

"Control de evolución de antocianos aplicando la técnica de Ribereau-Gayón en aceitunas negras procesadas, por oxidación de burbujeo y difusión de aire".

Brom. Olga Sandra Rodríguez

Tesis par la obtención del grado
DE LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA
Facultad de Ciencias Agrarias U.N.Cuyo
Chacras de Coria, Mendoza
Año: 2010



***" Control de evolución de antocianos,
aplicando la técnica de Ribereau-
Gayón en aceitunas negras
procesadas, por oxidación de
burbujeo y difusión de aire".***

Bromatóloga: Olga Sandra Rodríguez

DIRECTOR: Ing. Agr. Alejandro Gascón

ASESOR EN EL ÁREA ESTADÍSTICA: Ing. Agr. Laura Cánovas

MIEMBROS DEL COMITÉ EVALUADOR:

Presidente: Ing. Agr. MSc Mónica Bauzá

Vocales: Lic. Brom. Adriana Giménez

Ing. Agr. Susana Campos

Suplente: Ing. Agr. Verónica Araniti

RESUMEN:

La producción de aceitunas de mesa, junto con el aceite de oliva, se encuentra en franco aumento, gracias al auge dado en el consumo a estos alimentos. El color es un atributo fundamental en el momento de apreciar su calidad, ya que es lo primero que percibe el consumidor, siendo esta valoración en gran medida subjetiva. Los antocianos, son los pigmentos encargados de dar colores que van desde el rosado al violeta, característico en aceitunas negras pero a diferencia de otros pigmentos, éstos no son estables, especialmente en soluciones alcalinas, manifestándose en la pérdida del color. Se trabajó con la variedad Nevadillo, en tres momentos de cosecha: verdes, pre- envero y envero avanzado. Se aplicaron dos tratamientos de oxidación durante cuatro días: uno por incorporación de aire por burbujeo fino y otro por incorporación de aire por recirculación y solubilización por Venturi. Se aplicó la técnica Ribereau – Gayon para la cuantificación de antocianos y se expresaron en miligramos por litro, en pulpa y líquido de gobierno, utilizando espectrofotometría ultravioleta visible. Se analizó estadísticamente como un experimento factorial con diseño completamente aleatorizado y los datos de la cuantificación de antocianos indicó una diferencia significativa ($\alpha=0,005$) de orden superior. Con lo cual la cantidad de antocianos depende del momento de cosecha del fruto, la muestra a la que se aplica el método de análisis (pulpa o líquido de cobertura), los tratamientos de oxidación aplicados y los días que se sometieron las aceitunas a esos tratamientos.

Palabras claves: ***Aceitunas, cuantificación antocianos, espectrofotometría, oxidación.***

INDICE GENERAL

Introducción	1
Estructura química de los antocianos	6
Marco Teórico	8
Estabilidad de los antocianos	9
a- Influencia de la estructura química	9
b- Efecto de pH	10
c- Efecto de la temperatura	11
d- Efecto de la luz	11
e- Efecto del bisulfito	11
f- Degradación oxidativa	11
Copigmentación de los antocianos	12
Factores que afectan la copigmentación	12
a- pH del medio	12
b- Temperatura	13
c- Presencia de sales	13
Índice de color	14
Extracción de antocianos	15
Objetivos	16
Materiales y Métodos	17
Operaciones previas	17
Tratamientos	20
Materiales	22
Características del equipo	23
Metodología	23
Técnica de Ribereau – Gayon (en pulpa)	23
Técnica de Ribereau – Gayon (en líquido)	25
Reactivos	27
Resultados	29
Conclusión	35
Bibliografía	36
Anexo	38

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Provincias productoras de aceitunas en la Argentina1
Figura 2: Provincias olivícolas2
Figura 3: Fruto de aceituna variedad Nevadillo 3
Figura 4: Estructura química del principal antociana en aceituna4
Figura 5: Estructura de las antocianidinas7
Figura 6: Efecto del pH en la estructura de los antocianos 10
Figura 7: Espectro de luz 14
Figura 8: Momento de cosecha 17
Figura 9: Rastrillo utilizado para cosechar 17
Figura 10 :Cajas para transportar las aceitunas 18
Figura 11: Recipiente de lavado de las aceitunas 18
Figura 12: Aceitunas negras 19
Figura 13: Enfermedad de alambrado en aceitunas negras 19
Figura 14: Equipo utilizado para el tratamiento incorporación de aire por burbujeo 20
Figura 15: Aceitunas en tratamiento de oxidación 21
Figura 16: Equipo utilizado para el tratamiento incorporación de aire por recirculación y solubilización por Venturi21
Figura 17: Espectrofotómetro Metrolab 22

Figura 18: Aceitunas negras	23
Figura 18: Líquido obtenido aplicando la técnica Ribereau-Gayon en pulpa de aceituna	24
Figura 19: Líquido obtenido aplicando la técnica Ribereau- Gayon en líquido de gobierno	25
Figura 20: Contenido de antocianos en líquido de gobierno aplicando tratamiento incorporación de aire por burbujeo fino	29
Figura 21: Contenido de antocianos en pulpa de Aceituna aplicando tratamiento incorporación de aire por burbujeo fino	30
Figura 23: Contenido de antocianos en líquido de gobierno aplicando tratamiento incorporación de aire por recirculación y solubilización por Venturi	31
Figura 24: Contenido de antocianos en pulpa de aceituna aplicando tratamiento incorporación de aire por recirculación y solubilización por Venturi	32

INDICE DE TABLAS

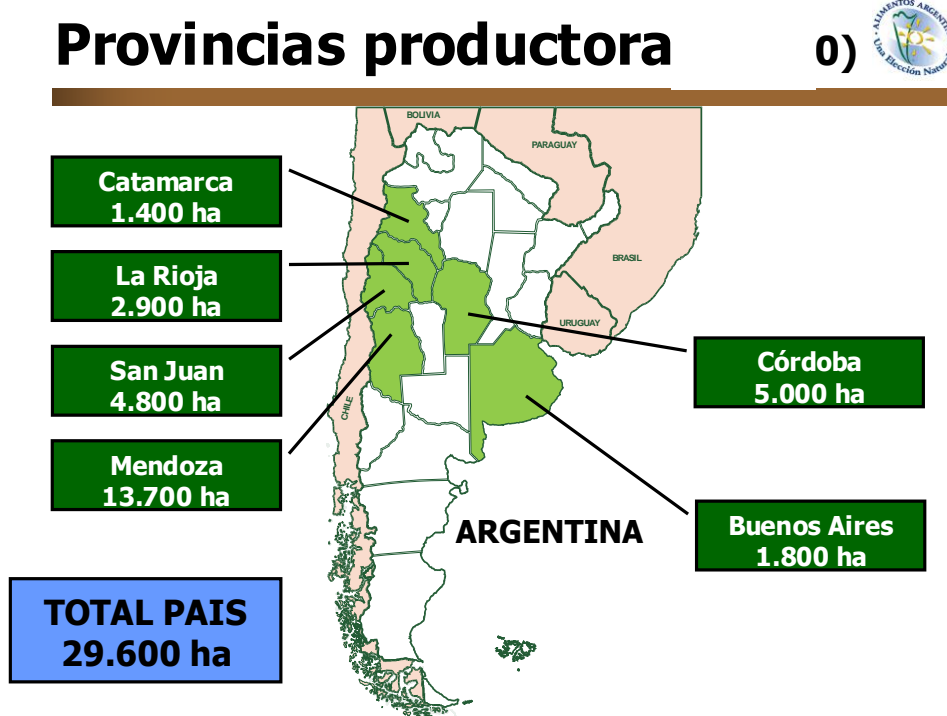
Tabla 1: Resultados obtenidos aplicada técnica Ribereau- Gayon con bisulfito de sodio	38
Tabla 2: Resultados obtenidos en miligramos por Litro de antocianos	41
Salida de Varianza de Info Stat	44



Introducción

"Las aceitunas de mesa son los frutos de variedades determinadas de olivo cultivado (*Olea europea*, L) sanos, cosechados en el estado de madurez apropiado y de calidad tal, que, sometidos a las preparaciones adecuadas, den un producto comestible y de buena conservación. Estas preparaciones pueden, eventualmente, incluir la adición de diversos productos o condimentos de buena calidad alimenticia" (IOOC, 1991).

Nuestro sector olivarero ha protagonizado en los últimos años una profunda transformación, aumentando su producción. Las principales provincias cultivadas y productoras de Argentina son:

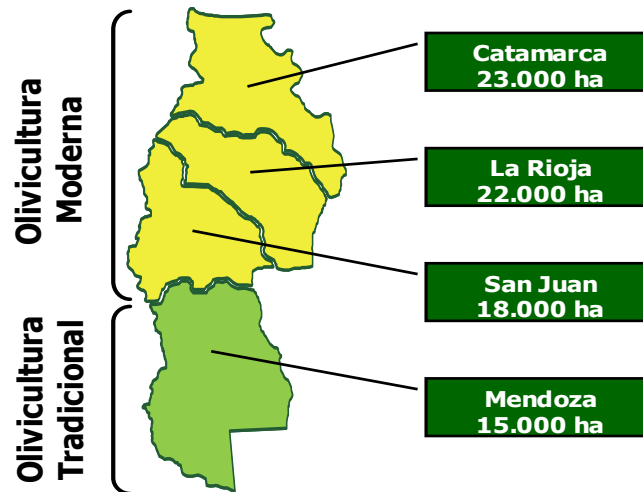


Fuente: Dirección de Industria Alimentaria

Fig.1: Provincias productoras de aceitunas en la Argentina

En el año 2004, las provincias productoras se caracterizan por un aumento significativo de zonas cultivadas y diferenciarse en una olivicultura con tecnología moderna y una tradicional, ubicando a Mendoza dentro las regiones con producción oleícola tradicional.¹⁸

Provincias productoras



Fuente: Dirección de Industria Alimentaria

Fig. 2: Provincias olivícolas

Las campañas 2004/2005 alcanzaron una producción de 85000-90000 toneladas de aceitunas de mesa y 25000 toneladas en aceite de oliva. Mientras que el consumo fue de 13000-14000 toneladas.

La ubicación de la Argentina en el contexto mundial según campaña 2004/2005 sería:

Décimo productor y quinto exportador de aceite de oliva

Quinto productor y segundo exportador de aceitunas de mesa

Las perspectivas para la campaña 2010/2012 serían de unas 100000 toneladas para aceitunas de mesa y 115000 toneladas para aceite de oliva.²⁰

Las aceitunas negras naturales se elaboran a partir del fruto maduro de color negro violáceo intenso. El producto requerido por los consumidores debe presentar coloraciones que van del verde parduzco al rosado, hasta llegar al negro violáceo intenso, siendo estos colores su característica diferencial de alta calidad y la garantía de una correcta elaboración.²

El color en un alimento es un atributo fundamental en el momento de apreciar su calidad ya que es lo primero que percibe el consumidor, siendo esta valoración en gran medida subjetiva. En las aceitunas de mesa de un

mismo lote, el color presenta elevada variabilidad, debido a que está asociado al grado de maduración del fruto, al proceso de elaboración, al pH de la solución de cobertura o gobierno, o a la presencia de alguna alteración. El industrial busca obtener un producto lo más homogéneo posible, de cualidades organolépticas óptimas. Lo ideal sería poder asignar al color un valor numérico y evitar problemas en el momento de su comercialización.

Para realizar este trabajo se utilizó la variedad de aceituna **Nevadillo**, ya que desarrolla rápidamente coloración característica al someterla al proceso de oxidación, en tres momentos distintos de cosecha: **verdes, pre- envero y envero avanzado.**



Fig.3: Fruto de aceituna variedad Nevadillo

El término "antocianina" del griego *anthos*: flor y *kyanos*: azul fue utilizado por Marquat en 1835 para designar a los pigmentos azules de las flores. Más tarde se descubrió que no sólo el color azul, sino que también el púrpura, violeta, magenta y que todos los tonos de rojo, rosado, escarlata, que aparecen en muchas flores, frutos, algunas hojas y raíces de plantas, se deben a pigmentos químicamente similares a las antocianinas de Marquat.^{13,26}

Actualmente se utilizan indistintamente los términos antocianina y antociano para referirse al mismo tipo de pigmento.

Los antocianos se encuentran principalmente en los frutos, flores, algunas hojas y raíces de plantas.

Las mayores fuentes alimenticias que contienen antocianos pertenecen a las familias Vitaceae (uva) y Rosaceae (fresa, manzana, pera, etc) otras familias en los que se encuentran las Oleaceae (olivo) Cruciferae (calabaza roja, repollo morado), Solanaceae (tomate, papas, camotes) etc.¹⁷

- Los antocianos basados en la cianidina (estructura química principal de los antocianos) se dan más frecuentemente en las partes comestibles de las plantas.
- El porcentaje de existencia del total de los antocianos es: alrededor del 50 por ciento para derivados de la cianidina, del 12 por ciento para cada uno de pelargonidina, peonidina y delphinidina y del 7 por ciento para petunidina y malvidina.

En el fruto de *Olea europaea, L* el principal antociano es cianidina 3-glucósido.

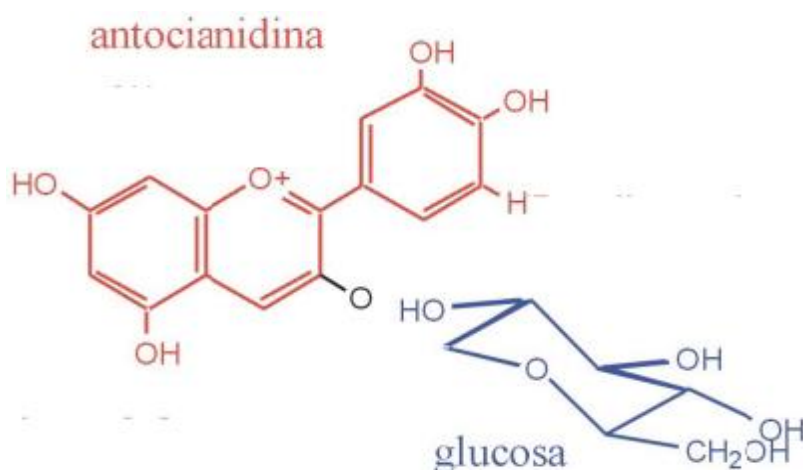


Fig. 4 : Estructura química del principal antociano en aceituna.

Ellos son intensamente coloreados y solubles en agua. Se considera que tienen como función en la planta el ser atrayentes de insectos y pájaros para los procesos de polinización y diseminación de semillas.

Como pigmentos naturales inocuos, los antocianos tienen un considerable potencial en la industria alimentaria, pero a diferencia de los pigmentos rojos sintéticos que se utilizan actualmente, los antocianos no son estables especialmente en soluciones neutras y alcalinas, ocurriendo fácilmente cambios durante el procesamiento del material crudo y el almacenaje, lo que se manifiestan en pérdida de color, oscurecimiento del producto y formación de precipitados en los extractos.¹⁷

Recientes investigaciones, han permitido incrementar el número de antocianos conocidos, así alrededor de 300 antocianos eran conocidos hasta antes del año 1935, entre los años 1995 y 1997 se han reportado 85 nuevos antocianos¹⁵ y entre los años 1998 y 2000 cerca de otras 50 estructuras¹⁴. Hasta el año 2002 se habían descrito más de 560 antocianos.

Los antocianos o antocianinas son uno de los flavonoides que se están estudiando más intensamente por su aplicabilidad en la industria de alimentos, incluso se estima que son los colorantes rojos de origen vegetal con mejores perspectivas para ser utilizados como pigmentos naturales en productos alimenticios. Muchas frutas, hortalizas y flores deben su atractiva coloración a este grupo de sustancias hidrosolubles. Las antocianinas tienden a ser rojo-violáceas, mientras que en algunos frutos pueden ser naranja-rojizo.¹⁰

Por otro lado el incremento del interés en su estudio es debido a su importante **actividad antioxidante**. Los antioxidantes son sustancias de diversos tipos que previenen o demoran el daño molecular producido por los radicales libres. De estos, uno de los que ha logrado captar mayor interés son los pigmentos antociánicos y derivados, compuestos de naturaleza polifenólica contenidos en frutas y verduras.

La evidencia epidemiológica sugiere que el consumo de frutas y verduras puede reducir el riesgo de cáncer y de enfermedades

cardiovasculares, planteándose la posibilidad que esto se deba a la presencia de antioxidantes en estos alimentos⁵. En 1998, el Consejo de Nutrición del Instituto de Medicina de la Academia de Ciencias de los Estados Unidos de Norteamérica propuso una definición de antioxidantes dietarios para caracterizar las propiedades biológicas de estos compuestos, según éste, un antioxidante dietario es una sustancia presente en los alimentos que disminuye significativamente los efectos adversos de las especies reactivas del oxígeno, del nitrógeno o ambas, sobre las funciones normales en humanos.

Con respecto a la acción antioxidante de los antocianos no existen muchos estudios, pero resultados de investigaciones indican que la presencia de cianidina y sus glicósidos poseen actividad antioxidante comparable a los productos comerciales, además de mostrar un efecto antiinflamatorio mejor que la aspirina.⁵

Los polifenoles, según su estructura química se pueden subdividir en flavonoides o no flavonoides, son compuestos fenólicos que poseen un anillo aromático, al que se une diversos grupos sustituyentes, como hidroxilo, carboxilo y metoxilo, estos polifenoles se unen a los antocianos para formar copigmentos, donde los principales constituyentes pertenecen al grupo de las antocianinas de la familia de los flavonoides, por lo tanto parte de la acción colorante y antioxidante de los antocianos pueden estar vinculados con los polifenoles cuyo efecto protector está vastamente estudiado.

Estructura química de los antocianos:

Los antocianos están basados químicamente en dos anillos bencénicos, una única estructura aromática, unidos por un heterociclo oxigenado, insaturado, catiónico, llamada cianidina y todos se consideran derivados de ella por adición o sustracción de grupos hidroxilo, por metilación o por glicosidación.

Los antocianos están considerados dentro del grupo de los flavonoides, ya que poseen el esqueleto característico C₆-C₃-C₆ y el mismo

origen biosintético, pero difieren en la mayor absorción dentro en la región visible del espectro.

Hay seis antocianidinas (agliconas de los antocianos) comunes siendo la cianidina la más común y responsable del color magenta, los colores rojo- naranja son debido a la pelargonidina (con un grupo hidroxilo menos que la cianidina) , mientras que los colores violeta y azul son generalmente debido a la delphinidina (con un grupo hidroxilo más).

Cada una de las 6 antocianidinas se presenta con unidades de azúcar, la variación está en el tipo de azúcar, en el número y en la posición en la que están unidos .

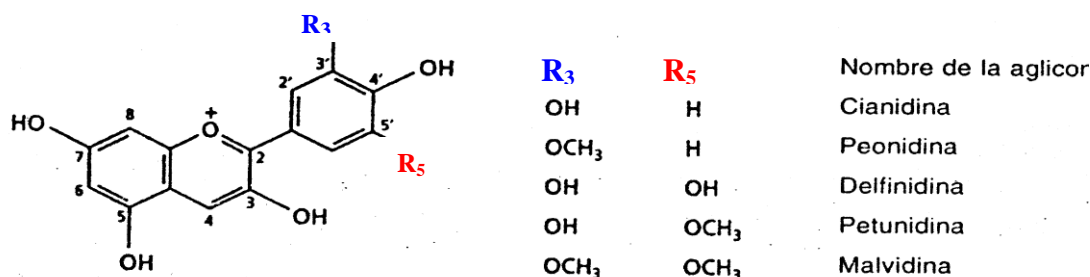


Fig. 5: Estructura de las antocianidinas

En función de la existencia en los radicales hidrogeniones (R^3), funciones oxidrilos (OH) o bien metoxilos (OCH₃), resultan distintos tipos de antocianos.

Entre los monosacáridos comunes podemos mencionar a la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa y como disacáridos a la rutinosa, sambibiosa, soforosa, gentiobiosa y latirosa.^{26,4}



Márco

Teórico

Las aceitunas son drupas carnosas, más o menos alargadas según la variedad, de color verde, que cambia a morado o negro cuando está madura, alcanzando un peso medio comprendido entre 1,5 y 3 gramos, aproximadamente. Sus dimensiones oscilan, en general de 2 a 3 centímetros de longitud y de 1 a 2 centímetros de diámetro transversal.²²

El porcentaje de pulpa, muy amarga cuando aún está verde, varía del 70 al 88 por ciento, del 12 al 30 por ciento restante, representa el hueso. Tanto las características físicas mencionadas como la composición química dependen de cierto número de factores, entre los que se destacan la variedad, el estado de desarrollo y la madurez del fruto en la época de recolección. En menor grado pero no menos importantes, son la situación geográfica, la calidad del suelo el tipo de cultivo, etc.⁸

“Las aceitunas negras naturales son aquellas obtenidas por oxidación en medio alcalino, a partir de frutos que no han alcanzado su completa madurez fisiológica y conservados en salmuera mediante un proceso de esterilización por calor”. Se conocen también como aceitunas ennegrecidas por oxidación (Consejo Oleícola Internacional, 1980).²

Las normas de aceitunas de mesa definen este tipo como las obtenidas de frutos recogidos en plena madurez o poco antes, pudiendo presentar según la zona de producción y época de recogida, color negro rojizo, negro violeta, negro verdoso o castaño oscuro. Las aceitunas negras naturales durante su elaboración, se exponen al aire para acentuar su color pero este proceso deteriora su textura, para evitar una aireación excesiva es muy importante determinar el momento en que poseen mayor intensidad de color. El proceso de pardeamiento enzimático es dinámico y reversible: existe un periodo óptimo de aireación en el cual se logra la máxima intensidad de color y a partir del cual el fenómeno se revierte, esta es una reacción de oxidación en la que interviene como sustrato el oxígeno molecular catalizado por una enzima: polifenol oxidasa, fenolasa o tirosinasa. La enzima se encuentra en plástidos,

cloroplastos y en citoplasma celular, por ello algunos factores controlan la oxidación como el control de oxígeno en contacto con la superficie.¹⁹ Los frutos, como todos los tejidos vivos metabólicamente activos, se hallan sometidos a constantes modificaciones en su composición durante las etapas de desarrollo y maduración, así como en el periodo de poscosecha. El tipo y amplitud de los mismos depende de las condiciones de crecimiento, de la fase de madurez en que se encuentran, del papel fisiológico que representan en la planta, del conjunto genético de las células específicas.

Respecto a los cambios de color que experimentan los frutos durante las etapas de crecimiento y desarrollo, son los pigmentos cloroplásticos, clorofilas y carotenoides, los responsables de la variación del verde fuerte al verde amarillento, siendo posteriormente, las **antocianinas** las que darán tonalidades púrpuras al madurar. Los antocianos son pigmentos sensibles a las variaciones de pH, así a pH 3 el pigmento está presente como sal de flavilio de color rojo, a pH 8 es de color violeta y a pH 11 de color azul. Estudios recientes indican que el color de las antocianinas se hace resistente a las variaciones de pH cuando se encuentran como productos de condensación con catequinas en presencia de aldehídos, siendo en estos casos de mayor valor como agente de coloración de los alimentos.¹⁰

Estabilidad de los antocianos:

a- Influencia de la estructura química:

Los antocianos son compuestos que se degradan fácilmente. En general, los son más estables a pH ácido. La glucosilación y la acilación de los azúcares también aumentan la estabilidad y por tanto los di glucósidos son más estables que sus correspondientes monoglucósidos.⁶

b- Efecto de pH:

La molécula de antocianina contiene un núcleo flavilio, que posee un oxígeno oxonio cargado positivamente. Teniendo en cuenta la existencia de los dobles enlaces conjugados, la carga es deslocalizada sobre el

conjunto del ciclo, que se estabiliza por resonancia. El flavilio es un ejemplo de catión oxonio estable, que puede ser aislado. Las soluciones de antocianinas presentan colores que están directamente relacionados con el pH. En medio ácido son rojas, luego se decoloran a medida que el pH aumenta, la decoloración máxima se observa para valores de 3,2 a 3,5. El color varía del malva al azul para pH superiores a 4, el amarillo aparece luego en medio neutro o alcalino. El catión flavilio (que posee un oxígeno, oxonio cargado positivamente, AH^+) anhidro base quinoidal (A), pseudobase carbinol (B) y pseudobase calcona (C)⁶

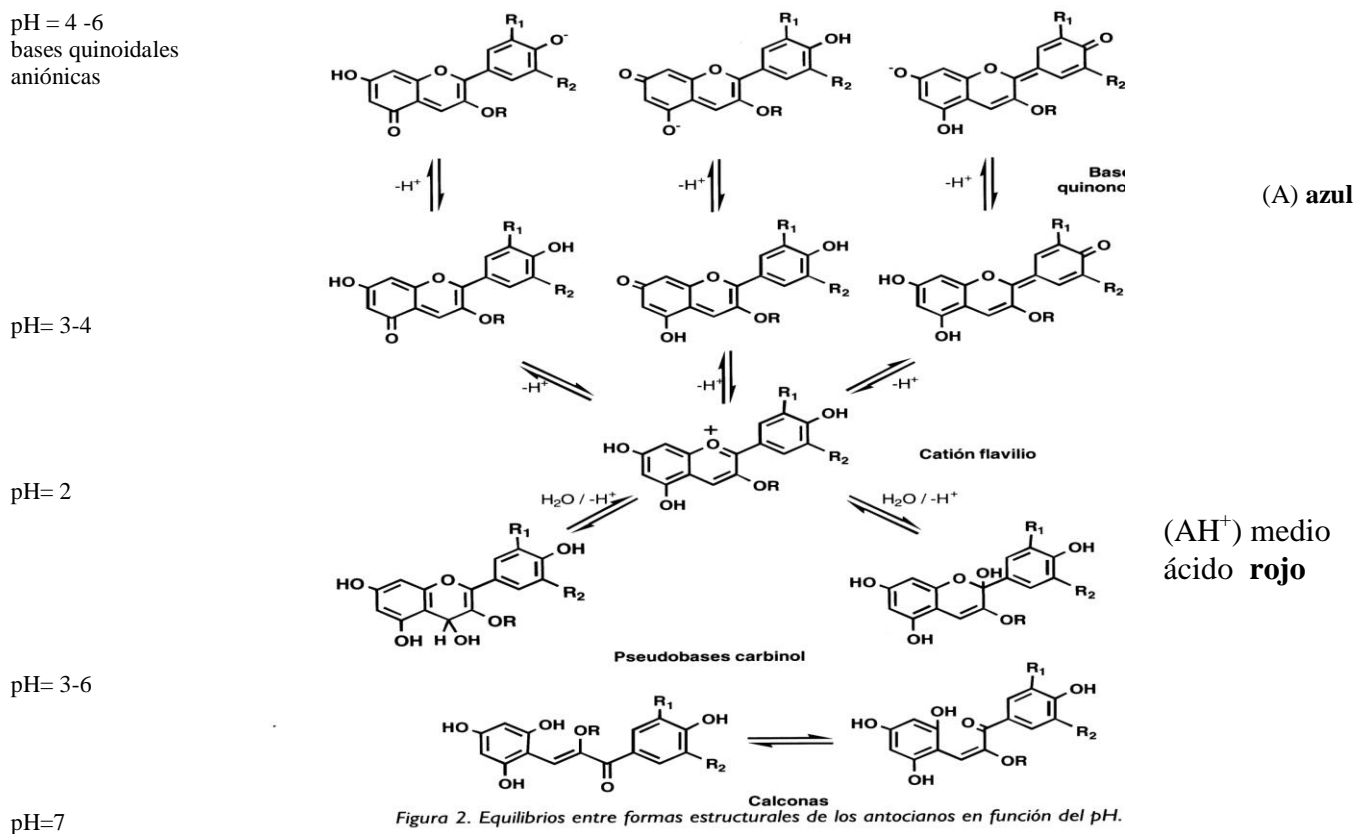


Fig. 6: Efecto del pH en la estructura de los antocianos²⁶

c- Efecto de la temperatura:

Estudios realizados, señalaron que la tasa de degradación de los antocianos se duplica por cada 10 grados de aumento de la temperatura.

El proceso de degradación térmica se ve también influido por el pH del medio, siendo más acusado a valores de pH más altos.²⁶

d- Efecto de la luz:

Se pudo comprobar, que la radiación luminosa aceleraba la degradación de los antocianos, probablemente debido a la existencia de reacciones de tipo autooxidativo. Los productos que se originan en la foto degradación de los antocianos son similares a los que se producen en su degradación térmica.²⁶

e- Efecto del bisulfito:

Los iones bisulfito son capaces de formar compuestos de adición con los constituyentes orgánicos polares o fácilmente polarizables, entre ellos, los antocianos. La reacción ocasiona la decoloración de los antocianos, pero también les aporta estabilidad.^{26,12} Esta reacción es reversible en grado variable, dependiendo de la naturaleza del antociano y del pH. La unión con bisulfito no solo produce una disminución de la intensidad colorante en las disoluciones de antocianos, sino también un desplazamiento en el espectro en la región visible²⁶.

f- Degradación oxidativa :

Las antocianinas en solución de alcohol acidificado (0,1 por ciento), expuestas a la luz, se decoloran en algunos días. La reacción sobre todo es afectada por la influencia de la naturaleza (etanol, metanol, etc.) y la concentración en alcohol, el oxígeno y la luz parecen ser catalizadores, se ha señalado la presencia de dihidroflavonoles (taxifolina) en medio de reacción.²³

Copigmentación de los antocianos:

Un fenómeno que ha llamado la atención durante muchos años es la intensidad de color y la variedad de matices que presentan las flores, aún cuando en las mismas existen intervalos de pH donde los antocianos son normalmente incoloros.^{26,1}

Esto se ha explicado a partir de las interacciones que pueden producirse entre los antocianos y otros compuestos que los acompañan en sus medios naturales (muchos de ellos incoloros). Los iones flavilio y las bases quinónicas de los antocianos presentan una estructura prácticamente plana, capaz de asociarse con otros compuestos, fenólicos o no, que posean también una parte plana. Esta interacción denominada copigmentación, permite estabilizar las formas coloreadas del antociano.

La copigmentación da lugar a efectos característicos en la absorción UV-visible del cromóforo antociánico.

Por ello, la copigmentación es una interacción molecular frecuente entre los antocianos y los polifenoles presentes en altas concentraciones en aceitunas, dando por ejemplo en aceitunas negras naturales (500-700 miligramos por kilogramo), para las verdes enteras (1000 miligramos por kilogramo) y para aceitunas de color cambiante (1200 miligramos por kilogramo).

Estos polifenoles presentes en aceitunas poseen extraordinaria sensibilidad, no sólo a la naturaleza y concentración del pigmento y copigmento, si no también a la temperatura, pH y a la composición del medio en el que tiene lugar la reacción de copigmentación ^{26,4}.

Factores que afectan la copigmentación:

a- pH del medio:

El pH óptimo para la copigmentación se sitúa entre 3 y 5, dependiendo del pigmento-copigmento.^{26,21} La influencia del pH está esencialmente relacionada con las transformaciones estructurales que se producen en el antociano. En disoluciones muy ácidas de antocianos predomina la forma flavilio y de este modo, la presencia de un copigmento no origina cambios perceptibles de color ya que la disolución está muy coloreada por sí misma. Por esta razón, los efectos de la copigmentación son más fácilmente observables en disoluciones acuosas débilmente ácidas o neutras, donde, en ausencia de copigmento, predominan las

reacciones de hidratación que conducen a formas incoloras. Esto también puede pasar en zonas ligeramente alcalinas^{26,4}.

b- Temperatura:

Los cambios en la temperatura producen un fuerte efecto sobre el espectro visible en las disoluciones copigmentadas de antocianos.

El aumento de temperatura reduce la estabilidad de los complejos de copigmentación, haciendo que parte de los iones flavilio quede libre y disponible para su hidratación y subsiguiente decoloración. El descenso de la temperatura, por el contrario, refuerza la asociación entre pigmento y copigmento^{26,4}.

c- Presencia de sales:

Se ha observado que la adición de sales sódicas a disoluciones de antocianos produce un aumento en la intensidad colorante, ya que facilita la auto asociación y aumenta asimismo su estabilidad.

El efecto se justifica porque los iones minerales como K^+ , Na^+ y Cl^- , fuertemente solvatados, compiten eficientemente con el catión flavilio por las moléculas de disolvente produciendo una reducción en el proceso de hidratación del antociano. El efecto de la sal es solo importante a valores de pH en que tiene lugar la hidratación de los cationes flavilio. Si las cantidades de sal adicionadas son altas se produce una ligera disminución en el efecto de copigmentación debido a los cambios que se producen en la fuerza iónica de la disolución.^{26,7}

Índice del color:

El color es una propiedad de la materia directamente relacionada con el espectro de la luz y por lo tanto, se puede medir físicamente en términos de energía radiante o intensidad y por su longitud de onda.²⁰

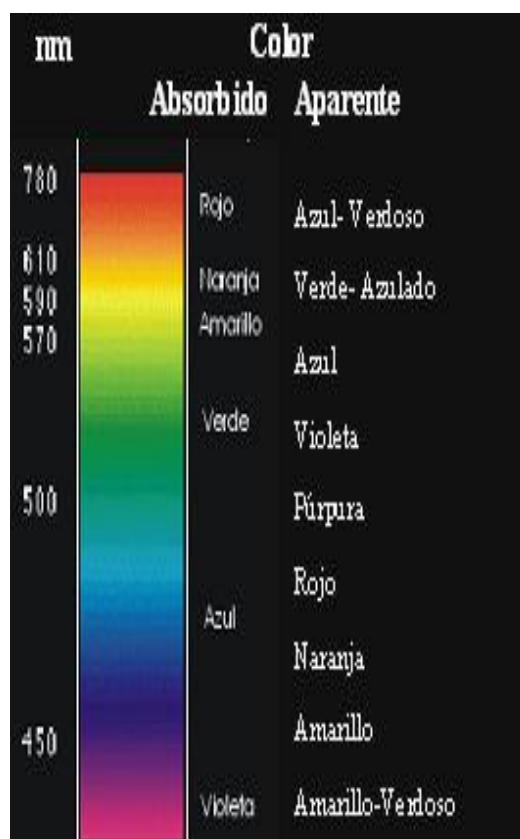


Fig. 7: Espectro de luz

El sol y otras fuentes luminosas emiten radiaciones electromagnéticas de diferente longitud que al incidir sobre una superficie son parcial o totalmente absorbidas. Las no absorbidas se reflejan y dan la sensación de color.¹⁶

El ojo humano, solo puede percibir el color cuando su energía corresponde a una longitud de onda que oscila entre 380 y 780 nanómetros. En base a esto, la identificación de los colorantes se basa en la propiedad que tiene cada pigmento de absorber una cierta longitud de onda del espectro visible.³

Los *antocianos* pueden ser cuantificados en forma global o individual, en uvas, vinos y otros sustratos, de acuerdo con los métodos tradicionales de extracción, los cuales pueden ser identificados por sus propiedades espectrales, fundamentalmente en la región visible, en solución ácida (0,1 por ciento de ácido clorhídrico en alcohol etílico absoluto) tienen dos máximos de absorción principal, uno en la región visible, entre 465 y 550 nanómetros y otro en el ultra violeta, alrededor de los 275 nanómetros.

La absorbancia en la zona visible es debida a la estructura del heterociclo central (cianidina) y la conjugación con los dos ciclos bencénicos, siendo influenciada por el nivel de pH y el solvente.

Extracción de antocianos:

El procedimiento más común para realizar la extracción de antocianos es el uso de soluciones de metanol o etanol acidificados con diferentes proporciones de ácido clorhídrico (0,1 -1 por ciento). El uso de solventes orgánicos tiene la ventaja de inactivar las enzimas presentes en los tejidos vegetales y, además, debido a su rápida evaporación, facilita los sucesivos tratamientos del extracto obtenido.²⁵

Cabe destacar que durante el desarrollo de los proyectos de investigación 06/A238 y 06/A314, derivó la cuantificación de antocianos realizado en aceitunas y en salmuera de gobierno, la determinación de la evolución de los antocianos en aceitunas **es inédita**, tomando como parámetro de aplicación la técnica de Ribereau – Gayon²⁵ para la cuantificación de antocianos en uva y productos derivados.



Objetivos

HIPÓTESIS

- En procesos de oxidación de aceitunas negras es posible cuantificar los antocianos con la técnica Ribereau- Gayon, por espectroscopia ultravioleta visible.
- Las distintas técnicas aplicadas en la oxidación de aceitunas negras, influyen en la evolución de los antocianos.
- El estado de madurez de las aceitunas, influyen en la evolución de los antocianos durante la aplicación de los tratamientos de oxidación.
- Los días de tratamiento de oxidación de las aceitunas, influyen en la evolución de los antocianos.

OBJETIVO GENERAL

- Aplicar la técnica Ribereau – Gayon para la separación y cuantificación de antocianos, en pulpa de aceitunas y en líquido de gobierno.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la incidencia de los distintos tratamientos de oxidación en aceitunas negras.
- Evaluar la incidencia del estado de madurez sobre la evolución de los antocianos .
- Evaluar la incidencia de los días de tratamiento en la evolución de los antocianos.



*Materiales
Y
Métodos*

Se trabajó con aceitunas, variedad Nevadillo provenientes de Maipú, Mendoza en tres momentos diferentes de cosecha:

- **verde**
- **pre - envero**
- **envero avanzado**

OPERACIONES PREVIAS:



Fig. 8: Momento de cosecha

El sistema de **recolección** utilizado fue manual, conocido como "ordeño", mediante el cual los operarios, desde el suelo, fueron desprendiendo las aceitunas con una especie de rastrillos plásticos manuales y las depositaron en un morral de 8-10 Kilogramos de capacidad, que llevaban colgados.¹¹



Fig.9: Rastrillo utilizado para cosechar

Rastrillo manual con dientes de goma, utilizado en la cosecha de aceituna.

Para las aceitunas destinadas a la elaboración del tipo negras naturales en las que se reúnen una serie de circunstancias tales como madurez más avanzada y por consiguiente, mayor facilidad para desprenderse del árbol, el daño producido en la pulpa es menos visible por estar ya oscura, a veces se emplean procedimientos de recolección mecánica, consiguiéndose reducir sensiblemente el precio de la misma a costa de incrementar el porcentaje de los dañados.



Para el **transporte** del fruto colectado se colocó en cajas de plástico perforadas, de 20-22 Kilogramos de capacidad, donde permanecieron hasta el momento de su tratamiento.

Fig. 10: Cajas para transportar las aceitunas



El **lavado** se realizó para eliminar principalmente el polvo y otras suciedades que arrastran los frutos. Los lavados fueron dinámicos, dejando escurrir bien las aceitunas.

Fig.11: Recipiente de lavado de las aceitunas

A continuación, las aceitunas se introdujeron en vasijas hasta colmatage, quedando una relación de dos tercios de volumen con los frutos y un tercio relleno con salmuera para iniciar el proceso de **fermentación**. La solución, de salmuera con una concentración de cloruro de sodio del 8-10 por ciento (peso/volumen), teniendo en cuenta que la salinidad tiene una gran influencia sobre la velocidad de fermentación, que es mayor para los porcentajes más bajos.



Fig. 12: Aceitunas negras

No obstante, los problemas más frecuentes y difíciles de eludir en las aceitunas negras son los que afectan a la textura. Suelen presentarse como ablandamiento, separación de la piel con acumulación de gas en el interior, surcos en la superficie cuando se exponen al aire, etc.



Fig. 13: Enfermedad de alambrado en aceitunas negras

Durante la fermentación de las aceitunas en condiciones anaeróbicas tradicional, se produce una proporción variable de frutos con la alteración denominada "alambrado" también llamada "gas- pocket" o "fish eye", son una serie de fisuras, que a veces se extienden hasta el hueso y producen la desaparición de gran parte de la pulpa. Ello se debe a la acumulación de dióxido de carbono en el interior de los fermentadores, producido por el efecto de la actividad de los microorganismos responsables de proceso fermentativo. Para evitar la aparición del alambrado se efectúa la fermentación en condiciones aeróbicas.

Se colocaron las aceitunas en fermentadores⁹ , a los que se les introdujo un dispositivo de aireación especialmente diseñado. El cual tenía la misión de: mantener los niveles adecuados de oxígeno disuelto en el líquido, controlar el crecimiento de microorganismos, y por último

conseguir condiciones homogéneas en todos los puntos del interior de los recipientes.

Por el interior de dicha columna se inyectó aire a razón de 0.1 litro/hora/litro de capacidad, de forma continua o de 0.3 litro/hora/litro de capacidad, en discontinuo, durante 8 horas al día. La salmuera tenía una concentración entre 2 y 9 por ciento de NaCl, según la flora que se pretendió favorecer y el pH a 4,0-4,2 unidades.

En la evolución del color superficial del fruto, el proceso clásico anaeróbico, en general, dio lugar a tonalidades más claras. En los aeróbicos, el efecto del caudal a medida que aumenta el flujo de aire, lo hizo el grado de oxidación y las aceitunas se volvieron más oscuras. En las condiciones de trabajo recomendadas (0.3 litro/hora/litro de capacidad durante 8 horas al día) se observó que las aceitunas recogidas al principio de campaña presentaban un negro más intenso que las maduras.

Para realizar el ennegrecimiento de aceitunas de mesa, se utilizó diferentes procesos de aireación en medios alcalinos de oxidación. Se utilizó dos prototipos a escala piloto, en aceitunas variedad Nevadillo, en distintos estados de maduración (envero, pre envero y envero avanzado), se oxidaron en medio alcalino de hidróxido de sodio al 1.5 por ciento por incorporación de aire, utilizando tres tambores plásticos (repeticiones estadísticas) los cuales se llenaron con 8 kilogramos de aceitunas y 12 kilogramos de solución de soda, que se adaptaron según los siguientes tratamientos:



Tratamiento 1: Incorporación de aire por burbujeo fino.

Un tubo central concéntrico en cuyo extremo inferior se colocó un material poroso para el perlado fino del aire insuflado a través de un compresor (sistema de oxidación californiano)

Fig. 14: Equipo utilizado para el tratamiento incorporación de aire por burbujeo



Fig. 15: Aceitunas en tratamiento de oxidación



Fig. 16: Equipo utilizado para el tratamiento incorporación de aire por recirculación y solubilización por venturi

Tanto las aceitunas como el líquido de gobierno (soda cáustica) ascienden por el efecto de las burbujas de aire dentro del tubo y generan un movimiento convectivo en toda la vasija. El oxígeno disuelto oxida los polifenoles propios del fruto.

Tratamiento 2: Incorporación de aire por recirculación y solubilización por venturi.

Los tambores se ensamblaron en un circuito cerrado que alimenta una bomba centrífuga. En el expelente de la misma se intercala un eyector venturi para la succión de aire atmosférico que se incorpora a la soda cáustica.

Se estudió el efecto de diversos parámetros que pueden controlarse para obtener el máximo de extracción en los antocianos como son el solvente, pH de la mezcla, proporción de solvente/sólido, tiempo de extracción y temperatura. El pH tiene un marcado efecto en la estabilidad y rendimiento de la extracción. En el rango de pH de 4 a 5 se obtuvo la máxima extracción.

Por todo lo visto hasta ahora, resaltando los atributos de la coloración en aceitunas negras, para el momento de comercialización y consumo, teniendo en cuenta los posibles defectos que se pueden producir en su elaboración quitándole valor comercial, se realizó el siguiente trabajo, para la cuantificación de antocianos, lo cual nos permitiría

decidir el momento oportuno de cosecha y el tratamiento que mejor se adecue para la oxidación de las aceitunas en un determinado tiempo de tratamiento.

Los equipos para la experimentación fueron armados en el Laboratorio de Investigación de la Cátedra de Industrias Agrarias, en la Facultad de Ciencias Agrarias.

Materiales:

- ✓ Cubetas de 1 cm.
- ✓ Embudo de filtración vástago largo.
- ✓ Erlenmeyers de 50 mL.
- ✓ Espectrofotómetro de absorción visible.
- ✓ Gradillas para tubos de ensayo.
- ✓ Matraces.
- ✓ Papel de filtro poro grueso.
- ✓ Pipetas de 1, 5 , 10 y 20 mL.
- ✓ Tubos de ensayo.



Fig. 17: Espectrofotómetro Metrolab

Características del equipo utilizado:

- ✚ Metrolab UD 40/T: Espectrofotómetro ultravioleta visible de simple haz .
- ✚ Rango espectral: 330 -990 nm.
- ✚ Ancho de banda: 8 nm.
- ✚ Luz dispersa: menos que 0,25%.
- ✚ Modo operacional: lineal en por ciento de transmitancia escala de absorbancia y concentración.
- ✚ Alojamiento porta muestra: cubeta cuadrada de 10 mm de paso de luz.

Metodología:



Fig.17: Aceituna negras

El tamaño de las aceitunas, utilizadas de diámetros ecuatoriales entre 20- 22 milímetros, tipo "C". De cada recipiente se extrajeron 10 aceitunas y 10 mililitros de salmuera de gobierno por muestreo, realizados a las 12, 24,48 y 72 horas, a partir del contacto entre las aceitunas con la salmuera y la incorporación de aire.

El pH inicial fue 1,2-1,4 se modificó a 3-5 con solución de hidróxido de sodio al 5 por ciento y luego se aplicó la técnica Ribereau- Gayon

Técnica de Ribereau – Gayon²³ aplicada en aceituna (pulpa):

- 1- Se tritularon las aceitunas, se pesó en balanza analítica 1 gramo de la muestra.
- 2- Se colocó el gramo de aceituna pesada en un erlenmeyers de 50 mililitros.
- 3- Se agregó 1 mililitro de etanol absoluto adicionado de 0,1 por ciento de ácido clorhídrico concentrado y 20 mililitros de ácido clorhídrico al 2 por ciento volumen / volumen.

-
- 4- Se homogeneizó.
 - 5- Se filtró con filtro de papel poro grueso.
 - 6- Se tomó dos tubos de ensayo de 25 mililitros a los cuales se adicionó:
 - Tubo A₁: 10 mililitros de la solución anteriormente preparada, con 4 mililitros de agua destilada.
 - Tubo A₂: 10 mililitros de la misma solución y 4 mililitros de solución de bisulfito de sodio al 15 por ciento.
 - 7- Se agitó ambos tubos de ensayo
 - 8- Se dejó en reposo durante 20 minutos.
 - 9- Se realizó la lectura de absorbancia en espectrofotómetro a 520 nm.

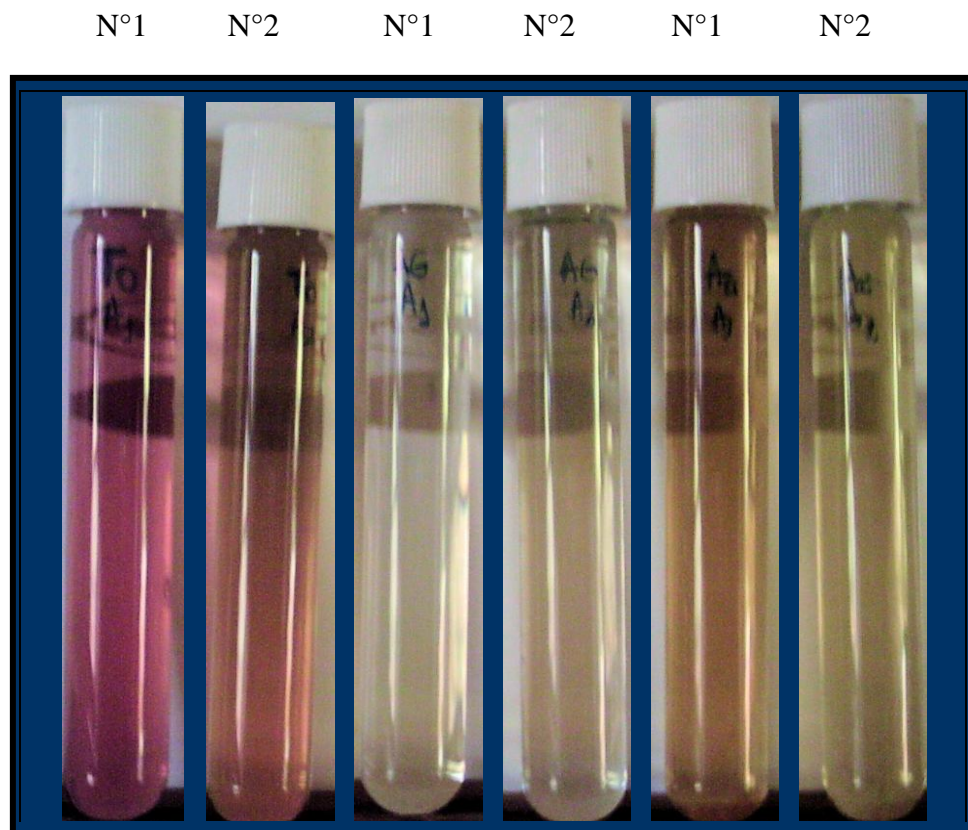


Fig. 18 : Líquido obtenido aplicando la técnica Ribereau- Gayón en pulpa de aceitunas. La figura muestra el triplicado de la extracción de antocianos luego de aplicada la técnica, para pulpa de aceitunas, en los tubos N°1, los antocianos se encuentran con agua destilada, en los tubos N°2 se

encuentran los antocianos decolorados luego de ser tratados con bisulfito de sodio.

La base de cálculo de la concentración de antocianos es:

$$(\text{Absorbancia Tubo (1)} - \text{Absorbancia Tubo (2)}) = X$$

$$\text{Antocianos en mg/L} = X \cdot 875^*$$

875* = Factor de conversión adimensional, que surge de la curva de calibración, relacionando la absorbancia de distintas longitudes de onda con la concentración de antocianos en la muestra analizada, permite con la lectura de absorción multiplicada por el factor de conversión dar la concentración de antocianos en miligramos por litro.

Técnica de Ribereau – Gayon aplicada en salmuera de gobierno de aceitunas:

- 1- Se tomó 1 mililitro de la salmuera de gobierno de las aceitunas.
- 2- Se colocó la salmuera en un erlenmeyers de 50 mililitro.
- 3- Se agregó 1 mililitro de etanol absoluto adicionado de 0,1 por ciento de ácido clorhídrico concentrado y 20 mililitros de ácido clorhídrico al 2 por ciento volumen/ volumen.
- 4- Se homogeneizó.
- 5- Se filtró con filtro de papel poro grueso.
- 6- Se tomó dos tubos de ensayo de 25 mililitros a los cuales se adicionó:
 - a. Tubo A₁: 10 mililitros de la solución anteriormente preparada, con 4 mililitros de agua destilada.
 - b. Tubo A₂: 10 mililitros de la misma solución y 4 mililitros de solución de bisulfito de sodio al 15 por ciento.
- 7- Se agitó ambos tubos de ensayo
- 8- Se dejó en reposo durante 20 minutos.
- 9- Se realizó la lectura de absorbancia en espectrofotómetro a 520 nm.

N°1

N°2

N°1

N°2



Fig. 19 : Líquido obtenido aplicando la técnica Ribereau- Gayón en líquido de gobierno de aceitunas

La figura muestra la extracción de antocianos luego de aplicada la técnica, para líquido de gobierno de aceitunas, en los tubos N°1, los antocianos se encuentran con agua destilada, en los tubos N°2 se encuentran los antocianos decolorados luego de ser tratados con bisulfito de sodio.

La base de cálculo de la concentración de antocianos es:

$$(\text{Absorbancia Tubo (1)} - \text{Absorbancia Tubo (2)}) = X$$

$$\text{Antocianos en mg/L} = X \cdot 875^*$$

875* = Factor de conversión adimensional, que surge de la curva de calibración, relacionando la absorbancia de distintas longitudes de onda con la concentración de antocianos en la muestra analizada, permite con la lectura de absorción multiplicada por el factor de conversión dar la concentración de antocianos en miligramos por litro.

Reactivos:

- a- Solución etanol al 96 por ciento: 96 mililitros de alcohol etílico absoluto más 4 mililitros de agua destilada.
- b- Solución alcohol acidulado al 0,1 por ciento: 0,1 mililitro de ácido clorhídrico y llevar a 100 mililitros con alcohol al 96 por ciento.
- c- Solución de ácido clorhídrico al 2 por ciento: 2 mililitros de ácido clorhídrico p.a. y llevar a 100 mililitros con agua destilada.
- d- Solución de bisulfito de sodio al 15 por ciento: 15 gramos de droga bisulfito de sodio p.a. y llevar a 100 mililitros con agua destilada.

Aplicada la técnica de Ribereau – Gayon para la separación y cuantificación de antocianos en aceitunas negras, los resultados fueron analizados estadísticamente, como un experimento factorial con diseño completamente aleatorizado (2 x 2 x 3 x 4) y tres repeticiones. Los factores fueron: A (incorporación de aire a través de burbujeo fino en la soda cáustica, y solubilización de aire en soda cáustica por Venturi en un circuito de recirculación); B: lugar de medición (liquido y pulpa) ; C: estadio de la aceituna (verde, pre envero y envero avanzado) y D: días transcurridos desde que comenzó el tratamiento (24, 48,72 y 96 horas). La variable respuesta fue expresada en mg/L de antocianos .²⁷

Se utilizó el software Info stat para prueba de análisis de la varianza (ADEVA) y prueba de comparaciones múltiples de medias de Tukey, trabajando en todos los casos con un nivel de significancia de $\alpha= 0,05$.



Resultados

Los datos obtenidos luego de aplicar la técnica Ribereau Gayon en las muestras de pulpa de aceituna y líquido de gobierno, concluidos los tratamientos de oxidación, en los tres estadíos de cosecha, fueron expresados en miligramos por litro de antocianos de la variable respuesta y los días de tratamiento.

Se estudiaron mediante gráficos de tendencia, a través del tiempo para cada tratamiento de donde surgieron los siguientes resultados:

Tratamiento uno : Incorporación de aire por burbujeo fino

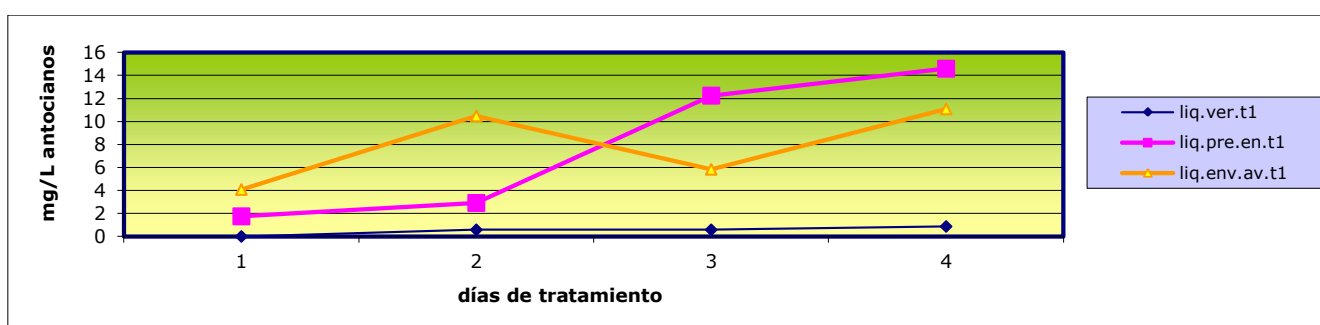


Figura 20: Contenido de antocianos en líquido de gobierno aplicando tratamiento incorporación de aire por burbujeo fino

Se observa el contenido de antocianos en el líquido de cobertura, durante los días de tratamiento y teniendo en cuenta el estadío de las aceitunas, la concentración en **verde** no aumenta durante los días de tratamiento, mientras que en **pre-enero** crece progresivamente desde el primer día del tratamiento llegando a su máxima expresión el día cuarto, probablemente debido a la lixiviación de los antocianos contenidos en la pulpa de aceituna al líquido cobertura.

En el líquido de cobertura del estadío **enero** avanzado el contenido de antocianos crece durante los dos primeros días de tratamiento, en el tercer día baja la concentración, pero aumenta en el cuarto día, probablemente por un aumento de antocianos y polifenoles que pasan de la pulpa al líquido de cobertura.

Tratamiento uno : Incorporación de aire por burbujeo fino

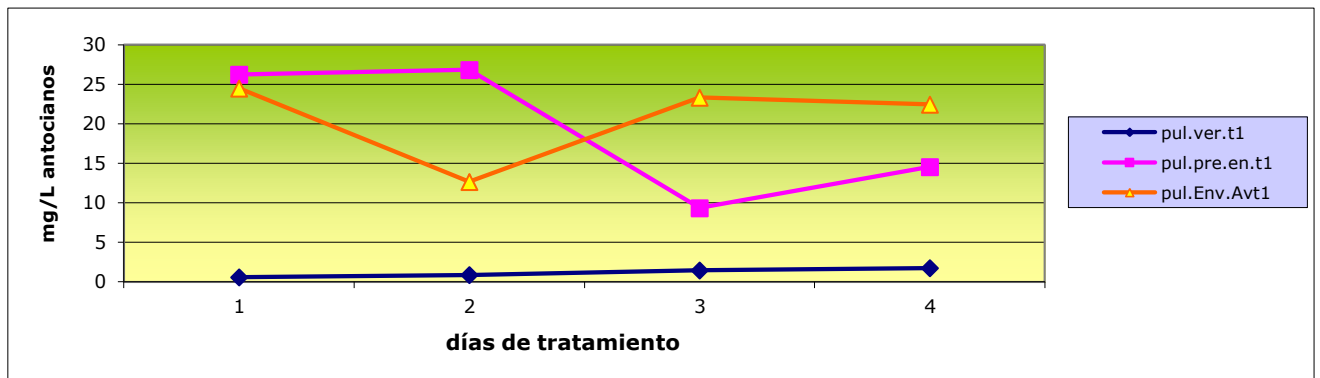


Figura 21: Contenido de antocianos en pulpa aplicando tratamiento incorporación de aire por burbujeo fino

El análisis estadístico de los datos, para los tratamientos, muestra que los antocianos contenidos en la pulpa de aceitunas, encuentran su mayor expresión en el estadio **pre-envero** durante los dos primeros días de tratamiento, luego decrece su contenido, posiblemente por la degradación pigmentaria que se producen en los antocianos y polifenoles.

En **verde**, no se mostró aumento en la concentración de antocianos durante los cuatro días del tratamiento, esto es lógico teniendo en cuenta que en esta etapa no se encuentran desarrollados los pigmentos que darán coloración oscura al fruto.

Se observa que en **envero avanzado** un descenso de la cantidad de antocianos en el segundo día de tratamiento, posteriormente aumenta su contenido no variando mucho durante el tercer y cuarto día.

Tratamiento dos: Incorporación de aire por recirculación y solubilización por Venturi

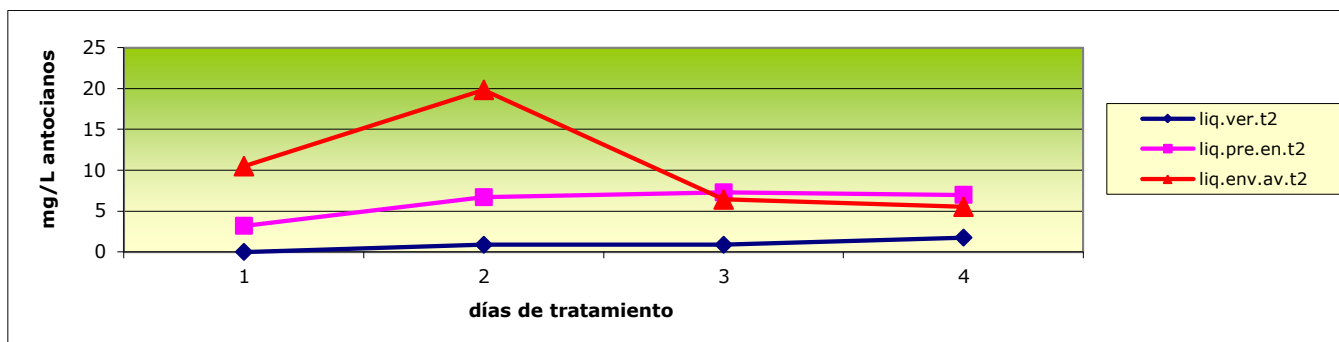


Figura 23: Contenido de antocianos en líquido de gobierno aplicando tratamiento de incorporación de aire por recirculación y solubilización por Venturi

La cantidad de antocianos presente en el líquido de gobierno, no mostró aumento en su concentración en el estadio **verde**, durante los cuatro días de tratamiento.

En **pre-envero**, aumenta progresivamente la cantidad de antocianos en el líquido de gobierno desde el primer al cuarto día.

La mayor expresión de antocianos, está dada para el estadio **envero avanzado** principalmente durante los dos primeros días de tratamiento, probablemente por su estado de mayor madurez existe más lixiviación de pigmentos de la pulpa al líquido de gobierno.

Tratamiento dos: Incorporación de aire por recirculación y solubilización por Venturi

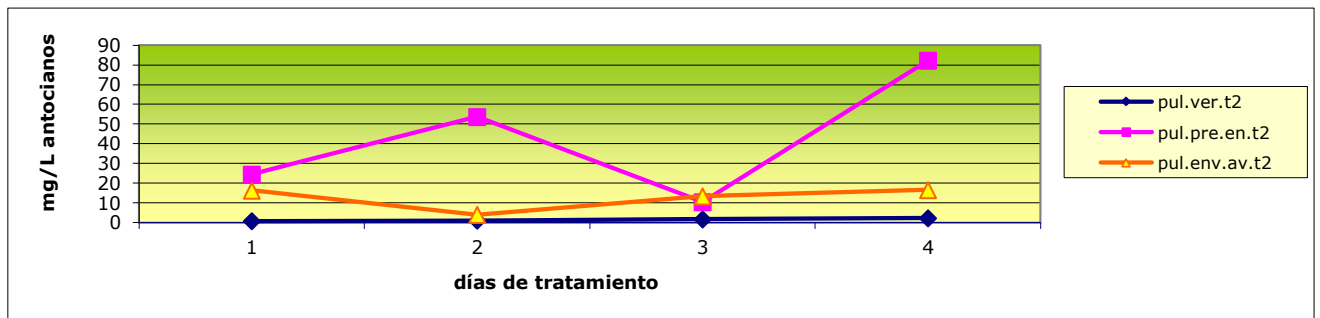


Figura24: Contenido de antocianos en pulpa de aceitunas aplicando tratamiento de incorporación de aire por recirculación y solubilización por Venturi

Se observa que el contenido de antocianos en pulpa de aceitunas, la mayor cantidad se encuentra en el estadio **pre-envero** aumentando en el segundo día de tratamiento, disminuye en el tercer día, llegando a su máxima concentración en el cuarto día.

No se muestra una variación en la concentración de antocianos en **verde**, ya que en esta etapa del fruto, no hay desarrollo de pigmentación antociánica.

En **envero avanzado**, hay una disminución de la concentración de antocianos en el día dos de tratamiento, luego aumenta durante los días tres y cuatro del tratamiento, aunque la concentración aumenta, es menor comparada con el estadio pre-envero, puede ser porque en el estadio envero avanzado, hay mayor madurez del fruto, teniendo la mayor degradación oxidativa producida por el tratamiento en los antocianos y en polifenoles, los cuales darán la coloración final de la aceituna.

Se aplicó la técnica de Ribereau Gayon para la separación y cuantificación de antocianos en aceitunas negras, expresando los resultados en miligramos por litro.

Luego se analizaron los distintos factores que inciden en la cuantificación de los antocianos, donde el análisis estadístico (Tablas de resultados y salida del software Anexo 1) de los datos , para aceitunas, indicó una diferencia significativa ($\alpha= 0,005$) de orden superior.

Esto significa que la cantidad de antocianos depende del momento de corte (cosecha del fruto), combinado con el lugar de análisis (pulpa y líquido de gobierno), los tratamientos aplicados (T1: incorporación de aire por burbujeo fino y T2: incorporación de aire por recirculación y solubilización por Venturi) y el tiempo de extracción (días de tratamiento).

La prueba de TuKey, indicó un promedio mayor de contenido de antocianos en pulpa de aceituna, cuando se incorpora aire por recirculación y solubilización por Venturi, en el estadio pre-envero y el tiempo máximo de tratamiento que fue de cuatro días.

En cuanto a las **muestras**, existen diferencias significativas en la cantidad de antocianos contenidos en el líquido de cobertura y en pulpa, siendo mayor la cantidad de antocianos en pulpa.

Existe diferencias significativas en los **tiempos de cosecha** de aceituna, con respecto a los días de tratamiento, donde la cantidad de antocianos en verde es mínima en el día primero de tratamiento, aumenta en envero avanzado y su máxima expresión en estadio pre-envero para los dos tratamientos de oxidación en el día cuatro.

Analizados los **días de tratamientos** existen diferencias significativas entre el tercer y cuarto día, siendo éste último el de mayor cuantificación, especialmente para el tratamiento dos (incorporación de aire por recirculación y solubilización por Venturi) en el estadio pre-envero.

Hay diferencias significativas, relacionando los **tratamientos, las muestras , los estadios de cosecha y los días de tratamiento** , siendo mínima la cantidad de antocianos en el tratamiento uno (incorporación de aire por burbujeo fino), en el líquido de cobertura , en el estadio verde y en el día uno de tratamiento. La mayor cantidad de antocianos se presenta en el tratamiento dos, (incorporación de aire por

recirculación y solubilización por Venturi) en pulpa, en tiempo de cosecha pre-envero, en los días dos y cuarto de tratamiento.

Para los tratamientos aplicados, **estadios de cosecha y días de tratamiento**, hay diferencias significativas, teniendo menor cantidad de antocianos en ambos tratamientos en verde del primer al tercer día de tratamiento.

Si relacionamos las **muestras, los estadios y los días de tratamiento**, hay diferencias significativas, la menor cantidad de antocianos se encuentran tanto en líquido como en pulpa para el estadio envero en todos los días del tratamiento, hasta en líquido en pre-envero el primer día, la mayor cantidad de antocianos se expresa en pulpa, en el tiempo de cosecha pre-envero durante el cuarto día de tratamiento.



Conclusiones

De acuerdo a los objetivos planteados, se puede concluir:

Que la técnica Ribereau –Gayon, se puede aplicar en la separación y cuantificación de antocianos en aceitunas negras, porque puede detectar cantidades mínimas de absorbancia en el rango de longitud de onda a 520 nanómetros como indica la técnica de cuantificación .

En cuanto a los factores que inciden en la cuantificación de los antocianos, los tratamientos aplicados para la oxidación, el de incorporación de aire por recirculación y solubilización por Venturi, logra mayor efectividad en la oxidación de aceitunas.

Se puede observar que en el estadio **verde** tanto en líquido de cobertura como en pulpa de aceituna se encuentra el menor valor de absorbancia, lo cual es coherente, teniendo en cuenta que en esta etapa el fruto no posee la cantidad de antocianos que se obtienen en la oxidación y madurez de la aceituna.

Para estadio **pre- envero** en la muestra pulpa, se encuentra la mayor cantidad de antocianos, para ambos tratamientos. En **envero avanzado**, los antocianos disminuyen su cantidad, por su madurez, degradando paulatinamente los pigmentos antociánicos .

La mayor cuantificación de antocianos, se logra en el tercer y cuarto día de tratamiento, para todos los estadios de cosecha de aceitunas.

Debido a que no hay antecedentes de aplicación de la técnica de cuantificación de antocianos en aceitunas, estos resultados pueden ser utilizados como antecedentes para futuros proyectos de investigación, ampliando el barrido espectral para determinar la longitud de onda de mayor absorción, otras variedades de aceitunas, para la aplicación de los tratamientos de oxidación y aplicado a estadio pre-envero para optimizar la producción de aceitunas negras mejorando su calidad de producción.

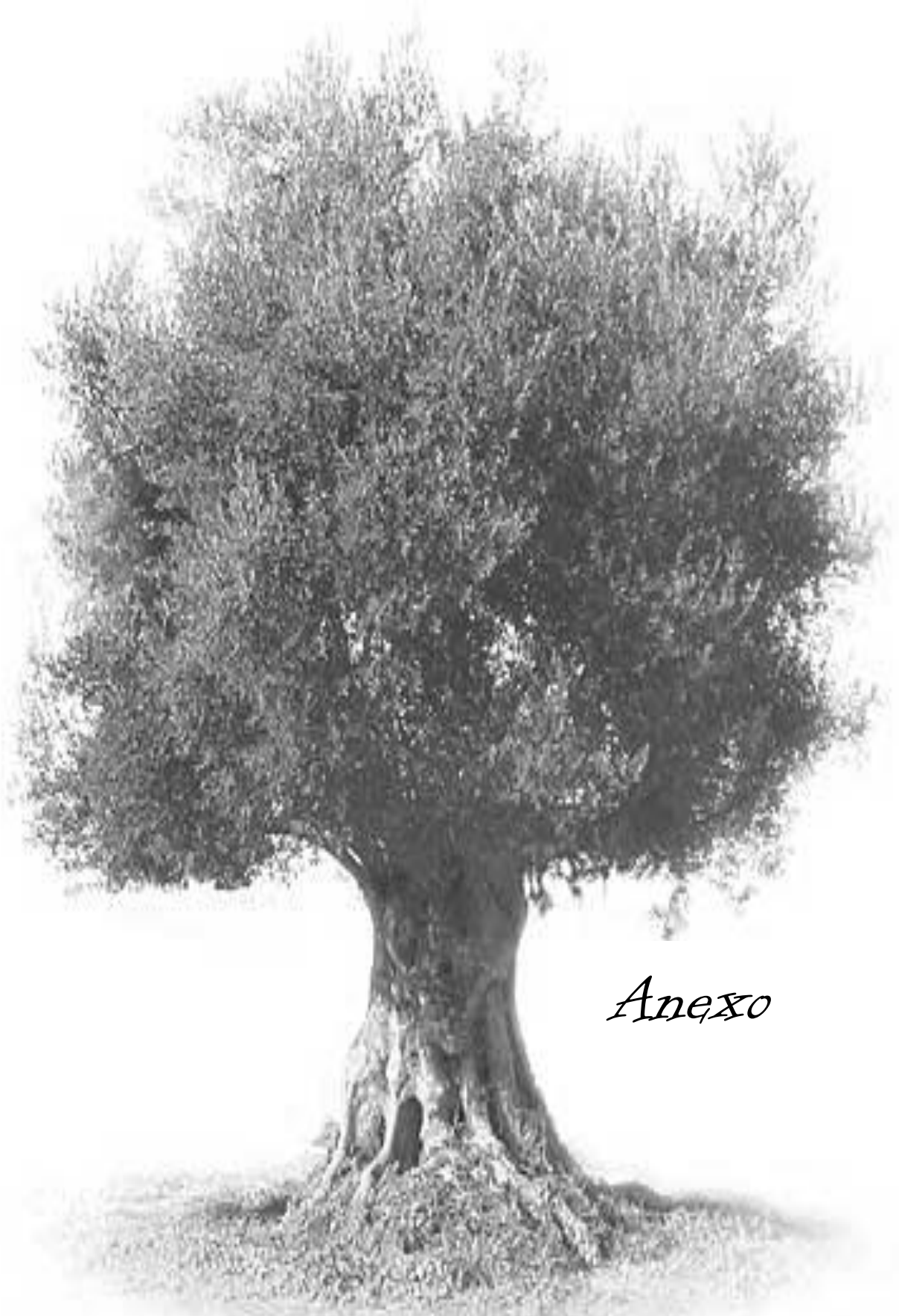


Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA:

1. Asen S, Stewart, RN, Morris, KH (1972) Copigmentation of anthocyanins plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry* 1: 1139-1144.
2. Biotecnología de la Aceituna de mesa (1985) Instituto de la Grasa y sus derivados. Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Sevilla- Capitulo 5- Aceitunas tipo negras.
3. Badui, Jergal (1999) Química de los alimentos.
4. Broullard, R. (1992) Chemical Structure of Anthocyanins en anthocyanins as food color. Academic Press p. I-40.
5. Córdova Rosa N. (2003) Antocianos y Betalainas . Antioxidantes naturales. Propiedades Farmacológicas de las antocianinas y sus derivados. Cap.6 pag 205-227.
6. Diaz, LS ;Gasque, F. (1976) Estabilidad de los pigmentos antocianicos de los zumos de uvas viníferas e híbridas. *Rev. Agroquim. Tec.Ali.* 16 (4):5009-515.
7. Dangles, O; Wigand MC (1992) Anthocyanin anti-copigment, effect. *Phytochemistry* 31(II) : 3811-3812.
8. Fernandez Bolanos FJ, Gonzales P (1956). Cambios de composición de la aceituna durante su desarrollo, vol II,7 185-189.
9. Fernández, Garrido, et, al (1987) Fermentación aeróbica de aceitunas negras al natural en salmuera.
10. Gascón, A. Formento, J. Cerchai, E; et al (2003) Antocianos y Betalainas . Antioxidantes naturales. Tecnologías de obtención. Cap. 4 pag.95- 191).
11. Gigante Máximo, (2001) L' Olivo – Consorcio Legnolegno. I.T.A.S. "A. Zanelli" p.161-165.
12. Glories, Y (1984) La couleur des vins rouges l'apartie, les equilibres des anthocyanes es des tannins comaisance de la vigne et do vio. 18(3):195-217.

-
13. Harbone, J. and Williams AC. (1998) Anthocyanin and other flavonoides. Rep.15,631-652
 14. Harbone JB. And Williams AC.(2001) Anthocyanin and other flavonoides. Rep.18, 310-333
 15. Harbone (1973) Phytochemical Methods. Chapman and Hall. London
 16. Hernandez, MR (1999). La cata y el conocimiento de los vinos.
 17. Hrazdina, G. (1982) Anthocyanins in the flavonoides (Harbone), J.B; eds Chapman and hall. NY p 135-186
 18. Instituto Nacional de Estadísticas y Censo de la República Argentina (INDEC) [en línea] [www.indec.gov.ar] (Consulta: mayo 2009)
 19. Luquez C, Aguilera, JM (2006) El color en las aceitunas negras naturales de mesa. Nueva técnica de mensura digitalizada para optimizar el método de oscurecimiento natural Re. FCA pag.65-74
 20. Marginet Campos Jose Luis (Ing. Agr.) Alimentos argentinos.gov.ar [en línea] [www.indec.gov.ar] (Consulta: mayo 2008)
 21. Mazza,G. Broyllard, R (1990) The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. Phytochemistry 29: 1097-1102.
 22. Nieto Orteja,J. Miguel,(1955) Las Variedades de olivo cultivadas em España.Ministerio de Agricultura Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas.
 23. Pascal Ribereau – Gayon (1989) Tratado de enología II. Química del vino. Estabilización y tratamiento.
 24. Ribereau – Gayon, Peynand, Sudrand (1972) Ciencia y técnica del vino. Editorial Hemisferio Sur.
 25. Rivas- Gonzalo,JC,(2003) Análisis o fan thocyanins en methods in Polyphenol analysis – Santos- Buelga C Willimson, G,ed. The royal society of chemistry, Cambridge RV p.338-358.
 26. Rives JC; Santos C; Lock O. (2003) Antocianos y Betalainas Química y estabilidad de antocianos. Cap.2
 27. Thomas M. Little, Jackson Hills. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Ed. Trillas. México, 1976



Anexo

Análisis de la varianza Salida de Info Stat

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
antocianos	144	0,86	0,79	64,74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	30447,85	47	647,83	12,47	<0,0001
tratam	227,81	1	227,81	4,38	0,0389
muestra	4510,24	1	4510,24	86,78	<0,0001
estadio	7376,81	2	3688,40	70,97	<0,0001
dias	1183,14	3	394,38	7,59	0,0001
tratam*muestra	134,33	1	134,33	2,58	0,1112
tratam*estadio	1343,97	2	671,98	12,93	<0,0001
tratam*dias	583,05	3	194,35	3,74	0,0137
muestra*estadio	3275,26	2	1637,63	31,51	<0,0001
muestra*dias	1001,78	3	333,93	6,43	0,0005
estadio*dias	1412,73	6	235,46	4,53	0,0004
tratam*muestra*estadi..	2079,85	2	1039,92	20,01	<0,0001
tratam*muestra*dias	887,56	3	295,85	5,69	0,0012
tratam*estadio*dias	1874,04	6	312,34	6,01	<0,0001
muestra*estadio*dias	2847,68	6	474,61	9,13	<0,0001
tratam*muestra*estadi..	1709,60	6	284,93	5,48	0,0001
Error	4989,15	96	51,97		
Total	35437,01	143			

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=2,38906

Error: 51,9704 gl: 96

tratam	Medias	n	
t1	9,88	72	A
t2	12,39	72	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=2,38906

Error: 51,9704 gl: 96

muestra	Medias	n	
liq	5,54	72	A
pulpa	16,73	72	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=3,50973

Error: 51,9704 gl: 96

estadio	Medias	n	
verde	1,60	48	A
envero avan	12,96	48	B
pre-envero	18,85	48	C

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=4,45279

Error: 51,9704 gl: 96

dias	Medias	n	
3	7,92	36	A
1	9,38	36	A
2	11,74	36	B
4	15,50	36	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=4,45279

Error: 51,9704 gl: 96

tratam	muestra	Medias	n	
t1	liq	5,25	36	A
t2	liq	5,83	36	A
t1	pulpa	14,51	36	B
t2	pulpa	18,96	36	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=6,06716

Error: 51,9704 gl: 96

tratam	estadio	Medias	n	
t2	verde	1,20	24	A
t1	verde	2,00	24	A
t2	envero avan	11,59	24	B

t1	pre-envero	13,30	24		B
t1	envero avan	14,33	24		B
t2	pre-envero	24,39	24		C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=7,46624

Error: 51,9704 gl: 96

tratam	dias	Medias	n			
t2	3	6,71	18	A		
t1	2	9,09	18	A	B	
t1	3	9,14	18	A	B	
t2	1	9,23	18	A	B	
t1	1	9,53	18	A	B	
t1	4	11,76	18	A	B	
t2	2	14,39	18	B	C	
t2	4	19,25	18			C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=6,06716

Error: 51,9704 gl: 96

muestra	estadio	Medias	n			
liq	verde	0,69	24	A		
pulpa	verde	2,51	24	A		
liq	pre-envero	6,71	24	A	B	
liq	envero avan	9,22	24		B	
pulpa	envero avan	16,70	24			C
pulpa	pre-envero	30,99	24			D

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=7,46624

Error: 51,9704 gl: 96

muestra	dias	Medias	n			
liq	1	3,26	18	A		
liq	3	5,88	18	A		
liq	4	6,12	18	A		
liq	2	6,90	18	A		
pulpa	3	9,96	18	A	B	
pulpa	1	15,50	18		B	
pulpa	2	16,57	18		B	
pulpa	4	24,89	18			C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=9,88926

Error: 51,9704 gl: 96

estadio	dias	Medias	n					
verde	1	0,36	12	A				
verde	2	0,87	12	A	B			
verde	3	1,16	12	A	B			
verde	4	4,01	12	A	B	C		
pre-envero	3	10,35	12		B	C	D	
envero avan	2	11,81	12			C	D	
envero avan	3	12,25	12			C	D	
envero avan	1	13,85	12			C	D	E
envero avan	4	13,92	12				D	E
pre-envero	1	13,92	12				D	E
pre-envero	2	22,53	12				E	F
pre-envero	4	28,58	12					F

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=9,88926

Error: 51,9704 gl: 96

tratam	muestra	estadio	Medias	n					
t1	liq	verde	0,51	12	A				
t2	liq	verde	0,87	12	A	B			
t2	pulpa	verde	1,53	12	A	B			
t1	pulpa	verde	3,50	12	A	B	C		
t2	liq	pre-envero	6,05	12	A	B	C		
t1	liq	pre-envero	7,36	12	A	B	C		
t1	liq	envero avan	7,87	12	A	B	C		
t2	liq	envero avan	10,57	12		B	C	D	
t2	pulpa	envero avan	12,61	12			C	D	E
t1	pulpa	pre-envero	19,25	12				D	E
t1	pulpa	envero avan	20,78	12					E

t2 pulpa pre-envero 42,73 12 F
 Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=11,99585

Error: 51,9704 gl: 96

tratam	muestrad	dias	Medias	n				
t1	liq	1	1,94	9	A			
t2	liq	1	4,57	9	A	B		
t1	liq	2	4,66	9	A	B		
t2	liq	4	4,76	9	A	B		
t2	liq	3	4,86	9	A	B		
t1	liq	3	6,90	9	A	B	C	
t1	liq	4	7,48	9	A	B	C	
t2	pulpa	3	8,55	9	A	B	C	D
t2	liq	2	9,14	9	A	B	C	D
t1	pulpa	3	11,37	9	A	B	C	D
t1	pulpa	2	13,51	9	A	B	C	D
t2	pulpa	1	13,90	9	A	B	C	D
t1	pulpa	4	16,04	9		B	C	D
t1	pulpa	1	17,11	9			C	D
t2	pulpa	2	19,64	9				D
t2	pulpa	4	33,73	9				D

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05) E

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=15,64248

Error: 51,9704 gl: 96

tratam	estadio	dias	Medias	n				
t1	verde	1	0,29	6	A			
t2	verde	1	0,44	6	A			
t1	verde	2	0,73	6	A			
t2	verde	2	1,02	6	A			
t1	verde	3	1,02	6	A			
t2	verde	3	1,31	6	A	B		
t2	verde	4	2,04	6	A	B		
t1	verde	4	5,98	6	A	B		
t2	pre-envero	3	8,89	6	A	B		
t2	envero avan	3	9,92	6	A	B		
t2	envero avan	4	11,08	6	A	B		
t1	envero avan	2	11,67	6	A	B		
t1	pre-envero	3	11,81	6	A	B		
t2	envero avan	2	11,96	6	A	B		
t1	pre-envero	4	12,54	6	A	B		
t2	envero avan	1	13,41	6	A	B		
t2	pre-envero	1	13,85	6	A	B		
t1	pre-envero	1	14,00	6	A	B		
t1	envero avan	1	14,29	6	A	B		
t1	envero avan	3	14,58	6	A	B	C	
t1	pre-envero	2	14,87	6	A	B	C	
t1	envero avan	4	16,77	6		B	C	
t2	pre-envero	2	30,19	6			C	D
t2	pre-envero	4	44,62	6				D

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=15,64248

Error: 51,9704 gl: 96

muestra	estadio	dias	Medias	n				
liq	verde	1	0,00	6	A			
pulpa	verde	1	0,73	6	A			
liq	verde	3	0,73	6	A			
liq	verde	2	0,73	6	A			
pulpa	verde	2	1,02	6	A			
liq	verde	4	1,31	6	A			
pulpa	verde	3	1,60	6	A			
liq	pre-envero	1	2,48	6	A			
liq	pre-envero	2	4,81	6	A	B		
liq	envero avan	3	6,12	6	A	B		
pulpa	verde	4	6,71	6	A	B		
liq	envero avan	1	7,29	6	A	B		
liq	envero avan	4	8,31	6	A	B		
pulpa	envero avan	2	8,46	6	A	B		
liq	pre-envero	4	8,75	6	A	B		
pulpa	pre-envero	3	9,91	6	A	B	C	
liq	pre-envero	3	10,79	6	A	B	C	

liq	envero	avan	2	15,16	6	A	B	C		
pulpa	envero	avan	3	18,37	6		B	C		
pulpa	envero	avan	4	19,54	6		B	C		
pulpa	envero	avan	1	20,41	6		B	C		
pulpa	pre-envero		1	25,37	6			C	D	
pulpa	pre-envero		2	40,25	6				D	E
pulpa	pre-envero		4	48,42	6					E

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Test: Tukey Alfa: =0,05 DMS: =23,40790

Error: 51,9704 gl: 96

tratam	muestra	estadio	dias	Medias	n					
t1	liq	verde	1	0,00	3	A				
t2	liq	verde	1	0,00	3	A				
t1	liq	verde	3	0,58	3	A				
t1	pulpa	verde	1	0,58	3	A				
t1	liq	verde	2	0,58	3	A				
t2	pulpa	verde	1	0,87	3	A				
t1	liq	verde	4	0,87	3	A				
t2	liq	verde	2	0,87	3	A				
t2	liq	verde	3	0,87	3	A				
t1	pulpa	verde	2	0,87	3	A				
t2	pulpa	verde	2	1,16	3	A	B			
t1	pulpa	verde	3	1,46	3	A	B			
t2	pulpa	verde	3	1,75	3	A	B			
t1	liq	pre-envero	1	1,75	3	A	B			
t2	liq	verde	4	1,75	3	A	B			
t2	pulpa	verde	4	2,33	3	A	B			
t1	liq	pre-envero	2	2,91	3	A	B	C		
t2	liq	pre-envero	1	3,21	3	A	B	C		
t1	liq	envero avan	1	4,08	3	A	B	C	D	
t2	pulpa	envero avan	2	4,08	3	A	B	C	D	
t2	liq	envero avan	4	5,54	3	A	B	C	D	
t1	liq	envero avan	3	5,83	3	A	B	C	D	
t2	liq	envero avan	3	6,42	3	A	B	C	D	
t2	liq	pre-envero	2	6,71	3	A	B	C	D	
t2	liq	pre-envero	4	7,00	3	A	B	C	D	
t2	liq	pre-envero	3	7,29	3	A	B	C	D	
t1	pulpa	pre-envero	3	9,33	3	A	B	C	D	
t2	liq	envero avan	1	10,50	3	A	B	C	D	
t2	pulpa	pre-envero	3	10,50	3	A	B	C	D	
t1	liq	envero avan	2	10,50	3	A	B	C	D	
t1	liq	pre-envero	4	10,50	3	A	B	C	D	
t1	pulpa	verde	4	11,08	3	A	B	C	D	
t1	liq	envero avan	4	11,08	3	A	B	C	D	
t1	pulpa	envero avan	2	12,83	3	A	B	C	D	
t2	pulpa	envero avan	3	13,41	3	A	B	C	D	
t1	liq	pre-envero	3	14,29	3	A	B	C	D	
t1	pulpa	pre-envero	4	14,58	3	A	B	C	D	
t2	pulpa	envero avan	1	16,33	3	A	B	C	D	
t2	pulpa	envero avan	4	16,62	3	A	B	C	D	
t2	liq	envero avan	2	19,83	3	A	B	C	D	
t1	pulpa	envero avan	4	22,46	3	A	B	C	D	
t1	pulpa	envero avan	3	23,33	3	A	B	C	D	
t1	pulpa	envero avan	1	24,50	3		B	C	D	
t2	pulpa	pre-envero	1	24,50	3		B	C	D	
t1	pulpa	pre-envero	1	26,25	3			C	D	
t1	pulpa	pre-envero	2	26,83	3				D	
t2	pulpa	pre-envero	2	53,67	3					E
t2	pulpa	pre-envero	4	82,25	3					F

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)