

INFLUENCIA DE COBERTURAS DE QUITOSANA EN LOS ATRIBUTOS FÍSICO-QUÍMICOS DE PEPINOS DURANTE SU ALMACENAMIENTO REFRIGERADO

Mario A. García*, Alicia Casariego y Julián A. Acuña

Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Calle 222 No. 2317, CP 13600,
La Habana, Cuba.

E-mail: marioifal@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de coberturas de quitosana al 1,5 % (m/v) en pepinos (*Cucumis sativus* L.) var. Olimpo durante 21 días de almacenamiento entre 8 y 10 °C. Las coberturas se aplicaron por doble inmersión de los pepinos en una disolución de quitosana al 1,5 % (m/v) en ácido láctico al 1 % (v/v). Se determinaron varios parámetros de calidad durante el almacenamiento: pérdida de peso, distancia de penetración, sólidos solubles, acidez valorable, pH y deterioro fúngico visible. La aplicación de las coberturas de quitosana mejoró la apariencia de los pepinos, preservando sus atributos comerciales, aunque no disminuyó las pérdidas de peso por transpiración durante el almacenamiento. Además, los pepinos cubiertos presentaron menor deterioro fúngico visible que los pepinos controles, lo que pudo deberse a la acción fungicida de la quitosana.

Palabras clave: *Cucumis sativus*, pepino, cobertura de quitosana, almacenamiento.

ABSTRACT

Influence of chitosan coatings on physical chemical attributes of cucumbers during their refrigerated storage

The aim of the present work was to evaluate the effect of the application, by double immersion, of chitosan coatings at 1.5% (w/v) in cucumbers (*Cucumis sativus* L.) cv. Olimpo during 21 days of storage between 8 and 10 °C. The coatings were applied by double immersion of cucumbers in a chitosan solution at 1 % (w/v) in lactic acid at 1 % (v/v). Some parameters of quality were determined during the storage: weight loss, penetration distance, soluble solids, titrable acidity, pH and visible fungal decay. The application of chitosan coating improved the appearance of cucumbers, preserving their commercial attributes, although did not decrease the weight losses by transpiration during storage. Moreover, the coated cucumbers presented lesser visible fungal decay than uncoated cucumbers, which could be due to the fungicidal action of chitosan.

Keywords: *Cucumis sativus*, cucumber, chitosan coating, storage.

INTRODUCCIÓN

Entre la amplia gama de especies hortícolas comercializadas, el pepino ocupa el cuarto puesto en la producción mundial de hortalizas, antecedido por el tomate, col y cebolla. Asimismo manifiesta un alto índice de aceptación por consumidores en todo el mundo y una alternativa de producción que puede satisfacer las crecientes necesidades humanas de vegetales, además de los elevados aportes a la economía que representa para aquellos países exportadores de esta hortaliza (1).

***Mario A. García Pérez:** Licenciado en Ciencias Alimentarias (2006). Master en Ciencia y Tecnología de Alimentos (2009). Doctor en Ciencias de los Alimentos (2015). Se desempeña como profesor de Principios de Ingeniería de Alimentos, Conservación de Alimentos y Ciencia y Tecnología de Frutas y Hortalizas en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana. Su área de investigación está relacionada con el empleo de polímeros naturales en la industria alimentaria.

Uno de los mayores atractivos del pepino para los consumidores es su diversidad, con variedades destinadas al consumo fresco y otras al procesamiento industrial para obtener un amplio surtido de productos.

A nivel mundial se estima que las pérdidas poscosecha de frutas y hortalizas frescas oscilan entre 25 y 50 % (2), siendo las principales causas las pudriciones, lesiones físicas, desórdenes fisiológicos e inadecuada tecnología o carencia de esta, para el control de la maduración y senescencia.

El cultivo protegido se reconoce hoy día como una tecnología agrícola avanzada, que puede influir eficazmente en la producción de hortalizas frescas durante todo el año. En la década de 1990 se inició el cultivo protegido en Cuba a partir de transferencias de tecnologías de Israel y España basadas en el efecto invernadero (3). Dentro de la producción hortofrutícola nacional mediante esta tecnología, deben resaltarse las de tomates, pimientos y pepinos, como rubros de importancia por su gran demanda en el consumo diario y rendir mayores y más sustanciales servicios a la economía.

Generalmente el pepino se debe almacenar por un período inferior a los 14 días para evitar la pérdida de la calidad visual y sensorial en el fruto. Después de dos semanas se pueden incrementar las pudriciones, amarillamiento y deshidratación. La temperatura de 7,2 °C se usa comúnmente, pero origina daño por frío después de 2 a 3 días (4).

En este sentido, la aplicación de recubrimientos en productos vegetales es una alternativa útil para su conservación, pues proporcionan una capa protectora y originan una atmósfera modificada en el vegetal (5) y de esta forma alargan su vida de anaquel gracias a las propiedades de barrera a los gases y vapor de agua que estas presentan (6, 7). Constituyen además, alternativas ambientalmente amistosas a diferencia de los empaques no biodegradables y sintéticos (8-11), y también por su papel como agentes antimicrobianos (12, 13) y antioxidantes naturales (14).

Los componentes de películas y coberturas biodegradables se clasifican en hidrocoloides, lípidos y compuestos o combinados (15). Desafortunadamente cada uno de ellos tiene ciertas limitaciones (16) y la eficiencia funcional de las películas y coberturas

biodegradables depende de su composición (17). En esta categoría se encuentra la quitosana, derivado N-desacetilado de la quitina, ampliamente utilizada debido a sus propiedades para formar películas, de buena biocompatibilidad, biodegradabilidad, de bajo costo (18), inocuidad (19), y ser un recurso renovable.

Considerando las ventajas de los recubrimientos de quitosana como método alternativo para incrementar la vida de anaquel de productos hortofrutícolas, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia de la aplicación de coberturas de quitosana sobre los parámetros físico-químicos de pepinos (*Cucumis sativus* L.) var. Olimpo durante su almacenamiento refrigerado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los pepinos, cultivados mediante la tecnología de cultivo protegido, fueron seleccionados por su tamaño y estado de madurez uniformes y ausencia de daños mecánicos o causados por insectos, magulladuras y quemaduras de sol. Se lavaron con agua de acueducto, se higienizaron con disolución de hipoclorito de sodio (80 mg/L) y se secaron a temperatura y humedad relativa ambientales. Esta es una variedad modificada genéticamente (híbrido) proveniente de Canadá, la cual se introdujo en Cuba y se ha caracterizado por ser muy productiva y resistente a plagas y enfermedades.

Se utilizó una quitosana de masa molecular 275 kDa y grado de desacetilación de 83,5 %, producida en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, por N-desacetilación de la quitina de langosta común (*Panulirus argus*).

Como disolución formadora de cobertura (DFC) se preparó una disolución de quitosana al 1,5 % (m/v) en ácido láctico al 1 % (v/v). Su aplicación se realizó por inmersión de 20 pepinos en la DFC durante 30 s, seguido de un escurrimiento y secado en parrillas de acero inoxidable sometidas a un flujo de aire forzado a temperatura y humedad relativa ambientales (28 ± 1 °C y 78 % HR) durante 1 h, para luego realizar la segunda inmersión y posterior secado en las mismas condiciones.

Después del secado, los pepinos se envasaron en cajas plásticas y se almacenaron durante 21 días entre 8 y 10 °C (4, 20). Además, se mantuvo un lote control

(20 pepinos) sin la aplicación de coberturas para comparar las variaciones de los atributos físico-químicos de calidad durante el almacenamiento.

Las evaluaciones de los atributos de calidad del producto se realizaron al inicio y transcurridos 7; 10; 15 y 21 días de almacenamiento. Los análisis físico-químicos incluyeron sólidos solubles refractométricos (21), acidez valorable (22) y valor de pH (23). Las determinaciones se realizaron por triplicado. El deterioro fúngico se determinó de forma visual durante los 21 días de almacenamiento.

Las pérdidas de peso durante el almacenamiento se determinaron con una balanza técnica de 0,01 g de precisión, utilizando 10 pepinos marcados de cada tratamiento y los resultados se expresaron como porcentaje de pérdida de peso en cada momento de evaluación con relación al peso inicial de los productos.

Para evaluar la firmeza de los pepinos se utilizó un penetrómetro de cono con ángulo de 30° (A. H. Thomas, Co., Filadelfia, EE.UU.) y una masa adicional de 150 g que se le aplicó al fruto durante 5 s en caída libre (24). Los valores de los indicadores medidos se sometieron a análisis de varianza factorial mediante el programa STATISTICA (versión 7, 2004, StatSoft. Inc., Tulsa, EE.UU.). La prueba de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$) se usó para determinar la diferencia estadística entre las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra los valores de los parámetros físico-químicos determinados a esta variedad de pepino. Estos valores resultaron similares a los reportados (pH= 5,2; 0,2 % (m/m) de ácido cítrico y 3,1 °Brix) para esta hortaliza (25).

Tabla 1. Caracterización físico-química del pepino variedad Olimpo (n = 3)

Parámetro	Media (desviación estándar)
Masa (g)	217,0 (11,0)
Longitud (cm)	12,8 (0,5)
Firmeza (1/10 mm)	14,0 (4,0)
Acidez (% m/m de ácido cítrico)	0,11 (0,07)
Sólidos solubles (°Brix)	1,55 (0,09)
Humedad (% m/m)	95,9 (0,1)
pH	5,71 (0,03)

Las diferencias entre estos valores y los informados en la presente investigación se deben fundamentalmente a la variedad de la hortaliza y condiciones agrológicas durante su cultivo.

El pepino es un fruto que se cosecha inmaduro con 96 % de agua en sus tejidos (26). Como principal problema durante la poscosecha se encuentra la pérdida de turgencia ocasionada por la pérdida de agua a través de la transpiración y respiración del vegetal (27).

La relación entre la temperatura y humedad relativa está asociada al déficit de presión de vapor de agua durante el almacenamiento (28, 29); su control reduce la velocidad de transpiración y mantiene por mayor tiempo el agua en las células y la turgencia de los tejidos (30). El pepino posee un coeficiente de transpiración bajo, sin embargo existen diversos factores que pueden afectar la pérdida de agua como son la relación área superficial/volumen, integridad del producto, factores tecnológicos como la humedad relativa de la atmósfera de almacenamiento y empleo de recubrimientos (31, 32). Además, en pepinos, el contenido de agua varía en función del estado de madurez al corte y condiciones de manejo pre y poscosecha (27).

La Fig. 1 muestra el aumento de las pérdidas de peso de los pepinos durante su almacenamiento. Se observa que el tratamiento con cobertura de quitosana no se diferenció ($p \leq 0,05$) del control. Sin embargo, se esperaba que las coberturas redujeran las pérdidas de peso durante el almacenamiento al actuar como barreras a la transferencia de vapor de agua desde el fruto hacia el medio circundante (33). Aunque se ha señalado que las películas y coberturas de quitosana poseen una alta permeabilidad al vapor de agua (34), otro estudio (33) que evaluó las pérdidas de peso en pimiento morrón y pepinos cubiertos con quitosana, encontró que los frutos cubiertos perdieron menos peso que aquellos sin tratamiento. Los autores informaron que la concentración de quitosana resultó proporcional a la reducción de pérdida de peso. Los autores concluyeron que estos resultados se debieron a la barrera que se forma alrededor del fruto, la cual impidió la pérdida de peso debida a la transpiración.

El hecho de que las coberturas no minimizaran las pérdidas de peso durante el almacenamiento pudiera estar relacionado a que la efectividad de la

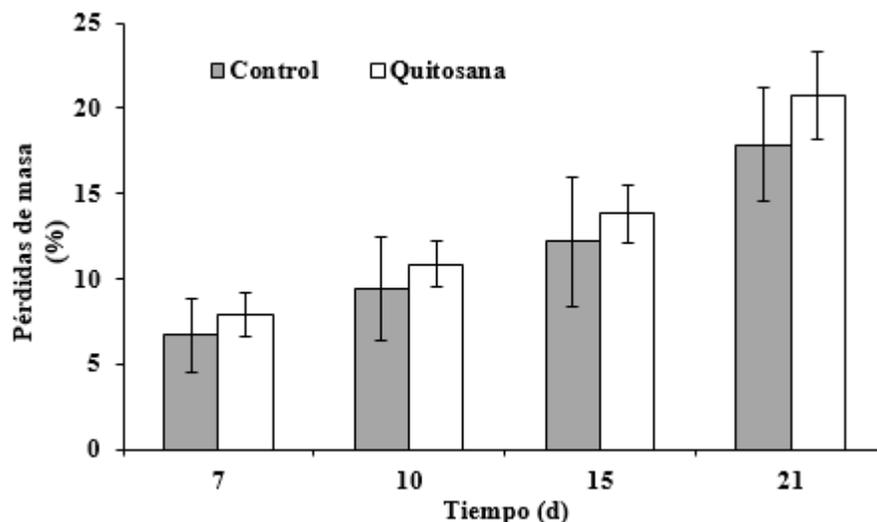


Fig. 1. Comportamiento de las pérdidas de peso de los pepinos durante su almacenamiento entre 8 y 10 °C. Las barras de error indican desviación estándar (n= 10).

cobertura, aplicada por inmersión del producto en la DFC, depende, en gran medida, de su habilidad de extenderse sobre la superficie del sólido a cubrir. Por lo tanto, las DFC deben ser capaces de mojar la superficie del alimento uniformemente y formar una cobertura con una adecuada adhesión, cohesión y durabilidad (35). Para conocer la efectividad de las DFC se recomienda evaluar previamente, las propiedades de superficie a través de indicadores como los coeficientes de humectabilidad, extensibilidad y cohesividad (36).

Se ha reportado una pérdida de peso alrededor del 16 % a los 15 días de almacenamiento, similar a los encontrados en este estudio (37). Los síntomas de pérdida de agua en frutas y hortalizas llegan a ser evidentes cuando pierden entre el 5 y 10 % de su masa, debido principalmente a la transpiración y características estructurales de los tejidos (28). Los primeros indicios de marchitamiento de los pepinos fueron apreciables a los 10 días de almacenamiento, cuando alcanzaron valores superiores al 10 % de pérdida de agua. También

se ha planteado que la calidad comercial de los pepinos se garantiza cuando existen pérdidas de agua inferiores al 5 % (38). La Tabla 2 presenta los modelos estadísticos para la pérdida de masa de los pepinos durante su almacenamiento entre 8 y 10 °C. El análisis de los residuos de los modelos indica en todos los casos que estos siguen una distribución normal y los experimentos estuvieron bien aleatorizados, además no se detectaron observaciones atípicas, ni puntos con alto valor de influencia.

La distancia de penetración aumentó ($p \leq 0,05$) durante el período de almacenamiento, tanto para los pepinos controles como para los tratados (Tabla 3), lo cual indica un ablandamiento del tejido que se corresponde con los procesos de senescencia de productos no climatéricos (39, 40) como el pepino. No se encontró diferencia significativa entre productos controles y recubiertos con quitosana, lo cual se corresponde con las pérdidas de peso experimentadas por las hortalizas de ambos lotes durante su almacenamiento, lo que conlleva a una disminución en su turgencia y favorece su deformación (37).

Tabla 2. Modelos estadísticos para la pérdida de masa (PM) de pepinos durante su almacenamiento entre 8 y 10 °C

Tratamiento	Modelo	R ²
Control	PM=0,8280t	78,6
Cobertura de quitosana	PM=0,9535t	95,4

PM: pérdida de masa por transpiración; t: tiempo en días.

Tabla 3. Comportamiento de la distancia de penetración (1/10 mm) en pepinos durante su almacenamiento entre 8 y 10 °C

Tiempo (d)	Tratamiento	
	Control	Cobertura de quitosana
0	13,0 (3,0) a	13,0 (3,0) a
7	16,0 (2,0) b	18,0 (4,0) b
10	19,0 (3,0) bcd	22,0 (4,0) cdef
15	22,0 (4,0) def	25,0 (3,0) ef
21	19,0 (2,0) bc	19,0 (3,0) bc

Media (desviación estándar); n = 5.

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

Existen diversos factores que pueden incidir en los porcentajes de sólidos solubles de los diferentes productos agrícolas, entre ellos la variedad, estado de madurez, condiciones de almacenamiento, entre otros. Para el caso del pepino, más que el carácter varietal, influyen sobre el contenido de sólidos solubles, factores agrológicos, especialmente la climatología durante el cultivo y riego, los que pueden variar los valores de sólidos solubles para frutas y hortalizas de una misma variedad.

Los pepinos no se caracterizan por presentar valores altos de porcentaje de sólidos solubles (26). Los sólidos solubles oscilaron entre 3,0 y 3,5 °Brix durante el almacenamiento, sin que se observaran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos. Al considerar que los pepinos no son climatéricos (41), los cambios en los solutos pudieron estar asociados con la pérdida de agua de los tejidos. Tales resultados, han sido reportados para frutos no climatéricos como zanahorias (29). También en fresa, cereza dulce y frambuesa se ha demostrado que durante el almacenamiento ocurre una reducción significativa en el potencial hídrico y un incremento en el contenido de sólidos solubles totales por efecto de la pérdida de agua (27, 30).

La acidez valorable mostró una tendencia similar para todos los tratamientos durante el tiempo, sin que existieran diferencias significativas ($p \leq 0,05$), con valores que oscilaron entre 0,06 y 0,11 % de ácido cítrico. Estos valores coincidieron con los informados (entre 0,05 y 0,08 % de acidez) para esta hortaliza (25, 42). Estos valores variaron ligeramente durante el período de conservación. En cuanto a los valores de pH, se obtuvo un patrón de evolución semejante para todos los tratamien-

tos, con valores entre 5,56 y 6,55, sin que existieran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) durante el almacenamiento; estos valores fueron similares a los reportados (25).

Se apreció que los pepinos con coberturas de quitosana mostraron mayor brillo que los del lote control, lo cual coincide con lo reportado (43, 44).

La mayoría de los pepinos de ambos tratamientos presentaron desarrollo fúngico visible. Entre las posibles afectaciones se apreció una capa algodonosa sobre las puntas de los pepinos, lo cual puede asociarse con una pudrición algodonosa. Además, se detectó que la superficie de los pepinos se hizo vulnerable al tacto, manifestando una pérdida notable de su firmeza, comportamiento relacionado con el desarrollo de una pudrición blanda. Estas apreciaciones coinciden con lo reportado (4) quienes relacionaron estas afectaciones con el desarrollo del hongo *Pythium*, el cual crece en condiciones de elevado contenido de agua, como el presente en esta hortaliza; esta lesión se manifiesta generalmente sobre las puntas y superficie del pepino. Los pepinos cubiertos con quitosana presentaron menor afectación, lo que pudo deberse a la acción fungicida de la quitosana (11, 33).

CONCLUSIONES

La aplicación de las coberturas de quitosana mejoró la apariencia de los pepinos, preservando sus atributos comerciales, aunque no disminuyó las pérdidas de peso por transpiración durante el almacenamiento. Además, los pepinos cubiertos con quitosana presentaron menor afectación por el desarrollo fúngico visible, lo que pudo deberse a la acción fungicida de la quitosana.

REFERENCIAS

1. FAO. *Prevención de pérdidas de alimentos poscosecha: frutas, hortalizas, raíces y tubérculos*, Roma, FAO, 1993.
2. FAO. *Manual para el mejoramiento del manejo de frutas y hortalizas*. Roma, Depósito de Documentos de la FAO, 2002.
3. IHL. *Manual para casas de cultivos protegidos*. La Habana, Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova, 1999.
4. Suslow, T.V. y Cantwell, M. *Pepino. Recomendaciones para mantener la calidad poscosecha*. Davis, Department of Vegetables Crops, Universidad de California, 2002.
5. García, M. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 18(1):71-76, 2008.
6. Krochta, J. y De Mulder-Jhonson, C. *Food Technol.* 51(2):60-63, 1997.
7. Butler, B.; Vergano, P.; Testin, R.; Bunn, J. y Wills, J. J. *Food Sci.* 61(5):953-955, 961, 1996.
8. Gennadios, A.; Weller, M.A.; Hanna, M.A. y Fronning, G.W. *Food Sci.* 61(3):585-589, 1996.
9. Rosa, D.S.; Franco, B.L.M. y Calil, M.R. *Polím.: Cienc. Tecnol.* 11:82-88, 2001.
10. Tharanathan, R.N. y Saroja, N. *J. Sci. Ind. Res.* 60:547-559, 2001.
11. Tharanathan, R.N. *Trends in Food Sci. & Technol.* 14(3):71-78, 2003.
12. Fernández, M. *Int. J. Food Sci. Technol.* 6(2):97-108, 2000.
13. Catalá, R. y Gavara, R. *Arbor CLXVIII* 661:109-127, 2001.
14. Chien, P.J.; Sheu, F.; Huang, W.T. y Su, M.S. *Food Chem.* 102:1192-1198, 2007.
15. Bosquez, E.; Vernon, E.; Pérez, L. y Guerrero, I. *Industria Alimentaria* 22(1):14-36, 2000.
16. Pavlath, A.E. *Edible Films*. Albany, CA., Western Regional Research Center. U.S. Department of Agriculture. Technomic Publi Co., 2000.
17. Debeaufort, F.; Quesada-Galló, J. y Voilley, A. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38(4):299-313, 1998.
18. Sirinivasa, P.C.; Ramesh, M.N.; Kumar, K.R. y Tharanathan, R.N. *J. Food Eng.* 63:79-85, 2004.
19. Argulló, E.; Rodríguez, M. S.; Ramos, V. y Albertengo, L. *Macromol. Biosci.* 10:521-530, 2003.
20. NC-478. *Especificaciones de calidad de pepinos*. Cuba, 2007.
21. NC-ISO 2173. *Productos de frutas y vegetales. Determinación del contenido de sólidos solubles. Método refractométrico*. Cuba, 2001.
22. NC-ISO 750. *Productos de frutas y vegetales. Determinación de la acidez valorable*. Cuba, 2001.
23. NC-ISO 1842. *Productos de frutas y vegetales. Determinación del pH*. Cuba, 2001.
24. Hayakawa, M. y Deman, J. *J. Texture Studies* 13:201-210, 1982.
25. Hernández, C.; Pérez, L.E. y Ramírez, R.E. *Desarrollo de recubrimientos comestibles a base de mucílagos de linaza y semillas de chíya y su impacto en la vida útil de pepinos mínimamente procesado* [en línea]. Consultado abril 2009 en www.coecyt-coachcoah.gob.mx/206%5C1%5C350%5C2009%5C2%5C24%5CUAZ%20Hern%C3%A1ndez%20Coronado.pdf
26. Musmade, A.M. y Desai, U T. *Cucumber and Melon*. En: *Handbook of Vegetables Science and Technology*. B.K. Salunke y S.S. Kadam (Eds.), New York, Marcel Dekker, Inc. 1998, pp. 245-253.
27. Walter, W.M.; Epley, D.G. y McFeeters, R.F. *J. Agric. Food Chem.* 38:2185-2191, 1990.
28. Ryall, L. y Lipton, W.J. *Refrigerated storage*. En: *Handling transportation and Storage of Fruits and Vegetables*. Vol. I. L. Ryall y W. Lipton (Eds.), Westport, CT., AVI Publishing Co., Inc. 1982, pp. 293-306.
29. Shibairo, S.I.; Upadhyaya, M.K. y Toivonen, M. *Scientia Hort.* 71:1-12, 1997.
30. Leonardi, C.; Guichard, S. y Bertin, N. *Scientia Hort.* 84:285-296, 2000.
31. Galvis, V. y Herrera, A. *El tomate, manejo poscosecha*, Bogotá, Universidad Nacional de Bogotá, 1995.
32. Wills, R.; McGlasson, B.; Graham, D. y Joyce, D. *Postharvest: An Introduction to the Physiology & Handling of Fruit, Vegetables & Ornamentals*, Sydney, University of Western Sydney, 1998, 212 p.
33. El Ghaouth, A.; Arul, J. y Ponnampalam, R. *J. Food Proc. Preserv.* 15:359-368, 1991.
34. Shellhammer, T. y Krochta, J. *J. Food Sci.* 62 (2):390-398, 1997.
35. Krochta, J. y De Mulder-Jhonson, C. *Food Technol.* 51(2):60-63, 1997.
36. Hershko V. y Nussinovitch A. *Biotechnol. Prog.* 14:756-765, 1998.
37. Muy, R.; Siller, D.; Díaz, J. y Valdés, J. *Rev. Fitotecnia Mex.* 27(2):157-165, 2004.
38. Ben-Yehoshua, S. *Transpiration, water stress and gas exchange*. En: *Postharvest Physiology of Vegetables*. J. Weichmann (Ed.), New York, Marcel Dekker, Inc., 1987, pp. 113-138.
39. Gómez, P. A. y Camelo, A. F. *Horticultura Brasileira* 20(1):38-43, 2002.
40. Díaz, R.; Casariego, A.; Rodríguez, J.; Martínez, A. y García, M. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 20(2):31-36, 2010.
41. Suslow, T. y Cantwell, M. *Cucumber. Produce facts. Perishables Handling No. 90*. Davis, CA., Universidad de California, 1997, pp. 21-22.
42. Kader A.A. *Recomendaciones para Mantener la Calidad Postcosecha de Pepino*. Davis, CA., Postharvest Technology Research and Information Center. Universidad de California, 2007.
43. Rodríguez, M.S.; Ramos, V.; Pistonesi, M.; Del Blanco, L. y Agulló, E. *Información Tecnológica* 9(3):129-134, 1998.
44. García, M.; Díaz, R.; Casariego, A.; Bolumen, S.; De Hombre, R.; González, I.; Rodríguez, I. y Salgado, J. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 19(1):1-6, 2009.