for 1h. The residue was collected under vacuum and washed with 2 portions of 20 mL ethanol 78 %, 2 portions of 10 mL ethanol 95 %, and 10 mL of acetone. The residue was dried for 2h at 105 °C, cooled and weighed. Then, the residue ashes and residue protein were determined. For total dietary fiber (TDF) percentage determination, equation 5 was used.

$$\%TDF = \frac{\text{Fiber weight} - \left(\frac{(\text{Protein} + \text{Ashes})_{\text{in fiber obtained}}}{100} \right) * \text{Fiber weight}}{\text{Waste weight}} * 100\% \quad (\text{Eq. 5})$$

Carbohydrates. Carbohydrates were determined by difference. For carbohydrates (C) percentage determination, equation 6 was used.

$$\%C = 100 - (\%P + \%CF + \%TDF + \%ASH) \quad (\text{Eq. 6})$$

Statistical analysis

We performed all the analyses in triplicate; the values reported are presented as average values along with their standard deviations.

RESULTS

Bromatological analysis

The results obtained for dry matter (DM), ashes (ASH), crude fat (CF), proteins (Pr), total dietary fiber (TDF) and carbohydrates (C) are presented in Table 1. These results suggested that the DM percentage is between 11 and 73 %. Passion fruit peel (PFP) was the waste with the lowest DM content and soursop seed (SS) the waste with the highest DM content. In accordance with waste DM content, most of these could not be used for a combustion process without the use of an auxiliary fuel or without being subjected to a previous drying process, because its moisture content is over 50 % (Shojaeiarani *et al.*, 2019).

As for the ash content, SS has the lowest percentage ($1,58 \pm 0,01$ %) and the tree tomato stem (TTSt) the highest percentage ($12,80 \pm 0,21$ %). Waste with an ASH content greater than 5 % is not recommended for their use in the combustion process, since these negatively affect calorific power, generate atmospheric pollution (presence of halides), form slag deposits that cause thermal resistance to passage of heat (basic ash) and cause oxidation in combustion equipment (acid ash) (Rojas-González *et al.*, 2019). According to ASH and DM content, the most suitable waste to be used in the combustion process are grape seed (GS) and SS.

On the other hand, it is important to highlight that moisture, specifically equilibrium moisture content, is an indicator of the stability of food products. Therefore, it is important to analyze the water activity of the waste in order to know what its stability would be. In this way, it is possible to define whether it is advisable for the waste to go through a dehydration process so that it can be used for food purposes (Bell, 2020). Regarding the ash content, it is important to identify the type of food in which the waste wants to be used. For example, flours may have an ash content of less than 2,5 % (ICONTEC, 2002), while in concentrates for an adult cat it is recommended that the percentage of ash be less than 10 % (Dueñas, 2018).

In the Table 1 is observed that the CF percentages are between 1 and 34 %, where the PP is the waste with the lowest CF content and OS is the waste with the highest CF content. In general, the seeds have a higher fat

content. Fats are one of the main sources of energy for humans. Also, fats help in the synthesis of hormones and allow the assimilation of liposoluble vitamins including A, D, E and K (Hernandez-Rodas *et al.*, 2016). Vegetable fats promote cardiovascular health because they reduce cholesterol levels. Therefore, TS, OS, SS and TTS, can be used to obtain vegetable fats, which have important applications in the food and pharmaceutical industry due to the advantages they have on health (Hernandez-Rodas *et al.*, 2016). In addition, due to their high CF content, these wastes could be used in biodiesel production (Ramos *et al.*, 2019). Spigno *et al.* (2013) report a value of 1,40 % for CF for GS, which is 8,8 times lower compared to that found experimentally ($12,38 \pm 0,18$ %).

As for Pr content, the TTP has the lowest percentage ($2,44 \pm 0,19$ %) and the TTSt the highest percentage ($19,47 \pm 0,23$ %). Similarly, it was obtained that the seeds also have a high content. According to these results, TTS, TS, OS and SS could be used to obtain proteins, which besides being fundamental in the diet due to their contribution of essential amino acids. They have applications in the pharmaceutical and food industry, because these act as gelling agents, emulsifiers and water absorbers (Awuchi *et al.*, 2019).

On the other hand, wastes with a greater amount of Pr and C like GP and SP have a potential use in the food industry considering that the interactions between these biopolymers have a positive influence on the products development with good textures and consistency like puddings and desserts (Awuchi *et al.*, 2019). Gutierrez *et al.* (2003), report values of 12,00 % (C) for PP, which differ significantly from those found in this study ($54,82 \pm 0,86$ %), which is 4,6 grater that reported by Gutierrez *et al.* (2003).

Table 1. Bromatological analysis.

Waste	% DM	% ASH	% CF	% Pr	% TDF	% C
PFP	$11,34 \pm 0,34$	$8,03 \pm 0,11$	$1,92 \pm 0,05$	$9,85 \pm 0,29$	$45,22 \pm 0,92$	$34,97 \pm 1,20$
PP	$14,52 \pm 0,23$	$4,81 \pm 0,07$	$1,31 \pm 0,03$	$7,51 \pm 0,19$	$31,55 \pm 0,75$	$54,82 \pm 0,86$
TTP	$17,04 \pm 0,45$	$8,67 \pm 0,09$	$2,55 \pm 0,06$	$2,44 \pm 0,19$	$51,50 \pm 0,41$	$34,84 \pm 0,48$
TTS	$21,09 \pm 0,24$	$4,03 \pm 0,05$	$27,87 \pm 0,15$	$19,47 \pm 0,23$	$42,07 \pm 0,65$	$6,56 \pm 0,30$
TTSt	$18,33 \pm 0,18$	$12,80 \pm 0,21$	$3,37 \pm 0,09$	$9,97 \pm 0,33$	$52,93 \pm 0,83$	$20,94 \pm 0,53$
MP	$21,87 \pm 0,31$	$2,80 \pm 0,02$	$6,02 \pm 0,02$	$5,97 \pm 0,22$	$29,49 \pm 0,12$	$55,72 \pm 0,22$
LP	$14,79 \pm 0,34$	$6,06 \pm 0,06$	$2,14 \pm 0,08$	$5,39 \pm 0,11$	$55,47 \pm 0,57$	$30,95 \pm 0,60$
TP	$22,81 \pm 0,29$	$3,05 \pm 0,03$	$3,01 \pm 0,09$	$9,40 \pm 0,18$	$38,49 \pm 1,38$	$46,05 \pm 1,58$
TS	$33,26 \pm 0,29$	$1,92 \pm 0,02$	$31,75 \pm 0,97$	$13,15 \pm 0,89$	$51,32 \pm 2,02$	$1,85 \pm 0,18$
OP	$25,42 \pm 0,17$	$3,53 \pm 0,04$	$2,48 \pm 0,19$	$7,19 \pm 0,30$	$42,16 \pm 0,62$	$44,64 \pm 0,33$
OS	$42,60 \pm 0,48$	$3,26 \pm 0,08$	$34,45 \pm 1,69$	$13,17 \pm 0,16$	$37,66 \pm 2,40$	$11,46 \pm 0,88$
SP	$31,98 \pm 0,22$	$6,22 \pm 0,10$	$2,28 \pm 0,07$	$7,65 \pm 0,22$	$32,40 \pm 0,24$	$51,46 \pm 0,35$
SS	$73,48 \pm 0,47$	$1,58 \pm 0,01$	$31,29 \pm 1,03$	$12,56 \pm 0,20$	$52,74 \pm 1,30$	$1,83 \pm 0,14$
GP	$32,30 \pm 0,23$	$2,44 \pm 0,03$	$3,02 \pm 0,20$	$8,21 \pm 0,22$	$22,32 \pm 0,56$	$64,01 \pm 0,86$
GS	$69,40 \pm 0,51$	$1,91 \pm 0,05$	$12,38 \pm 0,18$	$9,79 \pm 0,26$	$61,22 \pm 0,36$	$14,70 \pm 0,60$
GSt	$40,80 \pm 0,33$	$7,12 \pm 0,10$	$2,38 \pm 0,26$	$8,85 \pm 0,22$	$49,52 \pm 1,58$	$32,13 \pm 1,43$

Wastes such as GS, LP, TTSt and SS, which have a high TDF content, could be used in the preparation foods with satiating qualities, as the high TDF content increases the time of chewing, producing a greater amount of saliva and gastric juices and generating the stomach expansion. In addition, soluble fiber decreases digestion, which causes glycogen and fat to be mobilized as energy sources to maintain the level of glucose needed in the blood. Therefore, wastes with high fiber content can be used to treat overweight, diabetes, colon cancer, cardiovascular disease and constipation problems (Soliman, 2019).

Moreover, wastes such as GP and MP, which have a low TDF content, do not have important applications in the food or pharmaceutical industry to obtain products that improve stomach or intestinal problems. Gutierrez *et al.* (2003), report values of 15,93 % (TDF) for PP, which differ significantly from those found in this study. The value found experimentally ($31,55 \pm 0,75$ %) corresponds to approximately double that reported in the literature.

When comparing the results for the bromatological analysis found experimentally in the present work with data from the literature, it was found that these results differ considerably for some wastes. The difference between results may be due to the raw material harvesting conditions, because a lot of data reported in the literature are from studies conducted in other countries. Therefore, it is expected that the wastes have different characteristics in their composition due to soil conditions, environmental conditions and the fertilizers used (Ruales, 2015).

Prospective use of fruit waste

Currently, the valorization of fruit wastes such as seeds and peels has become a challenge for the industries, since these present a high organic load that generates a negative environmental impact, and their adequate disposal represents great costs for those who produce this type of wastes (Vargas and Pérez, 2018). Fruit wastes are generally used for energy generation (Gutiérrez *et al.*, 2020). However, agro-industry waste has a potential use in the human food and animal feed industry due to the large number of compounds of interest that it contains, such as proteins, fibers, fats and carbohydrates (Torres-León *et al.*, 2018). The use of waste to obtain a specific food, for example, flour, cookies, energy bars, additives for meat products, or concentrates for animals, will depend on the composition of each waste.

The recovery of these compounds from agro-industry waste is a sustainable alternative that allows minimizing the costs related to waste disposal, maximizing resources and adding value to them. Therefore, one of the possible applications of these, is their use in the production of animal feed, for example, concentrates for poultry, livestock or dogs, due to the protein and fiber content present in fruit wastes. Nevertheless, it should be noted that, if these are managed properly at the microbiological level, pest control and stability, fruit residues have a potential use in the food industry for human beings (Roda and Lambri, 2019). The amount of fibers, proteins, carbohydrates and fats present in the fruit wastes, will open a general panorama on the possibility of obtaining specific food products. However, more rigorous studies are needed in order to verify the effectiveness of these applications.

The fruit wastes characterized in the present study, such as TTP, TTSt, LP, TS, SS and GS, have a high fiber content (>50 %). Therefore, they can be harnessed to obtain pectins, which are used in the food industry as food additive due to the ability they have to form gels, in addition to the beneficial properties for health such as lowering cholesterol, preventing or decreasing carcinogenesis, increasing satiety, among others (Petkowicz and Williams, 2020). Likewise, the pectin obtained from fruit wastes can be used to produce coating films to preserve the sensory properties and extend the shelf life of some fruits (Maftoonazad and Ramaswamy, 2019).

Similarly, the fruit wastes analyzed in this document could be considered as foods high in fiber, since they have a percentage of total dietary fiber greater than 6 % (European Commission, 2006). Therefore, fruit wastes can be utilized in the preparation of functional concentrates and probiotic formulations with anticancer properties (Petkowicz and Williams, 2020). High fiber content in wastes could be used as a food supplement, food ingredient or in obtaining flours for the preparation of cakes, cookies, cereal bars and bread. The use of these wastes in the food industry could have benefits such as improving intestinal health and lipid metabolism (Alves *et al.*, 2020). On the other hand, wastes such as TS, SS and TTS, which have high fiber (>40 %) and protein (>10 %) contents, can be used to obtain these compounds, which have molecular interactions that contribute functional properties to food, like decreased aggregation and protein precipitation, and increased protein thermal stability (Chevalier *et al.*, 2019).

TTS, TS, OS and SS are wastes that have a high protein content (>12 %). These could be used to obtain proteins that provide functional properties to the food (Gomes *et al.*, 2020), or as raw material for the production of concentrates for animal feed (Calvo, 2017). The use of proteins isolated from agro-industrial waste is an alternative that could reduce human dependence on animal protein. To achieve this, it is necessary to carry out studies on the quality of proteins from agro-industrial waste, considering their amino acid composition, digestibility and bioavailability, as well as the development of techniques that allow improving these last two properties (Chin *et al.*, 2019).

The carbohydrate (>44 %) and protein (>7 %) content of wastes such as PP, TP, OP, SP and GP could be used as substrates in fermentation since they are a source of carbon and nitrogen (Pereira-Da Silva *et al.*, 2020). Generally, these processes use inorganic nitrogen sources, which are usually expensive, this represents an opportunity to reduce the costs of the inputs used in the fermentation processes (Serna and Torres, 2015). The high content of carbohydrates (>50 %) in wastes such as PP, MP, SP and GP suggests that they can be used in the fermentable sugar industry to obtain alcoholic beverages (Chin *et al.*, 2019), or in obtaining foods with a high energy intake (Ahnen *et al.*, 2020). On the other hand, these wastes could be used to produce pullulan through submerged and solid-state fermentation by *A. pullulans* (Singh *et al.*, 2019). Pullulan is a microbial exopolysaccharide that can be used as a substitute for starch in the preparation of low-calorie foods, it can serve as a prebiotic and benefit the health of the consumer, it has application as a stabilizer and protective glaze in various food products, among others (Singh *et al.*, 2019).

The wastes with a high content of crude fat (>27 %), for example TTS, TS, OS and SS, have a potential use to obtain vegetable fats that can be incorporated into functional foods with benefits for human health such as the synthesis of hormones and the assimilation of vitamins A, D, E and K (Hernandez-Rodas *et al.*, 2016). However, it is important to analyze this fat content in order to determine its composition and classify them as saturated or unsaturated fatty acids. Polyunsaturated fatty acids have application in the prevention of cardiovascular diseases due to their high content of HDL cholesterol (Shahidi and Ambigaipalan, 2018). The polyunsaturated fatty acids could be obtained through solid-state fermentation (Klempová *et al.*, 2020) or using different extraction techniques such as soxhlet, microwave assisted, and ultrasound assisted extraction (Hakimi *et al.*, 2018). These same wastes, which have a crude fat percentage between 20,5 % and 37,7 % can be used in animal feed (Calvo, 2017).

CONCLUSIONS

The bromatological characterization is a theoretical base in the studies of use of agroindustrial residues. The variety in the percentages of compounds such as proteins, fibers, fats and carbohydrates present in the fruit wastes, shows that the specific application of each of these residues will depend on which component is the majority.

Grape and soursop seeds, lulo skin and tree tomato stem are a promising raw material for preparing foods with satiating properties and obtaining pectins. Tree tomato, soursop, mandarin and orange seeds that could be used in the food and pharmaceutical industry as gelling and emulsifying agents. Likewise, the seeds of tree tomato, mandarin, orange and soursop have applications in obtaining functional foods that promote the synthesis of hormones and the assimilation of vitamins, while waste rich in carbohydrates, such as pineapple, mango, soursop and skin grape, can be used in the preparation of foods with high energy content.

The results of this research are a theoretical basis that opens the doors for future research on the specific use of waste in the food industry based on the bromatological composition.

REFERENCES

- AHNEN, RYLEE T.; MOTTET, RACHEL; OMOLO, MORRINE; SLAVIN, JOANNE. Carbohydrates. In: Present Knowledge in Nutrition (MARRIOTT, BERNADETTE P.; BIRT, DIANE F.; STALLINGS, VIRGINIA A.; YATES, ALLISON A.). 11 ed. Cambridge (United States): Academic Press, 2020, p. 37–50.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-66162-1.00003-2>

- ALVES, SILVANEIDE; MACÊDO, MANUELLA; MAIA, FRANCISCO-FELIPE; FERNANDES, ROSIMARY; DA SILVA, KELIANE. Preparation, phytochemical and bromatological evaluation of flour obtained from the acerola (*Malpighia puniceifolia*) agroindustrial residue with potential use as fiber source. *LWT*, v. 134, 2020, p. 1-7.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110142>
- ASTM INTERNATIONAL. ASTM E1756-08: Standard test method for determination of total solids in biomass. Pennsylvania (USA): 2020a.
<https://doi.org/10.1520/E1756-08R20>
- ASTM INTERNATIONAL. ASTM E1755-01: Standard test method for ash in biomass. Pennsylvania (USA): 2020b.
<https://doi.org/10.1520/E1755-01R20>
- AWUCHI, CHINIZA-GODSWILL; IGWE, VICTORIA-SOMTOCHUKWU; ECHETA, CHINELO-KATE. The Functional Properties of Foods and Flours. *International Journal of Advanced Academic Research*, v. 5, n. 11, 2019, p. 139-160.
- BELL, LEONARD N. Moisture Effects on Food's Chemical Stability. In: *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications* (BARBOSA-CÁNOVAS, GUSTAVO V.; FONTANA, ANTHONY J.; SCHMIDT, SHELLY J.; LABUZA, THEODORE P.) 2 ed. New Jersey (United States): John Wiley & Sons, 2020, p. 227-253.
<https://doi.org/10.1002/9781118765982.ch9>
- CALDERÓN-OLIVER, MARIEL; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, LUIS H. Food Vegetable and Fruit Waste Used in Meat Products. *Food reviews international*, 2020, p. 1-27
<https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1740732>
- CALVO, VERÓNICA. Implementación de un proceso para el aprovechamiento integral de plantas medicinales (*Curcuma longa*) y residuos de frutas (*Annona muricata*) [Food engineering thesis]. Caldas (Colombia): Corporación Universitaria Lasallista, Facultad de Ingeniería, 2017, 140 p.
- CHEVALIER, LAURA M.; RIOUX, LAURIE-EVE.; ANGERS, PAUL; TURGEON, SYLVIE L. Study of the interactions between pectin in a blueberry puree and whey proteins: Functionality and application. *Food Hydrocolloids*, v. 87, 2019, p. 61-70.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.038>
- CHEW, KIT-WAYNE; CHIA, SHIR-REEN; YEN, HONG-WEI; NOMANBHAY, SAIFUDDIN; HO, YEEK-CHIA; SHOW, PAU-LOKE. Transformation of biomass waste into sustainable organic fertilizers. *Sustainability*, v. 11, n. 8, 2019, p. 1-19.
<https://doi.org/10.3390/su11082266>
- CHIN, WAI-HO; LAZIM, AZWAN; FAZRY, SHAZRUL; UMI-KALSUM-HJ, HUSSAIN-ZAKI; MASSA, SALVATORE; SENG, JOE-LIM. Alcoholic fermentation of soursop (*Annona muricata*) juice via an alternative fermentation technique. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 100, n. 3, 2019, p. 1012-1019.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.10103>
- DUEÑAS, NUBIA A. Análisis químico nutricional de 10 marcas comerciales de pienso para gato adulto en el mercado colombiano [Thesis in veterinary Medicine]. Bogotá D.C. (Colombia): Universidad de la Salle, 2018, 50 p.
- EUROPEAN COMMISSION. Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *Official Journal of the European Union* L404, 2006, p. 9-25.
- GOMES, AMANDA; FRANCO, YARA-MARIA; MATTAR, BRUNO-AUGUSTO. Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends in Food Science & Technology*, v. 97, 2020, p. 170-184.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>
- GUTIÉRREZ, ALEXIS-SAGASTUME; CABELLO, JUAN J.; HENS, LUC; VANDECASTEELE, CARLO. The energy potential of agriculture, agroindustrial, livestock, and slaughterhouse biomass wastes through direct combustion and anaerobic digestion. The case of Colombia. *Journal of Cleaner Production*, v. 269, 2020, p. 3-17.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122317>

- GUTIÉRREZ, FRANCISCO; ROJAS, AUGUSTO; DORMOND, HERBERT; POORE, MATHEW; WING, RODOLFO. Características nutricionales y fermentativas de mezclas ensiladas de desechos de piña y avícolas. *Agronomía Costarricense*, v. 27, n. 1, 2003, p. 79–89.
- HAKIMI, MOHD-IDHAM; ILHAM, ZUL; ABDUL, RABIATUL-ADAWIYYAH. Enhancement of Agro-Industrial Copra Residue Oil Yield Using Microwave-Assisted Extraction. *Waste and Biomass Valorization*, v. 10, 2018, p. 2681–2688.
<https://doi.org/10.1007/s12649-018-0274-1>
- HERNANDEZ-RODAS, MARÍA-CATALINA; MORALES, JESSICA; VALENZUELA, RODRIGO; MORALES, GLADYS; VALENZUELA, ALFONSO. Beneficios de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 en la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Revista Chilena de Nutrición*, v. 43, n. 2, 2016, p. 196–205.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182016000200013>
- ICONTEC. NTC-2799: Industrias Alimentarias. Harina de Plátano. Bogotá D.C. (Colombia): 2002.
- JOHNSON, IAN T. Fiber. In: *Present Knowledge in Nutrition* (MARRIOTT, BERNADETTE P., BIRT, DIANE F., STALLINGS, VIRGINIA A. and YATES, ALLISON A.). 11 ed. Cambridge (United States): Academic Press, 2020, p. 515–529.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-66162-1.00002-0>
- KEKANA, THAPELO-WILTON; MARUME, UPENYU; MUYA, MUKENGELA-CLAUDE; NHERERA-CHOKUDA, FLORENCE V. Periparturient antioxidant enzymes, haematological profile and milk production of dairy cows supplemented with *Moringa oleifera* leaf meal. *Animal Feed Science and Technology*, v. 268, 2020, p. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114606>
- KLEMPOVÁ, TATIANA; SLANÝ, ONDREJ; ŠÍŠMIŠA, MICHAL; MARCINĚÁKB, SLAVOMÍR; ĚERTÍKA, MILAN. Dual production of polyunsaturated fatty acids and beta-carotene with *Mucor wosnessenskii* by the process of solid-state fermentation using agro-industrial waste. *Journal of Biotechnology*, v. 311, 2020, p. 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.02.006>
- LIM, D.C.C.; ABU, M.F.; MAJID, M. Nutritional composition of stingless bee honey from different botanical origins. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, v. 269, 2019, p. 1–5.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/269/1/012025>
- MAFTOONAZAD, NEDA; RAMASWAMY, HOSAHALLI S. Application and evaluation of a pectin-based edible coating process for quality change kinetics and shelf-life extension of lime fruit (*Citrus aurantifolium*). *Coatings*, v. 285, n. 9, 2019, p. 1–14.
<https://doi.org/10.3390/coatings9050285>
- MARRUGO, GLORIA; VALDÉS, CARLOS F.; GÓMEZ, CARLOS; CHEJNE, FARID. Pelletizing of Colombian agro-industrial biomasses with crude glycerol. *Renewable Energy*, v. 134, 2019, p. 558–568.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.11.004>
- COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. El país sigue avanzando en la gestión integral de residuos sólidos. 2017.
<https://www.minambiente.gov.co/index.php/noticias/3204-el-país-sigue-avanzando-en-la-gestion-integral-de-residuos-solidos>
- MOJICA-GÓMEZ, JAQUELÍN; PÉREZ-MORA, WALTER. Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales de la Industria Vinícola del Valle de Sáchica. Bogotá D.C. (Colombia): Servicio Nacional de Aprendizaje, 2019, p. 113.
- PEREIRA-DA SILVA, ADEJANILDO; FONTES-SANTANA, GIZELE C.; AMARAL, PRISCILLA F.F. Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst. *Food and Bioproducts Processing*, v. 115, 2020, p. 68–77.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.02.002>
- PESCE, GAETANO-ROBERTO; FERNANDES, MARIA C. ; MAUROMICALE, GIOVANNI. Globe artichoke crop residues and their potential for bioethanol production by dilute acid hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, v. 134, 2020, p. 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105471>
- PETKOWICZ, CARMEN L.O.; WILLIAMS, PETER-ANTHONY. Pectins from food waste: Characterization and functional properties of a pectin extracted from broccoli stalk. *Food Hydrocolloids*, v. 107, 2020, p. 105930.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105930>

- QIAN, CHENG; LI, QINGBO; ZHAND, ZEZHONG; WANG, XIAOFENG; HU, JIAOCHAN; CAO, WENJUN. Prediction of higher heating values of biochar from proximate and ultimate analysis. *Fuel*, v. 265, 2020, p. 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116925>
- RAMOS, MARTA; SOARES, ANA-PAULA; PUNA, JAIME-FILIFE; GOMES, JOAO; BORDADO, JOAO-CARLOS. Biodiesel production processes and sustainable raw materials. *Energies*, v. 12, n. 23, 2019, p. 1-30. <https://doi.org/10.3390/en12234408>
- RÍOS-PÉREZ, FERNANDO; SOTO-SIMENTAL, SERGIO; QUINTERO-LIRA, AURORA; PILONI-MARTINI, JAVIER; GÜEMES-VERA, NORMA. Harina de cáscara de vaina de cacao: Una opción para el aprovechamiento de residuos agroindustriales. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*, v. 6, n. 11, 2020, p. 5-7
- RODA, ARIANNA; LAMBRI, MILENA. Food uses of pineapple waste and by-products: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 54, n. 4, 2019, p. 1009-1017. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14128>
- ROJAS-GONZÁLEZ, ANDRÉS-FELIPE; FLÓREZ-MONTES, CILIANA; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, DIEGO-FERNANDO. Prospectivas de aprovechamiento de algunos residuos agroindustriales. *Revista Cubana de Química*, v. 31, n. 1, 2019, p. 31-52.
- RUALES, ÁNGELA-VIVIANA. Evaluación del potencial energético y bioactivo de los residuos generados por la producción y transformación de la uva [Master's thesis in chemical engineering]. Manizales (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales, Departamento de Ingeniería Química, 2015, 141 p.
- RUSSO, CATERINA; MAUGERI, ALESSANDRO; LOMBARDO, GIOVANNI E.; MUSUMECI, LAURA; BARRECA, DAVIDE; RAPISARDA, ANTONIO; CIRMI, SANTA; NAVARRA, MICHELE. The Second Life of Citrus Fruit Waste: A Valuable Source of Bioactive Compounds. *Molecules*, v. 26, n. 19, 2021, p. 5991. <https://doi.org/10.3390/molecules26195991>
- SERNA, LILIANA; TORRES, CRISTIAN. Potencial agroindustrial de cáscaras de mango (*Mangifera indica*) variedades Keitt y Tommy Atkins. *Acta Agronómica*, v. 64, n. 2, 2015, p. 110-115. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43579>
- SHAHIDI, FEREDOON; AMBIGAIPALAN, PRIYATHARINI. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 9, n. 1, 2018, p. 345-381. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317-095850>
- SHOJAEIARANI, JAMILEH; BAJWA, DILPREET S.; BAJWA, SREEKALA G. Properties of densified solid biofuels in relation to chemical composition, moisture content, and bulk density of the biomass. *BioResources*, v. 14, n. 2, 2019, p. 4996-5015. <https://doi.org/10.15376/biores.14.2.Shojaeiarani>
- SINGH, RAM-SARUP; KAUR, NAVPREET; KENNEDY, JOHN F. Pullulan production from agro-industrial waste and its applications in food industry: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 217, 2019, p. 46-57. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.050>
- SOLIMAN, GHADA A. Dietary fiber, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Nutrients*, v. 11, n. 5, 2019, p. 1-11. <https://doi.org/10.3390/nu11051155>
- SPIGNO, GIORGIA; MAGGI, LUANA; AMENDOLA, DANILA; DRAGONI, MONICA; DE FAVERI, DANTE M. Influence of cultivar on the lignocellulosic fractionation of grape stalks. *Industrial Crops and Products*, v. 46, 2013, p. 283-289. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.01.034>
- TADESCO, DORIANA E.A.; SCARIONI, SVEVA; TAVA, ALDO; PANSERI, SARA; ZUORRO, ANTONIO. Fruit and Vegetable Wholesale Market Waste: Safety and Nutritional Characterization for Their Potential Re-Use in Livestock Nutrition. *Sustainability*, v. 13, n. 16, 2021, p. 9478. <https://doi.org/10.3390/su13169478>
- TORRES-LEÓN, CRISTIAN; RAMÍREZ-GUZMAN, NATHIELY; LONDOÑO-HERNANDEZ, LILIANA; MARTINEZ-MEDINA, GLORIA A.; DÍAZ-HERRERA, RENE; NAVARRO-MACIAS, VÍCTOR; ALVAREZ-PÉREZ, OLGA B.; PICAZO, BRIAN; VILLARREAL-VÁZQUEZ, MARIA; ASCACIO-VALDES, JUAN; AGUILAR, CRISTOBAL N. Food Waste and Byproducts: An Opportunity to Minimize Malnutrition and Hunger in Developing Countries. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 2, n. 52, 2018, p. 1-17. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00052>

- VARGAS, JUAN-JOSÉ; VERA, GABRIELA-VICTORIA; SUPPÉ, NICOLE-ANDREA. Caracterización físico-química, microscópica de barrido y dispersión de rayos x del mucílago de cladodios de *Opuntia ficus indica* en la región alta de Tacna. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, v. 85, n. 3, 2019, p. 305-314.
- VARGAS, YURY-ALEXANDRA; PÉREZ, LILIANA-IBETH. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, v. 14, n. 1, 2018, p. 1-14.
<https://doi.org/10.18359/rfcb.3108>
- XICOY, HELENA; WIERINGA, BÉ; MARTENS, GERARD, J.M. The Role of Lipids in Parkinson's Disease. *Cells*, v. 8, n. 1, 2019, p. 1-58.
<https://doi.org/10.3390/cells8010027>
- YU, YONG-MING; FUKAGAWA, NAOMI K. Protein and amino acids. In: *Present Knowledge in Nutrition* (MARRIOTT, BERNADETTE P.; BIRT, DIANE F.; STALLINGS, VIRGINIA A.; YATES, ALLISON A.). 11 ed. Cambridge (United States): Academic Press, 2020, p. 15-35.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-66162-1.00002-0>

The influence of milk-clotting enzymes on the lipid composition and organoleptic properties of semi-matured cheeses*

Influencia de las enzimas coagulantes de la leche sobre la composición lipídica y propiedades organolépticas de quesos semi-madurados

USGAME-FAGUA, KAREN-GINETH^{1*}; GARCÍA-TORRES, ANGÉLICA-MARÍA²;
ROJAS-MORALES, CARLOS-IVÁN³; MEDINA-VARGAS, OSCAR-JULIO⁴

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 12 enero 2021.

Aprobado para publicación: 27 julio 2021.

* Proyecto de origen: "Implementación de membranas cerámicas en el proceso de elaboración del queso Paipa, su efecto en la calidad microbiológica y el contenido de ácido linoleico conjugado-SGI 2140" e "Innovación tecnológica en queso Paipa y su efecto en el contenido de ácido linoleico conjugado como potencial alimento funcional-SGI 2396". Financiación: Dirección de Investigaciones de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia DIN-UPTC. Culminación: en ejecución.

- 1 Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Facultad de Ciencias, Maestría en Química, Grupo de Investigación en Química y Tecnología de Alimentos (GIQTA). Químico. Tunja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-8544-2542>
- 2 Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas, Grupo de Investigación en Química y Tecnología de Alimentos (GIQTA). Doctora en Química. Tunja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-4014-7931>
- 3 Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Biológicas, Grupo de Investigación en Química y Tecnología de Alimentos (GIQTA). Magister en Ciencias Biológicas. Tunja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-3330-7469>
- 4 Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas, Grupo de Investigación en Química y Tecnología de Alimentos (GIQTA). Doctor en Tecnología de Alimentos. Tunja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-6609-356X>

ABSTRACT

The milk-clotting enzymes used in the production of semi-matured and matured cheeses, can influence the metabolic processes that occur during maturation. This study evaluated the impact of chymosin enzyme E.C. 3.4.23.4 (recombinant and microbial origin) on the lipid composition and organoleptic properties of Paipa Cheese, a semi-mature artisan Colombian product. The lactic acid bacteria content in milk and Paipa cheese, the coagulant and lipolytic activity of chymosin, the lipid composition as well as the lipid profile of the product, total free fatty acids, and sensory analysis were evaluated. The results indicated a greater lipolysis in cheeses made with chymosin microbial origin which were associated with a greater lipolytic activity and a greater perception of acidic, rancid, and soapy flavors. Nevertheless, panelists preferred cheese prepared using recombinant chymosin, with lower lipolysis and lipolytic activity. Regardless of the type of protein precipitant that can be used in the elaboration of semi-matured and matured cheeses, Paipa cheese had a high content of saturated fatty acids and omega 3, 6, and 9; which accounted for the organoleptic and nutritional characteristics, which could favorably impact its commercial activity.

RESUMEN

Las enzimas coagulantes de la leche utilizadas en la producción de quesos semi-madurados y madurados pueden influir en los procesos metabólicos que se producen durante la maduración. Este estudio evaluó el impacto de la quimosina E.C. 3.4.23.4 (de origen recombinante y microbiano) en la composición lipídica y las propiedades organolépticas del queso Paipa, un producto colombiano artesanal semi-madurado. Se evaluó el contenido de bacterias ácido lácticas en la leche y el queso Paipa, la actividad coagulante y lipolítica de la quimosina, la composición lipídica, así como el perfil lipídico del producto, ácidos grasos libres totales y análisis sensorial. Los resultados indicaron una mayor lipólisis en los quesos elaborados con quimosina de origen microbiano, los cuales se asociaron con una mayor actividad lipolítica y una mayor percepción de sabores ácidos, rancios y jabonosos. No obstante, los panelistas prefirieron el queso preparado con quimosina recombinante, con menor lipólisis y actividad lipolítica. Independientemente del tipo de precipitante proteico que se pueda utilizar en la elaboración de quesos semi-madurados y madurados, el queso Paipa presenta un alto contenido de ácidos grasos saturados y omega 3, 6 y 9; lo que da cuenta de las características organolépticas y nutricionales, que podrían impactar favorablemente su actividad comercial.

KEYWORDS:

Paipa cheese; Chymosin, Maturation; Lipid profile; Free fatty acids; Lipolysis; Lipolytic activity; Lactic acid bacteria.

PALABRAS CLAVE:

Queso Paipa; Quimosina; Maduración; Perfil lipídico; Ácidos grasos libres; Lipólisis; Actividad lipolítica; Bacterias ácido-lácticas.

Correspondence: karen.usgame@uptc.edu.co

Cómo citar este artículo: USGAME-FAGUA, KAREN-GINETH; GARCÍA-TORRES, ANGÉLICA-MARÍA; ROJAS-MORALES, CARLOS-IVÁN; MEDINA-VARGAS, OSCAR-JULIO. The influence of milk-clotting enzymes on the lipid composition and organoleptic properties of semi-matured cheeses. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 20, n. 1, 2022, p. 97-112. Doi: <https://doi.org/10.18684/bsaa.v.n.2022.1827>

INTRODUCTION

Paipa cheese is a semi-mature artisan cheese which is typical of the Colombian Andean region. Some of its original organoleptic characteristics are a featured mild bitter flavor, a strong and moderate rancid aroma, and a semi-dry texture. These characteristics come in part from the raw milk obtained from the region's own cattle. These characteristics are only possible because of the natural environment and local production customs of the region with which it is associated. As a result of these characteristics it has been granted protection under the designation of origin (PDO) (Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia-SIC, 2011). The manufacturing process includes the transformation and/or separation of casein (due the hydrolysis of the Phe105 – Met106 bond of k-casein) which is the main protein in milk. This is accomplished using enzymatic coagulation by adding proteolytic enzymes: chymosin (E.C. 3.4.23.4) known as commonly “milk-clotting enzymes”. As a result of this process, a milk curd or gel is obtained which is mainly composed of fat and proteins. This results in a strong tendency for the syneresis phenomenon to occur, exuding a significant part of the milk whey (Romero Del Castillo-Shelly and Mestres-Lagarriga, 2004). The traditional protocol for making Paipa cheese does not specify the type of precipitating agent to be used during its manufacture. Producers choose a clotting agent based on economic factors and the known results of the changes. These changes in the taste and smell of the product demonstrate the need for knowledge which allows the producer to accurately assess the type and degree of changes on the organoleptic properties of this type of cheese.

Milk-clotting enzymes, chymosin, are in constant demand in the dairy industry; for this reason, there is a wide variety of protein precipitants whose origin could affect their specificity and properties, so their use could be limited to the kind of dairy product to be manufactured (Romero Del Castillo-Shelly and Mestres-Lagarriga, 2004). Two of the most commercially enzymes are recombinant chymosin (RC), 100 % pure recombinant chymosin secreted by *Aspergillus niger* var. *awamori*, by genetic engineering techniques, and chymosin microbial origin (CMO), an aspartic protease obtained by the controlled fermentation of *Rizhomucor Miehei*. These precipitants differ in origin as well as in the content of proteolytic and lipolytic enzymes which remain in the cheese-product, favoring different metabolic processes during maturation. In the case of lipid metabolism, the milk-clotting enzymes are related to the release of free fatty acids (FFA) which are the precursors to volatile compounds such as carboxylic acids, alcohols, ketones, thioesters, and other agents responsible for the safety of the product and its organoleptic properties; mainly odor and taste (Bertuzzi *et al.*, 2018). Studies associated to the use of CMO in the production of Camembert, Cheddar, and Edam, have shown that their use favors proteolysis and lipolysis related to bitter flavors in hard, long-maturing cheeses (Reps *et al.*, 2006); these protein precipitants have been widely accepted at the industrial level given their high coagulant activity and low non-specific proteolytic activity. RC have been characterized by their high specificity, low non-specific proteolytic activity, predictable coagulation behavior, and conducive to vegetarian diets just like CMO ((Romero Del Castillo-Shelly and Mestres-Lagarriga, 2004). When comparing Paipa Cheeses from different Colombian companies, differences were found in their composition and appearance (data not shown). This may be directly connected to the absence of studies that identify the impact of the type of protein precipitant on its organoleptic and nutritional characteristics.

As an experimental procedure for the present investigation it was necessary to carry out both preliminary tests on fresh raw milk and on Paipa cheeses. The objective of this work was to evaluate the influence of the kind of chymosin (recombinant and microbial origin) on the lipolytic activity, lipid composition and organoleptic properties for the particular case of a dairy product. These aspects account for the importance of milk-clotting enzymes on the organoleptic and nutritional properties of semi-matured and matured cheeses; while providing the possible impact it may have on its commercial activity.

METHODS

Preliminary tests on fresh raw bovine milk

Both collection of raw milk and maturation of cheeses were carried out in Paipa, municipality of the department of Boyacá (central-eastern Colombia). It is at an elevation of 2.525 m, the climate is mild with an average of 13,7 °C and relative humidity 70-78 %. The different assays were developed at the Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia located in Tunja (capital of Boyacá department), 48 km of Paipa.

Three batches of milk were collected, each with a content of 11 L. Each cheese required 5,5 L of milk from Norman, Holstein, and Jersey breeds of cattle and their respective crosses. The cattle were raised on dairy farms in the municipality of Paipa and its surrounding areas. The selection of livestock relied on farms with a non-specialized dairy production system using animals in adequate body condition. The animals had a diet based on kikuyu and ryegrass, mineralized salt, and did not receive any type of food supplement. Each analysis within the preliminary tests were performed in triplicate and included:

Physicochemical composition. To assess the quality and composition of the milk, pH, protein percentage, percentage of total solids, and fat percentage were determined using a LactoScan SA30 dairy analyzer that meets the requirements established by the AOAC. The percentage of acidity was measured by titration with NaOH, AOAC 947.05 method (1990).

Lactic acid bacteria content. Lactic acid bacteria content was quantified because these microorganisms are the main source of lipolytic enzymes in matured cheeses and influencing both lipid metabolism and the organoleptic properties in the final product. The count of lactic acid bacteria (LAB) required the preparation of serial dilutions in base 10 of milk in sterile peptone water. One milliliter of the diluted sample was inoculated in plates for microbial count (3M Petrifilm) and incubated for 48±3 h at temperatures between 28 and 37 °C as indicated by AOAC PTM 041701 (1990).

Coagulant activity of the milk-clotting enzymes. This process allowed the evaluation of the strength or coagulation capacity of the precipitant. One unit of coagulant activity (UCA) corresponds to the amount of enzyme extract (minimal chymosin concentration 530 mg/L) necessary to coagulate 10 mL of skimmed milk reconstituted in 100 s at 30 °C. It was calculated using equation 1 (Amira *et al.*, 2018).

$$\text{Coagulant activity} \left(\frac{\text{UCA}}{\text{mL}} \right) = \frac{10 \times V}{T_c \times V'} \quad (\text{Eq. 1})$$

Where: UCA/mL = units of coagulant activity per milliliter, V = volume of milk (mL), T_c = coagulation time (s), V' = quantity of enzyme extract (mL).

Lipolytic activity of the milk-clotting enzymes. In order to quantify the lipase activity of the enzymes from the coagulants and define the amount of enzyme that produces an evaluable FFA. One μEq of NaOH was added until a pH of 8,5 was reached on a cream substrate after being incubated for 24 h at 37 °C (Bevilacqua *et al.*, 2019). It was calculated using equation 2.

$$\text{Lipolytic activity} \left(\frac{\text{LU}}{\text{g}} \right) = \frac{(A-B-C) D}{E \times 10^{-6}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Where: LU/g= lipolytic units per gram of coagulant, A= volume of NaOH used in the neutralization (mL), B= volume of NaOH used in the neutralization of the blank (mL), C= volume of NaOH used in the neutralization of the precipitant extract (mL), D= concentration of NaOH, E= volume of sample (mL).

The selection of RC and CMO coagulants, was chosen according to preferences of the Paipa cheese producers. The current study used the chymosin microbial origin: Microclerici rennet, Caglificio Clerici, Sacco system (Italy): a precipitant of fungal origin obtained by the controlled fermentation of *Rizhomucor miehei*, whose active component is the aspartic protease of *Rizhomucor miehei*. The current study also used the recombinant chymosin Albamax rennet, Caglificio Clerici, Sacco system (Italy): a 100 % pure recombinant chymosin secreted by *Aspergillus niger* var. *awamori*, whose active component is particularly Chymosin B.

Preparation and testing of Paipa cheese

Paipa cheeses were made in laboratory using 5,5 L of milk each, following the manufacturing protocol established in resolution 70802 of the Superintendency of Industry and Commerce of Colombia. The resolution states the conditions and stages for the manufacturing of the cheese, protected designation of origin (PDO). The fresh and raw milk must first be filtered using a cloth, heated to between 30 and 35 °C, and curdled for 35 min from the addition of 1 % of milk-clotting enzyme by volume of milk (SIC, 2011). The curd formed must then be cut and agitated, sat and drained to a malleable wet mass, kneaded and salted using 11 g of cooking salt, and molded and pressed for 10 h in round perforated plastic molds with a capacity of 450 g. Only after this process can it be let to mature for 21 days in a cellar at temperatures between 15 and 20 °C and a controlled relative humidity between 65 and 70 %. Three batches of Paipa cheeses were made, each consisting of two cheeses; one cheese made using the recombinant chymosin (RC) and another using the chymosin of microbial origin (CMO). Each analysis that made up the tests on the cheeses were performed in triplicate and included:

Physicochemical composition. pH was determined using a pH meter, following the AOAC 981.12 method (1990). Salt percentage was determined using AgNO_3 , following the AOAC 935.43 method (1990). The percentage of protein and the percentage of dry protein was measured using the Kjeldahl method, following the AOAC 920.123 (1990). The percentages of total solids, humidity and humidity in defatted cheeses were measured using AOAC 926.08 (1990). The percentages of fat and fat in dry material were measured using gravimetric analysis using AOAC 933.05 (1990). Water activity was measured at 20 °C according to the standard AOAC 978.18 (1990). The acidic percentage was measured according to the method described in AOAC 920.124 (1990). The percentage yield was calculated based on the average theoretical yield obtained in the production of Paipa cheese (Niño De Onshuus, 1998).

Lactic acid bacteria content. Five grams of cheese was macerated in 45 mL of sterile peptone water and 100 μL of tween 80 was added. Serial dilutions in base 10 of the sample were then prepared in sterile peptone water. One milliliter of the diluted sample was inoculated on plates of 3M microbial counting petrifilm and the plates were incubated for 48 ± 3 h at temperatures between 28 and 37 °C according to AOAC PTM 041701(1990).

Lipid composition

Lipid Profile. The analysis of the fatty acids extracted from 100 g samples of cheese was carried out by extracting and quantifying their methyl esters on an AT 6890N gas chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, California, U.S.A.) with a flame ionization detector (GC-FID) according to the automated Soxhlet extraction method and ISO 12966-1:2014/ISO 12966-2:2017 standards. 37 Component FAME Mix, (AccuStandard, Inc., 125 Market Street, New Haven CT 06513, Cat FAMQ-005) was used as a certified reference standard. The column used in the analysis was a DB-23 (J & W Scientific, Folsom, CA, USA) [50 %-cyanopropyl-poly(methylsiloxane), 60 m x 0,25 mm x 0,25 μm]. The injection used was 2 μL in volume and was done in split mode (50:1).

Total FFA quantification. In order to evaluate the influence of the type of chymosin (E.C. 3.4.23.4) on lipolysis or release of FFA in cheeses, the “copper soaps” spectrophotometric method was used (Câmara *et al.*, 2017).

Sensory analysis. In order to evaluate the organoleptic properties of the elaborated Paipa cheeses, the sensory panel required the training of 16 individuals. The individuals were trained during a non-continuous time of 8 h with different commercial Paipa cheeses. The attributes evaluated were visual appearance, manual and mouth texture, flavor, and an olfactory and retronasal evaluation. The information was recorded in an evaluation format designed by the authors of this paper. Each panelist rated the perceived intensity of each attribute on a scale from 0 to 5, with 0 being the total absence of the attribute and 5 being the presence at a very high intensity. Subsequently, they were asked to select the cheese that was most pleasing. For each Paipa cheese sample to be evaluated, slices of 10 g (6,0 cm long, 4,0 cm wide and 1,5 cm thick) were given to the participants. The slices were presented simultaneously to eliminate impacts caused by the order of presentation and were arbitrarily labeled. After the sensory analysis of each cheese sample, panelists rinsed their mouths with purified water and neutralized the taste with saline crackers to remove any aftertaste. The sensory analysis took into account the standard ISO 13299 (2016).

Statistical Analysis

The statistical analysis of the data was carried out using the statistical program “R”. A block design with only one factor: type of chymosin ; two treatments: recombinant chymosin (RC) and chymosin of microbial origin (CMO), and three blocks: milk batch was used. Analysis of variance ANOVA was performed using a significance level of 0,05, following the statistical model described by equation 3.

$$Y_{ij} = \mu + \beta_j + \tau_i + \sum_{ij}, \quad (\text{Eq. 3})$$
$$i = 1, 2, \dots, k \quad j = 1, 2, \dots, b$$

Where: Y_{ij} = response of treatment i in block j , μ = general mean, β_j = effect of the j^{th} block, τ_i = effect of the i^{th} treatment, \sum_{ij} = experimental error in unit j for treatment i .

RESULTS

Preliminary analysis on fresh raw milk

Physicochemical composition and content of lactic acid bacteria. Table 1 presents the physicochemical composition of the milk used to make the analyzed cheeses.

Table 1. Physicochemical composition of milk.

Caracteristic	Result	Accepted value*
pH	6,58 ± 0,10	6,5
Percentage of proteins	3,10 ± 0,12	3,0
Percentage of total solids	11,68 ± 0,18	>11,4
Percentage of fats	3,19 ± 0,29	3,0
Percentage of acidity	0,16 ± 0,004	0,16

*Value accepted by resolution 70802 of the Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia by Paipa cheese (SIC, 2011)

The results obtained show that the physicochemical composition of the collected milk is adequate for making Paipa cheese. The results fall within the accepted values of pH, protein percentages, total solids, fat, and acidity, established by the regulations that govern its production. The average initial content of LAB was $1,33 \times 10^7$ CFU/mL of milk which are similar to results obtained in the microbiological analysis carried out on raw milk in the production of Castelmagno cheeses, with values of $6,00 \times 10^6$ CFU/mL (Dolci *et al.*, 2010). The high quantity of bacteria is common in raw milk, since both milk and its derivatives are typical means of proliferation.

Coagulant and lipolytic activities of milk-clotting enzymes. Table 2 shows the results of coagulation capacity (coagulant activity) and lipase activity (lipolytic activity) for each type of enzyme.

Table 2. Coagulant and lipolytic activity of the chymosins evaluated.

Activity	RC	CMO
Coagulant activity (UCA/mL)	$1,34 \pm 0,21^a$	$1,28 \pm 0,19^a$
Lipolytic activity (LU/g)	22356 ± 3590^a	28177 ± 3176^b

^{a,b} Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0,05$), ANOVA analysis of variance.

There are no significant differences in coagulant activity on milk proteins by the two types of protein precipitants. When comparing the coagulant activity reported by Amira *et al.* (2018), using chymosin during the preparation of the curd ($\approx 1,11$ UCA/mL), it was found that chymosins analyzed presented higher values: RC (1,34 UCA/mL) and CMO (1,28 UCA/mL). It should be mentioned that a higher precipitation activity is related to a better specificity towards k-casein and results in a greater hydrolysis rate (Amira *et al.*, 2018).

The evaluation of lipolytic activity showed significant differences. Lipolysis was found to be higher in chymosin microbial origin, which favor the hydrolysis of triglycerides and would generate a greater release of FFA. Since FFAs act as precursors for volatile compounds, this has important implications for the organoleptic properties of the product, mainly in the generation of characteristic odors and flavors (Bertuzzi *et al.*, 2018).

Preparation and analysis of Paipa cheeses

Physicochemical composition and content of lactic acid bacteria. Table 3 presents the physicochemical composition of the produced Paipa cheeses.

Table 3. Physicochemical composition.

Characteristic	RC	CMO
pH	$5,67 \pm 0,32^a$	$5,56 \pm 0,32^b$
Percentage of salt	$2,12 \pm 0,04^a$	$2,28 \pm 0,06^a$
Percentage of protein	$28,05 \pm 0,13^a$	$31,65 \pm 0,16^a$
Percentage of protein in dry base	$43,69 \pm 0,23^a$	$47,31 \pm 0,12^a$
Percentage of total solids	$65,17 \pm 0,87^a$	$66,05 \pm 2,56^a$
Percentage of humidity	$34,83 \pm 0,87^a$	$33,95 \pm 2,56^a$
Percentage of humidity in defatted cheese	$44,47 \pm 0,06^a$	$40,23 \pm 0,07^a$
Percentage of fat	$19,49 \pm 0,53^a$	$17,73 \pm 0,17^a$
Percentage of fat in dry material	$30,36 \pm 0,46^a$	$26,50 \pm 0,37^a$
Activity of water	$0,92 \pm 0,04^a$	$0,92 \pm 0,07^a$
Percentage of acidity	$1,05 \pm 0,10^a$	$1,16 \pm 0,02^a$
Percentage of yield	$97,12 \pm 3,78^a$	$93,18 \pm 5,84^a$

^{a,b} Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0,05$), ANOVA analysis of variance.

The physicochemical composition of the produced cheeses showed a significant difference in the pH of the final product when different types of chymosins are used. In cheeses made with CMO, the pH was lower, which could be related to a greater accumulation of fermentation products such as lactic acid and other organic acids. Although there were differences, they were not significant when using a particular type of chymosin for percentages of salt, protein, protein on a dry base, total solids, humidity, moisture of defatted cheese, fat, fat in dry material, and acidity. When evaluating the percentage of salt, the use of CMO caused a slight increase in its concentration which enhances flavor, but also intervenes in specific characteristics of the product. Changes to the structure, texture, functional properties, extension of the product's shelf life were noted in addition to contributing to the selection of microorganisms through a partial regulation of water in the paste (SIC, 2011; Loudiyi *et al.*, 2018). There were no differences regarding the water activity of the cheeses, finding an activity of 0,92 which is outside the range at which pathogenic bacteria and other microorganisms associated with spoilage grow optimally (0,94-0,99) (Trmčić *et al.*, 2016).

The cheeses made with RC had a higher yield of 97,12 % when compared to those made with CMO: 93,18 %. This behavior was favored by two important factors regarding the optimization of cheese yield. The first factor was the moisture/protein ratio which was higher in RC cheeses (1,24) than CMO cheeses (1,07). The second factor was the fat/protein ratio, which was higher in RC cheeses (0,69) than CMO cheeses (0,56) resulting in a more efficient retention of fat and causing the precipitation and agglomeration of proteins resulting in less fat loss from the serum (Pazzola *et al.*, 2019). Despite the fact that the cheeses made with CMO generated a lower yield, it is important to note that in this product, the highest amount of total solids is provided by the quantity of protein.

There were no significant differences in the cheeses analyzed regarding LAB. In RC cheeses there was an average of $5,47 \times 10^9$ CFU/g while CMO cheeses had an average of $7,81 \times 10^9$ CFU/g. These results are similar to the analysis of bacterial diversity in Paipa cheese carried out by Castellanos-Rozo *et al.* (2020) which concludes them to be the main group of microorganisms in this product. Similar LAB contents have been reported in traditional cheeses such as Serra da Canastra and Fruhe with values on the order of 10^8 – 10^9 CFU/g. These bacteria are derived mainly from the native microbial flora of raw milk and remain in the product until the end of maturation due to their acid-tolerance (Kamimura *et al.*, 2020; Murgia *et al.*, 2020). Important populations of these bacteria in Paipa cheese could favor the development of the functional properties in the product since they have the ability to play a probiotic role and synthesize compounds with antimicrobial capacity such as organic acids (mainly lactic acid), hydrogen peroxide, and bacteriocins that inhibit the degradation and growth of pathogenic bacteria while providing flavor to the cheese (Castro *et al.*, 2016).

The LAB content depending on the type of precipitant and its relation to total FFA will be analyzed in greater detail in Sec. Total free fatty acid quantification.

Lipid composition

Lipid profile. Figure 1 shows the lipid profile of the Paipa cheeses made with the chymosin RC and CMO. The results are expressed according to: (a) carbon chain length: short chain fatty acids (FA-SC), medium chain fatty acids (FA-MC), and long chain fatty acids (FA-LC); and (b) degree of unsaturation: saturated, monounsaturated, polyunsaturated, and total fatty acids.

The type of chymosin used in the production of Paipa cheese had no significant effect on the concentration of fatty acids. When analyzing Figure 1a, the results indicate that Paipa cheese is mainly made up of FA-LC, secondly by FA-MC, and to a lesser extent by FA-SC. In general, FA-LC tend to have a lesser influence on flavor when compared to FA-SC and FA-MC. This is due to their high threshold of sensory perception related to background flavors which are not directly perceived at first taste. In contrast, the perception threshold for non-esterified FA-SC and FA-MC is lower, such that even at low concentrations they have significant impacts on the development of aromas and flavors (Güler, 2005).

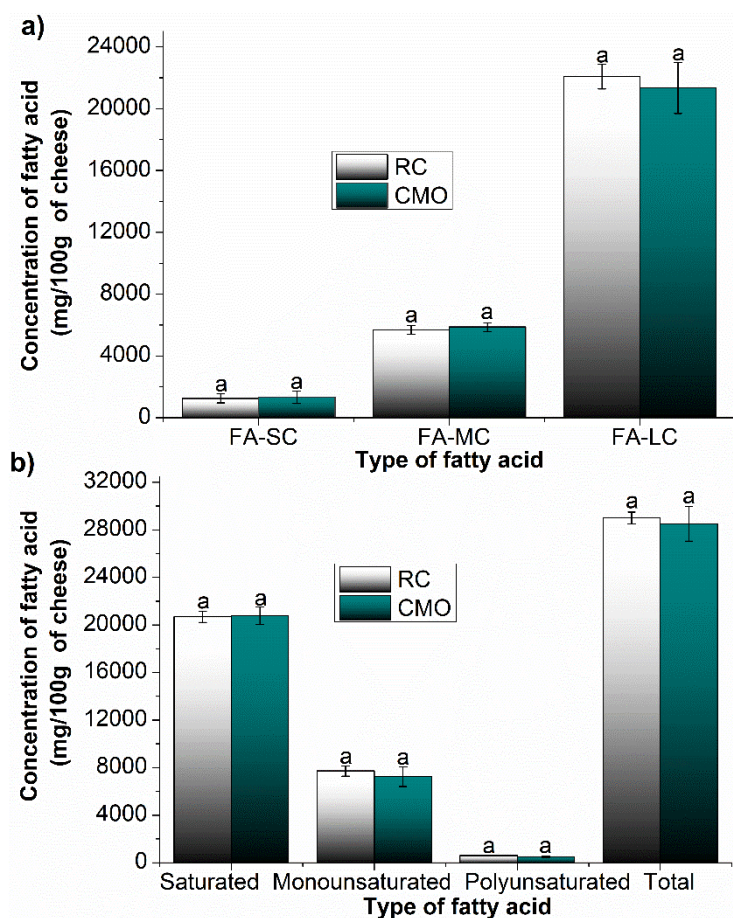


Figure 1. Lipid composition. a) Classification by carbon chain length. b) Classification by degree of unsaturation.

^{ab} Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0,05$), ANOVA analysis of variance.

The lipid profile shown in Figure 1b, shows that Paipa cheese is mainly composed of saturated fatty acids, followed by monounsaturated fatty acids, and to a lesser extent polyunsaturated fatty acids. Saturated fatty acids make up 71,31 % of the total content, where palmitic, myristic, and stearic acids were predominant. When comparing the lipid profiles of the Paipa cheeses made for this paper with Paipa cheeses from three different commercial brands, 7,84 % more saturated fatty acids were found in their content (data not shown). Unsaturated fatty acids (mono and polyunsaturated) are related to factors such as the origin of raw milk, altitude of the area in which it is produced (Paipa is at 2525 m.a.s.l), and a diet of cattle based on green forage. These factors favor the concentration of this type of fatty acid in milk, compared to those obtained in milk from lower altitudes and from cattle fed with concentrated (Zeppa *et al.*, 2003; Hanus *et al.*, 2018). Monounsaturated fatty acids are beneficial because they are useful as an energy source, reduce blood concentrations of low-density lipoproteins and prevent cardiovascular disease (De Souza *et al.*, 2015). Polyunsaturated fatty acids play an essential role in human health and in the proper function of the brain, heart, and vision (Sokoła-Wysoczańska *et al.*, 2018). It is important to note that no trans fatty acids were found in Paipa cheese, which is positive considering that its intake is related to the development of coronary heart disease, inflammation, endothelial dysfunction, and other diseases associated with increased levels of cholesterol carried by low-density lipoproteins (LDL) (Oteng and Kersten, 2020). The characteristics found in Paipa cheese can be further studied to determine each of the stages and factors that intervene in the production process and in order to improve the lipid, protein, and microbiolo-

gical composition of the raw material and therefore of the finished product. Table 4 presents the contents of the fatty acids of greater nutritional and organoleptic relevance in the cheeses analyzed.

Table 4. Fatty acids of greater nutritional and organoleptic relevance in cheeses.

Fatty acid	Retention time (min)	RC (mg/100 g of cheese)	CMO (mg/100 g of cheese)
Butyric (C4:0)	3,787	656,33 ± 168,05 ^a	672,00 ± 238,27 ^a
Caproic (C6:0)	4,153	587,33 ± 126,47 ^a	652,33 ± 165,30 ^a
Caprylic (C8:0)	4,974	350,33 ± 59,50 ^a	387,00 ± 67,64 ^a
Capric (C10:0)	6,565	728,33 ± 102,38 ^a	779,00 ± 113,65 ^a
Lauric (C12:0)	8,906	858,00 ± 69,16 ^a	894,33 ± 82,25 ^a
α-Linolenic (C18:3n3)	24,413	152,00 ± 20,07 ^a	126,33 ± 22,01 ^a
Eicosapentaenoic (C20:5n3)	32,925	19,00 ± 5,00 ^a	14,00 ± 4,00 ^a
Linoleic (C18:2n6c)	22,562	390,67 ± 23,71 ^a	332,33 ± 39,55 ^a
Arachidonic (C20:4n6)	30,480	18,33 ± 4,04 ^a	13,67 ± 3,06 ^a
Oleic (C18:1n9c)	21,202	7046,00 ± 374,72 ^a	6571,67 ± 771,83 ^a
Eicosenoic (C20:1n9)	27,217	12,33 ± 0,58 ^a	12,67 ± 1,53 ^a

^{a,b} Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0,05$), ANOVA analysis of variance.

There were no significant differences in the content of fatty acids of nutritional and organoleptic relevance in cheeses made with RC or CMO. Regardless of the type of chymosin (E.C. 3.4.23.4), the lipid profiles show the presence of the fatty acids responsible for generating the characteristic flavors and aromas in matured cheeses. Among the fatty acids that provide the acidic flavor of cheese are capric acid, which is a flavor enhancer and is associated with a burning acidic flavor, and caproic acid, which has a pungent flavor (Güler, 2005). The rancid and bitter flavors are mainly due to the presence of capric and butyric acids, of which the latter also contributes to the typical cheese flavor. In addition to these flavors which are characteristic of Paipa cheese, there are others which are characteristic of the lipolytic activity of bacterial enzymes including LAB, on matured cheeses. This is how the soapy and spicy flavors are related to the presence of lauric, and caprylic acids (Güler, 2005).

The contents of butyric, caprylic, and caproic acids were higher than those found in the lipid profiles of commercial Paipa cheeses (≈ 150 mg/100 g of cheese) evaluated by our research group (data not shown). These differences can be attributed to climatic factors according to the seasonal stage of milk collection for the production of cheeses and differences in the livestock selection and storage procedures, among other aspects that would impact the lipid composition of both the raw material and the final product; however, its effect on the organoleptic properties depends mainly on the specific hydrolytic activity of each fatty acid as well as on the dynamics of its release.

A chromatographic analysis on the fatty acids of nutritional importance indicated an important content of omega-3, 6, and 9 such as: linolenic, eicosapentaenoic, linoleic, arachidonic, oleic and eicosenoic acids. Omega-3s such as linolenic and eicosapentaenoic acid, have shown effect to reducing the possibility to suffer cardiovascular related problems (Fleming and Kris-Etherton, 2014). In addition to omega-3s, omega-6s, and those derived from long-chain polyunsaturated fatty acids such as arachidonic and linoleic acid, have a central role in the structure and functions of the cell membrane that promote neonatal growth, metabolism of neurotransmitters, the development of the visual and nervous systems, and provide beneficial anti-inflammatory and immunological effects (Santillo *et al.*, 2018). In the case of omega-9s, oleic acid was one of the fatty acids found in the highest proportion making up 23,5 % of the total fatty acids present. This compound reduces the incidences of developing cardiovascular disease. These qualities present in Paipa cheese highlight its nutritional quality and should be used to search for alternatives that strengthening and broaden its use.

Total FFA quantification. The impact of the type of milk-clotting enzymes on lipolysis, understood as the degree of FFA release, by hydrolytic action of lipolytic enzymes is presented in Table 5.

Table 5. Effect of milk-clotting enzymes on lipolysis and increase of lactic acid bacteria.

	RC	CMO
Lipolysis (mg of FFA/100 g of cheese)	7,52 ± 2,89 ^a	162,07 ± 9,43 ^b
Lactic acid bacteria (CFU/g)	5,47 x 10 ⁹ ^a	7,81 x 10 ⁹ ^a

^{a,b} Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0,05$), ANOVA analysis of variance.

The results obtained indicated significant differences in lipolysis in the cheeses made with RC and CMO. The CMO cheeses presented a higher degree of lipolysis, releasing $162,07 \pm 9,43$ mg of FFA/100 g of cheese which corresponds to 0,57 % of the total fatty acids. The RC cheeses resulted in a lower lipolysis, resulting in a release of $7,52 \pm 2,89$ mg of FFA/100 g of cheese or 0,03 % of all fatty acids. A higher content of released FFA is related to a higher intensity in the perceived flavors. This was the case in the sensory analysis carried out on Azul, Limburguer, and Roquefort cheeses which were classified as stale, strong cheeses with butyric flavors, which presented high concentrations of FFA (on average 2395 mg FFA/100 g of cheese). In contrast, cheeses such as Port Salut, Monterey, Edam, and Colby, had mild milk flavors and are characterized by low levels of FFA (on average 58 mg FFA/100 g cheese) (Reps *et al.*, 2006; Thierry *et al.*, 2017). The impact of lipolysis on the intensity of the flavors of Paipa cheeses will be observed in detail in Sec. Sensory analysis. In matured products made with raw milk, the production of FFA is normal since it is responsible for the typical flavors of these cheeses. Additionally, they act as precursors of the volatile compounds such as alcohols, aldehydes, ketones, and esters among other compounds responsible for the flavor and aroma of the cheese. It can also negatively impact the taste of cheeses by introducing defects such as rancid flavors accompanied by the production of "Spicy" flavors which are often unpleasant to the palate of consumers. There was no excessive lipolysis for any of the Paipa cheeses analyzed, which would account for a development of flavors and aromas typical of matured products. Although a higher intensity of sour and bitter flavors was found in CMO cheese, it did not reach the point of being "unpleasant" for consumption.

The LAB in matured cheeses are a source of lipolytic enzymes and their presence favors the release of FFA (Lopez *et al.*, 2006). Despite having generated greater lipolysis in CMO cheese, no significant differences were found in terms of LAB content between RC and CMO cheeses in the current study. It can therefore be inferred that this was not a factor directly related to the higher lipolysis generated in CMO cheese. It is important to note that there are several sources of lipolytic enzymes which include LAB, the lipoprotein lipase in milk, and the type of milk-clotting enzyme, among others. The results from the current study indicate that the enzymes from the CMO significantly influenced the production of FFA which indicated both a higher lipolytic activity and FFA content.

Sensory analysis. When comparing Paipa cheeses made with RC and CMO, there were no significant differences in the characteristics such as color, size, brightness, porosity, and greasy appearance. Differences between cheeses made using the two methods included yield which was 97,12 % for RC cheese and 93,18 % for CMO cheese and the color of the paste which was creamy yellow in cheeses made with RC and creamy white for those made with CMO. Figure 2 contains a radar chart related to the flavor, texture, and olfactory properties of the cheeses.

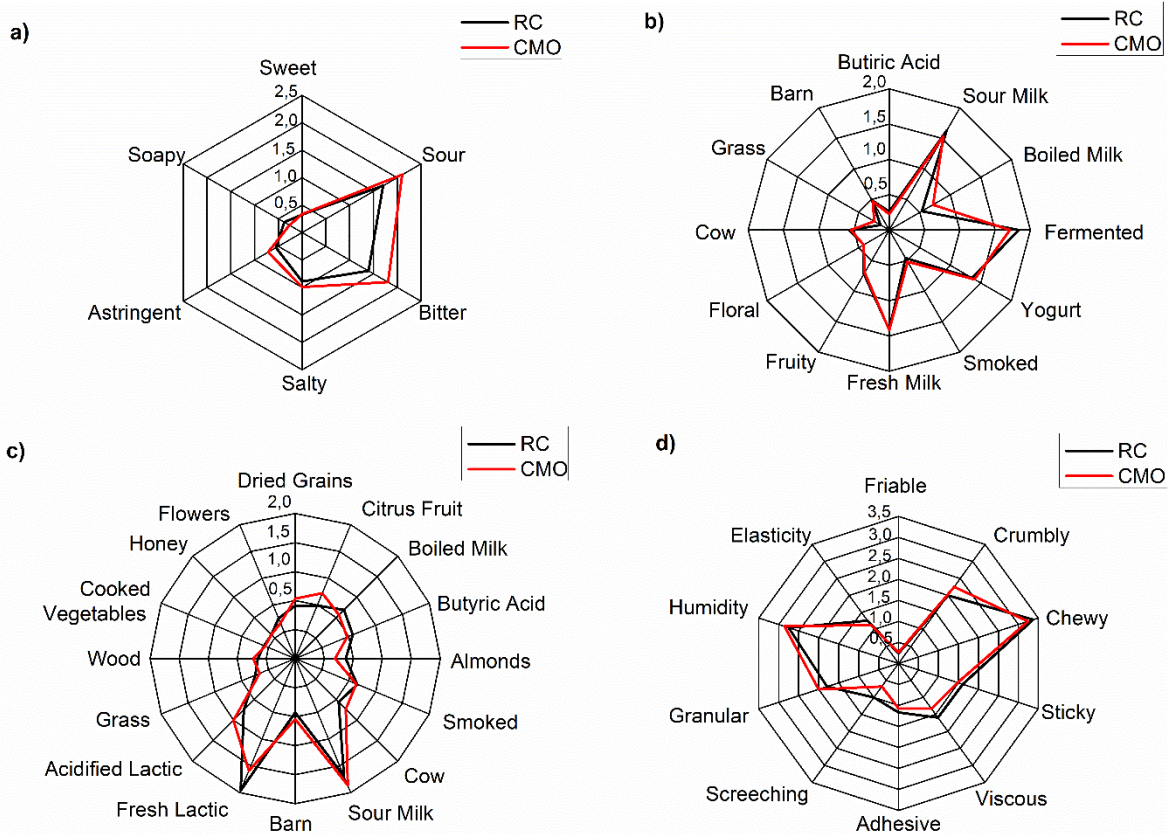


Figure 2. Sensory analysis. a) taste. b) orthonasal olfactory sensation. c) retronasal olfactory sensation. d) tactile sensation.

The graphs show the average of the score given to each attribute in a range of 0-5, with 0: low and 5: high.

The sensory analysis of the RC and CMO cheeses showed large differences regarding the flavor and the olfactory and tactile properties of the cheeses. In Figure 2a, the CMO cheeses had an intense sour and bitter flavor as well as a slightly higher astringent sensation compared to the RC cheese. Astringency, soapy, spicy, or burning acid flavors are characteristic of matured cheeses and are related to the presence of lauric, caprylic and caproic acid (Güler, 2005). These acids are found in a higher concentration in CMO cheeses as shown in the lipid analysis (Table 4).

The main differences in orthonasal olfactory sensations are found in the aromas of sour and fermented milk, which were more intense in RC cheeses. The odors of grass and boiled milk were more predominant for CMO cheeses as shown in Figure 2b. These aromas occurred as a result of the butyric and capric acid in both cheeses (Güler, 2005). Depending on the concentration of the acids in the cheese, a rancid or typical cheese flavor would be exhibited.

Regarding the retronasal olfactory sensations as seen in Figure 2c, the RC cheeses presented a greater intensity in the aromas of boiled milk and fresh lactic. The CMO cheeses presented a primarily acidified lactic, cow, and fruity citrus smells. These results support the finding of higher concentrations of caproic and capric acid in CMO cheeses (Table 4) which are related to goat cheese and stable aromas (Güler, 2005). In low concentrations of FFA in RC cheese typically generate smooth aromas of fresh milk.

Regarding the tactile sensation (manual and mouth texture) (Figure 2d), the CMO cheeses were more granular and crumblier. RC cheeses were more elastic, sticky, viscous, and screeching. These characteristics are due to the physicochemical composition of the processed cheeses (Table 3). Since CMO cheeses have a lower percentage of fat they are less viscoelastic, have a higher humidity, as well as a less cohesive texture (Shi *et al.*, 2020).

A sensory analysis of the cheeses showed that despite a low threshold of perception of the FA-SC: 200-900 $\mu\text{mol}/\text{kg}$; small changes in the concentration of these compounds can cause significant changes in the perception of the product. The most notable differences in the attributes analyzed were found in the sour and bitter flavors. Additionally, smells of cow, sour milk, and stable milk were the main reasons why CMO cheese presented a lower degree of acceptance by the panelists (33,33 % acceptance).

CONCLUSIONS

The kind of chymosin (E.C. 3.4.23.4) used in the production of Paipa cheeses (a colombian semi-matured dairy product), significantly influences the lipolysis, release of FFA and organoleptic properties of the product. The CMO produced a greater lipolytic activity and favored a greater release of FFA when compared to the lipolytic activity and release of FFA in RC cheeses. As a result of the higher lipolysis, the cheeses made with CMO tended to be perceived as having more acidic, rancid, bitter, and soapy flavored. This was attributed to FA-SC and the butyric, caproic, caprylic, capric, and lauric acids which were perceived to be less preferable in the sensory analysis. The type of protein precipitant did not significantly influence LAB proliferation; however, the counts of these bacteria indicated that they are of the important sources of lipolytic enzymes in the product. This contributes to the development of flavors, aromas, the promotion of antimicrobial activity, and a probiotic role in cheeses. The lipid composition of the product was not impacted by the use of a particular milk-clotting enzyme. This was seen as a result of a high content of saturated fatty acids, important omega 3, 6, and 9 such as linolenic, linoleic, and oleic acids, and the absence of trans fats. The current study highlights the importance of the impact of chymosin on the organoleptic and nutritional properties of matured cheeses in general as well as Paipa cheese; while providing the possible impact it may have on its commercial activity. Studies concerning the process of release of free fatty acids during maturation and its relationship with organoleptic properties are recommended.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was assisted by the Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (SGI 2396 and SGI 2140 grant). Thanks the Paipa cheese factory “Lácteos Factory” for their advice and technology support.

REFERENCES

- AMIRA, AMAL; BLECKER, CHRISTOPHE; RICHEL, AURORE; ARGÜELLES-ARIAS, ANTHONY; FICKERS, PATRICK; FRANCIS, FRÉDÉRIC; BESBES, SOUHAIL; ATTIA, HAMADI. Influence of the ripening stage and the lyophilization of wild cardoon flowers on their chemical composition, enzymatic activities of extracts and technological properties of cheese curds. *Food Chemistry*, v. 245, 2018, p. 919–925.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.082>
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). *Official Methods of Analysis*. Maryland (USA): 1990, 700 p.
- BERTUZZI, ANDREA S.; McSWEENEY, PAUL L.H.; REA, MARY C.; KILCAWLEY, KIERAN N. Detection of Volatile Compounds of Cheese and Their Contribution to the Flavor Profile of Surface-Ripened Cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 17, n. 2, 2018, p. 371–390.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12332>

- BEVILACQUA, ANTONIO; SPERANZA, BARBARA; SANTILLO, ANTONELLA; ALBENZIO, MARZIA; GALLO, MARIANGELA; SINIGAGLIA, MILENA; CORBO, MARIA ROSARIA. Alginate-microencapsulation of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum*: Performances of encapsulated microorganisms and bead-validation in lamb rennet. *LWT-Food Science and Technology*, v. 113, 2019, p. 1-6.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108349>
- CÂMARA, SANDRA P.A.; DAPKEVICIUS, AIRIDAS; ROSA, HENRIQUE J.D.; SILVA, CÉLIA C.G.; MALCATA, XAVIER; ENES-DAPKEVICIUS, MARIA L.N. Physicochemical, biochemical, microbiological and safety aspects of Pico cheese: Assessment throughout maturation and on the final product. *International Journal of Dairy Technology*, v. 70, n. 4, 2017, p. 542–555.
<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12424>
- CASTELLANOS-ROZO, JOSÉ; PÉREZ-PULIDO, RUBÉN; GRANDE, MARÍA-JOSÉ; LUCAS, ROSARIO; GÁLVEZ, ANTONIO. Analysis of the bacterial diversity of Paipa cheese (a traditional raw cow's milk cheese from Colombia) by high-throughput sequencing. *Microorganisms*, v. 8, n. 218, 2020, p. 2–12.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8020218>
- CASTRO, R.D; DE OLIVEIRA, LETICIA G.; SANT'ANNA, FELIPE M.; PINHEIRO-LUIZ, LIVIA- MARÍA; SANDES, SAVIO; SILVA, C.I.F.; SILVA, A.M; NUNES, ALVARO C.; PENNA, CLAUDIA; SOUZA, M.R. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 8, 2016, p. 6086–6096.
<https://doi.org/10.3168/jds.2015-10579>
- COLOMBIA. SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO (SIC). Resolución N° 70802. Bogotá (Colombia): 2011, 12 p.
- DE SOUZA, RUSSELL J.; MENTE, ANDREW; MAROLEANU, ADRIANA; COZMA, ADRIAN I.; HA, VANESSA; KISHIBE, TERUKO; ULERYK, ELIZABETH; BUDYŁOWSKI, PATRICK; SCHÜNEMANN, HOLGER; BEYENE, JOSEPH; ANAND, SONIA S. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *The BMJ*, v. 351, 2015, p. 1–16.
<https://doi.org/10.1136/bmj.h3978>
- DOLCI, PAOLA; ALESSANDRIA, VALENTINA; RANTSIOU, KALLIOPI; BERTOLINO, MARTA; COCOLIN, LUCA; Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripening of Castelmagno PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 143, n. 1–2, 2010, p. 71–75.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.007>
- FLEMING, JENNIFER A.; KRIS-ETHERTON, PENNY M. The evidence for α -Linolenic acid and cardiovascular disease benefits: Comparisons with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Advances in Nutrition*, v. 5, n. 6, 2014, p. 863S-876S.
<https://doi.org/10.3945/an.114.005850>
- GÜLER, ZEHRA. Quantification of free fatty acids and flavor characteristics of Kasar Cheeses. *Journal of Food Lipids*, v. 12, 2005, p. 209–221.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2005.00018.x>
- HANUŠ, OTO; SAMKOVÁ, EVA; KŘÍŽOVÁ, LUDMILA; HASOŇOVÁ, LUCIE; KALA, ROBERT. Role of fatty acids in milk fat and the influence of selected factors on their variability—a review. *Molecules*, v. 23, n. 7, 2018, p. 1–32.
<https://doi.org/10.3390/molecules23071636>
- SUIZA. ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE NORMALIZACIÓN (ISO). ISO 13299: Análisis sensorial. Metodología. Guía general para establecer un perfil sensorial: Ginebra (Suiza): 2016, 48 p.
- KAMIMURA, BRUNA A.; CABRAL, LUCÉLIA; NORONHA, MELLINE F.; BAPTISTA, RAFAELA C.; NASCIMENTO, HENRY M.; SANT'ANA, ANDERSON S. Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms. *Food Microbiology*, v. 89, 2020, p. 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103453>

- LOPEZ, CHRISTELLE; MAILLARD, MARIE-BERNADETTE; BRIARD-BION, VALERIE; CAMIER, BENEDICTE; HANNON, JOHN A. Lipolysis during ripening of Emmental cheese considering organization of fat and preferential localization of bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 16, 2006, p. 5855–5867.
<https://doi.org/10.1021/jf060214l>
- LOUDIYI, MOHAMMED; RUTLEDGE, DOUGLAS-NEIL; AÏT-KADDOUR, ABDERRAHMANE. ComDim for explorative multi-block data analysis of Cantal-type cheeses: Effects of salts, gentle heating and ripening. *Food Chemistry*, v. 264, 2018, p. 401–410.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.039>
- MURGIA, MARCO A.; DEIANA, PIETRINO; NUDDA, ANNA; CORREDDU, FABIO; MONTANARI, LUIGI; MANGIA, NICOLETTA P. Assessment of microbiological quality and physicochemical parameters of fruhe made by Ovine and Goat Milk: A sardinian (Italy) cheese. *Fermentation*, v. 6, n. 4, 2020, p. 2–10.
<https://doi.org/10.3390/fermentation6040119>
- NIÑO- DE ONSHUUS, YOLANDA. Manual de elaboración de queso Paipa. Bogotá (Colombia): Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), Universidad Nacional de Colombia, 1998, 45 p.
- OTENG, ANTWI-BOASIAKO; KERSTEN, SANDER. Mechanisms of Action of trans Fatty Acids. *Advances in Nutrition*, v. 11, n. 3, 2020, p. 697–708.
<https://doi.org/10.1093/advances/nmz125>
- PAZZOLA, MICHELE; STOCCO, GIORGIA; DETTORI, MARIA L.; BITTANTE, GIOVANNI; VACCA, GIUSEPPE M. Effect of goat milk composition on cheesemaking traits and daily cheese production. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 5, 2019, p. 3947–3955.
<https://doi.org/10.3168/jds.2018-15397>
- REPS, ARNOLD; JEDRYCHOWSKI, LUCJAN; WIŚNIEWSKA, KRYSZYNA; JANKOWSKA, AGNIESZKA. Application of a coagulating preparation obtained with Rhizomucor Miehei N in cheese-making. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 5, n. 2, 2006, p. 97–101.
<https://doi.org/10.3923/pjn.2006.97.101>
- ROMERO DEL CASTILLO-SHELLY, ROSER; MESTRES-LAGARRIGA, JOSEP. *Productos lácteos. Tecnología*. 1 ed. Barcelona (España): Edicions UPC, 2004, 228 p.
- SANTILLO, ANTONELLA; FIGLIOLA, LUCIA; CILIBERTI, MARIA G.; CAROPRESE, MARIANGELA; MARINO, ROSARIA; ALBENZIO, MARZIA. Focusing on fatty acid profile in milk from different species after in vitro digestion. *Journal of Dairy Research*, v. 85, n. 2, 2018, p. 257–262.
<https://doi.org/10.1017/S0022029918000274>
- SHI, YONGQI; QI, LIANG; XUEMEI, SONG; YAN, ZHANG. Effect of Fat Content on Texture, Rheology and Microstructure of Yak Milk Hard Cheese. *Shipin Kexue*, v. 41, n. 20, 2020, p. 14–19.
[10.7506/spkx1002-6630-20190617-181](https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-20190617-181)
- SOKOŁA-WYSOCZAŃSKA, EWA; WYSOCZAŃSKI, TOMASZ; WAGNER, JOLANTA; CZYŻ, KATARZYNA; BODKOWSKI, ROBERT; LOCHYŃSKI, STANISŁAW; PATKOWSKA-SOKOŁA, ANDBOŻENA. Polyunsaturated fatty acids and their potential therapeutic role in cardiovascular system disorders. *Nutrients*, v. 10, n. 1, 2018, p. 1–21.
<https://doi.org/10.3390/nu10101561>
- THIERRY, ANNE; COLLINS, YVONNE F.; ABEIJÓN MUKDSI, M.C.; MCSWEENEY, PAUL L.H.; WILKINSON, MARTIN G.; SPINNLER, HENRI E. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Lipolysis and Metabolism of Fatty Acids in cheese*. 4 ed. Saint Louis (USA): Academic Press, 2017, p. 423–444.
- TRMCIC, ALJOSA; CHAUHAN, KHUSHBOO; KENT, DAVID J.; RALYEA, ROBERT D.; MARTIN, NICOLE H.; BOOR, KATHRYN J.; WIEDMANN, MARTIN. Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 8, 2016, p. 6105–6120.
<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11112>

ZEPPA, GIUSEPPE; GIORDANO, MANUELA; GERBI, VINCENZO; ARLORIO, MARCO. Fatty acid composition of Piedmont "Ossolano" cheese. *Le Lait*, v. 83, n. 2, 2003, p. 167–173. doi:10.1051/lait:2003007.
<https://doi.org/10.1051/lait:2003007>

Digestibility, rumen kinetics, and blood metabolites in lambs fed *Samanea saman* and *Cordia dentata**

Digestibilidad, cinética ruminal y metabolitos sanguíneos en corderos alimentados con *Samanea saman* y *Cordia dentata*

GUTIERREZ-OVIEDO, FABIAN¹; PARDO-GUZMÁN, JAIRO²; CASTAÑEDA-SERRANO, ROMÁN³

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 1 marzo 2021.

Aprobado para publicación: 1 septiembre 2021.

* Título del proyecto de origen: “Innovación y gestión técnico científica para el desarrollo de la cadena ovino caprina del departamento del Tolima”. Financiación: Sistema General de Regalías SGR Departamento del Tolima, Colombia. Culminación: 01 de Junio de 2020.

- 1 Universidad del Tolima, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Grupo de Investigación en Sistemas Agroforestales Pecuarios. Médico Veterinario y Zootecnista. Ibagué, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-7585-0606>
- 2 Universidad del Tolima, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Grupo de Investigación en Sistemas Agroforestales Pecuarios. Médico Veterinario y Zootecnista. Ibagué, Colombia. <http://orcid.org/0000-0002-4746-5978>
- 3 Universidad del Tolima, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Grupo de Investigación en Sistemas Agroforestales Pecuarios. Doctor en Zootecnia. Ibagué, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-6935-3918>

Corresponding author: rcastaneda@ut.edu.co

Cómo citar este artículo: GUTIERREZ-OVIEDO, FABIAN; PARDO-GUZMÁN, JAIRO; CASTAÑEDA-SERRANO, ROMÁN. Digestibility, rumen kinetics, and blood metabolites in lambs fed *Samanea saman* and *Cordia dentata*. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 20, n. 1, 2022, p. 113-123. Doi: <https://doi.org/10.18684/bsaa.v.n.2022.1839>

ABSTRACT

Colombian sheep production is carried out in extensive pastures with a low percentage of protein and high fiber levels that lead to low weight gains. The aim of this study was to evaluate intake, digestibility, rumen kinetics, and blood metabolites in hair lambs fed *Samanea saman* and *Cordia dentata*. Twelve hair lambs were distributed in an experimental 4x4 Latin square design, with four treatments and four experimental periods. Treatments were T1: 100 % *Dichanthium spp* hay, T2: 80 % *Dichanthium spp* hay, 20 % *S. saman*, T3: 80 % *Dichanthium spp* hay, 20 % *C. dentata*, T4: 80 % *Dichanthium spp* hay, 10 % *S. saman*, and 10 % *C. dentata*. The highest nutrients intakes were obtained with diets containing tree foliage compared with the T1 diet ($p < 0,05$). In vivo and In vitro digestibility of DM, OM and, NDF of tree leaves diets showed higher values than the T1 diet ($p < 0,05$). Digestible and metabolizable energy were similar between tree leaves diets ($p < 0,05$). Blood urea nitrogen values were superior for animals fed the T2 diet ($p < 0,05$). Degradability values at 96 hours were higher for the T2 diet ($p < 0,05$). Potential degradability was superior for the T3 diet. The results of this study demonstrate that *S. saman* and *C. dentata* leaves improve nutrients intake and digestibility. Therefore, they can be an alternative for sheep in the tropical dry forest.

RESUMEN

La producción ovina colombiana se realiza en pastos extensivos con bajo porcentaje de proteína y altos niveles de fibra que conducen a bajas ganancias de peso. El objetivo de esta investigación fue evaluar el consumo, digestibilidad, cinética ruminal y metabolitos sanguíneos en corderos de pelo alimentados con *Samanea saman* y *Cordia dentata*. Se distribuyeron doce corderos de pelo en un diseño experimental cuadrado latino 4x4, con cuatro tratamientos y cuatro períodos experimentales. Los tratamientos fueron T1: 100 % *Dichanthium spp*, T2: 80 % *Dichanthium spp*, 20 % de *S. saman*, T3: 80 % de *Dichanthium spp*, 20 % de *C. dentata*, T4: 80 % de *Dichanthium spp*, 10 % de *S. saman* y 10 % *C. dentata*. Las mayores ingestas de nutrientes se obtuvieron con dietas que contenían follaje arbóreo ($p < 0,05$). La digestibilidad in vivo e in vitro de MS, MO y FDN de las dietas con follaje arbóreo mostró valores más altos que la dieta T1 ($p < 0,05$). La energía digestible y metabolizable fue similar entre las dietas con follaje arbóreo ($p < 0,05$). Los valores de nitrógeno ureico en sangre fueron superiores para los animales alimentados con dieta T2 ($p < 0,05$). Los valores de degradabilidad a las 96 horas fueron mayores para la dieta T2 ($p < 0,05$). La degradabilidad potencial fue superior para la dieta T3. Los resultados de este estudio demuestran que el follaje de *S. saman* y *C. dentata* mejoran el consumo y la digestibilidad.

INTRODUCTION

Ruminants play an important role in food security in developing countries because they can convert fibrous foods such as grass and agro-industrial residues into products of high biological value like meat and milk (Guyader *et al.*, 2016). In these regions, most of the sheep farms present a low

KEYWORDS:

Energy; Hair sheep; Nutrition; Protein; Ruminants; Silvopastoral systems; Small Ruminants; Supplementation; Tropical dry forest; Tropical tree fodder.

PALABRAS CLAVES:

Bosque seco tropical; Energía; Forraje de árboles tropicales; Nutrición; Ovinos de pelo; Pequeños rumiantes; Proteína; Rumiantes; Sistemas silvopastoriles; Suplementación.

level of adoption of technologies, limitations of commercialization, and extensive grazing in pastures with low protein content and high fiber, thus leading to low body weight gain and low income (Vega-Pérez *et al.*, 2017) To solve this, the major trend in ruminant production has been the increase of grain feeding (Dumont *et al.*, 2018). However, these feed sources have disadvantages for small farmers, such as the high price, fluctuations in international markets, and the demand for cereals for biodiesel production (Thompson *et al.*, 2019). Hence, many studies have proved that using tropical trees and shrub leaves in ruminants diets can improve performance and decrease methane production (Vandermeulen *et al.*, 2018) Latin American Tropical dry forests present a high degree of diversity and endemism (Banda *et al.*, 2016). Many of these plants can be used for feeding because they have protein levels greater than 15 % and fiber levels less than 60 % (Perez *et al.*, 2013). Previous research demonstrated that *Samanea saman* and *Cordia dentata* are suitable for ruminant feeding. Since they have high protein levels and lower fiber values (Delgado *et al.*, 2014) than Angleton grass (*Dichanthium spp.*), a typical grass from the tropical dry forest, characterized for its low protein, high fiber, and low digestibility (Mantilla *et al.*, 2010).

However, there is a lack of information about the effect of including *S. saman* and *C. dentata* leaves on intake, digestibility, ruminal kinetics, and nutritional value in ruminant diets. Thus, the aim of this research was to evaluate the effect of partial replacement of Angleton (*Dichanthium spp.*) hay by *S. saman* and *C. dentata* leaves on feed intake, *in vivo* and *in vitro* digestibility, ruminal kinetics, and blood metabolites in hair lambs.

METHOD

Localization

This experiment was conducted from June to September 2017 at the experimental farm “Las Brisas” of the University of Tolima, in the city of Ibagué, department of Tolima, Colombia, located at 4°25’38.4” N + 75°13’40.8” W, 1285 masl with annual precipitation between 1.500 and 2.000 mm and an average temperature of 23,1 °C.

Experimental diets and treatments

The *Dichanthium spp.* was collected at the “Centro Universitario Regional del Norte” of the University of Tolima, Armero, Tolima, Colombia. The hay was chopped into one to three cm of size for ease of feeding. The *S. saman* and *C. dentata* leaves were collected at intervals of 45 days at “Centro de Investigación NATAIMA”, El Espinal, Colombia.

The experimental diets consisted of *Dichanthium spp.* hay with partial replacement by *S. saman* and *C. dentata* leaves (Table 1).

T1: 100 % *Dichanthium spp.*;

T2: 80 % *Dichanthium spp.* hay, 20 % *S. saman*;

T3: 80 % *Dichanthium spp.*, 20 % *C. dentata*;

T4: 80 % *Dichanthium spp.*, 10 % *S. saman*, 10 % *C. dentata*

Table 1. Bromatological composition of the ingredients and diets for hair lambs.

Nutrients	Feed ingredients			Experimental diets ^a			
	<i>Dichanthium spp</i>	<i>S. saman</i>	<i>C. dentata</i>	T1	T2	T3	T4
DM	89,7	91,6	90,2	89,7	90,0	89,8	89,9
OM	92,8	94,8	81,9	92,8	93,2	90,6	91,9
CP	3,4	20,4	13,5	3,4	6,8	5,4	6,1
NDF	77,2	52,1	58,4	77,2	72,1	73,4	72,8
ADF	39,7	31,7	35,1	39,7	38,1	38,8	38,4
Lignin	12,3	11,2	16,9	12,3	12,1	13,2	12,6
EE	1,1	2,3	1,5	1,1	1,4	1,2	1,3
Ash	7,1	5,1	18,1	7,1	6,7	9,3	8,0
TC	88,4	72,2	67	88,4	85,1	84,1	84,6
CNF	11,2	20,1	8,6	11,2	13	10,7	11,8

^aT1: *Dichanthium spp*; T2: 80 % *Dichanthium spp*, 20 % *S. saman*; T3: 80 % *Dichanthium spp*, 20 % *C. dentata*; T4: 80 % *Dichanthium spp*, 10 % *S. saman*, *C. dentata*.

Animals and experimental design

This study was carried out following the guidelines of the University of Tolima (agreement of the academic council number 0171 of October 29, 2008) and act number 02 of 2017 of the committee of bioethics.

Twelve castrated Colombian hair lambs ($20,15 \pm 1,67$ kg and an average age of six months) were randomly distributed and allocated to one of four dietary treatments. Each group received one of the diets under 4 x 4 Latin Square experimental design with four treatments, four experimental periods, and three animals for each treatment.

Sample collection

In vivo digestibility was determined by the total collection of feces. Each experimental period was divided into two: 12 days of diet adaptation and five days for data and sample collection. During the adaptation period, the lambs were located in pens for each treatment and fed at 4 % of live body weight. In the collection period, the lambs were housed in metabolic cages equipped with feeders, waterers, and collectors of feces and urine. The diet was adjusted to obtain 5-10 % orts. Feces and orts were collected every morning before feeding and weighed, and samples were taken and frozen for further analysis.

Samples of feeds, orts, and feces were pre-dried for 72 hours in an air circulation stove at 55 °C and ground in Willey type mills (2 mm mesh) and analyzed for Dry Matter (DM), Crude Protein (CP), Ether Extract (EE), (AOAC, 2009); Neutral Detergent Fiber (NDF), Acid Detergent Fiber (ADF), and lignin content (Van Soest *et al.*, 1991), Total Carbohydrates (TC). Non-Fiber Carbohydrates (NFC) were calculated as follows (Equation 1) (Sniffen *et al.*, 1992)

$$NFC = 100 - (CP + NDF + EE + MM) \quad (\text{Eq. 1})$$

Blood samples were collected per animal on the last day of each experimental period. They were analyzed for Plasma glucose, NEFA, and BHBA concentrations using commercial Biosystems® (glucose and BUN) and Randox® (β-hydroxybutyrate) kits and Biosystems A15® automatic blood chemistry system at the Laboratory of Veterinary Diagnostics at the University of Tolima-LADIVE.

Intake and apparent digestibility evaluations

DM, OM, CP, NDF, ADF, EE, TC, NFC, intake, and TDN of each treatment were calculated by the difference between the total of each nutrient contained in the feed offered to the lambs and the amount in the orts, expressed in grams per animal per day (g d^{-1}), Apparent digestibility (AD) of DM, OM, CP, NDF, EE, TC, and NFC was obtained using the equation as follows (Equation 2). where: Nf = nutrient in feed (g); No = nutrient in orts (g); and Nfc = nutrient in feces (g).

$$AD = ((Nf - No - Nfc) / (Nf - No)) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

TDN was calculated as follows (Equation 3) (Weiss, 1993) where subscript *d* means digestible.

$$TDN = CPd + NFCd + aNDFd + EEd \times 2,25 \quad (\text{Eq. 3})$$

The DE was estimated at 4,4 Mcal/kg of TDN, and the DE was converted to ME at an 82 % efficiency rate (National Research Council-NRC, 2007).

In vitro digestibility and ruminal degradability

In vitro DM digestibility (IVDMD) was determined based on the technique proposed by Tilley and Terry (1963), adapted to the DAISY II®-ANKOM® artificial rumen. Ruminal fluid was obtained from a rumen-cannulated Gyrolando steer maintained in a pen of *Dichanthium spp* grass with water ad libitum. For each feed sample (pre-ground to 1 mm), 0,5 g were placed into F57 ANKOM® filter bags. Then they were then distributed in four glass containers with buffered solutions A and B and ruminal inoculum. Subsequently, they were introduced into the DAISY II® incubator for 48 hours at a constant temperature of 39 °C. At the end of this period, 40 mL of 6 N HCl and 8 g of pepsin were added (EC 3.4.23.1 Sigma®). The samples were left in an incubator for an additional 24 hours. Subsequently, the bags were dried at 105 °C for eight hours; DIVMS was calculated as the difference between the incubated feed and the residue after incubation.

Degradation kinetics of DM was determined in parallel within *in vitro* dry matter digestibility using the DAISY II® incubator. The incubation times at 3, 6, 12, 24, 48, and 96 hours were considered. The parameters of *in vitro* rumen degradation of DM were calculated as follows (Equation 4) (Orskov and McDonald, 1979), where, P is the amount degraded at time t, “a” is the rapidly soluble fraction, “b” is the potentially degradable fraction, “c” is the rate of degradation of fraction b.

$$P = a + b(e^{-ct}) \quad (\text{Eq. 4})$$

Potential degradability (PD) was calculated using the following equation (Equation 5) where *a* and *b* represent the soluble and degradable fractions, respectively.

$$PD = a + b \quad (\text{Eq. 5})$$

The effective degradability (ED) of the DM was calculated using the following equation (Equation 6) where *k* is the velocity of the passage of particles in the rumen, estimated for each diet, considering the passage rates of 2, 5, and 8 %/hour, values that can be attributed to low, medium, and high consumption levels, respectively.

$$ED = a + (b \times c / c + k) \quad (\text{Eq. 6})$$

Statistical analysis

Nutrients intake, digestibility, and blood metabolites data were statistically using the general linear model procedure of SAS software (Statistical Analysis System, version 9,1). The treatment, period, and animal and their respective interactions as fixed effects. When the analysis of variance indicated the existence of differences between treatments, the respective means were compared using the Tukey test with significance declared at $p < 0,05$. Analysis of variance was carried out for *in vitro* digestibility, *in vitro* degradability and degradability kinetic parameters were compared using the Tukey test with significance declared at $p < 0,05$.

RESULTS

Intake

DM, OM, NDF intake were higher in the diets containing tree leaves ($p < 0,01$). Furthermore, NDF intake containing T4 was superior to the other diets ($p < 0,01$). The CP intake was lower in lambs fed with the T1 diet, while the lambs fed diets with T2 and T4 showed higher values ($p < 0,01$) (Table 2). The dry matter intake increased between 45 to 59 % in lambs fed with *S. saman* and *C. dentata*. The increase of their intake contributes to improving OM, CP, NDF, EE, TC, NFC, and TDN consumption. These findings corroborate the results of Castañeda-Serrano *et al.* (2018) who reported a similar intake in lambs fed with 25 % of *G. ulmifolia*, *G. sepium*, or *T. diversifolia* leaves with a basal diet of *Dichanthium spp* hay and rice bran. In our study, the lowest DM intake was obtained with the 100 % *Dichanthium spp* diet, which contains 5 to 7 % more fiber than other diets. Less fiber in diets with tree leaves might have resulted in less time in chewing and ruminal filling and a higher ruminal outflow that might have caused a higher intake (Niderkorn *et al.*, 2019) Protein intake is the main factor in daily weight gain. We found protein intake with tree leaves increased between 44 to 59 % in the lambs fed with diets with tree leaves (Costa-Germano *et al.*, 2018) Similarly, Marsetyo *et al.* (2020) reported that lambs fed basal diets of Mulato grass with supplementation of *Centrosema pascuorum*, *Dolichos lablab*, or *Clitoria ternatea* showed higher nutrients intake compared with the control diet but not showed differences between them. This occurred because lambs fed ad libitum can choose feeds, or parts of them, which are of good nutritional quality (Moyo *et al.*, 2019) Otherwise, the results of this study suggest high acceptability of *S. saman* and *C. dentata* by ruminants in accordance with Pérez-Almarino *et al.* (2013) who reported high acceptability of *S. saman* and *C. dentata* by dairy cows.

Table 2. Nutrients intake in hair lambs fed with *Dichanthium spp*; *S. saman* and *C. dentata*.

Intake (g/day)	Experimental diets				SEM	P
	T1	T2	T3	T4		
DM	437,4a	635,2b	633,8b	698,7b	17,7	<0,01
OM	406,3a	596,9b	574,8b	643,3b	16,28	<0,01
CP	13,0a	51,5c	34,5b	45,8c	2,27	<0,01
NDF	316,3a	436,2b	451,8bc	502,5c	12,98	<0,01
EE	6,3a	8,7b	8,2b	8,7b	0,22	<0,01
TC	375,9a	535,3b	531,5b	587,5b	14,6	<0,01
NFC	42,7a	80,4c	63,2b	67,5b	2,54	<0,01
TDN	149,0a	378,9b	343,6b	417,3b	2,17	<0,01

T1: *Dichanthium spp*; T2: 80 % *Dichanthium spp*, 20 % *S. saman*; T3: 80 % *Dichanthium spp*, 20 % *C. dentata*; T4: 80 % *Dichanthium spp*, 10 % *S. saman*, *C. dentata*. Means with a different letter in a column are statistically different (Tukey: $p < 0,05$). SEM: Standard error of the mean

Digestibility

DM, MO, NDF, TC digestibility and, IVDMD were higher for diets with tree leaves than the T1 diet, but they did not show differences between them ($p < 0,01$). CP digestibility was highest for the T2 diet, followed by T3, T4, and T1 diet ($p < 0,01$). EE and NFC digestibility did not show a difference between diets ($p > 0,05$). The TDN values for diets with tree leaves were higher than the T1 diet ($p < 0,01$) (Table 3). The highest digestibility of DM, OM, CP, NDF, and TC for the treatments with tree leaves, is consistent with the results of Sio *et al.* (2018). They evaluated the digestibility of the diets with three levels of *Paraserianthes falcataria* leaves (10, 15, and 20 %) in a grass basal diet and found that from 10 % of inclusion, it is possible to improve the digestibility of nutrients due to the rapid growth of the microbial population of the rumen because *S. saman* and *C. dentata* have high levels of protein and medium of low levels of NDF (Gebregiorgis *et al.*, 2012).

Table 3. Nutrients digestibility (%) and energy values in hair lambs fed with *Dichanthium spp.*, *S. saman*, and *C. dentata*.

Item	Experimental diets				SEM	P
	T1	T2	T3	T4		
DM	37,1a	61,4b	55,3b	63,4b	2,1	<0,01
OM	40,3a	64,2b	57,4b	65,2b	2,0	<0,01
CP	20,2a	64,5d	36,2b	50,1c	2,8	<0,01
NDF	37,3a	63,8b	60,7b	67,0b	2,4	<0,01
EE	50,0	59,8	55,8	50,5	2,4	0,44
TC	37,0a	64,2b	58,9b	66,5b	2,3	<0,01
NFC	35,5	59,3	30,1	50,6	6,5	0,37
TND	32,9a	59,1b	52,9b	59,4b	2,1	<0,01
IVDMD	44,9a	55,5c	51,4b	54,1ab	0,9	<0,01
DE ^(Mcal/Kg DM)	1,4a	2,6b	2,32b	2,6b	0,95	<0,01
ME ^(Mcal/Kg DM)	1,1a	2,1b	1,9b	2,1b	0,07	<0,01

T1: *Dichanthium spp.*; T2: 80 % *Dichanthium spp.*, 20 % *S. saman*; T3: 80 % *Dichanthium spp.*, 20 % *C. dentata*; T4: 80 % *Dichanthium spp.*, 10 % *S. saman*, *C. dentata*. Means with a different letter in a column are statistically different (Tukey: $p < 0,05$). SEM: Standard error of the mean

Blood metabolites

Glucose values showed no differences between treatments ($p > 0,05$). β HB showed a similar pattern ($p > 0,05$). Furthermore, the BUN of lambs fed the T2 diet showed higher values ($p < 0,01$). (Table 4). The blood urea nitrogen (BUN) values were lower than those established for sheep (Carlos-Leite *et al.*, 2015). Low levels of this metabolite may be due to deficient protein or energy in the diet (De Oliveira *et al.*, 2016). However, the highest levels of BUN in T2 treatment could indicate a better contribution of nitrogen to microbial protein production. Glucose values are closely correlated with dry matter and energy intake. However, in our trial, we did not observe differences between the treatments even though we observed differences for feed consumption, and the energy values were lower for the T1 diet. Regarding the β HB concentrations, these did not differ between treatments, and their values were below the proposed in sheep (Catunda-Vasconcelos *et al.*, 2013) (5,33 to 6,17 mg/dL). According to these results, it can be inferred that the lambs were not in a negative energy balance.

Table 4. Blood metabolites in lambs fed with *Dichanthium* spp, *S. saman*, and *C. dentata*.

Item	Experimental diets				SEM	P
	T1	T2	T3	T4		
Glucose, mg dL ⁻¹	64,5	67,2	63,3	66,0	1,3	0,77
BUN, mg dL ⁻¹	3,8a	7,5b	2,6a	3,1a	0,39	<0,01
βHB, mg dL ⁻¹	3,3	4,1	3,7	4,1	0,17	0,27

T1: *Dichanthium* spp; T2: 80 % *Dichanthium* spp, 20 % *S. saman*; T3: 80 % *Dichanthium* spp, 20 % *C. dentata*; T4: 80 % *Dichanthium* spp, 10 % *S. saman*, *C. dentata*. Means with a different letter in a column are statistically different (Tukey: p<0,05). SEM: Standard error of the mean.

Ruminal Degradability and degradability kinetics

At 96 h the T2 showed the highest degradability among the other diets. On the other hand, the T3 and T4 diets presented higher values than the T1 diet (Table 5). Regarding effective degradability, the highest values were observed in the T2 diet in the three levels of passage rate. The “a” and “c” fraction in the T3 diet was superior to the other diets. However, its “b” fraction was lower. The potential degradability was higher for the T3 diets (Table 6). The “a” fraction shown in tree leaves diets might be attributed to higher CP levels in *S. saman* and *C. dentata*, leading to a high amount of nitrogen available in the rumen used to produce microbial protein, the principal source of proteins for ruminants (De Oliveira *et al.*, 2014). Patra and Yu (2014, 2015) showed that saponins found in *S. saman* (Anantasook *et al.*, 2015) and nitrates found in *C. dentata* (Garcia *et al.*, 2009), could inhibit methane production, allowing the growth of cellulolytic bacteria and increases the feed degradability and production of volatile fatty acids. Otherwise, in this study, the T4 diet shows the lower “b” fraction. To the knowledge of the authors, there are no studies that evaluated or explained the *in vivo* interaction between saponins and nitrates.

Table 5. *In vitro* degradability by hours of dry matter in diets for hair lambs using *Dichanthium* spp, *S. saman*, and *C. dentata*.

Degradability	Treatments				SEM	P
	T1	T2	T3	T4		
3	12,1a	16,9b	16,2b	14,9ab	0,63	<0,01
6	14,7a	18,9b	19,8b	17,8ab	0,62	<0,01
12	21,5	24,1	22,3	21,6	0,50	0,22
24	29,0ab	35,1c	27,4a	30,7ab	0,91	0,02
48	42,7a	48,9b	40,1a	43,1a	1,07	0,03
96	51,3a	60,7c	53,9b	54,6b	1,06	<0,01

T1: *Dichanthium* spp; T2: 80 % *Dichanthium* spp, 20 % *S. saman*; T3: 80 % *Dichanthium* spp, 20 % *C. dentata*; T4: 80 % *Dichanthium* spp, 10 % *S. saman*, *C. dentata*. Means with a different letter in a column are statistically different (Tukey: p<0,05). SEM: Standard error of the mean.

Table 6. Degradability kinetics of diets for hair lambs using *Dichanthium* spp, *S. saman*, and *C. dentata*.

Treatments	Parameters						
	A (%)	B (%)	C (%/h)	PD (%)	ED (K=0,02)	ED (K=0,05)	ED (K=0,08)
T1	8,36a	47,2a	0,025c	55,6a	31,1a	24,2a	19,8a
T2	12,5ab	55,3b	0,021b	67,8c	37,2c	29,1c	24,3d
T3	14,9c	61,5c	0,010a	76,5d	33,0b	25,5b	22,1c
T4	11,8ab	50,6a	0,019b	62,52b	33,3b	25,9b	21,8b
P	<0,01	0,03	<0,01	<0,04	<0,01	0,03	<0,01

T1: *Dichanthium* spp; T2: 80 % *Dichanthium* spp, 20 % *S. saman*; T3: 80 % *Dichanthium* spp, 20 % *C. dentata*; T4: 80 % *Dichanthium* spp, 10 % *S. saman*, *C. dentata*. A (%) = soluble fraction. B (%) = potentially degradable fraction. C (%/h) = the rate of degradation of fraction b. PD= a+b fraction. ED= Effective degradability. K= Passage rate

CONCLUSIONS

Intake, digestibility, and degradability of the nutrients improved when *S. saman* and *C. dentata* were included in the diet. We demonstrated that their inclusion does not have harmful effects on protein and energy status. Their inclusion is a promising alternative for the supplementation of low-quality grass-fed ruminants in tropical and subtropical countries.

We suggest that this information could be used as basic data for future studies, where conventional protein feeds will be replaced by *S. saman* and *C. dentata*.

REFERENCES

- ANANTASOOK, NIRAWAN; WANAPAT, METHA; CHERDTHONG, ANUSORN; GUNUN, PONGSATORN. Effect of tannins and saponins in *Samanea saman* on rumen environment, milk yield and milk composition in lactating dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 99, n. 2, 2015 p. 335–344. <https://doi.org/10.1111/jpn.12198>
- BANDA, KARINA; DELGADO-SALINAS, ALFONSO; DEXTER, KYLE G.; LINARES-PALOMINO, REYNALDO; OLIVEIRA-FILHO, ARY; PRADO, DARIÉN; PULLAN, MARTIN; QUINTANA, CATALINA; RIINA, RICARDA; RODRÍGUEZ, GINA M.; WEINTRITT, JULIA; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, PEDRO; ADARVE, JUAN; ÁLVAREZ, ESTEBAN; ARANGUREN, ANAIRAMIZ; ARTEAGA, JULIÁN-CAMILO; AYMARD, GERARDO; CASTAÑO, ALEJANDRO; CEBALLOS-MAGO, NATALIA; COGOLLO, ÁLVARO; CUADROS, HERMES; DELGADO, FREDDY; DEVIA, WILSON; DUEÑAS, HILDA; FAJARDO, LAURIE; FERNÁNDEZ, ÁNGEL; FERNÁNDEZ, MILLER-ÁNGEL; FRANKLIN, JANET; FREID, ETHAN H.; GALETTI, LUCIANO A.; GONTO, REINA; GONZÁLEZ, ROY; GRAVESON, ROGER; HELMER, EILEEN H.; IDÁRRAGA, ÁLVARO; LÓPEZ, RENÉ; MARCANO-VEGA, HUMFREDO; MARTÍNEZ, OLGA G.; MATURO, HERNÁN M.; MCDONALD, MORAG; MCLAREN, KURT; MELO, OMAR; MIJARES, FRANCISCO; MOGNI, VIRGINIA; MOLINA, DIEGO; MORENO, NATALIA-DEL PILAR; NASSAR, JAFET M.; NEVES, DANILO M.; OAKLEY, LUIS J.; OATHAM, MICHAEL; OLVERA-LUNA, ALMA ROSA; PEZZINI, FLÁVIA F.; REYES DOMINGUEZ, ORLANDO-JOEL; ELVIRA RÍOS, MARÍA; RIVERA, ORLANDO; RODRÍGUEZ, NELLY; ROJAS, ALICIA; SÄRKINEN, TIINA; SÁNCHEZ, ROBERTO; SMITH, MELVIN; VARGAS, CARLOS; VILLANUEVA, BORIS; PENNINGTON, TOBY. Plant diversity patterns in neotropical dry forests and their conservation implications. *Science*, v. 353, n. 6306, 2016 p. 1383–1387. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5080>
- CARLOS-LEITE, MARIA-MARÍLIA; CHAVES-FERREIRA, DOWGLISH; VALE, ANDRÉ M.; FAÇANHA-EVANGELISTA, DÉBORA-ANDRÉA; MELO-MARTINS, MARÍLIA; SOTO-BLANCO, BENITO. Blood parameters in the morada nova sheep: Influence of age, sex and body condition score. *Journal of Animal and Plant Sciences*, v. 25, n. 4, 2015, p. 950–955.
- CASTAÑEDA-SERRANO, ROMÁN; PIÑEROS-VARÓN, ROBERTO; VÉLEZ-GIRALDO, ALEJANDRA. Foliage of tropical arboreal species in feeding ovines (*Ovis aries*): Intake, digestibility and balance nitrogen. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, v. 22, n. 1, 2018, p. 58–68.
- CATUNDA-VASCONCELOS, ANA-CLAUDIA; LIMA-SILVA, ITALO-CORDEIRO; BANDEIRA-CANDIDO, GABRIEL; GADELHA-FIGUEIREDO, CARLA-RENATA; PEREIRA-SALES, ELZENIA; SALMITO-VANDERLEY, CARMINDA-SANDRA; ALENCAR-DE-ARAÚJO, AIRTON; GABRIMAR-ARAÚJO, MARTINS; CAMPOS-NASCIMENTO, ANA-CLÁUDIA. Blood leptin, insulin and glucose concentrations in hair sheep raised in a tropical climate. *Small Ruminant Research*, v. 114, n. 2-3, 2013, p. 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.07.008>

- COSTA-GERMANO, ROBERTO; LIMA-BATISTA, HUGO; MEDEIROS-NUNES, ARIOSVALDO; CRUZ-BELTRAO, GEORGE; PEIXOTO, MARIA; SILVA, JUSCELINO. Net protein and energy requirements for weight gain of Santa Inês and Morada Nova sheep. *Livestock Science*, v. 214, 2018, p. 288–292.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.04.011>.
- DELGADO, DENIA C.; HERA, ROSARIO; CAIRO, J.; ORTA, YBETT. Samanea saman, árbol multipropósito con potencialidades como alimento alternativo para animales de interés productivo. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, v. 48, n. 3, 2014, p. 205–212
- DE OLIVEIRA-REUTER, EUCLIDES; PINTO-MONÇÃO, FLÁVIO; ARAÚJO-GABRIEL, ANDRÉA-MARI; BUSCHINELLI-DE-GÓES, RAFAEL; LEMPP, BEATRIZ; VALENZUELA-MOURA, LAIS. Ruminant degradability of neutral detergent fiber of *Cynodon spp.* grasses at four regrowth ages. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 36, n. 2, 2014, p. 201–208.
<https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v36i2.22469>
- DE OLIVEIRA-MARTINS, ROSEANE-PINTO; ASSANTE-TORRES, RAFAEL; FERREIRA-SILVA, ANDRÉ; OLIVEIRA-FERREIRA, FRANKLYN; GUIMARÃES-CRUZ, FRANK-GEORGE; FERREIRA-RUFINO, JOÃO-PAULO. Avaliação do perfil metabólico em diferentes fases do parto de ovelhas Santa Inês na Amazônia Ocidental. *Revista Brasileira de Saude e Producao Animal*, v. 17, n. 1, 2016, p. 37–44.
<https://doi.org/10.1590/s1519-99402016000100004>.
- DUMONT, BERTRAND; GROOT, JEROEN; TICHIT, MURIEL. Make ruminants green again – how can sustainable intensification and agroecology converge for a better future?. *Animal*, v. 12, n. s2, 2018, p. s210-s219.
<https://doi.org/10.1017/S1751731118001350>.
- GARCIA, ANDREA E.; ABADIA, BEATRIZ; BARAHONA, ROLANDO; SANCHEZ, SOLANGE. Caracterización Fitoquímica de Factores Antinutricionales en Las Hojas de Uvito (*Cordia dentata* Poir). *Revista MVZ Cordoba*, v. 14, n. 1, 2009, p. 1611–1623.
<https://doi.org/10.21897/rmvz.370>.
- GEBREGIORGIS, FELEKE; TEGENE, NEGESSE; AJEBU, NURFETA. Feed intake and utilization in sheep fed graded levels of dried moringa (*Moringa stenopetala*) leaf as a supplement to Rhodes grass hay. *Tropical Animal Health and Production*, v. 44, n. 3, 2012, p. 511–517.
<https://doi.org/10.1007/s11250-011-9927-9>.
- GUYADER, JESSIE; JANZEN, HENRY; KROEBEL, ROLAND; BEAUCHEMIN, KAREN. Forage use to improve environmental sustainability of ruminant production. *Journal of animal science*, v. 94, n. 8, 2016, p. 3147–3158.
<https://doi.org/10.2527/jas.2015-0141>
- MANTILLA, CECILIA-LARA; OVIEDO-ZUMAQUÉ, LUÍS E.; BETANCUR-HURTADO, CESAR A. Efecto de la época de corte sobre la composición química y degradabilidad ruminal del pasto *Dichanthium aristatum* (Angleton). *Revista Zootecnia Tropical*. v. 28, 2010, p. 275–281
- MARSETYO, MARSETYO; MUHAMMAD-ILYAS, MUMU; MUHAMAD, BASRI. The Effect of Various Legume Herbs Supplementation on Intake, Digestibility and Growth of Fat-tailed Lambs Given Mulato Grass. *Animal Production*, v. 21, n. 3, 2020, p. 129–135.
<https://doi.org/10.20884/1.jap.2019.21.3.784>
- MOYO, MEHLULI; RASHEED-ADEKUNLE, ADEBAYO; IGNATIUS-VERLA, NSAHLAI. Effects of diet and roughage quality, and period of the day on diurnal feeding behaviour patterns of sheep and goats under subtropical conditions. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 32, n. 5, 2019, p. 675–690.
<https://doi.org/10.5713/ajas.17.0901>.
- UNITED STATES OF AMERICA. NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient Requirements of Small Ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids. Washington (United States Of America): National Academies Press, 2007, 362 p.
<https://doi.org/10.17226/11654>.
- NIDERKORN, VINCENT; MARTIN, CÉCILE; BERNARD, MICKAËL; MORVAN, ALINE; ROCHETTE, YVANNE; BAUMONT, RENÉ. Effect of increasing the proportion of chicory in forage-based diets on intake and digestion by sheep. *Animal*, v. 13, n. 4, 2019, p. 718–726.
<https://doi.org/10.1017/S1751731118002185>

- ØRSKOV, EGIL-ROBERT; MCDONALD, IAN W. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage". *The Journal of Agricultural Science*, v. 92, n. 2, 1979, p. 499–503.
<https://doi.org/10.1017/S0021859600063048>.
- PATRA, AMLAN K.; YU, ZHONGTANG. Effects of vanillin, quillaja saponin, and essential oils on in vitro fermentation and protein-degrading microorganisms of the rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, n. 2, 2014, p. 897–905.
<https://doi.org/10.1007/s00253-013-4930-x>
- PATRA, AMLAN K.; YU, ZHONGTANG. Essential oils affect populations of some rumen bacteria in vitro as revealed by microarray (*Rumen bact* Array) analysis. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, 2015, p. 297.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00297>.
- PÉREZ-ALMARIO, NELSON; IBRAHIM, MOHAMMAD; VILLANUEVA, CRISTÓBAL; SKARPE, CHRISTINA; GUERIN, HUBERT. Diversidad forrajera tropical 1: Selección y uso de leñosas forrajeras en sistemas de alimentación ganadera para zonas secas de Nicaragua. *Agroforestería en las Américas*, v. 50, 2013, p. 37–43.
- PÉREZ-ALMARIO, NELSON; IBRAHIM, MOHAMMAD; VILLANUEVA, CRISTÓBAL; SKARPE, CHRISTINA; GUERIN, HUBERT. Diversidad forrajera tropical 2. Rasgos funcionales que determinan la calidad nutricional y preferencia de leñosas forrajeras para su inclusión en sistemas de alimentación ganadera para zonas secas de Nicaragua. *Agroforestería en las Américas*, v. 50, 2013, p. 44–52.
- SIO, STEFANUS; HILARIUS, YOSEP,SIKONE; USBOKO, CHARLES-ASAR. Nutrient digestion and body weight gain of Balinese cows getting basic ration of spear grass and rosewood leaves supplemented with falcata tree leaves". *International Journal of Life Sciences (IJLS)*, v. 2, n. 2, 2018, p. 1–11.
<https://doi.org/10.29332/ijls.v2n2.114>.
- SNIFFEN, CHARLES J.; O'CONNOR, JIM D.; VAN SOEST, PETER J.; FOX, DANNY G.; RUSSELL, JIM. Net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of animal science*, v. 70, n. 11. 1992, p. 3562-3577.
<https://doi.org/10.2527/1992.70113562x>.
- THOMPSON, WYATT; DEWBRE, JOE; PIERALLI, SIMONE; SCHROEDER, KATERYNA; PÉREZ-DOMÍNGUEZ, IGNACIO; WESTHOFF, PATRICK. Long-term crop productivity response and its interaction with cereal markets and energy prices. *Food Policy*, v. 84, 2019, p. 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2018.12.001>.
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass and Forage Science*, v. 18, n. 2, 1963, p. 104–11.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>.
- UNITED STATES OF AMERICA. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 20a ed. Gaithersburg (United States Of America): 2009.
- VAN SOEST, PETER J.; ROBERTSON, JAMES B.; LEWIS, BETTY A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, v. 74, n. 10, 1991, p. 3583–3597.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- VANDERMEULEN, SOPHIE; RAMÍREZ-RESTREPO, CARLOS-ALBERTO; BECKERS, YVES; HUGUES, CLAESSENS; BINDELLE, JÉRÔME. Agroforestry for ruminants: A review of trees and shrubs as fodder in silvopastoral temperate and tropical production systems. *Animal Production Science CSIRO*, v. 58, n. 5, 2018, p. 767-777.
<https://doi.org/10.1071/AN16434>.
- VEGA-PÉREZ, CARLOS A.; GRAJALES-LOMBANA, HENRY A.; MONTOYA-RESTREPO, LUZ-ALEXANDRA. Sistemas de información: definiciones, usos y limitantes al caso de la producción ovina colombiana. *Orinoquia*, v. 21, n. 1, 2017, p.64–72.
<https://doi.org/10.22579/20112629.395>
- WEISS, WILLIAM. Predicting Energy Values of Feeds. *Journal of Dairy Science*, v. 76, n. 6, 1993, p. 1802–1811.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77512-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77512-8).

Efecto del abono a base de hoja de coca en *Pisum sativum* L. en el Cauca, Colombia*

Effect of coca leaf fertilizer on *Pisum sativum* L. in Cauca, Colombia

AMBUILA-CHAMIZO NURY-MARCELA¹; CÓRDOBA-CERÓN, EDUARD-ESTEVEN²;
MONTES-ROJAS, CONSUELO³; ANAYA-FLOREZ, MARIA-DEL SOCORRO⁴

RESUMEN

La arveja, alverja o guisante es un cultivo que tiene un nivel proteico que oscila entre 20 y 24 %, lo cual lo convierte en un alimento importante para la seguridad alimentaria. Dado el alto contenido de fósforo y proteína es exigente en fertilización, pero altamente cultivado en varios municipios del departamento del Cauca, la investigación tuvo por objeto evaluar

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 19 febrero 2021.

Aprobado para publicación: 27 septiembre 2021.

* Título proyecto de origen: "Evaluación de abonos orgánicos a base de hoja de coca para cultivos transitorios en el Cauca". Financiación: SENA-Universidad del Cauca. Finalización: diciembre 2019.

- 1 Universidad del Cauca, Departamento de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación para el Desarrollo Rural (Tull). Ingeniero (a) Agropecuario. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-2146-8684>
- 2 Universidad del Cauca, Departamento de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación para el Desarrollo Rural (Tull). Ingeniero (a) Agropecuario. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-6353-5657>
- 3 Universidad del Cauca, Departamento de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación para el Desarrollo Rural (Tull). MSc. Profesora de planta. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-8117-9465>
- 4 Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). Licenciada en Biología. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-9208-2845>

Correspondencia: cmontesr@unicauca.edu.co

Cómo citar este artículo: AMBUILA-CHAMIZO, NURY-MARCELA; CÓRDOBA-CERÓN, EDUARD-ESTEVEN; MONTES-ROJAS, CONSUELO; ANAYA-FLOREZ, MARIA-DEL SOCORRO. Efecto del abono a base de hoja de coca en *Pisum sativum* L. en el Cauca, Colombia. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v.20, n. 1, 2022, p. 124-135. Doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v.n.2022.1840>

el efecto del abono orgánico a base de hoja de coca en la producción de *Pisum sativum* L. en dos municipios del departamento, mediante fertilización foliar y edáfica, para comparar con la fertilización convencional. Se empleó un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones y seis tratamientos (Testigo; CocALOFA I al 4 %; CocALOFA I al 8 %; CocALOFA II al 4 %; CocALOFA II al 8 %; CocALOFA II al 8 %) y como variables de respuesta se tuvieron los componentes de rendimiento. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas para altura de la planta, producción en grano verde y rendimiento en Popayán, mientras en Timbío se presentaron diferencias estadísticas en altura de la planta, granos por vaina, peso de cien granos, producción en grano verde y rendimiento. El tratamiento con mejores resultados fue CocALOFA I al 4 % alcanzando alturas entre 1,57 y 1,55 m, peso de cien granos de 65 g, producción por planta de 108,3 y 100,59 g y rendimientos de 3009,28 y 2794,17 kg/ha. El rendimiento con el abono líquido orgánico mineralizado a base de hoja de coca al 4 % superó en un 34 y 28 % al biofertilizante comercial en los dos centros experimentales.

ABSTRACT

The pea, pea or pea is a crop that has a protein level that ranges between 20 and 24 %, which makes it an important food for food security. Given the high content of phosphorus and protein, it is demanding in fertilization, but highly cultivated in several municipalities of the department of Cauca, the research aimed to evaluate the effect of organic fertilizer based on coca leaf in the production of *Pisum sativum* L. in two municipalities of the department, through foliar and edaphic fertilization, to compare with conventional fertilization. A randomized complete block design was used with three repetitions and six treatments (Control; 4 % CocALOFA I; 8 % CocALOFA I; 4 % CocALOFA II; 8 % CocALOFA II; 8 % CocALOFA II) and as response variables were the performance components. Statistically significant differences were detected for plant height, green bean production and yield in Popayán, while in Timbío there were statistical differences in plant height, grains per pod, weight of one hundred grains, green bean production and yield. The treatment with the best results was 4 % CocALOFA I reaching heights between 1,57 and 1,55 m, weight of one hundred grains of 65 g, production per plant of 108,3 and 100,59 g and yields of 3009,28 and 2794,17 kg/ha. The yield with the mineralized organic liquid fertilizer based on 4 % coca leaf was 34 and 28 % higher than the commercial biofertilizer in the two experimental centers.

INTRODUCCIÓN

La arveja (*Pisum sativum* L.) es considerada como uno de los productos básicos de la economía campesina de pequeños y medianos productores, se cultiva en 11 de los 32 departamentos de Colombia, especialmente en clima frío y medio (Pomboza *et al.*, 2017) y es la segunda leguminosa más cultivada después del frijol.

El cultivo de arveja es importante en Colombia porque contribuye a la seguridad alimentaria, el grano contiene propiedades nutricionales importantes debido a los aportes de proteínas, carbohidratos, fibra y

PALABRAS CLAVE:

Arveja; Biofertilizante; Sostenibilidad; Medioambiente; Fertilización; Abonos orgánicos; Nutrición de plantas; Residuos de cosecha; *Erythroxyllum coca* Lam; Rendimiento.

KEYWORDS:

Pea; Biofertilizer; Sustainability; Environment; Fertilization; Organic fertilizers; Plant nutrition; Crop residues, *Erythroxyllum coca* Lam; Yield.

vitaminas A, B y C; cuando se consume fresca o refrigerada, suministra tiamina (Vitamina B1), fósforo y hierro (Sturbelle *et al.*, 2018). Adicionalmente, es una alternativa económica para los pequeños productores en la zona andina (Burbano *et al.*, 2018), genera oportunidades de empleo debido a la cantidad de mano de obra y alto número de labores culturales para su producción. Se estima que dependen de este cultivo más de 26.000 productores, genera alrededor de 2,3 millones de jornales y 15.000 empleos directos a nivel nacional. Su importancia para la agricultura se debe a la capacidad de fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico y porque es una buena opción dentro de un plan de rotación de cultivos, ya sea a campo abierto o bajo invernadero (Serova *et al.*, 2018).

Los costos de producción se han incrementado debido al alto valor de los fertilizantes comerciales, adicionalmente, el efecto ambiental que estos ocasionan ha perjudicado el área cultivada. Los fertilizantes de síntesis química mal utilizados ocasionan ensalitramiento de los suelos, pérdida de la fertilidad natural, lixiviación de nutrientes más allá de la zona radical de los cultivos, emisión de gases de efecto invernadero y contaminación de cuerpos de agua superficiales y subterráneos (Chaveli, 2019). Se reporta que el uso de éstos ocasiona la disminución cualitativa y cuantitativa del crecimiento de microorganismos del suelo o bien altera su diversidad, lo que hace aumentar la fragilidad del sistema, además causa contaminación de aguas superficiales y freáticas por procesos de transferencia (Peña *et al.*, 2019). La contaminación por fertilizantes se produce cuando éstos se utilizan en mayor cantidad de la que pueden absorber los cultivos, o cuando se eliminan por acción del agua o del viento de la superficie del suelo antes de que puedan ser absorbidos (Jaime *et al.*, 2019). Los excesos de nitrógeno y fosfatos pueden infiltrarse en las aguas subterráneas o ser arrastrados a cursos de agua. Esta sobrecarga de nutrientes provoca la eutrofización de lagos, embalses y estanques y da lugar a una explosión de algas que suprimen otras plantas y animales acuáticos lo cual perjudica la rentabilidad de los productores (Cáceres, 2019).

Existen nuevas alternativas para aumentar la producción y obtener alimentos inocuos, siempre teniendo en cuenta como principio básico la conservación del medio ambiente. La biofertilización es una opción viable porque permite una producción a bajo costo, protección al medio ambiente y mantiene la conservación del suelo, desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad (Collazos *et al.*, 2018). Por lo anterior, esta investigación tuvo por objeto evaluar el efecto de un abono orgánico mineralizado producido a base de hoja de coca en el cultivo de arveja (*Pisum sativum* L.) en dos municipios del departamento del Cauca, mediante fertilización foliar y edáfica, con el propósito de mejorar el rendimiento, evitar el deterioro ambiental y proponer una alternativa de la hoja de coca diferente al uso ilícito.

MÉTODO

Localización del experimento

La investigación se llevó a cabo en los municipios de Popayán y Timbío. Popayán en el centro SENA localizado al norte del municipio, a una latitud de 2°28'52.7" norte y una longitud de 76°33'33.7" oeste, a una altitud de 1.780 msnm., temperatura media de 19 °C y precipitación media anual de 1.941 mm y en Timbío en el Centro Académico y Experimental La Sultana localizado en la Vereda Urubamba, a una latitud de 2°22'29.1" norte y una longitud de 76°43'31.5" oeste, a una altitud de 1.850 msnm., temperatura media de 18 °C y precipitación media anual de 2.000 mm.

Preparación de CocALOFA

Para la preparación del abono orgánico se utilizaron hojas de coca maceradas y harina proveniente de hoja de coca, material disponible en zonas cocaleras del Cauca, que puede ser utilizado como materia prima en la elaboración de abonos orgánicos para aprovechar sus cualidades nutricionales a través del compostaje y la fermentación (Anaya and Troyano, 2017).

Inicialmente, se maceraron las hojas de coca hasta obtener 2,5 kg y se colocaron en un recipiente plástico que contenía 6 L de agua. Después, en diferentes recipientes, se diluyeron 100 g de cada sulfato (Cobre, Zinc, Magnesio, Manganeso, Calcio, Potasio, Hierro) en 500 mL de agua cada uno, a cada sulfato se adicionaron 5 mL de

zumo de limón como agente quelante; estas soluciones se agregaron al recipiente en el orden indicado. Luego, en 500 mL de agua se disolvieron 30 g de vitaminas granuladas (se pueden reemplazar por 1 kg de frutos o de flores); aparte se diluyeron 100 g de ácido bórico en 500 mL de agua caliente y 50 g de levadura comercial para diluirla en 2 L de agua a una temperatura menor de 40 °C o agregar 2 L de levadura casera.

Posteriormente, se adicionaron 500 g de cal fosforita, 200 g de ceniza cernida y 100 g de compost maduro. En otro recipiente se mezcló 1 kg de miel de purga con 5 L de agua hasta disolver completamente, esta mezcla se adiciono a la solución total. Posteriormente, se agregaron 100 mL de ácidos húmicos y fúlvicos.

En la medida que se adicionaron los insumos se mezcló uniformemente la mezcla. Finalmente, se mezcló a ritmo constante durante 5 minutos, se tapó con una estopa, malla o zarán seco y limpio que permitiera la fermentación aeróbica y se amarró con fibra. Se marcó el recipiente con la fecha de preparación y el nombre del producto.

Culminado el proceso, se dejó fermentar durante 15 días, periodo después del cual la mezcla fue cernida, para luego empacar y conservar en un lugar fresco y oscuro. El procedimiento descrito permite obtener 20 L de CocALOFA I. El mismo procedimiento se repite para preparar CocALOFA II, solo que se emplea en vez de hoja, 500 g de harina de coca.

Diseño experimental

En las dos unidades productivas se empleó un diseño de bloques completos al azar con 6 tratamientos y 3 repeticiones con distancia entre surcos de 0,8 m y entre plantas de 0,45 m, siendo el factor de bloque la pendiente.

Descripción de los tratamientos

En el Cuadro 1 se describen los tratamientos para estudiar el efecto del abono orgánico líquido mineralizado a base de hoja de coca CocALOFA I y CoCALOFA II.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos.

Tratamiento	Producto	Dosis/ planta	Tipo aplicación	DDS
T0= testigo	10-30-10	30 g	Edáfica	30 y 45
	25-4-25	50 g	Edáfica	30 y 45
T1	CocALOFA I al 4 %	50 mL	Foliar	15
		100 mL	Edáfica	30
		50 mL	Foliar	45
		100 mL	Edáfica	
T2	CocALOFA I al 8 %	50 mL	Foliar	15
		100 mL	Edáfica	30
		50 mL	Foliar	45
		100 mL	Edáfica	
T3	CocALOFA II al 4 %	50 mL	Foliar	15
		100 mL	Edáfica	30
		50 mL	Foliar	45
		100 mL	Edáfica	
T4	CocALOFA II al 8 %	50 mL	Foliar	15
		100 mL	Edáfica	30
		50 mL	Foliar	45
		100 mL	Edáfica	
T5	Fertilizante orgánico comercial	50 mL	Foliar	15
		50 mL	Foliar	30
		50 mL	Foliar	45

*DDS= Días después de siembra

En el cuadro 2 se describe la composición nutricional de fertilizante orgánico comercial.

Cuadro 2. Composición del fertilizante orgánico comercial.

Elemento		%
Nitrógeno -Total	N-Total	60,00
Nitrógeno - Nítrico	N-HN ₃	18,00
Nitrógeno -Amoniacal	N-HN ₄	16,00
Nitrógeno - Ureico	N	26,00
Fósforo soluble en agua	P ₂ O ₅	15,00
Potasio soluble en agua	K ₂ O	76,00
Calcio soluble en agua	CaO	0,80
Magnesio soluble en agua	MgO	4,50
Azufre soluble en agua	S	3,80
Silicio soluble en agua	SiO ₂	6,20
Carbono orgánico oxidable	COO	113,00
pH en solución al 10 %	p H	5,30
Densidad a 20 °C	Ds	1,20
Conductividad eléctrica 1:200	CE	2,28 Ds/m

Fuente: (Ecoline, 2020)

Variables de respuesta

Para evaluar el efecto del CocALOFA sobre arveja (*Pisum sativum* L.) se registraron los componentes de rendimiento (número de vainas por planta, número de granos por vaina, peso de cien granos, producción y rendimiento) y altura de planta.

Altura de la planta (AP). Se midió la longitud desde el cuello hasta la hoja bandera donde empezaron a salir los zarcillos, en una muestra de 10 plantas/parcela. Se midió cuando las plantas alcanzaron su altura máxima (60 DDS).

Número de vainas por planta (VP). Una vez realizada la cosecha (85 DDS) se hizo el conteo de todas las vainas. Para la cosecha total se hicieron 3 pases, al final se sumaron todas las vainas y se dividió entre el número de plantas.

Número de granos por vaina (GV). Del área útil de cada parcela se escogió una muestra al azar de 50 vainas y se realizó el conteo de granos.

Peso de cien granos (PC). Se pesaron 5 muestras de 100 granos por cada parcela y se obtuvo el promedio.

Producción (Pn). Se pesaron primero las vainas con grano y luego los granos solos. Después, se calculó la producción como la sumatoria de las cosechas de las plantas totales del área útil y se dividió entre el número de plantas. Así se obtuvo la producción por planta con vainas y sin vainas.

Relación grano vaina (RGV). Se obtuvo de dividir el peso de los granos sobre el peso de las vainas con grano.

Rendimiento (Rto). Una vez se obtuvo la producción por planta, se multiplicó por el número de plantas por ha, de acuerdo a la densidad de siembra, para obtener el rendimiento/ha.

Siembra y manejo del cultivo

Se realizó de forma manual depositando dos semillas por golpe. Se emplearon semillas de la variedad Piquinegra. En el momento de la siembra se aplicaron 100 g de cal dolomita por sitio, en todas las parcelas; 500 g de lombricompost de hoja de coca a las parcelas de los tratamientos 1, 2, 3 y 4 y 500 g de compost tradicional a las parcelas de los tratamientos 0 y 5, como nutrición complementaria.

El manejo cultural incluyó tutorado, deshierba, aporque, manejo preventivo de plagas y enfermedades. Estas labores se programaron de acuerdo al ciclo fenológico del cultivo.

El tutorado se hizo antes de que las plantas emitieran la primera guía, empleando tutorado vertical.

El control de arvenses y aporque se realizó de forma manual y con azadón, en dos ocasiones, la primera a los 25 días después de siembra (DDS) y la segunda a los 45 DDS.

En cuanto al manejo fitosanitario, se hizo de manera preventiva aplicando bio-insecticidas comerciales, que son insecticidas orgánicos los cuales tienen extractos de neem, ajo y ají y se utilizaron para el control de tierrero (*Agrotis ipsilon*). Mientras que para el control de hongos y en especial para la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) se utilizó caldo bordelés en una concentración del 1%.

Análisis estadístico

Para el análisis de la información se utilizó el programa SPSS statistics 22, se aplicó estadística descriptiva y, posteriormente, se confirmó la normalidad de los datos para realizar análisis de varianza de dos factores (bloques y tratamientos) con el fin de determinar si había diferencias estadísticamente significativas entre bloques y luego entre tratamientos, dado que la investigación se realizó en una ladera que tiene gradiente de fertilidad, cada bloque representa un gradiente. Para establecer cuáles fueron las diferencias significativas entre tratamientos observadas, se realizó la prueba post hoc de promedios de Duncan

RESULTADOS

Caracterización y composición del CocALOFA

Los abonos líquidos orgánicos mineralizados a base de hoja de coca CocALOFA I y CocALOFA II, como se observa en el Cuadro 3, contienen la mayoría de los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas.

Los resultados diferenciales de los análisis entre los dos abonos, se deben a que la harina de coca tiene menor cantidad de nutrientes por la pérdida en el proceso de secado para la obtención de harina, debido a que los aminoácidos y vitaminas son sensibles a temperaturas altas y los minerales pueden perderse en el proceso de extrusión de la hoja (Cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación resultados análisis CocALOFA I Y II.

Parámetro	Resultado		Unidades	Método analítico
	CocALOFA I	CocALOFA II		
Carbono orgánico oxidable total	18,1	8,96	g/L	Wakley-Black (NTC 5167)
pH	7	4,52	Unidades pH	Potenciométrico
Densidad (20 °C)	1,01	1,01	g/cm ³	Gravimétrico (NTC 5167)
Conductividad eléctrica 1:200	0,29	0,2	dS/m	Potenciométrico
Sólidos insolubles	0,18	3,77	g/L	Gravimétrico (NTC 5167)
Nitrógeno total (Norg)	2,78	2,09	g/L	Sumatoria
Nitrógeno Orgánico (nOrg)	2,78	2,09	g/L	Micro-Kjeldhal (NTC 5167)
Fósforo (P ₂ O ₅)	0,07	0,71	g/L	Colorimétrico (NTC 5167)
Potasio (K ₂ O)	11,8	5,61	g/L	Abs. Atómica (NTC 5167)
Calcio (CaO)	1,55	2,28	g/L	Abs. Atómica (NTC 5167)
Magnesio (MgO)	1,98	1,53	g/L	Abs. Atómica (NTC 5167)
Azufre (S-SO ₄)	4,51	3,5	g/L	Turbidimétrico (NTC 5167)
Hierro	0,16	0,84	g/L	Abs. Atómica (NTC 5167)
Manganeso	444	1133	mg/L	Abs. Atómica (NTC 5167)
Cobre	20	480	mg/L	Abs. Atómica (NTC 5167)
Zinc	406	1402	mg/L	Abs. Atómica (NTC 5167)
Boro	8,9	11	mg/L	Colorimétrico (NTC 5167)
Sodio	0,37	0,16	g/L	Emisión de llama (NTC 5167)

Respuesta a los tratamientos

En el Cuadro 4 se relacionan los promedios obtenidos en cada variable de respuesta tras la aplicación de los tratamientos, como se puede observar los mejores resultados en rendimiento se obtuvieron con el T1.

En los dos municipios, los mayores promedios para altura, vainas/planta, producción y rendimiento se obtuvieron con el T1, superando en un 6 % al T2 en altura, en un 36 % al T5 en vainas por planta y en un 35 % al T4 en producción en grano verde y rendimiento en Popayán, mientras en Timbio el T1 superó en un 30 % al T5 para vainas/planta, en un 13 % al T0 para peso de 100 granos y en un 29 % al T3 para producción y rendimiento comparando con respecto al testigo.

Todas las plantas presentaron porte alto, indeterminado o voluble y se encuentran dentro del rango de la variedad que oscila entre 1 y 2 m (Singh *et al.*, 2019), igualmente sucedió con el número de granos por vaina y peso de cien granos en donde los promedios fueron muy similares entre tratamientos y coinciden con las características morfológicas de esta variedad, cuyo peso de cien granos está alrededor de 52 g y la cantidad de granos por vaina está entre 5 y 7.

En cuanto a la relación peso grano/peso vaina (RGV) en Popayán, la mejor relación la obtuvo el T3 con el 69 % y la más baja el T1 con el 64 %; en Timbio el T2 mostró una RGV de 61 %; T0, T1 y T3 de 64 %; T5 de 65 % y T4 de 66 %. En general, el peso de la vaina en todos los tratamientos, osciló entre 34 y 39 %, lo que indica que el mayor peso se encuentra en el grano, siendo este un componente relevante para la aceptabilidad del producto.

La relación grano vaina (RGV) es un factor importante que influye en la aceptación del producto en el mercado de arveja en vaina verde o en fresco. Una relación grano vaina alta significa que el mayor peso del producto se encuentra en el grano y no en la vaina, lo cual mejora su precio en el mercado (Burbano *et al.*, 2018).

Cuadro 4. Promedios de las variables de respuesta evaluadas y diferencias significativas de DUNCAN.

Tratamiento	Altura (m)	Vainas/planta	Granos/vaina	Peso 100 granos (g)	Pn/pl en vaina (g/pl)	Pn/pl en grano verde (g/pl)	Rendimiento en grano verde (kg/ha)
Centro Agropecuario SENA (Popayán)							
T0	1,53 B	31,66	5,25	64,44	128,66	82,33 C	2287,05 C
T1	1,57 C	37	5,25	67,44	168,33	108,33 D	3009,28 D
T2	1,47 A	27	5,66	64,33	111,66	76,00 B	2111,12 B
T3	1,55 B	28,66	5,41	67,33	117,66	81,66 C	2268,53 C
T4	1,50 A	26,66	5,66	68,44	107,66	70,66 A	1962,97 A
T5	1,50 A	23,66	5,16	69	108,33	71,00 A	1972,23 A
Centro Académico y Experimental La sultana (Timbío)							
T0	1,56 C	29,63	5,25 A	56,66 A	144	92,10 C	2558,44 C
T1	1,55 C	31,34	6,08 B	65,00 C	158	100,59 D	2794,17 D
T2	1,47 A	24,75	6,16 B	59,44 A	140	85,06 B	2362,35 B
T3	1,50 B	23,35	6,50 C	63,77 B	111,66	71,60 A	1989,26 A
T4	1,50 B	24,1	6,08 B	63,11 B	111,33	72,97 A	2027,10 A
T5	1,52 B	22,05	5,91 B	59,44 A	111,66	72,73 A	2020,74 A

Todos los tratamientos con fertilización orgánica a base de hoja y harina de coca obtuvieron los mejores promedios respecto a número de granos por vaina. Si el NGV se sitúa entre tres y cuatro se considera bajo, medio entre cinco a seis y alto mayor de seis (Torres *et al.*, 2020).

Los resultados obtenidos con el tratamiento 1 se atribuyen a que el abono orgánico contiene los elementos esenciales que requiere una planta para su normal desarrollo y crecimiento, a diferencia del fertilizante de síntesis química que sólo aporta los elementos primarios nitrógeno, fósforo y potasio. Los resultados con CocALOFA I se atribuyen a que tiene mayor cantidad de nutrientes que CocALOFA II, que se prepara con harina de coca y en proceso pierde propiedades nutricionales porque se conservan las características nutricionales de la planta de coca. La coca (*Erythroxylum coca* spp) contiene nutrientes como proteínas, carbohidratos, fibras, calcio, hierro, fósforo, vitamina A y riboflavina, que lo hacen útil en la nutrición animal, vegetal y humana (Debouck, 2017). El tratamiento 2, a pesar de tener mayor dosis, no presentó buenos resultados, lo que implica que a la planta le afecta la mayor concentración de nutrientes.

De forma semejante, el fertilizante orgánico comercial no contiene oligoelementos esenciales como hierro, manganeso, cobre, zinc y boro, elementos desempeñan funciones importantes en las plantas y, cuando están presentes en cantidades insuficientes, pueden producirse graves alteraciones y reducirse notablemente el crecimiento y la producción (Singh *et al.*, 2019).

La arveja requiere de diferentes nutrientes, en especial los macronutrientes, la fertilización con abonos orgánicos mineralizados es una buena opción porque contiene la mayoría de los nutrientes que cumplen una acción determinada en la fisiología del cultivo (Singh *et al.*, 2019).

El análisis de varianza ANOVA ($p \leq 0,05$), detectó diferencias estadísticamente significativas para las variables altura de la planta, producción en grano verde y rendimiento (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza en los dos centros de investigación.

VARIABLES DE RESPUESTA		Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F	Sig.
Centro agropecuario SENA						
Altura (m)	Entre-Tratamientos	0,21	5	0,042	3,798	,003*
	Dentro-del tratamiento	1,926	174	0,011		
	Total	2,136	179			
Vainas/planta	Entre-Tratamientos	327,111	5	65,422	0,978	0,47
	Dentro-del tratamiento	802,667	12	66,889		
	Total	1129,778	17			
Granos/vaina	Entre-Tratamientos	2,903	5	0,581	0,595	0,7
	Dentro-del tratamiento	64,417	66	0,976		
	Total	67,319	71			
Peso de 100 granos (g)	Entre-Tratamientos	178,833	5	35,767	1,069	0,39
	Dentro-del tratamiento	1606,667	48	33,472		
	Total	1785,5	53			
Producción/planta en grano verde (g/pl)	Entre-Tratamientos	2935,333	5	587,067	54,75	,000*
	Dentro-del tratamiento	128,667	12	10,722		
	Total	3064	17			
Rendimiento (kg/ha)	Entre-Tratamientos	2264953,9	5	452990,79	54,75	,000*
	Dentro-del tratamiento	99281,424	12	8273,452		
	Total	2364235,4	17			
Centro Académico y experimental La sultana						
Altura (m)	Entre-Tratamientos	0,158	5	0,032	2,792	0,019*
	Dentro-del tratamiento	1,856	164	0,011		
	Total	2,014	169			
Vainas/planta	Entre-Tratamientos	193,178	5	38,636	1,469	0,28
	Dentro-del tratamiento	289,315	11	26,301		
	Total	482,493	16			
Granos/vaina	Entre-Tratamientos	7,951	5	1,59	1,218	0,031*
	Dentro-del tratamiento	80,917	62	1,305		
	Total	88,868	67			
Peso de 100 granos (g)	Entre-Tratamientos	396,523	5	79,305	4,101	0,004*
	Dentro-del tratamiento	870,222	45	19,338		
	Total	1266,745	50			
Producción/planta en grano verde (g/pl)	Entre-Tratamientos	2095,489	5	419,098	63,94	0,000*
	Dentro-del tratamiento	72,106	11	6,555		
	Total	2167,595	16			
Rendimiento (kg/ha)	Entre-Tratamientos	1615396,9	5	323079,38	149,3	0,000*
	Dentro-del tratamiento	23805,126	11	2164,102		
	Total	1639202	16			

*Diferencia estadística altamente significativa

La prueba de comparación de promedios de Duncan ($p=0,05$) formó entre dos y 4 grupos para las variables de respuesta (Cuadro 4). Aunque hubo diferencias significativas en altura de planta, los resultados estuvieron dentro del rango que alcanza la variedad piquinegra, resultados coinciden con lo reportado por Riascos *et al.* (2018), quienes obtuvieron un valor de 1,56 m con fertilización de síntesis química, aclarando que en esta investigación el mayor valor obtenido fue con abono orgánico.

Como se puede apreciar, los resultados con CocALOFA en menor concentración, tanto con base en hoja de coca o con harina de coca, tuvieron las mayores producciones y rendimientos, siendo el mejor T1 (CocALOFA I la 4 %). Este comportamiento se atribuye a que el abono orgánico mineralizado contiene los elementos esenciales para el buen desarrollo del cultivo y cumplimiento de sus funciones fisiológicas (Montes *et al.*, 2019), brinda tanto macro como micro nutrientes que ayudan a mejorar la nutrición de las plantas.

El rendimiento en grano verde alcanzado por T1 en Popayán superó en 31,56 % al testigo (T0), mientras en Timbío en el 9,22 %. Estos resultados son similares a los reportados por Riascos *et al.* (2018) que obtuvieron un rendimiento de 2919 kg/ha.

Las parcelas a las cuales se les aplicó fertilizante orgánico comercial y CocALOFA I y II presentaron mayor número de granos por vaina superando a la fertilización de síntesis química, posiblemente porque esta última aporta sólo tres de los nutrientes esenciales para las plantas (nitrógeno, fósforo y potasio), mientras que los demás brindan nutrientes principales, secundarios y micronutrientes que ayudan a mejorar la nutrición de las plantas. Esta característica es bastante influenciada por la disponibilidad de luz, agua y nutrientes (Álvarez *et al.*, 2020), aunque Cazzola *et al.* (2019) afirman que el número de granos por vaina es un carácter cuya expresión depende en alto grado de la composición genética del material y del manejo agronómico que permite que se exprese bien la característica.

Para la variable peso de 100 granos, el tratamiento con CocALOFA I al 4 % en Timbío obtuvo el mejor promedio diferenciándose del más bajo que fue T0 en 8,34 g. Esta característica es importante puesto que representa la parte útil para el consumo de esta leguminosa, por lo general, son muy apreciadas en el mercado las variedades con mayor peso de grano (Majeed *et al.*, 2019). Además, es de anotar que los tratamientos con base en hoja de coca y el fertilizante orgánico comercial fueron superiores a los alcanzados con la fertilización convencional, posiblemente porque la hoja de coca posee minerales que son importantes para la nutrición de las plantas, tales como proteína cruda (20,2 %), fósforo (1.400 mg), calcio (1.600 mg), potasio (1,10 mg) y hierro (55,8 mg) (Mattos, 2014). Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Riascos *et al.* (2018), quien consiguió rendimientos entre 2133 y 2838 kg/ha tras la inoculación con *Rhizobium leguminosarum*, *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*.

En general, es importante mencionar que las plantas mostraron una buena respuesta tras la aplicación tanto del abono orgánico mineralizado a base de hoja de coca como del fertilizante NPK, precisando que el CocALOFA presentó mejores resultados en altura, vainas/planta, peso de 100 granos, producción y rendimiento, lo cual se atribuye a que el uso de abonos orgánicos mejora las propiedades del suelo y la productividad de los cultivos, además, hacen un aporte significativo de nitrógeno, fósforo y potasio (NPK) y brindan nutrientes secundarios y micronutrientes que ayudan a mejorar la nutrición de la planta (Bobillea *et al.*, 2019).

Por otra parte, a pesar de que en los dos municipios las plantas mostraron buen vigor y expresaron las características propias de su variedad, considerando la sumatoria de todos los tratamientos se pudo determinar que el rendimiento en Timbío fue superior en 120 kg a lo obtenido en Popayán. Esta diferencia se atribuye a que los suelos en Timbío han sido cultivados por mucho tiempo y han realizado rotación de cultivos con grandes aportes de materia orgánica, por lo tanto, es un suelo con buena porosidad que permite un adecuado desarrollo de raíces, retención de agua, aireación y drenaje, mientras en Popayán son suelos que no se han cultivado, vienen de pasturas y han tenido cero aportes de materia orgánica.

Los resultados permiten sugerir que la hoja de coca puede tener un uso alternativo como componente de abonos orgánicos líquidos y sólidos, teniendo en cuenta que contiene 2,1 % de nitrógeno total, 2744 mg/kg de fósforo total, 92 mg/kg de sodio total, 12240 mg/kg de potasio total, 9574 mg/kg de calcio total, 2548 mg/kg de magnesio total, 94 % de materia orgánica, 6 % de ceniza, 13 % de proteína total, pH de 4,9 y conductividad eléctrica de 4540 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Apaza *et al.*, 2015), es un material vegetal que tiene usos potenciales lícitos importantes en la nutrición de cultivos.

La hoja de coca es una alternativa para que los productores puedan disminuir los costos de producción al reemplazar los fertilizantes de síntesis química, de forma parcial o total, ya que estos tienen alto costo en el mercado.

CONCLUSIONES

En los dos municipios el cultivo de arveja respondió a la aplicación del abono líquido orgánico mineralizado a base de hoja de coca al 4 %, superando al testigo en un 20 % promedio. El rendimiento con el abono líquido orgánico mineralizado a base de hoja de coca al 4 % superó en un 34 y 28 % al abono orgánico comercial en Popayán y Timbío respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad del Cauca y al Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA), por el apoyo en la realización del trabajo de investigación.

REFERENCIAS

- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, DAVID; CHAVES-MORILLO, DIANA; GÓMEZ-LOPES, EYDER; HURTADO-BENAVIDES, ANDRÉS. Estimación del riesgo ambiental causado por plaguicidas en cultivos de arveja de Ipiales, Nariño-Colombia. *Tecnología*, v. 23, n. 47, 2020, p. 77-91.
<https://doi.org/10.22430/22565337.1404>
- ANAYA-FLOREZ, MARIA-DEL SOCORRO; TROYAN-SÁNCHEZ, DORA-LUCILA. Producción tecnificada de abonos orgánicos sólidos y líquidos a partir de hoja de coca para la fertilización de cultivos transitorios. Popayán (Colombia): Centro Regional SENA, 2017, 34 p.
- APAZA-CONDORI, EMMA-EVA; MAMANI, PATI-FRANCISCO; SAINZ-MENDOZA, HUMBERTO. Sistema de compostaje para el tratamiento de residuos de hoja de coca con la incorporación de tres activadores biológicos, en el centro experimental de Kallutaca. *Journal of the selva andina Biosphere*, v. 3, n. 2, 2015, p. 75-85.
- BOBILLEA, HELENE; FUSTEC, JOELLE; ROBINS, RICHARD J.; CUKIERB, CAROLINE; LIMAMI, ANIS M. Effect of water availability on changes in root amino acids and associated rhizosphere on root exudation of amino acids in *Pisum sativum* L. *Phytochemistry*, v. 61, 2019, p. 75-85.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.01.015>
- BURBANO-ERAZO, ESTEBAN; DOMINGUEZ-CHAUZA, JHON-JAIRO; CHECA-CORAL, OSCAR-EDUARDO. Efecto de cinco densidades de siembra en líneas de arveja *Pisum sativum* L. con el gen mutante afila. *Investigación Agraria*, v. 20, n. 1, 2018, p. 22-29.
<https://doi.org/10.18004/investig.agrar.2018.junio.22-29>
- CACERES-URIBE, ANGELA-NATALIA. Estudio de los cuerpos lénticos en el escenario de cambio climático, una mirada a Colombia. *Revista Pertinencia Académica*, v. 3, n. 3, 2019, p. 29-50.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.3516301>
- CAZZOLA, FEDERICO; MAGLIA, FERNANDO; GUINDÓN, FERNANDA; BERMEJO, CAROLINA JULIETA. Selección de progenitores para planes de cruzamiento en arveja (*Pisum sativum* L.) y estimación de parámetros genéticos mediante el uso de blup. *Ciencias Agronómicas, Revista de investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias UNR*, v. 33, n. 19, 2019, p. 7-12.
- COLLAZOS-SILVA, ROICER; NERY-CHAVEZ, JUAN-CARLOS; HUAMAN-HUAMÁN, EYNER. Rendimiento de tres cultivares de arveja (*Pisum sativum* L.) con aplicación de fertilizantes químicos y orgánicos en el anexo de Taquia, Chachapoyas. *Revista de Investigación en Agroproducción Sustentable*, v. 2, n. 2, 2018, p. 26- 33.
- CHAVELI-CHAVEZ, PAVELI. Fertilización organomineral en el manejo sostenible de tierras cultivadas con maíz (*Zea mays* L.). *Revista Científica Agroecosistemas*, v. 7, n. 3, 2019, p.116-122.
- DEBOUCK-DANIEL G. En: *Domesticación en el continente americano*. 1 ed. Lima (Perú): Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), 2017, p.135-149.

- ECOLINE – Expertos en nutrición vegetal. 2020. <http://ecolineagricola.com/product/eko-soil/>. [citado 20 de diciembre de 2020].
- JAIME-CALDERON, FRANKLIN-ECUADOR; CASTRO-GUERRA, JORGE-WILLIAM; ORLANDO-LUCIO, DIOMEDES-AUGUSTO. Impacto ambiental provocado por el inadecuado uso de fertilizantes químicos en cultivos de maíz. v. 3, n. 1, 2019, p. 61-72.
- MAJEED, ABDUL; MUHAMMAD, ZAHIR; SIYAR, SAIRA. Assessment of heavy metal induced stress responses in pea (*Pisum sativum* L.). Acta Ecologica Sinica, v. 39, 2019, p. 284–288.
<https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.12.002>
- MATTOS-VAZUALDO DIEGO. Coca y representación: La hoja de coca en la constitución de la nación boliviana en la época neoliberal. Latin American Research Review, v. 49, n. 1, 2014, p. 23-38
- MONTES-ROJAS, CONSUELO; ANAYA-FLOREZ, MARIA-DEL SOCORRO. Efecto de la fertilización con abono orgánico (A.L.O.F.A) en plantas de café (*Coffea arabica*). Scientia et Technica, v. 24, n. 2, 2019. p. 331-339.
- PEÑA-MURILLO, SANDRA E.; ZAMBRANO-NEVÁREZ, EDDIE; BAQUERIZO-FIGUEROA, JULIO; ANTÓN-LOOR, ANGEL; SOLÓRZANO-ALDAZ, KATHERIN. Nuevos sistemas de tratamientos de suelo contaminado por hidrocarburos. Journal of Information Systems and Technologies, E21, 2019, p. 226-236.
- POMBOZA-TAMAQUIZA, PEDRO-PABLO; NAVARRO-GARZA, HERMILIO; PÉREZ-OLVERA, MARIA-NTONIA; FLORES-SANCHEZ, DIEGO. Prácticas organizativas mixtecas asociadas con la seguridad alimentaria y su patrimonio. Revista Mexicana Ciencias Agrícolas, v. 8. n. 18, 2017, p. 3697-3710.
<http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v8i18.215>
- RIASCOS-DELGADO, MARCELA-ELIZABETH; CHECA-CORAL, OSCAR-EDURADO. Evaluación y selección de líneas de arveja con gen afila bajo dos densidades de población. Revista UDCA Actualidad y divulgación científica, v. 21, n. 2, 2018, p. 367-376.
<http://doi.org/10.31910/rudca.v21.n2.2018.984>
- SEROVA, TATIANA A.; TSYGANOVA, ANA V.; TSYGANOV, VIKTOR E. Early nodule senescence is activated in symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) forming ineffective nodules blocked at different nodule developmental stages. Protoplasma, v. 255, 2018, p. 1443–1459.
- SINGH, SIMRANJEET; VIJAY, KUMAR; GURPREET-KAUR, SIDHU; CHIVITA, DATTA; DALJEET-SINGH, DHANJAL; BHUPENDRA, KOULF; HARMEET-SINGH, JANEJA; JOJINFER, SINGH. Plant growth promoting rhizobacteria from heavy metal contaminated soil promote growth attributes of *Pisum sativum* L. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 17, 2019, p. 665–671.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.035>
- STURBELLE-SCHIAVON, JOSUAN; PERIPOLLI-BEVILAQUA, GILBERTO-ANTONIO; SCHIAVON-ALBUQUERQUE, TATIANA; ARAUJO-PINHEIRO, PAULO-EFDUARDO; DA ROCHA, EBERHARDT; FERREIRA-ANTUNES, IRAJÁ. Evaluation of pisum cultivars of double-purpose for diversification of ecological agricultural systems. Brazilian Journal Of Development, v. 4. n. 6, 2018, p. 3147-3153.
- TORRES-MARTÍNEZ, FRANCISCO-JAVIER; RIVADENEIRA-MIRANDA, CARLOS-NELSON; CASTILLO-MARÍN, ÁLVARO-JOSÉ. Producción y comercialización de arveja en el departamento de Nariño-Colombia. Agronomía Mesoamericana, v. 31, n. 1, 2020, p. 129-140.
<http://doi.ORG/10.15517/am.v31i1.36776>

Obtención de nanoemulsiones de *Cúrcuma longa* L. y su aplicación en bebida acuosa*

Obtention of nanoemulsions of *Curcuma longa* L. and its application in aqueous beverage

CHICA-BARCO, VANESSA¹; MARTÍNEZ-CORREA, HUGO A.²; PEREZ-MUNIVE, ADRIANA M.³

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 17 febrero 2021.

Aprobado para publicación: 9 julio 2021.

* Proyecto de investigación de origen: "Combinación de procesos de extracción de fluidos supercríticos y ultrasonido en la obtención de compuestos de cúrcuma (*Curcuma longa*) y su efecto en la estabilidad de sus emulsiones". Financiación: Universidad Nacional de Colombia-proyecto Hermes 42119. Culminación: marzo 2020,

1 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería y Administración, Grupo de investigación en procesos agroindustriales (GIPA). Ingeniera Agroindustrial. Palmira, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-3250-5516>

2 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería y Administración, Grupo de investigación en procesos agroindustriales (GIPA). Ph.D. Ingeniería de Alimentos. Palmira, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-9617-0033>

3 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería y Administración, Grupo de investigación en procesos agroindustriales (GIPA). Ingeniera Agroindustrial. Palmira, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-0467-8743>

Correspondencia: hamartinezco@unal.edu.co

Cómo citar este artículo: CHICA-BARCO, VANESSA; MARTÍNEZ-CORREA, HUGO A.; PEREZ-MUNIVE, ADRIANA M. Obtención de nanoemulsiones de *Cúrcuma longa* L. y su aplicación en bebida acuosa. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 20, n. 1, 2022, p. 136-151. Doi: <https://doi.org/10.18684/bsaa.v.n.2022.1861>

RESUMEN

La curcumina contrarresta diversas patologías como el cáncer o enfermedades neuro-degenerativas. Sin embargo, su solubilidad es baja en soluciones acuosas limitando su aplicabilidad. Esta investigación elaboró una nanoemulsión estable de aceite en agua (O/W) a base de oleoresina de *Curcuma longa* (ORC) para ser aplicada a bebida acuosa como una posible alternativa al uso de colorantes artificiales como la tartrazina. Se formularon y prepararon dos tipos de nanoemulsión: Oleoresina (EORC) y curcumina comercial 75 % (ECC). Estas se caracterizaron mediante el porcentaje de retención de curcumina (CR), contenido de fenoles totales (TPC); estabilidad física y tamaño de partícula (TP) por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se obtuvieron nanoemulsiones estables con TP de 10,201 nm y 13,847 para EORC y ECC respectivamente. EL CR hallado fue de 67,13 % (EORC) y 81,991 % (ECC); y, el contenido de fenoles para EORC fue de 35,466 y 36,128 mg EAG/L para ECC. Igualmente, se obtuvieron bebidas acuosas a base de EORC con un CR de 80,014 %. La bebida con EORC presentó mayor turbidez en comparación a la ECC y la tartrazina (control). Se obtuvieron nanoemulsiones y bebidas estables con aspectos diferenciables como color, turbidez, tamaño de partícula, separación de fases/tiempo. La EORC presentó mayor CR, por lo tanto, puede ser una alternativa potencial como colorante y antioxidante en bebidas acuosas.

ABSTRACT

Curcumin counteracts over different pathologies like cancer or neurodegenerative diseases. However, its solubility is low in aqueous solutions therefore limiting its applicability. This study worked on obtaining an oil-in-water (O/W) stable oleoresin-based emulsion of *Curcuma longa* (ORC) to be applied into an aqueous beverage as an alternative to artificial colorants such as tartrazine. Two types of nanoemulsion were formulated and prepared: Oleoresin (EORC), and commercial curcumin 75 % (ECC). They were differentiated by percentage curcumin retention (CR), total phenol content (TPC); physical stability, and particle size (TP) under a Transmission Electron Microscopy (TEM). Two stable nanoemulsions were obtained with a TP of 10,201nm (EORC), and 13,847 nm for ECC. CR observed for EORC was 67,136 % and 8,991 % for ECC. Total Phenol content of 35,466 and 36,128 mg EAG/L respectively. Same way, aqueous beverages with EORC were processed and showed a CR of 80,014 %. EORC beverage presented higher turbidity compared to ECC and tartrazine (as control). Emulsions and beverages revealed settle aspects like color, turbidity; particles size or phase/time division. EORC exhibited greater CR which could be a possible alternative as colorant and antioxidant in aqueous beverages

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la investigación y el desarrollo de alimentos funcionales ha cobrado gran importancia en el campo alimentario, industrial y de la medicina, debido a sus propiedades funcionales que contrarrestan y/o previenen

PALABRAS CLAVE:

Emulsión; Nanoemulsión; Curcumina; Actividad antioxidante; Extracción asistida por ultrasonido (EAU); Bebida acuosa; Compuestos fenólicos; Tamaño de partícula; Tartrazina; Estabilidad; Índice de cremado.

KEYWORDS:

Emulsion; Nanoemulsion; Curcumin; Antioxidant activity; Ultrasound-assisted extraction (UAE); Aqueous beverage; Phenolic compounds; Particle size; Tartrazine; Stability; Cremation index.

enfermedades (Granato *et al.*, 2020). La *Cúrcuma longa* L., es una planta perenne, pertenece a la familia *Zingiberaceae* que se produce en China, Malasia, Perú, Brasil, India (Sandeep *et al.*, 2018); posee una coloración entre amarillo y naranja que hace que sea atractiva para proporcionar color a los alimentos por la presencia de curcuminoides en su composición, principalmente la curcumina (75 %), la demetoxicurcumina (10-25 %) y la bisdemetoxicurcumina (5 %) (Patil *et al.*, 2019). La curcumina, principal compuesto fenólico, posee un alto potencial terapéutico (Araiza-Calahorra *et al.*, 2018; Aswathanarayan & Vittal, 2019; Azmi *et al.*, 2019), debido que puede actuar frente a diferentes patologías como enfermedades cardiovasculares, intestinales, neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson), contra el cáncer, diabetes, Enfermedades metabólicas, SIDA, cálculo biliar, enfermedades de las articulaciones y del hígado, anemia, infecciones bacterianas e infecciones virales, entre otras (Araiza-Calahorra *et al.*, 2018; Bhatt *et al.*, 2018; Danafar *et al.*, 2018; Azmi *et al.*, 2019; Bagheri *et al.*, 2020).

A pesar de los beneficios que tiene la curcumina, su biodisponibilidad y aplicación en la industria está limitada debido a su baja solubilidad en soluciones acuosas y su susceptibilidad a cambios de pH especialmente a condiciones alcalinas, a la luz, a la oxidación, al calor, humedad e iones de hierro y temperatura, que también limitan su eficacia clínica (Danafar *et al.*, 2018). Debido a lo anterior, en la industria es común el uso de colorantes sintéticos por su estabilidad y poder colorante como la tartrazina (FD&C Yellow No. 5 y E102). Sin embargo, este tipo de aditivo se ha restringido en diferentes países como Noruega, Austria, Suecia y Alemania (Bonciu *et al.*, 2018), ya que puede provocar efectos adversos y alterar los marcadores bioquímicos en el cerebro, daño a microvellosidades y permeabilidad intestinal debido al agotamiento crónico de zinc (Bhatt *et al.*, 2018). Por lo anterior, existen alternativas para contrarrestar dichas limitaciones mediante sistemas de administración basados en emulsiones, los cuales se dividen en macroemulsiones, microemulsiones o nanoemulsiones. Las nanoemulsiones se consideran cinéticamente estables, pero termodinámicamente inestables. Los métodos de producción de nanoemulsión pueden ser métodos de alta intensidad como dispositivos ultrasónicos, o métodos de baja intensidad como temperatura de inversión de fase (McClements & Jafari, 2018). Según Azmi *et al.* (2019), a mayor superficie del sistema de emulsión permite mejorar la absorción de activos o drogas a través de muchas rutas, además determina la entrega sostenida y selectiva.

Debido a lo anterior, con esta investigación se busca obtener una emulsión estable aceite en agua (O/W) a base de extractos de oleorresina de cúrcuma con alta capacidad antioxidante y retención de curcumina, con el fin de aplicarla en una bebida acuosa como alternativa al uso de colorantes sintéticos como la tartrazina.

MÉTODO

Los rizomas de cúrcuma se obtuvieron en el municipio de Palmira, Valle del Cauca (Colombia) (temperatura media $27,2 \pm 1,13$ °C, humedad relativa: $61,67 \pm 3,21$ %, altitud: 1001 msnm, latitud: $3^{\circ}31'48''$, longitud: $76^{\circ}81'13''$). Estos rizomas se cortaron en rodajas de 5 mm de espesor y se secaron a 40 °C hasta peso constante, obteniendo una humedad final de 14,38 % en base seca, posteriormente, se procesaron en un molino de martillos de acero inoxidable-calibre 14 (Didacontrol SAS) hasta un diámetro medio de partícula de 0,402 mm y se almacenaron en refrigeración (4 °C) en recipientes herméticos hasta su uso.

Materiales

Curcumina de síntesis 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona (Merck, ≥ 75 %). Curcumina estándar (Eastman Kodak Company, Rochester, Nueva York, 98,45 %). Aceite de soya, girasol y oliva obtenidos en el mercado local (Palmira, Colombia). Monooleato de sorbitán (Span 80, HLB=4,3); Monooleato de polioxietilensorbitano, o polisorbato 80 (Tween 80, HLB=15), se obtuvieron de Panreac. Alcohol etílico al 95 %, metanol absoluto, azida de sodio NaN_3 (Merck).

Extracción de oleorresina de cúrcuma (ORC)

La oleorresina de *Cúrcuma longa* (ORC) se obtuvo mediante la metodología presentada por Wakte *et al.* (2011) y Li *et al.* (2014) and both methods were better than continuous ultrasonic extraction of curcuminoids. For the pulsed ultrasonic-assisted extraction, the optimal conditions were 60% amplitude (AMP. La Cúrcuma deshidratada (6,4 % de humedad) se llevó a microondas (140 W por 1 min), luego se mezcló con solución de etanol:agua (40:60, relación sólido/solvente de 1:15 (g/mL)), y se sometió a extracción asistida por ultrasonido (Amplitud 45 % por 10 min con pulsos on:off (3:1), circulación de agua a 40 °C (Branson Digital Sonifier 450, USA). El extracto se filtró al vacío y se rotoevaporó (IKA RV8-S S99, Suiza) a una temperatura de 53 °C y una velocidad de 30 rpm, posteriormente se liofilizó (Labconco freezezone 6 plus, USA) a una presión de vacío de 0,120 mBar y una temperatura de -60 °C por 24 horas y se conservó en refrigeración (4 °C) hasta su uso.

Caracterización de oleorresina de cúrcuma (ORC)

La caracterización de ORC obtenida se realizó con la determinación de rendimiento, fenoles totales (TPC) (Singleton *et al.*, 1999), ensayo ABTS (ácido 2'2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico]) (Machado *et al.*, 2015) y contenido de curcumina (%C) (Syed *et al.*, 2015). El porcentaje de curcumina se obtuvo mediante la ecuación 1 reportada por Patil *et al.* (2018).

$$\%C = \frac{M_C}{M_M} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

%C: Porcentaje de curcumina.

M_C : Masa de la curcumina extraída (g).

M_M : Masa de la muestra en base seca (g).

Solubilidad de curcumina en aceites

La solubilidad de la curcumina se determinó utilizando método espectrofotométrico planteado por Ahmed *et al.* (2012) con modificaciones. Brevemente, se añadió curcumina en exceso en 20 mL de cada aceite a una temperatura de 80 °C por 10 min. La mezcla se sonicó (20 min) y se centrifugó (1750 rpm por 10 min). Las soluciones se mantuvieron a 25 °C por 24 h. Posteriormente, el sobrenadante fue diluido en aceite para lectura en el espectrofotómetro (Shimadzu UV 1800, Suiza). Se empleó una celda cero con aceite puro según el caso como referencia. Se calculó el contenido de curcumina utilizando una curva de calibración estándar para curcumina comercial en aceite de soya ($R^2 = 0,9835$, $\lambda = 418,8$ nm), girasol ($R^2 = 0,9978$, $\lambda = 418,2$ nm) y oliva ($R^2 = 0,9913$, $\lambda = 417,8$ nm). Para la oleorresina de cúrcuma (ORC) se obtuvo una curva de calibración con un $R^2 = 0,9867$, $\lambda = 417,8$ nm.

Formulaciones y preparación de nanoemulsiones

Preparación de la fase oleosa. Una vez se obtuvo el aceite en el cual la curcumina es más soluble, éste se calentó a 80 °C y se adicionaron 0,1890 mg ORC/g emulsión y el SPAN 80 agitando por un periodo de 1 hora.

Preparación de la fase acuosa. En paralelo con la fase oleosa, se preparó la fase acuosa, la cual acuosa contiene azida de sodio (N_3Na) como antimicrobiano, según lo reportado por Kharat *et al.* (2018). La fase acuosa se llevó a 80 °C y se adicionó Tween 80 hasta observar su completa dilución.

Preparación de nanoemulsiones. Posteriormente, se mezclaron las fases y se llevaron a homogenización (Ultraturrax IKA, T18 digital, Brasil) (14.000 rpm por 15 min). Esta mezcla se sometió a ultrasonido (Branson Digital Sonifier 450, USA) (Amplitud 40 %, 15 min, baño de circulación de agua a 12 °C), condiciones establecidas me-

dian­te pruebas pre­vias. Final­mente, las emul­siones se con­ser­va­ron a tem­pe­ra­tu­ra de re­fri­ge­ra­ción al­re­de­dor de 5 ± 1 °C hasta su apli­ca­ción. Para re­a­li­zar la emul­sión con­trol se re­a­li­zó el mis­mo pro­ce­di­mien­to, pe­ro re­em­pla­zan­do la oleorresina por curcu­mi­na co­mer­cial al 75 % (0,00191 mg de curcu­mi­na co­mer­cial/ g emul­sión).

Pruebas de caracterización de nanoemulsiones

Cuantificación de curcumina. El con­te­ni­do de curcu­mi­na en las nanoemul­siones se de­ter­mi­nó se­gún la me­to­do­lo­gía im­ple­men­ta­da por Syed *et al.* (2015), con mo­di­fi­ca­cio­nes. Se mez­cla­ron 0,5 g de emul­sión (p/p) en 25 mL de me­tanol, se ca­len­tó en ba­ño de agua a 60 °C hasta diso­lu­ción co­m­ple­ta (10 min), se a­gi­tó ma­nu­al­men­te (15 min) y se so­ni­có (15 min) (Branson 2510R-DTH, USA), lue­go de lo cual se cen­tri­fu­gó (4.000 rpm por 10 min). Para cuan­ti­fi­car la can­ti­dad de curcu­mi­na pre­sen­te se uti­li­zó la re­gre­sión lineal ($R^2 = 0,9989$), en tan­to que el con­te­ni­do de curcu­mi­na se ex­pre­só co­mo porcen­ta­je de re­ten­ción (%CR) me­diante ecua­ción 2 si­mi­lar a lo re­por­ta­do por Aditya *et al.* (2015) con mo­di­fi­ca­cio­nes.

$$\%CR = \frac{C_f}{C_i} * 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

C_i : Con­te­ni­do de curcu­mi­na in­ci­al en emul­sión ($\mu\text{g/mL}$).

C_f : Con­te­ni­do de curcu­mi­na ($\mu\text{g/mL}$) día final de aná­li­sis (día 15).

Fenoles Totales. Se de­ter­mi­nó el con­te­ni­do de fe­no­les (TPC) de acuer­do con lo re­por­ta­do por Wolfe *et al.* (2003). Se pre­pa­ró la curva de ca­li­bra­ción de ácido gálico ($R^2 = 0,9986$). Lue­go, se a­gre­ga­ron 60 μL de mues­tra a la con­cen­tra­ción a­de­cu­ada y 60 μL de RFC en to­dos los pozos, se­gui­do de 180 μL de diso­lu­ción de car­bo­na­to de so­dio, si­guien­do el pro­ce­so se lle­vó la mi­cro­pla­ca a in­cu­ba­ción 30 °C por 30 min, se lle­vó a vor­tex y se pro­ce­dió a leer las mues­tras a 750 nm en el lec­tor de mi­cro­pla­cas.

Tamaño de partícula y morfología de emulsiones (TEM). Las emul­siones se ca­rac­te­ri­za­ron por su ta­ma­ño y mor­fo­lo­gía tenien­do co­mo base el es­tudio re­a­li­za­do por Lu *et al.* (2018), me­diante el uso de mi­cro­scopio elec­tró­ni­co de tran­smi­sión (TEM) (JEOL, JEM 1011, To­ki­o, Ja­pón) (100 kV). Se se­có una mues­tra a tem­pe­ra­tu­ra am­biente por 24 h an­tes de ob­te­ner imá­ge­nes de las par­ti­cu­las ba­jo TEM, las cuales se an­a­li­za­ron con el soft­ware libre Image J (ver­sión 1.50i).

Estabilidad. La es­ta­bi­li­dad de las emul­siones fue de­ter­mi­na­da me­diante el pro­ce­di­mien­to pre­sen­ta­do por Sugu­mar *et al.* (2015). In­ci­al­men­te, se cen­tri­fu­gó para pro­bar la es­ta­bi­li­dad a 3.500 rpm du­ran­te 30 min y se e­vi­den­ció si ha­bía se­pa­ra­ción de fa­ses, se­gui­do de un cic­lo de ca­len­ta­mien­to-en­friamien­to a tem­pe­ra­tu­ras de 40 y 5 °C al­ter­na­ti­va­men­te, cada día du­ran­te 15 días.

Índice de cremado. El ín­di­ce de cre­ma­do (%IC) se mi­dió de acuer­do con la me­to­do­lo­gía re­por­ta­da por Aditya *et al.* (2015). Las emul­siones se al­ma­ce­na­ron en pro­be­tas de vi­drio a 4 ± 1 °C y 25 ± 2 °C. Las me­di­cio­nes se hi­cie­ron a in­ter­va­los de tie­mpo es­pe­cí­fi­cos (5, 10 y 15 días). El porcen­ta­je de cre­ma­do ex­pre­sa­do co­mo porcen­ta­je que per­ma­nece es­ta­ble se de­ter­mi­nó uti­li­zan­do la ecua­ción 3:

$$\%IC = \left(1 - \frac{h_c}{h_T}\right) * 100 \quad (\text{Ec.3})$$

Donde:

%IC: Porcentaje que permanece estable sin formación de crema.

h_c : Altura de cremado.

h_T : Altura total inicial.

Características fisicoquímicas de las emulsiones

Determinación de pH. El valor de pH de las emulsiones se midió por triplicado, usando un medidor de pH (Mettler Toledo, modelo FE20).

Determinación de color. Se determinaron las coordenadas de color de las emulsiones (b^*) con un colorímetro Konica Minolta (Chroma Meter CR-400, Japón). El equipo se calibró, posteriormente se colocó una muestra (10 mL) en una caja de Petri y se iluminó con luz diurna artificial D65 (2 ángulos estándar).

Obtención bebidas acuosas. Las bebidas se desarrollaron de acuerdo con la formulación planteada por Kim *et al.* (2014). Brevemente, sacarosa (7,5 % p/v), ácido cítrico (0,2 % p/v), ácido ascórbico (0,1 % p/v) y benzoato de sodio (0,05 % p/v) se añadieron al agua y se disolvieron completamente. Para aportar color a las bebidas se incorporaron las emulsiones preparadas con anterioridad a base de oleoresina (EORC) y curcumina comercial (ECC), ambas con una concentración de curcumina de 1,88 $\mu\text{g/mL}$. La bebida control (tartrazina) se preparó mediante incorporación de 5 mL de solución (60 $\mu\text{g/mL}$, dentro de la dosis permitida). Se utilizaron botellas de vidrio esterilizado para almacenar el sistema de bebidas fortificadas con curcumina bajo refrigeración (4 ± 1 °C).

Pruebas de evaluación en bebida acuosa

Contenido de curcumina. Se usó la metodología reportada por Aditya *et al.* (2015), con modificaciones. Para ello se tomaron 500 μL de bebida, se adicionaron 500 μL de metanol y se mezclaron completamente. Se usó un vortex (Boeco, V1 Plus) para romper la emulsión y solubilizar la curcumina, luego se centrifugó (16.000 x g por 40 min). El sobrenadante se diluyó adicionalmente con metanol según se requirió (200 μL de sobrenadante en 5 mL de metanol) y se cuantificaron utilizando espectrofotómetro UV vis y la curva de calibración para curcumina patrón ($R^2 = 0,9989$). Se expresó como porcentaje de retención de curcumina (%CR) como se hizo para emulsiones (Ecuación 2).

Turbidez. Las pruebas de turbidez se utilizaron para medir la formación de cristales de curcumina en sistemas acuosos usando un método espectrofotométrico reportado por Kharat *et al.* (2017). La turbidez en las bebidas se midió cada 24 horas, utilizando un espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-vis, China) a 600 nm, empleando una plancha de agitación (Thermo scientific SP131325Q) y un agitador magnético. La turbidez se calculó a partir de cada valor de absorbancia utilizando la ecuación 4:

$$T = 2,03 * \frac{Abs}{L_c} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

T: Turbidez (cm^{-1}).

Abs: Absorbancia.

L_c : Longitud del trayecto de la celda (cm).

Características fisicoquímicas de las bebidas. Las características fisicoquímicas se determinaron de igual manera que en las emulsiones.

Tamaño de partícula y morfología de curcumina en bebida (TEM). El tamaño de partícula se determinó con la misma metodología usada en emulsiones.

Análisis estadístico

Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se presentaron como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) utilizando el software InfoStat y prueba de Tukey a un nivel de significación del 5 %. Por otra parte, para analizar estadísticamente el comportamiento de los datos en el tiempo se usó un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA), donde los bloques fueron los días de estudio.

RESULTADOS

Caracterización oleorresina de cúrcuma (ORC)

El cuadro 1 muestra los resultados para la caracterización de la oleorresina de cúrcuma obtenidos mediante ultrasonido con un rendimiento del 20,303 %. Además, se obtuvo una concentración de Compuestos Fenólicos Totales (TPC) en la oleorresina de 2583,762 mg EAG/100 g harina. Vijayan *et al.* (2019) obtuvieron extractos de *Cúrcuma aromática* Salisb mediante fluidos supercríticos SCCO_2 (45 °C a 40 MPa por 60 min) con un valor de actividad antioxidante por ABTS de $64,2 \pm 1,2 \mu\text{mol TE/g}$ oleorresina, con isopropanol (20 % v/w) como solvente.

Se obtuvo un contenido de curcumina de 0,062 mg/mg oleorresina, lo cual es equivalente a 1,259 % de curcumina (Cuadro 1). Patil *et al.* (2018) reportaron contenido de curcumina obtenida por soxlhet con etanol a partir de tres variedades de *cúrcuma salem*, *Krishna*, *Rajapuri* con valores de 3,8, 2,5 y 4,2 % respectivamente.

Cuadro 1. Caracterización ORC.

Prueba	Resultado
Rendimiento (%)	20,303
Fenoles (mg EqAG/100 g muestra)	2583,762 \pm 40,488
ABTS ($\mu\text{mol TE/g}$ muestra)	2375,159 \pm 52,716
Contenido de curcumina (mg curcumina/mg oleorresina)	0,062 \pm 0,001

Solubilidad de curcumina comercial y oleorresina

En cuanto a la solubilidad, se encontró que la curcumina comercial es más soluble en aceite de oliva, seguido de soya y girasol con valores de $2,911 \pm 0,047$, $1,940 \pm 0,165$ y $1,519 \pm 0,024$ mg de curcumina/mL de aceite (mg/mL), por que se seleccionó el aceite de oliva como fase oleosa para las emulsiones. Para ORC, la solubilidad fue $2,289 \pm 0,004$ mg de oleorresina/mL aceite ($0,142 \pm 0,003$ mg curcumina /mL aceite).

Los resultados obtenidos mostraron que la solubilidad es alta en relación con la solubilidad de curcumina pura en agua reportada en otros estudios ($456 \mu\text{g/L}$) (Jakubek *et al.*, 2019). Además, la solubilidad obtenida en aceite de oliva tanto para CC como para el ORC es mayor a la reportada por Araiza-Calahorra *et al.* (2018) para curcumina aislada con un valor de $0,080$ mg/mL (60°C , 10 min), debido al coeficiente de partición relativamente alto de la curcumina-P entre 2,3 y 2,6 (medida de la preferencia de la fase lipídica sobre la fase acuosa en un sistema disolvente bifásico, inmiscible) (Jamwal, 2018).

Formulaciones y preparación de emulsiones

Las formulaciones obtenidas tanto para ECC como para EORC están compuestas por fase acuosa (FA) (84 %) y fase oleosa (FO) (16 %), la relación entre FA y FO fue de 5,25. La relación entre los surfactantes fue de 2,01 teniendo en cuenta sus balances hidrofóbicos (HLB): Tween 80= 15 y Span 80= 4,3. También se encontró que FO fue menor al 33 %, el uso de surfactantes fue menor al 32 % y el agua fue mayor al 50 %.

Pruebas de caracterización de emulsiones

El mayor porcentaje de CR de curcumina fue para ECC con un valor de 81,991 % con respecto a EORC (67,136 %). Esto se podría explicar debido a la influencia del pH (Cuadro 2), porque EORC tiene un pH inicial de 6,943 cercano a la neutralidad y esto puede ocasionar cambios en la estructura y estabilidad fisicoquímica de la curcumina (Kharat *et al.*, 2017); los mismos autores mencionan que la curcumina es relativamente estable en emulsiones acidas con porcentaje de CR entre 85 y 95 %, pero inestables en emulsiones alcalinas neutras con porcentajes de retención entre 53 y 62 % durante 30 días. Por su parte, Aditya *et al.* (2015) reportaron que la estabilidad de la curcumina en emulsiones fue 91 y 87 % después de 15 días de almacenamiento a 4 y 23°C , respectivamente, con un pH de $2,85 \pm 0,3$, por tanto su estabilidad es mayor. Además, los resultados de color (coordenada b^*), demuestran que las coordenadas presentaron cambios entre el día 1 y 15, especialmente EORC (Figura 1, cuadro 2) con un pH cercano a la neutralidad ($6,707 \pm 0,131$), lo que indicaría que se produjo una leve degradación química de la curcumina (Martínez-Guerra *et al.*, 2019). Kharat *et al.* (2018) analizaron color (coordenada b^*) en emulsiones O/W en función de surfactantes como caseinato de sodio, Tween 80, quillaja saponina y soluciones de goma arábica, bajo condiciones de pH neutro ($\text{pH} = 7,55^\circ\text{C}$, 15 días), donde se nota una disminución del color entre los días 1 y 15 similar al comportamiento que se ha obtenido en el presente estudio.

Cuadro 2. Resultados para EORC y ECC, día 1 y 15.

Emulsión (día)	pH	Color (b^*)
EORC (1)	$6,943 \pm 0,287^a$	$13,990 \pm 0,593^b$
EORC (15)	$6,740 \pm 0,114^c$	$13,690 \pm 0,470^d$
ECC (1)	$6,470 \pm 0,061^e$	$15,790 \pm 0,799^f$
ECC (15)	$6,457 \pm 0,035^e$	$15,010 \pm 0,179^h$

*letras diferentes evidencian diferencias significativas respecto al tipo de emulsión (EORC y ECC) y al tiempo (día 1 y 15).

Los resultados de porcentaje de CR se relacionan con los resultados obtenidos en TPC, para ECC pasó de 37,552 en el día 1 a 36,128 mg EAG/L en el día 15, valores ligeramente superiores a los obtenidos con EORC los cuales variaron de 35,830 a 35,466 mg EAG/L en el mismo tiempo. Además, los análisis ANOVA mostraron diferencias significativas entre el tipo de emulsión y entre los días 1 y 15.

Los resultados TPC obtenidos en las emulsiones (EORC y ECC) son inferiores a los obtenidos para ORC antes de su encapsulación, es decir, que es posible que las propiedades antioxidantes se hayan visto afectadas por las condiciones de emulsificación (ultrasonido y homogeneización) (Liu *et al.*, 2019). Sin embargo, más del 60 % de curcumina permaneció estable en ambos tipos de emulsión y, según Kumar *et al.* (2019), las fuerzas de cavitación creadas por el ultrasonido hacen que se produzca nanoemulsiones estables. Además, los resultados de estabilidad física en las emulsiones ECC y EORC en el periodo de estudio (15 días) permiten evidenciar que no se presentaron cambios importantes en cuanto a consistencia, debido a que las emulsiones se mantuvieron físicamente en fase homogénea (Figura 1), de color amarillo claro, sin formación de cremas, ni separación de fases después del almacenamiento, lo que demuestra que la curcumina en las emulsiones fue estable, esto se puede atribuir a que las nanoemulsiones a menudo tienen mejor estabilidad a la separación gravitacional, floculación y coalescencia que las emulsiones convencionales (Aswathanarayan & Vittal, 2019).

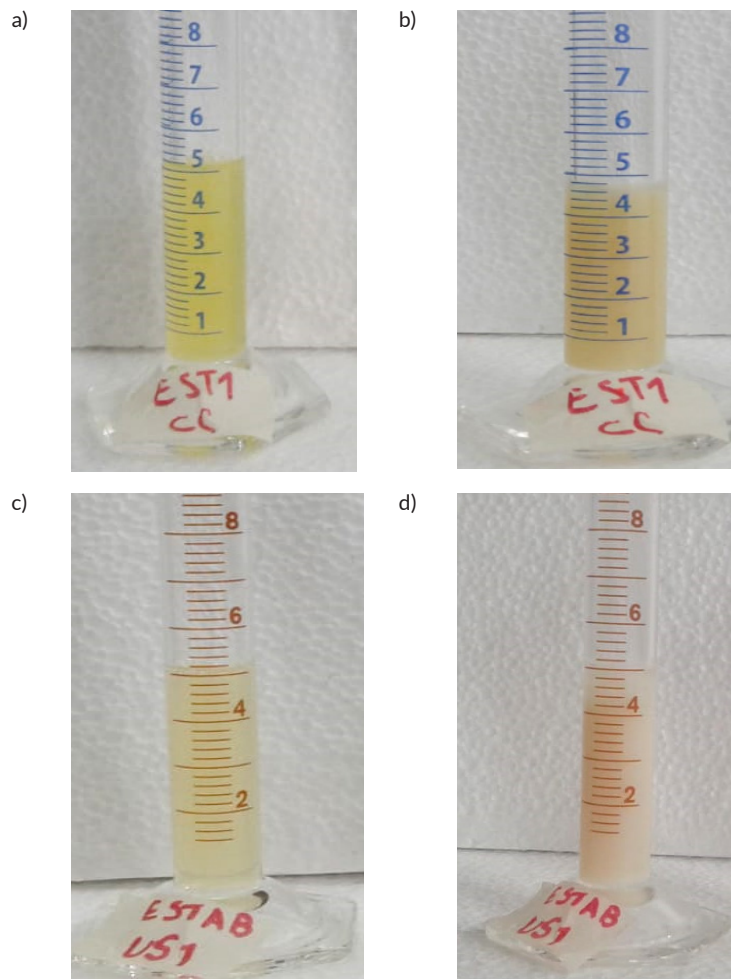


Figura 1. Estabilidad en emulsiones.

a) ECC día 1. b) ECC día 16. c) EORC día 1. d) EORC día 16

De acuerdo con la ANOVA, se encontró que los resultados de porcentaje de (%IC) para ECC a 4 y 25 °C no presentaron diferencias significativas ante los cambios de temperatura, contrario a EORC a 4 y 25 °C (Cuadro 3), aunque en lo relacionado con el tiempo ambas emulsiones presentaron diferencias significativas.

Cuadro 3. Resultados índices de cremado para EORC como ECC.

	EORC (4 °C)	EORC (25 °C)	ECC (4 °C)	ECC (25 °C)
1	100± 0,000 ^{aC}	100± 0,000 ^{bBC}	100± 0,000 ^{abC}	100± 0,000 ^{abC}
5	99,167± 0,722 ^{abc}	100± 0,000 ^{bBc}	100± 0,000 ^{abBC}	100± 0,000 ^{aBbC}
10	98,542± 0,361 ^{aB}	99,625± 0,722 ^{Bb}	99,583± 0,217 ^{abB}	99,292± 0,505 ^{abB}
15	97,5± 0,000 ^{aA}	98,333± 0,361 ^{bA}	97,917± 0,722 ^{abA}	97,292± 0,361 ^{a bA}

*letras minúsculas indican diferencias significativas respecto a los tratamientos EORC y ECC a 4 °C y 25 °C.

*Letras mayúsculas indican diferencias significativas respecto al tiempo (día 1 y 15).

La estabilidad de EORC y ECC fue mayor con relación a otros estudios. Por ejemplo, Aditya *et al.* (2015) desarrollaron emulsiones a base de aceite de soya, aceite de oliva, aceite de girasol y triglicéridos de cadena media (MCT) y encontraron que el índice de cremado (%IC) es mayor para las emulsiones a base de aceite de oliva y soja ya que alrededor de 90 % permaneció estable.

Tamaño de partícula de las emulsiones y morfología

Teniendo en cuenta los resultados y el ANOVA, existen diferencias entre el TP obtenido tanto para los tipos de emulsión como su cambio en el tiempo (Cuadro 4). En el caso de ECC el TP aumentó, el cual puede estar relacionado con la maduración de Ostwald (Liu *et al.*, 2019), sin embargo, es importante mencionar que en este estudio se encontraron nanoemulsiones (10-100 nm) que tienen una estabilidad mucho mejor a la agregación en comparación con la de las emulsiones convencionales, debido a su tamaño de gota muy pequeño (Liu *et al.*, 2019). En otros estudios, Lu *et al.*, (2018) obtuvieron una nanoemulsión almacenada por 6 meses a 4 y 25 °C, con un TP de 12,4±0,5 nm y 16,7±0,6 nm respectivamente, lo que es comparable con los resultados obtenidos para ECC con TP entre 7,083 y 13,847 nm entre el día 1 y día 15 respectivamente.

Cuadro 4. Resultados bebida a base de EORC como ECC y bebida control (día 1 y 15).

Prueba	EORC		ECC		Tartrazina (Control)	
	Día 1	Día 15	Día 1	Día 15	Día 1	Día 15
%CR	-	80,014 ^a	-	20,048 ^b	-	-
Turbidez (cm ⁻¹)	0,379±0,001 ^a	0,456±0,001 ^a	0,075±0,002 ^b	0,127±0,001 ^b	0,020±0,001 ^b	0,021±0,001 ^b
TP(nm)	22,355 ^a	5,732 ^b	41,028 ^c	5,309 ^d	-	-
pH	3,033±0,006 ^a	3,043±0,006 ^a	2,943±0,006 ^b	2,920±0,000 ^b	2,903±0,006 ^b	2,883±0,006 ^b
Color (b*)	13,373±0,650 ^a	12,987±0,506 ^c	6,113±0,250 ^b	5,850±0,229 ^d	4,517±0,257 ^c	4,133±0,121 ^e

*letras diferentes evidencian diferencias significativas respecto al tipo de bebida y al tiempo (día 1 y 15).

*letras iguales no evidencian diferencias significativas respecto al tipo de bebida y al tiempo (día 1 y 15).

En cuanto a la morfología en emulsiones (Figura 2), las nanoemulsiones presentan forma esférica con glóbulos relativamente uniformes, sin formación de agregados. Sin embargo, EORC en el día 1 presenta forma esférica pero con ciertos bordes irregulares como estructuras dentadas en su superficie, similar a los reportado por Ghayour *et al.* (2019) quienes nanoencapsularon curcumina y quercetina en nanoestructuras micelares o las nanopartículas de caseína.

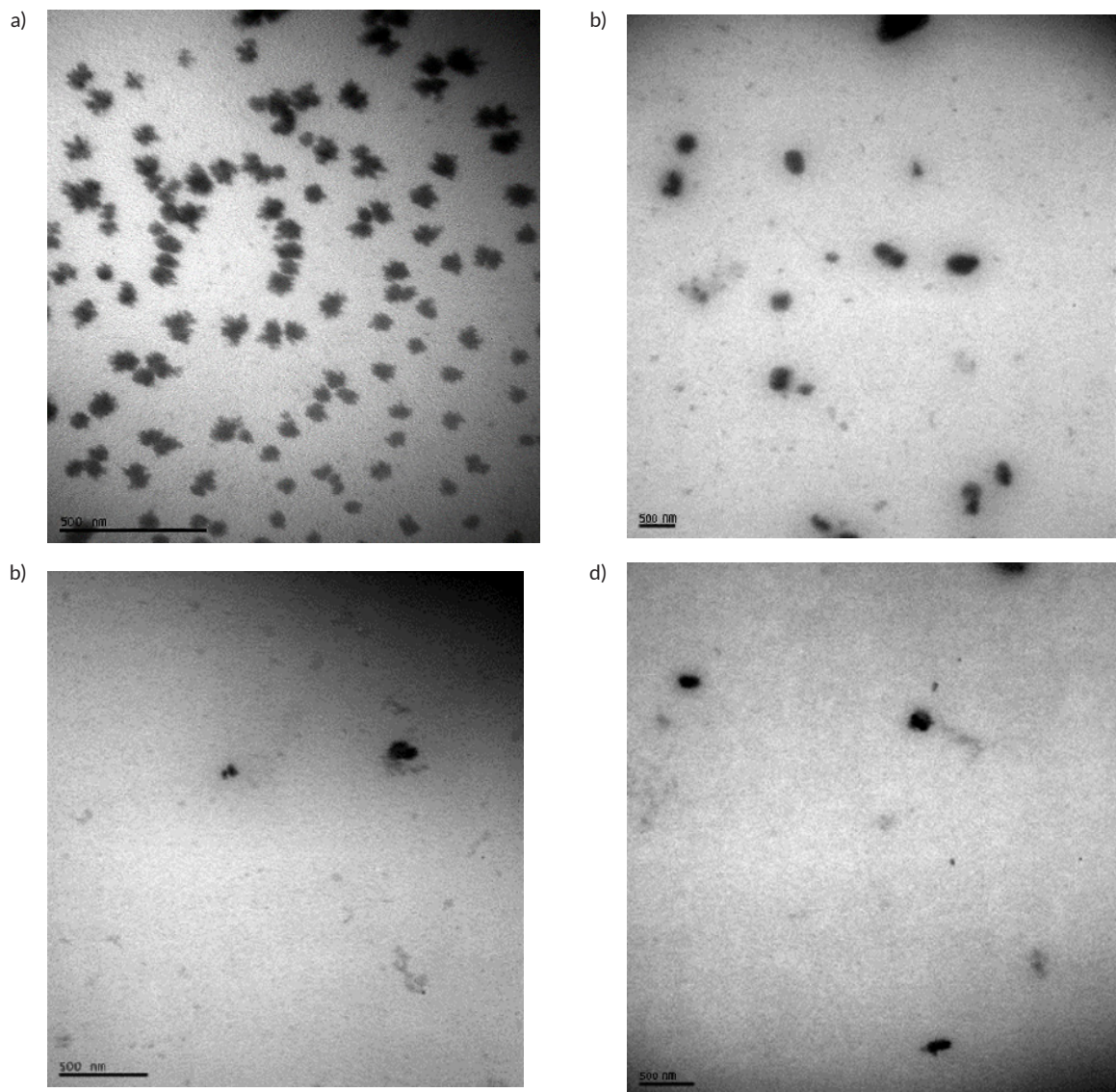


Figura 2. Tamaño de partícula en emulsiones.

a) EORC día 1 b) EORC día 15 c) ECC día 1 d) ECC día 15 obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) (escala: 500 nm).

Pruebas de evaluación en bebida acuosa

Según los análisis estadísticos ANOVA, se observa que hay diferencias significativas entre los tipos de bebida y el tiempo de análisis. La bebida con EORC presentó mayor porcentaje de %CR que la bebida con ECC con valores de 80,014 y 20,048 % respectivamente (Cuadro 4). EORC presentó resultados superiores a los reportados por Aditya *et al.* (2015), quienes obtuvieron una estabilidad de la curcumina en la bebida alrededor del 40 %. Sin embargo, para la bebida con ECC se puede afirmar que hubo una degradación de curcumina en el tiempo, lo cual va acorde con resultados anteriores que han mostrado una degradación hidrolítica de la curcumina en la fase acuosa bajo condiciones de pH ácidos (Cuadro 4) (Wang *et al.*, 2019), además de la posible degradación de curcumina por cristalización en medio ácido (Kharat *et al.*, 2017), acorde con la disminución de color (Cuadro 4, Figura 3).

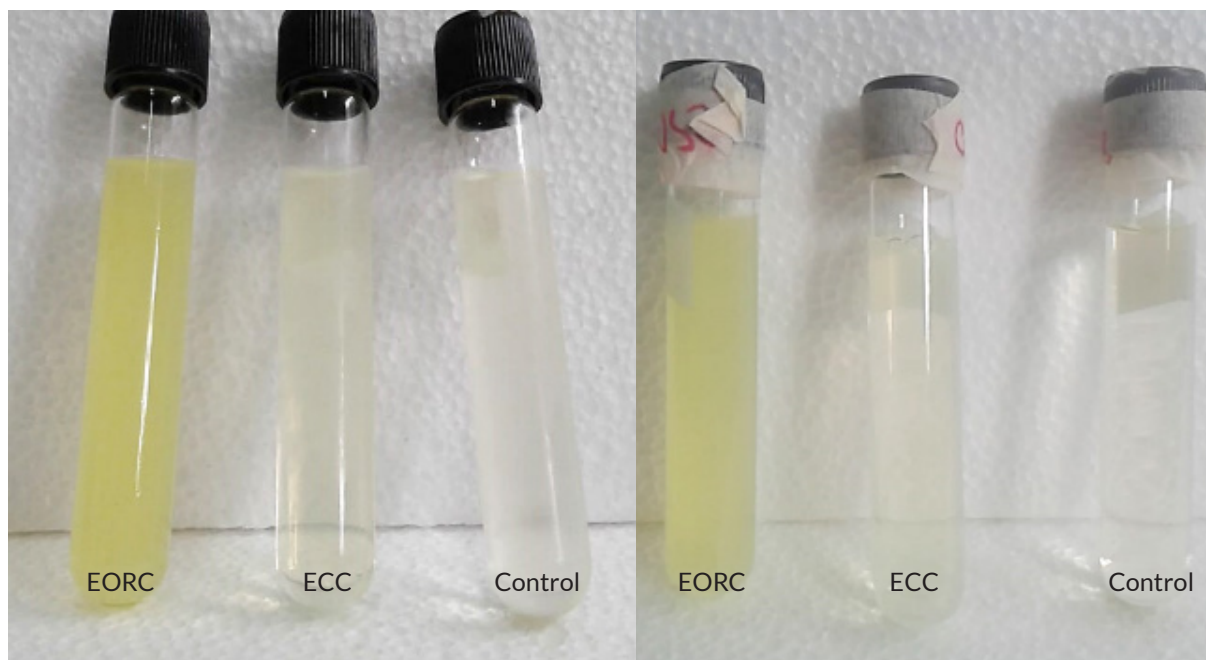


Figura 3. Estabilidad física de bebidas en el tiempo (EORC y ECC) y al tiempo (día 1 y 15).

a) Bebidas EORC, ECC y tartrazina (Control) día 1 b) bebidas EORC, ECC y tartrazina (Control) día 15.

En otros estudios, Kharat *et al.* (2017) analizaron curcumina en bebidas acuosas y encontraron que la muestra comercial de curcumina ($\geq 65\%$), que en realidad consistía en una mezcla de curcuminoides, parecía tener una mejor estabilidad a pH 7 que la muestra de curcumina pura. Este resultado es acorde con estudios previos realizados por Gordon *et al.* (2015), quienes mencionan que la lenta degradación del extracto de cúrcuma en relación con la curcumina pura sugirió diferentes tasas de degradación para los curcuminoides en la mezcla de extracto en comparación con los compuestos puros, lo cual confiere mayor estabilidad de la curcumina en extracto ante el pH fisiológico, similar a lo encontrado en el presente estudio, teniendo en cuenta que se usó oleorresina de *Cúrcuma longa*, la cual contiene carbohidratos, curcuminoides, aceites esenciales, ácidos grasos, entre otros, en comparación a CC, la cual está compuesta por curcumina $\geq 75\%$, bisdemetoxicurcumina $\leq 5\%$ y demetoxicurcumina $\leq 20\%$, mediante análisis HPLC (Merck, 2019).

Por otra parte, analizando los resultados de turbidez como una medida de estabilidad física, muestran que no existen diferencias significativas entre la bebida con ECC y tartrazina, pero sí hay diferencias con la bebida con EORC y en el tiempo para los tres tipos de bebida (Cuadro 4), siendo más turbia la bebida con EORC. En todos los casos se presenta un aumento de la turbidez con el tiempo (Figura 4), es decir que la curcumina es estable químicamente pero susceptible a formación de cristales y, por tanto, incremento en la turbidez (Kharat *et al.*, 2017). Además, la bebida con EORC posee diferentes curcuminoides ya que no se realizó purificación y, por tanto, estos tienen diferentes estabilidades según el pH, lo cual es importante entender y analizar con mayor profundidad para tomar decisiones durante el proceso de desarrollo de sistemas de entrega efectivos para este componente bioactivo.

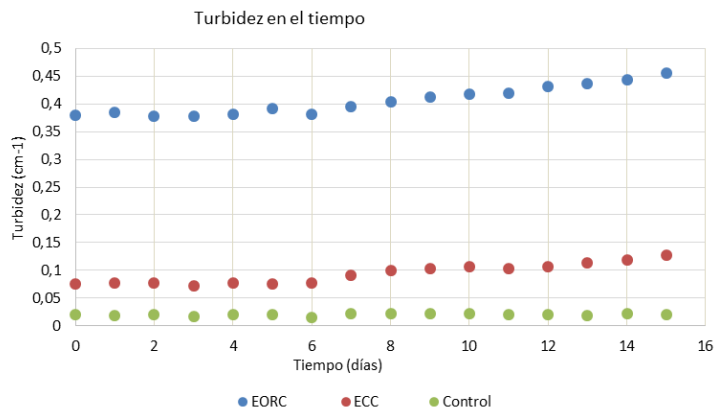


Figura 4. Turbidez en el tiempo para los tres tipos de bebida.

Tamaño de partícula y morfología de curcumina en bebida (TEM)

En cuanto a los resultados de TP obtenidos para las bebidas en estudio (Cuadro 4), se puede encontrar que a menor TP, la turbidez aumenta y, en el caso de la bebida con EORC, el TP inicial es la mitad en comparación a la bebida con ECC por tanto su turbidez es mayor, debido a que estas partículas dispersan la luz de manera más efectiva (Kharat *et al.*, 2017). Para la bebida con EORC se obtiene una disminución del TP de 22,355 nm a 5,732 nm y para la bebida con ECC de 41,028 nm a 5,309 nm.

En cuanto a la morfología en bebidas, se evidencia mediante imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 5) que las partículas presentan forma esférica con glóbulos relativamente uniformes, sin formación de agregados, con bordes lisos tal como se observó para las emulsiones, pero en este caso las partículas son dispersas en cuanto a cantidad por área.

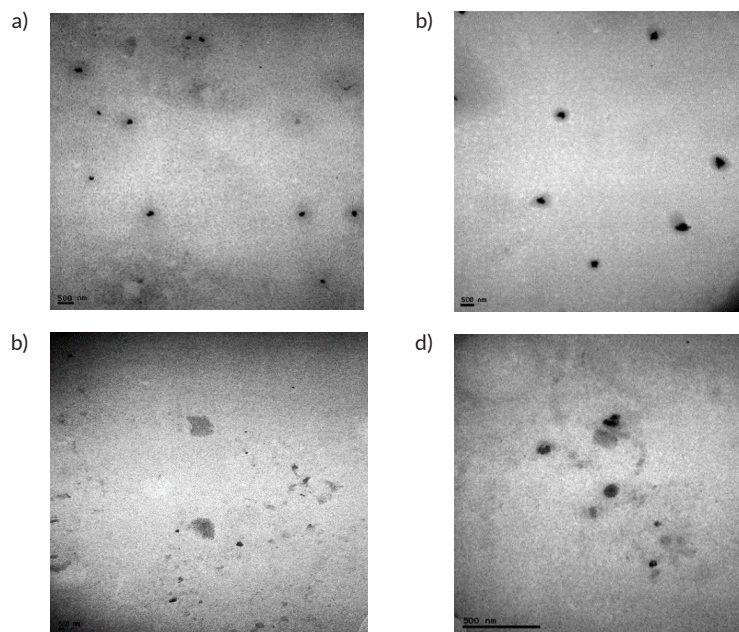


Figura 5. Tamaño de partícula en bebidas a) EORC día 1 b) EORC día 15 c) ECC día 1 d) ECC día 15 obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) (escala: 500 nm).

CONCLUSIONES

La solubilidad de curcumina comercial fue mayor en el aceite de oliva, seguido de soya y girasol con valores de $2,911 \pm 0,047$, $1,940 \pm 0,165$ y $1,519 \pm 0,024$ mg de curcumina/mL de aceite, respectivamente. La solubilidad para oleorresina fue de $0,142 \pm 0,003$ mg curcumina /mL aceite.

Se obtuvieron nanoemulsiones O/W a partir de ORC y CC estables durante 15 días con TP de 10,201 y 13,847 nm y porcentaje de CR de 67,136 y 81,991 % respectivamente. La actividad antioxidante para EORC y ECC el día 1 fue de 35,830 y 37,552 mg EAG/L de emulsión respectivamente, lo cual tuvo una leve disminución en el día 15 con valores de 35,466 y 36,128 mg EAG/L de emulsión para EORC y ECC respectivamente, por lo tanto, ECC presentó mejores características que EORC.

La bebida con EORC presentó mejor resultado principalmente con relación al porcentaje de CR con un valor de 80,014 % respecto a la bebida con ECC y una diferencia de color con coordenadas *b de $13,373 \pm 0,650$ y $12,987 \pm 0,506$ entre los días 1 y 15. Sin embargo, la bebida EORC tuvo mayor turbidez posiblemente debido al bajo TP inicial con un valor de 22,355 nm aproximadamente la mitad en comparación a la bebida con ECC.

Se concluye que la emulsión a base de EORC tiene potencial de aplicación como colorante en bebidas acuosas conservando su capacidad antioxidante.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del proyecto HERMES (código 42119), al Laboratorio de Microscopía Electrónica & al Laboratorio de Tecnología de Leches

REFERENCIAS

- ADITYA, N.P.; ADITYA, S.; YANG, H.J.; KIM, H.W.; PARK, S.O.; LEE, J.; KO, S. Curcumin and Catechin Co-Loaded Water-in-Oil-in-Water Emulsion and Its Beverage Application. *Journal of Functional Foods*, v. 15, 2015, p. 35–43.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.013>
- AHMED, K.; LI, Y.; MCCLEMENTS, D.J.; XIAO, H. Nanoemulsion- and Emulsion-Based Delivery Systems for Curcumin: Encapsulation and Release Properties. *Food Chemistry*, v. 132, n. 2, 2012, p. 799–807.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.039>
- ARAIZA-CALAHORRA, A.; AKHTAR, M.; SARKAR, A. Recent Advances in Emulsion-Based Delivery Approaches for Curcumin: From Encapsulation to Bioaccessibility. *Trends in Food Science and Technology*, v. 71, 2018, p. 155–169.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.009>
- ASWATHANARAYAN, J.B.; VITTAL, R.R. Nanoemulsions and Their Potential Applications in Food Industry. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 3, 2019, p. 1–21.
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00095>
- AZMI, N.A.N.; ELGHARBAWY, A.A.M.; MOTLAGH, S.R.; SAMSUDIN, N.; SALLEH, H.M. Nanoemulsions: Factory for Food, Pharmaceutical and Cosmetics. *Processes*, v. 7, n. 9 2019, p. 617.
<https://doi.org/10.3390/pr7090617>
- BAGHERI, H.; GHASEMI, F.; BARRETO, G.E.; RAFIEE, R.; SATHYAPALAN, T.; SAHEBKAR, A. Effects of Curcumin on Mitochondria in Neurodegenerative Diseases. *BioFactors*, v. 46, n. 1, 2020, p. 5–20.
<https://doi.org/10.1002/biof.1566>

- BHATT, D.; VYAS, K.; SINGH, S.; JOHN, P.J.; SONI, I. Tartrazine Induced Neurobiochemical Alterations in Rat Brain Sub-Regions. *Food and Chemical Toxicology*, v. 113, 2018, p. 322–327.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.011>
- BONCIU, E.; ROSCULETE, E.; ROSCULETE, C.A. The clastogenic effect of tartrazine, a synthetic yellow dye, in plant meristematic tissues. *Annals of the University of Craiova–Agriculture, Montanology, Cadastre Series*, v. 49, 2019.
<http://anale.agro-craiova.ro/index.php/aamc/article/view/876>
- DANAFAR, H.; SHARAFI, A.; KHEIRI, S.; MANJILI, H.K. CoDelivery of Sulforaphane and Curcumin with Pegylated Iron Oxide-Gold Core Shell Nanoparticles for Delivery to Breast Cancer Cell Line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v. 17, n. 2, 2018, p. 480–494.
<https://doi.org/10.2g2037/ijpr.2018.2239>
- GHAYOUR, N.; HOSSEINI, S.M.H.; ESKANDARI, M.H.; ESTEGHLAL, S.; NEKOEI, A.R.; HASHEMI-GAHRUIE, H.; TATAR, M.; NAGHIBALHOSSAINI, F. Nanoencapsulation of Quercetin and Curcumin in Casein-Based Delivery Systems. *Food Hydrocolloids*, v. 87, 2019, p. 394–403.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.031>
- GORDON, O.N.; LUIS, P.B.; ASHLEY, R.E.; OSHEROFF, N.; SCHNEIDER, C. Oxidative Transformation of Demethoxy and Bisdemethoxycurcumin: Products, Mechanism of Formation, and Poisoning of Human Topoisomerase II α . *Chemical Research in Toxicology*, v. 28, n. 5, 2015, p. 989–996.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00009>
- GRANATO, D.; BARBA, F.J.; KOVAČEVIĆ, D.B.; LORENZO, J.M.; CRUZ, A.G.; PUTNIK, P. Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 11, n.1, 2020, p. 93–118.
<https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>
- JAKUBEK, M.; KEJÍK, Z.; KAPLÁNEK, R.; HROMÁDKA, R.; ŠANDRIKOVÁ, V.; SÝKORA, D.; ANTONYOVÁ, V.; URBAN, M.; DYTRYCH, P.; MIKULA, I.; MARTÁSEK, P.; KRÁL, V. Strategy for Improved Therapeutic Efficiency of Curcumin in the Treatment of Gastric Cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 118, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109278>
- JAMWAL, R. Bioavailable Curcumin Formulations: A Review of Pharmacokinetic Studies in Healthy Volunteers. *Journal of Integrative Medicine*, v. 16, n. 6, 2018, p. 367–374.
<https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.07.001>
- KHARAT, M.; DU, Z.; ZHANG, G.; MCCLEMENTS, D.J. Physical and Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of PH, Temperature, and Molecular Environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, n. 8, 2017, p. 1525–1532.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04815>
- KHARAT, M.; ZHANG, G.; MCCLEMENTS, D.J. Stability of Curcumin in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Emulsifier Type and Concentration on Chemical Degradation. *Food Research International*, v. 111, 2018, p. 178–186.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.021>
- KIM, S.O.; HA, T.V.A.; CHOI, Y.J.; KO, S. Optimization of Homogenization-Evaporation Process for Lycopene Nanoemulsion Production and Its Beverage Applications. *Journal of Food Science*, v. 79, n. 8, 2014, p. 12–14.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12472>
- KUMAR, M.; BISHNOI, R.S.; SHUKLA, A.K.; JAIN, C.P. Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. *Preventive Nutrition and Food Science*, v. 24, n. 3, 2019, p. 225–234.
<https://doi.org/10.3746/pnf.2019.24.3.225>
- LI, M.; NGADI, M.O.; MA, Y. Optimization of Pulsed Ultrasonic and Microwave-Assisted Extraction for Curcuminoids by Response Surface Methodology and Kinetic Study. *Food Chemistry*, v. 165, 2014, p. 29–34.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.115>
- LIU, Q.; HUANG, H.; CHEN, H.; LIN, J.; WANG, Q. Food-Grade Nanoemulsions: Preparation, Stability and Application in Encapsulation of Bioactive Compounds. *Molecules*, v. 24, n. 23, 2019, p. 1–37.
<https://doi.org/10.3390/molecules24234242>

- LU, P.S.; INBARAJ, B.S.; CHEN, B.H. Determination of Oral Bioavailability of Curcuminoid Dispersions and Nanoemulsions Prepared from *Curcuma longa* Linnaeus. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 98, n. 1, 2018, p. 51–63.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.8437>
- MACHADO, A.P.D.F.; PASQUEL-REÁTEGUI, J.L.; BARBERO, G.F.; MARTÍNEZ, J. Pressurized Liquid Extraction of Bioactive Compounds from Blackberry (*Rubus Fruticosus* L.) Residues: A Comparison with Conventional Methods. *Food Research International*, v. 77, 2015, p. 675–683.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.042>
- MARTÍNEZ-GUERRA, J.; PALOMAR-PARDAVÉ, M.; ROMERO-ROMO, M.; CORONA-AVENDAÑO, S.; ROJAS-HERNÁNDEZ, A.; RAMÍREZ-SILVA, M.T. New Insights on the Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Media at Different PH: Influence of the Experimental Conditions. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 14, n. 6, 2019, p. 5373–5385.
<https://doi.org/10.20964/2019.06.24>
- MC CLEMENTS, D.J.; JAFARI, S.M. General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation. *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization*, 2018, p. 3–20.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00001-1>
- PATIL, S.; RANVEER, R.C.; DEBAJE, P.P.; KADAM, J.H.; SAHOO, A.K. Ultrasound Assisted Extraction of Curcumin. *Asian J. Dairy & Food Res*, v. 37, n. 3, 2018, p. 250–252.
<https://doi.org/10.18805/ajdfr.DR-1356>
- PATIL, S.S.; BHASARKAR, S.; RATHOD, V.K. Extraction of Curcuminoids from *Curcuma longa*: Comparative Study between Batch Extraction and Novel Three Phase Partitioning. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 49, n. 4, 2019, p. 407–418.
<https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1575859>
- SANDEEP, I.S.; DAS, S.; NAYAK, S.; MOHANTY, S. Chemometric Profile of *Curcuma longa* L. Towards Standardization of Factors for High Essential Oil Yield and Quality. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B–Biological Sciences*, v. 88, n. 3, 2018, p. 949–957.
<https://doi.org/10.1007/s40011-016-0831-y>
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, v. 299, 1999, p. 152–178.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- SUGUMAR, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Nanoemulsion Formation and Characterization by Spontaneous Emulsification: Investigation of Its Antibacterial Effects on *Listeria monocytogenes*. *Asian Journal of Pharmaceutics*, v. 9, n. 1, 2015, p. 23.
<https://doi.org/10.4103/0973-8398.150033>
- SYED, H.K.; LIEW, BIN; LOH, G.O.K.; PEH, K.K. Stability Indicating HPLC-UV Method for Detection of Curcumin in *Curcuma longa* Extract and Emulsion Formulation. *Food Chemistry*, v. 170, 2015, p. 321–326.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.066>
- VIJAYAN, U.K.; VARAKUMAR, S.; SINGHAL, R.S. A Comparative Account of Extraction of Oleoresin from *Curcuma Aromatica* Salisb by Solvent and Supercritical Carbon Dioxide: Characterization and Bioactivities. *LWT*, v. 116, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108564>
- WAKTE, P.S.; SACHIN, B.S.; PATIL, A.A.; MOHATO, D.M.; BAND, T.H.; SHINDE, D.B. Optimization of Microwave, Ultra-Sonic and Supercritical Carbon Dioxide Assisted Extraction Techniques for Curcumin from *Curcuma longa*. *Separation and Purification Technology*, v. 79, n. 1, 2011, p. 50–55.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.03.010>
- WANG, L.; LU, N.; ZHAO, L.; QI, C.; ZHANG, W.; DONG, J.; HOU, X. Characterization of Stress Degradation Products of Curcumin and Its Two Derivatives by UPLC–DAD–MS/MS. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 12, n. 8, 2019, p. 3998–4005.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.02.003>
- WOLFE, K.; Wu, X.; Liu, R. H. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 3, 2003, p. 609–614. <https://doi.org/10.1021/jf020782a>

Propóleos de Nariño: Propiedades fisicoquímicas y actividad biológica*

Propolis from Nariño: Physicochemical properties and biological activity of Propolis

SALAMANCA-GROSSO, GUILLERMO¹; OSORIO-TANGARIFE, MÓNICA-PATRICIA²;
CABRERA-MONCAYO, JESUS ANTONIO³

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 17 febrero 2021.

Aprobado para publicación: 12 Noviembre 2021.

* Título del proyecto de origen: "Identificación de marcadores moleculares en propóleos colombianos mediante espectrometría de masas con ionización electrospray y valoración de sus propiedades fisicoquímicas". Financiación: Oficina de Investigaciones y Desarrollo Científico a través de la Coordinación General EOCYT- P 410120516, 2018.

- 1 Universidad del Tolima, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Grupo de Investigaciones Mellitopalinológicas y Propiedades Fisicoquímicas de Alimentos (GIMELLIFISTO). Ph.D. Ciencias Químicas. Ibagué, Colombia. <http://orcid.org/0000-0001-8947-7574>.
- 2 Universidad del Tolima, Grupo de investigaciones Mellitopalinológicas y Propiedades Fisicoquímicas de Alimentos (GIMELLIFISTO). Msc. Microbiología Tropical. Ibagué, Colombia. <http://orcid.org/0000-0003-4176-7550>.
- 3 Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Ph.D Ciencias Biomédicas. Pasto, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-5968-226X>

Correspondencia: gsalaman@ut.edu.co

Cómo citar este artículo: SALAMANCA-GROSSO, GUILLERMO ; OSORIO-TANGARIFE, MÓNICA-PATRICIA; CABRERA-MONCAYO JESUS ANTONIO. Propóleos de Nariño: Propiedades fisicoquímicas y actividad biológica. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 20, n. 1, 2022, p. 152-164. Doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1863>

RESUMEN

El propóleo, es un producto natural de consistencia resinosa y cauchosa elaborado por las abejas a partir de exudaciones de plantas. En este trabajo se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas, atributos sensoriales y actividad biológica de extractos etanólicos de propóleo de tres diferentes zonas biogeográficas del departamento de Nariño. Muestras de propóleo crudo beneficiados de cada región fueron comparadas, y sus extractos alcohólicos fueron evaluados a través de métodos de separación y técnicas de espectroscopía. La actividad biológica fue evaluada usando cepas bacterianas de Staphylococcus aureus y Escherichia coli. Los análisis cromatográficos revelaron la presencia de metabolitos secundarios con actividad biológica frente a las bacterias estudiadas. Los espectros de infrarrojo y los cromatogramas, exhibieron diferencias entre las muestras, identificados como tipo -O y -B. La fracción fenólica, presentó diferencias significativas para flavonas y flavonoles. Los índices de oxidación fueron inferiores a 5 segundos. En relación a los extractos etanólicos evaluados, éstos mostraron una mayor sensibilidad sobre S. aureus en la técnica de Kirby-Bauer. La investigación realizada aporta al estudio y caracterización de propóleos de esta zona colombiana, ampliando el conocimiento sobre productos de origen natural.

ABSTRACT

Propolis is natural product processed by honey bees from plant exudations with a resinous and rubber-like consistency. This work examines the physicochemical properties, sensory attributes, and biological activity of propolis ethanol extracts from three different biogeographic zones in department of Nariño, Colombia. Samples of raw propolis obtained from each area were compared, and their alcoholic extracts studied through separation methods and spectroscopic techniques. Biological activity was evaluated using Staphylococcus aureus and Escherichia coli strains. Chromatographic analysis revealed the presence of secondary metabolites with potential biological activity. Infrared spectrum and chromatograms displayed differences between group samples, identified as type -O and -B. Phenolic fraction exhibited significant variations on flavones and flavanols. Oxidation rates were lower than 5 seconds. Evaluated ethanolic extracts exposed greater sensitivity to S. aureus under the Kirby-Bauer technique. Present research contributes towards expanding knowledge about natural-origin products like propolis on such Colombian regions.

INTRODUCCIÓN

El propóleo es reconocido en todo el mundo, ha sido registrado en el Chemical Abstracts Service (CAS) 9009-62-5, como un producto natural elaborado por distintos géneros de abejas, a partir de exudaciones mucilaginosas, gomas, materiales lipofílicos, látex y material resinoso de plantas, que traen a sus colmena y mezclan con secreciones glandulares de la hipofaringe y glándulas cereras. Son de consistencia pastosa, con

PALABRAS CLAVE:

Actividad biológica; Fenoles y flavonoides; Propóleos colombianos; Propiedades fisicoquímicas; HPTLC; LC-ESI(-)-MS/MS.

KEYWORDS:

Biological activity; Phenols and flavonoids; Colombian propolis; Physicochemical properties; HPTLC; LC-ESI(-)-MS/MS.

tonalidades castaño, marrón, pardo, rojizo y verde, según el origen botánico y geográfico (Anjum *et al.*, 2019; El-Guendouz *et al.*, 2019). Estos productos han llamado la atención en relación a la salud de las abejas y se ha determinado su papel como protector, antiséptico de la colmena y responsable de la salud e inmunidad frente a los agentes infecciosos (Ciftci-Yilmaz *et al.*, 2017; Anjum *et al.*, 2019). En las regiones tropicales, las abejas encuentran diversas fuentes de elaboración, por tanto, su composición química es diferente y variable debido a la riqueza y diversidad de la flora tropical. Existen en la literatura reportes de un sinnúmero de propiedades biológicas sobre los propóleos que actúan como antitumorales, antiprotozoarios, anticancer (Sforzin, 2016; Omar *et al.*, 2017), antihipertensivos, antimicrobianas, antiinflamatorias, antihepatotóxicos y antivirales, entre otras (Veiga *et al.*, 2017; El-Guendouz *et al.*, 2019; Touzani *et al.*, 2019).

Los componentes químicos de los propóleos varían de acuerdo a las fuentes botánicas y a las áreas biogeográficas donde están instaladas las colmenas. Los métodos instrumentales de análisis, actualmente han permitido identificar en matrices de propóleos alrededor de 350 compuestos fitoquímicos (Guzelmeric *et al.*, 2018; Touzani *et al.*, 2019). Considerando la demanda de este tipo de productos, es indispensable establecer los parámetros para identificar el control de calidad de los propóleos de las regiones. El advenimiento y desarrollo de los métodos cromatográficos de análisis han posibilitado el estudio y cuantificación de principios activos presentes en distintas matrices de propóleos (Ahmed *et al.*, 2017; Drescher *et al.*, 2017).

La actividad antibacteriana es la más estudiada, se conoce el efecto de extractos etanólicos de propóleos frente *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *S. saprophyticus*, *E. faecalis* (Zainullin *et al.*, 2018; Seibert *et al.*, 2019; Przybyłek *et al.*, 2019; Veloz *et al.*, 2019). En Colombia, las investigaciones realizadas sobre actividad biológica *in vitro* de propóleos han sido reportadas desde la región Andina, Boyacá, Caldas, Cundinamarca y Santander (Bastos *et al.*, 2011; Talero *et al.*, 2012; Herrera *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2012; Velásquez y Montenegro, 2017). Esta actividad frente a patógenos ha sido atribuida a la presencia terpenos, flavonoides y antraquinonas, principalmente.

La producción de propóleos en Colombia ha sido relacionada desde diversas zonas biogeográficas. Algunos trabajos sobre caracterización y cuantificación en muestras de Arauca, Boyacá y San Andrés (Salamanca y Osorio, 2018) y sobre el perfil mineral de muestras de propóleos del Tolima (Salamanca *et al.*, 2004). Adicionalmente, se han reportado trabajos sobre actividad antioxidante de propóleos colectados en Atlántico y Santander (Rodríguez *et al.*, 2012; Herrera *et al.*, 2012). La concepción de propóleos más actualizada entorno a su control de calidad, consiste en la determinación de sus propiedades fisicoquímicas y la estimación de su actividad biológica. En este contexto, el objetivo de este trabajo se ha centrado en el estudio de las propiedades fisicoquímicas, perfilación organoléptica, estimación de componentes minerales, así como la actividad biológica de muestras de propóleos colectados en tres zonas de biogeográficas de Nariño.

MÉTODO

Reactivos

Todos los reactivos usados en este trabajo fueron de grado analítico: etanol, metanol, acetato de etilo, ácido fórmico y tolueno (Sigma Aldrich de Steinheim, Germany), aminoetildifenilborinato (Fluka Steinheim, Germany), polientilenglicol, ácido sulfúrico, hidróxido de potasio (Merck, Hohenbrunn, Germany), patrones de pinocembrina, galangina, pinobanksina, naringenina, ácido cafeico, crisina, quercetina y apigenina (Sigma-Aldrich) y 2,4 dinitrofenilhidrazina (2,4D) (Merck, Alemania).

Muestras

Se colectaron nueve muestras de propóleos de tres zonas biogeográficas diferentes, bosque húmedo montano bajo (*bh-MB*), muy húmedo premontano (*bh-PM*) y muy húmedo premontano (*bmh-PM*), para las localidades de Buesaco (1°23'05"N y 77°09'23"O, 1959 msnm, 18 °C, 1472 mm/año), San Juan de Pasto/Catambuco, Vereda Botana, (Pasto, 1°12'49"N y 77°16'52"O, 2534 msnm, 13 °C, 1273 mm/año) y La Unión (1°36'19"N, 77°07'47"N, 1726 msnm, 19 °C). Las colectas se realizaron siguiendo criterios de aleatoriedad, con tres niveles de tratamiento y tres repeticiones. La toma de muestras fue realizada usando raspado directamente desde el interior de las colmenas tipo Langstroth removiendo el producto adherido en las caras laterales, tapa, entretapa y alzas. El material se dispuso en frascos ámbar tipo *twist off* de 250 mL y almacenado a -10 °C, hasta el momento del análisis.

Parámetros fisicoquímicos

Se registró el peso, aspecto, textura, color, olor, sabor e impurezas visibles de los propóleos colectados, así como los puntos de fusión, contenido de humedad, sólidos fijos, cenizas, masas mecánicas, resinas y ceras. Para el análisis de cenizas, se evaluó el contenido mineral mediante espectrofotometría de absorción atómica de calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, níquel, potasio, sodio y zinc. En el extracto etanólico (EEP) se cuantificó la acidez total, pH, fenoles y flavonoides totales, siguiendo los métodos descritos por Salamanca (2017). La acidez se determinó sobre 50 mL de agua destilada, libre de CO₂ en presencia de fenoltaleína y el volumen total de la solución de hidróxido correspondió a la fracción ácida presente expresada como porcentaje de ácido tartárico. El contenido de fenoles totales, las flavonas, flavonoles, flavanonas y dihidroflavonoles, se determinaron por espectrofotometría UV-Vis. Los fenoles se determinaron siguiendo los protocolos descritos por Baba y Malik (2015) y se expresaron como mg/g de EEP. Las flavonas, flavonoles, flavanonas y dihidroflavonoles, se realizaron usando metodologías descritas por Kasiotis *et al.* (2017) y Betances-Salcedo *et al.* (2017), los resultados fueron expresados como mg/g. Las evaluaciones sensoriales se adelantaron siguiendo criterios de Meilgaard (2007), usando escala hedónica sobre seis atributos que fueron evaluados por cinco jueces entrenados. El perfil densitométrico de los extractos se realizó mediante técnicas cromatográficas de alta eficiencia (HPTLC), conforme a Salamanca y Osorio (2018).

Las determinaciones de minerales se realizaron usando espectrofotometría de absorción atómica, haciendo uso de lámparas de cátodo hueco por elemento: Calcio, Hierro, potasio, magnesio y manganeso. El índice de oxidación se midió en extractos alcohólicos (EEP), siguiendo la metodología descrita por Salamanca (2018). La absorbancia específica de los espectros UV-Vis de los EEP, se obtuvo por el método de Miyataka *et al.* (1997) a la longitud de onda de máxima absorción, usando espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10s. Además, los EEP, se evaluaron usando técnicas de espectroscopía FT-IR en la unidad Perkin Elmer Spectrum One spectrometer (Perkin Elmer, USA™), la proyección final de los espectros se realizó haciendo uso del paquete Origin®2019. Los análisis mediante LC-ESI(-)-MS/MS procedieron tras la homogenización mediante ultrasonido, filtración y centrifugado, a través de espectrometro de masas MS/MS, usando un sistema a 7,2T LTQ FT Ultra (Thermo Scientific), dispuesto con chip-based direct infusión, nanoelectrospray ionisation source, la adquisición de datos se realizó en el rango 150-800 m/z, siguiendo la metodología descrita por Sawaya *et al.* (2011).

Actividad biológica

La actividad antibacteriana de los EEP, se determinó conforme a los protocolos de Farmacopea Americana USP 24, (Cupull-Santana *et al.*, 2013), operando métodos difusionales sobre bacterias Gram (+) de *Streptococcus* y bacterias Gram (-) de *Escherichiae*, las cuales fueron cultivadas en agar tripticasa de soya bajo condiciones aeróbicas por 18 h a 37±1 °C. En las determinaciones se usaron los métodos de difusión por pozos y de Kirby-Bauer. El crecimiento de los microorganismos y la difusión del antibiótico se estimaron de acuerdo con el tamaño de las zonas de inhibición a 24, 48 y 72 horas. El mismo procedimiento fue aplicado a un control de etanol al 80 %, la solución de concentración de 10 mg/mL fue preparada a partir de la solución estándar de sulfato de estreptomina (0,1 % p/v) en agua destilada estéril con buffer fosfato pH 8,0.

Estadística

Las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado en cada una de las muestras colectadas. En todos los casos se estimó el promedio, desviación estándar y coeficientes de variación de cada parámetro. Las evaluaciones para el análisis de varianza de una vía se efectuaron haciendo uso del paquete estadístico JMP14™. Las evaluaciones densitométricas de los perfiles de cromatografía de capa fina de alta eficiencia (HPTLC) haciendo uso del software libre ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA).

RESULTADOS

Los propóleos estudiados corresponden a los tipos III, IV y V, que corresponden a las zonas biogeográficas enmarcadas y consistentes con los observados en otras muestras de zonas tropicales (Salamanca, 2017). Los extractos etanólicos de los propóleos de las zonas de estudio presentaron un carácter ácido, las diferencias en este parámetro pueden ser explicadas teniendo como referencia factores climáticos, la oferta floral y el tiempo en el cual las abejas han propolizado las colmenas.

Los promedios para el contenido de cenizas entre muestras presentan diferencias significativas, siendo mayor en los propóleos de Pasto con 1,70 %. Los tenores de cera oscilaron entre 10,1 y 19,0 %. La mayor proporción de masas mecánicas se observaron en las muestras de Pasto, respecto de las otras dos zonas. Las resinas, son indicativas de la calidad del producto en términos de la actividad antioxidante, sus valores oscilaron entre 50,2 y 60,3 % (Cuadro 1).

Cuadro 1. Parámetros fisicoquímicos asociados a muestras de propóleos de tres zonas biogeográficas de Nariño.

Parámetros	Unidades	<i>bh-PM</i>	<i>bh-MB</i>	<i>bmh-PM</i>	Valores guía
		Buesaco	S.J. Pasto	La Unión	
Punto de fusión	°C	63,0 (1,00) ^a	59,0 (1,00) ^b	65,0 (1,00) ^a	60-100 °C
Cenizas	g/100 g	0,81 (0,27) ^a	1,70 (0,30) ^c	0,74 (0,10) ^{a,b}	-
Cera		10,1 (0,70) ^a	11,7 (3,40) ^{a,b}	19,0 (2,00) ^c	< 25 %
Resinas		60,3 (7,40) ^a	50,2 (2,60)	54,8 (7,54)	50-60 %
Masas mecánicas		27,3 (6,60) ^a	38,2 (3,10) ^b	29,0 (6,20) ^a	< 25 %
Acidez (A. tartárico)	mg/ 100 mL	6,60 (2,36) ^a	9,10 (1,26) ^b	16,4 (0,32) ^c	-
pH	-	4,20 (0,13) ^a	4,40 (0,11) ^b	4,10 (0,07) ^a	-

Letras iguales en la misma fila corresponden a valores comparables entre promedios observados en muestras. Desviación estándar (ds).

Las determinaciones de minerales, son menos frecuentes en muestras de propóleos y exponen variabilidad en el perfil de los elementos analizados. Los promedios observados presentaron menor variación para el contenido de hierro en las muestras de Pasto, frente a los de la Unión y Buesaco. Los elementos más representativos en todos los casos correspondieron a sodio y potasio (Cuadro 2).

Cuadro 2. Componentes de la fracción mineral de muestras de propóleos de tres zonas biogeográficas de Nariño.

Mineral	Buesaco	La Unión	S.J. Pasto	Mineral	Buesaco	La Unión	S.J. Pasto
	mg/Kg				mg/Kg		
Calcio	66,3 (21,2)	1298 (909)	2050 (950)	Sodio	436,1 (15,4)	340,5 (25,8)	431,1 (77,7)
Hierro	312 (59,8)	357 (57,9)	101,0 (10,0)	Zinc	72,9 (8,0)	110 (32,5)	35,0 (11,0)
Potasio	1529 (294)	1989 (632)	1832 (345,5)	Sodio/Potasio	0,285	0,171	0,235
Magnesio	47,3 (12,9)	359,6 (43,3)	763,6 (169,2)	Cobre	ND	ND	ND
Manganeso	11,6 (4,40)	91,2 (18,6)	5,64 (0,26)	Niquel	ND	1,61 (1,27)	ND

Desviación estándar (ds). ND: No determinado.

Los contenidos de fenoles presentaron diferencias importantes entre los grupos de muestras, valores están correlacionados con los promedios observados para flavanonas, flavonas y flavonoles, que también concuerdan con los tiempos de oxidación (Cuadro 3). El parámetro $E_{1\text{cm}}^{-1\%}$ de la absorción UV-Vis, es otro de los parámetros fisicoquímicos usados para evaluar la calidad de los extractos de propóleos y se relaciona con la actividad biológica de metabolitos secundarios como ácidos fenólicos y flavonoides. Los valores de $E_{1\text{cm}}^{-1\%}$ de las muestras, presentaron valores entre 77 y 370, siendo menores en los extractos de Buesaco, respecto de los extractos de la Unión y Pasto.

Cuadro 3. Compuestos fenólicos e índices de oxidación de EEP de tres zonas biogeográficas de Nariño.

Componente	Unidades	Buesaco	La Unión	S. J. Pasto
Fenoles	mg/g	55,0 (4,92)	69,1 (4,20)	36,6 (5,00)
Flavonas+Flavonoles		17,8 (2,90)	17,6 (1,42)	7,55 (0,43)
Flavanonas		37,1 (7,30)	51,5 (2,83)	29,1 (5,41)
$E_{1\text{cm}}^{-1\%}$	-	84-105	106-370	77-103
Índice de oxidación*	s	3,90 (0,80)	3,40 (1,10)	3,60 (0,50)

(*) En EEP. Valor guía (22 s). s: segundos. Desviación estándar (ds).

La huella espectral FT-IR de los extractos de propóleos estudiados son característicos (Figura 1), se observaron señales con oscilación y vibración (cm^{-1}) de grupos alifáticos (2930 y 2876), carbonilo (1660-1680), hidroxilo (3200-3650) y anillos aromáticos sustituidos (1500, 1580 y 1600). Las bandas de absorción (3300-3600 cm^{-1}), se relacionaron con grupos -OH de flavonas hidroxiladas, isoflavonoides con una banda significativa a 1680 propia de grupos carbonilo, a 1620 cm^{-1} , otras señales características se presentaron a 1440 cm^{-1} , 1283 y 1231 cm^{-1} que son frecuencias de vibración C=C-H propias de anillos aromáticos.

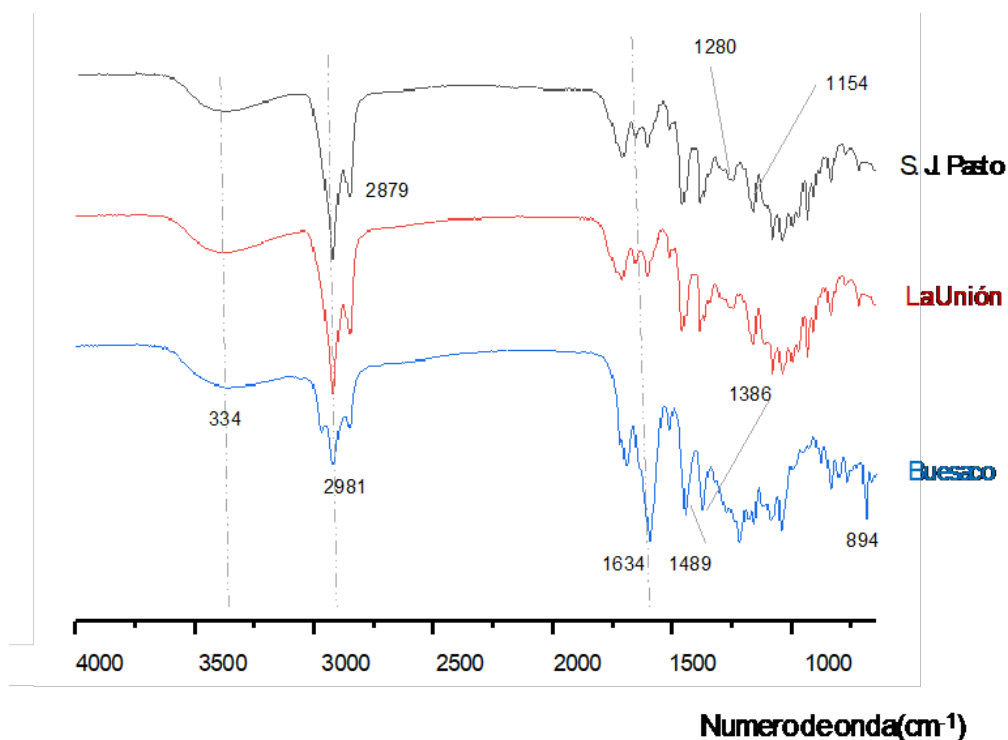


Figura 1. Espectros de infrarrojo (FT-IR) de EEP de tres zonas geográficas de Nariño.

La inspección visual de los cromatogramas mediante HPTLC, en principio no revelaron diferencias mayores para los hR_p , sin embargo, se identificaron bandas representativas de compuestos fenólicos, propios de los propóleos de Nariño. Se presentaron 13 metabolitos secundarios que se asocian en los cromatogramas con diferentes tonos de color, así: verde (apigenina, naringenina y crisina), naranja (quercetina) y azul (ácido cafeico, galangina, feruloil y p-derivados del ácido coumarico) y que concuerdan con otros reportes (Guzelmeric *et al.*, 2018). Los análisis densitométricos, presentaron gran similitud en la composición de los EEP de las muestras de Buesaco y La Unión, que difirieron ligeramente respecto de las de Pasto (Figura 2).

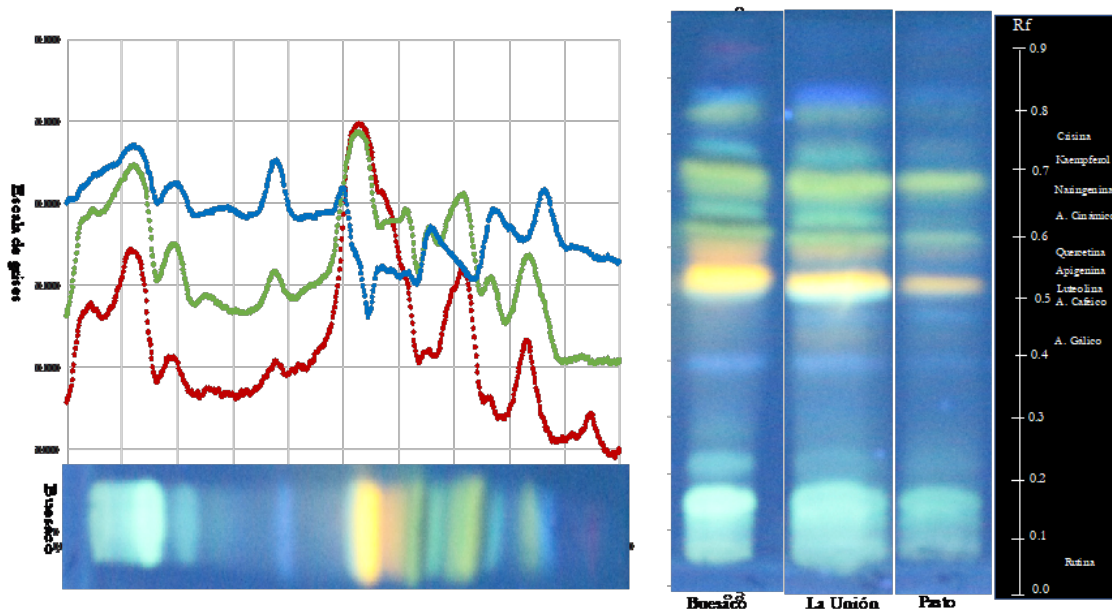


Figura 2. Huella dactilar y perfil densitométrico de cromatogramas de muestras de propóleos de tres zonas geográficas de Nariño.

La huella digital de los cromatogramas mediante técnicas LC-ESI(-)-MS/MS de los extractos de Buesaco y La Unión, presentaron patrones de fragmentación similares (Figura 3). La relación (m/z), reveló la presencia de acetina (283), ácido cafeico (179), apigenina (269), fenetil éster de ácido cafeico (179), crisina (253), crisin-5-metilester (267), kaempferol (285), naringenina (271), pinocembrina (255), pinobanksina (271), quercetina (253), luteolin-8-O-glucósido (439) y pinocembrin 8-O-glucósido (439). En los análisis LC-ESI(-)-MS/MS de los EEP, se muestran patrones similares con otros tipos de propóleos reportados en la literatura (Hochheim *et al.*, 2019). Las muestras analizadas presentaron un marcador (m/z : 501), que también ha sido identificado en muestras de Cuba y nordeste de Brasil (Cuesta-Rubio *et al.*, 2007; López *et al.*, 2014; Anjum *et al.*, 2019).

El perfil sensorial de las muestras de Buesaco y La Unión, presentó diferencias en el aspecto, con similitud en los descriptores olfativos y gustativos, que los diferencian de las muestras de Pasto (Figura 4). Las características organolépticas exhibieron aspectos plásticos, maleables, pegajosos y opacos, de tonos marrón con algunas tonalidades verdosas, aromas resinosos y elevada astringencia en muestras de Buesaco y la Unión, que difieren de las de Pasto, que presentaron tonos marrón, de aspecto terroso, resinoso, pegajoso y opaco, sus puntos de fusión mostraron valores similares entre 59 a 65 °C.

En cuanto a la actividad biológica, se observó un importante efecto inhibitorio de los extractos frente a *S. aureus* y *E. coli*. Los halos de inhibición para *E. coli* y *S. aureus* observados mediante Kirby-Bauer, revelaron un ligero efecto de sensibilidad de los extractos respecto del método de difusión (Figura 5). El uso de estreptomycin como referencia a 10 µg/mL mostró mayores halos de inhibición en relación a los extractos de las muestras estudiadas. Los extractos de propóleos exhibieron mayor actividad frente a microorganismos Gram (+) que Gram (-), resultados que son similares a los reportados para *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* y *S. thermophilus*, (AL-Ani *et al.*, 2018), en tanto que los hallazgos y observaciones con los EEP de Nariño son comparables con los datos reportados por Selvaraj *et al.* (2018).

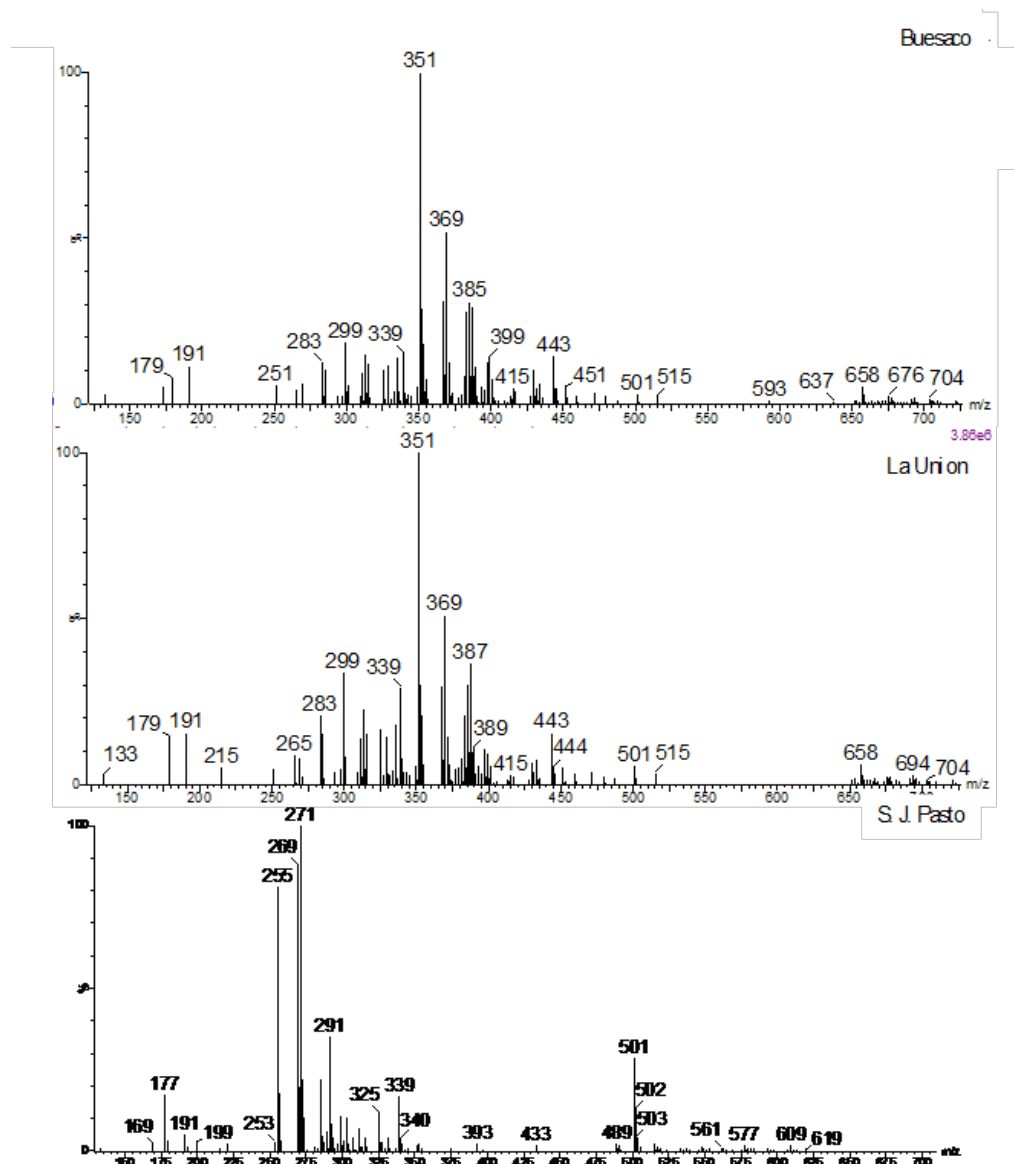


Figura 3. Patrón de fragmentación LC-ESI(-)-MS de muestras de propóleos de Buesaco, La Unión y S.J de Pasto, Nariño.

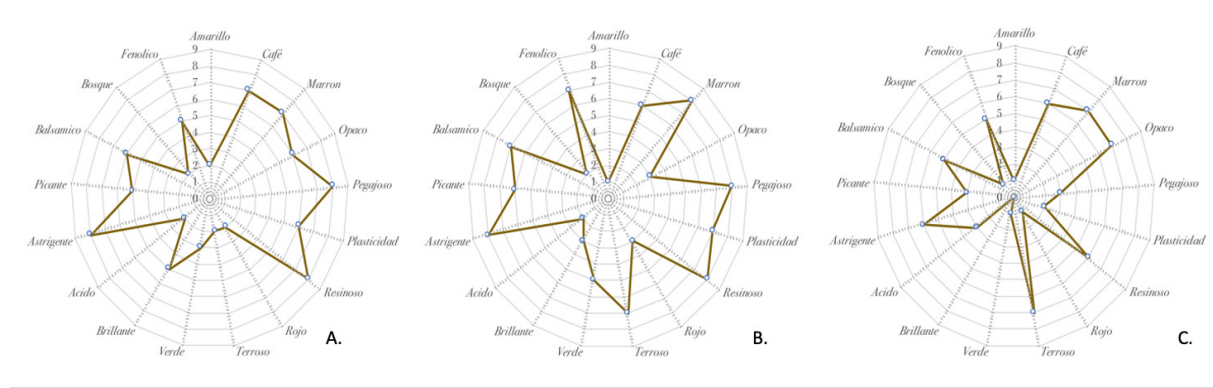


Figura 4. Perfil sensorial de los atributos asociados a muestras crudas de propóleos de las zonas de A. Buesaco, B. La Unión y C. S.J. Pasto, Nariño, Colombia.

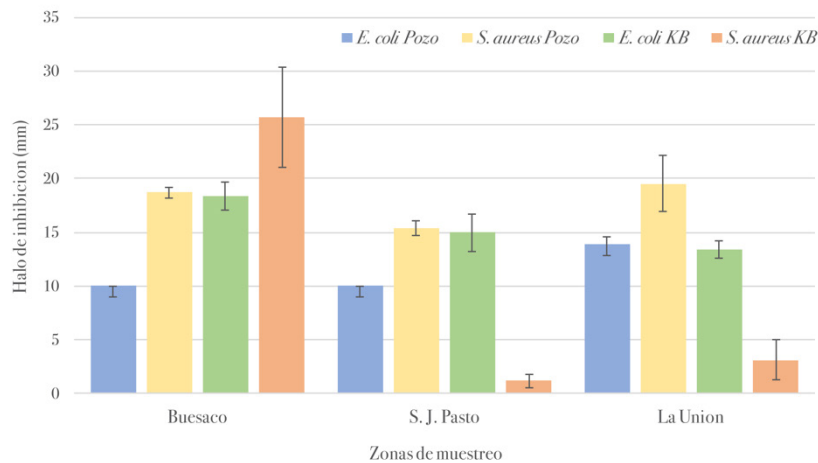


Figura 5. Actividad antibacteriana de extractos alcohólicos de propóleos de Nariño frente a *E. coli* (ATCC 9.341) y *S. aureus* (ATCC 25.923) métodos de Kirby-Bauer y difusión en pozos

El contenido de resinas observado en las muestras de Nariño fue superior a los valores encontrados en las de Atlántico (Rodríguez *et al.*, 2012), Bajo Cauca (Viloria *et al.*, 2012) y La Unión, Antioquia (Palomino *et al.*, 2010). En cuanto a los minerales, los valores observados fueron menores respecto a otros propóleos reportados en la literatura (Salamanca *et al.*, 2004). Los rendimientos de resinas del estudio, son concomitantes con los perfil de fenoles y flavonoides totales (mg/g), y con los reportados por otros investigadores (Delgado *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

El trabajo permitió identificar y caracterizar tipos de propóleos de tres zonas biogeográficas del departamento de Nariño sobre atributos fisicoquímicos, sensoriales y actividad biológica. La huella digital de los espectros de infrarrojo y los cromatogramas HPTLC y ESI(-)-MS/MS, permitieron clasificar las muestras como tipo-O y tipo-B y categorías III a V, como propios de zonas altoandinas propias de región cafetera. El uso de técnicas espectrofotométricas complementarias y de cromatografía revelaron la presencia de metabolitos secundarios con potencial actividad biológica. El trabajo ha hecho posible demostrar la sensibilidad de los propóleos de Buesano, La Unión y S.J. Pasto, frente a *S. aureus* y *E. coli*, en la técnica de difusión en pozo y uso de sensibilizadores. Los hallazgos contribuyen al estudio de matrices complejas asociadas al sistema apícola productivo desde matrices de propóleos colombianos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan gratitud Instituto de Biología de la Universidad de Campinas (Brasil), por el acompañamiento y disposición para la evaluación cromatográfica (HPLC-ESI-MS). A la Facultad Ingeniería y Zootecnia de la Universidad de São Paulo (Pirassununga-Brasil), a los Departamentos de Química de las Universidades de Nariño y Tolima. A los evaluadores y colaboradores permanentes de la Revista Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial por las observaciones y recomendaciones durante el proceso de arbitraje.

REFERENCIAS

- AHMED, R.; TANVIR, E.M.; HOSEN, M.; AFROZ, R.; AHMMED, I.; RUMPA, N.E.; PAUL, S.; HUA-GAN, S.; SULAIMAN, S.; KHALIL, M. Antioxidant properties and cardioprotective mechanism of Malaysian propolis in rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, n. 5370545, 2017, p. 1-11.
<https://doi.org/10.1155/2017/5370545>
- AL-ANI, I.; ZIMMERMANN, S.; REICHLING, J.; WINK, M. Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. Medicines, v. 5, n. 1, 2018, p. 2-17.
<https://doi.org/10.3390/medicines5010002>
- ANJUM, SI.; ULLAH, A.; KHAN, KA.; ATTAULLAH, M.; KHAN, H.; ALI, H.; BASHIR, M.; TAHIR, M.; ANSARI, M.; GHARAMH, H.; ADGABA, N.; DASH, C. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. Saudi Journal of Biological Science, v. 26, n. 7, 2019, p. 1695-03.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013>
- BABA, S.A.; MALIK, S.A. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. Journal of Taibah University for Science, v. 9, n. 4, 2015, p. 449-54.
<https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.11.001>
- BARRERA, E.; GIL, J.; RESTREPO, A.; MOSQUERA, K.; DURANGO, D. A coating of chitosan and propolis extract for the postharvest treatment of papaya (*Carica papaya* L. cv. Hawaiiiana). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, v. 68, n. 2, 2015, p. 7667-78.
<https://doi.org/10.15446/rfnam.v68n2.50982>
- BASTOS, E.M.; GUZMÁN, D.; FIGUEROA, J.; TELLO, J.; SCOARIS, D.O. Caracterización antimicrobiana y fisicoquímica de propóleos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) de la región andina colombiana. Acta Biológica Colombiana, v. 16, n. 1, 2011, p. 175-184. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2011000100013
- BETANCES-SALCEDO, E.; REVILLA, I.; VIVAR-QUINTANA, A.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M. Flavonoid and Antioxidant Capacity of Propolis Prediction Using Near Infrared Spectroscopy. Sensors, v. 17, n. 7, 2017, p. 1647.
<https://doi.org/10.3390/s17071647>
- CIFTCI-YILMAZ, S.; AZMAN, Z.N.; KOSEM, K.; GUNDUZ, E.; GRENMAN, RG. Evaluating Antioxidant Capacity of Different Propolis Samples from Konya, Turkey and Their Inhibitory Effect on Head and Neck Cancer Cells. BioRxiv. n., 2017, 183913.
<https://doi.org/10.1101/183913>
- CUESTA-RUBIO, O.; PICCINELLI, A.L.; CAMPO-FERNÁNDEZ, M.; MÁRQUEZ-HERNÁNDEZ, I.; ROSADO, A.; RASTRELLI, L. Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. Journal Agricultural and Food Chemical, v. 55, 2007, p. 7502-09.
<https://doi.org/10.1021/jf071296w>
- CUPULL-SANTANA, R.D.; CORTÉS-RODRÍGUEZ, R.; OLAZÁBAL-MANSO, E.E.; HERNÁNDEZ-MEDINA, C.A. Actividad antifúngica de propóleos obtenidos en tres provincias de Cuba sobre hongos contaminantes en cultivos de tejidos vegetales. Acta Universitaria, v. 23, n. 6, 2013, p. 3-9.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41629561001>

- DELGADO, A.M.L.; ANDRADE, O.J.; RAMÍREZ, B.C.A. Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, v. 6, n. 28, 2015, p. 74-87.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322015000200006
- DRESCHER, N.; KLEIN, A.M.; NEUMANN, P.; YAÑEZ, O.; LEONHARDT, S. Inside honeybee hives: Impact of natural propolis on the ectoparasitic mite *Varroa destructor* and viruses. *Insects*, v. 8, n. 15, 2017, p. 1-18.
<https://doi:10.3390/insects8010015>
- EL-GUENDOUI, S.; LYOUSSEI, B.; MIGUEL, M. Insight on Propolis from Mediterranean Countries: Chemical Composition, Biological Activities and Application Fields. *Chemistry & Biodiversity*, v. 16, 2019, p. 1-35.
<https://doi:10.1002/cbdv.201900094>
- GUZELMERIC, E.; RISTIVOJEVIĆ, P.; TRIFKOVIĆ, J.; DASTAN, T.; YILMAZ, O.; CENGİZ, O.; YESILADA, E. Authentication of Turkish propolis through HPTLC fingerprints combined with multivariate analysis and palynological data and their comparative antioxidant activity. *LWT–Food Science and Technology*, v. 87, 2018, p. 23-32.
<https://doi:10.1016/j.lwt.2017.08.060>
- HERRERA, L.V.; PISCIOTTI, O.M.; RAMOS, M.O.; NEIRA, F.L.; SOTO, S.J. Actividad antimicrobiana *in vitro* de un propóleo de Santander sobre *Enterococcus faecalis*. *Revista Ustasalud*, v. 11, 2012, p. 73-78.
<https://doi:10.15332/us.v11i2.1119>
- HOCHHEIM, S.; GUEDES, A.; FACCIN-GALHARDI, L.; RECHENCHOSKI, D.Z.; NOZAWA, C.; LINHARES, R.E.; DA SILVA FILHO, H.; RAU, M.; SIEBERT, D.; MICKE, G.; MENDES DE CORDOVA, C. Determination of phenolic profile by HPLC–ESI-MS/MS, antioxidant activity, *in vitro* cytotoxicity and anti-herpetic activity of propolis from the Brazilian native bee *Melipona quadrifasciata*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 29, n. 3, 2019, p. 339-50.
<https://doi:10.1016/j.bjp.2018.12.010>
- KASIOTIS, K.M.; ANASTASIADOU, P.; PAPADOPOULOS, A.; MACHERA, K. Revisiting Greek propolis: chromatographic analysis and antioxidant activity study. *PloS One*, v. 12, n. 1, 2017, p. 1-27.
<https://doi:10.1371/journal.pone.0170077>
- LÓPEZ, B.G.C.; SCHMIDT, E.M.; EBERLIN, M.N.; SAWAYA, A.C.H.F. Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry*, v. 146, 2014, p. 174–180.
<https://doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.063>
- MARTÍNEZ, J.; GARCÍA, C.; DURANGO, D.; GIL, J. Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *Revista MVZ Córdoba*, v. 17, n. 1, 2012, p. 2861-69.
<https://doi:10.21897/rmvz.254>
- MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. *Sensory Evaluation Techniques*. 4th ed. Boca Raton (USA): CRC Press; 2015.
https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=IGjdCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Sensory+Evaluation+Techniques.+4th+ed.&ots=FSCgXBCDU9&sig=XVlpG4_vVbG0c0ma8MAOeZ9QVeY#v=onepage&q=Sensory%20Evaluation%20Techniques.%204th%20ed.&f=false
- MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.; SATOH, T. Evaluation of Propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese Propolis by Enzymatic and Physico-Chemical Methods. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 20, n. 5, 1997, p. 496-501.
<https://doi:10.1248/bpb.20.496>
- OLIVEIRA, R.N.; MANCINI, M.C.; DE OLIVEIRA, F.C.S.; PASSOS, T.M.; QUILTY, B.; DA THIRÉ, R.M.; Mc GUINNESS. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. *Matéria (Rio J)*, v. 21, n. 3, 2016, p. 767-79.
<https://doi:10.1590/S1517-707620160003.0072>
- OMAR, R.; IGOLI, J.O.; ZHANG, T.; GRAY, A.I.; EBILOMA, G.U.; CLEMENTS, C.J.; FEARNLEY, J.; EBEL, R.; PAGET, T.; DE KONING, H.; WATSON, D. The chemical characterization of Nigerian propolis samples and their activity against *Trypanosoma brucei*. *Scientific Report*, v. 7, n. 923, 2017, p. 1-10.
<https://doi:10.1038/s41598-017-01038-2>

- OSORIO, T.M.; SALAMANCA, G.G. Actividad biológica del propóleo. En Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo. 1 ed. Ibagué (Colombia): Sello editorial de la Universidad del Tolima, 2017. p. 287-323.
https://www.researchgate.net/publication/328346989_Origen_naturaleza_propiedades_fisicoquimicas_y_valor_terapeutico_del_propoleo
- PALOMINO, L.; MARTÍNEZ, J.; GARCÍA, C.; GIL, J.; DURANGO, D. Caracterización Físicoquímica y Actividad Antimicrobiana del Propóleo en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, v. 63, 2010, p. 5373-83.
<http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n1/a13v63n01.pdf>
- PRZYBYŁEK, I.; KARPINSKI, T.M. Antibacterial Properties of Propolis. Molecules, v. 24, n. 2047, 2019, p. 1-17.
<https://doi:10.3390/molecules24112047>
- RODRÍGUEZ, Y.; SÁNCHEZ-CATALÁN, F.; ROJANO, B.; DURANGO, D.; GIL, J.; MARÍN-LOAIZA, J. Caracterización físicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento del Atlántico, Colombia. Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica, v. 15, n. 2, 2012, p. 303-311.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-42262012000200007&script=sci_abstract&lng=es
- SALAMANCA, G.G.; OSORIO, T.M. New insular red propolis from Colombia: botanical origin, biological and chemical markers. En: 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 10th International Congress On Biodiversity. Atenas (Grecia): 2018.
<https://cdn.technologynetworks.com/ep/pdfs/new-insular-red-propolis-from-colombia-botanical-origin-biological-and-chemical-markers.pdf>
- SALAMANCA, G.G.; RAMÍREZ, C.; RUBIANO, L. Contenido mineral de los propóleos colectados en algunas zonas biogeográficas colombianas. Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó, v. 20, n. 1, 2004, p. 79-85.
- SALAMANCA, G.G. Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo. 1 ed. Ibagué (Colombia): Sello editorial Universidad del Tolima, 2017.
- SAWAYA, A.C.H.F.; BARBOSA-DA SILVA-CUNHA, I.; MARCUCCI, M.C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. Chemistry Central Journal, v. 5, n. 27, 2011, p. 1-10.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3123264/pdf/1752-153X-5-27.pdf>
- SEIBERT, J.B.; BAUTISTA-SILVA, J.P.; AMPARO, T.R.; PETIT, A.; PERVIER, P.; DOS SANTOS ALMEIDA, J.C.; AZEVEDO, M.; SILVEIRA, B.; BRANDÃO, G.; DE SOUZA, G.; TEIXEIRA, L.; DOS SANTOS, O. Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. Food Chemistry, v. 287, 2019, p. 61-67.
<https://doi:10.1016/j.foodchem.2019.02.078>
- SELVARAJ, R.; SIVAKUMARI, K.; FLORA-PRIYADARSHINI, J.; ASHOK, K.; JAYAPRAKASH, P.; RAJESH, S. Phytochemical profiling and antibacterial activity of propolis. International Journal of Scientific Research, v. 7, n. 6, 2018, p. 373-376.
https://www.researchgate.net/publication/330170066_PHYTOCHEMICAL_PROFILING_AND_ANTIBACTERIAL_ACTIVITY_OF_PROPOLIS
- SFORCIN, J.M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. Phytotherapy Research, v. 30, 2016, p. 894-905.
<https://doi:10.1002/ptr.5605>
- SHAWKY, E.; IBRAHIM, R.S. Bioprofiling for the quality control of Egyptian propolis using an integrated NIR-HPTLC-image analysis strategy. Journal of Chromatography B: Biomedical and Applications, v. 1095, 2018, p. 75-86.
<https://doi:10.1016/j.jchromb.2018.07.029>
- TALERO, C.; HERNÁNDEZ, D.; FIGUEROA, J. Calidad microbiológica de propóleo crudo y sólidos solubles de extractos de propóleo de *Apis mellifera* en Colombia. Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia, v. 59, n. 2, 2012, p. 109-118.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-29522012000200005&script=sci_abstract&lng=es

- TOUZANI, S.; EMBASLAT, W.; IMTARA, H.; KMAIL, A.; KADAN, S.; ZAID, H.; ELARABI, I.; BADIAA, L.; SAAD, B. In vitro evaluation of the potential use of propolis as a multitarget therapeutic product: Physicochemical properties, chemical composition, and immunomodulatory, antibacterial, and anticancer properties. *BioMed Research International*, v. 2019, 2019, p. 1-11.
<https://doi.org/10.1155/2019/4836378>
- VEIGA, R.S.; DE MENDONÇA, S.; MENDES, P.B.; PAULINO, N.; MIMICA, M.J.; LAGAREIRO NETTO, A.A.; LIRA, I.S.; LOPEZ, B.G.; NEGRÃO, V.; MARCUCCI, M.C. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of Applied Microbiology*, v. 122, n. 4, 2017, p. 911-20.
<https://doi:10.1111/jam.13400>
- VELASQUEZ, B.D.; MONTENEGRO, S.P. Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos obtenidos de *Apis mellifera*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, v. 8, n. 1, 2017, p. 185-93.
<https://doi:10.22490/21456453.1848>
- VELOZ, J.J.; ALVEAR, M.; SALAZAR, L.A. Antimicrobial and antibiofilm activity against *Streptococcus mutans* of individual and mixtures of the main polyphenolic compounds found in Chilean propolis. *BioMed Research International*, v. 7602343, 2019, p. 1-7.
<https://doi:10.1155/2019/7602343>
- VILORIA, J.; GIL, J.; DURANGO, D.; GARCÍA, C. Caracterización fisicoquímica del propóleo de la Región del Bajo Cauca Antioqueño (Antioquia, Colombia). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, v. 10, 2012, p. 76-85.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1692-35612012000100010&script=sci_abstract&tlng=es
- ZAINULLIN, R.A.; KUNAKOVA, R.V.; GAREEV, V.F.; GALYAUTDINOV, I.V.; SADRETDINOVA, Z.R.; MUSLIMOV, Z.S.; ODINOKIV, N. Flavanones and flavones from ashkir propolis. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 54, n. 5, 2018, p. 975-77.
<https://doi:10.1007/s10600-018-2526-5>

Obtención de “Snacks” de piña (*Ananas comosus*) mediante las técnicas combinadas de Ventana de Refractancia y Fritura con Aire Caliente*

Obtaining “Snacks” of pineapple (*Ananas Comosus*) by the combined techniques of Refractance Window and Hot Air Frying”

GONZÁLEZ-HOYOS, LINA-VANESSA¹; ARROYO-RINCÓN, ANA-MARÍA²; TOBAR-SUAREZ, ALEXANDER³;
POLANÍA-RIVERA, ANNA-MARÍA⁴; AYALA-APONTE, ALFREDO⁵; DÍAZ-ORTIZ, ALBERTO⁶

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 11 de Abril 2021

Aprobado para publicación: 11 de Octubre 2021

* Título del proyecto de origen: “Incremento de la competitividad sostenible en la agricultura de ladera en todo el departamento, Valle del Cauca, Occidente”. Financiación: Sistema General de Regalías. Culminación: marzo 2021.

1 Universidad del Valle, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería de Alimentos. Ingeniera de Alimentos. Cali, Colombia.

2 Universidad del Valle, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería de Alimentos. Ingeniera de Alimentos. Cali, Colombia.

3 Universidad del Valle, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería de Alimentos. Ingeniero de Alimentos. Cali, Colombia.

4 Universidad del Valle, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería de Alimentos. Estudiante de Doctorado en Ingeniería con énfasis en Ingeniera de Alimentos. Cali, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-9646-2266>

5 Universidad del Valle, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería de Alimentos. Ph.D. Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Cali, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-0310-3577>

6 Universidad del Valle, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería de Alimentos. Ph.D. Ingeniería de Procesos. Cali, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-0310-3577>

Correspondencia: alfredo.ayala@correounivalle.edu.co

RESUMEN

Las técnicas de secado de Ventana de Refractancia (VR) y Fritura con Aire Caliente (AF), permiten obtener snacks de frutas de alta calidad nutricional y fisicoquímica. El propósito de este trabajo fue evaluar las técnicas de secado de WR-AF para obtener "snacks" de piña deshidratada. Se emplearon trozos de piña de la variedad MD2 con geometría triangular (40 mm de lado y 4 mm de espesor). En el secado por WR se emplearon tres temperaturas (70, 80 y 90 °C). Para cada temperatura se modeló la cinética de secado mediante cuatro modelos matemáticos (Newton, Page; Wang & Singh, y Midilli). Se determinó: color, en términos de Luminosidad (L^*) y cambio total de color (ΔE), actividad de agua (a_w), coeficientes de difusión y energía de activación. Para las muestras secadas en la combinación de las técnicas VR-AF, se determinaron las curvas de secado, L^* , ΔE , a_w y vitamina C. En total se realizaron 4 tratamientos en el secado con AF a 100 °C; tres de las cuales fueron muestras tratadas (MT) previamente por WR, y el otro fue muestra no tratada (MNT). Los resultados mostraron que, a mayor temperatura de secado por WR mayor fue el coeficiente de difusión y menor fue el tiempo de secado. Para un contenido de humedad de 9 % (d.b), los tratamientos a 90, 80 y 70 °C requirieron 90, 110 y 130 min de secado, respectivamente. El modelo de Midilli fue el que mejor ajustó las cinéticas de secado. Se observó que las técnicas de VR-AF permitieron obtener menor tiempo de secado, mayor retención de vitamina C y de color respecto a las MNT. Estos resultados indican que la técnica WR-AF es una alternativa viable para producir "snacks" de piña en tiempos mas cortos y con mayor conservación de las características de calidad.

ABSTRACT

Refractance Window (WR) and Hot Air-Frying (HAF) dried techniques, allows to obtain high nutritional and physicochemical quality fruit snacks. The aim of this work consisted on evaluating WR-AF dry techniques to obtain dehydrated pineapple snacks. MD2 variety pineapple pieces were cut into triangular shapes with 40 mm by side and 4 mm in thickness.

For WR drying, three temperatures were set (70, 80 and 90 °C). For each one, a dry-out kinetics model was applied adopting 4 math models (Newton, Page; Wang & Singh, and Midilli). Also, color as in Luminosity (L^*), total color changes (ΔE), water activity (a_w), diffusion coefficient, and activation energy were determined. On dried samples under WR-HAF mixed method, drying curves were determined, as well as, L^* , ΔE , a_w and vitamin C. In total, four treatments were evaluated in the AF process at 100 °C; three of which were treated sam-

PALABRAS CLAVE:

Snacks, Piña; Cinética; Secado; Ventana de refractancia; Fritura con aire caliente; Actividad de agua; Color; Vitamina C.

KEYWORDS:

Snacks; Pineapple; Kinetics; Drying; Refractance Window; Air-Frying; Water activity; Color; Vitamin C.

Cómo citar este artículo: GONZÁLEZ-HOYOS, LINA-VANESSA; ARROYO-RINCÓN, ANA-MARÍA; TOBAR-SUAREZ, ALEXANDER; POLANÍA-RIVERA, ANNA-MARÍA; AYALA-APONTE, ALFREDO; DÍAZ-ORTIZ, ALBERTO. Obtención de "Snacks" de piña (*Ananas comosus*) mediante las técnicas combinadas de Ventana de Refractancia y Fritura con Aire Caliente. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 20, n. 1, 2022, p. 165-178. Doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v19.n2.2021.1879>

ples (TS) under WR, and one sample left untreated (UNTS). Results showed that the higher the drying temperature under WR, the greater the diffusion coefficient and lower the drying time. To reach 9 % (d.b) of humidity, treatments at 90, 80 and 70 °C required 90, 110 and 130 min, respectively. Midilli model adjusted better to drying kinetics. WR-HAF techniques allowed less drying time, higher vitamin C, and color retention compared to UNTS. Results demonstrated that combined WR-HAF is a feasible alternative to obtain pineapple snacks in shorter time while preserving high quality characteristics.

INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus*) es originaria de Brasil y Paraguay y es una de las frutas que más se consume en el mundo (Olmos, 2015) y apetecida por su sabor, aroma y aporte nutricional; se puede consumir en fresco o como producto procesado tipo refrescos, enlatados dulces, entre otros (Wu & Shiau, 2015; Rani & Tripathy, 2019). De acuerdo con estimaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la piña está en segundo lugar en la producción mundial de frutas tropicales, con 28,3 millones de toneladas en 2018 (Braga *et al.*, 2020). A pesar de que se evidencian diversos productos procesados a base de piña, son pocos los desarrollos de “snacks” como producto deshidratado con textura crujiente y con alta retención de calidad. Por otro lado, la piña, como en las frutas en general, presenta corto tiempo de vida útil por su alto contenido de agua o actividad de agua, por lo que es necesario aplicar nuevos procesos para desarrollar productos con alta retención de calidad y, a la vez, incrementar la vida útil. El secado es una alternativa como método de conservación de los alimentos, ya que extiende la vida útil (Braga *et al.*, 2020), reduce el contenido de humedad, disminuyendo el peso y el volumen y facilitando el transporte y almacenamiento de productos, además, se disminuye la actividad del agua por debajo de 0,6, inhibiendo los microorganismos de deterioro, así como los cambios físicos y químicos durante el almacenamiento (Vega-Gálvez *et al.*, 2007).

Para su conservación, la piña se ha deshidratado por diversos métodos como el secado con aire caliente, el secado solar, la deshidratación osmótica, la liofilización, las microondas, entre otros (Salazar *et al.*, 2019; Mohammed *et al.*, 2020; Zzaman *et al.*, 2021), sin embargo, estos métodos evidencian algunos efectos negativos en la calidad fisicoquímica y nutricional en los alimentos. El secado con aire caliente es la técnica más utilizada en la industria alimentaria, pero los tiempos de operación son relativamente prolongados y las características del producto final no siempre son deseables (Zhang *et al.*, 2018), mientras que el secado por liofilización presenta productos con alta retención de calidad, pero su inconveniente radica en que emplea largos tiempos de procesamiento (mayor de 24 h), alto consumo de energía y, en consecuencia, altos costos de operación.

En los últimos años se han desarrollado métodos de secado con alta retención de la calidad de frutas y hortalizas, estos son el secado por Ventana de Refractancia (VR) y la técnica de Fritura con Aire Caliente (FAC) llamado también “Air Frying”. La técnica de secado por VR fue desarrollada por MCD Technologies, Inc., es relativamente simple, barata y se puede aplicar a una variedad de productos. La VR utiliza agua como medio de calentamiento a una temperatura inferior al punto de ebullición colocando el producto sobre una película plástica MAYLAR que es relativamente transparente a la radiación infrarroja del agua (Ortiz-Jerez *et al.*, 2015; Raghavi *et al.*, 2018). En varias investigaciones se ha demostrado que alimentos secados por VR obtienen productos con alta retención en calidad nutricional, fisicoquímica y organoléptica en comparación con otros métodos de secado en diversos vegetales (Nemzer *et al.*, 2018; Leiton-Ramírez *et al.*, 2020). El método por FAC es una técnica de secado convectivo con aire caliente de alta velocidad que puede usarse con o sin adición de aceite al producto. Este método le confiere al producto agradables propiedades texturales y sensoriales; es una nueva técnica con la que se obtienen productos alimenticios en cortos tiempos, logrando un producto saludable, deshidratado y con textura crujiente (Shaker, 2015). A pesar de que con estas técnicas (VR y FAC) se obtienen alimentos secos con retención significativa de calidad, la combinación de ellas permite obtener snacks con menores tiempos de proceso y mayor retención de calidad al compararla con una sola técnica. El objetivo de este estudio fue obtener Snacks de piña mediante el método combinado de las técnicas de VR y FAC, evaluando cinéticas de secado, cambios de color, a_w y vitamina C.

MÉTODO

La experimentación se realizó en los laboratorios de la Escuela de Ingeniería de Alimentos de la Universidad del Valle (Cali, Valle del Cauca, T: 28 °C y 70 % humedad relativa). Se emplearon frutos de piña MD2 proporcionados por productores de piña del norte del mismo departamento; con condiciones de procesamiento de 24 °C y 85 % HR, las piñas se lavaron con agua potable, se pelaron y se cortaron en trozos regulares con geometría triangular (40 mm de lado y 4 mm de espesor)

Secado por ventana de refractancia

Los trozos de piña se secaron en un equipo piloto de VR (CEI-ROBOTS, Col) que consiste en un tanque lleno de agua (largo: 0,6 m, ancho: 0,4 m) en cuya superficie se coloca una membrana de poliéster transparente (tipo Mylar™). Se emplearon tres temperaturas para el calefactor de agua (70, 80 y 90 °C). Las muestras se colocaron sobre la membrana de poliéster (Mylar) para el secado y, a diferentes tiempos, se retiraron muestras para construir la curva de secado graficando el contenido de humedad (g agua/g materia seca) vs el tiempo de proceso (min) (Ochoa-Martínez *et al.*, 2012). Los experimentos se realizaron por triplicado.

El contenido de humedad (CH) se determinó de acuerdo con el método 20.013 (AOAC, 1980). La actividad del agua (a_w) se midió con el equipo Decagón (AquaLab CX-1, USA) con una sensibilidad de 0,001. El color se determinó mediante el uso de un espectrocolorímetro (HunterLab, USA), obteniendo las coordenadas de color L^* , a^* , b^* del sistema CIE- $L^*a^*b^*$ a partir de los espectros de reflexión de las muestras, utilizando como referencia el iluminante D65 y el observador 10 °: a partir de estas coordenadas se calcularon las diferencias de color (ΔE) (Ecuación 1) (Villamizar *et al.*, 2012). Como variables de respuesta indirectas en el proceso por VR se calcularon los coeficientes de difusión del agua y la energía de activación. El coeficiente de difusión se calculó usando el primer término de la solución analítica de la segunda ley de Fick (Ecuación 2). Se asumió que la geometría es una placa plana infinita, que la distribución de la humedad inicial es uniforme, la resistencia a la transferencia de masa despreciable y no existe encogimiento (Onwude *et al.*, 2016).

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (\text{Ec. 1})$$

Dónde ΔE : Es la diferencia de color; L^* es el valor de L^* para la muestra tratada; L_0^* es valor de L^* para la muestra fresca; a^* es el valor de a^* para la muestra tratada; a_0^* es el valor de a^* para la muestra fresca; b^* es el valor de b^* para la muestra tratada; b_0^* es el valor de b^* para la muestra fresca.

$$MR = \frac{(M_t - M_e)}{(M_0 - M_e)} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(-D_e \frac{(2n+1)^2 t \pi^2}{4l^2}\right) \quad (\text{Ec. 2})$$

Dónde MR Es la relación adimensional de humedad; los subíndices, 0, t y e representan las humedades en el tiempo 0, t y en el equilibrio respectivamente; n es el número de términos de la sumatoria, D_e es el coeficiente difusivo del agua, l es la dimensión característica de la muestra (Ochoa-Martínez & Ayala-Aponte, 2005).

Para el cálculo de la difusividad efectiva (D_e) se linealizó la ecuación 3 convirtiéndose en la ecuación 4; la pendiente de la ecuación se igualó a $-D_e \pi^2 / 4l^2$ donde l es el espesor medio de la muestra (Vega *et al.*, 2007).

$$MR = \frac{8}{\pi^2} \exp\left(\frac{-D_e \pi^2 t}{4l^2}\right) \quad (\text{Ec. 3})$$

$$\ln(MR) = \ln \frac{8}{\pi^2} - \left(\frac{D_e \pi^2}{4l^2}\right) t \quad (\text{Ec. 4})$$

La energía de activación se determinó mediante la ecuación 5 tipo Arrhenius. La dependencia de D_e con la temperatura de secado por VR se determinó empleando esta ecuación tipo Arrhenius (Onwude *et al.*, 2016). La ecuación 5 se linealizó y se convirtió en ecuación 6; la pendiente de la ecuación se igualó a $-E_a/R$ y se despejó la Energía de activación (E_a).

$$D_e = D_o \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (\text{Ec. 5})$$

$$\ln(D_e) = \frac{1}{T} \left(\frac{-E_a}{R}\right) + \ln(D_o) \quad (\text{Ec. 6})$$

Dónde: E_a es la energía de activación [J/mol]; R es la constante de los gases [J/mol K]; T es la temperatura [K]; D_o es una constante.

Los valores experimentales de las cinéticas de secado por VR se ajustaron mediante 4 modelos matemáticos: Newton, Page, Wang & Singh y Midilli (Michalewicz *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2017) (Cuadro 1). El mejor modelo cinético se empleó en las tres temperaturas para predecir los tiempos de secado en las muestras de piña para alcanzar un nivel de humedad de 45 % (b,h) o su equivalente en base seca de 81,82 %; estas muestras parcialmente deshidratadas a 70, 80 y 90 °C se secaron por la técnica de FAC.

Cuadro 1. Modelos cinéticos para el ajuste de valores experimentales de humedad en el secado de rodajas de piña MD2 por la técnica de VR.

Nombre	Modelo	
Newton	$MR = \exp(-kt)$	(Ec. 7)
Page	$MR = \exp(-kt^n)$	(Ec. 8)
Wang y Singh	$MR = 1 + At + Bt^2$	(Ec. 9)
Midilli	$MR = A \cdot \exp(-kt^n) + Bt$	(Ec. 10)

Secado por la técnica de fritura con aire caliente

Se empleó un equipo de FAC a 100 °C con una capacidad de 4,2 L (Imusa, easy fry), este puede secar con o sin presencia de aceite. Consta con un control análogo de temperatura y tiempo. Se emplearon dos niveles de humedad de trozos de piña, un nivel fue 0,45 g agua/g mt; donde mt=masa total (0,8182 g agua/g ms; donde ms=materia seca) obtenido en cada temperatura (70, 80 y 90 °C) en el secado por VR; estas muestras son llamadas muestras tratadas (MT) y el otro nivel fue $0,86 \pm 0,02$ g agua/g m.t (6,14 g agua/g ms) correspondiente a la humedad de la piña en estado fresco como muestra no tratada por VR (MNT). Se obtuvieron 4 tratamientos para el secado por FAC, correspondientes a las MT (70, 80 y 90 °C) y MNT (piña fresca o muestra control). Se realizaron las curvas de secado de piña en los cuatro tratamientos por FAC. A diferentes tiempos se determinó el CH para obtener la curva de secado, y al final del secado (1 % bs) se midieron el color, a_w , y vitamina C. El diseño se realizó completamente al azar en los 4 tratamientos. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los resul-

tados se analizaron mediante el programa estadístico SPSS 18 (versión 23) y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95 %.

El contenido de vitamina C se determinó por reflectometría, que es una técnica basada en la interacción entre la materia y la luz (Poveda-Nuñez, 2014). Se utilizó un refractómetro digital (Rqflex 10 Merck; Reflectoquant, EDM Millipore Corp., Darmstadt, Germany), diluyendo 1 g de muestra en 10 mL de agua destilada. El resultado se expresó como mL de ácido ascórbico por cada 100 g de muestra (Ecuación 11). El análisis se realizó por triplicado para cada muestra (Domínguez *et al.*, 2016). La determinación de la vitamina C se realizó a las muestras frescas y a las muestras secas al final del experimento por los dos métodos (VR y FAC).

$$\frac{\text{mg de ácido ascórbico}}{100 \text{ g muestra}} = \frac{\text{Lectura} \cdot \text{volumen H}_2\text{O destilada}}{10 \cdot \text{Peso de la muestra}} \quad (\text{Ec. 11})$$

Para el cálculo de la pérdida de vitamina C, se estimó mediante la diferencia entre la concentración final e inicial de la muestra, dividida por la muestra inicial

RESULTADOS

Curvas de secado por VR

La Figura 1 muestra las curvas de secado de piña secadas por VR. El CH de las muestras frescas de piña fue de $6,14 \pm 0,12$ g agua/g ms ($0,86 \pm 0,02$ g agua/g mt), y a_w de $0,9815 \pm 0,0043$, valores similares a los reportados por otros investigadores (Salazar *et al.*, 2019; Ashutosh *et al.*, 2021). Se evidenció un efecto significativo ($p < 0,05$) de la temperatura de secado por VR sobre el contenido de humedad en la piña: a mayor temperatura, menor fue el tiempo de proceso para obtener un mismo nivel de humedad, o caso contrario, a mayor temperatura mayor pérdida de humedad se obtuvo para un mismo tiempo de secado en las tres temperaturas. Diferentes autores reportan resultados similares en distintos alimentos como en batata biofortificada (Souza *et al.*, 2019), en cubos de piña (Sethi & Kaur, 2019) y en cáscaras de manzana (Moussaoui *et al.*, 2021).

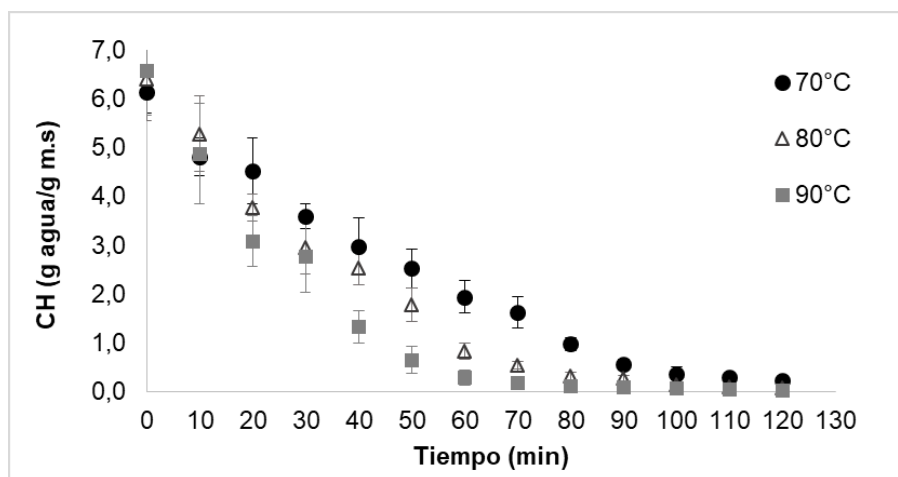


Figura 1. Cinéticas de secado de muestras de piña mediante VR a 70, 80 y 90 °C.

Para obtener un CH aproximado de 9 % (b.s), se observa que a 90 °C se alcanza en el menor tiempo con 90 min, seguido de 80 °C con 110 min y 70 °C con 130 min. Este resultado puede explicarse, ya que al incrementarse la temperatura se aumenta la transferencia de calor, la tasa de evaporación y la migración de agua desde interior hacia la superficie del alimento, ocasionando que la muestra pierda agua en menor tiempo (Souza *et al.*, 2019; Macedo *et al.*, 2020).

Es evidente que con la técnica de VR se alcanzan significativamente tiempos más cortos respecto a otros métodos de secado de piña como el secado convectivo (Salazar *et al.*, 2019; Mohammed *et al.*, 2020) Estos tiempos más cortos en VR comparado con otros métodos, pueden ser atribuidos a la combinación de los mecanismos de transferencia de calor como la radiación (energía infrarroja del agua), la conducción en la membrana plástica y en el alimento y al aumento de la convección por efecto de la circulación del aire en las muestras que están en la superficie de la membrana plástica.

Coefficiente de Difusión y energía de activación

Los coeficientes de difusión efectiva (D_e) del agua en el secado por VR se incrementaron significativamente ($p < 0,05$) con el aumento de la temperatura, obteniéndose valores de $7,75 \times 10^{-10}$, $1,708 \times 10^{-09}$ y $2,027 \times 10^{-09}$ m^2/s , respectivamente, para 70, 80 y 90 °C. Estos valores de D_e están dentro del rango general de 10^{-11} – 10^{-09} m^2/s para el secado de alimentos (Macedo *et al.*, 2020) y tienen el mismo orden de magnitud según los reportados en otros estudios en piña (Ponkham *et al.*, 2012; Berbert *et al.*, 2016). También, coincide con el secado de otras frutas como en banano (Macedo *et al.*, 2020) y mora (Kaveh *et al.*, 2020) El incremento de D_e con el aumento de la temperatura puede explicarse por la disminución de la viscosidad del agua permitiendo su difusión molecular en los capilares del producto, aumentando el valor de difusividad de humedad (Corrêa *et al.*, 2010), comportamiento que también ha sido reportado en batata (Souza *et al.*, 2019) y en piña (Silva *et al.*, 2015; Berbert *et al.*, 2016).

La energía de activación (E_a) para el proceso de secado por VR en las tres temperaturas fue de 50,03 kJ/mol. Este valor se encuentra dentro del rango de valores encontrados en la literatura para alimentos de 12,7 a 110 kJ/mol (Montes *et al.*, 2008). La energía de activación representa la energía requerida para iniciar la difusión de la humedad del alimento durante el secado (Olanipekun *et al.*, 2015): otros autores encontraron un valor relativamente similar de E_a (41,53 kJ/mol) en el secado de banano en bandejas (Macedo *et al.*, 2020).

Modelación de las cinéticas de secado

El Cuadro 2 contiene los parámetros cinéticos estimados mediante 4 modelos (Newton, Page, Wang & Singh y Midilli), incluyendo los criterios de calidad (R^2), E(%), RMSE y χ^2) para la evaluación del ajuste. Los resultados mostraron que todos los modelos presentaron buen ajuste; sin embargo, el modelo Midilli fue el que mejor ajustó los valores experimentales en las tres temperaturas de secado por presentar valores de R^2 más próximos a 1,0 y RMSE y χ^2 más cercanos a cero (Figura 2). Algunos investigadores han reportado que el modelo de Midilli modela con precisión el comportamiento del secado en varias frutas como el banano (Macedo *et al.*, 2020) y la piña (Onwude *et al.*, 2016).

Cuadro 2. Parámetros cinéticos de los modelos Newton, Page, Wang & Singh, Midilli para muestras de piña secadas por el método de VR.

Modelo	Temperatura (°C)	Coefficientes modelo	R ²	E (%)	RMSE	x ²
Newton	70	k:1,2140	0,9739	0,4471	0,0492	0,0004
	80	k:1,6810	0,9807	0,8040	0,0445	0,0006
	90	k:2,2710	0,9820	0,8453	0,0421	0,0007
Page	70	k:1,2280 n:1,2220	0,9849	0,2382	0,0374	0,0009
	80	k:1,8210 n:1,2570	0,9928	0,2124	0,0272	0,0002
	90	k:2,6160 n:1,2420	0,9906	0,2804	0,0305	0,0001
Wang & Singh	70	A: -0,1934 B:-0,0761	0,8073	0,5123	0,1336	0,0361
	80	A: -0,4876 B:0,0740	0,8122	0,9904	0,1890	0,0780
	90	A: -0,7317 B:0,2081	0,8347	0,8537	0,1276	0,0292
Midilli	70	k:0,9235 n:1,0150 A:0,9841 B: -0,0748	0,9918	0,1896	0,0276	0,0000
	80	k:1,7230 n:1,2140 A:0,9960 B: -0,0113	0,9934	0,1561	0,0256	0,0000
	90	k:2,5850 n:1,2460 A:0,9920 B: -0,0021	0,9907	0,4313	0,0303	0,0000

Se observa que el parámetro cinético k aumenta con el incremento de la temperatura, lo que indica dependencia con la temperatura; similar comportamiento se observó en el secado de Aloe vera (Jha *et al.*, 2016; Ayala *et al.*, 2021). Esta dependencia con la temperatura indica que k se puede asociar con la pérdida de agua de la muestra, considerándolo como un parámetro pseudo-difusivo (Ah-Hen *et al.*, 2013).

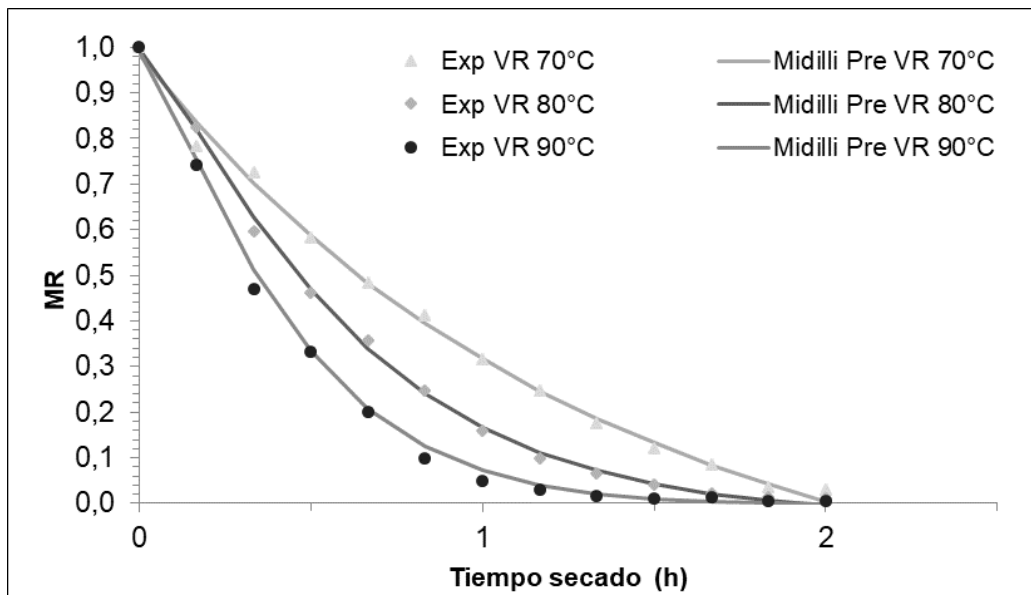


Figura 2. Valores de la relación de humedad predicha por el modelo Midilli frente a la relación de humedad experimental.

Sustituyendo los parámetros del Cuadro 2 (modelo Midilli) y la relación de humedad (MR) en la Ecuación 9 del Cuadro 1, se encontraron los tiempos para las tres temperaturas en el que las muestras de piña alcanzan el CH de 45 % b.h. o su equivalente en base seca de 81,82 %. Los tiempos alcanzados con este modelo de midilli en las tres temperaturas (70, 80 y 90 °C) fueron respectivamente 90, 67 y 50 min.

Color y actividad del agua en muestras de piña con una humedad de 0,45 g agua/ g mt (0,8182 g agua/ g ms)

Del proceso de secado por VR en las tres temperaturas, se obtuvieron muestras de piña con un CH de 45 % (b.h), como pretratamiento al secado por FAC. En el Cuadro 3 se presentan los cambios de color y a_w de muestras de piña en estado fresco y secadas por VR con 45 % (b.h) de humedad. Se observa una disminución de luminosidad y del cambio total de color en las tres temperaturas de secado desde el inicio hasta el nivel de humedad 45 %. Este resultado puede ser atribuido a la temperatura de proceso en la fruta, ya que la piña es susceptible al pardeamiento no enzimático por su alto contenido de azúcares (Zzaman *et al.*, 2021). Sin embargo, al comparar entre los tres pretratamientos, no se observó un efecto significativo ($p > 0,05$) del nivel de temperatura sobre el color (no se evidenciaron efectos en L^* ni en ΔE); este comportamiento puede estar asociado por presentar el mismo nivel de humedad entre los pretratamientos.

Cuadro 3. Valores de color y a_w para diferentes condiciones de deshidratación en piña MD2 secadas a un CH de 45 % (b.h).

Tratamiento	Color				a_w	
	L^*		ΔE			
70 °C	43,88	± 2,19 ^a	6,26	± 0,14 ^a	0,524	± 0,053 ^a
80 °C	42,25	± 1,85 ^a	7,35	± 0,52 ^a	0,522	± 0,019 ^a
90 °C	42,21	± 2,16 ^a	7,67	± 0,35 ^a	0,515	± 0,088 ^a

Letras diferentes indican una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos ($p < 0,05$).

Por otro lado, se observó que la a_w en los pretratamientos disminuyó significativamente ($p < 0,05$) desde 0,987 (estado fresco) hasta valores que variaron entre 0,515 y 0,522, debido a la pérdida de agua durante el secado, ya que la a_w decrece con la disminución del CH. Estos valores de a_w indican que las muestras con 45 % (b.h) son seguras durante el almacenamiento frente al ataque de microorganismos por presentar valores inferiores a la a_w crítica de 0,63 (Ochoa-Martínez *et al.*, 2012; Sethi & Kaur, 2019). Igual que en el color, no se evidenció entre los pretratamientos un efecto significativo ($p > 0,05$) de la temperatura sobre la a_w comportamiento que se esperaba, ya que los pretratamientos presentan similar contenido de humedad.

Secado con tecnología de Fritura con Aire Caliente

En la Figura 3 se observan las curvas de secado de piñas tratadas y no tratadas durante el proceso de deshidratación por la técnica de FAC a 100 °C. El CH inicial de las muestras de piña MNT fue de 0,8541 g agua/mt (5,856 ± 0,18 g agua/g ms), mientras que el CH inicial para las MT fue de 0,4500 ± 0,003 g agua/g mt (0,8182 g agua/g ms), obtenida previamente en el proceso por VR (70, 80 y 90 °C).

Las MT presentaron significativamente ($p < 0,05$) menor contenido de agua con respecto a la MNT (control) para un mismo tiempo de secado; de forma contraria, puede decirse que las MT alcanzaron menor tiempo de secado respecto a la MNT para obtener un mismo nivel de humedad. Puede notarse que para alcanzar un CH del 1 % (b.s), las MT alcanzaron menores tiempos entre 18 y 24 min, mientras que la MNT alcanzó 45 min, resultado esperado ya porque las MT inician con menor contenido de humedad respecto a la MNT.

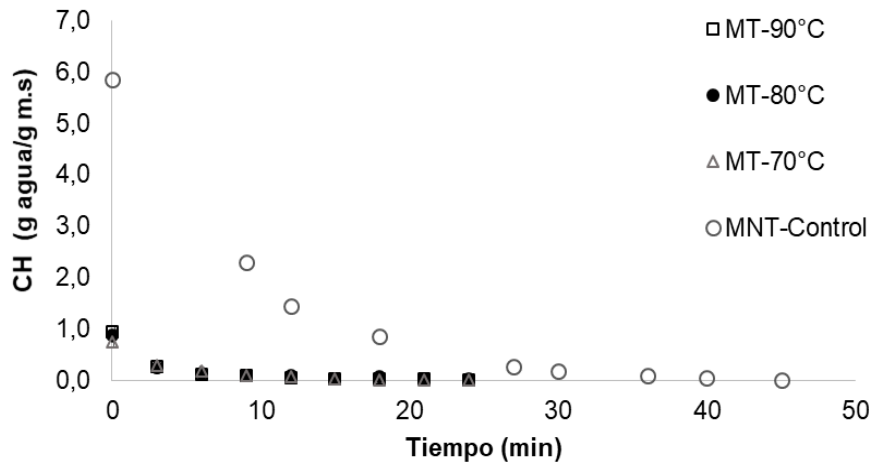


Figura 3. Cinéticas de secado de muestras de piña tratada y no tratada durante el proceso por AF a 100 °C.

Con respecto al CH, entre las MT no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) durante el secado por FAC, lo que indica posiblemente que la temperatura (70, 80 y 90 °C) en el secado por VR no ocasionó cambios significativos en la estructura de la fruta y, por consiguiente, no afectó la salida del agua durante el proceso de FAC. Este resultado también puede estar influenciado por contener el mismo nivel de humedad inicial (45 % b.h), permitiendo la salida del agua a una misma velocidad en los tres pretratamientos.

En el Cuadro 4 se presentan los cambios de color, a_w , y vitamina C de muestras de piña secadas a 100 °C por la técnica de FAC para un CH de 1 % (b.s). La piña en estado fresco (MNT) presenta las siguientes características: $45,02 \pm 0,88$ de luminosidad (L^*), $0,9815 \pm 0,0043$ de a_w y $358,37 \pm 2,35$ mg/100 g m.s de vitamina C.

Cuadro 4. Valores de color, a_w , contenido y pérdida de Vitamina C para muestras de piña MD2 secadas por FAC hasta un CH de 1 % (b.s).

Tratamiento	Color				a_w		Contenido de vit C (mg/100 g m.s)		Pérdida de Vit C (%)
	L^*	ΔE							
MNT (Control)	30,04	$\pm 1,21^a$	19,57	$\pm 0,02^a$	0,195	$\pm 0,008^a$	171,06	$\pm 13,80$	$52,27 \pm 0,92^a$
MT-70 °C	37,21	$\pm 2,41^b$	13,57	$\pm 0,34^b$	0,209	$\pm 0,018^a$	212,69	$\pm 26,85$	$40,65 \pm 0,88^b$
MT-80 °C	36,98	$\pm 1,83^b$	14,09	$\pm 0,22^b$	0,198	$\pm 0,046^a$	224,84	$\pm 32,65$	$37,25 \pm 0,97^b$
MT-90 °C	35,94	$\pm 1,69^b$	14,78	$\pm 0,67^b$	0,184	$\pm 0,039^a$	220,11	$\pm 24,61$	$38,58 \pm 0,54^b$

Letras diferentes indican una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos ($p < 0,05$).

Se presentó un efecto significativo ($p < 0,05$) entre las MT y las MNT sobre la luminosidad y el cambio total de color, mientras que entre las MT no se presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$). Puede notarse que la MNT presentó el menor valor de L^* con $30,04 \pm 1,21$ y el mayor cambio de color ΔE con $19,57 \pm 0,02$, lo que indica que presentó mayor oscurecimiento y, en consecuencia, mayor cambio de color; este comportamiento puede ser atribuido al mayor tiempo de proceso durante el secado por FAC, con 45 min para obtener un CH de 1 % (b.s); mientras que las MT alcanzaron aproximadamente 21 min para este mismo nivel de humedad. Se ha evidenciado que el tiempo de secado influye en el cambio de color; de acuerdo con Izli *et al.* (2018), reportan mayor tiempo de proceso en el secado convectivo a 80 y 90 °C con menores valores de L^* respecto al secado por microondas de muestras de piña. Este comportamiento se ha presentado en otras frutas como en la pera (Marzec *et al.*, 2020) y en la manzana (Rajoriya *et al.*, 2020).

La a_w no mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en los cuatro tratamientos, varió en valores entre 0,195 y 0,209. Estos valores cercanos de a_w pueden ser atribuidos por tener un similar CH. Los resultados de actividad de agua indican que los “snacks” de piña secados por la técnica de FAC son altamente estables contra los microorganismos durante el almacenamiento, ya que presentan valores alejados de la a_w crítica de 0,63 (Ochoa-Martínez *et al.*, 2012; Sethi & Kaur, 2019).

Con respecto a la vitamina C, se presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las MT y MNT al final del secado para un CH de 1 % (b.s). La MNT o control (solo secada por FAC) presentó mayor pérdida de vitamina C frente a las muestras tratadas y posteriormente secadas por FAC; esta mayor pérdida de vitamina C en la MNT (52,27 %) puede asociarse al mayor tiempo (45 min) de exposición al secado a 100 °C. Se ha evidenciado que a mayor tiempo de secado se provocan mayores pérdidas o menor retención de vitaminas en frutas (Marín *et al.*, 2006). Este resultado significa que la reducción de humedad en las MT o método combinado (VR-FAC) mostró un efecto protector frente a la pérdida de vitamina C comparada con la muestra no tratada. Entre las muestras tratadas (70, 80 y 90 °C) no se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$) sobre la pérdida de vitamina C, alcanzando valores relativamente cercanos que variaron entre 37,25 y 40,65 %. Este comportamiento puede ser atribuido al menor tiempo de exposición de las muestras durante el secado por FAC a 100 °C, ya que contenían menor agua al inicio del proceso, secadas previamente por VR. De acuerdo con Ayala *et al.* (2021), la pérdida de vitamina C en los procesos de secado en alimentos se asocia con el hecho de que es uno de los nutrientes más sensibles al calor y a los largos tiempos de secado, por consiguiente, la combinación de estos dos métodos de secado (VR-FAC) permite retener significativamente este nutriente en los snacks de piña por el tiempo corto de secado.

CONCLUSIONES

La técnica de ventana de refractancia demostró obtener tiempos cortos de proceso y mayor coeficiente de difusión del agua con el incremento de la temperatura de secado. El modelo predictivo de Midilli fue el que mejor ajustó las curvas de secado por ventana de refractancia en las tres temperaturas, técnica que presenta un alto potencial como alternativa de conservación de piña, ya sea como pretratamiento o como técnica directa.

Como pretratamiento al proceso de FAC se observa que la VR es efectiva para mantener las propiedades de color y vitamina C en los “snacks” de piña. Se evidencia que muestras de piña pretratadas con VR (con menor contenido de humedad) y posteriormente secadas por la técnica de FAC presentan menores tiempos de secado, mayor retención de la vitamina C y en el color (mayor claridad y menor cambio total de color). Estos resultados demuestran que el secado de piña por el método combinado de VR seguido de la técnica de FAC puede ser una alternativa para obtener un producto tipo “snacks” de piña con tiempos cortos de procesamiento y alta retención de características de color y vitamina C.

AGRADECIMIENTOS

Al Sistema General de Regalías con el proyecto de “Incremento de la competitividad sostenible de la agricultura de ladera en todo el departamento, Valle del Cauca, occidente”. Universidad Nacional – Sede Palmira. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Universidad del Valle – Sede Cali.

REFERENCIAS

- AH-HEN, K.; ZAMBRA, C.E.; AGUËRO, J.E.; VEGA-GÁLVEZ, A.; LEMUS-MONDACA, R. Moisture Diffusivity Coefficient and Convective Drying Modelling of Murta (*Ugni molinae Turcz*): Influence of Temperature and Vacuum on Drying Kinetics. *Food and Bioprocess Technology*, v. 6, n. 4, 2013, p. 919–930.
<https://doi.org/10.1007/s11947-011-0758-5>
- AOAC. Official Methods of Analysis, 13th ed. Association of the Official Agricultural Chemists. Washington D.C. (United States of America): 1980, p. 376-384.
- ASHUTOSH, S.C.; SHWETA, S.; ATUL, D.; POWAR. Optimization of pineapple drying based on energy consumption, nutrient retention, and drying time through Multi-Criteria Decision-Making. *Journal of Cleaner Production*, v. 292, 2021, 135907.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.125913>
- AYALA, A.; CARDENAS, J.D.; TIRADO, D.F. Aloe vera gel drying by Refractance Window: Drying kinetics and High-Quality Retention. *Foods*, v. 10, 2021, n. 1445, p. 1-16.
<https://doi.org/10.3390/foods10071445>
- BERBERT, P.A.; TEREZINHA, M.; DE OLIVEIRA, R.; MARTINAZZO, A.P. Drying of Pineapple Slices in Natura and Pre- Osmodehydrated in Inverted Sugar, v. 32, n. 3, 2016, p. 597–610.
<https://doi.org/10.14393/BJ-v32n3a2016-26201>
- BRAGA, V.; GUIDI, L.R.; DE SANTANA, R.C.; ZOTARELLI, M.F. Production and characterization of pineapple-mint juice by spray drying. *Powder Technology*, v. 375, 2020, p. 409–419.
<https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.08.012>
- CORRÊA, P.C.; OLIVEIRA, G.H.H.; BOTELHO, F.M.; GONELI, A.L.D.; CARVALHO, F.M. Modelagem matemática e determinação das propriedades termodinâmicas do café (*Coffea arabica L.*) durante o processo de secagem. *Revista Ceres*, v. 57, n. 5, 2010, p. 595–601.
<https://doi.org/10.1590/S0034-737X2010000500005>
- DOMINGUEZ, P.; MEDINA, J.J.; MIRANDA, L.; LÓPEZ, J.M; ARIZA, M.T.; SORIA, C.; SANTOS, B.; TORRES, E.A.; HERNANDEZ, I. Effect of Planting and Harvesting Dates on Strawberry Fruit Quality under High Tunnels. *International Journal of Fruit Science*, v. 16, n.1, 2016, p. 228-238.
<https://doi.org/10.1080/15538362.2016.1219291>
- IZLI, N.; IZLI, G.; TASKIN, O. Impact of different drying methods on the drying kinetics, color, total phenolic content and antioxidant capacity of pineapple. *Journal of Food*, v. 16, n. 1, 2018, p. 213-221.
<https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1381174>
- JHA, R.K.; PRABHAKAR, P.K.; SRIVASTAV, P.P.; RAO, V.V. Influence of temperature on vacuum drying characteristics, functional properties and micro structure of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel. *Research in Agricultural Engineering*, v. 61, n. 4, 2016, p. 141–149.
<https://doi.org/10.17221/13/2014-RAE>
- KAVEH, M.; TAGHINEZHAD, E.; AZIZ, M. Effects of physical and chemical pretreatments on drying and quality properties of blackberry (*Rubus spp.*) in hot air dryer. *Food Science and Nutrition*, v. 8, n. 7, 2020, p. 3843–3856.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.1678>
- LEITON-RAMÍREZ, Y.M.; AYALA-APONTE, A.; OCHOA-MARTÍNEZ, C.I. Physicochemical Properties of Guava Snacks as Affected by Drying Technology. *Processes*, v. 8, n. 1, 2020, p. 106.
<https://doi.org/10.3390/pr8010106>
- MACEDO, L.L.; VIMERCATI, W.C.; DA SILVA-ARAÚJO, C.; SARAIVA, S.H.; TEIXEIRA, L.J.Q. Effect of drying air temperature on drying kinetics and physicochemical characteristics of dried banana. *Journal of Food Process Engineering*, v. 43, n. 9, 2020, p. 1–10.
<https://doi.org/10.1111/jfpe.13451>
- MARÍN, B.E.; LEMUS, M.R.; FLORES, M.V.; VEGA, G.A. La rehidratación de alimentos deshidratados. *Revista Chilena de Nutrición*, v. 33, n. 3, 2006, p. 527–538. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182006000500009>
- MARZEC, A.; KOWALSKA, H.; KOWALSKA, J.; DOMIAN, E.; LENART, A. Influence of Pear Variety and Drying Methods on the Quality of Dried Fruit. *Molecules* (Basel, Switzerland), v. 25, n. 21, 2020.
<https://doi.org/10.3390/molecules25215146>

- MICHALEWICZ, J.S.; HENRIQUEZ, J.R.; CHARAMBA, J.C. Secado de Cajuil (*Anacardium Occidentale L.*): Estudio Experimental y Modelado de la Cinética de Secado. *Información Tecnológica*, v. 22, n. 6, 2011, p. 63–74.
<https://doi.org/10.4067/S0718-07642011000600007>
- MOHAMMED, S.; EDNA, M.; SIRAJ, K. The effect of traditional and improved solar drying methods on the sensory quality and nutritional composition of fruits: A case of mangoes and pineapples. *Heliyon*, v. 6, n. 6, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04163>
- MONTES, E.J.; TORRES, R.; ANDRADE, R.D.; PÉREZ, O.A.; MARIMON, J.L.; MEZA, I.I. Modelado de la cinética de secado de ñame (*Dioscorea rotundata*) en capa delgada. *Ingeniería e Investigación*, v. 28, n. 2, 2008, p. 45–52.
- MOUSSAOUI, H.; BAHAMMOU, Y.; TAGNAMAS, Z.; KOUHILA, M.; LAMHARRAR, A.; IDLIMAM, A. Application of solar drying on the apple peels using an indirect hybrid solar-electrical forced convection dryer. *Renewable Energy*, v. 168, 2021, p. 131–140.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.12.046>
- NEMZER, B.; VARGAS, L.; XIA, X.; SINTARA, M.; FENG, H. Phytochemical and physical properties of blueberries, tart cherries, strawberries, and cranberries as affected by different drying methods. *Food Chemistry*, v. 262, 2018, p. 242–250.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.047>
- OCHOA-MARTÍNEZ, C.I.; QUINTERO, P.T.; AYALA, A.A.; ORTIZ, M.J. Drying characteristics of mango slices using the Refractance Window™ technique. *Journal of Food Engineering*, v. 109, n. 1, 2012, p. 69–75.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.032>
- OCHOA-MARTÍNEZ, C.I.; AYALA-APONTE, A. Modelos matemáticos de transferencia de masa en Deshidratación Osmótica. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, v. 4, n. 5, 2005, p. 330–342.
<https://doi.org/10.1080/11358120509487660>
- OLANIPEKUN, B.F.; TUNDE-AKINTUNDE, T.Y.; OYELADE, O.J.; ADEBISI, M.G.; ADENAYA, T.A. Mathematical Modeling of Thin-Layer Pineapple Drying. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 39, n. 6, 2015, p. 1431–1441.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.12362>
- OLMOS, A. Cadena regional de piña departamento de Casanare. Yopal (Casanare): Gobernación de Casanare, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente, 2015, p. 1-15.
- ONWUDE, D.I.; HASHIM, N.; JANIUS, R.B.; NAWI, N.M.; ABDAN, K. Modeling the Thin-Layer Drying of Fruits and Vegetables: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 15, n. 3, 2016, p. 599–618.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12196>
- ORTIZ-JEREZ, M.J.; GULATI, T.; DATTA, A.K.; OCHOA-MARTÍNEZ, C.I. Quantitative understanding of Refractance Window™ drying. *Food and Bioproducts Processing*, v. 95, 2015, p. 237–253.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.05.010>
- PONKHAM, K.; MEESO, N.; SOPONRONNARIT, S.; SIRIAMORN PUN, S. Modeling of combined far-infrared radiation and air drying of a ring shaped-pineapple with/without shrinkage. *Food and Bioproducts Processing*, v. 90, n. 2, 2012, p. 155–164.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.02.008>
- POVEDA, N. Determinación de la influencia de las zonas de producción sobre el contenido de componentes bioactivos y la capacidad antioxidante de cinco frutas andinas [Tesis Ingeniería Bioquímica]. Ambato (Perú): Universidad Técnica de Ambato, 2014, p. 1-146.
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8454/1/BQ%2055.pdf>
- RAGHAVI, L.M.; MOSES, J.A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Refractance window drying of foods: A review. *Journal of Food Engineering*, v. 222, 2018, p. 267–275.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.032>
- RAJORIYA, D.; SHEWALE, S.R.; BHAVYA, M.L.; HEBBAR, H.U. Far infrared assisted refractance window drying of apple slices: Comparative study on flavour, nutrient retention and drying characteristics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 66, 2020, 102530.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102530>

- RANI, P.; TRIPATHY, P.P. Effect of ultrasound and chemical pretreatment on drying characteristics and quality attributes of hot air-dried pineapple slices. *Journal of Food Science and Technology*, v. 56, n. 11, 2019, p. 4911–4924.
<https://doi.org/10.1007/s13197-019-03961-w>
- SALAZAR, D.M.; ÁLVAREZ, F.C.; ACURIO, L.P.; PEREZ, L.V.; ARANCIBIA, M.Y.; CARVAJAL, M.G.; VALENCIA, A.F.; RODRIGUEZ, C.A. Osmotic concentration of pineapple (*Cayenne lisse*) as a pretreatment for convection drying. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 292, n. 1, 2019.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/292/1/012039>
- SETHI, K.; KAUR, M. Effect of osmotic dehydration on physicochemical properties of pineapple using honey, sucrose and honey-sucrose solutions. *International Journal of Engineering and Advanced Technology*, v. 9, n. 1, 2019, p. 6257–6262.
<https://doi.org/10.35940/ijeat.A2026.109119>
- SHAKER, M.A. Comparison between traditional deep-fat frying and air-frying for production of healthy fried potato strips. *International Food Research Journal*, v. 22, n. 4, 2015, p. 1557–1563.
- SILVA, K.S.; GARCIA, C.C.; AMADO, L.R.; MAURO, M.A. Effects of Edible Coatings on Convective Drying and Characteristics of the Dried Pineapple. *Food and Bioprocess Technology*, v. 8, n. 7, 2015, p. 1465–1475.
<https://doi.org/10.1007/s11947-015-1495-y>
- SOUZA, D.G.; RESENDE, O.; DE MOURA, L.C.; JUNIOR, W.N.F.; ANDRADE, J.W.D.S. Drying kinetics of the sliced pulp of biofortified sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Engenharia Agrícola*, v. 39, n. 2, 2019, p. 176–181.
<https://doi.org/10.1590/1809-4430-eng.agric.v39n2p176-181/2019>
- VEGA, A.; URIBE, E.; LEMUS, R.; MIRANDA, M. Hot-air drying characteristics of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) and influence of temperature on kinetic parameters. *LWT–Food Science and Technology*, v. 40, n. 10, 2007, p. 1698–1707.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.01.001>
- VEGA-GÁLVEZ, A.; TELLO-IRELAND, C.; LEMUS-MONDACA, R. Simulación matemática del proceso de secado de la gracilaria chilena (*Gracilaria Chilensis*). *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería*, v. 15, n. 1, 2007.
<https://doi.org/10.4067/S0718-33052007000100008>
- VILLAMIZAR, R.H.; QUICENO, M.C.; GIRALDO, G.A. Effect of vacuum frying process on the quality of a snack of mango (*Mangifera indica* L.). *Acta Agronómica*, v. 61, n. 1, 2012, p. 40–51.
- WU, M.Y.; SHIAU, S.Y. Effect of the Amount and Particle Size of Pineapple Peel Fiber on Dough Rheology and Steamed Bread Quality. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 39, n. 6, 2015, p. 549–558.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.12260>
- ZHANG, M.; CHEN, H.; MUJUMDAR, A.S.; TANG, J.; MIAO, S.; WANG, Y. Recent developments in high-quality drying of vegetables, fruits, and aquatic products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 57, n. 6, 2017, p. 1239–1255.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2014.979280>
- ZHANG, Z.; WEI, Q.; NIE, M.; JIANG, N.; LIU, C.; LIU, C.; LI, D.; XU, L. Microstructure and bioaccessibility of different carotenoid species as affected by hot air drying: Study on carrot, sweet potato, yellow bell pepper and broccoli. *LWT Food Science and Technology*, v. 96, 2018, p. 357–363.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.061>
- ZZAMAN, W.; BISWAS, R.; HOSSAIN, M. A. Application of immersion pre-treatments and drying temperatures to improve comprehensive quality of pineapple (*Ananas comosus*) slices. *Heliyon*, v. 7, n. 1, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05882>

Lipasa de semillas de *Pachira speciosa* inmovilizadas en esferas de quitosano: un sistema bio-catalítico reusable*

Lipase of *Pachira speciosa* seeds immobilized in chitosan beads: a recyclable bio-catalytic system

VALENZUELA-JARAMILLO, IVON-ESHER¹; MENDOZA-MEZA, DARY²

RESUMEN

*Las lipasas vegetales son biocatalizadores altamente versátiles debido a su quimioselectividad, enantioselectividad y regioselectividad. El propósito fue obtener un biocatalizador reusable a partir de lipasas de semillas de *Pachira speciosa*, aplicable a la bioconversión de lípidos. Se obtuvo una lipasa parcialmente purificada de extractos de semillas de *P. speciosa*, median-*

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 21 marzo 2021.

Aprobado para publicación: 21 octubre 2021.

* Proyecto de investigación de origen: "Aprovechamiento de lipasas y de frutos oleaginosos de origen vegetal provenientes de la región Caribe colombiana para la obtención de biocombustibles". Financiación: Universidad del Atlántico. Culminación: 15 de marzo de 2019.

1 Universidad del Atlántico, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de investigación en Productos Naturales y Bioquímica de Macromoléculas. MSc. Química. Puerto Colombia, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-1992-7511>

2 Universidad del Atlántico, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de investigación en Productos Naturales y Bioquímica de Macromoléculas. Ph.D. Biotecnología. Puerto Colombia, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-0609-6480>

Correspondencia: darymendoza@mail.uniatlantico.edu.co

Cómo citar este artículo: VALENZUELA-JARAMILLO, IVON-ESHER; MENDOZA-MEZA, DARY. Lipase of *Pachira speciosa* seeds immobilized in chitosan beads: a recyclable bio-catalytic system. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 20, n. 1, 2022, p. 179-193. Doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v.n.2022.1890>

te cromatografía de filtración en gel en Sephadex G-100; la actividad específica lipasa (AL_e) se determinó mediante titulación de ácidos grasos libres. Se aplicó un diseño de superficie de respuesta Box-Behnken para establecer las condiciones que maximizan la inmovilización de la lipasa a tres soportes: esferas de quitosano (Q), esferas de alginato de calcio cubiertas con quitosano (Alg-Q) y esferas magnéticas de quitosano- $Fe(OH)_3$ (Q-Fe). La mayor AL_e de la enzima libre fue $8,23 \pm 0,23$ nKat/mg de proteína, a $40^\circ C$ y pH 9. El porcentaje de inmovilización y la AL_e (nKat/mg de esferas) de cada biocatalizador fue: Q = $90,6\%$ y $3,74 \pm 0,3$ nKat/mg; Alg-Q = $88,5\%$ y $3,62 \pm 0,1$ nKat/mg; EQ-Fe = $76,4\%$ y $2,88 \pm 0,1$ nKat/mg. El biocatalizador más estable fue la lipasa inmovilizada en quitosano, con 85% de retención de la AL_e hasta el tercer ciclo catalítico. Estudios futuros estarán enfocados a establecer los parámetros cinéticos del biocatalizador.

ABSTRACT

Plant lipases are highly versatile biocatalysts due to their chemo-selectivity, enantio-selectivity, and region-selectivity. The purpose was to obtain a recyclable biocatalyst from *Pachira speciosa* seed lipases, applicable to lipid bioconversion. A partially purified lipase was obtained from *P. speciosa* seed extracts, by gel filtration chromatography on Sephadex G-100; the specific lipase activity (LA_s) was determined by free fatty acid titration. A Box-Behnken response surface design was applied to establish conditions that maximize lipase immobilization to three supports: chitosan beads (Ch), calcium alginate beads coated with chitosan (Alg-Ch), and chitosan- $Fe(OH)_3$ magnetic beads (Ch-Fe). The highest LA_s of the free enzyme was $8,23 \pm 0,23$ nKat/mg of protein at $40^\circ C$ and pH 9. The immobilization percentage and LA_s (nKat/mg of beads) of each biocatalyst was EQ = $90,6\%$ and $3,74 \pm 0,3$ nKat/mg; Alg-Q = $88,5\%$ and $3,62 \pm 0,1$ nKat/mg; EQ-Fe = $76,4\%$ and $2,88 \pm 0,1$ nKat/mg. The most stable biocatalyst was the lipase immobilized in Ch, with 85% retention of LA_s until the third catalytic cycle. Future studies will be focused on establishing the kinetic parameters of the biocatalyst.

INTRODUCCIÓN

Las lipasas (E.C. 3.1.1.3) son enzimas altamente versátiles muy utilizadas en procesos biotecnológicos como la producción de detergentes, surfactantes, biopolímeros, aromatizantes, cosméticos (Patel *et al.*, 2019; Chandra *et al.*, 2020) y fármacos quirales (Ehlert *et al.*, 2019); también, en la bioconversión de alimentos (Akshita *et al.*, 2020) y en la síntesis de bio-combustibles (Lv *et al.*, 2021). Después de las proteasas, las lipasas son las enzimas más utilizadas en la industria, por lo que hay un gran interés en la búsqueda de nuevas fuentes que satisfagan las necesidades de un mercado en crecimiento (Fatima *et al.*, 2020).

Comparada con la catálisis química convencional, la catálisis mediada por lipasas presenta algunas ventajas que han llamado la atención de la industria biotecnológica, como son: mayor economía en el gasto del catalizador, condiciones de reacción suaves (temperatura y pH), baja generación de

PALABRAS CLAVES:

Pachira speciosa; Lipasa vegetal; Biocatalizador; Actividad lipolítica; Inmovilización; Quitosano; Alginato; Esferas magnéticas; Actividad residual; Bioconversión.

KEYWORDS:

Pachira speciosa; Plant lipase; Biocatalyst; Lipase activity; Immobilization; Chitosan; Alginate; Magnetic beads; Residual activity; Bioconversion.

desechos y mayor capacidad de resolución de mezclas racémicas (Pereira-Cipolatti *et al.*, 2019). Si bien las lipasas de origen microbiano (Ej. *Pseudomonas cepacia*, *Rhizopus oryzae* y *Candida antarctica*) son las más usadas en biotecnología (Chandra *et al.*, 2020; Fatima *et al.*, 2020), la producción de algunas de ellas es limitada por los altos costos que demanda el cultivo de microorganismos y los procesos de extracción y purificación. Los esfuerzos para solucionar estos problemas se han enfocado en el uso de cepas modificadas genéticamente para ser altamente productoras (Jares-Contesini *et al.*, 2020), la optimización de condiciones de fermentación (Bharathi *et al.*, 2019) y el desarrollo de procesos aguas abajo más eficientes (Khoo *et al.*, 2020). Por otra parte, también se investigan fuentes alternativas de lipasas, como las plantas (Seth *et al.*, 2014) a partir del látex de *Carica papaya* (Nhat *et al.*, 2019) y algunas lipasas de semillas oleaginosas en germinación han sido exploradas (Kawinski *et al.*, 2021).

Las especies del género *Pachira* (Malvaceae: Bombacoideae) son plantas tropicales, nativas de Sudamérica. Aunque en Colombia se consideran endémicas de la región Amazónica (Guevara-Andino *et al.*, 2018), estas se encuentran distribuidas en varias zonas, donde se utilizan principalmente como plantas ornamentales. *Pachira speciosa* Triana and Planch y *P. aquatica* Aubl pertenecen al mismo grupo de especies con frutos en forma de cápsula leñosa y semillas oleaginosas grandes y desnudas (Bernal *et al.*, 2015). Perez-Polizelli *et al.* (2008), mencionan las características de la lipasa de *P. aquatica*, que son deseables en procesos de biotransformación de lípidos, como su alta estabilidad a pH alcalinos y en diferentes solventes orgánicos, así como afinidad elevada por ésteres de ácidos grasos de cadena larga; no obstante, las enzimas que se encuentran en estado libre poseen baja estabilidad estructural, lo cual limita su reutilización y encarece los procesos biocatalíticos. La inmovilización de enzimas en diferentes tipos de soportes ya sea de naturaleza orgánica, inorgánica o mixta, ha mostrado ser efectiva para mejorar características funcionales como la estabilidad y la reusabilidad (Alnoch *et al.*, 2020), sin embargo, los soportes pueden afectar las propiedades de la enzima, de aquí la necesidad de escoger el material más apropiado.

El propósito de la presente investigación fue producir un sistema biocatalítico reciclable a partir de la lipasa extraída de semillas de *P. speciosa* inmovilizada en tres soportes a base de quitosano. El nuevo biocatalizador se constituiría en una alternativa económica en procesos de transformación de lípidos de interés para la industria biotecnológica nacional.

MÉTODO

Material biológico

Los frutos de *P. speciosa* se colectaron en el mes de marzo de 2018 en el Campus de la Universidad del Atlántico, municipio de Puerto Colombia, departamento del Atlántico (Coordenadas geográficas: 11°01'N y 74°52'O; temperatura: 28 °C; humedad relativa: 85 %). La identidad botánica de la planta fue establecida en el Herbario del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (No. COL576764).

Extracción de la lipasa

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Peres-Polizelli *et al.* (2008), con modificaciones; las semillas desnudas se mezclaron con un tampón de lisis (EDTA 0,001M; DTT 0,003M; $K_2S_2O_5$ 0,016 M; Tris-HCl 0,05 M, pH 8), usando la relación 0,3:1 (p/v). La mezcla se homogenizó en un procesador Osterizer® Blender durante 15 min, seguida de agitación (320 rpm) por 24 h a 15 °C, en un equipo Velp Scientifica ARE 230 V/50-60 Hzd y centrifugación a 4000 rpm por 40 min y 4 °C. El sobrenadante (extracto crudo) se almacenó a 4 °C.

La concentración de proteína total en el extracto se determinó mediante ensayo de Bradford (Kielkopf *et al.*, 2020), usando el estuche comercial QuickStart™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad) y una curva estándar de albumina sérica bovina.

Caracterización de la lipasa de *P. speciosa*

Cromatografía de filtración en gel. Se realizó la purificación parcial de la lipasa de *P. speciosa* en una columna Sephadex® G-100 (Sigma-Aldrich), usando el método descrito por Kumar *et al.* (2020) con modificaciones. Se agregaron a la columna 5 mL del extracto crudo de *P. speciosa*, la elución se realizó con buffer PBS 0,01 M (pH 7,4)/NaCl 0,015 M. Se colectaron alícuotas de 0,5 mL en viales eppendoff, monitoreando las proteínas a longitud de onda de 280 nm en un espectrómetro GENESYS 10S UV/Vis (Thermo Scientific™). Los eluidos se almacenaron a -20 °C.

Actividad lipolítica (AL). Se determinó en los eluidos de la columna Sephadex G-100, mediante método volumétrico (Urquijo-Rodríguez *et al.*, 2020). Brevemente, se preparó una emulsión compuesta por aceite de canola (1,25 g), agua destilada (1,25 g), Tris 40 mmol/mL, pH 8,3 (2 mL) y Tritón X-1000 (125 g). La hidrólisis del aceite emulsificado se realizó en matraces de 125 mL, en un baño termostático Dubnoff TPA-304 (Ethik Technology) con movimiento recíproco a 200 rpm. Después de 10 min de agitación se agregaron a la emulsión 950 µL de la lipasa. La reacción se detuvo con 10 mL de etanol:acetona en relación 1:1 (v/v). Para determinar los ácidos grasos liberados en la reacción, se adicionaron 10 mL de NaOH 0,05 M y tres gotas de fenolftaleína, luego se valoró el exceso de NaOH con una solución estandarizada de HCl 0,05 M. Se incluyó un blanco de reacción por tratamiento (emulsión con la enzima desnaturalizada a 100 °C). La AL se expresó en unidades de nKatal por mililitro de extracto (nKat/mL) y en unidades actividad enzimática específica (AL_e), de acuerdo con las ecuaciones 1 y 2.

$$AL \text{ (nKat/mL)} = (V_b - V_m) \times M \times 1000000 / (t \times V) \quad (\text{Ec. 1})$$

$$AL_e = \text{nKat} / (\text{mg de proteína}) \quad (\text{Ec. 2})$$

Dónde,

- V_b = Volumen de HCl gastado en la titulación del blanco.
- V_m = Volumen de HCl gastado en la titulación de la muestra.
- M = Molaridad del HCl.
- t = Tiempo de incubación en segundos.
- V = Volumen de enzima en la reacción.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se realizó de acuerdo con el protocolo de Zienkiewicz *et al.* (2015), en geles de poliacrilamida (gel separador 12 %T y gel concentrador 4 %C) y un equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad®). Brevemente, 10 µL de muestra (1 µg/µL de proteína) se mezclaron con 10 µL del buffer Laemmli-2X (Bio-Rad®), con 2-mercaptoetanol (condición reductora) y sin 2-mercaptoetanol (no reductora), luego se cargaron en el gel. El corrido electroforético se ejecutó a 100 V por 2 h. Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (Merck., S.A., Darmstadt, Germany), luego se visualizaron en un equipo UVP ImagingSys EC3410 LMS-26 97-0279-01 (Bio-Rad®).

Efecto de la temperatura y el pH en la AL

Se aplicó un diseño experimental 2² para establecer las condiciones de temperatura y pH que maximicen la AL de la lipasa parcialmente purificada de *P. speciosa*. Se evaluaron dos niveles de pH usando un tampón de acetato de sodio 0,1 M/EDTA 0,01M (pH 5) o tampón Tris 0,03 M (pH 9); también se evaluaron dos niveles de temperatura (20 y 60 °C). Estos parámetros se eligieron tomando como referencia el estudio de Peres-Polizelli *et al.* (2008), e tanto que la AL se evaluó siguiendo el método volumétrico descrito arriba con un tiempo de reacción de 90 min.

Soportes de inmovilización

Se sintetizaron tres soportes de inmovilización, a saber: Esferas de quitosano (Q), de acuerdo con el protocolo de Biro *et al.* (2008); esferas magnéticas de quitosano-Fe(OH)₃ (Q-Fe), de acuerdo con Pospiskova and Safarik (2013) y, esferas de alginato recubiertas con quitosano (Alg-Q), según Bai and Wu (2021).

Caracterización de los soportes

EL tamaño y forma de los soportes se determinó en un microscopio Dinolite AD 413t I2V con iluminación azul (400 nm), infrarroja (940 nm) y magnificación óptica de 10X. Adicionalmente, la superficie de los soportes se analizó en un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) TESCAN® modelo Vega 3, de acuerdo con el protocolo descrito por Santos-Duarte *et al.* (2019).

Inmovilización de la lipasa de *P. speciosa*

Se realizó mediante el método de entrecruzamiento covalente (Pal and Khanum, 2011). Inicialmente, las esferas se funcionalizaron con glutaraldehído y se analizaron mediante espectroscopía de infrarrojo medio con transformada de fourier (FT-MIR) en un equipo Perkin Elmer Modelo Spectrum Two 93881, midiendo el espectro de absorción de cada muestra (16 barridos/muestra) en el rango de 450 a 4000 cm⁻¹. Luego, se optimizaron las condiciones de inmovilización de la lipasa mediante un diseño experimental de superficie de respuesta Box-Behnken con dos bloques (Cuadro 1). En cada reacción de inmovilización se utilizaron 0,2 g de esferas y 10 mL de glutaraldehído. Todas las reacciones se mantuvieron en agitación a 150 rpm por varios minutos (de acuerdo con el diseño). Finalizado el tiempo de reacción, las esferas se separaron del medio y el exceso de glutaraldehído se lavó varias veces con agua destilada. Cada soporte funcionalizado se mezcló con 5 mL de la lipasa parcialmente purificada de *P. speciosa* (1 mg/mL) disuelta en Tris 0,03 M (pH 9), seguido de incubación a 4 °C y agitación constante (100 rpm) durante 12 h. Finalmente, las esferas se filtraron y lavaron varias veces con el buffer Tris y se almacenaron a 4 °C. El porcentaje de proteína inmovilizada (variable respuesta) se calculó mediante la ecuación 3.

$$\% \text{ Inmovilización} = ((P_{\text{total}} - P_{\text{lavado}})/P_{\text{total}}) \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde, P_{total} corresponde a la concentración de proteína total en la reacción y P_{lavado} a la concentración de proteína en las aguas de lavado.

Cuadro 1. Diseño Box-Behnken para las condiciones de inmovilización de la lipasa de semillas de *P. speciosa*.

Factores	Niveles de los factores		
	-1	0	+1
A: Tiempo de reacción (h)	2	7	12
B: Glutaraldehído (mM)	3	5,5	8
C: Quitosano (g %)	1	1,5	2

AL_e y estabilidad de la lipasa inmovilizada

La AL_e se determinó usando el método volumétrico, mezclando 3 g de la enzima inmovilizada (esferas) con 10 mL del aceite de canola emulsificado. Los resultados se expresaron en unidades nKat/mg de esferas (Ecuación 4), donde:

$$\text{nKat/mg esferas} = \left(\frac{\text{nmol AGL} \cdot \text{s}^{-1}}{\text{mg de proteína}} \right) \times \left(\frac{\text{mg de proteína}}{\text{mg de esferas}} \right) \quad (\text{Ec. 4})$$

Para establecer la estabilidad de la lipasa inmovilizada, el sistema biocatalítico se separó de la mezcla de reacción, se lavó con agua ultrapura y solución Tris (pH 9), luego se utilizó en un nuevo ciclo de reacción hasta completar 5 ciclos. Para el cálculo de la actividad residual de la lipasa se tuvo en cuenta un 100 % de rendimiento de la AL_e para el primer ciclo.

Análisis estadístico

Los ensayos de AL se realizaron por triplicado. Los resultados se presentan como valores de la media \pm desviación estándar. Las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante ANOVA de una vía (significancia del 95 %); también, se usó la prueba post-hoc de diferencia significativa honesta de Tukey (I.C. 95 %), en el paquete estadístico RStudio versión 1.4.1106. El diseño de superficie de respuesta se realizó y analizó con el paquete estadístico Statgraphics Centurion (versión XVI 16.1.18), mientras que los gráficos se realizaron en RStudio.

RESULTADOS

Caracterización de la lipasa de semillas de *P. speciosa*

El rendimiento de extracción y la concentración de proteína total de las semillas de *P. speciosa* fue de $64 \pm 1,53$ % p/p y $1,92 \pm 0,46$ g/mL, respectivamente. Este resultado fue ligeramente menor al presentado por Peres-Polizelli *et al.* (2008) con la lipasa de semillas de *P. aquatica* (2,62 g/mL), usando condiciones de extracción similares, lo cual puede atribuirse a diferencia bióticas y abióticas entre las plantas utilizadas en los dos estudios.

En general, las semillas poseen alto contenido de proteínas de almacenamiento, las cuales tienen poca o ninguna actividad catalítica, por lo que es necesario reducir su proporción en el extracto y obtener fracciones ricas en lipasa para el proceso de inmovilización. La cromatografía en Sephadex G-100 logró separar dos fracciones (4 y 11) con alto contenido de proteínas (mayor absorbancia a 280 nm) y AL (Figura 1A). El análisis por SDS-PAGE de la fracción 4 con mayor AL, detectó una banda mayoritaria de 60 kDa en condición no reductora y, dos bandas de 32 y 28 kDa, en condición reductora (Figura 1B), sugiriendo que esta lipasa presenta dos cadenas polipeptídicas unidas mediante enlaces disulfuros, lo cual deberá confirmarse con análisis estructurales. Adicionalmente, el tamaño observado es cercano al reportado para otras lipasas de semillas oleaginosas (Mukherjee, 1994), incluida la lipasa de *P. aquatica* (55 kDa) (Peres-Polizelli *et al.*, 2008).

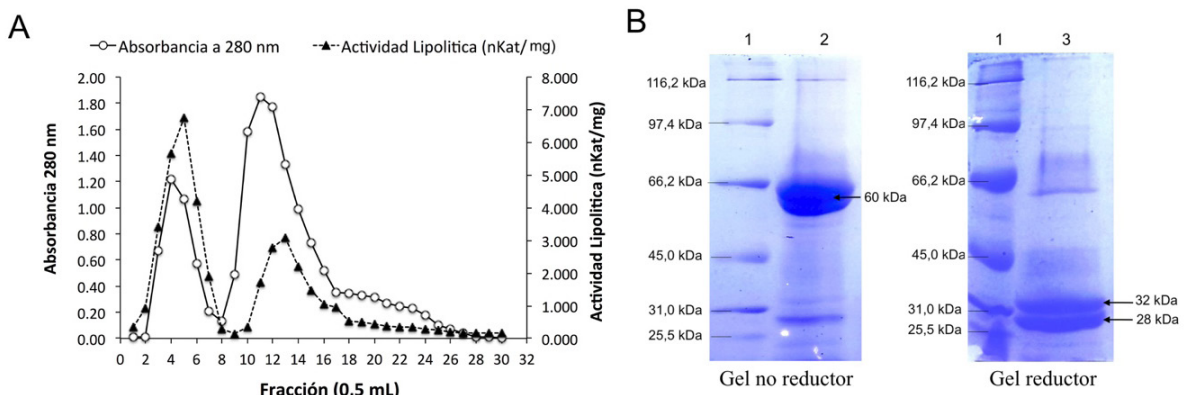


Figura 1. Caracterización de la lipasa de *P. speciosa*. A. Cromatografía de filtración en Sephadex G-100). B. SDS-PAGE. Carril1. Marcador de peso molecular (Broad range, Bio-Rad®); Carril 2. Gel no reductor; Carril 3: Gel reductor.

Efecto del pH y la temperatura

La máxima AL ($18,33 \pm 0,25$ nKat/mL; $AL_e = 7,57 \pm 0,33$ nKat/mg) fue detectada a pH 9 y 60 °C a los 90 min de reacción (ANOVA: Razón F= 147,9; Valor p= $2,4 \times 10^{-7}$). Cuando el experimento se llevó a cabo en tiempos de reacción mayores a 90 min se produjo reducción de la actividad (dato no mostrado), lo cual puede atribuirse a la acidificación del medio de reacción debido a la acumulación de ácidos grasos libres y a la posible desestabilización de la interfaz sustrato-enzima (Albayati *et al.*, 2020). El pH del medio de reacción es uno de los factores críticos en la catálisis enzimática, debido a su influencia en el estado de ionización de las cadenas laterales de los aminoácidos y las constantes de ionización (pKa) de los aminoácidos catalíticos, relacionadas con la conformación del sitio activo y con las velocidades de reacción del enzima (Swagata *et al.*, 2019). Por otra parte, la capacidad de esta lipasa para actuar a pH alcalino podría ampliar su abanico de aplicaciones a la biodegradación de las películas de lípidos en aguas residuales urbanas, contribuyendo a la reducción de la contaminación ambiental (Hu *et al.*, 2018). También, como otras lipasas alcalinas, esta enzima podría usarse en la síntesis de ésteres para la industria de alimentos procesados (Cong *et al.*, 2019).

Respecto a la temperatura, se realizó un experimento ampliando el rango de operación entre 20 y 80 °C, con intervalos de 20 °C, manteniendo fijo el pH en 9, con el propósito de establecer con mayor exactitud la temperatura óptima de reacción. El análisis de ANOVA mostró que existe diferencia significativa en la AL de los tratamientos (Valor p= $1,12 \times 10^{-6}$). El cambio de temperatura de 20 a 40 °C incrementó 3 veces la AL_e de la enzima, no obstante, cuando la temperatura se fijó en 60 °C la actividad decayó en aproximadamente 18 % y continuó disminuyendo a los 80 °C, resultado que permitió establecer la temperatura óptima de reacción en 40 °C con una $AL_e = 8,23 \pm 0,23$ nKat/mg (Figura 2B).

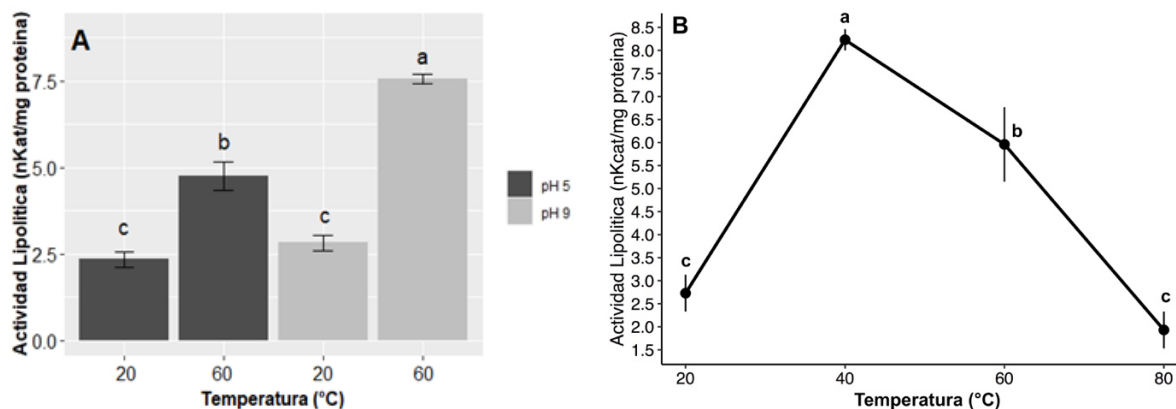


Figura 2. Efecto de la temperatura y pH en la actividad catalítica de la lipasa de *P. speciosa*. A. Gráfico de interacción temperatura-pH. B. Efecto de la temperatura a pH 9. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa según la prueba post-hoc de Tukey (Valor p < 0,005).

Soportes de inmovilización

Se lograron sintetizar tres soportes de inmovilización a base de quitosano. Q y Alg-Q presentaron forma esférica con diámetro de $1,5 \pm 0,14$ y $2 \pm 0,2$ mm, respectivamente. En el caso del Q-Fe, se obtuvo un material de color oscuro compuesto por partículas finas y agregadas de óxido de hierro con diámetros entre 30 y 120 μ m. La MEB evidenció presencia de poros en la superficie de los tres soportes, los cuales fueron de forma y tamaño irregular, siendo el soporte Q-Fe el material más poroso (Figura 3). El tamaño de las esferas es uno de los parámetros importantes en la inmovilización de las enzimas; se considera que a menor diámetro, habrá mayor actividad catalítica debido a que se reduce la resistencia a la transferencia del sustrato y se incrementa el área de superficie funcional del soporte (Xie *et al.*, 2009). Por otra parte, la porosidad y el tamaño de poro de la superficie del soporte tiene mayor influencia en los métodos de inmovilización por atrapamiento físico.

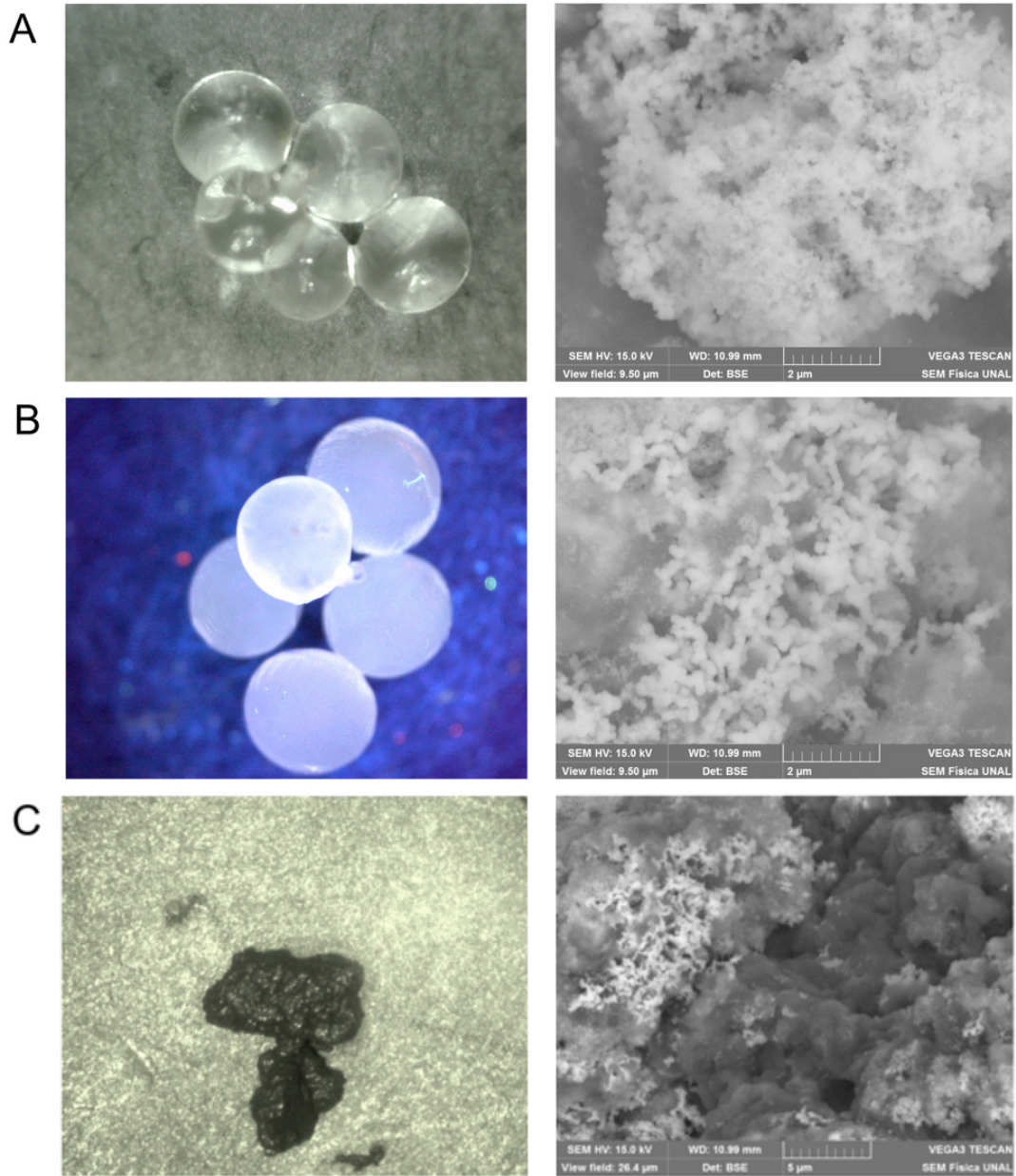


Figura 3. Soportes de inmovilización de la lipasa de *P. speciosa*. A. Esferas de quitosano; B. Esferas de alginato de calcio-quitosano; C. Esferas magnéticas de quitosano- $\text{Fe}(\text{OH})_3$.

En cuanto al proceso de funcionalización, se pudo comprobar mediante FT-MIR formación de enlaces imino ($\text{C} = \text{N}$) y etilénico ($\text{C} = \text{C}$) entre el glutaraldehído y el quitosano (bandas a 1638 cm^{-1} y 1557 cm^{-1} , respectivamente) en los tres soportes. La señal intensa a 3345 cm^{-1} corresponde al grupo OH de las moléculas de agua (Figura 4).

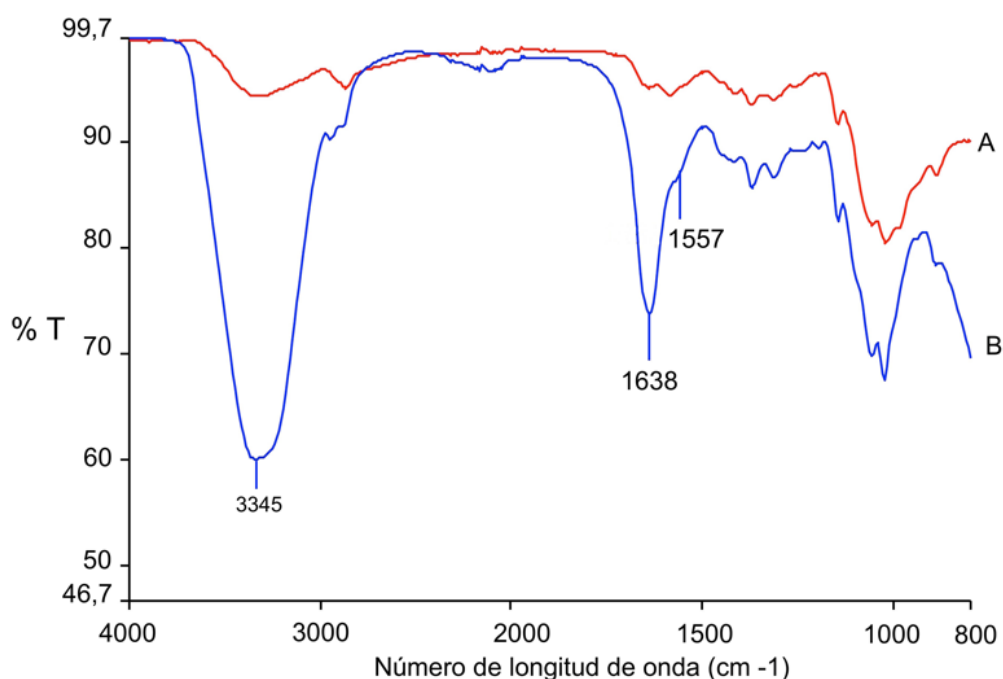


Figura 4. Espectro FT-MIR representativo del quitosano antes (A) y después de la funcionalización con glutaraldehído (B).

Inmovilización de la lipasa de semillas de *P. speciosa*

El cuadro 2 presenta los porcentajes de inmovilización de la lipasa de *P. speciosa* en los tres soportes, para cada tratamiento del diseño Box-Behnken. Los porcentajes máximos fueron de $79,70 \pm 0,57$ en Q; $77,1 \pm 2,35$ en Alg-Q y $78,60 \pm 2,47$ en Q-Fe.

Cuadro 2. Porcentaje de inmovilización de la lipasa parcialmente purificada de semillas de *P. speciosa*.

T	Factores			% Inmovilización ^a		
	A	B	C	Q	Alg-Q	Q-Fe
1	-1	-1	0	14,10	32,90	2,60
2	+1	-1	0	74,50	77,08	48,90
3	-1	+1	0	4,40	20,82	3,50
4	+1	+1	0	79,70	54,16	47,20
5	-1	0	-1	14,90	11,23	50,70
6	+1	0	-1	49,40	62,91	78,60
7	-1	0	+1	3,60	19,98	27,10
8	+1	0	+1	48,60	75,83	59,40
9	0	-1	-1	7,30	21,65	35,80
10	0	+1	-1	70,40	10,81	25,30
11	0	-1	+1	29,57	37,07	3,50
12	0	+1	+1	17,00	2,06	7,00
13	0	0	0	21,40	61,70	41,00
14	0	0	0	23,00	63,30	38,40
15	0	0	0	19,40	67,50	32,30

^aValores de la media de dos determinaciones para cada tratamiento; los tres últimos corresponden a los puntos centrales del modelo. A = tiempo de reacción (min); B = Concentración glutaraldehído (mM); C = Concentración quitosano (% p).

El ANOVA mostró que, para los tres soportes, el tiempo de reacción tuvo efecto significativo en la inmovilización, así: Q (ANOVA: Razón F= 35,11; Valor p= 0,0020), Alg-Q (ANOVA: Razón F= 123,45; Valor p= 0,0001), Q-Fe (ANOVA: Razón F= 86,34; Valor p= 0,0002). Las concentraciones de glutaraldehído y quitosano influyeron significativamente en la inmovilización de la enzima al Alg-Q (ANOVA: Razón F= 23,57; Valor p= 0,0047) y Q-Fe (ANOVA: Razón F= 33,39; Valor p= 0,0022), respectivamente. Con el propósito de observar el efecto de la interacción de estos factores en la inmovilización, se obtuvo el gráfico de superficie de respuesta del modelo, fijando la variable “tiempo de reacción” en el valor teórico optimizado por el modelo (12 horas), lo que evidenció que el efecto de estas variables es diferente para cada tipo de soporte (Figura 5), por lo que deberán optimizarse para cada sistema biocatalítico particular.

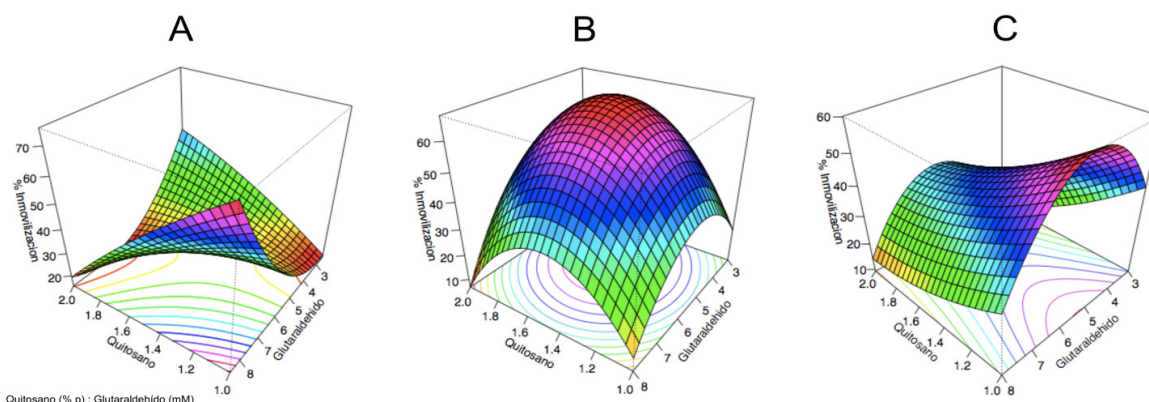


Figura 5. Superficie de respuesta para la reacción de inmovilización de la lipasa de *P. speciosa* en esferas de A: Quitosano; B: Alginato-chitosano; C: Quitosano-Fe(OH)₃

El ajuste del modelo de superficie de respuesta se verificó a través del coeficiente de correlación (R^2) que fue mayor a 0,91 (Q = 91,42 %; Alg-Q = 98,16 %; Q-Fe = 97,9 %); un R^2 elevado indica que el modelo es capaz de explicar el mayor porcentaje de la variabilidad de la respuesta. Adicionalmente, el modelo arrojó una predicción de la combinación de niveles en los factores evaluados, que maximizan el porcentaje de inmovilización de la enzima en los tres soportes; estas condiciones fueron reproducidas experimentalmente produciendo resultados ligeramente más bajos a los predichos por el modelo (Cuadro 3), siendo el mayor porcentaje de inmovilización experimental el de las esferas de quitosano ($90,58 \pm 3,07$ %).

Cuadro 3. Porcentaje de inmovilización de la lipasa de semillas de *P. speciosa* en tres sistemas biocatalítico.

Soporte	Tiempo (h)	[Glutaraldehído] (mM)	[Quitosano] (% g)	% Inmovilización	
				Teórico	Práctico (Media \pm DE)
Q	11,8	8,00	1,00	97,94	90,58 \pm 3,07
Alg-Q	12,0	4,70	1,56	92,98	88,48 \pm 4,09
Q-Fe	12,0	5,24	1,00	83,57	76,44 \pm 6,88

AL de la lipasa inmovilizada

Las AL de los sistemas biocatalíticos, obtenidas bajo condiciones de inmovilización optimizada, fueron Lipasa-Q= $3,74 \pm 0,3$ nKat/mg; Lipasa-Alg-Q= $3,62 \pm 0,1$ nKat/mg y Lipasa-Q-Fe= $2,88 \pm 0,1$ nKat/mg. El análisis de varianza mostró que existe diferencia significativa en la AL de los biocatalizadores (Valor p= 0,00019); sin embargo, la prueba post-hoc HSD Tukey (IC 95 %) indica que no hay diferencia significativa entre Lipasa-Q y Lipasa-(Alg-Q) (Valor p= 0,1225), indicando que la mayor actividad lipolítica se obtuvo con el sistema biocatalítico Lipasa-Q.

La inmovilización en materiales biopoliméricos es una estrategia que permite mejorar la actividad, selectividad, estabilidad y especificidad de las enzimas libres; no obstante, la eficacia de inmovilización depende tanto del

método de inmovilización como de características del soporte, tales como la porosidad, el área y funcionalidad superficial. En este estudio, el mayor porcentaje de inmovilización y AL se logró en esferas de Q, lo cual se atribuye al método de unión por entrecruzamiento entre los grupos $-NH_2$ y $-COO^-$ de los residuos de aminoácidos del enzima y la superficie del quitosano funcionalizado con glutaraldehído (grupos $-NH_2$ y $-OH$), que incrementa la estabilidad de la lipasa. Así mismo, el menor diámetro de la esfera, comparado con Alg-Q, pudo contribuir a la inmovilización al aumentar la superficie de contacto entre la enzima y el soporte. Eficiencias comparables ($> 90\%$) fueron reportados con la lipasa parcialmente purificada de *Rhizopus oryzae* R1 usando esferas de quitosano funcionalizadas con glutaraldehído y método de entrecruzamiento (Helai *et al.*, 2021).

El soporte Alg-Q representa un complejo poli-electrolítico, donde las moléculas de alginato interactúan con los grupos aminos del quitosano (Nuraliyah *et al.*, 2021); esta interacción limita los grupos funcionales del quitosano disponibles para interactuar con el glutaraldehído y la enzima, esto podría explicar la ligera reducción de la actividad catalítica del sistema Lipasa-(Alg-Q). En contraste, los efectos de pérdida de enzima por lixiviación, ampliamente reportados en matrices de alginato (Alnoch *et al.*, 2020), se pudieron disminuir con el recubrimiento de quitosano, lográndose porcentajes de inmovilización cercanos al obtenido con el sistema Lipasa-Q. De manera similar, Bonine *et al.* (2014) reportaron mejores eficiencias catalíticas de la lipasa de *P. aquatica* inmovilizada en esferas de alginato recubiertas con alcohol polivinílico (PVA), comparada con las esferas de alginato.

Por otra parte, el desarrollo de lipasas inmovilizadas en soportes magnéticos ofrece la ventaja de una separación rápida del enzima después de cada ciclo de reacción, lo cual reduciría el costo del biocatalizador en aplicaciones industriales; sin embargo, se ha reportado baja capacidad de reutilización de estos soportes, asociado a los métodos de inmovilización por adsorción y atrapamiento físico que permiten fuga de la enzima (Spelmezán *et al.*, 2020). En el presente estudio se usó el método de unión covalente con glutaraldehído para reducir pérdida de la lipasa del soporte magnético. Si bien se obtuvieron buenos porcentajes de inmovilización ($> 75\%$), fueron inferiores a los obtenidos con Q y Alg-Q, lo que se atribuye a la agregación de las partículas de hierro magnético, causada por la mayor relación entre el área superficial y el volumen, que limita el acceso del enzima a tales interfaces causando disminución de la actividad lipolítica. Para evitar la agregación Xu *et al.* (2014) han propuesto el uso de tensioactivos, dispersantes naturales o distintos revestimientos poliméricos durante o después de la síntesis del soporte.

Actividad residual del sistema Lipasa-Q

Se evaluó la actividad residual del sistema biocatalítico Lipasa-(Q), debido a que este presentó el mayor rendimiento de inmovilización y AL, observándose la conservación del 85,29 % de la actividad enzimática (AL = $3,48 \pm 0,084$ nKat/mg) hasta el tercer ciclo de reutilización; en el ciclo 4 fue del 63,23 % (AL = $2,58 \pm 0,09$ nKat/mg) y en el 5 fue del 50,02 % (AL = $2,05 \pm 0,12$ nKat/mg). Estos resultados son favorables, ya que se demuestra que un alto porcentaje de la lipasa se une al soporte en la orientación apropiada para preservar el sitio activo de la enzima, responsable de su estabilidad operativa y reusabilidad. Resultados comparables fueron descritos con la lipasa de *P. aquatica* inmovilizada en esferas de quitosano-PVA (Bonine *et al.*, 2014) y con la lipasa de semillas de laurel inmovilizadas en esferas de quitosano (Yagar and Balkan, 2017). El siguiente paso será evaluar el efecto de la inmovilización en la estabilidad a diferentes valores de pH y temperatura.

CONCLUSIONES

En este estudio se presenta un procedimiento eficaz para la obtención de un sistema biocatalítico reciclable formado por una lipasa de semillas oleaginosas de *P. speciosa* inmovilizada en esferas de quitosano funcionalizado con glutaraldehído, cuyas características funcionales son prometedoras a nivel biotecnológico. Teniendo en cuenta que las enzimas son catalizadores biodegradables y de menor toxicidad, el nuevo biocatalizador inmovilizado tiene el potencial de usarse en la bioconversión de aceites aplicables a la industria de los alimentos, así como también en procesos de degradación de lípidos en aguas residuales. Por otra parte, en el macrosector

agroindustrial, las oleaginosas, grasas y aceites representa uno de los sectores de mayor productividad (aproximadamente el 9 % del PIB de agroindustria en Colombia), por lo que las estrategias encaminadas a la optimización de los procesos de bioconversión de estas materias primas serían de gran impacto para el sector. No obstante, para establecer la utilidad real del biocatalizador en procesos tanto a nivel de laboratorio como a escala industrial se requieren estudios sobre el comportamiento cinético de la enzima (libre e inmovilizada). Finalmente, el desarrollo de este biocatalizador permitirá dar un valor agregado a los frutos de *P. speciosa* en Colombia, con miras a generar oportunidades para el desarrollo del sector agrícola en comunidades vulnerables, debido a los pocos requerimientos del cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la Universidad del Atlántico.

REFERENCIAS

- AKSHITA, MEHTA; SUMAN, GULERIA; ROJI, SHARMA; REENA, GUPTAET. Chapter 6–The lipases and their applications with emphasis on food industry. En RAMESH C. Ray; Applied Biotechnology Reviews, Microbial Biotechnology in Food and Health. Bhubaneswar (India): Academic Press, 2020, 308 p.
- ALBAYATI, SAMAH-HASHIM; MASOMIAN, MALIHE; ISHAK, SITI-NOR-HASMAH; MOHAMAD-ALI, MOHD-SHUKURI-BIN; THEAN, ADAM LEOW; MOHD-SHARIFF, FAIROLNIZA-BINTI; MUHD-NOOR, NOOR-DINA-BINTI; RAJA-ABD-RAHMAN, RAJA-NOOR-ZALIHA. Main Structural Targets for Engineering Lipase Substrate Specificity. *Catalysts*, v. 10, n. 7, 2020. p. 747.
<http://doi.org/10.3390/catal10070747>
- ALNOCH, ROBSON-CARLOS; ALVES-DOS SANTOS, LEANDRO; MARQUES-DE ALMEIDA, JANAINA; KRIEGER, NADIA; MATEO, CESAR. Recent Trends in Biomaterials for Immobilization of Lipases for Application in Non-Conventional Media. *Catalysts*, v. 10, 2020, p. 697.
<https://doi.org/10.3390/catal10060697>
- BAI, YUAN; WU, WEI. The Neutral Protease Immobilization: Physical Characterization of Sodium Alginate-chitosan Gel Beads. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Preprint, 2021.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-680678/v1>
- BERNAL, RODRIGO; GRADSTEIN, ROBERT; CELIS, MARTA. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Bogotá (Colombia): Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, 2015.
- BHARATHI, DEVARAJ; RAJALAKSHMI, G.; KOMATHI, S. Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. *Journal of King Saud University – Science*, v. 31, n. 4, 2019, p. 898-901.
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.12.018>
- BIRÓ, EMESE; S.Z. NÉMETH, ÁGNES; SISAK, CSABA; FECZKÓ, TIVADAR; GYENIS; JÁNOS Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 70, n. 6, 2018, p. 1240-1246.
<http://doi.org/10.1016/j.jprot.2007.11.005>
- BONINE, BARBARA; PERES-POLIZELLI, PATRICIA; BONILLA-RODRIGUEZ, GUSTAVO. Immobilization of a Plant Lipase from *Pachira aquatica* in Alginate and Alginate/PVA Beads. *Enzyme Research*, 2014, p. 1315-1322.
<https://doi.org/10.1155/2014/738739>
- CHANDRA, PREM; ENESPA, RANJAN-SINGH; ARORA, PANKAI-KUMAR. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, v. 19, 2020, p. 1-42.
<https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>

- CONG, SHANZI; TIAN, KANGMING; ZHANG, XIN; LU, FUPING; SINGH, SUREN; PRIOR, BERNARD; WANG, ZHENG-XIANG. Synthesis of flavor esters by a novel lipase from *Aspergillus niger* in a soybean-solvent system. *3 Biotech*, v. 9, n. 6, 2019, p. 244.
<https://doi.org/10.1007/s13205-019-1778-5>
- EHLERT, JANNA; KRONEMANN, JENNY; ZUMBRÄGEL, NADINE; PRELLER, MATTHIAS. Lipase-Catalyzed Chemoselective Ester Hydrolysis of Biomimetically Coupled Aryls for the Synthesis of Unsymmetric Biphenyl Esters. *Molecules* (Basel, Switzerland), v. 24, n. 23, 2019, p. 1-16.
<https://doi.org/10.3390/molecules24234272>
- FATIMA, SAMAR; FARYAD, AMNA; ATAA, ASIA; JOYIA, AHMAD-FAIZ; PARVAIZ, AQSA. Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2020, p. 1-14.
<https://doi.org/10.1002/bab.2019>
- GUEVARA-ANDINO, JUAN-ERNESTO; FERNANDEZ-ALONSO, JOSÉ-LUIS. A Remarkable New Species of *Pachira* (Malvaceae: Bombacoideae) from an Amazonian Hotspot of Endemism. *Systematic Botany*, v. 43, n. 4, 2018, p. 993-999.
<https://doi.org/10.1600/036364418X697724>
- HELAL, SHIMAA; ABDELHADY, HEMMAT M.; ABOU-TALEB, KHADIGA A.; HASSAN, MERVAT G.; AMER, MAHMOUD M. Lipase from *Rhizopus oryzae* R1: in-depth characterization, immobilization, and evaluation in biodiesel production. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 19, n. 1, 2021.
<https://doi.org/10.1186/s43141-020-00094-y>
- HU, JUN; CAI, WENHAO; WANG, CHANGGAO; DU, XIN; LIN, JIANGUO; CAI, JUN. Purification and characterization of alkaline lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* HFE733 and application for biodegradation in food wastewater treatment. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 32, n. 3, 2018, p. 583-590.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1446764>
- JARES-CONTESINI, FABIANO; GOMES-DAVANÇO, MARCELO; PAGOTTO-BORIN, GUSTAVO; GARCIA-VANEGAS, KATHERINA; GONÇALVES-CIRINO, JOÃO-PEDRO; RODRIGUES-DE MELO, RICARDO; MORTENSEN, UFFE-HASBRO; HILDÉN, KRISTIINA; ROSSI-CAMPOS, DANIEL; DE OLIVEIRA-CARVALHO, PATRICIA. Advances in Recombinant Lipases: Production, Engineering, Immobilization and Application in the Pharmaceutical Industry. *Catalysts*, v. 10, 2020, p. 1032.
<https://doi.org/10.3390/catal10091032>
- KAWIŃSKI, ADAM; MIKLASZEWSKA, MAGDALENA; STELTER, SZYMON; GŁĄB, BARTOSZ; BANAŚ, ANTONI. Lipases of germinating jojoba seeds efficiently hydrolyze triacylglycerols and wax esters and display wax ester-synthesizing activity. *BMC Plant Biology*, v. 21, n. 50, 2021, p. 1-13
<https://doi.org/10.1186/s12870-020-02823-4>
- KHOO, KUAN-SHIONG; LEONG, HUI-YI; CHEW, KIT-WAYNE; LIM, JUN-WEI; LING, TAU-CHUAN; SHOW, PAU-LOKE; YEN, HONG-WEI. Liquid Biphasic System: A Recent Bioseparation Technology. *Processes*, v. 8, n. 2, 2020, p. 149.
<http://doi.org/10.3390/pr8020149>
- KIELKOPF, CLARA; BAUER, WILLIAM; URBATSCH, INA. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 4, 2020, p. 136-138.
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>
- KUMAR, ANIL; MUKHIA, SRIJANA; KUMAR, NEEJAR; ACHARYA, VISHAL; KUMAR, SANJAY; KUMAR, RAKSHAK. A Broad Temperature Active Lipase Purified from a Psychrotrophic Bacterium of Sikkim Himalaya with Potential Application in Detergent Formulation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, 2020, p. 1-16.
<http://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00642>
- LV, LIANGLIANG; DAI, LINGMEI; DU, WEI; LIU, DEHUA. Progress in Enzymatic Biodiesel Production and Commercialization. *Processes*, v. 9, 2021, p. 355.
<https://doi.org/10.3390/pr9020355>

- MUKHERJEE, K.D. Plant lipases and their application in lipid biotransformations. *Progress in Lipid Research*, v. 33, n. 1-2, 1994, p.165-174.
[https://doi.org/10.1016/0163-7827\(94\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0163-7827(94)90019-1)
- NHAT, DANG-MINH; HA, PHAN-THI-VIET. The isolation and characterization of lipase from *Carica papaya* latex using zwitterion sodium lauroyl sarcosinate as agent. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, v. 13, 2019, p. 773-778.
<https://doi.org/10.5219/1164>
- NURALIYAH, ANDI; PERDANI, MEKA SAIMA, PUTRI, DWINI; SHLAN, MUHAMAD; WIJANARKO, ANONDHO; HERMANSYAH, HERI. Effect of Additional Amino Group to Improve the Performance of Immobilized Lipase From *Aspergillus niger* by Adsorption-Crosslinking Method. *Frontiers in Energy Research*, v. 9, 2021 p. 616945.
<https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.616945>
- PAL, AJAY; KHANUM, FARHATH. Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: Characterization of immobilized enzyme. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 6, 2011, p. 1315-1322.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.024>
- PATEL, NAVEEN; RAI, DHANANJAI; SHIVAM; SHAHANE SHRADDHA; MISHRA, UMESH. Lipases: Sources, Production, Purification, and Applications. *Recent Patents on Biotechnology*, v. 13, n. 1, 2019, p. 45-56.
<https://doi.org/10.2174/1872208312666181029093333>
- PEREIRA-CIROLATTI, ELIANE; COSTA-CERQUEIRA-PINTO, MARTINA; OLIVEIRA-HENRIQUES, AROSANA; COSTA-DA SILVA-PINTO, JOSÉ-CARLOS; MACHADO-DE CASTRO, ALINE; GUIMARÃES-FREIRE, DENISE-MARIA; ANDRADE-MANOEL, EVELIN. Enzymes in Green Chemistry: The State of the Art in Chemical Transformations. En SINGH, RAM-SARUP; SINGHANIA, REETA-RANI; PANDEY, ASHOK; LARROCHE, CHRISTIAN. *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Technology*. Amsterdam (Netherlands): Elsevier, 2019, 524 p.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64114-4.00005-4>
- PERES-POLIZELLI, PATRICIA; DELL ANTONIO-FACCHINI, FERNANDA; CABRAL, HAMILTON; BONILLA-RODRIGUEZ, GUSTAVO-ORLANDO. A new lipase isolated from oleaginous seeds from *Pachira aquatica* (Bombacaceae). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 150, n. 3, 2008, p. 233-242.
<https://doi.org/10.1007/s12010-008-8145-z>
- POSPISKOVA, KRISTYNA; SAFARIK, IVO. Low-cost, easy-to-prepare magnetic chitosan microparticles for enzymes immobilization. *Carbohydrate Polymers*, v. 96, n. 2, 2013, p. 545-548.
<http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.014>
- SANTOS-DUARTE, DIRLIANE; DE ALMEIDA-NASCIMENTO, JOSÉ-AUGUSTO; DE-BRITTO, DOUGLAS. Scale-up in the synthesis of nanoparticles for encapsulation of agroindustrial active principles. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 43, 2019, p. e023819.
<https://dx.doi.org/10.1590/1413-7054201943023819>
- SETH, SONALI; CHAKRAVORTY, DEBAMITRA; KUMAR-DUBEY, VIKASH; PATRA, SANJUKTA. An insight into plant lipase research—challenges encountered. *Protein Expression and Purification*, v. 85, 2014, p. 13-21.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.11.006>
- SPELMEZAN, CRISTINA-GEORGIANA; BENCZE, LÁSZLÓ-CSABA; KATONA, GABRIEL; IRIMIE, FLORIN-DAN; PAIZS, CSABA; TOȚA, MONICA-IOANA. Efficient and Stable Magnetic Chitosan-Lipase B from *Candida Antarctica* Bioconjugates in the Enzymatic Kinetic Resolution of Racemic Heteroarylethanol. *Molecules*, v. 25, 2020, p. 2-15.
<https://doi.org/10.3390/molecules25020350>
- SWAGATA, PAHARI; LEXUAN, SUN; EMIL, ALEXOV. PKAD: a database of experimentally measured pKa values of ionizable groups in proteins. *Database*, v. 2019, 2019, p. 1-7.
<https://doi.org/10.1093/database/baz024>

- URQUIJO-RODRIGUEZ, MILENA; FONTALVO-GÓMEZ, MIRIAM; VELOSO-DE PAULA, ARIELA; MENDOZA-MEZA, DARY. Hidrólisis enzimática del aceite de *Bactris guineensis* con fracciones del látex de *Carica papaya*: estudio del efecto de la temperatura, pH y concentración del sustrato. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, v. 18, n. 2, 2020, p. 70-81
[https://doi.org/10.18684/bsaa\(18\)70-81](https://doi.org/10.18684/bsaa(18)70-81)
- XIE, KONGLIANG; YU, YANHONG; SHI, YAQI. Synthesis and characterization of cellulose/silica hybrid materials with chemical crosslinking. *Carbohydrate Polymers*, v. 78, n. 4, 2009, p. 799-805.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.06.019>
- XU, JIAKUN; SUN, JINGJING; WANG, YUEJUN; SHENG, JUN; WANG, FANG; SUN, MIU. Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization. *Molecules*, v. 19, n. 8, 2014, p. 11465–11486.
<https://doi.org/10.3390/molecules190811465>
- YAGAR, HULIA; BALKAN, UGUR. Entrapment of laurel lipase in chitosan hydrogel beads. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 45, n. 5, 2017, p. 867-870.
<https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1182920>
- ZIENKIEWICZ, AGNIESZKA; REJÓN, JUAN-DAVID; ZIENKIEWICZ, KRZYSZTOF; CASTRO, ANTONIO-JESÚS; RODRÍGUEZ-GARCÍA, MARIA-ISABEL. In Gel Detection of Lipase Activity in Crude Plant Extracts (*Olea europaea*). *Bio-protocol*, v. 5, n. 8, 2015, p. e1444.
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1444>

Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico*

Molecular identification of filamental fungi and its biotechnological potential

SUÁREZ-CONTRERAS, LILIANA-YANET¹; PEÑARANDA-FIGUEREDO, FREDDY-ARMANDO²

RESUMEN

Los hongos filamentosos son organismos frecuentemente utilizados en el desarrollo de alternativas para resolver desafíos en diferentes sectores productivos. Igualmente, representan una oportunidad competitiva de valor económico en sectores como el agrícola, alimenticio y farmacéutico como también en el industrial y de biocombustibles. Dando continuidad a investigaciones previas de la Universidad Francisco de Paula Santander (UFPS), se analizaron 25 muestras del banco de cepas para caracterización molecular e identificación taxonómica. Se obtuvo ADN de cada cepa con la técnica fenol-clo-

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 23 Abril 2021.

Aprobado para publicación: 10 Noviembre 2021.

* Proyecto de investigación de origen: "Identificación molecular de los aislamientos de hongos conservados en el banco de cepas de la Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente de la Universidad Francisco de Paula Santander". Financiación: COLCIENCIAS-UFPS, convocatoria 753-2016. Finalización: mayo 30 de 2018.

1 Universidad Francisco de Paula Santander, Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, Grupo de investigación Ambiente y Vida. Magíster en Biología. Cúcuta, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-8020-502X>

2 Universidad Francisco de Paula Santander, Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, Grupo de investigación Ambiente y Vida. Ingeniero Biotecnológico. Cúcuta, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-0008-0667>

Correspondencia: lilianayanethsc@ufps.edu.co

Cómo citar este artículo: SUÁREZ-CONTRERAS, LILIANA-YANET; PEÑARANDA-FIGUEREDO, FREDDY-ARMANDO. Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 20, n. 1, 2022, p. 194-206. Doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1914>

roformo. Mediante las técnicas de PCR y de iniciadores de espaciadores internos de transcrito (ETS) primer 4 y 5, se obtuvieron los amplicones que fueron secuenciados. Se identificaron cepas de los ordenes Hypocreales, Eurotiales, Pleosporales y Saccharomycetales con ejemplares de géneros como el *Aspergillus*, *Curvularia*; *Purpureocillium*, *Penicillium* y *Trichoderma* entre otros. Los hallazgos se exhiben en el cladograma evidenciando la proximidad filogenética como también relacionando los potenciales biotecnológicos para el desarrollo de bio insumos, productos farmacéuticos y biocatalizadores. Gracias al estudio y revisión en bases de datos se logró avanzar en la descripción de las capacidades biológicas de estos hongos hacia el desarrollo de productos o servicios con base biotecnológica y enfoque de investigación en fitopatología.

ABSTRACT

*Filamentous fungi are organisms frequently used to develop alternatives to solve challenges in different productive representing a competitive opportunity with economic value in the agriculture, food and pharmaceutical, as well as industrial and biofuels sector. Continuing previous research at Universidad Francisco de Paula Santander (UFPS), 25 samples from the strain bank were used for molecular characterization and taxonomic identification. DNA from each strain was obtained under the phenol-chloroform procedure, then, using PCR technique and internal transcript spacer (ITS) primer 4 and 5, amplicons were acquired to be sequenced. Results showed taxonomy categorizations in 4 orders Hypocreales, Eurotiales, Pleosporales y Saccharomycetales with specimens from genus like *Aspergillus*, *Curvularia*; *Purpureocillium*, *Penicillium* y *Trichoderma* among others. Findings were laid into a cladogram to display their phylogenetic proximity, and connecting their biotechnological potential towards developing bio-materials, pharmaceutical products and bio-catalysts. Thanks to present study and data base review, it was possible to advance into describing the biological capabilities of these fungi towards developing biotechnological products and services with an approach in phytopathology research.*

INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos o mohos se caracterizan por tener un soma vegetativo (talo) similar a las plantas, filamentos microscópicos continuos más o menos alargados y ramificados con paredes celulares definidas, la mayoría, constituidas por quitina, dispuestas en microfibrillas como la celulosa, además de otros polisacáridos como mananos, galactanos y quitosán reemplazan a la quitina en algunos grupos, con una la pared celular formada por carbohidratos (80-90 %), y son las proteínas, los lípidos, polifosfatos e iones inorgánicos el material cementante (Estrada *et al.*, 2019).

Muchos hongos son beneficiosos, al degradar la materia orgánica compleja convirtiéndola a formas químicas simples que pasan a formar parte del suelo, absorbidas por otras generaciones de plantas, encargándose de la fertilidad de la tierra. Pese a los perjuicios que pueden causar estos organismos a

PALABRAS CLAVES:

ADN; Bioprospección; Cladograma; Control biológico; Homología; ETS; Marcador molecular; Mohos; Patógeno; PCR.

KEYWORDS:

DNA; Bioprospecting; Cladogram; Biologic control; Homology; ITS; Molecular marker; Molds; Pathogen; PCR

otros seres vivos, incluyendo a humanos, son un grupo de organismos muy importantes y exitosos desde el punto de vista evolutivo trascendental para la vida en el planeta (Tellez *et al.*, 2017; Mancilla *et al.*, 2021).

Otros hongos filamentosos tienen potencial de aplicación biotecnológica en diferentes sectores productivos debido a su capacidad para producir antioxidantes (Smith *et al.*, 2015), ácidos grasos polinsaturados, enzimas industriales, antibióticos, productos fermentados (Wakai *et al.*, 2017), pigmentos que se utilizan en alimentos (Dufossé *et al.*, 2014), antifúngicos, agentes hipolipidémico e inmunosupresores (Alberti *et al.*, 2017), y debido a su capacidad metabólica y mecánica diferentes especies de mohos se utilizan para el desarrollo de biofertilizantes, biopesticidas y acondicionadores biológicos (Tellez *et al.*, 2017). También, la necesidad de afianzar el crecimiento de los sistemas productivos agrícolas ha creado alternativas permitiendo avanzar y superar las deficiencias en procesos como la nutrición vegetal a partir del uso de fertilizantes de síntesis. Así, ha surgido la agricultura orgánica como una tecnología eficaz, respetuosa del medio ambiente, económica y factible de desarrollar, incluyendo la producción y uso de fertilizantes de origen microbiológico a partir de residuos agropecuarios para nutrir plantas, controlar plagas y enfermedades de plantas, e influir positivamente en las propiedades fisicoquímicas del suelo (Rojas, 2020).

Definir la identidad de las cepas es una fase insustituible en la investigación de cualquier agente biológico y la selección de las herramientas y mecanismo de identificación constituyen la confiabilidad de la información. El uso de la técnica de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR) como mecanismo de identificación molecular se precisa debido a la fiabilidad y practicidad de la técnica para amplificar segmentos de ADN asistido por cebadores como los Espaciadores internos de transcrito (ITS) que conforman la región ITS que se caracteriza por ser altamente repetitiva dentro del ADNr, poseer regiones conservadas, tener evolución relativamente lenta, pero a su vez, contener regiones menos conservadas, propiedades otorgadas por ITS2, 5.8 S e ITS1 respectivamente (Froeschke *et al.*, 2014); dichas características hacen de la región ITS un segmento significativamente de interés para estudios en taxonomía, incluso el espaciador interno de transcrito ha llegado a ser denominado por un grupo de micólogos como el marcador de barra para identificación de taxones y constituye uno de los mecanismos más confiables para determinar la identidad de mohos a nivel de especie (Bellemain *et al.*, 2010).

Esta investigación determinó un mecanismo de identificación molecular para doce especies de hongos distribuidos en los géneros *Trichoderma*, *Geotrichum*, *Purpureocillium*, *Laburnicola*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Bipolaris*, *Curvularia*, y *Alternaria*. Además, se realizó una correlación filogenética y revisión de antecedentes que enlistan una serie de capacidades de las diferentes especies identificadas para futuras aplicaciones en diferentes áreas de biotecnología. También, importante tanto para el banco de cepas como para el laboratorio de biotecnología molecular de la sede campos Elíseos de la Universidad Francisco de Paula Santander que permitirá avances en procesos de docencia e investigación.

MÉTODO

Esta investigación se realizó en el Centro Experimental Campos Elíseos, de la Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente de la Universidad Francisco de Paula Santander, ubicado en el municipio de Los Patios, Norte de Santander (Colombia) a una altura de 410 ms.n.m., y temperatura de 27 °C. Los aislamientos de los hongos conservados fueron caracterizados y procesados en los laboratorios Banco de Cepas y Biotecnología Molecular.

Extracción de ADN

Posterior al crecimiento en caldo Sabouraud, el micelio fue fraccionado con ayuda de una cuchilla de bisturí en trozos con diámetro no superior a 4 mm², exceptuando las cepas HA002, HE004, HF002 y HF003 a las que el micelio se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos, y se procedió utilizando los protocolos propuestos por Suárez (2016) y Blanco *et al.* (2021).

Obtención de los amplicones

Para la obtención de los fragmentos amplificados por medio de la PCR se utilizaron los cebadores ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') que amplificaron la región ITS en sentido y anti-sentido respectivamente, haciendo uso del protocolo propuesto por (Suárez, 2016).

Visualización y cuantificación de los amplicones de ADN

Para la visualización de los fragmentos de ADN amplificados se realizó en gel de agarosa al 1,5 % w/v y tampón TBE 1X, y las electroforesis se efectuó con un arranque de corrida de 120 voltios durante 5 minutos y posteriormente a 100 voltios durante 2 horas. Las muestras de ácidos nucleicos fueron marcadas con el intercalante gel red y revelado en el transiluminador y fotodocumentador ChemiDoc de Bio-Rad. Para la cuantificación de ADN se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop de Thermo scientific (Suárez, 2005).

Secuenciación de amplicones

Los productos de PCR obtenidos de cada una de las cepas se enviaron a la empresa Isla SAS, (Corea del Sur) para la posterior decodificación de las secuencias amplificadas, utilizando el secuenciador 3730xl DNA Analyzer. Los resultados fueron recibidos en formato fasta y la lectura del secuenciador fue reflejado en un archivo por medio de un cromatograma.

Identidad por homología

A partir de las secuencias obtenidas, se realizó un análisis utilizando la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, 2019) mediante la herramienta Targeted Loci Nucleotide BLAST que permitió determinar la identidad de los organismos mediante la comparación de la secuencia target (mi secuencia de interés) con la base de datos específica para secuencias curadas y remarcadas de la región espaciadora transcrita interna (ITS). Para ello se cargó la secuencia en formato fasta en la interfaz del Blast Targeted Loci Nucleotide, se seleccionó la base de datos para ITS sin ninguna otra modificación de parámetro, y se dio la orden de cargar el análisis. Como resultado se obtuvo la información de las secuencias depositadas en la base de datos con alineaciones significativas, teniendo en cuenta especialmente dos parámetro para la elección de la identidad: el E-value, cuyo valor debe estar próximo a un puntaje de 0,0 y la identidad con un porcentaje del 90 al100 %.

Representación de la relación filogenética

Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el software Mega 7,0; inicialmente, se realizó un alineamiento múltiple entre todas las secuencias incluida el outgrup (*E. coli*), se empleó el algoritmo de Muscle (Align by Muscle) en Mega 7,0, utilizando el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic); una vez culminado el análisis, el archivo que se generó fue guardado en formato Mega y se indicó que no correspondía a secuencias que codifican para proteínas, a partir del archivo de alineamiento múltiple se construyó el dendrograma en la opción phylogeny; para la reconstrucción de la filogenia se empleó el método estadístico de UPGMA, y el modelo Jukes-Cantor del software mencionado, logrando la representación del árbol inferido para la relación filogenética de las secuencias obtenidas en este estudio (Lessick, 2016).

RESULTADOS

Amplicones ITS mediante PCR

Con el protocolo utilizado en la PCR y con la implementación de los cebadores ITS4 e ITS5, se obtuvieron fragmentos de tamaños que variaron entre 0,5 y 0,8 Kilobases (Kb) (Figura 1), permitiendo un testeo de los amplicones obtenidos. A partir de este resultado se define lo que representa el fundamento de selección del proceso estándar para la identificación molecular de hongos filamentosos implementado por el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la UFPS. Además, según González-Estrada *et al.* (2020), para la identificación molecular de *Penicillium sp.* fue también realizada por PCR, empleando las regiones internas transcritas ITS1-5.8S-ITS2, utilizando el par de iniciadores de secuencia ITS4/ ITS5, y los pares de base obtenidos se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes de NCBI mediante el programa BLAST; además, Bejár *et al.* (2019), amplificaron ADN por PCR en tiempo real (qPCR), para identificar *Aspergillus fumigatus*.

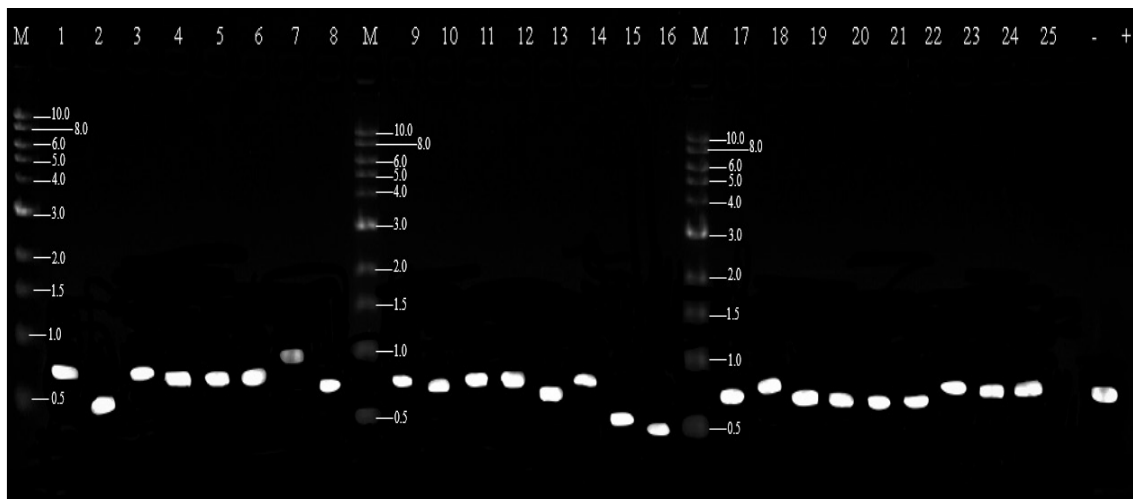


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % w/v, de los amplicones obtenidos a partir del ADN de hongos, utilizando ITS. M: Marcador molecular. 1, HA001; 2, HA002; 3, HA005; 4, HA006; 5, HA007; 6, HA008; 7, HD002; 8, HD008; 9, HD010; 10, HD011; 11, HE001; 12, HE002; 13, HE003; 14, HE004; 15, HF002; 16, HF003; 17, HF020; 18, HF021; 19, HI001; 20, HI002; 21, HI003; 22, HI004; 23, HI005; 24, JIF01; 25, JIF02; control (-); control (+), *Baeuveria bass*.

Determinación de identidad de hongos

Las 25 cepas se clasificaron en diez géneros identificados como *Trichoderma*, *Geotrichum*, *Purpureocillium*, *Luburnicola*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Baeuveria*, *Bipolaris*, *Curvularia* y *Alternaria*, distribuidos en doce (12) especies, de la siguiente manera: las cepas HA001, HA005 y HA006 corresponden a *Trichoderma yunnanense*; HA002, HE004, HF002 y HF003 son *Geotrichum silvícola*; HA007, HA008 y HE003 son *Purpureocillium lilacinum*; HD011, HI001, HI002, HI003, HI004 y HI005 corresponden a *Penicillium citrinum*; JIF01 y JIF02 son *Alternaria destruens*, la cepa HD002 es *Laburnicola hawksworthii*; HD008 es *Penicillium chrysogenum*; HD010 corresponde a *Aspergillus fumigatus*; HE001 a *Penicillium rubens*; HE002 es *Beauveria bassiana*; HF020 pertenece a *Bipolaris sivanesaniana*, y para finalizar HF021 es *Curvularia pisi* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Identificación, valores de identidad y E-value de cada una de las secuencias analizadas utilizando la base de datos NCBI.

Cód	Especies	E value	% Ident	Cód	Especies	E value	% Ident
HA001	<i>Trichoderma yunnanense</i>	0,0	99%	HE004	<i>Geotrichum silvicola</i>	8,00E-135	94%
HA002	<i>Geotrichum silvicola</i>	5,00E-147	95%	HF002	<i>Geotrichum silvicola</i>	4,00E-144	95%
HA005	<i>Trichoderma yunnanense</i>	0,0	99%	HF003	<i>Geotrichum silvicola</i>	3,00E-143	95%
HA006	<i>Trichoderma yunnanense</i>	0,0	99%	HF020	<i>Bipolaris sivanesaniana</i>	0,0	99%
HA007	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	0,0	99%	HF021	<i>Curvularia pisi</i>	0,0	98%
HA008	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	0,0	99%	HI001	<i>Penicillium citrinum</i>	0,0	99%
HD002	<i>Laburnicola hawksworthii</i>	8,00E-13	92%	HI002	<i>Penicillium citrinum</i>	0,0	99%
HD008	<i>Penicillium chrysogenum</i>	0,0	99%	HI003	<i>Penicillium citrinum</i>	0,0	99%
HD010	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,0	99%	HI004	<i>Penicillium citrinum</i>	0,0	99%
HD011	<i>Penicillium citrinum</i>	0,0	99%	HI005	<i>Penicillium citrinum</i>	0,0	99%
HE001	<i>Penicillium rubens</i>	0,0	97%	JIF01	<i>Alternaria destruens</i>	0,0	93%
HE002	<i>Beauveria bassiana</i>	0,0	98%	JIF02	<i>Alternaria destruens</i>	0,0	99%
HE003	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	7,00E-173	90%				

Los valores de identidad para todas las cepas superaron el 93 % y con E-value no inferior a 8×10^{-135} , según los análisis realizados a las 50 secuencias utilizando la herramienta Targeted Loci Nucleotide BLAST exceptuando la cepa HD002 cuyo resultado fue inconcluso en la secuencia ITS4, mientras que con el ITS5 el valor de identidad alcanzó el 92 % relacionando la especie *Laburnicola hawksworthii*.

Se considera la importancia de los datos moleculares para estudios de biodiversidad y el potencial de la investigación micológica en países como Brasil y Colombia. Para el caso de Brasil se determinó la diversidad de hongos basada en las secuencias ITS con un límite del 98 % (Menolli, 2020), mientras que en este trabajo fue del 97 al 99 %.

Aunque los niveles de identidad son significativos y, a pesar de que la región ITS es considerada un código de barras para la identificación taxonómica de hongos (Melloni, 2020), el uso estándar de estos cebadores durante la PCR puede generar sesgos, incurriendo al error en la secuencia, generando una predisposición en la clasificación de especies dentro de las divisiones basidiomicetos y ascomicetos, dependiendo de los iniciadores utilizados (Bellemain *et al.*, 2010). Por lo anteriormente señalado, se sugiere evaluar otros iniciadores para comparar los resultados y establecer un consenso mediante el análisis de las secuencias obtenidas por Bejár *et al.* (2019), logrando identificar diez cepas de *Aspergillus fumigatus sensu stricto* involucradas en la aspergilosis invasiva (AI) en el Perú, contribuyendo a explicar la resistencia al tratamiento y evidenciando la importancia del ambiente en el incremento de los casos.

Análisis filogenético

El filo *Ascomycota* se caracteriza por su estructura sexual en forma de saco o asca que contienen las ascosporas y por la conjugación de hifas asimilativas por medio de la anastomosis, también se constituye como un grupo de hongos numeroso con aproximadamente 114.000 especies identificadas y distribuidas en diversos ecosistemas (Wijayawardene *et al.*, 2021). Basados en la información extraída del repositorio de nomenclatura Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>) la totalidad de las cepas identificadas en el presente estudio corresponden al filo *Ascomycota*, representando los subfilos *Pezizomycotina* y *Saccharomycotina*, enclausurados en las clases *Sordariomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Dothideomycetes* y *Saccharomycetes*, y asociados a los órdenes *Hypocreales*, *Eurotiales*, *Pleosporales* y *Saccharomycetales*. Las especies *Trichoderma yunnanense*, *Purpureocillium lilacinum* y *Beauveria bassiana* son hongos que se caracterizan por su efecto antagonista y son ampliamente utilizados para el control biológico (Hernández *et al.*, 2019; Rui *et al.*, 2020; Romero *et al.*, 2020) y pertenecen al orden de los *Hypocreales*; *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium Rubens* y *Penicillium citrinum* son especies productoras de metabolitos de uso farmacéutico y reconocidos reductores de azúcares de interés

para la industria de los biocombustibles y hacen parte del grupo de los *Eurotiales* (Cabral *et al.*, 2018; Ouephanit *et al.*, 2019; Lina *et al.*, 2019; Tejas *et al.*, 2019; Lodha *et al.*, 2020; Huber *et al.*, 2020; Xianchun *et al.*, 2020; Mondal *et al.*, 2020); *Bipolaris sivanesaniana*, *Laburnicola hawksworthii*, *Alternaria destruens* y *Curvularia pisi* son especies vinculadas con efectos patógenos en diferencias especies vegetales (Manamgoda *et al.*, 2014; Zhai *et al.*, 2018) y son del orden de los *Pleosporales*; y en el orden de los *Saccharomycetales* se encuentra a *Geotrichum silvicola*.

En cuanto al cladograma (Figura 2) se puede inferir la relación entre los diferentes órdenes representado en las bifurcaciones que constituyeron clados entre *Hypocreales* - *Eurotiales*, *Hypocreales* - *Pleosporales*, *Eurotiales* - *Pleosporales*, *Hypocreales* - *Eurotiales* - *Pleosporales* - *Saccharomycetales*, respaldando los resultados obtenidos por Wang *et al.* (2009), que señalan la proximidad taxonómica entre los subfilos *Pezizomycotina* y *Saccharomycotina* basados en estudios de filogenia y que sugiere una filiación temprana entre los subfilos señalados.

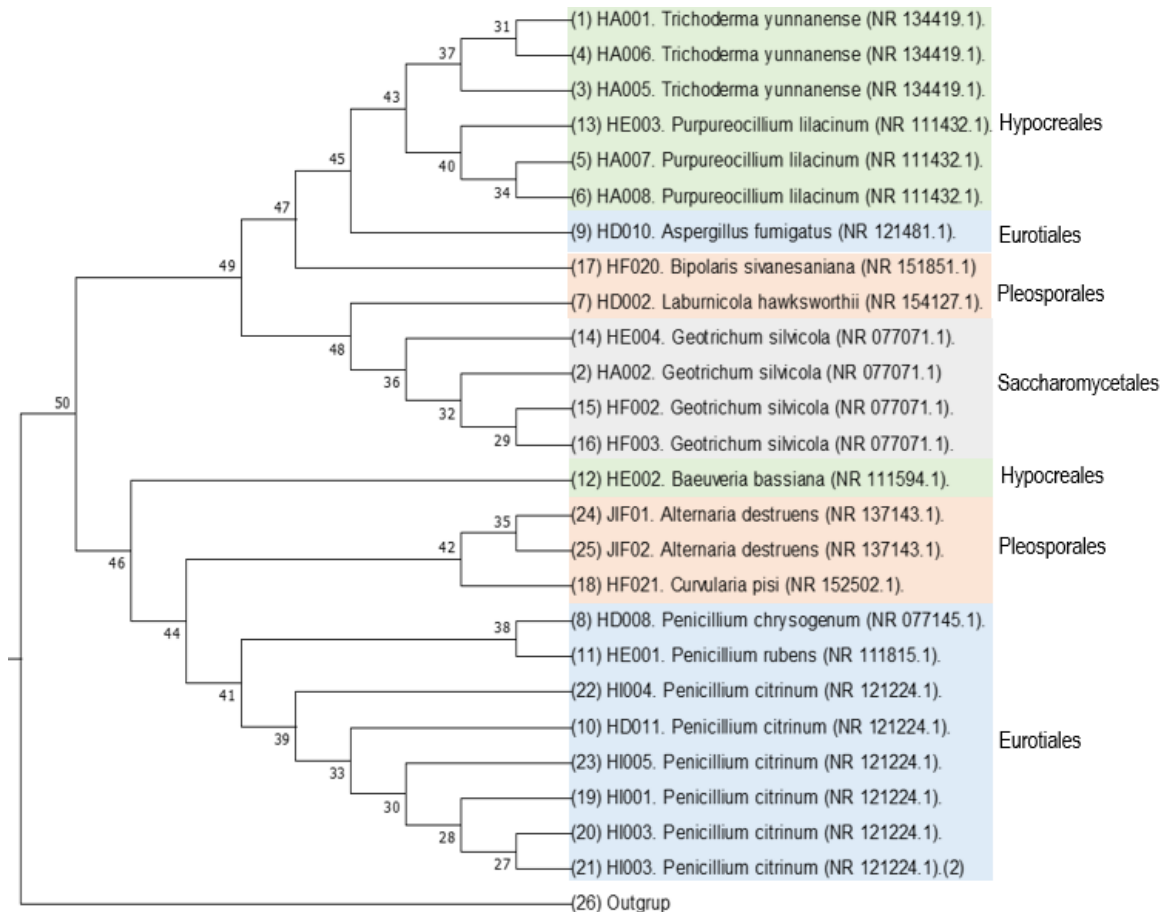


Figura 2. Cladograma. Representación de la proximidad filogenética de las secuencias amplificadas de la región ITS de las especies identificadas.

A manera de una descripción textual de los resultados representados en el cladograma, se señala lo siguiente: el árbol se dividió en dos grandes ramas que corresponden a los nodos 25 y 50, el nodo 25 se ubicó el grupo externo (outgrup) que se seleccionó de una secuencia de *E. coli*, mientras que en el nodo 50 se generó la especiación de las 25 cepas identificadas. Del nodo 50 se ramificaron dos nodos superiores, el 49 y el 46: en el nodo 46 se produjo una bifurcación resultando los nodos 47 y 48, en el nodo 47 se presentó una especiación directa en el taxón *Bipolaris sivanesaniana* (nodo 17) y se generó el nodo 45 el cual también se bifurcó en dos clados repre-

sentados en los nodos 43 y 9 en los que se ubicaron el orden de los Hypocreales y Eurotiales respectivamente; de los Hypocreales surgió la especiación de *Trichoderma yunnanense* (nodo 37) y *Purpureocillium lilacinum* (nodo 40) y en el nodo 9 se ubicó *Aspergillus fumigatus*, el nodo 48 se ramificó en los nodos 7 y 35 ubicando las especies *Laburnicola hawksworthii* y *Geotrichum silvícola*, respectivamente. El nodo superior 46 se ramificó en los nodos 12 y 44, en el nodo 12 se encontró el taxón *Baeuveria bassiana* que pertenece al orden de los Hypocreales, mientras que en el nodo 44 se formaron dos clados que corresponden a los nodos 42 y 41, en el nodo 42 se ubicaron especies del orden de los Pleosporales pero de los géneros *Curvularia* y *Alternaria*, y en el nodo 41 se agrupó el clado que corresponde al orden de los Eurotiales que pertenecen al género *Penicillium*; a su vez, en el nodo 42 se manifestó la especiación de *Curvularia pisi* (nodo 18), y *Alternaria destruens* (nodos 24 y 25). *Curvularia*, tradicionalmente ubicada en el género *Bipolaris*, fue recientemente reclasificada en *Curvularia*, con base a análisis filogenéticos, incluyendo a *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* y *B. spicifera* (Madrid *et al.*, 2019).

Umaña *et al.* (2019), mediante un estudio de distancias génicas utilizando intermicrosatélites (ISSR), identificó distanciamiento entre cepas de la misma especie, lo que concuerda con lo hallado en esta investigación, pero diferenciando en el método utilizando e identificando diferentes especies. Para el caso de la especie *Geotrichum silvícola*, las cepas HF002 y HF003 demuestran mayor proximidad en comparación con las cepas HA002 y HE004; para la especie *Trichoderma yunnanense* se evidenció que las cepas HA001 y HA006 tienen mayor grado de parentesco en comparación con la cepa HA005; caso similar sucedió con la especie *Purpureocillium lilacinum* que reflejó un mayor grado de semejanza entre las cepas HA007 y HA008 comparada con la cepa HE003; para el género *Penicillium* que presentó variedad de especies identificadas, se evidencia que las especies *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium rubens* tienen mayor grado de parentesco al agruparse en el mismo nodo, mientras que *Penicillium citrum* mantuvo un mayor grado de semejanza con los de su misma especie, lo que evidencia que las variaciones genéticas entre aislamientos no dependen de las distancias geográficas (Umaña *et al.*, 2019).

Potencial biotecnológico de los hongos identificados

Se realizó una recopilación bibliográfica en la que se describieron las capacidades reportadas por otros autores a cerca de cada género y especie de los hongos que se identificaron en esta investigación, buscando el potencial de las cepas para futuras aplicaciones.

Trichoderma es importante por su capacidad de adaptación y producción de metabolitos, como enzimas, compuestos promotores de crecimiento vegetal y compuestos volátiles, entre otros, de interés biotecnológico y ambiental. Este género es utilizado como agente de biocontrol contra hongos fitopatógenos debido a sus múltiples mecanismos de acción, destacando la antibiosis, el micoparasitismo, la competencia por espacio y nutrientes, y la producción de metabolitos secundarios. Varias especies de *Trichoderma* se han utilizado en sistemas acoplados de fermentación en sustratos sólidos o cultivos sumergidos, para generar energías alternativas como etanol. Los biorreactores como sistema de fermentación optimizan las condiciones del cultivo para favorecer la generación de biomasa y metabolitos (Hernández *et al.*, 2019).

Purpureocillium lilacinum favorece el crecimiento, el contenido de clorofila y controla fitopatógenos como *Botrytis* que causan enfermedades del moho gris en una gran variedad de frutas y verduras, y la pudrición blanda y tizón foliar en la zanahoria (Rui *et al.*, 2020). *P. lilacinum* es un nematófago que tiene capacidad ovicida contra *Ancylostoma* que es un parásito gastrointestinal (Menezes *et al.*, 2017), también tiene la capacidad de ejercer biocontrol contra *Meloidogyne incognita* que es uno de los patógenos más importantes del pepino (*Cucumis sativus* L.) y ha demostrado su efectividad en el control de plagas como *Meloidogyne javanica*, *Heterodera avenae* Wollenweber, y *Radopholus similis* que afectan la plantaciones de tomate, cebada y banano respectivamente (Dahlin *et al.*, 2019), además de la capacidad de solubilizar fósforo, producir sideróforos y ácido indol-3-acético (IAA) características de un candidato para uso como biofertilizante (Moreno *et al.*, 2020).

Geotrichum silvicola es una especie de levadura artroconidial asexual que fue reportada en el año 2005 y, en la actualidad, la información relacionada con el potencial de sus aplicaciones es escasa, pero se ha encontrado que tiene estrecha relación genética con *Galactomyces geotrichum*, que es una especie con potencial en la industria de alimentos, confiriendo características organolépticas y nutricionales de sabor, aroma y ácidos grasos poliinsaturados (omega 3 y 6) (Grygier *et al.*, 2019).

Se identificaron tres especies del género *Penicillium*, *Penicillium citrium* y *Penicillium rubens*. Son destacados productores de enzimas xilanolíticas, como *Penicillium chrysogenum*, capaz de metabolizar xilasa que es una enzima que degrada polisacáridos de material celulolíticos y lignocelulósico para producir etanol y bioetanol de segunda generación, también para el tratamiento de jugos, cervezas y vinos, y para producir xilitol (Cabral *et al.*, 2018; Delgado 2021); tiene la capacidad de remediar contaminación con dihidroxibencenos, sulfonatos lineales de alquilbenceno y desperdicios de grasas que son compuestos que actúan como contaminantes de fuentes hídricas (Franco *et al.*, 2020). *Penicillium chrysogenum* es un generoso productor de penicilina y derivados con potencial terapéutico y de control biológico de hongos, bacterias y virus (Huber *et al.*, 2020), mientras que *Penicillium citrinum* ha demostrado tener capacidad lipasa, xilanasa y celulasa y de producir quitosano, pencitrin y pencitrinol (Ouephanit *et al.*, 2019; Lina *et al.*, 2019; Tejas *et al.*, 2019; Lodha *et al.*, 2020; Huber *et al.*, 2020).

La primera sustancia antibiótica descubierta fue la Penicilina, por Alexander Fleming, quien observó que el hongo del pan inhibía el crecimiento de las bacterias de *S. aureus* que había sembrado, llamando al compuesto Penicilina (*Penicillium notatum*), pero como el efecto inhibitorio era mínimo llegó a pensar que esa sustancia carecía de interés comercial. Se propuso purificar Penicilina de una antibiótica 5-15 cepa que era mejor productora, dando comienzo a la era antibiótica (Asier, 2021).

Aspergillus fumigatus es un reconocido patógeno oportunista, causante de queratitis, reacciones alérgicas en las vías respiratorias y aspergilosis pulmonar (Nayak *et al.*, 2018). También, tiene aplicaciones biotecnológicas por su capacidad de producir lovastatina que es un metabolito secundario fúngico frecuentemente utilizado con fines farmacéuticos para reducir los niveles de colesterol y eventos cardiovasculares, puede producir enzimas con características celulasas, α -xilosidasa, FPasa, xilanasa, peptidasa y amilasa que tienen aplicación en diferentes sectores productivos como la industria de producción de bioetanol (Xianchun *et al.*, 2020; Mondal *et al.*, 2020). Las celulasas son un conjunto de enzimas hidrolíticas que descomponen la celulosa, mediante la actividad sinérgica de tres diferentes componentes, las endoglucanasa, exoglucanasa y la β -glucosidasa. A lo largo de los años, estudios de celulasas han demostrado ser potencial biotecnológico en diferentes áreas, aplicada principalmente por ser biodegradables e inofensivas con el medio ambiente. Su producción es bastante estudiada en residuos agrícolas o agroindustriales. La creciente industrialización de estas áreas, ha llevado a la producción de altas cantidades de residuos que no son tratados adecuadamente, siendo importante el aislamiento de microorganismos con potenciales celulolíticos, donde *Fusarium* sp. CCLM CX presentó la mayor actividad enzimática (Rodríguez, 2019).

Además, se han realizado otros trabajos para evaluar organismos antagonistas para el control de *Sclerotinia* sp. causante de la podredumbre blanca en lechuga, como, por ejemplo: *Trichoderma* sp., *Aspergillus flavipes*, *Muscodora yucatanensis*, *Penicillium commune*, *Bacillus* sp., *Clonostachys* sp., *Paecilomyces lilacinus*, *Pseudomonas* sp. y *Coniothyrium* sp. (Zubieta *et al.*, 2021).

Baeuveria bassiana es un entomopatógeno que controla plagas de insectos como *Nilaparvata lugen*, *Lasioderma serricorne*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Plutella xylostella*, *Phenarium purpurascens*, *Kuschelorrhynchus macadamiae* y *Carya illinoensis* que atacan los cultivos de arroz, patata, repollo, maíz, macadamia y nuez (Romero *et al.*, 2020; Agboyi *et al.*, 2020; Khun *et al.*, 2020).

CONCLUSIONES

Se lograron identificar hongos pertenecientes al género y especies *Trichoderma yunnanense*, *Geotrichum silvicola*, *Purpureocillium lilacinum*, *Laburnicola hawksworthii*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium rubens*, *Beauveria bassiana*, *Bipolaris sivanesaniana*, *Curvularia pisi*, y *Alternaria destruens*. Se mostró una relación taxonómica entre grupos como *Trichoderma* y *Purpureocillum*, entre *Penicillium*, y *Alternaria* – *Curvularia*, indicando que son géneros filogenéticamente próximos.

La caracterización molecular y la recopilación del potencial biotecnológico para hongos filamentosos permitirá avanzar en proyectos enfocados a la bioprospección, conocer cualidades y mecanismos de estos microorganismos con miras al desarrollo de procesos y productos biotecnológicos, comprender mecanismos de patogénesis y desarrollar alternativas de control de patógenos principalmente para cultivos de interés agrícola y comercial.

AGRADECIMIENTOS

A Colciencias y al Fondo de Investigaciones de la UFPS (FINU), por la financiación de este proyecto. Al PhD. Andrés F. Barajas.

REFERENCIAS

- AGBOYI-LAKPO, K.; KETOH-GUILLAUME, K.; DOURO-KPINDOU, O.; MARTIN, THIBAUD; GLITHO, I.; TAMÓ, M. Improving the efficiency of *Beauveria bassiana* applications for sustainable management of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in West Africa. *Biological Control*, v. 144, 2020, p. 104233. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104233>
- ALBERTI, FABRIZIO; FOSTER, GARY D.; BAILEY, ANDY M. Natural products from filamentous fungi and production by heterologous expression. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 101, n. 2, 2017, p. 493–500. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8034-2>
- ASIER-DOMINGUEZ, SAN P. Caracterización de microorganismos productores de antibióticos aislados en el proyecto micromundo—UZ [Tesis de Biotecnología]. Zaragoza (España): Universidad De Zaragoza. Facultad de Ciencias, 2021, 52 p. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.012>
- BELLEMAIN, E.; CARLSEN, T.; BROCHMANN, C.; COISSAC, E.; TABERLET, P.; KAUSERUD, H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, v. 10, n. 189, 2010, p. 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>
- BÉJAR, V.; VILLANUEVA, F.; LEÓN, S.; GUEVARA-GRANADOS, J; URIBE, A.; VERGARAY, G.; CUADRA, A.; SABOGAL, I. Identificación molecular de *aspergillus fumigatus* aislados de pacientes con aspergilosis invasiva. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, v. 36, n.1, 2019, p. 81-86. <https://doi:10.17843/rpmpesp.2019.361.3403>
- BLANCO-MANZANO, J.; SUAREZ-CONTRERAS, L. Caracterización molecular del fitopatógeno *Moniliophthora roreri*, utilizando marcadores issr, en Norte de Santander, Colombia. *Prospectiva*, v.19, n.1, 2021, p. 1-16. <https://doi.org/10.15665/rp.v19i1.2234>
- CENTRO NACIONAL DE INFORMACIÓN BIOTECNOLÓGICA (NCBI) [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EE. UU.), Centro Nacional de Información Biotecnológica; 1988. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [consultado el 16 de septiembre de 2019].

- DAHLIN, P.; EDER, R.; CONSOLI, E.; KRAUSS, J.; KIEWNICK, S. Integrated control of *Meloidogyne incognita* in tomatoes using fluopyram and *Purpureocillium lilacinum* strain 251. *Crop Protection*, v. 124, 2019, p. 104874. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104874>
- DELGADO-OLIVARES, L. Producción de etanol por digestión de residuos lignocelulósicos debido a hongos del suelo agrícola de la ciudad de lima. *PURIQ*, v. 3, n.1, 2021, p. 286-302. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.01.12>
- DUFOSSÉ, L.; FOUILLAUD, M.; CARO, Y.; MAPARI, S.A.; SUTTHIWONG, N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 26, 2014, p. 56–61. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2013.09.007>
- ESTRADA-SALAZA, GLORIA I.; RAMÍREZ-GALEANO, MARTHA C. *Micología general*. 1ed. Manizales (Colombia): Centro Editorial Universidad Católica de Manizales, 2019, ISBN 978-958-52337-1-3, 40 p.
- FRANCO-COSTA, MAYARA; DE OLIVEIRA, A.; DE OLIVEIRA, E.; DE OLIVEIRA, J. Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) by *Penicillium chrysogenum*. *Bioresource Technology Reports*, v. 9, 2020, p. 100363. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100363>
- FROESCHKE, G; VON DER HEYDEN, S. A Review of Molecular Approaches for Investigating Patterns of Coevolution in Marine Host–Parasite. Relationships, v.84, 2014, p. 209–252. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800099-1.00004-1>
- GONZÁLEZ-ESTRADA, R.; VEGA-ARREGUÍN, J.; ROBLES-VILLANUEVA, B.; VELÁZQUEZ-ESTRADA, R.; RAMOS-GUERRERO, A.; GUTIÉRREZ-MARTÍNEZ, P. Evaluación in vitro de productos químicos no convencionales para el control de *Penicillium citrinum*. *Polibotanica*, v. 49, 2020, p. 161-172. <https://doi:10.18387/polibotanica.49.11>
- GRYGIER, A.; MYSZKA, K.; JUZWA, W.; BIAŁAS, W.; RUDZIŃSKA, M.; ZIŃSK, R. *Galactomyces geotrichum* mold isolated from a traditional fried cottage cheese produced omega-3 fatty acids. *Journal International of Food Microbiology*, v. 319, 2019, p. 108503. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108503>
- HERNÁNDEZ-MELCHOR, D.; FERRERA-CERRATO, R.; ALARCÓN, A.. *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural Animal science*, v. 35, n. 1, 2019, p. 98-112. <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2018.03.002>
- HUBER, A.; GALGÓCZY, L.; VÁRADI, G.; HOLZKNECHT, J.; KAKAR, A.; MALANOVIC, N.; LEBER, R.; KOCH, J.; KELLER, M.; BATTÀ, G.; TÓTH, G.; MARX, F. Two small, cysteine-rich and cationic antifungal proteins from *Penicillium chrysogenum*: A comparative study of PAF and PAFB. *Biochimica et Biophysica Acta–Biomembranes*, v. 1862, n. 8, 2020, p. 183246. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183246>
- INDEX FUNGORUM. Recuperado el 08 de octubre del 2021 (<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>)
- JIN, X.; SONG, J.; MA, J.; LIU, GAO-QIANG. Thermostable β -xylosidase from *Aspergillus fumigatus*: Purification, characterization and potential application in lignocellulose bioethanol production, *Renewable Energy*, v. 155, 2020, p. 1425–1431. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.04.054>
- KHUN, K.; MASH, G.; STEVENS, M.; HUWER, R.; WILSON, B. . Response of the macadamia seed weevil *Kuschelorchynchus macadamiae* (Coleoptera: Curculionidae) to *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in laboratory bioassays. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 174, 2020, p. 107437. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107437>
- LESSICK, B. Johns Hopkins University. Quick guide on using MEGA phylogeny software.(Consultado junio 16 de 2020).
- LIMA, R.; ALVES, A.; DE PAULA, A.; DE CASTRO, H.; ANDRADE, G. Mycelium-bound lipase from *Penicillium citrinum* as biocatalyst for the hydrolysis of vegetable oils, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 22, 2019, p. 101410. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101410>

- LIU, R.; KHAN, R.; YUE, Q.; JIAO, Y.; YANG, Y.; LIN, Y.; XIE, B. Discovery of a new antifungal lipopeptaibol from *Purpureocillium lilacinum* using MALDI-TOF-IMS, Biochemical and Biophysical Researchs Communications, v. 527, n. 3, 2020, p. 689–695.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.021>
- LODHA, A.; PAWAR, S.; RATHOD, V. Optimised cellulase production from fungal co-culture of *Trichoderma reesei* NCIM 1186 and *Penicillium citrinum* NCIM 768 under solid state fermentation. Journal of Environmental Chemical Engineering, v. 8, n. 5, 2020, p. 103958.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103958>
- MADRID, H.; CÁRCAMO, C.; TAPIA, C. *Curvularia spicifera*. Revista Chilena de Infectología, v. 36, n. 5, 2019, p. 646-647.
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v36n5/0716-1018-rci-36-05-0646.pdf>
- MANAMGODA, D.; ROSSMAN, A.; CASTEBLURY, L.; CROUS, P.; MADRID, H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. The genus *Bipolaris*. Studies in Mycology, v. 79, 2014, p. 221–288.
<https://doi.org/10.1016/J.SIMYCO.2014.10.002>
- MANCILLA, J.; MORA, M.; MONTAÑEZ, D.; MARTÍNEZ, V.; FUENTES, R.; CARRANZA, R. Micobiota aislada de serpientes en cuarentena del centro para investigaciones y respuestas en ofidiología de la Universidad de Panamá (CEREO). Tecnociencia, v. 22, n.2, 2021, p. 180-197.
<https://doi.org/10.48204/j.tecno.v23n1a10>
- MENOLLI, N.; SÁNCHEZ-GARCÍA, M. Brazilian fungal diversity represented by DNA markers generated over 20 years. Brazilian Journal of Microbiology, v. 51, 2020, p. 729–749.
<https://doi.org/10.1007/s42770-019-00206-y>
- MENEZES-HOFSTÄTTER, B.; DA SILVA-FONSECA, A.; DE SOUZA, F.; DE SOUZA-SILVEIRA, J.; MARONEZE-PERSICI, B.; PÖTTER, L.; SILVEIRA, A.; ANTONIOLLI, Z.; BRAYER-PEREIRA, D. Effect of *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens* fungal extracts on the hatchability of *Ancylostoma* eggs. Revista Iberoamericana de Micología, v. 34, n. 1, 2017, p. 28–31.
<https://doi.org/10.1016/J.RIAM.2016.04.004>
- MONDAL, S.; SOREN, J.; MONDAL, J.; RAKSHIT, S.; KUMAR-HALDER, S.; CHANDRA-MONDAL, K. Contemporaneous synthesis of multiple carbohydrate debranching enzymes from newly isolated *Aspergillus fumigatus* SKF-2 under solid state fermentation: A unique enzyme mixture for proficient saccharification of plant bioresources. Industria Crops and Products, v. 150, 2020, p. 112409.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112409>
- MORENO-SALAZAR, R.; SÁNCHEZ-GARCÍA, I.; CHAN-CUPUL, W.; RUIZ-SÁNCHEZ, E.; HERNÁNDEZ-ORTEGA, H.; PINEDA-LUCATERO, J.; FIGUEROA-CHÁVEZ, D. Plant growth, foliar nutritional content and fruit yield of *Capsicum chinense* biofertilized with *Purpureocillium lilacinum* under greenhouse conditions. Scientia Horticulturae, v. 261, 2020, p. 108950.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108950>
- NAYAK, A.; CROSTON, T.; LEMONS, A.; GOLDSMITH, W.; MARSHALL, N.; KASHON, M.; GERMOLEC, D.; BEEZHOLD, D.; GREEN, B. *Aspergillus fumigatus* viability drives allergic responses to inhaled conidia. Ann Allergy, Asthma Immunology, v. 121, n. 2, 2018, p. 200-210.
<https://doi.org/10.1016/J.ANAI.2018.04.008>
- OUEPHANIT, C.; BOONVITTHYA, N.; THEERACHAT, M.; BOZONNET, S.; CHULALAKSANANUKUL, W. Efficient expression and secretion of endo-1,4- β -xylanase from *Penicillium citrinum* in non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* directed by the native and the preproLIP2 signal peptides. Protein Expression and Purification, v. 160, 2019, p. 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.03.012>
- RAMAKUWELA, T.; HATTING, J.; BOCK, C.; VEGA, F.; WELLS, L.; MBATA, G.; SHAPIRO-ILAN, D. Establishment of *Beauveria bassiana* as a fungal endophyte in pecan (*Carya illinoensis*) seedlings and its virulence against pecan insect pests. Biological Control, v. 140, 2020, p. 104102.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104102>

- RODRÍGUEZ-ANDACHI, A. Actividad celulolítica de hongos filamentosos aislados del Parque Nacional de Foz de Iguazu – Brasil en sustratos agrícolas mediante la planificación experimental [Tesis en Biotecnología]. Foz de Iguazu (Brasil): Universidad Federal de la integración Latinoamericana, 2019, 54 p.
<https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2017.09.025>
- ROJAS-PRIETO, N. Evaluación de dos residuos pecuarios en la elaboración de un biofertilizante empleando fermentación anaerobia [Tesis Magister en Biotecnología]. Medellín (Colombia): Universidad Pontificia Bolivariana, Escuela de Ingenierías, 2020, 117 p.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2017.07.001>
- ROMERO-ARENAS, O.; AMARO-LEAL, L.; RIVERA, A.; PARRAGUIRRE-LEZAMA, C.; SÁNCHEZ-MORALES, P.; VILLA-RUANO, N. Formulations of *Beauveria bassiana* MABb1 and mesoporous materials for the biological control of *Sphenarium purpurascens* in maize crops from Puebla, Mexico. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v. 23, n. 3, 2020, p. 653–659.
<https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.05.005>
- SMITH, H.; DOYLE, S.; MURPHY, R. Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. *Food Chemistry*, v. 185, 2015, p. 389–397.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.03.134>
- SUÁREZ-CONTRERAS, L. Identificación molecular de aislamientos de *Moniliophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia. *Acta Agronómica*, v. 65, 2016, p. 51–57.
<http://dx.doi.org/10.22463/0122820X.1174>
- SUÁREZ-CONTRERAS, L. Extracción y purificación del AND de *Moniliophthora roreri* hongo que ataca el cacao, en Norte de Santander. *Respuestas*, v. 10, n. 2, 2005, p. 4–8. <https://doi.org/10.22463/0122820X.629>
- TÉLLEZ-VARGAS, J.; RODRÍGUEZ-MONROY, M.; LÓPEZ-MEYER, M.; MONTES-BELMONT, R.; SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G. *Trichoderma asperellum* ameliorates phytotoxic effects of copper in onion (*Allium cepa* L.). *Environmental and Experimental Botany*, v. 136, 2017, p. 85–93.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2017.01.009>
- TEJAS-NAMBOODIRI, M.; PAKSHIRAJAN, K. Sustainable and green approach of chitosan production from *Penicillium citrinum* biomass using industrial wastewater as a cheap substrate, *Journal of Environmental Management*, v. 240, 2019, p. 431–440.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.03.085>
- UMAÑA-CASTRO, J.; OROZCO-CAYASSO, S.; UMAÑA-CASTRO, R.; MOLINA-BRAVO, R. Identificación molecular y características fisiológica de aislamientos de *Trichoderma* para el biocontrol de dos patógenos en la piña. *Revista de Ciencias Ambientales, Tropical Journal of Environmental Sciences*, v. 53, n. 1, 2019, p.125–142.
<http://doi.org/10.15359/rca.53-1.7>
- ZUBIETA-CORONADO, D.; ECHEVERRY-PRIETO, L.; ZAFRA-MEJÍA, C. Antagonismo in vitro por consorcios de *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. contra el fitopatógeno *Sclerotinia* sp. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, v. 19, n. 1, 2021, p. 16–31.
<https://doi.org/10.18684/bsaa.v19.n1.2021.1293>
- WAKAI, S.; ARAZOE, T.; OGINO, C.; KONDO, A. Future insights in fungal metabolic engineering. *Bioresource Technology*, v. 245, 2017, p. 1314–1326.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.095>
- WANG, H.; XU, Z.; GAO, L. A fungal phylogeny based on 82 complete genomes using the composition vector method. *BMC Evolutionary Biology*, v. 9, n. 195, 2009.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-195>
- WIJAYAWARDENE, N.; HYDE, K.; DAI, D. Outline of Ascomycota, *Encyclopedia of Mycology*, 2021, p. 246–254.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819990-9.00064-0>
- ZHAI, Y.; LI, X.; WANG, T.; WANG, B.; LI, C.; ZENG, G. A review on airborne microorganisms in particulate matters: Composition, characteristics and influence factors. *Environment International*, v. 113, 2018, p. 74–90.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2018.01.007>

Evaluación fisicoquímica y microbiológica de ahuyama (*Cucurbita moschata*) troceada en fresco con recubrimiento y polietileno*

Physicochemical and microbiological evaluation of freshly cut ahuyama (*Cucurbita moschata*) preserved under coating and polyethylene

RUCO-SÁNCHEZ, CRISTINA¹; SANTIAGO-CAMPO, CARLOS-HOLMES²; PAZ-PEÑA, SANDRA-PATRICIA³; MOSQUERA-SÁNCHEZ, SILVIO-ANDRÉS⁴

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 27 julio 2021.

Aprobado para publicación: 20 septiembre 2021.

* Título proyecto de origen: "Evaluación fisicoquímica y microbiológica de ahuyama (*Cucurbita moschata*) troceada en fresco con recubrimiento y polietileno". Financiación: Universidad del Cauca. Culminación: agosto 4 de 2018

1 Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias. Ingeniero Agroindustrial. Popayán, Colombia.

2 Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias. Ingeniero Agroindustrial. Popayán, Colombia.

3 Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias. Ingeniero Agroindustrial, Grupo Investigación Ciencia y Tecnología de Biomoléculas de Interés Agroindustrial (CYTBIA). Popayán, Colombia.

4 Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo Investigación Ciencia y Tecnología de Biomoléculas de Interés Agroindustrial (CYTBIA). M.Sc. Ingeniería. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-2448-608X>

Correspondencia: smosquera@unicauca.edu.co

Cómo citar este artículo: RUCO-SÁNCHEZ, CRISTINA; SANTIAGO-CAMPO, CARLOS-HOLMES; PAZ-PEÑA, SANDRA-PATRICIA; MOSQUERA-SÁNCHEZ, SILVIO-ANDRÉS. Evaluación fisicoquímica y microbiológica de ahuyama (*Cucurbita moschata*) troceada en fresco con recubrimiento y polietileno. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 20, n. 1, 2022, p. 207-220. Doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1943>

RESUMEN

La ahuyama (*Cucurbita moschata*) se caracteriza por su valor nutritivo, especialmente por su contenido de vitamina A, carbohidratos, fósforo y minerales. También, por poseer 45 % de carotenoides totales, 66 % de β -caroteno, 33 % de α -caroteno y 44 % de luteína. Su elevado porcentaje de agua cercano al 90 % es propicio para el crecimiento bacteriano y/o fúngico disminuyendo su vida útil. Este estudio evaluó, cada tres días durante un total de 12, con tres repeticiones y tres réplicas, las características fisicoquímicas (peso, color, firmeza, tasa de respiración); microscópicas (MOAR y MET), bromatológicas y microbiológicas, de ahuyama variedad bolo verde troceada en fresco. 4 tratamientos: SN (muestra testigo); CV con vinipel; CR con recubrimiento de almidón de yuca y aceite esencial de tomillo al 1 %; y CB con sistema binario (recubrimiento de fuente natural y vinipel) a una temperatura de 19 °C y humedad media de 77,75 %. Los tratamientos con película de vinilo arrojaron menor pérdida de peso y firmeza, menor tasa de respiración y mayor estabilidad en el color, en tanto que las muestras testigo y recubiertas, arrojaron mayor contenido de azúcares y humedad, pero menor cantidad de proteína y cenizas. Adicionalmente, las muestras con vinipel, con y sin recubrimiento, registraron un menor crecimiento fúngico. La ahuyama troceada en fresco puede conservarse de forma adecuada mediante el uso de películas de polietileno de baja densidad (vinipel), que permiten retrasar de manera efectiva los procesos de pérdida de calidad inducidos por las operaciones de corte y manipulación.

ABSTRACT

Ahuyama (*Cucurbita moschata*) is recognized by its nutritional value, as it is composed of vitamin A, carbohydrates, phosphorus and minerals. Also, for its content of 45 % of total carotenoids; 66 % of β -carotene; 33 % of α -carotene, and 44 % of lutein. However, its high amount of water, about 90%, is conducive to bacterial and/or fungal growth reducing its useful life. Present study evaluated every three days, over a total of 12, three repetitions and three replications of freshly cut green bolus squash variety. Physicochemical attributes like weight, color, firmness, and respiration rate were observed, as well as those microscopic (MOAR and MET); bromatological, and microbiological characteristics to 4 different treatments as follow: SN (control sample); CV (Vinyl wrap); CR (coated with cassava starch and 1 % thyme essential oil); and CB: (binary system with natural source coating and Vinyl wrap) under environmental conditions of 19 °C temperature and 77,75 % average humidity. Vinyl wrap treatment exhibited lower weight, firmness loss, fewer respiration rate loss, and had better color stability. Control and coated samples showed higher sugar and moisture content but lower ash and protein. Additionally, samples with coated and uncoated stretch film registered minor fungal growth. Fresh cut squash could be properly preserved through the use of low-density polyethylene films (vinyl wrap), allowing to effectively delay the course of quality loss because of handling operations.

PALABRAS CLAVE:

Aceite esencial de tomillo;
Almidón de yuca; Polietileno;
Recubrimiento natural; Vinipel;
Evaluación fisicoquímica;
Microscopía electrónica;
Crecimiento fúngico.

KEYWORDS:

Thyme essential oil; Cassava starch; Polyethylene; Natural coating; Vinyl wrap; Ahuyama; Physicochemical evaluation; Electronic microscopy; Fungal growth.

INTRODUCCIÓN

La ahuyama o zapallo es un cultivo familiar que pertenece a las cucurbitáceas y cuenta con diversidad de usos en fresco, posicionándola entre los alimentos más prometedores por su valor nutritivo, propiedades medicinales y usos como materia prima para la agroindustria, artesanía y decoración. En 2017 en Colombia, el área cosechada, producción y rendimiento fueron de 10.480 ha, 124.001 t y 12 t.ha⁻¹ respectivamente, pero el nivel tecnológico de los cultivos es diverso en las regiones por la calidad de la semilla, labores culturales, la nutrición, el riego y la protección fitosanitaria (Correa-Álvarez *et al.*, 2019).

El gran tamaño de la ahuyama (*Cucurbita moschata*), calabaza o zapallo, dificulta la compra del fruto entero; los supermercados, plazas de mercado y tiendas de barrio disponen el fruto en porciones, facilitando su consumo y visualización de las características de la pulpa, principalmente el color, que es un elemento que se relaciona directamente con la aceptabilidad. En algunos casos, se cubre con polietileno (vinipel), aunque en otros se exhibe sin protección, quedando expuesta a las partículas encontradas en el ambiente y al contacto directo con el comprador, que son fuentes de contaminación e inducen a un rápido deterioro de la calidad por *Alternaria* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Miceliasterilia* sp., *Oidium* sp., *Penicillium* sp. y *Nigrospora* sp (Universidad Nacional de Colombia, 2011), aunque Márquez (2012) aclara que los microorganismos que la atacan son los hongos *Phytophthora* pp. *Dydimella bryoniae*, *Colletotrichum orbiculare* causante de antracnosis, *Fusarium* spp., y la mancha bacteriana causada por *Pseudomonas syringae* p.v. *lachrymans*. En este estudio se evaluaron las características fisicoquímicas y microbiológicas de ahuyama variedad Bolo verde troceada en fresco, con recubrimiento natural y polietileno como materiales de empaque, almacenados bajo condiciones ambientales, con el fin de establecer el mejor método de cubierta para la comercialización.

MÉTODO

La investigación se desarrolló en Popayán, Colombia (1.760 msnm, temperatura promedio 19 °C, humedad relativa del 77,75 %) (Alcaldía de Popayán, 2018), en los laboratorios de Biotecnología, Microbiología, Textura y Empaques y de Microscopía electrónica de la Universidad del Cauca.

Materiales

Se utilizaron siete ahuyamas variedad Bolo verde cultivadas en el municipio de Guachené (Cauca), recolectadas 60 días después de la floración (DDF) en estado maduro, considerando uniformidad en tamaño, forma, color (cáscara verde oscuro no opaco y pedúnculo 50 % marrón) (Sollier *et al.*, 2005). Se seleccionaron frutos sin magulladuras, manchas, decoloraciones, perforaciones, residuos químicos y signos de pudrición, con olor y sabor característico (Instituto Colombiano de Normas y Certificación-ICONTEC, 1977).

Se usó polietileno de baja densidad (vinipel), por ser plástico extensible, atóxico y adherente en PVC (Muñoz-Monsalve, 2020); almidón hidrolizado de yuca variedad SM 707-17 modificado con α -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* Ban 240 L (Sigma Aldrich) con grado de modificación de 10 % de Dextrosa Equivalente (DE) (Hoyos-Yela *et al.*, 2019), humedad del 12 % en base seca y tamaño de partícula de 300 μ m; aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) que impide el desarrollo de colonias bacterianas a una concentración del 1 % (Montero-Recalde *et al.*, 2018).

A las ahuyamas se les retiró la tierra, se desinfectaron con hipoclorito de sodio a 50 ppm (OIRSA, 2020) y se secaron con toallas absorbentes, se cortaron en trozos de 20 x 8 cm, se retiraron las semillas, se colocaron en canastillas lavadas y desinfectadas; se identificaron con letras de acuerdo con el tratamiento: SN (muestra testigo), CV (vinipel), CR (recubrimiento de almidón de yuca y aceite esencial de tomillo al 1 %) y CB (sistema binario: recubrimiento de fuente natural y vinipel) y se realizaron mediciones fisicoquímicas, microbiológicas, bromatológicas y de microscopía, por triplicado, a los 3, 6, 9 y 12 días.

Para el tratamiento CR, las materias primas se mezclaron a 30 °C, adicionando 4 % de almidón de yuca, 2 % (v/v) de glicerina y 0,02 % Tween 80 con 1 % (v/v) de aceite esencial de tomillo, se llevó a baño maría a 75 °C por 15 minutos con agitación constante y aspersión (Hoyos-Yela *et al.*, 2019) con un porcentaje de ciclo de 20 %, tiempo de anticipación de 2 s, tiempo posterior de 2 s, presión del líquido 30 bar, presión de aire 40 bar.

Para el tratamiento CV se aplicaron tres capas de vinipel sobre el fruto y se colocaron las ahuyamas en las canastillas previamente lavadas y desinfectadas con hipoclorito de sodio. Para el tratamiento CB, se aplicó el recubrimiento natural, previo al revestimiento con vinipel, sobre cada trozo de ahuyama.

Evaluación de variables

Se evaluaron cambios en pérdida de peso (Cañizares *et al.*, 2019); color (colorímetro NR20XE) mediante luminosidad L^* ($L^* = 0$ para el negro y 100 para el blanco), cromaticidad a^* (verde [-], rojo [+]) y b^* (azul [-], amarillo [+]), coordenadas C^* (croma) y h° (tono); firmeza (Castillo-Silva *et al.*, 2018) y tasa de respiración (Oxybaby), recuento microbiológico en medio YGC por duplicado (100 μ L) sembrado en superficie con perlas de vidrio de diluciones de solución de pulpa de ahuyama hasta 10^{-3} , incubadas a 28 °C. Se contaron las colonias después de 3, 4 y 5 días de incubación; se retiraron las cajas que tenían menos de 150 colonias (ICONTEC, 1977) y se hizo conteo de mohos por gramo. Se enviaron las muestras al laboratorio de análisis químico y bromatológico de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, para el análisis de azúcares totales, contenido de grasa, humedad, proteína y minerales, para los tres sistemas de cubierta y la muestra testigo.

Se procesaron las muestras por las técnicas MOAR (Microscopía Óptica de Alta Resolución) y MET (Microscopía Electrónica de Transmisión), para observar los cambios estructurales en el tejido de la ahuyama después de ser cortado y el efecto del recubrimiento sobre la cáscara y la pulpa.

RESULTADOS

Pérdida de peso

En frutos enteros, el agua de los espacios intercelulares no está expuesta a la atmósfera exterior, luego del corte se expone el tejido causando un incremento en la velocidad de evaporación y alteraciones fisiológicas que aceleran la senescencia, deterioro de tejidos, marchitez y arrugamiento (Salomón-Castaño *et al.*, 2020), sumado a la actividad de enzimas que inducen cambios en los componentes de la pared celular, provocando menor succulencia y firmeza del tejido (De Armas-Costa *et al.*, 2020). Los trozos de ahuyama de la muestra testigo perdieron el 46,4 % de su peso en 12 días frente a un fruto de ahuyama entero “tipo kabutía” que solo perdió el 8,6 % de su peso luego de seis meses a 12 °C y 80 % de humedad relativa (Zaccari *et al.*, 2015).

La aplicación del recubrimiento no tuvo efecto mientras que el uso del empaque con vinipel con o sin recubrimiento presentó diferencias significativas ($p < 0,05$), similar a lo obtenido en poscosecha de gulupa (*Pasiflora edulis* F. *edulis*) (Pachón *et al.*, 2006) a 6 y 18 °C con vinipel y cera almacenada 16–24 días, obteniendo menor pérdida de peso con vinipel (Figura 1). El Anova muestra un efecto significativo de todos los tratamientos sobre la pérdida de peso ($p < 0,05$), excepto entre CV y CB, lo que significa un comportamiento similar entre ellos, que se mantuvo durante el tiempo de valoración.

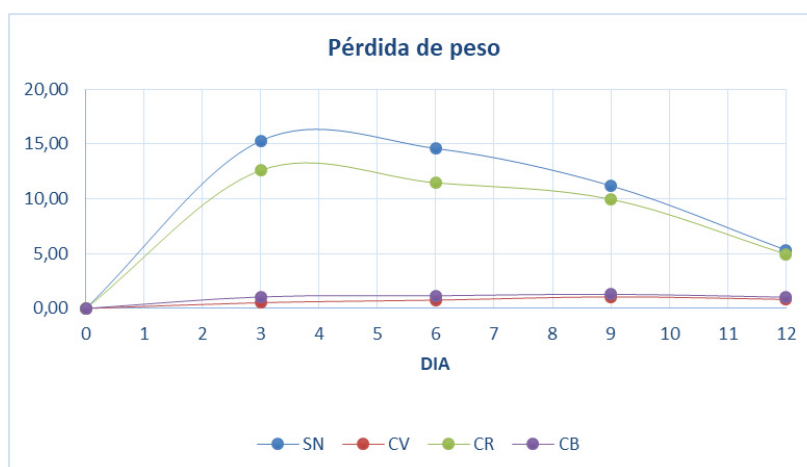


Figura 1. Comportamiento de la pérdida de peso.

Color

La luminosidad (L^*) disminuyó continuamente y no se encontraron diferencias entre los tratamientos debido al corte, aunque la ruptura de las células propició reacciones que conducen al deterioro de las células, tornándose marrón o negro debido a la síntesis de melanina (Salomón-Castaño *et al.*, 2020).

Los valores de cromaticidad en los costados de los trozos de ahuyama muestran mayor estabilidad en las muestras recubiertas con vinipel. El parámetro a^* se incrementó en el día 3 en la muestra testigo con notoria pérdida de color al cortar la ahuyama debido al incremento del área expuesta al oxígeno y el contacto de los carotenoides con las enzimas (peroxidasa y lipoxidasa) que catalizan su oxidación (Cervantes-Paz y Elhadi, 2019), en el día 6 ocurrió en las recubiertas y en el día 9 en los trozos con vinipel y no presentó diferencias significativas entre tratamientos hasta el día 12. La aplicación del recubrimiento incrementó las síntesis de carotenoides hasta el día 6, luego presentó comportamiento similar al de la muestra testigo, y los trozos con vinipel con o sin recubrimiento conservaron el color hasta el día 9. De lo observado, se puede inferir que empaque con vinipel actuó mejor ya que conservó el color, mientras que el recubrimiento presentó un efecto menos favorable a partir del día 6 (Figura 2).

El parámetro b^* presentó diferencia significativa ($p < 0,05$) por efecto del factor tiempo entre los días 0 y 12 en los tratamientos SN-CV, SN-CB y CV-CR, manifestando su influencia sobre la pérdida de color. El día 6 hubo diferencia significativa entre SN-CV y CR-CB, mientras que en los días 9 y 12, la muestra control y el recubrimiento presentaron un comportamiento similar en los tratamientos donde se efectuó el empaque con vinipel con o sin recubrimiento, con diferencias significativas (Figura 2a).

La escala C^* indica color menor saturado, característica conferida por los carotenoides presentes que son menos representativos, asociado con el parámetro b^* que también muestra disminución con el tiempo. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) por efecto del factor tiempo entre los días 0 y 12 en los tratamientos SN-CV, SN-CB y CV-CR, lo que indica que hay influencia del vinipel. Al igual que con el parámetro b^* , en los días 6, 9 y 12 existe una diferencia significativa entre el testigo y CV, CR-CB, respectivamente, en la disminución de saturación del color (Figura 2b).

La disminución del matiz (h°) en los trozos con vinipel y recubrimiento cada 3 días, fue el indicador del cambio de naranja a marrón debida a la marchitez del fruto por la disminución de la saturación (C^*). Se presentó diferencia significativa ($p < 0,05$) por efecto del factor tiempo entre los días 0 y el día 12 en los tratamientos SN-CV, SN-CB, CV-CR y CV-CB, indicando cambio de color amarillo a marrón, siendo similar el comportamiento en los tratamientos CR y CB. En el día 6 hubo diferencia entre SN-CV y CV-CR, debido a que el tratamiento con vinipel

presentó un aumento en la tonalidad; el último día hubo diferencia entre SN y CV, lo que quiere decir que el comportamiento tiende a ser similar entre los demás tratamientos (Figura 2c).

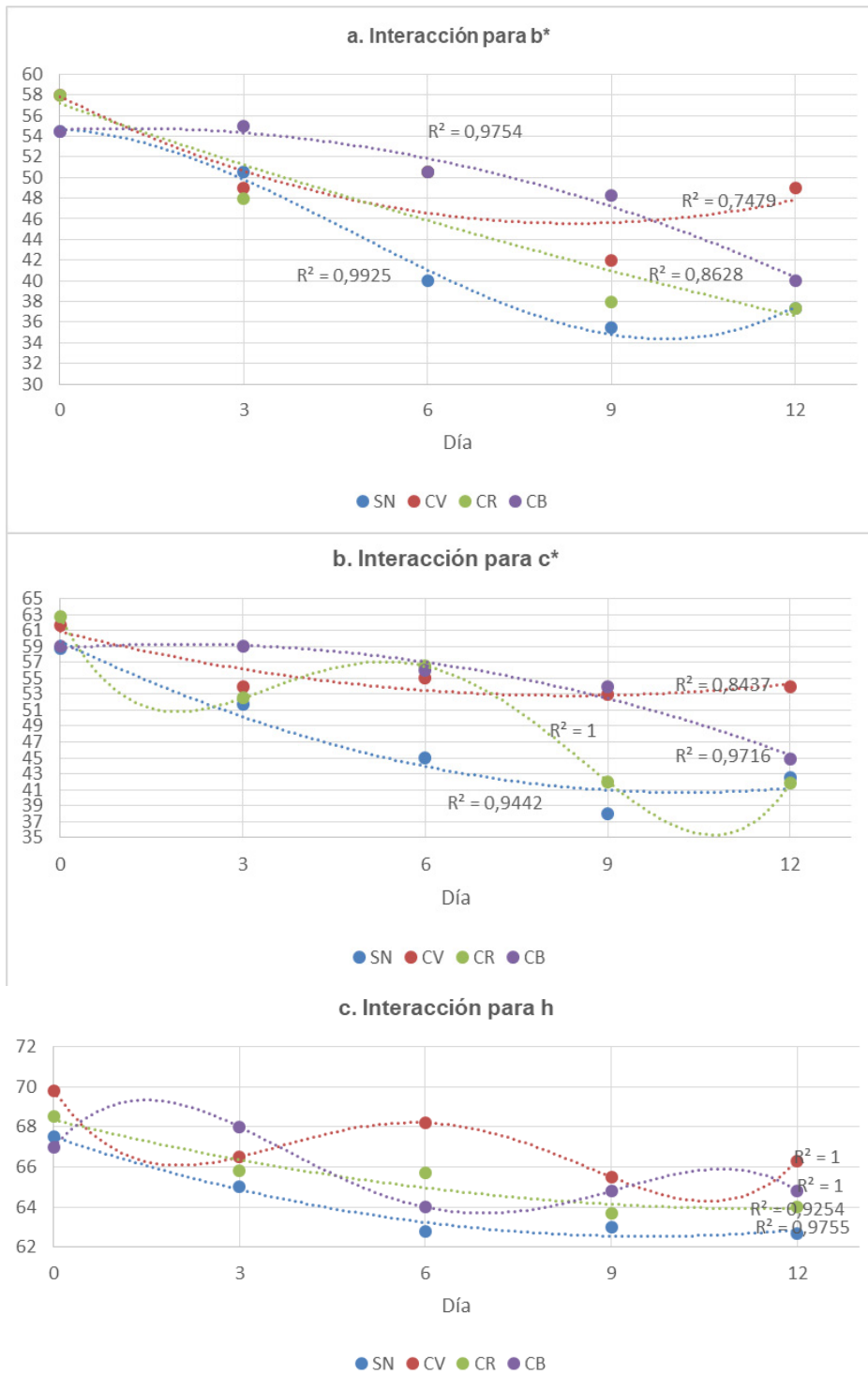


Figura 2. Comportamiento de b*, c*, h.

Firmeza

El ablandamiento de tejidos y arrugamiento en las frutas y hortalizas se deben a cambios fisiológicos por la hidrólisis de los almidones y de las pectinas, la reducción de su contenido de fibra y a la degradación de las paredes celulares que provocan la partición de las moléculas, facilitando el contacto con enzimas (proteolíticas y pectolíticas) y sustratos (Salomón-Castaño *et al.*, 2020).

El primer día hubo resultados heterogéneos (mínimo de 62,3 y máximo de 82,7 N), posiblemente por el estado de madurez del fruto y las condiciones de la plantación (clima, exposición al sol y superficie expuesta al suelo). Los frutos de los tratamientos CV y CB presentaron un comportamiento similar entre sí con incremento hasta el día 3 y posterior disminución, los de SN y CR presentaron disminución permanente excepto el día 6 (debido a la severa deshidratación que sufrieron algunos frutos, generando características “corchosas” en la corteza, que dificultaban su ruptura), siendo más pronunciada la de CR llegando a 22,7 al final del ensayo, valor menor de todos los obtenidos.

El ANOVA indica que el 82,09 % de los datos se ajustan al modelo R cuadrado, con efecto significativo de todos los tratamientos sobre la pérdida de firmeza, con diferencias significativas ($p < 0,05$) entre SN-CV, CV-CR y CR-CB en el día 3 por la influencia del vinipel que afecta las propiedades mecánicas y la pérdida de agua. El día 9 no presentó diferencia en SN-CV y SN-CB, siendo notoria la disminución excesiva en los trozos con recubrimiento. El día 12 hubo diferencias entre todos los tratamientos, excepto entre SN y CB, lo que indica que la muestra testigo y el sistema binario presentaron comportamiento similar, aunque en los cuatro tratamientos fue diferente, encontrando que CV fue el que menor pérdida de firmeza presentó al final del proceso. El uso de vinipel parece reducir el intercambio gaseoso y su efecto es independiente del empleo del recubrimiento que ocasionó mayores pérdidas de firmeza al incrementar la humedad del fruto por la ruptura de tejidos y adición de la cubierta, provocando el ablandamiento del tejido (Figura 3).

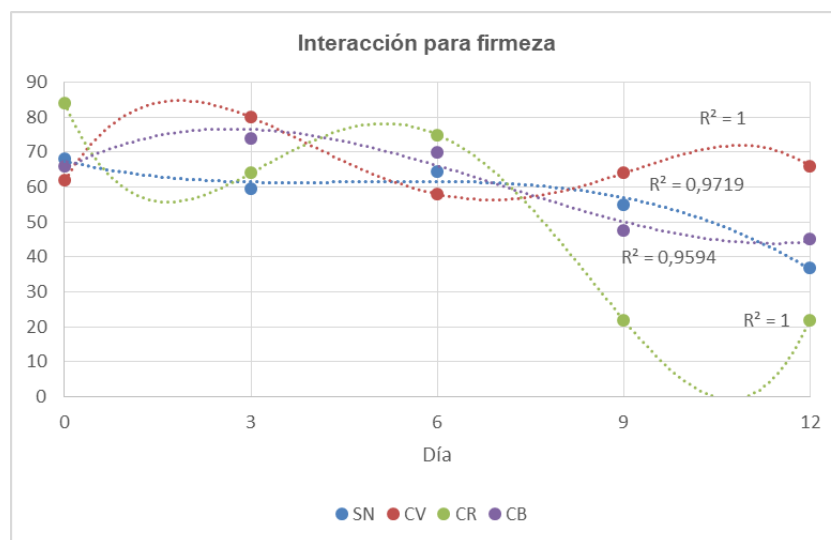


Figura 3. Comportamiento de la firmeza.

Tasa de respiración

La respiración regula la mayoría de las alteraciones bioquímicas, que se traducen en modificaciones de color, sabor y aroma, en función de factores intrínsecos y extrínsecos como la variedad de la fruta, el punto de cosecha (grado de madurez), la temperatura ambiente, la concentración de gases alrededor del producto y los cortes y daños mecánicos (García-Celis *et al.*, 2019).

Porcentaje de CO₂ La menor liberación de CO₂ ocurrió en el tratamiento SN, debido posiblemente a que la temperatura alrededor del corte modificó la composición atmosférica dentro de los materiales de cubierta (vinipel y recubrimiento) y la superficie, acelerando la respiración por la degradación celular y difusión del gas hacia el exterior de la célula (González-Orozco *et al.*, 2020), evidenciado en la superficie del vinipel como exudados en forma de pequeñas gotas. Este efecto también se presentó en zanahoria donde la velocidad de respiración entera y pelada comparada con cortes en forma de discos o tiras, aumentó de 6 a 8 y 12 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente; en coles, se incrementó a 6, 13 y 17 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, al ser cortada en cuartos y tiras de 0,5 x 3 cm y 0,25 x 1,5 cm, respectivamente en tanto que en lechuga aumentó de 2-3 veces (Cantwell, 1998).

Todas las muestras marcaron una curva ascendente con promedio de 25,2 % en CV, 26,1 % en CR y 27,1 % en CB, respecto a 13,4 % de SN en el día 12, lo que pone en manifiesto las significativas diferencias ($p < 0,05$) entre tratamientos. El ANOVA mostró que el 98,12 % de los datos se ajustan de forma aceptable al modelo matemático, evidenciando el efecto significativo de los tratamientos (SN, CV, CR, CB) sobre la tasa de respiración ($p < 0,05$), pues se presentaron diferencias significativas entre el testigo y CV y CR-CB. En la interacción tiempo-tratamiento, la película de vinipel el día 3 generó una barrera de protección ayudando a disminuir su producción; en el día 6, el tratamiento con recubrimiento presentó mayor producción con respecto a los demás, por lo tanto, mayor degradación celular. El día 12 la muestra testigo presentó menor porcentaje de CO₂, debido probablemente a la presencia de hongos que causaron daño físico e incrementaron la pérdida de agua y respiración, en tanto que los tratamientos con recubrimiento no tuvieron incidencia positiva sobre la disminución de porcentaje de CO₂ (Figura 4a).

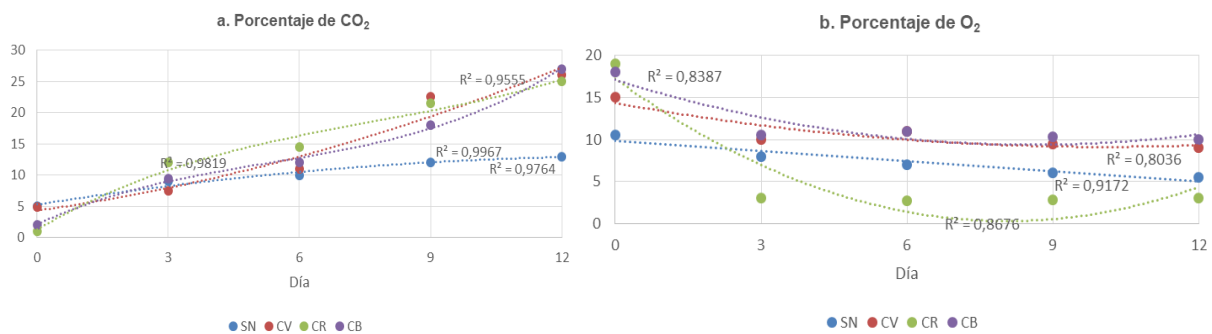


Figura 4. Comportamiento del porcentaje de CO₂ y O₂.

Porcentaje de O₂ Al realizar el corte del fruto, es notoria la disminución en el contenido de oxígeno debido al inicio del proceso de reparación celular, del cual es el principal sustrato (Figura 4b). Se observó mayor efectividad en los tratamientos con vinipel con o sin recubrimiento, con una disminución progresiva en el porcentaje de oxígeno, creando una modificación en la composición atmosférica: al bajar la concentración de oxígeno y/o subir la de dióxido de carbono, se suprimió el crecimiento fúngico.

Excepto entre CV y CB, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$), mientras que en la interacción tiempo-tratamiento, se encontró que en el día 3 el recubrimiento aceleró el consumo de O₂ para transformarlo en CO₂, iniciando la fase de senescencia, mientras los demás tratamientos presentaron una tendencia decreciente. El último día de seguimiento, el recubrimiento disminuyó el oxígeno de 19 a 3 %, lo que quiere decir que la respiración se desplazó hacia rutas anaerobias, generando compuestos volátiles como el acetaldehído y el etanol, que pueden dar origen al mal sabor y aroma (Franco-Gaytán *et al.*, 2018).

Pruebas bromatológicas

La energía proviene de la oxidación de las propias reservas de almidón, azúcares y otros metabolitos y a la deshidratación que inicia la activación de algunas enzimas (α -amilasa, β -amilasa e invertasa) (Corregido, 2020). Además, las levaduras también utilizan los azúcares como fuente de carbono para las necesidades de crecimiento y reproducción (Morocho y Leiva, 2019).

El contenido de carbohidratos fue de 33,6 % el día 0, disminuyendo hasta 19, 30 y 21,5 % el día 12 en SN, CV y CR, respectivamente (Figura 5a).

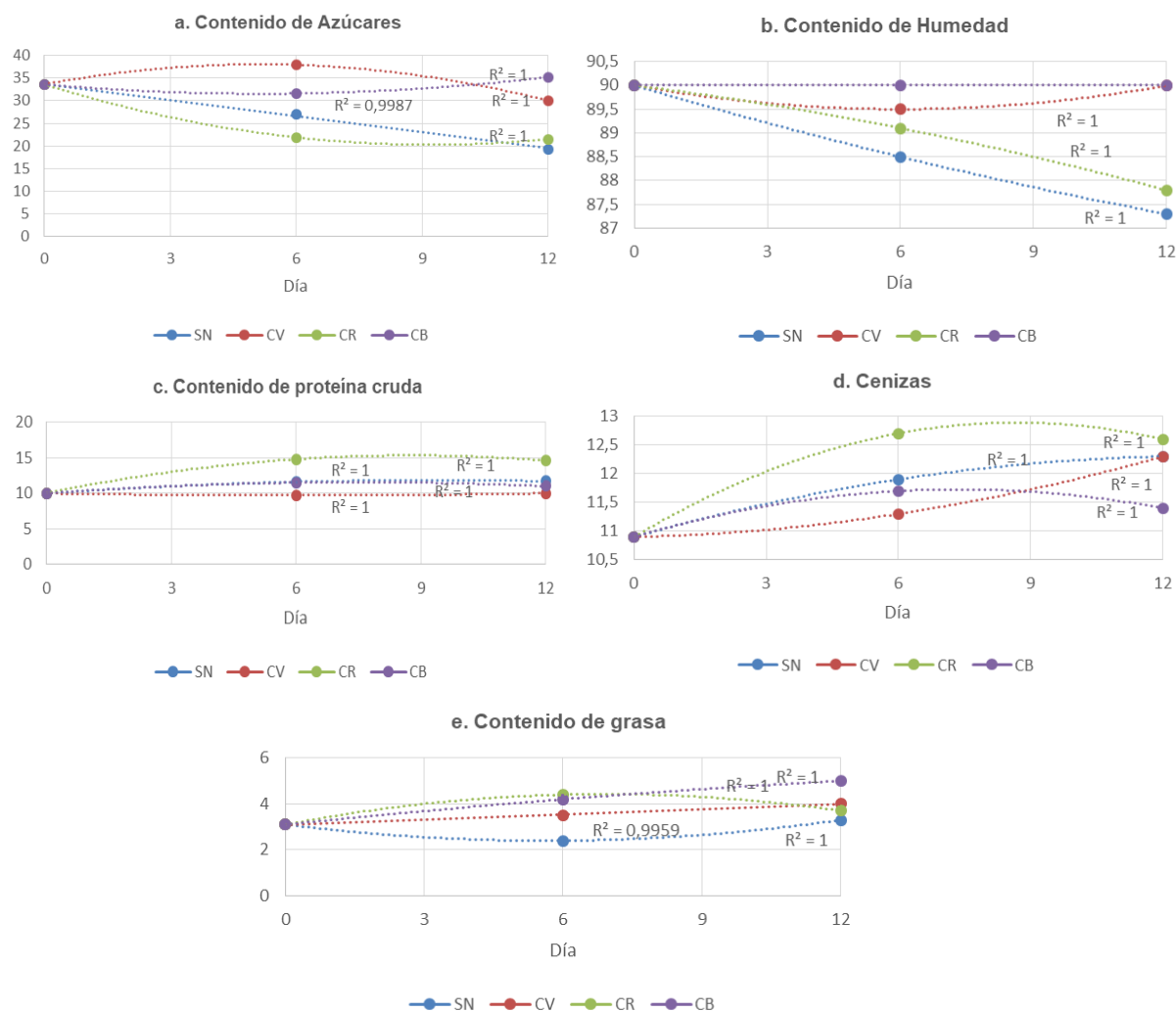


Figura 5. Resultados pruebas bromatológicas.

El porcentaje de humedad inicial (día 0) de los trozos de ahuyama fue 90 %. En el caso de los trozos de ahuyama SN y CR, se presentó una disminución hasta 87,3 y 87,8 % (Figura 5b), respectivamente, posiblemente como consecuencia directa de la diferencia de humedad entre la ahuyama y el ambiente, diferencial que genera el proceso de deshidratación celular (Mederos-Torres *et al.*, 2020).

La proteína cruda en los trozos de ahuyama al inicio fue de 10 %, que aumentó en los tratamientos SN, CR y CB con valores de 11,7, 14,6 y 11 % respectivamente (Figura 5c), posiblemente por la síntesis de enzimas y a la deshidratación que concentró el contenido de nutrientes (Wills *et al.*, 1984); resultado similar a lo reportado en hojas de *Moringa oleifera* al incrementarse en 25,6 y 31,5% en secado y deshidratado (Quintanilla-Medina *et al.*, 2018) y en banano de 1,27 % en su estado fresco a 2,18 % (Macías-Ganchozo *et al.*, 2018). El contenido de minerales presentó un incremento desde 10,9 % de cenizas en el día 0 (Figura 5d) debido posiblemente a la deshidratación de los trozos de ahuyama. El contenido inicial de grasa fue de 3,12 % (día 0), con incrementos en todos los tratamientos (Figura 5e), debido a la pérdida de agua que produjo la concentración de este nutriente, situación similar a lo encontrado por Casallas (2010) en banano deshidratado frente al fresco (1,1 g en 100 g).

Desarrollo fúngico

Los tratamientos con vinipel con o sin recubrimiento presentaron un crecimiento inferior a los demás, probablemente porque la capa protectora de vinipel aisló el trozo, minimizando el contacto de la superficie con el ambiente ya que las propiedades de barrera del vinipel como la permeabilidad, favorecieron la creación de una atmósfera que evitó el desarrollo de organismos de tipo aerobio. En el día 12 se observó una diferencia marcada del recubrimiento natural frente a los demás tratamientos, al presentar mayor crecimiento fúngico, permitiendo deducir que no es efectivo en frutos que han sufrido modificaciones mecánicas (cortes) y que, por el contrario, induce y potencia el desarrollo microbiano.

Los tratamientos SN y CR presentaron el mayor desarrollo de hongos sobre la superficie del trozo ($3,1 \times 10^4$ y $1,1 \times 10^5$ UFC/g respectivamente), debido probablemente a que la alta humedad de la ahuyama y las superficies cortadas proporcionaron las condiciones necesarias para el crecimiento fúngico (Hernández-López *et al.*, 2018) y a que algunos microorganismos aerobios psicrófilos, mesófilos y levaduras, encontraron disponibilidad de sustrato proveniente del almidón de yuca y materia orgánica de la ahuyama y a la temperatura ambiental predominante en la zona.

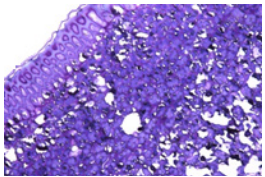
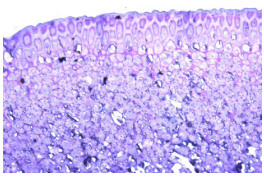
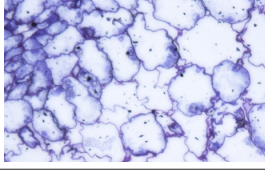
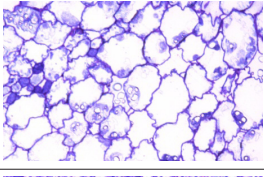
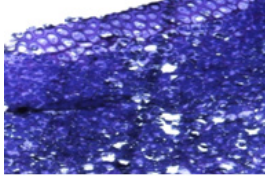
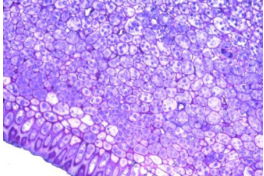
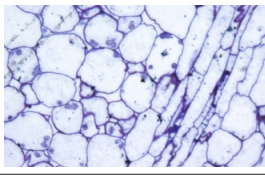
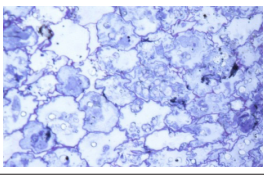
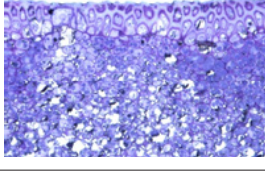
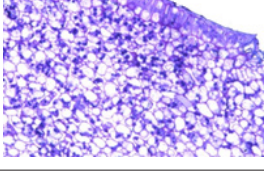
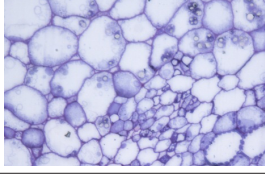
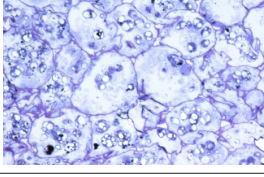
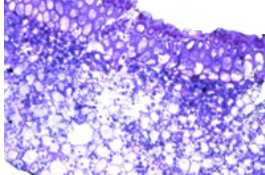
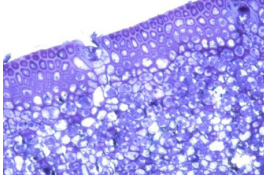
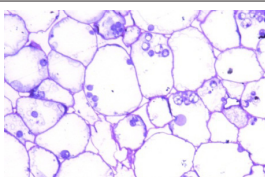
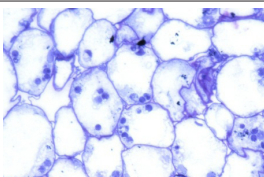
Pruebas microscópicas

Microscopía óptica de alta resolución (MOAR). La cáscara de la muestra testigo presentó células rotas desde el día 0, en tanto que en todos los tratamientos de la pulpa hubo considerable afectación debido al corte, causando liberación de agua en los espacios extracelulares y degradación de los lípidos de la membrana. Se evidencia presencia del recubrimiento en las células de la epidermis y tejido (colénquima) que incrementa la composición lipídica de la estructura, posiblemente por el aceite esencial de tomillo que, debido a la permeabilidad de las membranas fracturadas y porosas, permitieron su alojamiento en las estructuras.

Aunque el número de células cortadas fue relativamente pequeño, el tejido vegetal dañado produjo la aparición de espacios intra y extracelulares en la cáscara y pulpa, por la respuesta fisiológica de reparación del tejido, responsable del aumento de la respiración y de la producción de etileno, inducción de síntesis fenólica e inicio de la cicatrización de heridas.

Microscopía electrónica de transmisión (MET). La cáscara y la pulpa presentaron características propias de las células vegetales, como una pared celular gruesa que define la forma y el tamaño y proporciona sostén en la célula, cloroplastos y vacuolas cuya función es almacenar sustancias. En el tratamiento con vinipel se observó daño estructural en la cáscara y, como consecuencia, pérdida de la forma ovoide de la vacuola, células deformadas, espacios en la pared celular más pronunciados y deshidratación en las células, presentando encogimiento. La cáscara de los trozos en el sistema binario (CB) presentó mayor degradación celular con respecto a la muestra con recubrimiento, presentando células sin estructura definida, rompimientos celulares y células deshidratadas acompañados de encogimiento. En el tratamiento con vinipel se observó la ultraestructura de la pulpa, encontrando la estructura del almidón (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características de pulpa y cáscara por MET.

Tratamiento	Día 6	Característica	Día 12	Características
Muestra tes-tigo: cáscara		División celular; se pierde la forma alargada para hacerse redonda; presencia de espacios y ruptura celular en el tejido de volumen.		Pérdida de grosor. El tejido mecánico (colénquima) presenta compactación y agrupamiento; el tejido de volumen (parénquima) sigue el proceso de ruptura celular.
Muestra tes-tigo: pulpa		Pérdida de consistencia entre células, aparición de espacios extracelulares y disminución del tamaño de las células.		Pérdida de turgencia, disminución de tamaño y aumento de espacios intra y extracelulares, menor compactación.
CR: cáscara		Epidermis transformada, modificando los refuerzos de la cutícula y los tejidos mecánicos (colénquima); ruptura de células del tejido de volumen (parénquima).		Epidermis mantiene grosor, posee refuerzos en la estructura de cutícula y los tejidos mecánicos (colénquima).
CR: pulpa		Células compactadas y delimitadas por la pared celular, hay conservación del tejido de relleno (parénquima).		Pérdida de consistencia, degradación celular, rupturas a nivel intracelular y deshidratación del tejido.
CV: cáscara		División celular de epidermis y presencia de refuerzos en la cutícula y tejido mecánico; se evidencian espacios en el tejido de volumen (parénquima) y ruptura celular.		Epidermis más delgada con refuerzos sobre la estructura. Colénquima y parénquima con espacios translúcidos en el interior de la célula, no hay espacios extracelulares.
CV: pulpa		Las células del tejido de reserva (colénquima), presentan espacios extracelulares, a perder forma y tamaño.		Pérdida de turgencia con modificaciones de tamaño y generación de espacios extracelulares; no hay compactación entre células.
CB: cáscara		Epidermis y colénquima han sufrido transformación de sus refuerzos y aumento del tamaño de la epidermis. El colénquima presenta espacios a nivel intracelular, pero conserva su compactación.		Las células epidérmicas continúan con la estructura de refuerzo por la penetración del recubrimiento; hay mayor degradación celular en el parénquima, mayor cantidad de espacios y menor compactación.
CB: pulpa		Células con pérdida de tamaño y forma, evidenciado en los espacios intracelulares generados. Se inicia proceso de descompactación y pérdida de turgencia.		Células con pérdida de forma, mayor cantidad de espacios, deterioro general en el tejido de reserva (parénquima) y cambios en la anatomía general de tejido.

CONCLUSIONES

La mejor conservación de los trozos de ahuyama se observó con la película de vinipel, con o sin recubrimiento porque los frutos conservaron gran parte de sus características a temperatura ambiente (19 °C), retrasando significativamente la pérdida de peso, degradación de color, manteniendo la textura y firmeza de la muestra, menor crecimiento microbiano y conservación de los componentes (azúcares totales, contenido de grasa, humedad, proteína y minerales). La aplicación del recubrimiento natural a base de almidón de yuca y aceite esencial de tomillo al 1 %, no parece ser viable para la conservación de los trozos de ahuyama en pos cosecha. El recubrimiento puede ser favorable para frutos enteros que no han sufrido daño físico, pero al realizar el corte no es efectivo como una película de barrera contra los daños fisiológicos que se presentan.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad del Cauca por facilitar los recursos necesarios para el desarrollo de esta investigación, a la Asociación de Agricultores de Guachené (Cauca) por su participación activa en el desarrollo de las actividades.

REFERENCIAS

- ALCALDÍA DE POPAYÁN. Nuestra geografía. 2018. <http://popayan.gov.co/ciudadanos/popayan/nuestra-geografia>. [consultado enero 2018].
- CANTWELL, M. Fresh-Cut Biology and Requirements. En Fresh-Cut Products: Maintaining Quality and Safety UC Davis Postharvest Hort, 1998. Series No.10. Citado por Villegas, A. Cambios en la calidad de frutos de Litchi mínimamente procesados. <http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10856/Cambios%20en%20la%20calidad%20de%20frutos.pdf?sequence=1>. [Consultado julio 2019].
- CAÑIZARES, ADOLFO; AMAIZ-MOTA, SUSMARA; COLIVET, JULIO. Efecto de recubrimiento comestible a base de almidón de yuca sobre los parámetros químicos y sensoriales de cascos de guayaba. *Cumbres*, v. 5, n. 1, 2019, p. 137-154. <https://doi.org/10.48190/cumbres.v5n1a10>
- CASALLAS, L. Evaluación del análisis fisicoquímico del banano común (*Musa sapientum* L.) transformado por acción de la levadura *Candida guilliermondii* [Tesis Microbiología industrial y Nutrición y dietética]. Bogotá (Colombia): Pontificia Universidad Javeriana, 2010.
- CASTILLO-SILVA, DORA; SALAZAR-ANACONA, KATTERINE; MOSQUERA-SÁNCHEZ, SILVIO-ANDRÉS; RENGIFO-CANIZALES, EDWUIN. Efecto de recubrimientos de almidón modificado de yuca, proteína aislada de soya y aceite esencial de orégano aplicados a la papaya. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, v. 21, n. 1, 2018, p. 71-80. <https://doi.org/10.31910/rudca.v21.n1.2018.664>
- CERVANTES-PAZ, BRAULIO; ELHADI M., YAHIA. Efecto del proceso de maduración del fruto de aguacate en la absorción in vitro de carotenoides. *Revista Latinoamericana de Química*, n. 47, 2019, p. 353-353.
- CORREA-ÁLVAREZ, ENDER-MANUEL; YACOMELO-HERNÁNDEZ, MARLON-JOSÉ; LEÓN-PACHECO, ROMEL-IGOR; OROZCO-GUERRERO, ALFONSO-RAFAEL; SILVA-ACOSTA, GABRIEL-ERNESTO; TAMARA-MORELOS, RICARDO-ENRIQUE. Modelo productivo de ahuyama para la región caribe colombiana. Mosquera (Colombia): Agrosavia, 2019.

- CORREGIDO, MARÍA-CECILIA. Estudio funcional de enzimas del metabolismo del carbono y la energía en células auto- y heterotróficas de organismos fotosintéticos y quimiolitotrofos [Tesis doctorado en Ciencias Biológicas]. Santafé (Argentina): Universidad Nacional del Litoral, 2020.
- DE ARMAS-COSTA, RICARDO; MARTÍN-GÓMEZ, PEDRO; RANGEL-DÍAZ, JORGE. Signature of the maturity states of tropical climacteric fruits. *Revista Ciencia y Agricultura*, v. 17, n. 1, 2020, p. 51-65.
<https://doi.org/10.19053/01228420.v17.n1.2020.10654>
- FRANCO-GAYTÁN, IVÁN; SAUCEDO-VELOZ, CRESCENCIANO; CALDERÓN-ZAVALA, GUILLERMO; CRUZ-HUERTA, NICACIO; TELIZ-ORTIZ, DANIEL; GALICIA-CABRERA, ROSA M. Calidad y vida de anaquel de tres cultivares de fresa (*Fragaria ananassa*) tratadas con concentraciones altas de CO₂ por periodo corto. *Agro-Ciencia*, v. 52, n. 3, 2018, 14 p.
- GARCÍA-CELIS, JAQUELINE; ORTEGA-MUÑOZ, KEIDY-VIVIANA; PERLAZA-ESTERILLA, WAIBER. Evaluación del efecto de la aplicación de un recubrimiento de quitosano-aloe vera sobre la tasa de respiración de la uchuva (*Physalis Peruviana L.*). V Simposio de Materiales Poliméricos (Cali, Colombia, 2019). <http://web.b.ebscohost.com/acceso.unicauca.edu.co/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=15&sid=a9aa9948-de76-4ccf-b254-bac48d7159fb%40pdc-v-sessmgr03>
- GONZÁLEZ-OROZCO, BRIANDA; MERCADO-SILVA, EDMUNDO; CASTAÑO-TOSTADO, EDUARDO; VÁZQUEZ-BARRIOS, MARÍA-ESTELA; RIVERA-PASTRANA, DULCE M. Effect of short-term controlled atmospheres on the postharvest quality and sensory shelf life of red raspberry (*Rubus idaeus L.*). *CYTA – Journal of food*, v. 18, n. 1, 2020, p. 352–358.
<https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1758216>
- HERNÁNDEZ-LÓPEZ, MÓNICA; GUILLÉN-SÁNCHEZ, JESSICA; BAUTISTA-BAÑOS, SILVIA; GUILLÉN-SÁNCHEZ, DAGOBERTO. Evaluación de películas biodegradables en el control de hongos postcosecha de la papaya. *Cultivos Tropicales*, v. 39, n. 1, 2018, p. 52-60.
- HOYOS-YELA, NELSY; PÉREZ-IMBACHÍ, ROCÍO; MOSQUERA-SÁNCHEZ, SILVIO-ANDRÉS; PAZ-PEÑA, SANDRA-PATRICIA. Efecto de la aplicación de un recubrimiento de almidón de yuca modificado por vía ácida sobre el tomate larga vida. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica*, v. 22, n. 2, 2019, e1388.
<https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1388>
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACION (ICONTEC). Frutas y hortalizas frescas. NTC 1291. Bogotá (Colombia): 1977.
- MACÍAS-GANCHOZO, EDGAR; BELLO-MOREIRA, ITALO; TRUEBA-MACÍAS, SABRINA; ANCHUNDIA-MUENTES, XAVIER; ANCHUNDIA-MUENTES, MANUEL; BRAVO-MOREIRA, CELIO. Design, development and performance of solar dryer for pineapple (*Ananas comosus (L.) Merr.*), mamey (*Mammea americana L.*) and banana (*Musa paradisiaca L.*) fruit drying. *Acta Agronómica*, v. 67, n. 1, 2018, p. 30-38.
<https://doi.org/10.15446/acag.v67n1.60901>
- MÁRQUEZ, EVELYN-ROSA. Enfermedades. Conjunto Tecnológico para la Producción de Calabaza. Colegio de Ciencias Agrícolas. Estación Experimental Agrícola. Río Piedras (Puerto Rico): Universidad de Puerto Rico, 2012.
- MEDEROS-TORRES, YULIEM; BERNABÉ-GALLOWAY, PATRICIA; RAMÍREZ-ARREBATO, MIGUEL. Películas basadas en polisacáridos como recubrimientos biodegradables y su empleo en la postcosecha de los frutos. *Cultivos Tropicales*, v. 41, n. 3, 2020, e09.
- MONTERO-RECALDE, MAYRA; MIRA, JUAN-CARLOS; AVILÉS-ESQUIVEL, DIANA; PAZMIÑO-MIRANDA, PILAR; ERAZO-GUTIÉRREZ, RAMIRO. Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*. *Revista investigación veterinaria del Perú*, v. 29, n. 2, 2018, p. 588-593.
<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14520>
- MOROCHO, MARIUXI; LEIVA-MORA, MICHEL. Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Centro Agrícola*, v. 46, n. 2, 2019.

- MUÑOZ-MONSALVE, CATALINA. Operaciones especiales y de conservación en la poscosecha de frutas y hortalizas. Cadena Agrícola: 2020. <https://doi.org/10.22490/notas.3533>. [consultado enero 2018].
- OIRSA. Guía para uso de cloro en desinfección de frutas y hortalizas de consumo fresco, equipos y superficies en establecimientos. Dirección Regional de Inocuidad de los Alimentos. junio de 2020. <https://www.oirsa.org/contenido/2020/Guia%20para%20uso%20de%20cloro%20como%20desinfectante%20en%20establecimientos%2023.06.2020.pdf>. [consultado octubre 2019].
- PACHÓN, A.; MONTAÑO, A.; FISCHER, G. Efecto del empaque, encerado y temperatura sobre las características fisicoquímicas y organolépticas de la gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) en postcosecha. p. 72-78. En: Propiedades fisicoquímicas y sistemas de procesado: Productos hortofrutícolas en el desarrollo agroalimentario. Bogotá (Colombia): Editora Guadalupe, 2006.
- QUINTANILLA-MEDINA, J.J.; GARAY-MARTÍNEZ, J.R.; ALVARADO-RAMIREZ, E.R.; HERNÁNDEZ-MELÉNDEZ, J.; MENDOZA-PEDROZA, S.I.; ROJAS-GARCÍA, A.R.; JOAQUÍN-CANCINO, S.; HERNÁNDEZ-GARAY, A. Tiempo y temperatura sobre la pérdida de humedad y contenido de proteína en hojas de *Moringa oleifera* LAM. Agroproductividad, v. 11, n. 5, 2018, p. 88-92.
- SALOMÓN-CASTAÑO, JUAN; VILLARREAL-FUENTES, JUAN; FRANCO-MORA, OMAR; CASTAÑEDA-VILDÓZOLA, ÁLVARO; SÁNCHEZ-PALE, JESÚS. Resveratrol y 6-Bencil Amino Purina reducen la pérdida de firmeza y color en poscosecha de guanábana (*Annona muricata* L., Annonaceae). Acta Agrícola y Pecuaria, v. 6, n. 1, 2020, p. 1-9.
- SOLLIER, S.; ZACCARI, F.; MANDL, B. Elaboración del perfil y manual interpretativo de la norma de calidad de zapallos (*Cucurbita* sp). Montevideo (Uruguay): MGAP, 2005.
- UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA–SEDE PALMIRA. Agenda de Noticias. Encuentran dañinos hongos en zapallo. Julio de 2011. <http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/article/encuentran-daninos-hongos-en-zapallo.html>. [consultado marzo 2019].
- WILLS, R.; LEE, T.; GLASSON, M.C.; GRAHAM, D. Fisiología y Manipulación de Frutas y Hortalizas Post-Recolección. Zaragoza (España): Acribia, 1984.
- ZACCARI, F.; GALEAZZI, D.; RAHI, V. Efecto del tiempo de almacenamiento en condiciones controladas de temperatura sobre atributos físicos y químicos de zapallos “tipo kabutia” (*Cucurbita maximax* x *Cucurbita moschata*). Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, v. 16, n. 1, 2015, p. 114-120.

El huevo de gallina y su procesamiento industrial: una revisión*

Hen's egg and it's industrial process: a review

RAMÍREZ-CRESPO, LINA MARCELA¹; CORTÉS-RODRÍGUEZ, MISAEL²; MICANGUER-CARLOSAMA, ADRIANA³

RESUMEN

El huevo es un alimento con una gran cantidad de nutrientes para ser utilizados por nuestro organismo. El objetivo de la revisión es suministrar información general sobre el huevo de gallina y su relación con la salud; además, revisar el estado de los tratamientos térmicos y tecnologías emergentes aplicadas con el fin de generar valor en productos del sector avícola. La revisión se realizó sobre bases de datos de revistas científicas adscritas a Science Direct, Scopus, Scielo y Redalyc, durante un periodo comprendido entre 2013 y 2020. Dado que el huevo se considera un alimento de alto riesgo para la salud y un producto con una variedad de propiedades funcionales, en los últimos años, se ha identifica-

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 7 mayo 2020.

Aprobado para publicación: 11 octubre 2021.

* Proyecto de investigación de origen: "Development of a food supplement in powder based on egg, mango and added with physiologically active compounds". Financiación: The National University of Colombia and Avinal S.A. Culminación: February 3, 2020.

1 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de investigación de alimentos funcionales (GAP). Ingeniera de alimentos. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-6534-3843>

2 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de investigación de alimentos funcionales (GAP). PhD. Ingeniería de Alimentos. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-3407-1635>

3 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Grupo de investigación de alimentos funcionales (GAF). Candidata a PhD. Biotecnología. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-7630-3444>

Correspondencia: mcortesro@unal.edu.co; lmramirezcr@unal.edu.co

Cómo citar este artículo: RAMÍREZ-CRESPO, LINA MARCELA; CORTÉS-RODRÍGUEZ, MISAEL; MICANGUER-CARLOSAMA, ADRIANA. El huevo de gallina y su procesamiento industrial: una revisión. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 20, n. 1, 2022, p. 221-239. Doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1438>

do una tendencia en aplicar tratamientos térmicos que permitan obtener un producto seguro microbiológicamente para los consumidores y con el menor efecto en dichas propiedades para ser utilizado por la industria. En general, el huevo es una materia prima fácilmente procesable a través de diferentes tecnologías, que permiten obtener productos líquidos o sólidos para ser utilizados en nuevos productos procesados. El uso de estas tecnologías permite reducir los costos operativos y mejorar la calidad del producto.

ABSTRACT

The egg is a food with great amount of nutrients to be used by our body. Present review provides general information about chicken egg and its relation to health. In addition, it also compiled information regarding the status and conditions of heat treatments as well as emerging technologies applied giving value to products from the poultry sector. The review was carried out with databases dated between 2013 and 2020; from scientific journals affiliated to Science Direct, Scopus; Scielo, and Redalyc. The egg is a product with a variety of functional properties, but also considered as a high-risk food for health. In recent years, a trend that applies thermal treatments to obtain a microbiologically safe product for consumers, aims to have the least effect on its natural properties when handled by industry. In general, the egg is a raw material easily processed through different methods, allowing the obtention of liquid or solid products, to be used into new ones. Such technologies contribute to reduce operational costs as well as improving quality.

PALABRAS CLAVE:

Huevo; *Gallus domesticus*; Tratamientos térmicos; Secado; Propiedades funcionales; Clara; Yema; Proteína.

KEYWORDS:

Egg; *Gallus domesticus*; Heat treatments; Drying; Functional properties; White; Yolk; Protein.

INTRODUCCIÓN

Generalidades del huevo

El huevo es uno de los alimentos básicos de la nutrición humana, delicioso, saludable y fácil de digerir (Fernández *et al.*, 2017). La American Egg Board (2020), describe al huevo como sigue: 1) Cáscara: cubierta externa del huevo, rica en CaCO_3 , cuyo color depende de la raza del ave; 2) Yema: componente con mayor fuente de vitaminas, minerales, grasa y proteínas, su color depende de la alimentación de la gallina; 3) Disco germinal: mancha blanca, redonda, situada en la superficie de la yema; 4) Membrana vitelina: capa transparente que sostiene la yema; 5) Chalaza: cordones de clara que conservan la yema en el centro; 6) Cámara de aire formada al final del huevo, debido a la contracción en el almacenamiento; 7) Membranas de la cáscara (interna y externa), que rodean la clara y protegen contra la penetración bacteriana; 8) Clara líquida: masa que está más próxima a la cáscara, se extiende alrededor de la clara densa en los huevos de buena calidad; 9) Clara densa: masa firme rica en riboflavina y proteína, se extiende menos que la clara líquida en los huevos de alta calidad (Figura 1). La cáscara, clara y yema, representan un 12, 60 y 28 %, respectivamente.

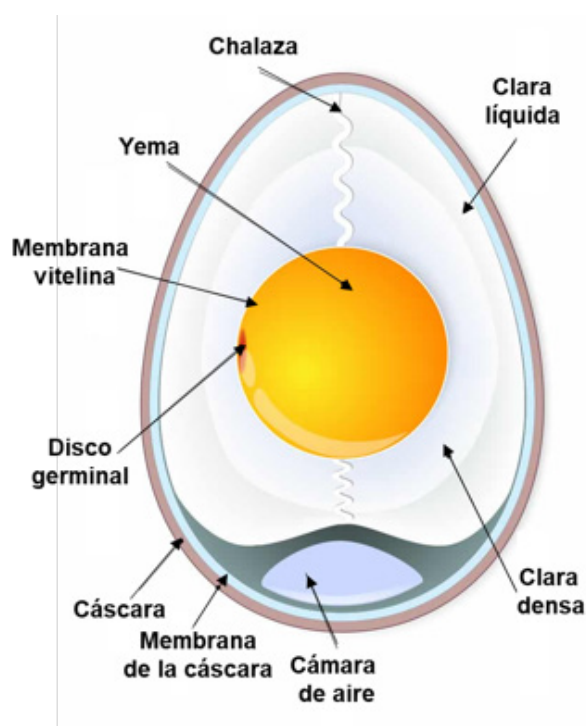


Figura 1. Estructura del huevo de gallina.

Fuente: <https://dietaelhuevo.com/composicion-y-estructura-del-huevo/>

El huevo es un alimento con importante contenido de nutrientes para el organismo, particularmente proteínas, lípidos, minerales y vitaminas de alta calidad (Lee and Paik, 2020). Se destacan contenidos de proteína (11,0-13,8 %), lípidos (8,5-12,0 %) y agua (74,4-88,7 %) (Hester, 2017; Lesnierowski y Stangierski, 2018; Eddin *et al.*, 2019). La proteína es de alto valor biológico, rica en aminoácidos esenciales, que promueven la síntesis y conservación de la masa muscular, relevante para atletas y adultos mayores; en estos últimos, contrarresta el proceso de sarcopenia, propio del envejecimiento (Lesnierowski y Stangierski, 2018). Las proteínas de la clara son principalmente, ovoalbúmina, ovotransferrina y ovomucoide; además, lisozima, avidina y ovomucina, siendo esta última, la responsable de la viscosidad de la clara (Eddin *et al.*, 2019). El cuadro 1 ilustra la composición del huevo de gallina.

Los huevos frescos presentan limitaciones en sus aplicaciones en la industria alimentaria, debido al transporte, corta vida útil, fragilidad, entre otros. La calidad del huevo inicia por estar libre de contaminación microbiana (Ahim *et al.*, 2019); sus características externas se valoran en función del estado de la cáscara (forma, textura, firmeza, limpieza y color), mientras que las interiores son evaluadas comercialmente por iluminación en el ovoscopio, en la que se revela el tamaño de la cámara de aire, color y movilidad de la yema (Fernández *et al.*, 2017; Fernández *et al.*, 2018). El color de la clara debe ser traslucido o ligeramente opaco, en un estado de gel y estar libre de manchas de sangre y carne. La yema en buenas condiciones presenta un color uniforme que va entre amarillo brillante a naranja, y está fija en el centro del huevo por las chalazas, que no son excesivamente grandes. Otros aspectos internos son los valores sensoriales (olor y color), toxinas y metales pesados (Zhang *et al.*, 2019).

Con respecto a la calidad de la clara, los factores más importantes son la línea genética, la edad del ave, el tiempo transcurrido luego de la ovoposición y las condiciones de almacenamiento (García *et al.*, 2016). Saleh *et al.* (2020), reportaron que el almacenamiento a bajas temperaturas prolonga la calidad del huevo; además, se presenta una disminución en su peso, un aumento del pH y de los sólidos totales de la clara (Shan *et al.*, 2020). Por otra parte, las unidades Haugh representan un indicador de frescura del huevo, que asocia propiedades como altura de la clara, el pH, índice de yema y color (Saleh *et al.*, 2020).

Cuadro 1. Composición del huevo de gallina.

Nutrientes	Huevo entero	Clara	Yema
Energía (calorías)	72,00	17,00	55,00
Proteína (g)	6,30	3,60	2,70
Carbohidratos (g)	0,36	0,24	0,21
Grasa total (g)	4,80	0,06	4,50
Grasa monoinsaturada (g)	1,80	0,00	2,00
Grasa poliinsaturada (g)	1,00	0,00	0,72
Grasa saturada (g)	1,60	0,00	1,60
Grasa Trans (g)	0,02	0,00	0,02
Colesterol (mg)	186,00	0,00	184
Colina (mg)	126,00	0,40	116,00
Riboflavina (mg)	0,20	0,15	0,09
Vitamina B12 (mg)	0,45	0,03	0,33
Ácido fólico (mg)	24,00	1,00	25,00
Vitamina D (UI)	41,00	0,00	37,00
Vitamina A (UI)	270,00	0,00	245,00
Vitamina E (mg)	0,50	0,00	0,44
Selenio (µg)	15,40	6,60	9,50
Fósforo (mg)	99,00	5,00	66,00
Hierro (mg)	0,88	0,03	0,46
Zinc (mg)	0,65	0,01	0,39
Calcio (mg)	28,00	2,00	22,00
Sodio (mg)	71,00	55,00	8,00
Potasio (mg)	69,00	54,00	19,00

Fuente: Cortez, 2015

El huevo y la salud

Desde los años 70, el consumo de huevo ha sido limitado debido a su relación con enfermedades cardiovasculares, al identificarse niveles elevados de colesterol plasmático como factor de riesgo (Dussaillant *et al.*, 2017). Sin embargo, Aljohi *et al.* (2019), no encontraron alteraciones en los niveles de biomarcadores de enfermedades cardiovasculares con un consumo de 12 huevos/semana en adultos mayores. Clayton *et al.* (2017), reportaron en su revisión que no hubo afectación en las concentraciones de lípidos en sangre con la ingesta de 2 huevos en el desayuno, 5 veces/semana, durante 14 semanas, en comparación con un desayuno isocalórico sin huevo. Del mismo modo, no se reportan cambios en las concentraciones del colesterol alto o bajo, en hombres de mediana edad ni en mujeres premenopáusicas (20-50 años) con ingestas de 3 huevos/día durante 30 días; así como tampoco, en mujeres posmenopáusicas (≥ 60 años) y adultos de 40 a 65 años con ingestas de 3 y 1 huevo/día, respectivamente.

Por otro lado, Fuertes (2016) reportó la “no evidencia de efectos adversos en la ingesta diaria de huevos sobre cualquier factor de riesgo cardíaco en adultos con enfermedad arterial coronaria durante un periodo de seis semanas”. De igual forma, Katz *et al.* (2014), evaluaron el efecto de la ingesta diaria en 32 adultos con enfermedad arterial coronaria establecida, concluyendo que no existen evidencias de efectos adversos en ningún factor de riesgo cardíaco (dilatación, lípidos, presión arterial o peso corporal) en un lapso de 6 semanas.

Estas investigaciones y muchas otras han permitido reevaluar las restricciones del consumo de huevo; además, hoy existe un mayor conocimiento sobre las causas de las enfermedades cardiovasculares, las cuales pueden explicar cómo el colesterol en la dieta influye en el colesterol en la sangre (Katz *et al.*, 2014; Clayton *et al.*, 2017).

TRATAMIENTOS CONVENCIONALES

Las industrias que utilizan huevos para la fabricación de sus productos requieren operaciones de almacenamiento, cascado, mezclado y la gestión de las cáscaras resultantes como residuos, por lo que es poco práctico el uso de huevos en cáscara. Por ello, el sector industrial ha evolucionado con la elaboración de ovoproductos como huevos enteros, claras y yemas en estado líquido, congelados o en polvo para su posterior uso (Roseland *et al.*, 2020), con ventajas al ser de fácil almacenamiento, empleo y dosificación, evitando los problemas de la manipulación de la cáscara, y ahorrando mano de obra y tiempo (Spanish Association Of Egg Products Industries, SAEPI, 2020).

El procesamiento de los ovoproductos inicia con la sanitización de los huevos, posteriormente se presentan etapas de quebrado, filtrado, homogenización, pasteurización, enfriamiento, refrigeración o congelación o secado, y empaque (Eddin *et al.*, 2019). La máquina quebradora, elimina la cáscara y separa la clara de la yema, los cuáles se procesan por separado o se unen posteriormente para la producción de huevo entero. El proceso de filtración retira los elementos gruesos (pedazos de cáscara y chalazas). El producto se somete a un enfriamiento entre 2 y 4 °C previo al tratamiento térmico y pasa a los tanques de mezclado para obtener un líquido homogéneo y con una textura adecuada. Posteriormente, se somete a pasteurización para reducir la carga patógena propia del producto. Dependiendo del tipo de ovoproducto, se procede a la etapa de deshidratación o directamente a empacar para su comercialización (Avícola Nacional S.A., 2018). Diversas tecnologías han sido utilizadas para la obtención de una amplia gama de ovoproductos, los cuales pueden ser agrupados en 3 categorías: líquidos, congelados y deshidratados, diversificándose según su aplicación en la industria de alimentos (Belyavin, 2020).

Los ovoproductos poseen propiedades funcionales (Masure *et al.*, 2019) (Cuadro 2), debido a su composición, la cual confiere características bioquímicas y funcionales, dependiendo de sus estructuras en estado natural o después de ser procesados. La clara es ampliamente utilizada como ingrediente en la industria por sus propiedades de gelificación y formación de espuma, con importancia evidente en productos como postres, pudines, productos cárnicos reformulados, tofu y surimi (Fernández *et al.*, 2017); mientras que la yema es usada para mayonesas, aderezos, salsas, pasta y otros productos, ya que los fosfolípidos, lipoproteínas y proteínas presentes actúan como agentes activos de superficie, que permiten la formación de emulsiones a partir de líquidos inmiscibles como el aceite y el agua (Fernández *et al.*, 2018). La clara y la yema pueden coagularse y actuar como enlace con otros ingredientes; además, se utilizan en productos de confitería y helados para controlar la cristalización de las moléculas de agua y crear una textura suave y una buena sensación en la boca (Belyavin, 2020).

Nuevas alternativas se están aplicando para mejorar las propiedades funcionales del huevo, se resalta la eliminación de restos de yema en la clara (> poder espumante), la modificación enzimática de la yema (> poder emulsificante), aplicación de tratamientos térmicos de los ovoproductos líquidos (> firmeza de los geles obtenidos por coagulación térmica), el empleo de aditivos (> poder espumante), entre otros (Fu *et al.*, 2020; Gazolu *et al.*, 2020).

Pasteurización. El huevo en cáscara tiene una corta vida útil, por esta razón, se ha recurrido a varios métodos de conservación. La pasteurización es uno de ellos y debe garantizar una buena calidad de la materia prima cruda en cuanto a su composición y frescura, ya que esa calidad puede verse afectada por las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa) y el tiempo (Eddin *et al.*, 2019).

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), sugiere que el huevo líquido entero se pasteurice al menos a 60 °C por 3,5 min; mientras que, en el Reino Unido, las recomendaciones son pasteurizar al menos a 64 °C durante 2,5 min. La pasteurización tradicional de huevo entero varía entre 65 y 68 °C durante 2 a 5 min, con el fin de asegurar 5 a 6 reducciones logarítmicas de microorganismos, especialmente *Salmonella enteritidis* y *Listeria Monocytogenes* (Lechevalier *et al.*, 2017).

Cuadro 2. Propiedades funcionales de los ovoproductos.

Propiedad	Descripción	Aplicaciones	Referencias
Adhesiva	Adhiere ingredientes como semillas y granos de diversos productos.	Barritas dietéticas, pan y aperitivos.	(Fernández <i>et al.</i> , 2017; Masure <i>et al.</i> , 2019)
Espumante	Las proteínas de la clara forman espuma consiguiendo productos más aireados y ligeros.	Merengues, mousses, soufflés y productos horneados.	(Fernández <i>et al.</i> , 2017; Gharbi y Labbañ, 2019; Shan <i>et al.</i> , 2020)
Aglutinante	Las proteínas de la clara dan estructura y ligan todos los componentes del alimento entre ellos.	Aperitivos, productos cárnicos, embutidos.	(Fernández <i>et al.</i> , 2017; Fu <i>et al.</i> , 2020)
Clarificante	La clara de huevo inhibe el pardeamiento enzimático y evita la turbidez en bebidas.	Vinos, zumos .	(Liu <i>et al.</i> , 2017)
Coagulante y gelificante	Las proteínas de la clara y de la yema cambian de estado fluido a gelatinoso.	Tartas y glaseados, flanes, pudines .	(Espina <i>et al.</i> , 2014; Fernández <i>et al.</i> , 2018; Shan <i>et al.</i> , 2020; Xie <i>et al.</i> , 2020)
Colorante	Los pigmentos de la yema contribuyen al color anaranjado de muchos alimentos.	Bollería y panadería, pasta, flan y natillas.	(Valverde <i>et al.</i> , 2016; Fernández <i>et al.</i> , 2017; Fernández <i>et al.</i> , 2018)
Emulsionante	Los fosfolípidos y lipoproteínas son agentes tensoactivos que estabilizan las emulsiones aceite/agua.	Aderezos para ensaladas, salsas.	(Shan <i>et al.</i> , 2020; Fu <i>et al.</i> , 2020; Gazolu <i>et al.</i> , 2020)
Antioxidante	Proteínas con actividad biológica que promueve el metabolismo de las grasas.	Bollería dulce, galletas, glaseados.	(Lesnierowski y Stangierski, 2018; Abeyrathne <i>et al.</i> , 2018; Lee y Paik, 2019)
Textura y palatabilidad	Da cuerpo y suavidad sustancial a los alimentos.	Variedades de pan, dulces y pudines.	(Fernández <i>et al.</i> , 2017; Alavi <i>et al.</i> , 2020)
Flexibilidad e hidratación	Proteínas hidrolizadas mejoran la solubilidad, flexibilidad e hidratación, permitiendo conservar las moléculas húmedas y frescas.	Panes especiales, dulces y bollería.	(Goilleux <i>et al.</i> , 2014; Masure <i>et al.</i> , 2019; Fu <i>et al.</i> , 2020)
Mejora la textura	Mantiene firme la textura de los alimentos y mejora las masas esponjosas.	Bollos, alimentos ligeros.	(Garcés <i>et al.</i> , 2016; Fernández <i>et al.</i> , 2017; Zhang <i>et al.</i> , 2019; Eddin <i>et al.</i> , 2019)
Espesante	Espesa las salsas y da cuerpo consiguiendo mejorar el producto.	Salsas y recubrimiento, alimentos preparados.	(Fernández <i>et al.</i> , 2017; Fernández <i>et al.</i> , 2018; Zhang <i>et al.</i> , 2019)

Fuente: Espina *et al.* (2014).

Los tratamientos térmicos proporcionan productos microbiológicamente seguros e incrementa la vida útil, pero también afectan las propiedades funcionales de las proteínas (Uysal *et al.*, 2017). Estos cambios se deben a la desnaturalización de las proteínas, cuyas moléculas pierden su estructura nativa y cambian a una disposición más desordenada a través del reordenamiento espacial de las cadenas de polipéptidos dentro de la molécula. La desnaturalización puede ser inducida por diversos factores o agentes fisicoquímicos como irradiación, calor, pH, sal y efectos de superficie (Fernández *et al.*, 2018). Por otro lado, en los ovoproductos, la desnaturalización inducida por el calor también se afecta por las condiciones mecánicas del proceso de pasteurización, incluido el diseño del equipo, la velocidad de flujo y el cambio de temperatura entre el medio de calentamiento y el producto (Llave *et al.*, 2018). Lechevalier *et al.* (2017) han reportado que la pasteurización del huevo a 60 °C mejora las propiedades interfaciales y de digestibilidad de las proteínas ovotransferrina y lisozima; además, las lipoproteínas presentes, al ser desnaturalizadas, son capaces de formar una red reticulada que da como resultado la gelificación inducida por el calor (Chang *et al.*, 2020).

La pasteurización de la clara realizada entre 55 y 64,4 °C provoca un aumento en la coagulación de la proteína y una disminución de la actividad de formación de espuma cuando se prolongan los tiempos. Esto se debe principalmente a la desnaturalización de la ovotransferrina y a la desnaturalización irreversible de la red ovomucina-lisozima (Iwashita *et al.*, 2019). Los cambios de la capacidad espumante de la clara también se afectan por otros factores como edad del ave, tiempo de almacenamiento, tiempo de batido, homogenización, centrifuga-

ción, temperatura, pH, contenidos de agua y azúcar, y por la presencia de yema (Khemakhem *et al.*, 2019). Para el caso de la pasteurización de la yema, Gharbi y Labbafi (2019) reportaron que algunas proteínas cambian las propiedades físicas tales como la viscosidad y la solubilidad, así como, las propiedades emulsionantes.

La incorporación de aditivos es una práctica que permite mejorar la estabilidad de los ovoproductos durante la pasteurización al retrasar su desnaturalización y modificar las propiedades funcionales (Chang *et al.*, 2020). La sal afecta los enlaces de H₂ e inhibe las interacciones entre las moléculas de agua y los grupos hidrofílicos en la cadena principal de la proteína, promoviendo modificaciones en la capacidad de gelificación. El azúcar mejora la estabilidad de la espuma y ofrece una textura pseudo-sólida en los productos de confitería (Alavi *et al.*, 2020). El uso de agentes bactericidas (H₂O₂), reduce la contaminación microbiana, permitiendo una pasteurización a temperaturas más bajas y afecta en menor grado las propiedades funcionales (Vieira *et al.*, 2019).

A nivel industrial se han implementado métodos de pasteurización con agua caliente, irradiación UV, calor seco o agua electrolizada (Eddin *et al.*, 2019), entre otros. Hester (2017) pasteurizó huevos en cáscara con aire caliente, reportando una temperatura en la superficie externa mayor a 70 °C y en el interior menor a 55 °C; sin embargo, el tratamiento no fue efectivo debido a que la yema presentó reducción máxima de *Salmonella enteritidis* de 1,9 ciclos Log. Otra opción es que la pasteurización con aire caliente puede combinarse alternativamente con la refrigeración y el envasado en atmósfera modificada (Jia *et al.*, 2019).

Pasteurización en seco. La pasteurización con calor seco es una alternativa en productos que son susceptibles a la temperatura. En el proceso se busca elevar la temperatura interna del producto y mantenerla durante cierto tiempo hasta eliminar los microorganismos objetivos (Lechevalier *et al.*, 2017). Para este proceso, antes del secado por aspersión (SA) de la clara, no se requiere de una pasteurización previa, ya que la pasteurización se hará una vez el producto se encuentre en polvo y de esta forma se evite el deterioro de las propiedades funcionales. La integración de la tecnología de radiofrecuencia antes del SA ha permitido una reducción superior a 6,7 ciclos Log para *Salmonella* (Wei *et al.*, 2020).

Gharbi y Labbafi (2019) reportan tratamientos térmicos (calentamiento en seco), no térmicos (alta presión hidrostática, micro fluidización dinámica de alta presión, Irradiación ultravioleta, ultrasonido de alta intensidad) y químicos (reacción de Maillard, hidrólisis enzimática) para mejorar las propiedades de formación y estabilidad de espuma; adicionalmente, reportan que el calentamiento de la clara causa un aumento sustancial en su flexibilidad molecular e hidrofobicidad superficial, dándose un despliegue más rápido y una mayor interacción intermolecular en la interfase formando una película más cohesiva.

Nahariah *et al.* (2018), evaluaron la solubilidad de la clara en polvo fermentada, pasteurizada en seco a 40, 50 y 55 °C por 30, 39 y 48 horas, encontrando la desnaturalización de la proteína y una menor solubilidad a mayor tiempo, alcanzando un valor óptimo del 57 % después de 30 horas a 55 °C, en tanto que Lechevalier *et al.* (2017), mejoraron las propiedades interfaciales de la clara, sin potenciar su resistencia proteica a la digestión a calentamiento en seco de 2 a 5 días a 70 °C y con 2 días a 80-90 °C.

Ultrapasteurización. El tratamiento más utilizado en la industria del huevo es la pasteurización térmica, sin embargo, los componentes del huevo son muy sensibles a las altas temperaturas (Lechevalier *et al.*, 2017). La ultra pasteurización (UHT) aplica más calor durante un tiempo muy corto, garantizando una mejor seguridad microbiológica, pero puede afectar la calidad del huevo; además, produce la coagulación de las proteínas, generando pérdidas de la capacidad espumante, emulsionante y gelificante, lo cual también limita su uso como materia prima en la industria alimentaria (Espina *et al.*, 2014). Liu *et al.* (2020), compararon huevos líquidos UHT y no pasteurizados almacenados durante 5 semanas, encontrando que el proceso UHT aumentó la vida útil del producto y mejoraron las propiedades viscosidad, resistencia del gel y solubilidad de las proteínas, principalmente.

Congelación. Entre las tecnologías de conservación más utilizadas se encuentra la congelación, que reduce el crecimiento de los microorganismos y prolonga la vida útil del huevo. Wakamatsu *et al.* (2018), evaluaron la influencia de la congelación–descongelación de la yema mediante la técnica de resonancia magnética nuclear, evidenciando que la desnaturalización es causada principalmente por la agregación de lipoproteínas de baja densidad. En un estudio similar, Au *et al.* (2016), evaluaron la estabilidad de la yema fresca y gelificada descongelada, encontrando que se mantienen hasta 1 y 5 días de almacenamiento respectivamente. Duan *et al.* (2017), evaluaron la influencia de los procesos de congelación y descongelación de la clara de huevo (10 % en contenido proteico) sobre las propiedades estructurales y la capacidad de formación de espuma de las proteínas que constituyen la clara (ovoalbúmina, ovomucoide, ovotransferrina, ovomucina y lisozima), encontrando modificaciones en la hidrofobicidad superficial y en la disposición de los grupos sulfhidrilo libres de las proteínas, como consecuencia de los cambios en sus estructuras moleculares. Las propiedades de formación y estabilidad de espuma mejoraron en la ovotransferrina y ovomucoide mientras que en la lisozima mejoró levemente, y en ovoalbúmina no se presentaron diferencias significativas. Huang *et al.* (2016), evaluaron mayonesas elaboradas con yema congelada y yema fresca, encontrando que la reología de la primera se incrementó, modificando las propiedades del producto y disminuyendo su estabilidad térmica. Por otro lado, nuevas alternativas como la congelación magnética han sido aplicadas por Fernández *et al.* (2017), quienes reportaron alta desnaturalización de las proteínas, además de la formación y estabilidad de espuma, firmeza del gel y contenido de sulfhidrilo libre.

SECADO POR ASPERSIÓN

El uso de los ovoproductos en polvo en la industria pastelera, mezclas de panadería, mayonesas y aderezos, helados, pastas, entre otros, se ha incrementado porque ofrece ventajas en la reducción de costos de almacenamiento y transporte, mayor seguridad microbiana y facilidad de dosificación (Rannou *et al.*, 2015). La elaboración de los ovoproductos en polvo tiene al menos tres etapas críticas: pasteurización, secado y almacenamiento, donde las condiciones de operación y almacenamiento afectan sus propiedades.

El proceso más empleado en la industria de ovoproductos en polvo es el SA, ya que es una operación económica, flexible y continua, produce partículas de buena calidad, y es la técnica de microencapsulación donde los bajos tiempos de residencia favorecen los componentes activos térmicamente sensibles; además, un alto contenido de sólidos en la alimentación obtenidos principalmente por evaporación y ultrafiltración al vacío, mejora la eficiencia térmica y la productividad (Betoret *et al.*, 2015).

Tratamientos previos a la alimentación al SA han sido reportados con el objetivo de mejorar las propiedades de los ovoproductos en polvo. La presencia de glucosa confiere malas propiedades de batido, favorece la reacción de pardeamiento durante el almacenamiento, además de un sabor desagradable (Ma *et al.*, 2019). De la misma manera, en los ovoproductos líquidos que son sometidos a deshidratación, la presencia de glucosa favorece el pardeamiento durante el almacenamiento, por lo que, para reducir este efecto, se debe disminuir su nivel hasta obtener una concentración menor a 0,01 % en el producto final (Sujata, 2014). Ji *et al.* (2020) emplearon procesos de ultrafiltración, adsorción de resina, precipitación y ajustes de pH en la separación de lisozima, ovomucina, ovotransferrina, ovomucoide y ovoalbúmina, obteniendo en la mayoría de las proteínas una pureza mayor a 90 %, sin afectación significativa en las propiedades funcionales.

Las condiciones de operación del SA y el contenido de agentes encapsulantes son factores importantes que afectan la calidad de los ovoproductos en polvo (Matumoto *et al.*, 2017). El huevo entero y la yema son más susceptibles a los cambios de las propiedades funcionales durante el SA que la clara, a pesar de que las proteínas de la clara coagulan a una temperatura más baja (Rannou *et al.*, 2015).

Magnani *et al.* (2015), han reportado mayor rendimiento durante el SA de huevo entero con temperatura de entrada de aire entre 120 y 150 °C, sin embargo, a 150 °C se produce la disminución de la cromaticidad amarilla. De igual forma, a 150 °C se obtuvo mejor rendimiento en la obtención de clara en polvo, pero causó oscurecimiento del producto debido a la reacción de Maillard (Magnani *et al.*, 2016). Wang y Selomulya (2020), encapsularon por SA péptidos de proteína de clara de huevo sometidos con temperatura de entrada de 180 °C, obteniendo una eficiente actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina.

Katekhong y Charoenrein (2018) no encontraron en clara en polvo influencia significativa de la temperatura de entrada al SA (140–180 °C) sobre la solubilidad, gelificación, color y la exposición de grupos SH, sin embargo, las propiedades funcionales presentaron mayores cambios a los 2 meses de almacenamiento y a temperatura de 40 °C, siendo la más afectada la propiedad de gelificación y la desnaturalización de las proteínas de la clara de huevo en polvo. Por otro lado, Rannou *et al.* (2015), evaluaron en la yema en polvo durante el almacenamiento obtenido por SA (160 y 180 °C), y almacenamiento entre 1 y 8 meses y temperaturas de 15 y 30 °C, reportando un incremento del tamaño de partícula con el tiempo (51,2→161,3 µm), mientras que la capacidad de formación de espuma mejoró para todos los tratamientos. Javed *et al.* (2018), evaluaron en polvo de huevo entero obtenido por SA, la influencia de las temperaturas de entrada (160–200 °C) y salida (60–80 °C), el flujo volumétrico de alimentación (200–400 mL/h) y velocidad de atomización (16000–24000 rpm), encontrando un efecto significativo de las temperaturas sobre las variables humedad y actividad acuosa (a_w) (favorable para propiedades funcionales y tiempo de almacenamiento), mientras que el contenido de ácidos grasos insaturados presentó una reducción significativa, conllevando a un incremento del contenido de peróxidos durante el almacenamiento (60 días y 25 °C).

En general, durante el almacenamiento, la temperatura y tiempo afectan las propiedades funcionales y el color en la yema en polvo (Ma *et al.*, 2019), además, el huevo en polvo afecta en forma significativa la oxidación de la fracción lipídica presente, reduciendo su vida útil (Matumoto *et al.*, 2017). Por otro lado, Wei *et al.* (2020), reportaron en yema en polvo con $a_w \approx 0,3$ limita el crecimiento de *Salmonella*, sin embargo, a mayores tiempos de almacenamiento y en condiciones incorrectas de empaquetado, la bacteria sobrevive. Algunos autores han adicionado tocoferol como antioxidante en la elaboración del huevo en polvo, con el objetivo de controlar la degradación de los lípidos en el proceso y durante el almacenamiento (Matumoto *et al.*, 2017).

TECNOLOGÍAS EMERGENTES

Altas presiones. La tecnología de altas presiones es amigable con el medio ambiente y ha mostrado resultados positivos como alternativa a la pasteurización convencional, por su efecto letal sobre microorganismos patógenos, incluso a bajas temperaturas (Menon *et al.*, 2020), además, mejora las propiedades funcionales de las proteínas y contribuye a la inactivación enzimática (Singh y Ramaswamy, 2015), garantizando un producto de alta calidad, más seguro y con mayor vida útil, en tanto que alimentos que posean componentes de bajo peso molecular, es menos perjudicial que los procesos térmicos, debido a que los enlaces covalentes no se ven afectados por la presión (Gharbi y Labbafi, 2019).

En los ovoproductos líquidos, las altas presiones pueden afectar la conformación de la proteína y conducir a la desnaturalización, agregación o gelificación, dependiendo del sistema, la presión aplicada, la temperatura y la duración del proceso (Gharbi y Labbafi, 2019). Patrignani *et al.* (2013), reportaron una mayor inactivación de la *Salmonella entérica* inoculada en huevo líquido entero cuando se aplicaron la homogenización a alta presión (100 MPa) que con el tratamiento térmico y, además, se presentó un aumento en la capacidad de formación de espuma (50 %) con respecto a las muestras no tratadas (26 %) aunque Panozzo *et al.* (2014), reportaron en clara líquida tratada a 150 MPa/8 min, una reducción de 5 ciclos Log para la *Salmonella entérica*.

Zhu *et al.* (2018), reportaron que el uso de altas presiones es efectivo en la inactivación de proteínas. La aplicación de 500 MPa/10 min reduce la alergenicidad de la ovoalbúmina (89,7 % de inhibición), 400 MPa/10 min reduce la acción de alérgeno de la ovoalbúmina hidrolizada de huevo, y 700 MPa/50 °C favorece la inhibición de la avidina en clara de huevo. Naderi *et al.* (2017), evidenciaron una alta desintegración de la fracción granular de la yema durante la obtención de extractos enriquecidos en tratamientos a 600 MPa/5 min, lo cual favoreció el rendimiento (menor a 230 µg folato/g sólido seco), además se observó la presencia de fosvitina en la fracción granular. Chung *et al.* (2016), aplicaron en huevos enteros líquidos tratamientos a 300 MPa/3 min seguido de calor (52 °C/3,5 min y 55 °C/2 min) en presencia de citrato de trietilo (2 %), alcanzando una reducción de más de 5 ciclos Log en *E. coli* y *L. innocua*.

En la yema de huevo, la fosvitina es de gran interés por el alto contenido en el aminoácido serina, debido a sus propiedades funcionales y biológicas. La aplicación de 600 MPa/10 min permitió incrementar la transferencia de la proteína hacia la clara facilitando su recuperación en la fracción soluble del huevo (Duffuler *et al.*, 2020). Por otra parte, Singh y Ramaswamy (2015), reportaron a 550 MPa/5 min un aumento en la viscosidad debido a la desnaturalización y agregación de las proteínas e influir negativamente en las propiedades funcionales de formación de espuma y el color, en la clara y en el huevo entero, en tanto que Shahbaz *et al.* (2018) reportaron a 550 MPa/5 min la conservación del color de la yema y sus propiedades sensoriales, en huevos pelados cocidos tratados por altas presiones y posterior pasteurización.

Calentamiento óhmico. Es eficaz para la pasteurización térmica, escaldado, deshidratación, entre otros, también llamada “calentamiento por resistencia” o “Electro calefacción”. El calentamiento óhmico se produce por el paso de una corriente eléctrica a través del alimento, incrementando la temperatura en su interior en forma rápida y homogénea, por la acción de la resistencia que ofrece el alimento a la corriente eléctrica, donde se inhiben los microorganismos a través del calor, proporcionando bajas pérdidas (Jaeger *et al.*, 2016; Menon *et al.*, 2020).

La tecnología ha sido aplicada para evaluar su efecto sobre las propiedades en el huevo entero, mejorar la capacidad de formación de espuma, aumentar la viscosidad, conservar las propiedades de gelificación y color y reducir la desnaturalización de las proteínas (Ramaswamy *et al.*, 2014). Llave *et al.* (2018), evaluaron el efecto de los tratamientos térmico y del calentamiento óhmico (30 V/20 KHz) de la yema y de la clara en baño de agua (20→90 °C a 0,5 °C/min) sobre las propiedades de color, encontrando que el aumento de la temperatura produce un cambio de color de la yema (naranja claro → amarillo vivo) y de la clara (transparente → nublado), relacionando ambos fenómenos con la desnaturalización de las proteínas, concluyendo que el calentamiento óhmico conserva mejor la calidad nutricional y sensorial.

Alamprese *et al.* (2019), aplicaron al huevo entero tratamientos con una frecuencia de 20 kHz y 2 escalas de tensión (0–90 V/0–180 V), manteniendo el producto a 65,5 °C/3 min, 70 °C/1 min, y 67 °C/4,5 min, garantizando la tecnología como una alternativa adecuada a la pasteurización convencional; además, se observó un incremento de la viscosidad aparente (hasta 190 %), un exceso de espuma (hasta 28 %) e incremento de la dureza de gel (hasta 15 %). Otros autores aplicaron tratamientos a 20 V/cm/20–60 °C al huevo líquido, sin encontrar cambios significativos en la viscosidad aparente, ni en la energía de activación; además, reportan que la aplicación del tratamiento 10 V/cm/ 50 Hz–10 kH en una solución de albúmina conllevó a la transición a gel a 75 °C, mientras que, en concentraciones de albúmina < 2 % p/v en la clara no hubo formación de gel (Jaeger *et al.*, 2016). Por otro lado, Alamprese (2015), reportaron la comparación de la pasteurización tradicional (65 °C/3,5 min) con el calentamiento óhmico (0–68 °C/1,4 min/20 V/cm) en huevo entero, encontrando una incorporación de aire de 324±7 % y 484±3 % respectivamente.

Campos eléctricos pulsados. Los campos eléctricos son una tecnología efectiva en la industria alimentaria, donde la temperatura alcanzada no supera los 55 °C, contribuyendo en el mejoramiento de la funcionalidad del alimento, la capacidad de extracción y la recuperación de compuestos nutricionales, así como la biodisponibilidad de micronutrientes (Barba *et al.*, 2015). Se aplica una intensidad eléctrica en el rango de 15 a 50 kV/cm y tiempos

entre 1 y 100 μ s, lo cual genera una diferencia de potencial entre las membranas celulares, lo suficientemente alta como para hacer que éstas se descompongan y, por lo tanto, inactiven los microorganismos de forma irreversible debido a la permeabilidad celular (Menon *et al.*, 2020).

La aplicación de campos eléctricos ha permitido la modificación de las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas de la clara, la obtención de péptidos en el huevo entero o como tratamiento previo a la hidrólisis de las proteínas, mejorando su digestibilidad (Liu *et al.*, 2018). Los mismos autores evaluaron la bioactividad de las proteínas hidrolizadas de huevo, reportando que la actividad antioxidante y antiinflamatoria de la ovomucina mejoró a las condiciones de 695 KJ/kg, 1,7 KV/cm y pH=4 (Liu *et al.*, 2019). Así mismo, la tecnología produce en la clara agregaciones principalmente en las proteínas lábiles al calor, cuando se utiliza alta intensidad en el campo eléctrico pulsado (700 KJ/kg, 1,8 kV/cm y pH=5-7) (Liu *et al.*, 2017). Baba *et al.* (2018), pasteurizaron huevo entero, integrando un calentamiento previo a temperatura inferior a 55 °C y campos eléctricos pulsados a 50 KV/cm, obteniendo una reducción de 6 ciclos Log en las enterobacterias aerógenas, cuando utilizaron carboximetilcelulosa como vehículo de incorporación, mientras que se presentó menor efectividad en la inhibición de enterobacterias cuando se utilizaron líquidos que contenían lipoproteínas extraídas del huevo entero.

Espina *et al.* (2014), aplicaron tratamientos combinados al huevo entero: 25 kV/cm y 100 kJ/kg seguido de calor suave (60 °C, 3,5 min) en presencia de 200 μ L/L de aceite esencial de limón, encontrando una reducción de 4 ciclos Log de *Salmonella senftenberg* 775W y *Listeria Monocytogenes*. Por otro lado, Wu *et al.* (2014), después de aplicar tratamientos de 25 kV/cm durante 200, 400, 600 y 800 μ s en clara, reportaron una disminución en el contenido de proteína soluble de 4,18, 4,40, 7,84 y 9,66 %, respectivamente, atribuyendo esto a la formación de agregados durante su procesamiento; adicionalmente, reportaron que en condiciones de 25kV/cm y 800 μ s se reducía en 4,5 ciclos log para *Salmonella*.

Microondas. El calentamiento por microondas es una de las tecnologías emergentes que gana terreno cada día en el procesamiento de alimentos, siendo efectiva en procesos de cocción, secado, conservación y pasteurización; en esta última, es capaz de destruir microorganismos a temperaturas menores que la convencional, sin embargo, no es uniforme ya que los campos electromagnéticos están afectados por las propiedades de los alimentos, geometría del empaque y la ubicación dentro del equipo (Zhang *et al.*, 2013). La tecnología aprovecha el comportamiento dieléctrico de las sustancias expuestas para generar calor desde el interior, la cual ocurre a cierta profundidad del producto (Wang *et al.*, 2020).

Li *et al.* (2019), evaluaron en clara en polvo la influencia del microondas sobre la solubilidad, la capacidad espumante y la estabilidad de la espuma, determinando que las mejores condiciones se obtuvieron a 419,4 W/90 s. Li *et al.* (2020), reportaron en proteínas de clara en polvo tratadas por calentamiento y fosforilación con microondas, un incremento en la porosidad e hidrofobicidad de la superficie y reducción en tamaño de partícula mejorando así las propiedades de humectabilidad (ángulo de contacto 142,85°), solubilidad (95,52 %) y dispersabilidad. En otro estudio, Li *et al.* (2018), evaluaron la fosforilación química y asistida por microondas de las proteínas de la clara, reportando un incremento del potencial zeta, y la capacidad y estabilidad de formación de espuma con el uso de microondas (400-500 W), mientras que a 600 W obtuvieron una disminución en estas propiedades. Por otro lado, Sumashree *et al.* (2019), pasteurizaron huevo líquido por microondas (2,45 GHz/900 W/ 20, 40 y 60 s), obteniendo con 40 s la ausencia de *Salmonella* para todos los tratamientos y límite seguro para el recuento total de bacterias ($>10^3$ Log UFC/mL).

Ultrasonido. El ultrasonido aplicado en alimentos comprende ondas de sonido con frecuencias entre 20 y 100 kHz e intensidad de sonido de 10 a 1000 W/cm². Los alcances implican la inactivación microbiana y enzimática, la homogeneización de fluidos multifásicos, la emulsificación, cristalización, limpieza de superficies y la mejora de la transferencia de masa en tecnologías de membrana, entre otros (Goilleux *et al.*, 2014; Menon *et al.*, 2020). Es una tecnología no térmica con efectos positivos o negativos en la calidad de los alimentos, que utiliza energía de vibración, produciendo burbujas de cavitación y genera temporalmente puntos de presión y temperatura alta

cuando ocurre la implosión. Se ha encontrado que la ultrasonificación es más efectiva en la inhibición de la actividad enzimática cuando se combina con otros procesos, tales como alta presión y/o calor (Chemat *et al.*, 2017).

En el huevo, Jun *et al.* (2020), aplicaron ultrasonidos mediante frecuencia dual continua (20/40 KHz), mejorando las propiedades de gelificación, solubilidad, capacidad de formación de espuma y su estabilidad proteica; además, disminuyó el tamaño de partícula en comparación con el huevo no tratado. Xiufang *et al.* (2020), reportaron una sinergia efectiva de tratamientos de ultrasonidos (968W/cm²) con tratamientos térmicos (35 °C/20 min) y adición de lisozima, en la pasterización de huevo entero líquido, logrando una reducción de 4,26 ciclos Log de *Salmonella typhimurium*. Kulchaiyawat *et al.* (2016), aplicaron en clara de huevo un calentamiento inicial a 63 °C por 5 min, seguido de la sonicación y adición de anhídrido octenil succínico (OSA), minimizando la formación de espuma durante el mezclado con otros ingredientes, mejorando la estabilidad térmica de las proteínas y concluyendo que el efecto del ultrasonido depende de la frecuencia, el pH y el tiempo de exposición. Gharbi y Labbafi (2018), reportaron que el tratamiento con ultrasonido a 20 kHz durante 2-14 min mejoró la solubilidad de las proteínas de la clara de huevo en la solución (10 % p/p y pH 8) y redujo el tamaño de las partículas de la proteína. Sheng *et al.* (2018), evaluaron el efecto del ultrasonido a 20 kHz en diversos pretratamientos de potencia (90, 120, 240, 360 y 480 W durante 10 min) sobre la formación de espuma de la clara, encontrando que la aplicación de 360 W produce mayor capacidad de formación de espuma (260 %). Stefanović *et al.* (2017), evaluaron tratamientos por ultrasonido a 20 kHz durante 2 a 15 min en la clara, reportando una disminución en el tamaño de partícula (368,4±10,5 → 68,4±5,2 nm) e incremento las fuerzas repulsivas de acuerdo con el potencial zeta (-4,7±1,4 → -22,8±1,1 mV), lo que mejoró la estabilidad de la proteína (193,3 %) frente a una clara no tratada; además, se incrementó solubilidad (8,1 %) y la capacidad de formación de espuma (60,6 %). Aunque, la tecnología es utilizada en la industria de alimentos, debe tenerse en cuenta que puede afectar la calidad sensorial, manifestándose en sabores desagradables, cambios en los parámetros físicos y degradación de los componentes.

Radiación Ultravioleta. La radiación de luz ultravioleta (UV) es una tecnología no térmica que puede utilizarse en la inactivación de diversos tipos de microorganismos pero, debido a la débil penetración de la luz, solo funciona en superficies o líquidos claros (Ricke y Gast, 2017); además, sus efectos dependen del tipo de producto y la dosis aplicada. Algunos autores afirman que no produce agentes indeseables que afecten el sabor, olor y color del alimento; además, elimina la *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Listeria* en huevos (Gharbi y Labbafi, 2019).

Ricke y Gast (2017) reportan letalidad para la mayoría de los microorganismos en las superficies, además de microorganismos en el aire; por otro lado, aplicaron radiación UV (23,6±0,1 J/cm²/20 s) en huevos con cáscara, encontrando una reducción logarítmica de 5,3 UFC/cm² de *S. Enteritidis* sin provocar daño visual al huevo. Bing *et al.* (2019) evaluaron la aplicación de 10 W/cm² combinada con desinfección con agua electrolizada ligeramente ácida sobre la descontaminación de las cáscaras de los huevos y, específicamente, sobre la *Salmonella enteritidis*, encontrando una reducción de 6,54 Log UFC/g. Hester (2017) aplicó un tratamiento UV con intensidad de 0,620 mW/cm² durante 7 min, reportando una reducción de 4,6 ciclos logarítmicos de *Salmonella Typhimurium* inoculada; además, se encontró una reducción de 2,6 y 4,3 ciclos Log de *Salmonella enteritidis* con tratamientos (0,1 mW/cm²/2 min) y (2,5 mW/cm²/5 min) respectivamente.

La radiación UV de alta energía se ha usado experimentalmente para pasteurizar ovoproductos líquidos, congelados y en polvo, siendo los resultados satisfactorios en muchos casos; sin embargo, se acelera la oxidación de los ácidos grasos, aunque no causa cambios de color o pH de los huevos líquidos. Por otro lado, cuando la clara se pasteuriza por radiación UV se puede generar cambios de sabor pero, si ésta es posteriormente sometida a SA, los sabores extraños se volatilizan (Sheng *et al.*, 2018). De Souza *et al.* (2015), cuantificaron vitaminas (A, B₂, B₅, C y E), minerales (P, Cl, K, Na, Ca, Mg, Fe y Zn) y principales metabolitos secundarios (luteína y zeaxantina) en el huevo entero, yema y clara, después de ser sometidos a la exposición a UV, reportando buena estabilidad de estos nutrientes a excepción del retinol, vitamina C y carotenoides, los cuales mostraron pérdidas de hasta 80, 66 y 61 %, respectivamente.

Por otra parte, Mattioli *et al.* (2020) compararon el efecto del ozono (600 mg/h for 2 h) y la radiación UV (254 nm por 15 s) sobre la calidad microbiológica del huevo, reportando una reducción de 2,27 y 5,57 ciclos Log de *Salmonella* en los huevos tratados con UV y ozono, respectivamente.

CONCLUSIONES

Los ovoproductos son materias primas utilizadas en una gran variedad de industrias alimenticias como panadería, repostería, salsas y aderezos, sopas, pastas, cremas, entre otros, pero a su vez, es una matriz alimentaria muy sensible ante los tratamientos térmicos, ya que sus proteínas tienen bajas temperaturas de desnaturalización, por lo que se requiere el uso de nuevas tecnologías o tecnologías mejoradas que permitan el procesamiento a temperaturas más bajas o menor tiempo de proceso, para que no se vean afectadas severamente las propiedades funcionales, características sensoriales y valores nutricionales de los productos.

REFERENCIAS

- ABEYRATHNE, E.; HUANG, X.; AHIN, D.U. Antioxidant, angiotensin-converting enzyme inhibitory activity and other functional properties of egg white proteins and their derived peptides–A review. *Poultry science*, v. 97, n. 4, 2018, p. 1462-1468.
<https://doi.org/10.3382/ps/pex399>
- AHIM, I.; ALI, R.; HABIB, A.; GIBRIL, S. Evaluation of Egg Quality Conditions in Omdurman Locality. *Journal of Applied Veterinary Sciences*, v. 4, n. 2, 2019, p. 1-5.
<https://doi.org/10.21608/JAVS.2019.62645>
- ALAMPRESE, CRISTINA. The effects of novel pasteurization technologies on egg product functionalities. Faculty of Agricultural and Food Sciences, Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences (DeFENS). Milan (Italy): University of Milan, 2015, p. 1-8.
- ALAMPRESE, C.; CIGARINI, M.; BRUTTI, A. Effects of ohmic heating on technological properties of whole egg. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 58, n. 2019, p. 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102244>
- ALAVI, F.; TIAN, Z.; CHEN, L.; EMAD-DJOMEHH, Z. Effect of CaCl₂ on the stability and rheological properties of foams and high-sugar aerated systems produced by preheated egg white protein. *Food Hydrocolloids*, 2020, p. 1-12.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105887>
- AMERICAN EGG BOARD. The incredible edible egg eggyclopedia. Egg safety, and nutrition, [online], 2020. Disponible en: <https://www.aeb.org/> [Citado 2 de abril de 2020]
- ALJOHI, H.; DOPLER-NELSON, M.; CIFUENTES, M.; WILSON, T.A. The consumption of 12 Eggs per week for 1 year does not alter fasting serum markers of cardiovascular disease in older adults with early macular degeneration. *Journal of Nutrition and Intermediary Metabolism*, v. 15, 2019, p. 35-41.
<https://doi.org/10.1016/j.jnim.2018.11.004>
- AU, C.; WANG, T.; ACEVEDO, N.C. Development of a low resolution HNMR spectroscopic technique for the study of matrix mobility in fresh and freeze-thawed hen egg yolk. *Food chemistry*, v. 204, 2016, p. 159-166.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.085>
- AVICOLA NACIONAL S.A. Egg product development process, 2018. Actualizado 28 de enero de 2020.
- BARBA, F.; PARNIAKOV, O.; PEREIRA, S.; WIKTOR, A.; GRIMI, N.; BOUSSETTA, N.; SARAIVIA, J. A.; RASO, J.; MARTIN-BELLOSO, O.; WITROWA-RAJCHERT, D.; LEOVKA, N.; VOROBIEV, E. Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. *Food Research International*, v. 77, n. 4, 2015, p. 773-798.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.015>
- BABA, K.; KAJIWARA, T.; WATANABE, S.; KATSUKI, S.; SASAHARA, R.; INOUE, K. Low-Temperature Pasteurization of Liquid Whole Egg using Intense Pulsed Electric Fields. *Electronics and communications in Japan*, v. 101, n. 2, 2018, p. 87-94.
<https://doi.org/10.1002/ecj.12053>
- BELYAVIN, C. Eggs: Use in the Food Industry. *Encyclopedia of Food and Health*, 2016, p. 476-479.
10.1016/B978-0-12-384947-2.00245-2
- BETORET, E.; BETORET, N.; ROCCULI, P.; DALLA-ROSA, M. Strategies to improve food functionality: Structure-property relationships on high pressures homogenization, vacuum impregnation and drying technologies. *Trends in Food Science and Technology*, v. 46, n. 1, 2015, p. 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.006>
- CHANG, C.; XU, Y.; SHI, M.; SU, Y.; LI, X.; LI, J.; YANG, Y. Effect of dry-heat and guar gum on properties of egg white powder: Analysis of forming capacity and baking performance. *Food Hydrocolloids*, v. 99, 2020, p. 1-6.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105333>
- CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A.G.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry*, v. 34, 2017, p. 540-560.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- CHUNG-YI, W.; HSIAO-WEN, H.; CHIAO-PING H.; BINGHUEI-BARRY, Y. Recent Advances in Food Processing Using High Hydrostatic Pressure Technology, *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*, v. 56, n. 4, 2016, p. 527-540.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2012.745479>
- CLAYTON, Z.; FUSCO, E.; KERN, M. Egg consumption and heart health: A review. *Nutrition*, v. 37, n. 2017, p. 79–85.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.12.014>
- CORTÉS, S. El huevo: Aliado nutricional durante el ciclo vital. *El huevo en la mira 2*. 2 ed. Bogotá (Colombia): Federación Nacional de Avicultores, 2015, p. 1–100.
- DE SOUZA, P.M.; MÜLLER, A.; BENIAICH, A.; MAYER-MIEBACH, E.; OEHLKE, K.; STAHL, M.; GREINER, R.; FERNÁNDEZ, A. Functional properties and nutritional composition of liquid egg products treated in a coiled tube UV-C reactor. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 32, 2015, p. 156–164.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.004>
- DUAN, X.; LI, J.; ZHANG, Q.; ZHAO, T.; LI, M.; XU, X.; LIU, X. Effect of a multiple freeze-thaw process on structural and foaming properties of individual egg white proteins. *Food chemistry*, v. 228, n. 2017, p. 243-248.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.005>
- DUFFULER, P.; GIARRATANO, M.; NADERI, N.; SUWAL, S.; MARCINIAK, A.; PERREAULT, V.; OFFRETF, C.; BRISSONA, G.; HOUSE, J.; POULIOT, Y.; DOYEN, A. High hydrostatic pressure induced extraction and selective transfer of β -phosvitin from the egg yolk granule to plasma fractions. *Food Chemistry*, v. 321, 2020, p. 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126696>
- DUSSAILLANT, C.; ECHEVERRÍA, G.; ROZOWSK, J.; VELASCO, N.; ARTEAGA, A.; RIGOTTI, A. Egg intake and cardiovascular disease: a scientific literature review. *Nutrición Hospitalaria*, v. 34, n. 3, 2017, p. 710–718.
<http://dx.doi.org/10.20960/nh.473>
- EDDIN, A.; IBRAHIM, S.; TAHERGORABI, R. Egg quality and safety with an overview of edible coating application for egg preservation. *Food chemistry*, v. 296, 2019, p. 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.182>
- ESPINA, L.; MONFORT, S.; ÁLVAREZ, I.; GARCÍA-GONZALO, D.; PAGÁN, R. Combination of pulsed electric fields, mild heat and essential oils as an alternative to the ultrapasteurization of liquid whole egg. *International Journal of Food Microbiology*, v. 189, 2014, p. 119–125.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.002>

- FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; PÉREZ-MATEOS, M.; DADASHI, S.; GÓMEZ-GUILLÉN, C.; SANZ, P. Impact of magnetic assisted freezing in the physicochemical and functional properties of egg components. Part 1: Egg white. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 44, 2017, p. 131-138.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.07.004>
- FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; PÉREZ-MATEOS, M.; DADASHI, S.; GÓMEZ-GUILLÉN, C.; SANZ, P. Impact of magnetic assisted freezing in the physicochemical and functional properties of egg components. Part 2: Egg yolk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 49, 2018, p. 176-183.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.11.006>
- FUERTE-GARCÍA, A. Egg consumption and cardiovascular risk. *Nutrición Hospitalaria*, v. 33, n. 4, 2016, p. 41-43.
<http://dx.doi.org/10.20960/nh.344>
- FU, X.; HUANG, X.; JIN, Y.; ZHANG, S.; MA, M. Characterization of enzymatically modified liquid egg yolk: Structural, interfacial and emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, v. 105, 2020, p. 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105763>
- GARCÉS-RIMÓN, M.; SANDOVAL, M.; MOLINA, E.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; MIGUEL, M. Egg protein hydrolysates: New culinary textures. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, v. 3, 2016, p. 17-22.
<https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2015.04.001>
- GARCÍA, D.; COLAS, M.; LÓPEZ, W.; PÉREZ, E.; SÁNCHEZ, A.; LAMAZARES, M.; GRANDÍA, R. El peso corporal y su efecto sobre indicadores bioproductivos en gallinas white leghorn L33. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, v. 63, n. 3, 2016, p. 188-200.
<http://dx.doi.org/10.15446/rfmvz.v63n3.62714>
- GAZOLU-RUSANOVA, D.; MUSTAN, F.; VINAROV, Z.; TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N.; SOYANOV, S.; DE FOLTER, J.W. Role of lysophospholipids on the interfacial and liquid film properties of enzymatically modified egg yolk solutions. *Food Hydrocolloids*, v. 99, 2020, p. 1-13.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105319>
- GHARBI, N.; LABBAFI, M. Effect of processing on aggregation mechanism of egg white proteins. *Food Chemistry*, v. 252, 2018, p. 126-133.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.088>
- GHARBI, N.; LABBAFI, M. Influence of treatment-induced modification of egg white proteins on foaming properties. *Food hydrocolloids*, v. 90, 2019, p. 72-81.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.060>
- GOILLEUX, A.; PAINE, J.; SUN, D. *Emerging technologies for food processing*. 2 ed. United States Of America: Elsevier, 2014, p. 629.
- HESTER, P. *Breeder hen influence on nutrient availability for the embryo and hatchling. Egg Innovations and Strategies for Improvements*. 1 ed. United States Of America: Elsevier Inc., 2017, p. 1-646.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800879-9.00006-8>
- HUANG, L.; WANG, T.; HAN, Z.; MENG, Y.; LU, X. Effect of egg yolk freezing on properties of mayonnaise. *Food Hydrocolloids*, v. 56, 2016, p. 311-317.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.027>
- IWASHITA, K.; HANDA, A.; SHIRAKI, K. Co-aggregation of ovotransferrin and lysozyme. *Food Hydrocolloids*, v. 89, 2019, p. 416-424.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.022>
- JAEGER, H.; ROTH, A.; TOEPFL, S.; HOLZHAUSER, T.; ENGEL, K.; KNORR, D.; VOGEL, R.; BANDICK, N.; KULLING, S.; HEINZ, V.; STEINBERG, P. Opinion on the use of ohmic heating for the treatment of foods. *Trends in Food Science and Technology*, v. 55, 2016, p. 84-97.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.007>
- JAVED, A.; IMRAN, M.; AHMAD, N.; HUSSAIN, A.I. Fatty acids characterization and oxidative stability of spray dried designer egg powder. *Lipids in health and disease*, v. 17, n. 1, 2018, p. 282.
<https://doi.org/10.1186/s12944-018-0931-1>

- JI, S.; AHN, D.; ZHAO, Y.; LI, K.; LI, S.; HUANG, X. An easy and rapid separation method for five major proteins from egg white: successive extraction and MALDI-TOF-MS identification. *Food Chemistry*, v. 315, 2020, p. 1-32.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126207>
- JIA, F.; YAN, W.; YUAN, X.; DAI, R.; LI, X. Modified atmosphere packaging of eggs: Effects on the functional properties of albumen. *Food Packaging and Shelf Life*, v. 22, 2019, p. 1-6.
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100377>
- JUN, S.; YAOYAO, M.; HUI, J.; OBADI, M.; ZHONGWEI, C.; BIN, X. Effects of single-and dual-frequency ultrasound on the functionality of egg white protein. *Journal of Food Engineering*, v. 277, 2020, p. 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.109902>
- KATEKHONG, W.; CHAROENREIN, S. Influence of spray drying temperatures and storage conditions on physical and functional properties of dried egg white. *Drying Technology*, v. 36, n. 2, 2018, p. 169-177.
<https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1307218>
- KATZ, D.; GNANARAJ, J.; TREU, J.; MA, Y.; KAVAK, Y.; NJIKE, V. Effects of egg ingestion on endothelial function in adults with coronary artery disease: A randomized, controlled, crossover trial. *American Heart Journal*, v. 169, n. 1, 2014, p. 162–169.
<https://doi.org/10.1016/j.ahj.2014.10.001>
- KHEMAKHEM, M.; ATTIA, H.; AYADI, M. A. The effect of pH, sucrose, salt and hydrocolloid gums on the gelling properties and water holding capacity of egg white gel. *Food Hydrocolloids*, v. 87, 2019, p. 11-19.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.041>
- KULCHAIYAWAT, C.; WANG, C.; YU, C.; HAN, Z.; WANG, T. Combination of treatments to improve thermal stability of egg albumen. *LWT–Food Science and Technology*, v. 72, 2016, p. 267–276.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.047>
- LECHEVALIER, V.; GUÉRIN-DUBIARD, C.; ANTON, M.; BEAUMAL, V.; BRIAND, E.; GILLARD, A.; LE GOUAR, Y.; MUSIKAPHUN, N.; TANGUY, G.; PASCO, M.; NAU, F.; DUPONT, D. Pasteurisation of liquid whole egg: Optimal heat treatments in relation to its functional, nutritional and allergenic properties. *Journal of Food Engineering*, v. 195, 2017, p. 137-149.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.10.007>
- LEE, J.; PAIK, H. Anticancer and immunomodulatory activity of egg proteins and peptides: a review. *Poultry Science*, v. 98, n. 12, 2019, p. 6505-6516.
<https://doi.org/10.3382/ps/pez381>
- LESNIEROWSKI, G.; STANGIERSKI, J. What's new in chicken egg research and technology for human health promotion: A review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 71, 2018, p. 46-51.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.022>
- LI, P.; SUN, Z.; MA, M.; JIN, Y.; SHENG, L. Effect of microwave-assisted phosphorylation modification on the structural and foaming properties of egg white powder. *LWT–Food Science and Technology*, v. 97, 2018, p. 151-156.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.055>
- LI, P.; SHENG, L.; JIN, Y. Using microwave-assisted phosphorylation to improve foaming and solubility of egg white by response surface methodology. *Poultry science*, v. 98, n. 12, 2019, p. 7110-7117.
<https://doi.org/10.3382/ps/pez424>
- LI, P.; JIN, Y.; SHENG, L. Impact of microwave assisted phosphorylation on the physicochemistry and rehydration behaviour of egg white powder. *Food Hydrocolloids*, v. 100, 2020, p. 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105380>
- LIU, Y.; OEY, I.; BREMER, P.; CARNE, A.; SILCOCK, P. Effects of pH, temperature and pulsed electric fields on the turbidity and protein aggregation of ovomucin-depleted egg white. *Food research international*, v. 91, 2017, p. 161-170.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.005>

- LIU, Y.; OEY, I.; BREMIER, P.; SILCOCK, P.; CARNE, A. Proteolytic pattern, protein breakdown and peptide production of ovomucin-depleted egg white processed with heat or pulsed electric fields at different pH. *Food Research International*, v. 108, 2018, p. 465-474.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.075>
- LIU, Y.; OEY, I.; BREMER, P.; SILCOCK, P.; CARNE, A.; MCCONNELL, M. Pulsed electric fields treatment at different pH enhances the antioxidant and anti-inflammatory activity of ovomucin-depleted egg white. *Food chemistry*, v. 276, 2019, p. 164-173.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.009>
- LIU, T.; LV, B.; ZHAO, W.; WANG, Y.; PIAO, C.; DAI, W.; HU, Y.; LIU, J.; YU, H.; SUN, F. Effects of Ultrahigh Temperature Pasteurization on the Liquid Components and Functional Properties of Stored Liquid Whole Eggs. *BioMed Research International*, 2020, p. 1-10.
<https://doi.org/10.1155/2020/3465465>
- LLAVE, Y.; FUKUDA, S.; FUKUOKA, M.; SHIBATA-ISHIWATARI, N.; SAKAI, N. Analysis of color changes in chicken egg yolks and whites based on degree of thermal protein denaturation during ohmic heating and water bath treatment. *Journal of Food Engineering*, v. 222, 2018, p. 151-161.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.024>
- MA, Y.; ZHAO, Y.; CHI, Y. Changes in the gel characteristics of two hen egg white powders modified by dry heating and the Maillard reaction during long-term storage. *LWT–Food Science and Technology*, v. 109, 2019, p. 123-129.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.003>
- MAGNANI-GRASSI, T.; GIGLIO-PONSANO, E. Desidratação de gemas de ovos por secagem por atomização. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 50, n. 12, 2015, p. 1186–1191. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015001200008>
- MAGNANI-GRASSI, T.; DE SIQUEIRA-MARCOS, M.; CAVAZZANA, J.; GIGLIO-PONSANO, E. Deshidratación de claras de huevo por atomización. *Ciência Animal Brasileira*, v. 17, n. 4, 2016, p. 601–607.
- MASURE, H.; WOUTERS, A.; FIERENS, E.; DELCOUR, J. Impact of egg white and soy proteins on structure formation and crumb firming in gluten-free breads. *Food Hydrocolloids*, v. 95, 2019, p. 406-417.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.062>
- MATTIOLI, S.; ORTENZI, R.; SCUOTA, S.; CARTONI, A.; DAL BOSCO, A.; COTOZZOLO, E.; CASTELLINI, C. Impact of ozone and UV irradiation sanitation treatments on the survival of Salmonella and the physical-chemical characteristics of hen eggs. *Journal of Applied Poultry Research*, 2020, p. 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.japr.2020.01.004>
- MATUMOTO-PINTRO, P.; MURAKAMI, A.; VITAL, A.; CROGE, C.; DA SILVA, D.; OSPINA-ROJA, I.; GUERRA, A. Effects of storage time and temperature on lipid oxidation of egg powders enriched with natural antioxidants. *Food chemistry*, v. 228, 2017, p. 463-468. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.044>
- MENON, A.; STOJCESKA, V.; TASSOU, S. A systematic review on the recent advances of the energy efficiency improvements in non-conventional food drying technologies. *Trends in Food Science and Technology*, v. 100, 2020, p. 67-76.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.014>
- NADERI, N.; DOYEN, A.; HOUSE, J.D.; POULIOT, Y. The use of high hydrostatic pressure to generate folate-enriched extracts from the granule fraction of hen's egg yolk. *Food chemistry*, v. 232, 2017, p. 253-262.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.144>
- NAHARIAH, N.; LEGOWO, A.; ABUSTAM, E.; HINTONO, A.; HIKMAH, H. Functional Characteristics of Fermented Egg White Powder After Pan-drying at Different Temperatures and Times. *International Journal of Poultry Science*, v. 17, n. 3, 2018, p. 134–139.
<https://doi.org/10.3923/ijps.2018.134.139>
- PANOZZO, A.; MANZOCCO, L.; CALLIGARIS, S.; BARTOLOMEOLI, I.; MAIFRENI, M.; LIPPE, G.; NICOLI, M.C. Effect of high pressure homogenisation on microbial inactivation, protein structure and functionality of egg white. *Food Research International*, v. 62, 2014, p. 718–725.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.051>

- PATRIGNANI, F.; VANNINI, L.; SADO-KAMDEM, S.; HERNANDO, I.; MARCO-MOLÉS, R.; GUERZONI, M.; LANCIOTTI, R. High pressure homogenization vs heat treatment: Safety and functional properties of liquid whole egg. *Food Microbiology*, v. 36, n. 1, 2013, p. 63–69.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.004>
- RAMASWAMY, H.; MARCOTTE, M.; SASTRY S.; ABDELRAHIM, K. Ohmic Heating in Food Processing. *Electro-Technologies for Food Processing Series*. Boca Ratón (United States Of America): CRC Press, 2014. p. 1–518.
- RANNOU, C.; QUEVEAU, D.; BEAUMAL, V.; DAVID-BRIAND, E.; LE BORGNE, C.; MEYNIER, A.; ANTON, M.; PROST, C.; SCHUCK, P.; D LOISEL, C. Effect of spray-drying and storage conditions on the physical and functional properties of standard and n-3 enriched egg yolk powders, *Journal of Food Engineering*, v. 154, 2015, p. 58–68.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.11.002>
- RICKE, S.C.; GAST, R.K. *Producing Safe Eggs*. London (United Kingdom): Elsevier, 2017, 421 p.
- ROSELAND, J.; SOMANCHI, M.; BAHADUR, R.; HAYTOWITZ, D.; PEHRSSON, P. Content and variability of vitamin D and iodine in processed egg products in the United States (US). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 86, 2020, p. 1–35.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103379>
- SALEH, G.; EL DARRA, N.; KHARROUBI, S.; FARRAN, M. Influence of storage conditions on quality and safety of eggs collected from Lebanese farms. *Food Control*, v. 111, 2020, p. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107058>
- SHAHBAZ, H.; JEONG, B.; KIM, J.; HA, N.; LEE, H.; HA, S.; PARK, J. Application of high pressure processing for prevention of greenish-gray yolks and improvement of safety and shelf-life of hard-cooked peeled eggs. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 45, 2018, p. 10–17.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.016>
- SHAN, Y.; TANG, D.; WANG, R.; TU, A.; YI, Y.; WANG, X.; LIU, B.; ZHOU, Y.; HUANG, Q.; LÜ, X. Rheological and structural properties of ovomucin from chicken eggs with different interior quality. *Food Hydrocolloids*, v. 100, 2020, p. 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105393>
- SHENG, L.; WANG, Y.; CHEN, J.; ZOU, J.; WANG, Q.; MA, M. Influence of high-intensity ultrasound on foaming and structural properties of egg white. *Food Research International*, v. 108, 2018, p. 604– 610.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.007>
- SINGH, A.; RAMASWAMY, H. High pressure modification of egg components: Exploration of calorimetric, structural and functional characteristics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 32, 2015, p. 45–55.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.010>
- SPANISH ASSOCIATION OF EGG PRODUCTS INDUSTRIES. SAEPI. ¿What are egg products?. [online], 2020. Disponible en: <https://www.inovo.es/que-son-los-ovoproductos/>. [citado 2 de abril de 2020].
- STEFANOVIĆ, A.B.; JOVANOVIĆ, J.R.; DOJČINOVIĆ, M.B.; LEVIĆ, S.M.; NEDOVIĆ, V.A.; BUGARSKI, B.M.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z.D. Effect of the Controlled High-Intensity Ultrasound on Improving Functionality and Structural Changes of Egg White Proteins. *Food and Bioprocess Technology*, v. 10, n. 7, 2017, p. 1224–1239.
<https://doi.org/10.1007/s11947-017-1884-5>
- SUJATA, Y. Egg Powder and Its Quality Control. *Online International Interdisciplinary Research Journal*, 2014, p. 2249–9598.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Egg-Powder-and-Its-Quality-Control-Sujata/29676396e994986eb8c4d5c584a9de24467da069>
- SUMASHREE, N.; HIREGOUDAR, S.; NIDONI, U.; RAMAPPA, K.T.; NAIK, N. Study of Proximate Composition, Quality Characteristics and Microbial Quality of Microwave Treated Liquid Whole Egg (LWE) Samples. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 8, n. 9, 2019, p. 335–342.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.809.040>

- UYSAL, R.; BOYACI, I.; SOYKUT, E.; ERTAS, N. Effects of heat treatment parameters on liquid whole egg proteins. *Food Chemistry*, v. 216, 2017, p. 201-208.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.050>
- VALVERDE, D.; LACA, A.; ESTRADA, L.; PAREDES, B.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Egg yolk and egg yolk fractions as key ingredient for the development of a new type of gels. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, v. 3, 2016, p. 30–37.
<https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2016.02.001>
- VIEIRA, D.A.; CABRAL, L.; NORONHA, M.; JÚNIOR, G.; SANT'ANA, A. Microbiota of eggs revealed by 16S RNA-based sequencing: From raw materials produced by different suppliers to chilled pasteurized liquid products. *Food control*, v. 96, 2019, p. 194-204.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.016>
- WAKAMATSU, H.; HANDA, A.; CHIBA, K. Observations using Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance (P-NMR) of structural changes in freeze-thawed hen egg yolk. *Food chemistry*, v. 244, 2018, p. 169-176.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.032>
- WANG, X.; GU, L.; SU, Y.; LI, J.; YANG, Y.; CHANG, C. Microwave technology as a new strategy to induce structural transition and foaming properties improvement of egg white powder. *Food Hydrocolloids*, v. 101, 2020, p. 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105530>
- WANG, Y.; SELOMULYA, C. Spray drying strategy for encapsulation of bioactive peptide powders for food applications. *Advanced Powder Technology*, v. 31, n. 1, 2020, p. 409-415.
<https://doi.org/10.1016/j.apt.2019.10.034>
- WEI, X.; LAU, S.; REDDY, B.; SUBBIAH, J. A microbial challenge study for validating continuous radio-frequency assisted thermal processing pasteurization of egg white powder. *Food microbiology*, v. 85, 2020, p. 1-7.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103306>
- WU, L.; ZHAO, W.; YANG, R.; CHEN, X. Effects of pulsed electric fields processing on stability of egg white proteins. *Journal of Food Engineering*, v. 139, 2014, p. 13–18.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.04.008>
- XIE, Y.; WANG, J.; WANG, Y.; WU, D.; LIANG, D.; YE, H.; CAI, Z.; MAC, M.; GENG, F. Effects of high-intensity ultrasonic (HIU) treatment on the functional properties and assemblage structure of egg yolk. *Ultrasonics sonochemistry*, v. 60, 2020, p. 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104767>
- XIUFANG, B.; XIAOQIONG, W.; YAN, C.; LIYI, C.; YAGE, X.; ZHENMING, C. Effects of combination treatments of lysozyme and high power ultrasound on the *Salmonella typhimurium* inactivation and quality of liquid whole egg. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 60, 2020, p. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104763>
- ZHANG, W.; LIU, F.; NINDO, C.; TANG, J. Physical properties of egg whites and whole eggs relevant to microwave pasteurization. *Journal of Food Engineering*, v. 118, n. 1, 2013, p. 62–69.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.03.003>
- ZHANG, M.; LI, J.; CHANG, C.; WANG, C.; LI, X.; SU, Y.; YANG, Y. Effect of egg yolk on the textural, rheology and structural properties of egg gels. *Journal of Food Engineering*, v. 246, 2019, p. 1-6.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.10.024>
- ZHU, Y.; VANGA, S.K.; WANG, J.; RAGHAVAN, V. Impact of food processing on the structural and allergenic properties of egg white. *Trends in Food Science & Technology*, v. 78, 2018, p. 188-96.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.005>

ÍNDICE TEMÁTICO

Volumen 20, No 1 (Enero – junio de 2022)

AGRÍCOLA

- Efecto del abono a base de hoja de coca en *Pisum sativum* L. en el Cauca, Colombia / AMBUILA-CHAMIZO, NURY-MARCELA; CÓRDOBA-CE-RÓN, EDUARD-ESTEVEN; MONTES-ROJAS, CONSUELO; ANAYA-FLOREZ, MARIA-DEL SOCORRO // En Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol 20 No 1, p. 124-135.
- Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico/ SUÁREZ-CONTRE-RAS, LILIANA-YANET; PEÑARANDA-FIGUEREDO, FREDDY-ARMANDO // En Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol 20 No 1, p. 194-206.
- Evaluación fisicoquímica y microbiológica de ahuyama (*Cucurbita moschata*) troceada en fresco con recubrimiento y polietileno/ RUCO-SÁNCHEZ, CRISTINA; SANTIAGO-CAMPO, CARLOS-HOLMES; PAZ-PEÑA, SANDRA-PATRICIA; MOSQUERA-SÁNCHEZ, SILVIO-ANDRÉS // En Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol 20 No 1, p. 207-220.

AGROINDUSTRIA

- Estudio del biodiesel obtenido a partir de aceite de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo) / BAS-TO-FLOREZ, LUIS-EDUARDO; MILLÁN-ALVARADO, SEBASTIAN-AUGUSTO; MEDINA-CABALLERO, LUISA-FERNANDA; MORA-VERGARA, LIA-ZAMARA; CABALLERO-HERNÁNDEZ, YULEISI-TATIANA // En Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol. 20 No 1, p.41-53.

- Evaluación de la bioaccesibilidad de cadmio en formulaciones de chocolatería por digestión gastrointestinal in vitro / MURILLO-MÉNDEZ, CRISTIAN-JAHIR; MOLINA-VELASCO, DANIEL-RICARDO; LÓPEZ-GIRALDO, LUIS-JAVIER; SALAZAR-BELEÑO, ANA-MILENA TATIANA // En Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol. 20 No 1, p.68-83.
- Bromatological characterization of fruit waste/ FLÓREZ-MONTES, CILIANA; ROJAS-GONZÁLEZ, ANDRÉS-FELIPE; RODRÍGUEZ- BARONA, SNEYDER // En Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol. 20 No 1, p. 84-96.
- The influence of milk-clotting enzymes on the lipid composition and organoleptic properties of semi-matured cheeses / USGAME-FAGUA, KAREN-GINETH; GARCÍA-TORRES, ANGÉLICA-MARÍA/ ROJAS-MORALES, CARLOS-IVÁN; MEDINA-VARGAS, OSCAR-JULIO // En Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol. 20 No 1, p. 97-112.
- Propóleos de Nariño: Propiedades fisicoquímicas y actividad biológica/ SALAMANCA-GROSSO, GUILLERMO; OSORIO-TANGARIFE, MÓNICA-PATRICIA; CABRERA-MONCAYO, JESUS ANTONIO // En Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol. 20 No 1, p. 152-164.
- Obtención de “Snacks” de piña (*Ananas comosus*) mediante las técnicas combinadas de Ventana de Refracción y Fritura con Aire Caliente/ GONZÁLEZ-HOYOS, LINA-VANESSA; ARROYO-RINCÓN, ANA-MARÍA; TOBAR-SUAREZ, ALEXANDER; POLANÍA-RIVERA, ANA-MARÍA; AYALA-APONTE, ALFREDO; DÍAZ-ORTIZ, ALBERTO // En Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol. 20 No 1, p. 165-178.

BIOTECNOLOGÍA

- El huevo de gallina y su procesamiento industrial: una revisión. / RAMÍREZ-CRESPO, LINA MARCELA; CORTÉS-RODRÍGUEZ, MISAEL; MICANGUER-CARLOSAMA, ADRIANA // En Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol 20 No 1, p. 221-239.
- Polifenoles totales de *Ganoderma lucidum* cultivado en residuos de *Pandala talaumanariñensis* y *Avena sativa*. / MUESES-MAFLA, ROBINSON-BYRON; BENAVIDES-CALVACHE, OLGA-LUCIA // En Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol 20 No 1, p. 18-26.
- Obtención de nanoemulsiones de *Cúrcuma longa* L. y su aplicación en bebida acuosa/ CHICA-BARCO, VANESSA; MARTÍNEZ-CORREA, HUGO A.; PEREZ-MUNIVE, ADRIANA M. // En Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol 20 No 1, p. 136-151.
- Lipasa de semillas de *Pachira speciosa* inmovilizadas en esferas de quitosano: un sistema bio-catalítico reusable/ VALENZUELA-JARAMILLO, IVON-ESHER; MENDOZA-MEZA, DARY// En Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol 20 No 1, p. 179-193.
- Digestibility, rumen kinetics, and blood metabolites in lambs fed *Samanea saman* and *Cordia dentata*/ GUTIERREZ-OVIEDO, FABIAN; PARDO-GUZMÁN, JAIRO; CASTAÑEDA-SERRANO, ROMÁN // En Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol. 20 No 1, p. 113-123.

PISCÍCOLA

- Digestibilidad de hidrolizados enzimáticos de vísceras de origen animal en *Piaractus brachypomus*, *Cuvier 1818*// PEREA-ROMÁN, CRÍSPULO; GARCÉS-CAICEDO, YENY-JUDITH; MORALES-BRAVO, YERIKA-JESLANNY ; JIMENEZ-CHAMORRO, MARLY-ANDREINA; HOYOS-CONCHA, JOSÉ-LUÍS ; VIVAS-QUILA, NELSON-JOSÉ / En Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol. 20 No 1, p. 54-67.

PECUARIO

- Producción, calidad de leche y análisis económico de vacas holstein suplementadas con ensilaje de botón de oro (*Tithonia diversifolia*) o ensilaje de maíz // ANGULO-ARIZALA, JOAQUÍN; NEMOCÓN-COBOS, ANA-MARÍA; POSADA-OCHOA, SANDRA-LUCÍA; MAHECHA-LEDESMA, LILIANA. // En Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol. 20 No 1, p. 27-40.