

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“Caracterización y aprovechamiento de la
savia de abedul. Preparación de bioplásticos
enriquecidos”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR**

María Zornoza Berodia

Julio, 2022



AGRADECIMIENTOS

A mi familia, especialmente a mis padres, mi hermana y mi pareja por brindarme siempre su apoyo en todo lo que me propongo y confiar en mí.

Agradecer a mis tutores, Manuel Rendueles de la Vega e Ismael Marcet Manrique, por su asesoramiento durante la elaboración de este trabajo. Gracias por el apoyo absoluto en cada etapa del proceso.

A mis compañeros de laboratorio María y Shihan, por sus consejos, paciencia y ayuda constante durante toda la realización del trabajo.

Finalmente, a mis compañeros de máster y laboratorio, por todos los buenos momentos que hemos pasado durante este curso y haberme ayudado en todo lo que podíais.

RESUMEN

La savia de abedul es reconocida a nivel internacional como uno de los productos forestales no maderables más rentables. En otros países de Europa, como Dinamarca, Noruega o Finlandia, se elaboran diferentes alimentos con esta savia, como cerveza, almíbar o vinagre, debido a su alto contenido en compuestos beneficiosos para la salud, como por ejemplo vitaminas u otros compuestos con propiedades antimicrobianas y antioxidantes.

En este trabajo, y teniendo en cuenta dichas propiedades bioactivas, se propone un uso diferente de la savia, de tal manera que se ha estudiado su utilización como aditivo en la preparación de bioplásticos preparados con gelatina y con caseína. Con este fin, la savia cruda fue recolectada por parte de la empresa asturiana llamada “La Savia”, se pasteurizó y se almacenó embotellada. Antes de realizar los bioplásticos, el contenido en proteínas, hidratos de carbono totales, azúcares reductores, ácidos orgánicos y fenoles de la savia de abedul fueron cuantificados, además de realizar dos tipos de pretratamientos como son el tratamiento térmico y la ultrafiltración para conseguir una esterilización de la savia almacenada. Los bioplásticos se prepararon disolviendo directamente la gelatina o la caseína al 5% en la savia de abedul, junto con un 2% de agente plastificante (glicerol), y secando la mezcla en recipientes adecuados en un horno a 40 °C durante 24 horas, de tal manera que los bioplásticos pudiesen ser desprendidos de dichos recipientes manualmente. Una vez preparados, se analizaron sus propiedades mecánicas, microestructura, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad, colorimetría, transmitancia y transparencia; así como las propiedades antioxidantes de estos materiales utilizando DPPH y su capacidad para quelar hierro.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la savia de abedul recolectada resultó tener un 0,02% (p/v) de proteínas, un 0,5% (p/v) de polisacáridos, un 0,4% (p/v) de azúcares reductores, una gran variedad de ácidos orgánicos como son el ácido málico u oxálico, y un 0,001% (p/v) de compuestos fenólicos. Así mismo, los bioplásticos obtenidos presentaron un máximo de un 91,91% de propiedades antioxidantes frente al DPPH y un 59,6% de actividad quelante de hierro. Los resultados obtenidos muestran que es posible preparar estos biomateriales utilizando savia de abedul, y que esta savia les otorga propiedades bioactivas a los materiales preparados, siendo una alternativa para el *packaging* alimentario.

ABSTRACT

Birch sap is internationally recognized as one of the most profitable non-timber forest products. In other European countries, such as Denmark, Norway or Finland, different foods are made with this sap, such as beer, syrup or vinegar, due to its high content of compounds beneficial to health, such as vitamins or other compounds with antimicrobial and antioxidant properties.

In this work, and taking into account these bioactive properties, a different use of the sap is proposed, in such a way that its use as an additive in the preparation of bioplastics prepared with gelatin and casein has been studied. For this purpose, the raw sap was collected by the Asturian company called "La Savia", pasteurized and stored in bottles. Before making the bioplastics, the content of proteins, total carbohydrates, reducing sugars, organic acids and phenols in the birch sap were quantified, and two types of pretreatments such as heat treatment and ultrafiltration were carried out to sterilize the sap. Bioplastics were prepared by directly dissolving 5% gelatin or casein in birch sap, together with 2% plasticizing agent (glycerol), and drying the mixture in suitable containers in an oven at 40 °C for 24 hours, so that the bioplastics could be manually removed from the containers. Once prepared, their mechanical properties, microstructure, water vapor permeability, solubility, colorimetry, transmittance and transparency were analyzed, as well as the antioxidant properties of these materials using DPPH and their iron chelating properties.

According to the results obtained, the birch sap collected was found to have 0,02% (w/v) of proteins, 0,5% (w/v) of polysaccharides, 0,4% (w/v) of reducing sugars, a variety of organic acids such as malic or oxalic acid, and 0,001% (w/v) of phenolic compounds. Likewise, the bioplastics obtained showed a maximum of 91,91% antioxidant properties against DPPH and 59,6% iron chelating activity. The results obtained show that it is possible to prepare these biomaterials using birch sap, and that this sap gives bioactive properties to the prepared materials, being an alternative for food packaging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Estructura básica de la gelatina. (Bernadette y Flórez, 2020)	24
Figura 2.- Estructura de la caseína en 2D. (Khan et al., 2021).....	25
Figura 3.- Espectrofotómetro empleado para la caracterización de la savia de abedul..	28
Figura 4.- Equipo HPLC Agilent 1200 utilizado en la determinación de ácidos orgánicos	29
Figura 5.- (A): Liofilizador LFD-10C Freeze Dryer empleado para la extracción de muestra liofilizada. (B): Muestra liofilizada repartida en dos matraces de 200 mL.	31
Figura 6.- Siembras con distinta concentración de savia de abedul	32
Figura 7.- Microscopio DME (Leica) empleado para observar los resultados microbiológicos de la savia de abedul.....	33
Figura 8.- Muestras tratadas a 70 °C a distintos tiempos. (A): Calentamiento durante 1 hora a 70 °C. (B): Calentamiento durante 40 minutos y luego seguidamente 50 minutos a 70 °C. (C): Calentamiento durante 40 minutos a 70 °C.....	34
Figura 9.- Muestras tratadas con distinto pH, filtradas y con tratamiento térmico. (A): Muestra a pH 3, filtrada y con un tratamiento térmico a 70 °C durante 40 minutos. (B): Muestra a pH 6, filtrada y con un tratamiento térmico a 70 °C durante 40 minutos. (C): Muestra a pH 4, filtrada y con un tratamiento térmico de 100 °C durante 40 minutos..	34
Figura 10.- Proceso de ultrafiltración empleando una membrana de 5 kDa para poder esterilizar completamente la savia ya centrifugada	35

Figura 11.- Homogeneizador Silent Crusher (Heidolph, Alemania) con el rotor 12 GM empleado en la elaboración de <i>films</i> de caseína y savia de abedul.....	36
Figura 12.- Centrifugadora 6500 (Kubota) empleada antes de realizar la liofilización de la savia de abedul.....	37
Figura 13.- Cámara de humedad HCP50 (Mettler) empleada para el mantenimiento de los <i>films</i>	37
Figura 14.- Micrómetro digital (Mitutoyo C., Japón) empleado para medir el grosor de los <i>films</i>	38
Figura 15.- Colorímetro utilizado para medir las propiedades colorimétricas de las muestras de aceite y de los <i>films</i>	39
Figura 16.- Texturometro en el que se coloca la plataforma para colocar los fragmentos de los <i>films</i> y la sonda P/5S y poder estudiar las propiedades mecánicas de éstos.	40
Figura 17.- Tapones sellados con trozos de <i>film</i> de caseína y gelatina junto con savia, en el desecador para el estudio de la permeabilidad de vapor de agua de estos <i>films</i>	42
Figura 18.- Resultado de la cuantificación de los azúcares reductores, observando distintas tonalidades (naranja oscuro con la dilución 1:10 de la savia, rojizo con la savia sin diluir y amarillo en el blanco).....	48
Figura 19.- Cromatograma resultante de la savia de abedul con H ₂ SO ₄ al 5%.	50
Figura 20.- Resultado de la cuantificación de los fenoles, observando distintas tonalidades (azul claro con la savia sin homogeneizar y transparente en el blanco).....	51
Figura 21.- Resultado de la propiedad quelante de la savia en comparación con el “blanco”	52

Figura 22.- Resultado de la electroforesis donde se observa que sí existen proteínas, aunque de manera muy tenue 53

Figura 23.- Microbiología resultante de la savia de abedul. (A): Posibles bacilos Gram Negativos resultantes de la siembra de la savia de abedul. (B): Posibles levaduras resultantes de la siembra de la savia de abedul 54

Figura 24.- Resultado microbiológico tras los tratamientos térmicos. (A) Muestra de savia calentada a 70 °C durante 40 minutos. (B) Muestra de savia calentada a 70 °C durante 1 hora. (C) Muestra de savia calentada a 70 °C durante 40 minutos y posteriormente 50 minutos. (A) Muestra de savia con pH 3 y calentada a 70 °C durante 40 minutos. (B) Muestra de savia con pH 6 antes de ser calentada a 70 °C durante 40 minutos. (C) Muestra de savia con pH 6 después de ser calentada a 70 °C durante 40 minutos..... 56

Figura 25.- Microbiología resultante del tratamiento térmico y de pH. (A): Posibles bacilos Gram Negativos resultantes de la savia de abedul pretratada. (B): Posibles levaduras resultantes de la siembra de la savia de abedul pretratada 57

Figura 26.- Electroforesis resultante de la savia. (A): Electroforesis resultante de la muestra de savia extraída del concentrado de la ultrafiltración. (B): Electroforesis resultante de la muestra de savia extraída del permeado de la ultrafiltración 58

Figura 27.- *Films* resultantes. (A) *Film* de gelatina, glicerol y savia. (B) *Film* de caseína, glicerol y savia..... 59

Figura 28.- Micrografías de los *films* de gelatina y caseína con savia de abedul cruda y concentrada. (A): *Film* control con gelatina. (B): *Film* control con caseína. (C): *Film* con gelatina y savia. (D): *Film* con caseína y savia. (E): *Film* con gelatina y savia concentrada. (F): *Film* con caseína y savia concentrada, en la que se señalan los espacios vacíos formados 68

Figura 29.- Resultado de la propiedad quelante de los *films* de savia con caseína y gelatina en comparación con el *film* de gelatina control. (A): Representación de la actividad

quelante de los *films* de savia con gelatina y caseína. (B): Propiedad quelante de los *films* de savia con gelatina y caseína, y sus respectivos *films* controles 71

Figura 30.- Resultado de la propiedad quelante de los *films* de savia concentrada con caseína y gelatina en comparación con el *film* de gelatina control. (A): Representación de la actividad quelante de los *films* de savia concentrada con gelatina y caseína. (B): Propiedad quelante de los *films* de savia concentrada con gelatina y caseína, y sus respectivos *films* controles..... 71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Contenido de azúcar (% peso) en las muestras de savia, representado por la media \pm desviación estándar. (Luczaj et al., 2014)	6
Tabla 2.- Parámetros físicos de la savia de abedul y de los productos del proceso de ósmosis inversa (OI). (Bilek et al., 2018).....	10
Tabla 3.- Contenido de minerales en la savia del abedul y en los productos del proceso de ósmosis inversa. (Bilek et al., 2018).....	11
Tabla 4.- Variaciones en las propiedades fisicoquímicas en la savia de abedul con ultrafiltración (UF). (Jeon et al., 2013).....	12
Tabla 5.- Recuento de las especies predominantes en la savia de abedul después del almacenamiento y tras 38 días de éste. (Nikolajeva y Zommere, 2018).....	16
Tabla 6.- Tiempos de retención en HPLC obtenidos de los ácidos patrones	49
Tabla 7.- Unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) resultantes tras todos los tratamientos térmicos y de pH.....	55
Tabla 8.- Resultados de la caracterización de la savia antes y después de ultrafiltrar (en el concentrado, epermeado y recirculado).....	57
Tabla 9.- Valores de transmitancia de los <i>films</i> de gelatina y caseína con savia y con agua destilada (grupo control).....	60
Tabla 10.- Transparencia y atributos de color de los <i>films</i> de savia y savia concentrada tanto con caseína como de gelatina, y los <i>films</i> con agua destilada (<i>films</i> control).....	62

Tabla 11.- Valores de grosor, resistencia a la punción (PS) y deformación por punción (PD) de los <i>films</i> de gelatina y caseína con savia y savia concentrada, y con agua destilada (grupo control).....	63
Tabla 12.- Valores de permeabilidad al vapor de agua (WVP) y tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) de los <i>films</i> de gelatina y caseína con savia y savia concentrada, y con agua destilada (grupo control)	65
Tabla 13.- Valores de solubilidad de los <i>films</i> de gelatina y caseína con savia y savia concentrada, y con agua destilada (grupo control) a distintos valores de pH	66
Tabla 14.- Resultados de la capacidad antioxidante de los <i>films</i> de gelatina y caseína junto con savia y savia concentrada, tras la realización del método DPPH	69
Tabla 15.- Resultados de la capacidad quelante de los <i>films</i> de gelatina y caseína con savia y savia concentrada, y agua destilada.....	70

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ANOVA	Análisis de varianza (<i>Analysis of variance</i>)
DCMD	Destilación por contacto directo de membranas
DPPH	2,2- difenil-1-1-picrilhidracilo
GLC capilar	Electroforesis capilar
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Afinidad
HPLC-MS	Cromatografía Líquida-Espectrometría de masas
ICP-OES	Espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado por inducción
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
MFU	Unidades de microfiltración
PCA	Plate Count Agar
PD	Deformación por punción
PE	Polietileno
PET	Tereftalato de polietileno
PFPA	Pentafluoropropionicanhídrido
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PS	Resistencia a la punción
OI	Ósmosis inversa
RID	Índice de refracción
SDS-Page	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Luz ultravioleta (<i>Ultraviolet</i>)

YI	Índice de amarillez (<i>Yellowness index</i>)
WI	Índice de blancura
WVP	Permeabilidad al vapor de agua (<i>Water Vapor Permeability</i>)
WVTR	Tasa de transmisión de vapor de agua (<i>Water Vapor Transmission Rate</i>)

ÍNDICE

1.- Introducción.....	1
1.1.- Objetivos	3
2.- Consideraciones teóricas.....	4
2.1.- Composición bioquímica de la savia de abedul. Evaluación de la metodología descrita en la literatura científica.....	5
2.1.1. Hidratos de carbono.....	5
2.1.2. Ácidos orgánicos	7
2.1.3. Proteínas	8
2.2.- Pretratamientos para aumentar la vida útil de la savia de abedul	9
2.3.- Aprovechamiento de la savia de abedul como producto alimenticio.....	15
2.4.- Fabricación de <i>films</i> o biopelículas biodegradables.....	20
3.- Metodología	26
3.1.- Caracterización de la savia de abedul y su microbiología	27
3.1.1. Determinación de proteínas	27
3.1.2. Determinación de hidratos de carbono totales.....	28
3.1.3. Determinación de azúcares reductores	28
3.1.4. Determinación de ácidos orgánicos y azúcares	29
3.1.5. Determinación de fenoles	30
3.1.6. Determinación de capacidad antioxidante.....	30
3.1.7. Determinación de capacidad quelante de la savia	31
3.1.8. Electroforesis SDS-Page.....	31
3.1.9. Análisis de la microbiología de la savia	32
3.2.- Tratamiento térmico y su efecto sobre los biopolímeros de la savia	33
3.3.- Ultrafiltración y su efecto sobre los biopolímeros de la savia	35
3.4.- Elaboración de <i>films</i> de gelatina y caseína aditivados con savia	36
3.4.1. Transmitancia y transparencia.....	38
3.4.2. Colorimetría.....	39
3.4.3. Propiedades mecánicas	40
3.4.4. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)	41
3.4.5. Solubilidad.....	42

3.4.6. Microestructura.....	43
3.4.7. Propiedades antioxidantes	44
3.4.8. Propiedades quelantes	44
3.5.- Análisis estadístico.....	45
4.- Resultados y discusión	46
4.1.- Caracterización de la savia de abedul	47
4.1.1. Determinación de proteínas	47
4.1.2. Determinación de hidratos de carbono totales.....	47
4.1.3. Determinación de azúcares reductores	48
4.1.4. Determinación de ácidos orgánicos y azúcares	49
4.1.5. Determinación de fenoles	50
4.1.6. Determinación de capacidad antioxidante	51
4.1.7. Determinación de la capacidad quelante de la savia	52
4.1.8. Electroforesis SDS-Page.....	53
4.1.9. Análisis de la microbiología de la savia	53
4.2.- Tratamiento térmico y su efecto sobre los biopolímeros de la savia	54
4.3.- Ultrafiltración y su efecto sobre los biopolímeros de la savia	57
4.4.- Elaboración de <i>films</i> a partir de la savia.....	58
4.4.1. Transmitancia y transparencia	59
4.4.2. Colorimetría.....	61
4.4.3. Propiedades mecánicas	63
4.4.4. Permeabilidad al vapor de agua (WVP) y solubilidad	64
4.4.5. Microestructura.....	67
4.4.6. Propiedades antioxidantes	68
4.4.7. Propiedades quelantes	69
5.- Conclusiones	72
6.- Referencias bibliográficas.....	74

INTRODUCCIÓN

En el pasado, la savia de abedul se usaba como medicamento, ya que se conoce que la savia de *Betula pendula*, la especie de abedul más común, se utilizaba contra la anemia, artritis, cálculos renales y hepáticos, gota, reumatismo y resfriados (Svanberg et al., 2012). Además, se creía que la savia de abedul tenía efecto diurético y propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias, además de ser administrada para aliviar dolencias como el reumatismo (Peev et al., 2010). Sin embargo, realmente casi no hay evidencia clínica sobre estos efectos beneficiosos otorgados a la savia de abedul, de manera que a pesar de cierto efecto antiinflamatorio, antipirético e inhibidor de la fagocitosis, su utilidad terapéutica no es superior a la de otros antipiréticos o analgésicos clásicos y modernos (Klinger et al., 1989).

Sin embargo, la savia también se empleaba como producto cosmético para el cabello y cuidado de la piel (Svanberg et al., 2012). En este caso, muchos autores han podido demostrar el posible uso de esta savia para productos antiedad. En este sentido, el empleo de plantas como una fuente valiosa de ingredientes cosméticos naturales ha conllevado al estudio pormenorizado de los compuestos que presenta la savia de abedul, observándose que es un producto alimentario rico en vitamina C o compuestos fenólicos y glucósidos, que la hacen un perfecto sustituto del agua en cosméticos como cremas faciales (Boroduškis et al., 2017). A su vez, ciertos estudios indican su utilidad como ingrediente que favorece la regeneración y proliferación celular, de manera que se puedan revertir ciertos signos del envejecimiento en base a un ingrediente natural como es la savia de abedul (Boroduškis et al., 2017).

Estas características nutricionales han atraído la atención de productores en el norte y este de Europa, los cuales fabrican ciertos productos a partir de esta savia de abedul, ajenos a la medicina, y centrándose en la comercialización de bebidas fermentadas, como la cerveza o el vino y ciertos almíbares, con el fin de ser un alimento más dentro de la dieta. A nivel internacional, se ha reconocido que la savia de abedul es uno de los productos forestales no maderables más rentables (Berg, 1993). En este sentido, en Dinamarca, Noruega o Finlandia se elaboran grandes cantidades de cerveza durante la primavera gracias a la adición de levadura y malta; o vino, gracias a la adición de azúcar y levadura (Svanberg et al., 2012). Sin embargo, en Suecia, se utiliza como un

ingrediente alimentario más, añadiéndolo directamente al café, las gachas, u obteniendo almíbar o vinagre a partir de ella.

El método de obtención de la savia de abedul consiste en extraer el producto en forma líquida realizando un único orificio por árbol, registrando siempre el tiempo y el volumen de savia recolectada. Una vez perforado, se recoge con mangueras que van a parar a botellas con cierta inclinación para que la extracción sea eficiente. Una vez realizada la recolección de la savia, se deben sellar los agujeros con tapones de madera (Mihai, 2017).

Por lo tanto, en la mayoría de los países, hay dos usos principales de la savia de abedul: uso nutricional, gracias a su contenido en azúcar que consigue un medio idóneo para la fabricación de bebidas fermentadas como la cerveza, el vino, o el jarabe de azúcar condensado, y el uso medicinal, puesto que se cree que presenta sustancias antimicrobianas capaces de ser hacer frente a multitud de enfermedades. No obstante, este trabajo se centra principalmente en el ámbito nutricional.

1.1.- *Objetivos*

Teniendo en cuenta que la savia sobre la que se va a desarrollar el presente Trabajo Fin de Máster ha sido recolectada de manera tradicional por la empresa asturiana “La Savia”, y que es suministrada totalmente cruda, con el fin último de ampliar su rango de aplicaciones por parte de la industria alimentaria se establecen los siguientes objetivos:

- 1º.- Caracterización de la savia cruda en cuanto a su composición en proteínas, polisacáridos, monosacáridos y fenoles.
- 2º.- Evaluación de diferentes pretratamientos con el objetivo de aumentar la vida útil del producto embotellado. Estudio del efecto de dichos pretratamientos sobre la composición de la savia.
- 3º.- Separación de las proteínas y/o polisacáridos contenidos en la savia pretratada en diferentes fracciones mediante tecnología de membranas.
- 4º.- Uso alternativo de la savia de abedul mediante la preparación de bioplásticos formulados con gelatina y caseína con propiedades funcionales extendidas.

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1.- *Composición bioquímica de la savia de abedul. Evaluación de la metodología descrita en la literatura científica*

2.1.1. Hidratos de carbono

Para caracterizar este tipo de savia, se debe de extraer realizando perforaciones de 50 mm de profundidad y 12 mm de diámetro aproximadamente en el abedul, a una altura de 4 m respecto al suelo (Kallio y Ahtonen, 1987) y preferiblemente durante el principio de la primavera, ya que su proporción va disminuyendo a medida que avanza la estación. La razón de este procedimiento es que se ha demostrado que el contenido de azúcar no es el mismo en todas las partes del árbol, y que en estas condiciones se encuentra la savia más dulce y rentable industrialmente (Schroeder, 1865). Posteriormente se congela para preservar la integridad de la muestra a -20 °C, y una vez descongelada, se separan los azúcares y ácidos utilizando un intercambiador de aniones. Posteriormente, en el caso de los azúcares, estos se eluyen por medio del paso por una columna con agua destilada. Estos compuestos, se secan en viales de reacción cónicos bajo una corriente de nitrógeno a 37 °C. Una vez secados, se añade un reactivo de sililiación para conseguir derivados volátiles y estables a partir de especies no volátiles, y la mezcla de reacción se agita durante 5 minutos, se mantiene a 60 °C durante 30 minutos y se deja reposar toda la noche a temperatura ambiente. Los derivados obtenidos pasan por la columna capilar en la cromatografía de gases, siendo la temperatura del inyector de aproximadamente 190 °C y el volumen inyectado no suele superar los 2 µL siendo el detector un espectrómetro de masas. Utilizando esta técnica se observa que la sacarosa y el mio-inositol dan un único pico. Esto puede dar a entender que la poca cantidad de sacarosa es proveniente de depósitos de almidón y azúcar invertido de los cuerpos lipídicos de las raíces (Lepeschkin, 1928).

Por otra parte, los hidratos de carbono pueden ser analizados por cromatografía de gases utilizando una columna de tipo capilar. Por este procedimiento se pueden identificar distintos azúcares (g/L): glucosa (2,5-4,7), fructosa (2,3-4,5), sacarosa (<0,7), galactosa (<0,05) y el azúcar alcohol mio-inositol (trazas). No obstante, en el caso de todos estos tipos de hidratos de carbono y su contenido de materia seca de la savia dependen de muchos factores ambientales y genéticos, afectando a su formación y catabolismo (Schroeder, 1865). Schroeder demostró que las altas temperaturas aumentan y las bajas

temperaturas retardan la conversión del almidón en azúcares. Cabe destacar que varios autores defienden la ausencia de sacarosa en la savia de algunas especies de abedul (*Betula pendula* y *Betula pubescens*), sin embargo, se ha comprobado que la mayoría presentan trazas de sacarosa, al igual de azúcares invertidos, los cuales pasan de glucosa a fructosa, aunque no siempre en la misma proporción, dando como resultado diferentes tonalidades de colores y sabores a la hora de la fabricación de sirope a partir de savia de abedul (Kallio y Ahtonen, 1987).

Por otro lado, existen estudios que caracterizan el contenido de azúcares de la savia de abedul por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en vez de gases. A partir del paso de la muestra a través de la columna, se realiza un análisis cualitativo midiendo y comparando los tiempos de retención de patrones de soluciones de fructosa, glucosa y sacarosa con respecto a los tiempos resultantes de la muestra de savia de abedul. La estabilidad del sistema se controla utilizando glicerol, y la repetibilidad de la prueba se controla con inyecciones de estándares de fructosa, glucosa y sacarosa (Kościelniak et al., 2003). Se conocen a partir de este método, los azúcares principales (fructosa y glucosa) y cierta cantidad detectable de sacarosa, en las especies de interés de *Betula pendula* y *Betula pubescens* (Tabla 1).

Tabla 1.- Contenido de azúcar (% peso) en las muestras de savia, representado por la media \pm desviación estándar. (Luczaj et al., 2014).

	Glucosa (%)	Fructosa (%)	Sacarosa (%)	Total de azúcar (%)
<i>Acer campestre</i>	0,0056 \pm 0,0027	0,0040 \pm 0,0020	2,74 \pm 0,68	2,76 \pm 0,73
<i>Acer negundo</i>	0,0045 \pm 0,0021	0,0051 \pm 0,0022	2,89 \pm 0,76	2,90 \pm 0,76
<i>Acer platanoides</i>	0,002 \pm 0,001	0,004 \pm 0,003	3,23 \pm 0,36	3,24 \pm 0,36
<i>Acer pseudoplatanus</i>	0,003 \pm 0,005	0,002 \pm 0,001	3,17 \pm 0,50	3,18 \pm 0,53
<i>Acer saccharinum</i>	0,002 \pm 0,001	0,001 \pm 0,001	4,01 \pm 0,24	4,01 \pm 0,26
<i>Betula pendula</i>	0,93 \pm 0,39	1,21 \pm 0,49	0,32 \pm 0,24	2,46 \pm 1,03
<i>Betula pubescens</i>	0,96 \pm 0,29	1,35 \pm 0,33	0,31 \pm 0,14	2,62 \pm 0,76
<i>Carpinus betulus</i>	0,49 \pm 0,25	0,38 \pm 0,22	0,02 \pm 0,02	0,87 \pm 0,47

No obstante, la cuantificación total de hidratos de carbono se puede realizar a partir de la técnica de Dubois, que consiste en realizar a la muestra problema una deshidrogenación seguida de una catálisis ácida empleando reactivos como fenol y ácido sulfúrico para así formar compuestos heterocíclicos coloridos derivados del furano que se cuantifican por espectrofotometría UV. Para el tratamiento de la muestra se realiza una solución madre de glucosa de la que se realiza una curva de calibrado y a partir de la

ecuación de la recta y las absorbancias obtenidas de las muestras sometidas a la espectrofotometría, se hayan las concentraciones de hidratos de carbono totales de la savia de abedul (Dubois et al., 1956).

2.1.2. Ácidos orgánicos

En el caso de los ácidos orgánicos, son compuestos oxigenados derivados de los hidrocarburos que se forman al sustituir en un carbono primario, dos hidrógenos por un oxígeno que se une al carbono mediante un doble enlace, y por último, el tercer hidrógeno se une por medio de un enlace simple a un grupo (OH) que se encuentran en un extremo de la cadena y se le denomina grupo carboxilo (Mortimer, 1989).

En el caso de la savia de abedul, estos compuestos pueden ser analizados por medio de la técnica GLC capilar o electroforesis capilar. Esta técnica consiste en la separación de los compuestos mediante la diferencia de velocidad de los compuestos iónicos bajo un campo eléctrico aportado dentro de un capilar de diámetro reducido. Por lo tanto, la velocidad a la que migran los compuestos es proporcional al campo eléctrico aplicado y a la carga del ión, e inversamente proporcional a la fuerza de rozamiento que se opone a su movimiento (Casado, 2014).

Gracias a esta técnica, se averiguan las variaciones estacionales que sufren los ácidos orgánicos. Los ácidos con mayor proporción encontrados en la savia de abedul son: ácido málico (0,1-0,7 g/L), fosfórico (<0,04 g/L), succínico (<0,1 g/L), cítrico (<0,1 g/L) y fumárico (trazas), aportando cierta acidez a este producto (Kallio y Ahtonen, 1987). A su vez, tal y como los azúcares, se comprueba que la concentración de estos ácidos, sobre todo el ácido málico, varía en función de la temperatura, formándose mayor concentración de ácidos con las altas temperaturas (Schroeder, 1895). En el caso del ácido fosfórico, se observa que presentaba una tendencia de desarrollo análoga al málico durante la primavera, es decir, aumenta durante sus inicios y va decreciendo su concentración a medida que transcurrían los meses. Sin embargo, la concentración de ácidos succínico y cítrico presentaba cierta uniformidad durante los meses de primavera. Por consiguiente, toda esta información, apoya la idea de la recogida durante los meses de primavera, a ser posible marzo y abril, ya que, a mayor contenido de ácidos, mayor proporción de actividad antioxidante de la savia.

A diferencia de estos autores, en este trabajo se cuantifican cualitativamente este tipo de biopolímeros a partir de cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC, la cual ha sido empleada por multitud de investigadores para determinar el contenido tanto de azúcares como de ácidos orgánicos (Medlicott y Thompson, 1985). Además, tal y como se ha comentado, presentan una gran importancia desde un punto de vista nutricional, y dentro de la estabilidad del producto terminado, debido a ello se necesita esta técnica analítica ampliamente utilizada para separar, detectar y cuantificar de una manera sensible y selectiva este tipo de biopolímeros, sin ser una herramienta destructiva (Gratzfeld-Hüsgen y Schuster, 2001).

2.1.3. Proteínas

En cuanto a las proteínas, se ha comprobado que su cantidad aumenta durante la temporada de extracción (Jiang y Col, 2001). Para poder separar los distintos tipos de proteínas e identificarlas, se pueden realizar varias metodologías: SDS-PAGE, electroforesis 2D o mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (HPLC-MS). Con este último método, se ha determinado que la savia de abedul muestra un perfil de proteínas variables, siendo las más predominantes dos proteínas con tamaños de aproximadamente 25 y 30 kDa.

Con respecto al contenido de aminoácidos en la savia, presenta alto contenido en glutamina libre y asparagina. Estos grupos amino, formarán parte de la posición central de los ácidos previamente comentados, contenidos en la savia primaveral de las diversas especies (Reuter y Wolfgang, 1954). Para el aislamiento y estudio de los aminoácidos, Ahtonen y Kallio (1989), utilizaron la misma metodología que para la determinación de azúcares, es decir, cromatografía de gases, derivatizando los aminoácidos con PFFA (pentafluoropropionicanhídrido), el cual se evapora después de una hora dejándolo a temperatura ambiente, pero consiguiendo un marcaje en cada aminoácido.

Ahora bien, la cuantificación total de estos biopolímeros se puede realizar a partir de la técnica de Lowry, una técnica sensible, capaz de detectar cantidades del orden de 10 microgramos de proteína. La reacción que tiene lugar se desarrolla en distintas fases: reacción previa de la proteína en medio alcalino con iones Cu^{+2} , en presencia de tartrato para evitar la precipitación y reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteau que se reduce por medio de los grupos fenol presentes en las proteínas dando lugar a un complejo

coloreado capaz de ser medido por espectrofotometría UV. Tras ello, se pueden cuantificar todo el contenido proteico que puede presentar la savia de abedul, y a continuación, identificar el tipo de proteína que es a partir de una electroforesis SDS-PAGE.

2.2.- Pretratamientos para aumentar la vida útil de la savia de abedul

La savia de abedul contiene como principales azúcares a la glucosa y la fructosa, junto con una cierta cantidad de proteínas y aminoácidos libres, lo que hace que sea un producto fermentable con el cual preparar bebidas alcohólicas como la cerveza o el vino. Sin embargo, esa riqueza de nutrientes es la principal causa que conlleva una gran reducción de la vida útil debido a que los medios con alto contenido de macro y micronutrientes conlleva a ser un medio perfecto para muchos microorganismos como diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. o levaduras (Nikolajeva y Zommere, 2018). Por esta razón, a partir de la savia existe una alta gama de productos embotellados a los que se les añade ácidos como ácido cítrico, láctico o málico o edulcorantes como la miel (Bilek et al., 2016) para que se prolongue la vida útil de estos alimentos. Sin embargo, este tipo de conservantes puede variar el sabor de la savia notablemente, por tanto, la única solución vigente actualmente es almacenar en estado congelado la savia bruta para evitar la excesiva colonización y reproducción de estos microorganismos.

Una manera de dificultar la proliferación de microorganismos en este tipo de productos y a la vez abaratar el coste de almacenamiento es mediante la reducción del volumen de savia por ósmosis inversa (OI), aumentando la concentración de azúcar (60-70%), la cual actuaría como autoconservante (Kaillo et al., 1985). Es ésta última la más innovadora, económica y fácil de realizar: se debe concentrar la savia de abedul al 60% utilizando una destilación por membrana de contacto directo a baja temperatura combinándolo con una microfiltración, y de esta manera, se evita la formación de un jarabe de savia de abedul color marrón oscuro debido a la concentración de savia por calentamiento con elevada temperatura, indeseable como aditivo para ciertos productos. De esta forma varios estudios han propuesto distintos procedimientos como la ósmosis inversa y destilación por contacto directo de membranas, microfiltración, ultrafiltración, radiación ultravioleta y radiación ultrasonido (Bilek et al., 2018), como método de

alargamiento de la vida útil de la savia de abedul y sin variar sus propiedades organolépticas.

▫ Ósmosis inversa y destilación por contacto directo de membranas (DCMD):

Una de las técnicas para aumentar la vida útil de la savia comienza con su destilación, es decir, con una microfiltración de la savia de abedul, empleándose catorce membranas de polipropileno y una apertura de poro nominal de 0,15 μm , y así disminuir la concentración de microorganismos presentes. Posteriormente, el permeado de la filtración es concentrado por ósmosis inversa y es llevado a su sometimiento a una destilación por membrana de acceso directo (Bilek et al., 2018).

El resultado de la destilación es favorable, reduciendo la actividad microbiana y junto con la ósmosis inversa y DCMD se aumenta notoriamente el contenido de materia seca.

Por otra parte, estudios recientes han averiguado que la posibilidad más económica para conseguir el concentrado y permeado de savia abedul fácilmente por ósmosis inversa (Wawer y Bilek, 2017). Gracias a esta solución, se conserva la composición saludable de la savia de abedul. A su vez, se consigue un producto claramente más dulce, puesto que aumenta la concentración de azúcares y una mejora en la conservación de las propiedades organolépticas de la savia original. En la Tabla 2, se resumen los parámetros físicos y químicos de la savia de abedul, junto con los de los productos obtenidos a partir de ella por ósmosis inversa.

Tabla 2.- Parámetros físicos de la savia de abedul y de los productos del proceso de ósmosis inversa (OI). (Bilek et al., 2018).

Parámetro	Savia de abedul	Concentrado de savia de abedul	Permeado
<i>Valor de Refracción [°Brix] ±SD (n=3)</i>	0,9 ± 0,0	2,6 ± 0	0 ± 0
<i>Conductividad electrolítica [μS/cm] ±SD (n=3)</i>	610 ± 0	1530 ± 0	10 ± 0
<i>pH ±SD (n=3)</i>	6,8 ± 0	6,4 ± 0	5,6 ± 0
<i>Materia seca [%]±SD (n=3)</i>	0,849 ± 0,012	2,557 ± 0,071	0,016 ± 0,002

Por otro lado, el contenido de minerales se considera la característica nutricional más importante de la savia de abedul. Las concentraciones de cobre, zinc y manganeso son elevadas desde el punto de vista nutricional. Sin embargo, el contenido de otros minerales importantes, como el calcio o el magnesio, es bajo. Las concentraciones de minerales en la savia del árbol y en los productos obtenidos a partir de ósmosis inversa se representan en la Tabla 3.

Tabla 3.- Contenido de minerales en la savia del abedul y en los productos del proceso de ósmosis inversa. (Bilek et al., 2018).

Mineral	Savia de abedul	Concentrado de savia de abedul	Permeado
Sodio [$mg\ dm^{-3}$] \pm SD (n=9)	$0,73 \pm 0,001$	$18,8 \pm 1,7$	$0,381 \pm 0,004$
Potasio [$mg\ dm^{-3}$] \pm SD (n=9)	$90,7 \pm 1,6$	$302,6 \pm 6,2$	$4,04 \pm 0,1$
Cobre [$mg\ dm^{-3}$] \pm SD (n=9)	$11,76 \pm 0,55$	$199,3 \pm 1,3$	<LOQ
Zinc [$mg\ dm^{-3}$] \pm SD (n=9)	$1,2 \pm 0,034$	$4,71 \pm 0,091$	$0,02 \pm 0,002$
Calcio [$mg\ dm^{-3}$] \pm SD (n=7)	$30,8 \pm 2,1$	$129,42 \pm 0,028$	$0,39 \pm 0,015$
Magnesio [$mg\ dm^{-3}$] \pm SD (n=9)	$23,88 \pm 0,21$	$49,1 \pm 0,58$	$0,222 \pm 0,005$
Manganeso [$mg\ dm^{-3}$] \pm SD (n=9)	$1,043 \pm 0,017$	$4,489 \pm 0,062$	$0,016 \pm 0,001$
Hierro [$\mu g\ dm^{-3}$] \pm SD (n=7)	$15,46 \pm 0,89$	271 ± 23	<LOQ

▫ Microfiltración:

Adicionalmente, estudios realizados en el Departamento de Agroecología en el Instituto de Ciencias Agrícolas, Protección y Gestión Ambiental de la Universidad de Rzeszów (Bilek et al., 2020), propusieron la técnica de microfiltración como el método más eficaz para extender la vida útil del concentrado de la savia obtenido previamente por ósmosis inversa sin necesidad de otros tipos de métodos como DCMD. En este caso, para la microfiltración se emplean filtros de 3 diámetros de poro diferentes: 0,22, 0,45 y 0,8 μm . Los resultados del concentrado de la savia de abedul tras el paso de los distintos filtros fueron: en el caso del concentrado resultante del paso de la savia por filtros de 0,22 y 0,45 μm , una misma densidad óptica desde el inicio, por lo que las muestras son estables tras la filtración, sin embargo, con el diámetro de poro de 0,8 μm , se observan variaciones de densidad óptica $0,71 \pm 0,03$ a $1,78 \pm 0,01$ MFU.

De esta forma, se concluye que tras la microfiltración se consigue una mayor vida útil de la savia de abedul, sin la necesidad de introducir conservantes químicos o procesos como la pasteurización.

▫ Ultrafiltración:

Por otra parte, otros trabajos emplean la ultrafiltración con una membrana de un tamaño de poro de no más de 0,03 μm , en vez de la microfiltración para obtener filtrados de la muestra de la savia de abedul y mejorar la capacidad de almacenamiento y alargar su vida útil (Jeong et al., 2013). Tras la ultrafiltración, el contenido de “ceniza bruta” en el concentrado (cantidad de minerales presentes en el producto) varía siendo un valor de 22,5% mg (Tabla 4). Se muestra una disminución significativa en minerales como el potasio, hierro, sodio o cobre. En el caso de los azúcares, como la fructosa y la glucosa, disminuye su contenido, al igual que los ácidos orgánicos, como el ácido cítrico o málico, reduciéndose el pH de la muestra. De esta manera, se comprueba que la ultrafiltración induce a una disminución de ciertos minerales y ácidos orgánicos, disminuyendo además el pH de las muestras por lo que, de esta manera, se reduce la concentración de microorganismos y se aumenta la vida útil del producto.

Tabla 4.- Variaciones en las propiedades fisicoquímicas en la savia de abedul tratada con ultrafiltración (UF). (Jeong et al., 2013).

		Control	UF
<i>Cenizas (mg %)</i>		23,67 \pm 0,29 ^{NS1}	22,50 \pm 1,32
<i>Mineral (mg/L)</i>	Cu	0,82 \pm 0,10 ^{a2}	0,72 \pm 0,09 ^{ab}
	Fe	0,61 \pm 0,09 ^{NS}	0,54 \pm 0,03
	Mn	2,36 \pm 0,02 ^a	2,22 \pm 0,05 ^b
	Zn	3,82 \pm 0,47 ^a	2,89 \pm 0,23 ^b
	Mg	11,90 \pm 0,15 ^a	11,57 \pm 0,12 ^{ab}
	Ca	25,82 \pm 0,12 ^a	24,82 \pm 0,21 ^b
	Al	2,73 \pm 0,34 ^a	2,46 \pm 0,22 ^{ab}
	K	30,10 \pm 4,81 ^a	18,91 \pm 1,05 ^b
	Na	7,51 \pm 0,36 ^a	6,77 \pm 1,57 ^{ab}
	<i>Azúcar libre (%)</i>	Fructosa	0,33 \pm 0,004 ^a
Glucosa		0,25 \pm 0,004 ^{NS}	0,23 \pm 0,007
<i>Ácido orgánico (mg/mL)</i>	Ácido cítrico	0,04 \pm 0,001 ^a	0,03 \pm 0,001 ^c
	Ácido málico	0,17 \pm 0,009 ^a	0,12 \pm 0,000 ^b
<i>pH</i>		5,11 \pm 0,02 ^a	5,10 \pm 0,01 ^a

▫ Radiación ultravioleta:

Para comprobar la eficacia de esta técnica, se lleva a cabo mediante el uso de esterilizadores tales como un esterilizador V9, al que se le introduce la muestra problema, en este caso, la savia de abedul. Una vez incorporada, se realizan tratamientos con radiación ultravioleta y a distintas condiciones como son cambios bruscos de temperatura o a diferentes tiempos. Tras el tratamiento con radiación ultravioleta, se observa un aumento significativo en la densidad óptica de la savia. Por tanto, se ha visto que la radiación ultravioleta no aumenta la vida útil con respecto a aquellas muestras a las que no se le ha sometido este tipo de tratamiento. Durante las condiciones de refrigeración, se observa tan sólo un cambio en el enturbiamiento de la savia, disminuyendo éste (Bilek et al., 2018).

▫ Ultrasonidos:

Para la realización de esta metodología, se suelen emplear cubetas esterilizadas de un densitómetro óptico y una fuente de ultrasonido, como puede ser Sonic 0,5 (PolSonic), en condiciones de temperatura ambiente y en refrigeración (4 °C). Tras varios días aplicando la fuente de ultrasonidos, se observa que, al aplicar el cuádruple de intensidad de ultrasonidos, se logra prolongar la vida útil a temperatura ambiente y en condiciones de refrigeración, extendiéndola a cinco días más o siete días (Bilek et al., 2018)

▫ Tratamiento térmico:

En el caso de las variaciones de los valores de temperaturas se emplea activamente para inactivar o destruir los microorganismos, utilizándose como uno de los principales métodos para la esterilización de líquidos en la industria alimentaria. De esta forma se pueden clasificar estos métodos físicos de destrucción de microorganismos en calor húmedo o calor seco (Teixeira, 2015).

En primer lugar, la esterilización por calor se basa en que todos los microorganismos son susceptibles en mayor o menor medida a la acción calorífica. El mecanismo de éste como agente esterilizante implica la desnaturalización proteica, fusión y desorganización de membranas y/o la aparición de procesos oxidativos irreversibles.

Sin embargo, las variables principales de un proceso de esterilización por calor son la temperatura y el tiempo de exposición, y por consiguiente la determinación del tiempo y la temperatura a la que se somete al producto en un proceso de esterilización térmica es condicionado por la cinética de inactivación térmica o resistencia al calor del microorganismo en cuestión, así como su sensibilidad al oxígeno o el pH (Teixeira, 2015). Siguiendo estos criterios, los microorganismos se pueden clasificar en dos grandes grupos sobre la base de su resistencia al calor: células vegetativas, cuya resistencia se basa en que a una exposición a 80 °C dura 1 minuto antes de su destrucción; y las bacterias esporuladas, capaces de sobrevivir a temperaturas de 100 °C durante tiempos más largos.

Con respecto a los dos tipos de calor empleados, en primer lugar, se encuentra el calor húmedo, al que se le denomina vapor saturado a presión, causando la muerte del microorganismo debido a que se desnaturaliza las proteínas celulares. La forma más sencilla de aplicar este tipo de esterilización es con un autoclave en el que se pone en juego dos tipos de vapor: vapor saturado, el cual está en contacto con el agua que lo generó, y el vapor sobrecalentado, que no está en contacto con el agua por tanto es inapropiado utilizarlo en autoclaves. En segundo lugar, existe la esterilización por calor seco, donde el agente esterilizante es el aire caliente seco, con una menor capacidad de tomar, transportar y ceder el calor que el vapor saturado. Para el empleo de este tipo de esterilización se utilizan estufas con control termostático y una correcta circulación de aire para evitar la estratificación de aire caliente, por ello, de esta manera se destruyen a los microorganismos por un proceso de oxidación en vez de desnaturalización (Ball y Olson, 1957).

En definitiva, gracias a la ósmosis inversa se conoce la composición de la fracción concentrada y permeada de la savia de abedul, sin embargo, como método de alargamiento de vida útil del producto obtenido por ósmosis inversa, se recomienda el uso de procedimientos como la micro o ultrafiltración, sin necesidad de utilizar procesos como la pasteurización o conservantes químicos. Por otra parte, se sabe que procesos como la aplicación de ultrasonidos alarga la vida útil de la savia de abedul, mientras que el aporte de radiación ultravioleta no aumenta la vida, pero sí que disminuye el enturbiamiento de las muestras de savia a una temperatura de 4 °C. Finalmente, los procesos de esterilización por calor son una gran alternativa para la destrucción de

microorganismos presentes en alimentos, además de ser una forma accesible y relativamente sencilla para las industrias.

2.3.- Aprovechamiento de la savia de abedul como producto alimenticio

Se conoce que la savia es un medio de crecimiento ideal para microorganismos porque tal y como se ha comentado en el anterior apartado, presenta la cantidad suficiente de compuestos orgánicos y minerales. Por esta razón, la savia de abedul fresca sin haberla sometido a ningún procedimiento especial se puede almacenar durante tan solo 2 meses, ya que a partir de este momento puede ser colonizado por levaduras y hongos filamentosos principalmente (Nikolajeva y Zommere, 2018).

Para poder mejorar su vida útil es necesario un procesamiento el cual siempre será a alta temperatura, independientemente del carácter tecnológico que tenga. Como resultado, las características organolépticas y composicionales de la savia cambian. No obstante, a partir de las nuevas investigaciones indicadoras de ciertos beneficios para la salud humana por parte de la savia de abedul, se han desarrollado, por ejemplo, bebidas sin pasteurizar ni perezcedera, es decir, sin ninguna aplicación de altas temperaturas. Sin embargo, se han desarrollado diferentes adiciones de ciertos endulzantes como la miel o saborizantes como el ácido cítrico, con el fin de mejorar el sabor y prolongar la vida útil del producto realizado a partir de la savia.

Otro método de alargamiento de vida útil es la introducción de ácidos láctico y málico (Łysoniewska et al., 2011), junto con un conservante químico como puede ser el sorbato de potasio, que otorgan la capacidad de prolongar la vida útil de la bebida durante al menos un mes, independientemente de si está en condiciones de refrigeración o no (al contrario de la otra situación, donde el producto siempre se mantendría en frío). No obstante, en este último caso, es necesario introducir algún endulzante para contrarrestar el sabor otorgado por los ácidos. Sin embargo, la conclusión obtenida es que la adición de ácido láctico es la solución idónea, debido a que a nivel nutricional y reglamentario, es un aditivo muy común en la fabricación de bebidas carbonatadas u otros productos líquidos alimenticios, donde el ácido láctico, realza no solo alargar la vida útil del producto, sino que realza el sabor, favorece la absorción de minerales, como el hierro, la acción de antioxidantes y tiene efecto bactericida (Górska y Pietkiewicz, 2009).

Para poder determinar el número de microorganismos cultivables en muestras de savia almacenadas a temperaturas entre 4 y 20 °C y poder conocer aquellos microorganismos que pueden aparecer en la savia, se siembran cada muestra en 5 medios de cultivo distintos: medio universal para bacterias aerobias; extracto de malta para levaduras y hongos filamentosos; Agar MRS para bacterias ácido-lácticas; medio con *Acetobacter* spp. para bacterias de ácido acético y Agar Endo para coliformes. Realizando cada prueba por duplicado e incubándolas a la temperatura idónea, se pueden contabilizar las unidades formadoras de colonias (UFC). A partir de estos cultivos se observaron distintos grupos de microorganismos (Tabla 5), en la cual solamente la bacteria *Burkholderia cepacia* es predominante antes y tras el almacenamiento.

Tabla 5.- Recuento de las especies predominantes en la savia de abedul después del almacenamiento y tras 38 días de éste. (Nikolajeva y Zommere, 2018).

Grupo	Clase	Nombre	Después de la congelación	Después del almacenamiento
Levaduras	Tremellomycetes	<i>Cryptococcus laurentii</i>	×	
		<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	×	
	Urediniomycetes	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	×	
Bacterias Gram positivas	Actinobacteria	<i>Micrococcus luteus</i>		×
	Bacilli	<i>Bacillus cereus</i>		×
		<i>Brevibacillus brevis</i>		×
		<i>Paenibacillus macerans</i>		×
Bacterias Gram Negativas	Alphaproteobacteria	<i>Brevundimonas vesicularis</i>		×
		<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	×	
	Betaproteobacteria	<i>Burkholderia cepacia</i>	×	×
	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas hydrophila</i>	×	
		<i>Kluyvera ascorbata</i>		×
		<i>Kluyvera cryocrescens</i>		×
		<i>Pantoea agglomerans</i>		×
		<i>Pseudomonas luteola</i>		×
	Flavobacteria	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	×	
	Sphingobacteria	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	×	

Además, se observa que no existen hongos filamentosos, pero sí 3 especies de levaduras como *Cryptococcus laurentii* o *Rhodotorula mucilaginosa* y 14 especies de bacterias (Tabla 5). Éstas pertenecen a Alfa, Beta y Gamma-proteobacterias, Actinobacterias, Flavobacterias y Esfingobacterias, siendo representantes de estos grupos *Bacillus cereus*, *Brevibacillus brevis* y *Paenibacillus macerans*. En el caso de las

levaduras, son especies que aportan tonalidades rosáceas y amarillas, las cuales no son patógenas, pero sí pueden variar el color de la savia. Todos estos microorganismos aportan la posibilidad de llevar a cabo ciertos productos donde se lleve a cabo una fermentación de la savia por parte de alguno de estos microorganismos o, aunque sea evitar, tras saber su existencia, el crecimiento de todos ellos porque puede perjudicar a la salud del consumidor o simplemente a las propiedades organolépticas del producto.

Toda esta información ha incentivado el uso de la savia de abedul como alimento, especialmente como bebida, incluyendo productos fermentados, jarabes o para reemplazar el agua. La bebida de savia se enlata, se acidifica normalmente con ácido cítrico, se pasteuriza y se comercializa (Tomchuk et al., 1973), aunque se puede alargar su vida útil con los procedimientos anteriormente comentados. Algunos de los productos realizados a partir de la savia de abedul son:

- Jarabe de abedul:

Es la unidad procesada de la savia natural sin aditivos ni conservantes. Para la producción de ésta, se debe realizar una eliminación de agua con ósmosis inversa y concentración de la savia a presión reducida y un tratamiento térmico optimizado. La savia obtenida se concentra por ósmosis inversa y el resultado concentrado es congelado a -20 °C y descongelado para fabricar el almíbar con un evaporador discontinuo rotatorio, consiguiendo así, la materia seca del almíbar. Este producto presentará un color, sabor y materia seca aceptable (Kallio et al., 1989).

Los azúcares más abundantes son la glucosa y la fructosa, los cuales aportan una menor viscosidad en el producto lo que lo hace más llamativo para el paladar, sin embargo, si en su contenido existiera mayor cantidad de sacarosa, la savia sería más viscosa y menor atractiva para el cliente. Además, presenta un aroma ligeramente a madera óptimo, pero solamente cuando se realiza un proceso de evaporación correcto con un flujo de calor óptimo.

No obstante, estudios indican que la alta molaridad de los grupos amino libres en la savia afecta a las cualidades del almíbar. Junto con los azúcares reductores, aceleran la formación de sabor y color a base, a base de la reacción de Maillard. Esto complica el

acabado del jarabe de abedul, aún así, existe una gran cantidad de azúcares y aminoácidos que hacen que el sirope de abedul sea un gran alimento en contenido de aminoácidos.

Por otra parte, se conoce que, para conseguir el sirope o jarabe, se necesita concentrar la savia de abedul con el método de ósmosis inversa, eliminando alrededor del 70% de agua de este líquido y concentrando en un 5% el contenido de azúcares. Debido a su alto contenido en fructosa, se debe destilar a bajas temperaturas y así evitar que el sirope se queme, y finalmente se utiliza como cultivo iniciador para la elaboración de la cerveza (Helfferich, 2021).

▫ Cerveza:

En este caso, países como Estados Unidos, Canadá o del norte de Europa elaboran bebida fermentada como la cerveza a partir de savia de abedul a partir de los azúcares del sirope de abedul produciendo una cerveza seca, sin tener un sabor dulce. Para realizarla, se necesita el jarabe de savia de abedul, junto con malta y lúpulo, a partir del cual se hierve durante cinco minutos y se deja enfriar, y finalmente se añade levadura, normalmente del género de *Saccharomyces* spp, aunque algunas veces no es necesario.

Por otra parte, la elaboración de esta bebida fermentada se realiza ya que, sin ningún procesamiento adicional, el tiempo de almacenamiento de la savia de abedul es relativamente corto, por lo que lo hace un proceso habitual y sencillo. La fermentación más común para la savia de abedul es como se ha comentado la propia de la cerveza, es decir, es fermentada por las bacterias y levaduras que están presentes de forma natural en la savia de abedul, sin necesidad de añadir ningún componente. Por ello, la microflora de la savia fermentada es específica del entorno de recogida y cambiará de un lote a otro, aunque al ser propia de este producto, no se conocerá específicamente qué especies de microorganismos llevarán a cabo la fermentación por lo que puede dar un producto tanto de alta como de baja calidad.

▫ Bebida probiótica:

En este caso, la composición de este tipo de producto es similar a la del material de partida, sin embargo, los azúcares se convierten en ácidos orgánicos, principalmente en ácido láctico, y en otros metabolitos. Si las bacterias de ácido láctico son dominantes

en el proceso de fermentación, el ácido láctico es el principal producto y se obtienen bebidas con un perfil de sabor agrio. Además del ácido láctico, presentará otros ácidos orgánicos e inorgánicos, incluido el ácido málico, ácido cítrico, ácido succínico y ácido fosfórico. Por otra parte, presenta como aminoácidos dominantes: la glutamina, citrulina, ácido glutámico, isoleucina, valina y asparagina. Por esta razón, los productores que buscan una calidad elevada y continua utilizan cultivos iniciadores: microorganismos específicos seleccionados de la naturaleza, en concreto, bacterias lácticas, como *Limosilactobacillus reuteri*, una especie simbiótica de *Lactobacillus* spp., que habita en el tracto gastrointestinal de vertebrados y mamíferos (Casas y Dobrogosz, 2000). Este proceso le proporcionará a la savia de abedul fermentada el título de bebida probiótica no láctea, ya que esta bacteria produce efectos beneficiosos entre los que están: protección a bacterias, virus u hongos, y sobre todo, prevención de la mala digestión de la lactosa por ausencia parcial o total de la enzima lactasa (intolerancia a la lactosa).

Para la realización del mantenimiento y crecimiento de *L. reuteri* en la bebida probiótica de savia de abedul, se necesita un medio MRS junto con: 10 g/L de peptona, 8 g/L de extracto de carne, 5,0 g de acetato de sodio, 4,0 g/L de extracto de levadura, 2,0 g/L citrato de amonio, 2 g/L KH_2PO_4 , 1,0 g/L Tween- 80, 0,1 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,05 g/L $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ y 20 g/L de glucosa (pH 6,0) (De Man et al., 1960). Se recoge la savia de abedul, se pasteuriza a 60 ° C durante 20 min. La savia suele contener 0,03% de ceniza, 3,32 g/L de glucosa, 4,67 g/L de fructosa y 0,13 g/L de sacarosa. La fermentación es realizada en matraces de 250 mL a 37 °C durante 48 horas. La savia de abedul se complementa con sacarosa, glucosa y fructosa. En cuanto a las medidas analíticas, se realiza un control del crecimiento de las cepas de la bacteria por medición espectrofotométrica a 550 nm. La acidez se determina utilizando fenolftaleína como indicador y los ácidos, azúcares y etanol mediante HPLC. Como resultado se obtuvieron que todas las cepas de *L. reuteri* crecieron en savia de abedul, consumiendo gran parte de glucosa y produciendo ácido láctico, ácido acético y etanol. A su vez, se demuestra que se debe complementar enormemente con grandes cantidades sacarosa, puesto que es la fuente de carbono más idónea para la bacteria, y de esta manera aumenta su crecimiento y fabricación de ácido acético.

Por otro lado, el contenido de metales pesados es el factor determinante de la seguridad sanitaria del consumo de la bebida probiótica de savia de abedul, pero no supera el nivel máximo permitido por la legislación de la Unión Europea para la categoría de

alimentos. Sin embargo, es preciso destacar el contenido relativamente alto de níquel en la bebida de savia de abedul analizada, debido a que no existe un nivel máximo establecido en la legislación alimentaria europea. Afortunadamente, el contenido de este metal pesado no aumenta en el concentrado de savia de abedul que presenta esta bebida en comparación con la savia natural (Bilek et al., 2017). Es por ello, por lo que esta bebida refrescante, con una composición natural, podría ser un producto interesante para los consumidores que valoran los alimentos no procesados con un alto valor nutricional, debido a su alto porcentaje de minerales. Por tanto, el producto así descrito tiene muchas posibilidades de triunfar en la categoría de los superalimentos o alimentos BIO procedentes de zonas ecológicamente limpias. Esto no sólo aumentaría el prestigio del producto, sino también la seguridad sanitaria de los consumidores especialmente importante en el caso de la savia del abedul, susceptible de sufrir el impacto de la contaminación agrícola e industrial (Bilek et al., 2016).

2.4.- *Fabricación de films o biopelículas biodegradables*

En este estudio se valora la fabricación de materiales deseados en la industria alimentaria, pero que no son necesariamente alimentos. Se conoce que con la finalidad de reducir los residuos plásticos sólidos sintéticos aportados al vertedero y disminuir la dependencia de los combustibles fósiles, se han empezado a utilizar durante estos últimos años los materiales biodegradables y renovables. En la industria alimentaria, tradicionalmente se han empleado plásticos como el poliestireno (PS), el polietileno (PE), el polipropileno (PP) y el tereftalato de polietileno (PET) para el embalaje de los alimentos (Madera-Santana et al., 2014). Este tipo de materiales conllevan multitud de problemas a la hora de eliminarlos, y por consiguiente, provocan un gran impacto ambiental ya que tienden a acumularse en los ecosistemas. Por este motivo, en estos últimos años, se han descubierto infinidad de alternativas, sobre todo como envases alimenticios, y una de las más destacadas es la película biodegradable o *film*. Estas películas son capas delgadas de materiales biopolímeros que se pueden colocar sobre los componentes de los alimentos como recubrimiento comestible (Atarés y Chiralt, 2016).

Estos materiales biodegradables están asociados al empleo de materias primas renovables, como proteínas o polisacáridos extraídos de fuentes agrícolas, marinas o animales. Debido a su carácter biodegradable, el medio ambiente, junto con la colaboración de cierta cantidad de microorganismos, oxígeno y una humedad óptima,

puede degradar esos materiales a sustancias simples como agua, CO₂ o biomasa. Gracias a estas características, puede ser un recubrimiento perfecto para el envasado de alimentos como frutas, carnes o verduras, donde éste debe de conservar y proteger durante la extracción de la materia prima, su procesamiento, producción, manipulación y almacenamiento (Da Rocha et al., 2018). Estos *films* funcionarán como atmósfera protectora, mejorando la vida útil del alimento ya que le protegerá de la humedad, daño mecánico, microorganismos y gases atmosféricos.

Asimismo, los *films* o polímeros biodegradables presentan macromoléculas repetitivas, cuya disposición determinan las características variables de estas películas. Una de ellas es la degradación o cambio en las propiedades fisicoquímicas del polímero (color, forma...) como resultado de cambios en los factores ambientales, como la luz, el calor, la actividad biológica, las condiciones químicas o la humedad. Estos factores pueden dar lugar a la alteración en la estructura y funcionalidad de los polímeros (Kumar et al., 2011). Además, se conoce que un aumento en el peso molecular de los polímeros da como resultado a una disminución en su biodegradabilidad.

Estas películas biodegradables presentan una clasificación en función de la materia prima utilizada para su elaboración: polímeros formados por un proceso químico que utiliza monómeros renovables como precursores, como el ácido poliláctico, polímeros como los polihidroxialcanoatos sintetizados a partir de microorganismos, y polímeros extraídos directamente de la biomasa vegetal o animal, incluidos los polisacáridos y las proteínas (Khalil et al., 2018):

- Films realizados a partir de polisacáridos: debido a su gran abundancia y baja toxicidad, es uno de los grupos elegidos para la elaboración de estos biopolímeros. Presentan una buena resistencia mecánica, propiedades de barrera del gas, son comestibles y fácilmente degradables. No obstante, son bastante frágiles e hidrofílicos. Los principales polisacáridos empleados son: el almidón, el agar, la celulosa y sus derivados como la pectina, el quitosano, el alginato y la carragenina (Akhtar et al., 2013).
- Films realizados a partir de lípidos: este tipo de biopelículas se usan habitualmente como barreras de permeabilidad de agua, sin embargo, carecen de suficiente

integridad estructural y durabilidad para ser una alternativa correcta. Los materiales hidrofóbicos más utilizados en este grupo son las ceras, ácidos grasos y alcoholes (Debeaufort y Voilley, 2009).

- Films realizados a partir de proteínas: las proteínas son polímeros tensioactivos abundantes en la naturaleza, capaces de elaborar estructuras tridimensionales estables gracias a interacciones no covalentes. Se han elaborado biopelículas a partir de proteínas de especies marinas como la proteína aislada de pescado, proteínas de productos o subproductos agrícolas y a partir de recursos naturales como caseína, soja, zeína de maíz, colágeno o gelatina. Gracias a la diversidad de aminoácidos que las forman, puede haber distintas combinaciones que les otorga unas excelentes propiedades mecánicas, aunque también presentan alta permeabilidad al agua debido a la hidroficidad de algunos aminoácidos. Además, a medida que se degradan proporcionan una fuente de nitrógeno que puede servir como fertilizante natural.

- Films llamados *composites*: los *composites* se elaboran a partir de dos o más constituyentes entre los mencionados anteriormente: proteínas, polisacáridos y/o lípidos. La finalidad de esta elaboración es conseguir un producto con las características mejoradas con respecto a la de los componentes individuales (Khalil et al., 2018).

Para elaborar estos *films* se realizan cuatro métodos denominados: *solvent casting*, técnica que consiste en extender una solución o suspensión filmógena sobre una placa Petri controlando el espesor del *film* por la masa de la suspensión vertida sobre la placa; extrusión, donde se utiliza uno o dos tornillos giratorios dentro de un barril para aumentar de forma progresiva la presión y mezclar los ingredientes del polímero a través de un troquel y fundición de cinta, en la cual se extiende una suspensión formadora del polímero sobre un soporte y unas cintas transportadoras que permite controlar el espesor de la película con una hoja llamada cuchilla rascadora (Khalil et al., 2018); micro y nanoencapsulación, en donde las sustancias activas como antioxidantes o vitaminas, quedan atrapadas en polímeros de carbohidratos, proteínas o lípidos para protegerlos de la oxidación; y por último, el electrohilado, en el que se centrifuga o pulveriza una

solución polimérica mediante el sometimiento a un campo eléctrico para obtener la biopelícula.

Las películas de biopolímero se pueden utilizar como agentes portadores para muchos tipos de aditivos. La incorporación de agentes antimicrobianos en películas de biopolímeros ha sido ampliamente estudiada, al igual que los antioxidantes, agentes antipardeamiento, nutracéuticos, potenciadores de textura, sabor para mejorar las propiedades funcionales y organolépticas de las películas y/o los alimentos envasados (Wihodo y Moraru, 2013). No obstante, las aplicaciones de estos *films* biodegradables dependerán de las características medibles como la permeabilidad al vapor de agua, la permeabilidad del oxígeno, resistencia a la rotura, elasticidad, solubilidad en agua o en lípidos, color, transmitancia y transparencia, propiedades antimicrobianas y poder antioxidante. Estas propiedades permiten el uso de biopelículas biodegradables dentro de la industria de la alimentación para prolongar la vida útil y mejorar la calidad de los productos alimenticios frescos y procesados. Además, mantendrá las condiciones organolépticas como el sabor o color del producto alimenticio, ya que evita la entrada de oxígeno y/o microorganismos y en enranciamiento de las grasas. Sin embargo, se necesita más investigación en el campo de los bioplásticos para superar las películas activas biodegradables desarrolladas deben tener algunas características personalizadas, como la tasa de transmisión de vapor de agua, la propiedad de barrera contra el oxígeno y la permeabilidad al CO₂ en un rango específico para aplicaciones comerciales de envases de alimentos. La tendencia actual indica cada vez más industrias producen comercialmente *films* de embalaje biodegradables (Da Rocha et al., 2018).

En este trabajo en particular, se realizaron *films* a partir de dos proteínas como son la caseína y gelatina, las cuales son proteínas solubles que forman películas flexibles, fuertes e impermeables al oxígeno (Da Rocha et al., 2018). Ambas a su vez, presentan una dependencia sobre las características físicas y químicas, como el peso molecular, ya que condicionarán que se tenga unas correctas propiedades mecánicas o no. El principal inconveniente de en este caso la gelatina, es que puede tender a hincharse o disolverse al entrar en contacto con alimento con gran porcentaje de humedad, además de que las biopelículas fabricadas a partir de ésta suelen volverse frágiles, rígidas y quebradizas (Luo et al., 2022). Por ello, una alternativa es el empleo de otras proteínas como la caseína, el quitosano o la pectina. Sin embargo, para el caso de la caseína, se observa poca resistencia

al agua, por lo que se recomienda la adición de polímeros como el glicerol para mejorar la elasticidad y flexibilidad de las películas (Elzoghby et al., 2011).

En particular, en el caso de la gelatina, es una proteína soluble en agua, insípida e incolora que se produce a partir de la hidrólisis parcial o total del colágeno con bajo costo y alta disponibilidad. Esta proteína se puede clasificar en dos tipos: tipo A, con un punto isoiónico de 6 a 9 que se consigue por extracción ácida, mientras que la tipo B, se consigue por extracción alcalina un punto isoiónico de 5. A su vez, la estructura está basada en una triple hélice de tres cadenas polipeptídicas estabilizadas por hidrógeno y enlaces hidrofóbicos (Figura 1) , que proporciona esa resistencia física y protege, gracias a los aminoácidos, del daño oxidativo ya que absorben fácilmente la radiación ultravioleta. La mayor parte de la gelatina se extrae de la piel de cerdo (46%), piel de bovino (29,4%), huesos de cerdo y ganado (23,1%) y la piel de pescado (1,5%) (Duconseille et al., 2015). Es por ello por lo que la gelatina producida a partir de estos subproductos presenta fuertes propiedades mecánicas y permeabilidad que lo traslada a los *films* elaborados a partir de ella, siendo las características más destacables de estas películas: la fuerza, la flexibilidad y la viscosidad. Asimismo, se conoce que esta proteína puede mezclarse con distintas moléculas como polímeros naturales (glicerol, glucosa, inositol...); enzimas y proteínas y nanomateriales. Todas estas alternativas ayudarán a estabilizar la estructura química de la gelatina a través de reacciones hidrofóbicas.

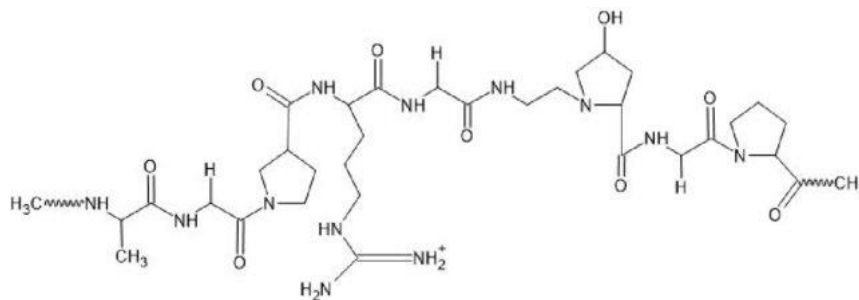


Figura 1.- Estructura básica de la gelatina. (Bernadette y Flórez, 2020).

Por otro lado, se encuentra la caseína, la cual es una de las principales proteínas lácteas que consta de cuatro fracciones: α s1-caseína (38%), α s2-caseína (10%), β -caseína (36%) y kappa-caseína (13%) (Figura 2). Estas proteínas tienen la capacidad de formar películas sin un procesamiento adicional, además de presentar una alta estabilidad térmica, biodegradabilidad, capacidad de emulsificación, por lo que la convierten en una alternativa idónea para la fabricación de *films*. La alta estabilidad térmica se puede atribuir a una estructura secundaria o terciaria relativamente baja debido a la ausencia de puentes

METODOLOGÍA

3.1.- Caracterización de la savia de abedul y su microbiología

3.1.1. Determinación de proteínas

Para conocer la concentración de proteínas presentes en la savia, se realizó el Método Lowry et al. (1951) modificado. Este método se basa en la medición de la absorbancia en presencia y en ausencia de CuSO_4 , para ello se debe realizar la recta de calibrado con BSA y se mide la cantidad de proteínas midiendo su absorbancia una longitud de onda dada.

En primer lugar, se prepararon las siguientes disoluciones:

- BSA a diferentes concentraciones se prepara para la elaboración de la recta de calibrado, que en este caso se realiza de 0 a 500 ppm (mg/L).
- Reactivo A: Na_2CO_3 (40g) al 2% y NaOH (8 g) 0,1 M y se disuelve en un matraz de 2 litros.
- Reactivo B1: $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ al 1% (1 g en 100 mL).
- Reactivo B2: Tartrato sódico potásico al 2% (2,68 g tartrato* H_2O al 1%).
- Reactivo C1: se prepara mezclando A, B1 y B2 en proporción 50:0.5:0.5.
- Reactivo Folin-ciocalteau: se diluye 1:2 y se cubre con papel de aluminio durante todo su uso.

El análisis se lleva a cabo mezclando 1 mL de savia o de la solución de BSA con 5 mL de C1, dejándose reposar la mezcla resultante en oscuridad durante 15 minutos. Tras ese tiempo, se añade 0,3 mL de reactivo Folin-Ciocalteau y se dejan otros 30 minutos a oscuras. Finalmente se mide la absorbancia a 580 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Genesys 150 Thermo Scientific (Thermo, Estados Unidos) (Figura 3).



Figura 3.- Espectrofotómetro empleado para la caracterización de la savia de abedul.

3.1.2. Determinación de hidratos de carbono totales

Para la cuantificación de los carbohidratos se utilizó el método de Dubois et al. (1956) usando una recta de calibrado de 0 a 100 ppm de D-glucosa como patrón y una disolución de fenol al 5%.

En cuanto al tratamiento de las muestras, a 1mL de muestra de savia, en este caso diluida 1:40 y 1:50, se añadieron 0,5 mL de fenol, e inmediatamente después 2,5 mL de H₂SO₄ (96%) y se agitó con el agitador Vortex. Se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 492 nm.

3.1.3. Determinación de azúcares reductores

En esta ocasión, se realizó por el método del ácido 3,5-ditrosalicílico (DNS). Para ello, en primer lugar, se preparó el reactivo DNS con 0,8 g de NaOH, 15 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y 0,5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Tras ello, se mezcló 0,5 mL de este reactivo con las muestras que en este caso eran 0,5 mL de savia diluida 1:10 y savia sin diluir, junto con la preparación de la recta de calibrado de 0 a 1000 ppm, yendo de 200 en 200 ppm a partir de una dilución de glucosa cuya concentración fue de

1 g/L. Posteriormente, se calentó en un baño de agua a 95 °C durante 5 minutos e inmediatamente después, se introdujeron en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se añadieron 5 mL de agua destilada a cada tubo, se agitaron con el agitador Vortex y se analizó en el espectrofotómetro la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

3.1.4. Determinación de ácidos orgánicos y azúcares

Estos compuestos se analizaron a partir de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), siguiendo la técnica descrita por Díaz et al. (2017). Para ello, se empleó un cromatógrafo Agilent 1200 (Agilent Technologies) (Figura 4). Este cromatógrafo fue equipado con una columna de afinidad (ICSep ICE-ION-300) asociada a un detector de índice de refracción (RID), lo cual se seleccionó mediante el programa *Online* del equipo. La fase móvil empleada fue H₂SO₄ (0,450 mM y pH 3,1) a un caudal de 0,3 mL/minuto con la temperatura de la columna fijada a 75 °C (Alonso et al., 2014). Todos los compuestos se determinaron empleando como referencia estándares analíticos externos preparados a partir de los ácidos patrones a una concentración de 2000 ppm diluyendo el volumen de solución stock adecuado con agua MilliQ hasta un volumen de 50 o 25 mL. Una vez preparados todos estos patrones, se filtraron con un filtro PVDF de 0,45 µm para introducirlos en los viales de HPLC de 2 mL por duplicado. Finalmente, la adquisición y el análisis de datos se realizaron con el software ChemStation (Agilent Technologies). Por último, tras pinchar todos los viales, patrones y las muestras problema, se limpió el equipo dejando que pasara la fase móvil por la columna durante horas, se paró el equipo y se quitó la columna, la cual se tapó por los extremos con unos tapones y parafilm.



Figura 4.- Equipo HPLC Agilent 1200 utilizado en la determinación de ácidos orgánicos.

Para poder conocer si los resultados obtenidos en el cromatograma de la savia de abedul eran proporcionales a la presencia de algunos ácidos orgánicos propios de la savia de abedul como ácido málico, cítrico, succínico, fosfórico, oxálico, acético y láctico, se llevaron a cabo diluciones de dichos ácidos a una concentración de 2000 ppm, para poder asegurar la presencia de resultados en el cromatograma.

3.1.5. Determinación de fenoles

En primer lugar, se preparó el reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:50. A continuación, se mezclaron 1 mL de la dilución del reactivo con 0,2 mL de muestra a analizar. Posteriormente, se añadieron 0,8 mL de carbonato sódico o Na_2CO_3 (75mg/mL) a las muestras y se calentaron en un baño a 50 °C durante 30 minutos. Al mismo tiempo, se realizó la recta de calibrado a partir de ácido gálico, en el rango de 0 a 200 ppm, realizando: 0-10-20-40-60-80-100-200 ppm. Pasados estos minutos, se realizó la medición de la absorbancia a 750 nm utilizando el espectrofotómetro.

3.1.6. Determinación de capacidad antioxidante

Se realizó el método DPPH y el método ABTS. En el caso de DPPH, se prepara el reactivo DPPH disolviendo 0,016 g de DPPH en 40 mL de etanol. Posteriormente, se prepararon 4 mL de etanol, junto con 0,6 mL DPPH y 0,6 mL de muestra problema, es decir, muestra de savia embotellada. Por otra parte, se realizó el “blanco” con etanol y muestra y el grupo control con etanol, DPPH y agua destilada en vez de muestra, que nos servirá para comparar cuánto se aclara la solución, es decir, cuánta capacidad antioxidante tiene la muestra de savia en comparación con el agua del grupo control. Todo ello se dejó en oscuridad durante 15 minutos y finalmente se midió la absorbancia con la longitud de onda a 517 nm.

En el caso de ABTS, se preparó el reactivo stock ABTS 7 mM y $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 2,5 mM, y se diluye 1:50 aproximadamente, ya que debe alcanzar un valor de absorbancia a 734 nm de 0,7. Se guardó a oscuridad durante 16 horas y transcurridas esas horas, se realizó una curva de calibrado de 0 a 400 ppm yendo de 50 en 50, usando 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane (Trolox), expresándose la capacidad antioxidante de los extractos como mg de Trolox/g extracto.

3.1.7. Determinación de capacidad quelante de la savia

La capacidad de quelación de iones ferrosos de los componentes que forman parte de la savia se ensayó según el método de Decker et al. (1992) y se mezclaron 5 mL de savia con 0,1 mL de 2 mM de FeCl_2 y 0,2 mL de solución de ferrozina 5 mM. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos, se midió la absorbancia a 562 nm. A partir de estos resultados, se conocieron los porcentajes de actividad quelante de la savia siguiendo la ecuación (1), siendo *Ablanco*, la absorbancia de la muestra tomada como “blanco” y *At*, la absorbancia de la muestra problema a 562 nm. El complejo Fe^{2+} /ferrozina tiene una absorbancia a esta longitud de onda, por lo que la alta capacidad de quelación se muestra como una baja absorbancia.

$$\text{Habilidad quelante del ión ferroso} = \frac{\text{Ablanco} - \text{At}}{\text{Ablanco}} \times 100 \quad (1)$$

3.1.8. Electroforesis SDS-Page

Se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE para determinar el tamaño de las proteínas presentes en la savia de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli, 1970. En este caso, las muestras de savia fueron previamente liofilizadas usando un liofilizador Cryodos Testar F80 (Figura 5.A y 5.B)



Figura 5.- (A): Liofilizador LFD-10C Freeze Dryer empleado para la extracción de muestra liofilizada. (B): Muestra liofilizada repartida en dos matraces de 200 mL.

El gel de separación, gel de concentración, tampón de electroforesis y tampón de la muestra 4X. En primer lugar, para el gel de separación al 12% se necesitaron 3,35 mL de agua destilada, 2,5 mL de Tris HCl 1,5M a pH 8,8, 100 μ L de SDS al 10%, 4 mL de acrilamida 30%/Bis acrilamida al 0,8%, 50 μ L de APS al 10% y 5 μ L de TEMED. El gel de concentración estaba formado por 3 mL de agua destilada, 1,24 mL de Tris HCl 0,5 M a pH 6,8, 50 μ L de SDS al 10%, 0,6 mL de acrilamida 30%/Bis acrilamida al 0,8%, 50 μ L de APS al 10% y 6 μ L de TEMED. El tampón de electroforesis estaba compuesto por 9 g de Tris, 43,2 g de glicina, 3 g de SDS y agua destilada; y el tampón de la muestra 4X el cual está formado por 3,5 g de glicerol, 0,8 g de SDS, 0,005 g de azul de bromofenol que actúa como colorante y se enrasó al volumen de 10 mL con Tris HCl 0,25 a pH 6,8. Una vez preparados, se prepara la muestra problema (savia junto el tampón de la muestra 4X), calentándola junto con los patrones a 100 °C durante 10 minutos. Una vez finalizado el calentamiento, se inyectaron en cada calle 15 μ L de los 2 patrones y la muestra a concentraciones desde 20 mg/mL hasta 5 mg/mL. Los geles fueron teñidos con Azul de Coomasie que se preparó con 0,1 g de Coomasie blue, 50 mL de metanol, 10 mL de ácido acético y 40 mL de agua destilada. Se dejó tiñendo durante 4 horas y finalmente se introduce el gel resultante en una solución compuesta por 100 mL de metano, 20 mL de ácido acético y 80 mL de agua destilada durante una noche y así, conseguir que se destiña el exceso de colorante del gel.

3.1.9. Análisis de la microbiología de la savia

Además de la caracterización de la savia, se realizó el análisis de su microbiología, sembrando en dos tipos de medios: PCA (Plate Count Agar) destinado para el crecimiento de mesófilos aerobios y M.R.S Agar, para el crecimiento de bacterias ácido-lácticas como el género *Lactobacillus* (Figura 6).

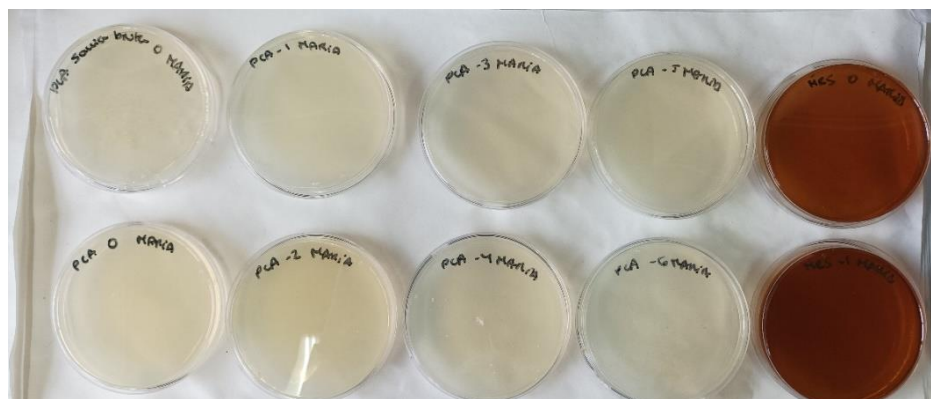


Figura 6.- Siembras con distinta concentración de savia de abedul.

Para poder realizar el recuento de colonias, se realizaron diluciones hasta 10^{-5} a partir de la savia problema y se dejaron durante 48 horas aproximadamente en una estufa a 30 °C. Una vez acabado ese tiempo, se realizó la tinción Gram para poder conocer qué tipos de microorganismos podían existir, y finalmente se observaron los resultados en el Microscopio DME (Leica) (Figura 7), con el objetivo 100× y aceite de inversión.



Figura 7.- Microscopio DME (Leica) empleado para observar los resultados microbiológicos de la savia de abedul.

3.2.- *Tratamiento térmico y su efecto sobre los biopolímeros de la savia*

Se recogieron distintas muestras a las que se les sometió a diferentes tratamientos térmicos y distintos pH con el fin de conocer la forma de esterilización óptima, sin que ocurra una pérdida de los biopolímeros esenciales de este producto alimenticio. Para ello, se presentaron distintas botellas, en las que, en primer lugar, se les sometió a una filtración con un filtro de 0,22 mm en condiciones no asépticas, y posteriormente, se les realizó un calentamiento en un baño a 70 °C durante distintos tiempos: a una botella se le sometió a un calentamiento de una hora (Figura 8.A); a otra botella se le asignó un calentamiento de 70 °C durante hora y media (Figura 8.B), y a otra botella se le realizó un calentamiento tan solo de 40 minutos (Figura 8.C).

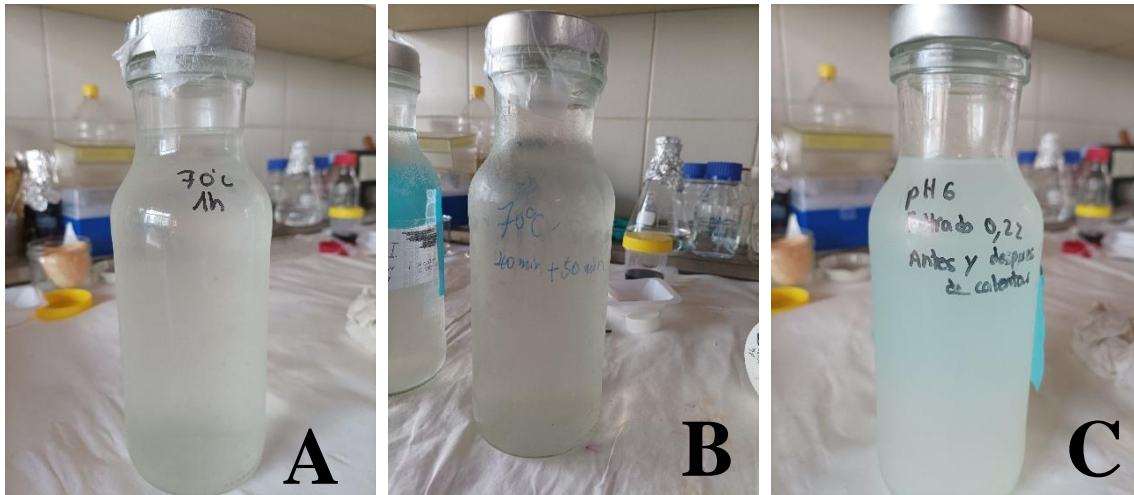


Figura 8.- Muestras tratadas a 70 °C a distintos tiempos. (A): Calentamiento durante 1 hora a 70 °C. (B): Calentamiento durante 40 minutos y luego seguidamente 50 minutos a 70 °C. (C): Calentamiento durante 40 minutos a 70 °C.

A su vez, se realizó otro tipo de tratamiento el cual consistía en el cambio de pH, para averiguar, si esto ayuda a la esterilización total junto con el filtrado y el tratamiento térmico de 70 °C. Por ello, se dividió el contenido de una botella en dos botellas cuya savia había sido filtrada con un filtro de 0,22 mm, pero a una de estas muestras se le cambió el pH a 3 acidificándola y finalmente se calentó a 70 °C durante 40 minutos (Figura 9.A) y a otra, se viró el pH a 6 y posteriormente se la trató térmicamente (Figura 9.B). Además, se analizó otra botella llamada UMAMI a la que se le había sometido a una filtración con un filtro de 0,22 mm, un tratamiento térmico de 100 °C durante 40 minutos y acidificado con ácido cítrico, consiguiendo un pH con un valor de 4 (Figura 9.C).

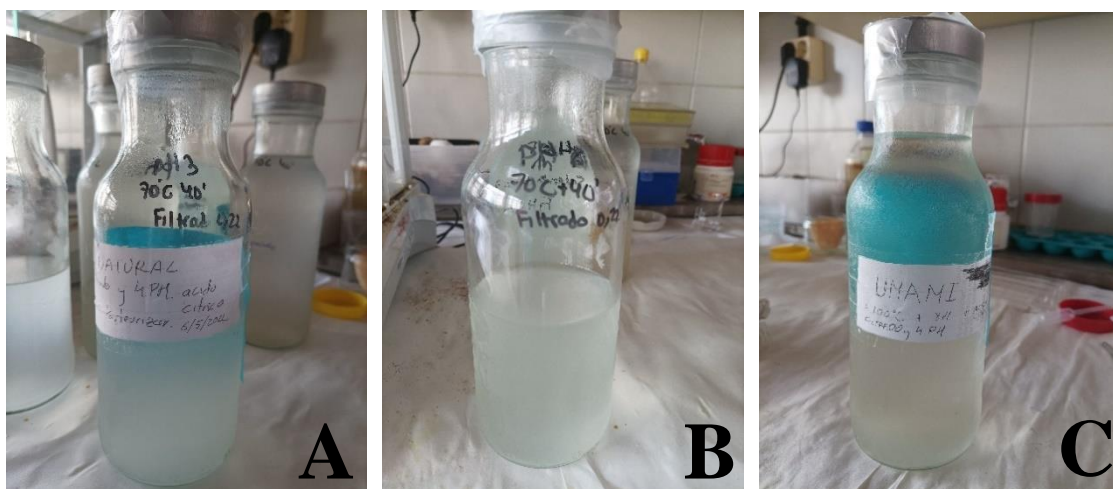


Figura 9.- Muestras tratadas con distinto pH, filtradas y con tratamiento térmico. (A): Muestra a pH 3, filtrada y con un tratamiento térmico a 70 °C durante 40 minutos. (B): Muestra a pH 6, filtrada y con un

tratamiento térmico a 70 °C durante 40 minutos. (C): Muestra a pH 4, filtrada y con un tratamiento térmico de 100 °C durante 40 minutos.

Una vez realizado la preparación de las muestras, se sembró 100 µL de cada botella por triplicado en placas con un medio Agar Nutritivo, con el fin de que pueda crecer todo tipo de bacterias presentes en la muestra de savia tras los cambios térmicos y de pH. A todas estas placas, se las incubó durante 48 horas en estufas con una temperatura de 30 °C.

3.3.- Ultrafiltración y su efecto sobre los biopolímeros de la savia

En este caso, se realizó una ultrafiltración a partir de 2 litros de savia de abedul para poder esterilizarla por completo y observar qué biopolímeros permanecían en el permeado y cuales en el retenido. Con tal fin se utilizó una membrana de polieter sulfona marca Hydrosart de Sartorius con un MWCO de 5 kDa (Figura 10).

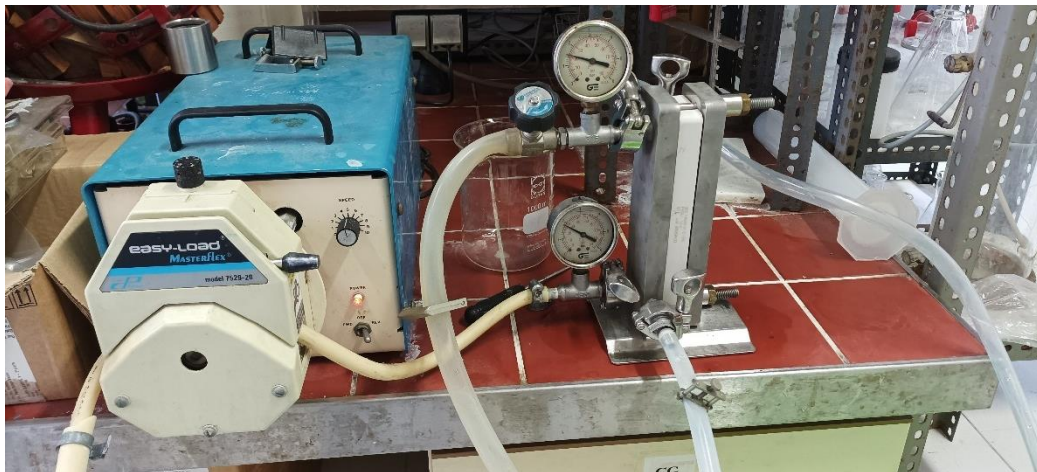


Figura 10.- Proceso de ultrafiltración empleando una membrana de 5 kDa para poder esterilizar completamente la savia ya centrifugada.

Una vez acondicionada la membrana con agua destilada, se ultrafiltraron 1,7 litros de savia aproximadamente aplicándose una presión transmembrana de 1,35 bar, de tal manera que se recogieron en el permeado 1,35 L de savia y en el retenido los restantes 0,35 L. Tanto del retenido como del permeado se analizó el contenido en proteínas, hidratos de carbono, azúcares reductores y fenoles de acuerdo con la metodología previamente descrita.

3.4.- Elaboración de films de gelatina y caseína aditivados con savia

Se realizaron *films* de dos proteínas, gelatina y caseína, por lo que se siguieron dos protocolos muy semejantes, pero con ciertas distinciones. En primer lugar, se realizaron disoluciones de gelatina o caseína al 5% para 100 mL de muestra de savia o agua destilada si se elaboran los *films* control (Luo et al., 2022). En ambos casos, se les añade 2 g de glicerol que actúa como plastificante y seguidamente, la solución resultante se disolvió aplicando temperatura: 15 minutos a 40 °C en el caso de solución con gelatina y 65 °C y 25 minutos en el caso de la solución con caseína. En el caso de la caseína se facilitó la dispersión de la proteína mediante el uso de un homogeneizador Silent Crusher (Heidolph, Alemania) con el rotor 12 GM (Figura 11).



Figura 11.- Homogeneizador Silent Crusher (Heidolph, Alemania) con el rotor 12 GM empleado en la elaboración de *films* de caseína y savia de abedul.

En cuanto a la savia, se realizaron dos ensayos antes de incorporarla a la solución de los *films*. En uno de ellos, la savia incorporada a estas películas se encontraba pasteurizada, mientras que en el otro ensayo, se utilizó savia concentrada, es decir, se centrifugó 750 mL aproximadamente a 8000 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente, es decir, 15 °C con la centrifugadora 6500 (Kubota) (Figura 12) y posteriormente, el sobrenadante se repartió en matraces para que se pudiese congelar y liofilizar finalmente en el liofilizador LFD-10C Freeze Dryer (Figura 5.A). Tras la liofilización, se concentró una tercera parte, disolviendo la savia liofilizada en 250 mL de agua destilada.



Figura 12.- Centrifugadora 6500 (Kubota) empleada antes de realizar la liofilización de la savia.

Tras la elaboración de las diluciones formadoras, se vertieron 15 mL por placa Petri, dejándose secar en estufa a 37 °C, durante 24 horas. Tras ello se despegaron de la placa y se estabilizaron y almacenaron en una cámara de humedad a 25 °C y 50% humedad (HCP50, Memmert) (Figura 13).



Figura 13.- Cámara de humedad HCP50 (Mettmert) empleada para el mantenimiento de los *films*.

3.4.1. Transmitancia y transparencia

Las propiedades de transmitancia y transparencia, es decir, las propiedades barreras de los *films* ante la luz ultravioleta y luz visible fueron evaluadas siguiendo la metodología de Dick et al. (2015). Debido a ello se cortaron en piezas rectangulares de aproximadamente 1 cm de ancho y se introdujeron en una celda de vidrio del espectrofotómetro.

En el caso del porcentaje de transmitancia, se estudió midiendo la transmitancia tanto en el rango ultravioleta como en el de la luz visible, desde 200 a 800 nm, mediante el espectrofotómetro UV-vis y utilizando la celda vacía como blanco.

Con respecto a la transparencia, se calculó su valor mediante la ecuación (2), donde A_{600} es la absorbancia de los *films* a una longitud de onda de 600 nm y x es el grosor de éstos en milímetros o mm.

$$\text{Transparencia} = \frac{A_{600}}{X} \quad (2)$$

Por último, el grosor de los *films* se midió utilizando un micrómetro digital (Mitutoyo C., Japón) con una precisión de $\pm 1\mu\text{m}$ (Figura 14), midiendo 9 puntos en total, es decir tres medidas para cada fragmento de cada tipo de *films* y posteriormente, se realizó la media aritmética.



Figura 14.- Micrómetro digital (Mitutoyo C., Japón) empleado para medir el grosor de los *films*.

3.4.2. Colorimetría

Para la realización de la medida del color de los *films* de caseína y gelatina producidos a partir de la savia, se empleó el colorímetro espectral LC 100/ SV 100 (Lovibond, Reino Unido) (Figura 15). Este equipo permite obtener los parámetros L^* o luminosidad, a^* o las coordenadas rojo/verde y b^* o las coordenadas amarillo/azul de acuerdo con la escala CIELAB (Stoll et al., 2018).



Figura 15.- Colorímetro utilizado para medir las propiedades colorimétricas de las muestras de aceite y de los *films*.

Para poder llevar a cabo el análisis, se calibró el equipo con un blanco estándar y se midieron las muestras de *film*. Para medir los *films*, se colocaron éstos sobre una hoja blanca (L^* , 95,2; a^* , 2,3; b^* , -9,2), la cual se utilizó como estándar. Las mediciones se hicieron por duplicado tanto para el *film* control (gelatina y caseína con agua) y los *films* problema (gelatina y caseína con savia). La diferencia total de color (ΔE^*), se calculó usando la ecuación (3), donde ΔL^* , Δa^* , Δb^* , son los valores de las diferencias de los correspondientes parámetros de color entre las muestras de *films* de caseína y gelatina; y el *Chroma* o saturación se calcula con la ecuación (4) (Stoll et al., 2018). Por otra parte, índice de blancura (White Index, *WI*) de los *films* se calculó con la ecuación (5). Finalmente se calculó el índice de amarillez o *Yl* con la ecuación (6) donde se relacionan los parámetros b^* y L^* (Francis y Clydesdale, 1977).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (3)$$

$$Chroma = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (4)$$

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L)^2 + a^2 + b^2} \quad (5)$$

$$Yl = (142,86 \times b^*)/L^* \quad (6)$$

3.4.3. Propiedades mecánicas

Estas propiedades se miden mediante una prueba de punción empleando un texturometro TA.XT.Plus Texture Analyser (Stable Microsystems, UK), equipado con una celda de 5 kg y una sonda de 5 mm de diámetro (P/5S) (Figura 16).

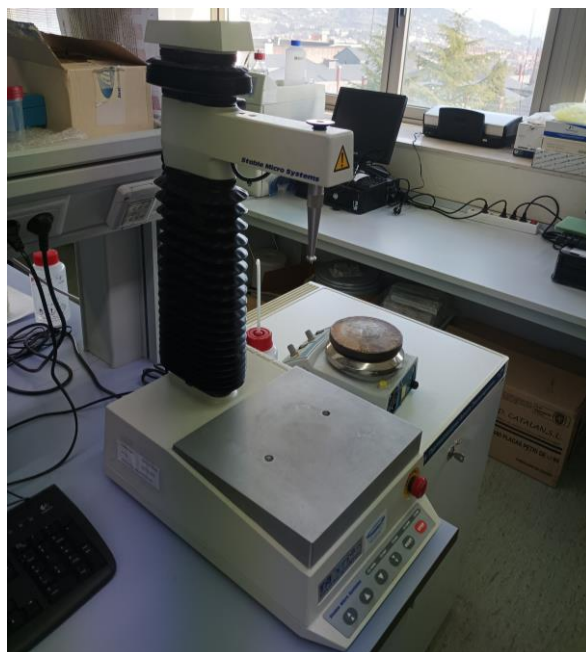


Figura 16.- Texturometro en el que se coloca la plataforma para colocar los fragmentos de los *films* y la sonda P/5S y poder estudiar las propiedades mecánicas de éstos.

Para poder llevar a cabo el estudio de este tipo de propiedades, los *films* se cortaron en 4 trozos cuadrados de igual tamaño y se colocaron en el texturometro entre dos placas, asegurándose que el *film* estuviera tenso y sin arrugas. Las placas que se utilizaron que van ancladas al texturometro, tienen un agujero que permite el contacto del *film* con la sonda, la cual lo presionará hasta romperlo. En esta ocasión, la velocidad de retorno de la sonda fue 10 mm/s, la fuerza de contacto 1 g y la distancia de retorno entre 10 y 30 mm.

Los valores de resistencia a la punción (PS) y deformación (PD) se calcularon mediante las ecuaciones (7) y (8):

$$PS = F_m / Th \quad (7)$$

$$PD = (\sqrt{D^2 + R^2} - R) / R \quad (8)$$

En el caso de la ecuación (7), el término F_m (N/mm^2) corresponde a la fuerza máxima aplicada por la sonda antes de la rotura del *film*, Th (mm) es el grosor del *film*, D es la distancia recorrida por la sonda desde que entra en contacto con el *film* hasta que éste se rompe (mm) y R (mm) es el radio del orificio de rotura del film (Weng et al., 2021).

3.4.4. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

Para determinar la permeabilidad al vapor de agua, se realizó la metodología explicada por Weng et al. (2021). En primer lugar, se llenaron los tapones de cloruro de polivinilo 1,6 cm de altura y 2,1 cm de diámetro con 1 mL de agua destilada y se sellaron con trozos circulares de los *films* con el mismo diámetro que el de la boca de los tapones, de manera que no quedase ningún poro sin pegar entre el tapón y el trozo de *film*, y para ello, se empleaba pegamento instantáneo.

En segundo lugar, los tapones con agua y sellados con los *films*, fueron pesados al inicio del estudio y se colocaron en un desecador de sílica gel (Figura 17), y los pesos de cada uno de los tapones fueron tomados cada hora durante 7 horas, de manera que se obtuvieron 8 medidas de los pesos. La pérdida de peso de los tapones se representó frente al tiempo, y el ratio de transmisión de vapor de agua o $WVTR$ se calculó mediante la ecuación (9):

$$WVTR = \frac{G}{t \times A} \quad (9)$$

En este caso, G/t es el cambio de peso que experimenta el tapón por unidad de tiempo (g/h), es decir, la pendiente de la representación gráfica, y A (m^2) es el área del tapón cubierta por el *film*.

Por otro lado, los valores de *WVTR* obtenidos de la anterior ecuación, se utilizaron para calcular la permeabilidad al vapor de agua o *WVP* de los *films* por medio de la ecuación (10):

$$WVP = \frac{WVTR \times Th}{\Delta P} \quad (10)$$

En este caso, *Th* (mm) representa al grosor del *film* y ΔP (kPa) es la diferencia entre las presiones parciales entre las dos caras del *film*, es decir, la presión de vapor del agua a temperatura ambiente.



Figura 17.- Taponés sellados con trozos de *film* de caseína y gelatina junto con savia, en el desecador para el estudio de la permeabilidad de vapor de agua de estos *films*.

3.4.5. Solubilidad

La solubilidad en agua de estos *films* de caseína y gelatina con savia y concentrada se midió en función de la metodología descrita por Weng et al. (2021). Por ello, los *films* controles y los que presentaban savia de abedul tanto de caseína como de gelatina, se cortaron en círculos de 2 cm de diámetro aproximadamente y se secaron en un horno a 90 °C durante 24 horas para poder conocer su peso seco.

Otros fragmentos con el mismo diámetro fueron sumergidos en una disolución tampón de Trizma 0,1 M pH 5, 7 y 9 a temperatura ambiente durante 24 horas. Tras ello, los trozos que no estuvieran disueltos se recuperaron con pinzas y se secaron a 90 °C durante 24 horas y finalmente se pesaron. Tras ello, con la ecuación (11) se pudo conocer el porcentaje de *film* disuelto, es decir, la solubilidad de los *films* control y de savia, con gelatina y caseína.

$$S(\%) = \frac{m1 - m2}{m1} \times 100 \quad (11)$$

En este caso S (%) es el porcentaje de solubilidad del *film*, $m1$ es el peso seco inicial del *film* y $m2$ es el peso seco en gramos de los *films* que no se han disuelto en la disolución tampón.

3.4.6. Microestructura

La microestructura de los *films* se observó mediante micrografías que se tomaron con un microscopio electrónico de barrido JSM-6610LV (Jeol, Estados Unidos). El objetivo de ello es estudiar la microestructura de la sección transversal de los *films* de gelatina y caseína tanto de savia de abedul como de savia previamente centrifugada y concentrada, y observar si el tratamiento de la savia favorece a la estructura de los *films* o al contrario, perjudica.

Para poder estudiar esta característica, se cortaron los *films* en piezas cuadradas de aproximadamente 1×1 cm con la ayuda de un bisturí quirúrgico. Estos trozos se fijaron a unas bases metálicas mediante una tira de carbono adhesiva por ambas caras, de manera que por una cara esta cinta se une al soporte, mientras que, por la otra, se une al fragmento del *film*. Posteriormente, estos *films*, se recubrieron de oro mediante pulverización catódica durante 5 minutos bajo una atmósfera de argón. Las micrografías resultantes, fueron tomadas con aumentos entre ×400, ×500, ×600 y ×800 (elegidos en función de la muestra), y el voltaje se fijó en 20 kV.

3.4.7. Propiedades antioxidantes

En este caso se realizó el método DPPH. En primer lugar, se prepararon el reactivo DPPH disolviendo 0,016 g de DPPH en 40 mL de etanol. Posteriormente se prepararon 4 mL de etanol, junto con 0,6 mL DPPH y aproximadamente 4 trozos de 1 cm cada uno de *film* de gelatina control y otros 4 de *film* de gelatina realizado con savia de abedul. Por otra parte, se realizó el “blanco” con etanol y muestra y el grupo control con etanol, DPPH y agua destilada en vez de muestra, que servirá para comparar cuánto se aclara la solución, es decir, cuánta capacidad antioxidante tiene la muestra de savia en comparación con el agua del grupo control. Todo ello se dejó en oscuridad durante 15 minutos y finalmente se midió la absorbancia con la longitud de onda a 517 nm. Tras ello, se calculó la capacidad antioxidante de los *films* de caseína y gelatina controles y con savia mediante la ecuación (12):

$$\text{Capacidad antioxidante (\%)} = \frac{Abs_c - Abs_s}{Abs_c} \times 100 \quad (12)$$

En este caso Abs_c es la absorbancia a 517 nm del *film* control y Abs_s es la absorbancia a 517 nm de los *films* problema, es decir, los *films* de caseína y gelatina con savia (Asadi y Pirsá, 2020).

3.4.8. Propiedades quelantes

La capacidad de quelación de iones ferrosos de los péptidos se ensayó según el método de Decker et al. (1992). Brevemente, se mezclaron 4 trozos de cada tipo de *film* (control de gelatina, control de caseína, gelatina y savia y caseína y savia) con 0,1 mL de 2 mM de $FeCl_2$ y 0,2 mL de solución de ferrozina 5 mM. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos, se midió la absorbancia a 562 nm. El complejo Fe^{2+} /ferrozina tiene una absorbancia a esta longitud de onda, por lo que la alta capacidad de quelación se muestra como una baja absorbancia. Por último, se midió la capacidad quelante siguiendo la ecuación (13):

$$\text{Capacidad quelante (\%)} = \frac{Abs\ blanco - Abs\ problema}{Abs\ blanco} \times 100 \quad (13)$$

Donde *Abs blanco* es la absorbancia a 517 nm del *film* control y *Abs problema* es la absorbancia a 517 nm de los *films* problema, es decir, los *films* de caseína y gelatina con savia.

3.5.- Análisis estadístico

Cada uno de los diferentes ensayos empleados para caracterizar la savia o las biopelículas elaboradas se realizó por duplicado, representándose en cada caso el promedio y la correspondiente desviación estándar de los resultados obtenidos. Los resultados de algunos de ellos fueron tratados estadísticamente para poder reconocer valores significativamente diferentes de otros a partir de un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Para poder llevar a cabo este análisis se empleó el programa Statgraphics Centurion XVI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- *Caracterización de la savia de abedul*

4.1.1. Determinación de proteínas

Tras el análisis de la savia y la comparación de los resultados obtenidos con la recta de calibrado previamente realizada, se pudo conocer que existe $0,020 \pm 0,016$ g/100 mL de proteína en la savia de abedul embotellada. En comparación con lo indicado en la bibliografía, la concentración de proteínas en ésta se encontraría entre 0,0003 y 0,006 g/100 mL, o incluso de 0,012 y 0,027 mg/100 mL. Por ello, se observó que la savia posee un mayor contenido proteico que el detectado por otros autores (Sancho et al., 2022). Por lo general, estas variaciones en la composición no tienen relación con las condiciones meteorológicas como la temperatura de la zona, sus precipitaciones o las horas de sol que presenta en la zona de recogida de la muestra. No obstante, puede deberse a la especie de abedul, ya que normalmente, todos los estudios realizados sobre la savia son basados en *Betula platyphylla* o *Betula verrucosa* y en este trabajo se estudió la savia de *Betula pendula*. Asimismo, se conoce que la concentración de proteínas varía a medida que se recoge durante la temporada, aumentándose exponencialmente hacia el final de la temporada de recolección. Esta variación, puede ser debida a que existe una mayor concentración de nitrógeno en la savia del xilema al final de la temporada (Kallio et al., 1995), ya que estas reservas de nitrógeno se encuentran en los cuerpos proteicos empleados como fuente de producción de proteínas para las plantas. Por ello, durante la latencia, estos orgánulos son la principal fuente de nitrógeno que se moviliza hacia el xilema durante la primavera, el cual distribuirá estos compuestos nitrogenados por toda la planta, de manera que puede ser la causa de un aumento de disponibilidad de proteínas al final de la recolección, explicándose así esa gran cantidad resultante de proteínas (Sauter y Van Cleve, 1992).

4.1.2. Determinación de hidratos de carbono totales

Al igual que con las proteínas, se realizó un calibrado para poder determinar el contenido en carbohidratos de las muestras de savia. A partir de esta recta, se conoce que existen $0,511 \pm 0,147$ g/100 mL. A su vez, estos biopolímeros se pueden detectar y cuantificar con la técnica de HPLC con la que se han identificado principalmente azúcares complejos como la sacarosa y azúcares reductores como son la glucosa y fructosa, conociéndose que existe aproximadamente 539 mg/100 mL de fructosa, 446 mg/100 mL

de glucosa y 58 mg/100 mL de sacarosa, es decir, una mayor cantidad que la existente en esta savia de abedul problema. Esta diferencia puede deberse al momento en el que se ha producido la medida a lo largo de la temporada de recogida (Kuka et al., 2013). Por otra parte, se ha demostrado que el contenido de hidratos de carbono totales no depende de la especie o variedad del árbol (Kallio y Ahtonen, 1987).

4.1.3. Determinación de azúcares reductores

Tras el análisis del contenido en carbohidratos de la savia, se procedió a cuantificar los azúcares reductores presentes en esta, para así determinar el contenido en azúcares simples y complejos de la savia estudiada. Estos azúcares reductores son aquellos que poseen su grupo hidroxilo del carbono anomérico intacto, tales como la glucosa, lactosa, fructosa, maltosa, galactosa o manosa, y que, a través del mismo, pueden reaccionar como reductores con otras moléculas que actuarán como oxidantes. Por tanto, se cuantifica que existe $0,399 \pm 0,003$ g/100 mL, a diferencia de lo que indica el etiquetado, que simplemente indican que hay 0,2 g de azúcares simples.

Por otra parte, se puede observar a simple vista el poder reductor de los azúcares en cada muestra gracias al color obtenido tras la prueba (Figura 18), apreciándose un color más oscuro a medida que aumenta el contenido en azúcares simples en las muestras analizadas.



Figura 18.- Resultado de la cuantificación de los azúcares reductores, observando distintas tonalidades (naranja oscuro con la dilución 1:10 de la savia, rojizo con la savia sin diluir y amarillo en el blanco).

4.1.4. Determinación de ácidos orgánicos y azúcares

Tal y como se declara en el apartado de *Materiales y Métodos*, el análisis de los ácidos orgánicos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC con las condiciones ya comentadas. Para poder conocer la presencia o ausencia de cada ácido, se identificó el tiempo de retención en minutos y se comparó con los tiempos resultantes a partir de los ácidos patrones (Tabla 6). Asimismo, durante la realización de este tipo de cromatografía se reconoció la presencia de algunos azúcares.

Tabla 6.- Tiempos de retención en HPLC obtenidos de los ácidos patrones.

TIEMPOS DE RETENCIÓN EN HPLC (MINUTOS)	
<i>Ácido málico</i>	20,95
<i>Ácido fosfórico</i>	13,68
<i>Ácido succínico</i>	27,97
<i>Ácido cítrico</i>	27,63
<i>Ácido oxálico</i>	19,79
<i>Ácido acético</i>	34,17
<i>Ácido láctico</i>	28,48

Tal y como se observa en la Figura 19, el cromatograma resultante de la savia de abedul indicó que existe fluctuaciones en las proporciones de los ácidos. El pico 1, presenta un tiempo de 11,4 minutos, por lo que, en comparación con los tiempos resultantes de los patrones, puede pertenecer al ácido oxálico, mientras que el pico 2, con un tiempo de 12,34 minutos puede pertenecer al ácido fosfórico. A continuación, los picos 3 y 4 presentaban tiempos de 20,87 y 23,052 minutos respectivamente, por lo que representaban a los ácidos málico y oxálico. No obstante, se conoce que estos tiempos pueden pertenecer a azúcares como glucosa y fructosa, por lo que los picos 3 y 4 de los ácidos pueden solaparse con los picos de estos azúcares. En el caso de los picos 5 y 6, poseían tiempos de retención con valores de 27,25 y 29,9 minutos, por esta razón, podían ser los ácidos cítrico y láctico. Por último, los picos 7 y 8, presentan los mayores valores

de tiempos de retención con 33,34 y 38,8 minutos, por lo que podían pertenecer al ácido acético ambos.

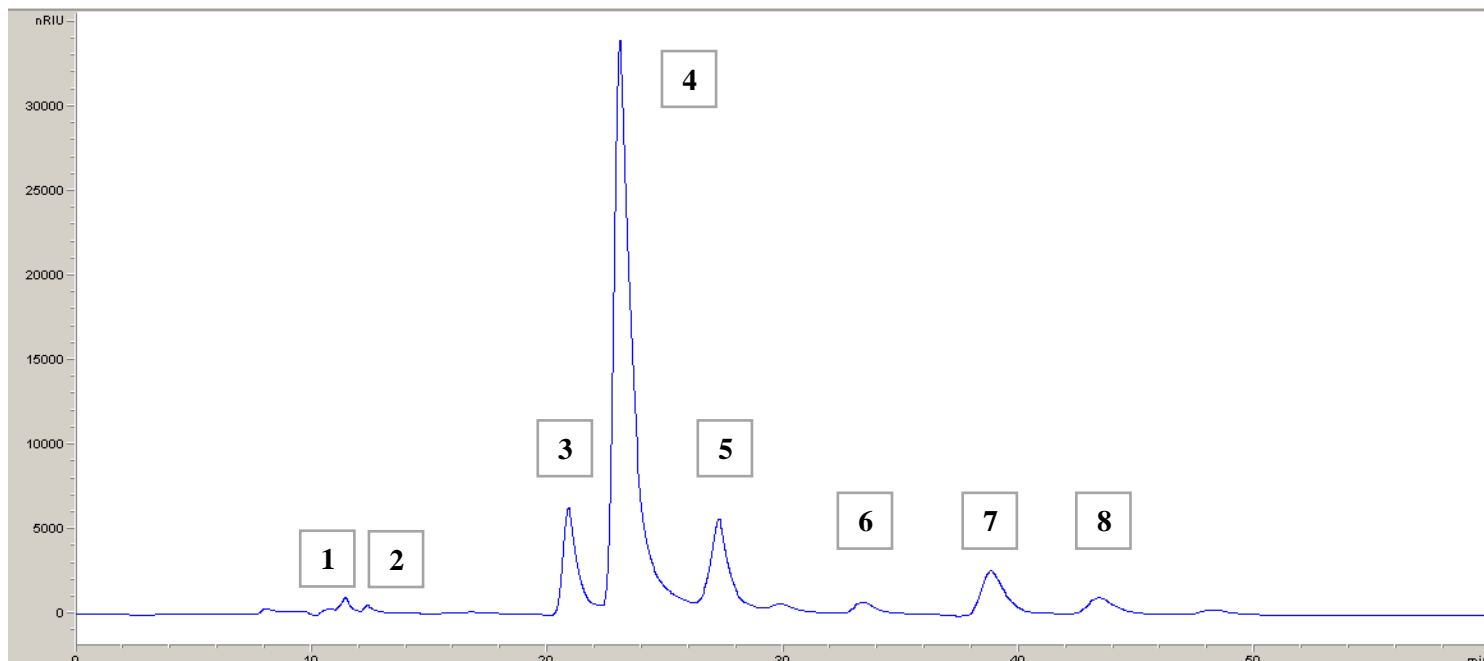


Figura 19.- Cromatograma resultante de la savia de abedul.

Tras estos resultados, se puede conocer la causa de la alta actividad antioxidante que presenta la savia de acuerdo con la bibliografía consultada. Esta actividad antioxidante permite retardar la degradación oxidativa de los lípidos y otros biopolímeros presentes en los alimentos (Maestro-Durán y Borja-Padilla, 1993). A su vez, estos compuestos pueden alterar características tanto químicas como sensoriales del alimento, tales como: pH, acidez total, estabilidad microbiológica...

4.1.5. Determinación de fenoles

Al igual que el resto, se obtiene una gráfica donde se observa la línea de tendencia y la ecuación de la recta. A partir de este calibrado se determinó que el contenido en compuestos fenólicos presentes en la savia es de $0,001 \pm 0,021$ g/100 mL, aportando cierta tonalidad azulada en la solución a medida de que exista mayor cantidad de fenoles (Figura 20). Por tanto, en la savia de abedul existen estas sustancias las cuales poseen funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Los compuestos fenólicos son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas.



Figura 20.- Resultado de la cuantificación de los fenoles, observando distintas tonalidades (azul claro con la savia y transparente en el blanco).

Los fenoles son sintetizados *de novo*, por las plantas y son regulados genéticamente, aunque a este nivel también existen factores ambientales. Además, actúan como fitoalexinas (compuesto que emplea la planta para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta. Estos compuestos, al igual que los ácidos orgánicos, se conoce que presentan importantes propiedades antioxidantes, siendo de especial interés tanto desde un punto medicinal como para preservar alimentos.

4.1.6. Determinación de capacidad antioxidante

En primer lugar, el resultado obtenido a partir de la savia con el método DPPH, es de $10,76 \pm 0,12\%$ pudiendo deberse a una mayor cantidad de fenoles en el contenido que queda al final de la botella y que desaparece en cuanto se mezcla toda la solución. Mientras que en el caso de la técnica ABTS, el porcentaje de capacidad antioxidante de la muestra de savia es de $29,45 \pm 0,11\%$, pudiendo deberse a la misma razón que en el anterior caso, y además, se observa que con este método se obtiene un mayor valor como resultado, en comparación con los obtenidos por DPPH.

En definitiva, ambos métodos indican la presencia de una gran cantidad de antioxidantes, posiblemente fenoles y ácidos orgánicos, que protegen a las células contra el daño de moléculas inestables denominadas radicales libres. Es por esta razón por la que esta bebida de savia es idónea para poder prevenir algunas afecciones como las

enfermedades cardíacas, diabetes tipo 2, osteoporosis, Alzheimer o Parkinson (Vilaplana, 2007).

4.1.7. Determinación de la capacidad quelante de la savia

En este caso, se observa que la savia presenta una gran capacidad quelante ($30,27 \pm 0,05\%$) gracias al ion ferroso, por tanto, es capaz de formar complejos con metales pesados observándose cierta tonalidad violeta cuanto más ion ferroso libre tenga la solución (Figura 21). Esta capacidad es de gran importancia, ya que los metales pesados no pueden ser metabolizados por el cuerpo humano y persisten en el organismo, donde ejercen sus efectos tóxicos cuando se combinan con uno o más grupos reactivos (ligandos) esenciales para las funciones fisiológicas normales. Los quelantes se diseñan para competir con los metales por los grupos reactivos fisiológicos, evitando o revirtiendo así sus efectos tóxicos e incrementando su excreción.



Figura 21.- Resultado de la propiedad quelante de la savia en comparación con el “blanco”.

El interés biológico de los quelantes se origina a partir de los esfuerzos para controlar los restos de metales que contribuyen al deterioro de los alimentos. Además, el mecanismo de quelación ha sido utilizado por los farmacólogos en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para pruebas clínicas en una amplia gama de alteraciones patológicas en las que se requiere eliminar iones metálicos de los tejidos, o bien introducirlos en el organismo con propósitos metabólicos.

4.1.8. Electroforesis SDS-Page

Los resultados de la electroforesis revelan la presencia de unas bandas muy tenues (Figura 22) que indican la presencia de proteínas, sin embargo, debido a la cantidad de sales presentes en la muestra de savia, dichas bandas no se observan con mucha claridad.

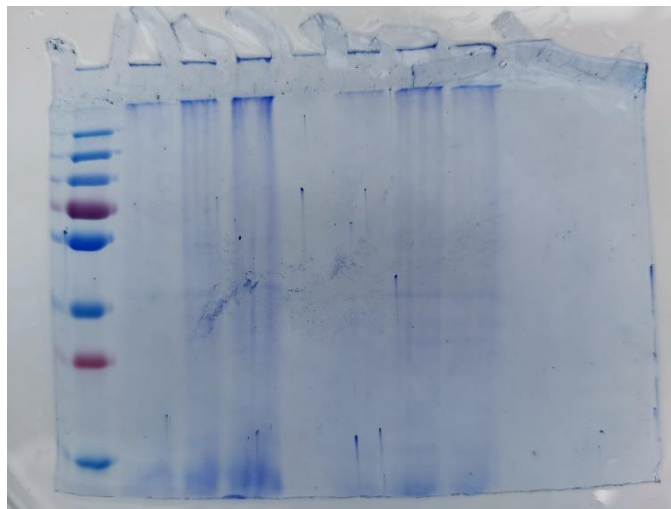


Figura 22.- Resultado de la electroforesis donde se observa que sí existen proteínas, aunque de manera muy tenue.

Sin embargo, ciertos autores han descubierto que, con esta misma técnica, existían 10 bandas de proteínas tanto en *B.platyphylla var. japonica* como en *B.verrucosa*, la cual es el género del que proviene este tipo de savia embotellada. Los tamaños moleculares de esas principales bandas se encontraban en el rango de 20 a 30 kDa (Hongzhou et al., 2001).

4.1.9. Análisis de la microbiología de la savia

Tras un periodo de incubación de 48 horas en la estufa a 30 °C, se realizó una tinción de Gram para poder conocer qué tipo de bacterias habían crecido. Se observaron dos tipos distintos de microorganismos: bacilos Gram Negativo (Figura 23.A) y levaduras (Figura 23.B). Estos bacilos pueden pertenecer a la especie *Escherichia coli* que pudo aparecer una mala manipulación de la savia de abedul o pueden pertenecer a las especies de *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas Hydrophila*, *Sphingomonas paucimobilis* (Nikolajeva y Zommere, 2018). En cuanto a las levaduras, su presencia revela la posibilidad de realizar algún tipo de alimento aprovechando este tipo de microorganismos para poder llevar a cabo una fermentación.

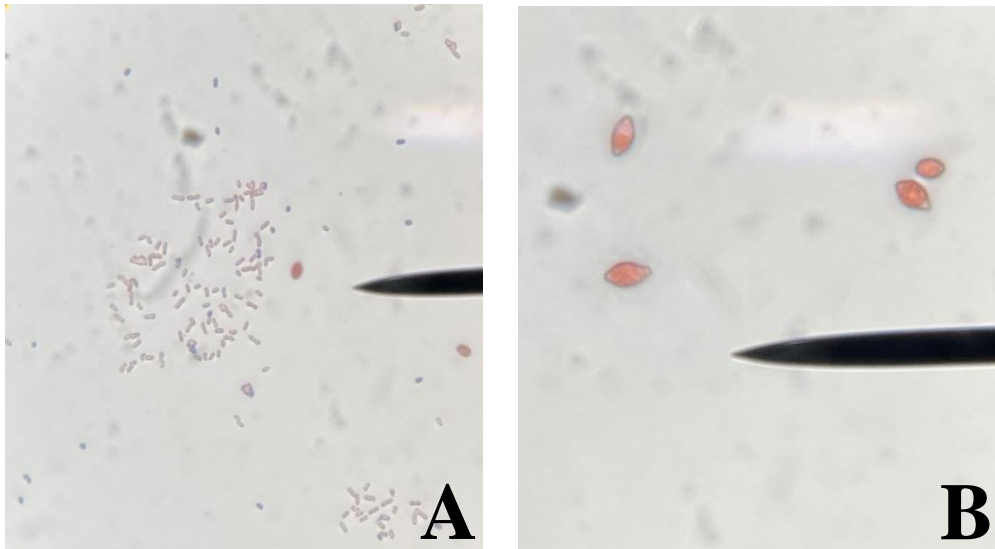


Figura 23.- Microbiología resultante de la savia de abedul. (A): Posibles bacilos Gram Negativos resultantes de la siembra de la savia de abedul. (B): Posibles levaduras resultantes de la siembra de la savia de abedul.

4.2.- *Tratamiento térmico y su efecto sobre los biopolímeros de la savia*

Tras las 48 horas sometiendo a las muestras a un tipo de tratamiento térmico, en este caso, calor húmedo, se analizó su microbiología. En esta ocasión, el suministrador de la savia filtró la savia por 0,22 mm pero en condiciones de no esterilidad, solo con el objetivo de quitar cuerpos extraños de mayor tamaño, es por ello por lo que se estudian los tratamientos térmicos que se exponen en la Tabla 7, con el objetivo de conocer qué técnica conlleva a una nula formación de microorganismos.

La alta cantidad de crecimiento microbiano que se puede ver en la Figura 24.A, Figura 24.B y Figura 24.C, indica que el tratamiento térmico realizado no es suficiente, al igual que la filtración ya que existen muchas colonias de microorganismos. Sin embargo, con el tratamiento del pH virándolo a un valor de 3 o 6 (Figura 24.D, Figura 24.E y Figura 24.F), junto con el tratamiento térmico de 70 °C durante 40 minutos, se limita de manera exhaustiva el crecimiento de microorganismos, pudiendo deberse a que crezcan ciertas especies solamente termófilas que puedan soportar esas altas temperaturas. Por lo tanto, el mejor tratamiento para poder conseguir una esterilización óptima es el calentamiento a 100 °C junto con un cambio de pH a 4 para evitar el crecimiento de los microorganismos propios de este tipo de savia, ya que como se puede observar en la Tabla 7, no crece ninguna colonia de ningún microorganismo. No obstante,

si no es posible alcanzar esas altas temperaturas, puede ser una opción válida el calentamiento a 70 °C y un cambio de pH a 6, ya que tal y como se ve en la Figura 24.F.

Tabla 7.- Unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) resultantes tras todos los tratamientos térmicos y de pH.

Muestra	Dilución	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media	UFC/mL
<i>Líquido original</i>	10 ⁻⁴	120	119	118	119	1,19 *10 ⁷
<i>Muestra de savia calentada durante 40 minutos a 70 °C</i>	Sin diluir	+300	+300	+300	+300	+300
<i>Muestra de savia calentada durante 40 minutos+50 minutos a 70 °C a pH 6,5</i>	Sin diluir	+300	+300	+300	+300	+300
<i>Muestra de savia calentada durante 1 hora a 70 °C</i>	Sin diluir	197	185	147	159,6	1,59*10 ²
<i>Muestra de savia calentada durante 40 minutos a 70 °C con pH 3</i>	Sin diluir	1	2	0	1	1
<i>Muestra de savia antes de ser calentada durante 40 minutos a 70 °C con pH 6</i>	Sin diluir	+300	+300	+300	+300	+300
<i>Muestra de savia después de ser calentada durante 40 minutos a 70 °C con pH 6</i>	Sin diluir	1	0	0	0	0
<i>Muestra de savia después de ser calentada durante 40 minutos a 100 °C con pH 4</i>	Sin diluir	0	0	0	0	0

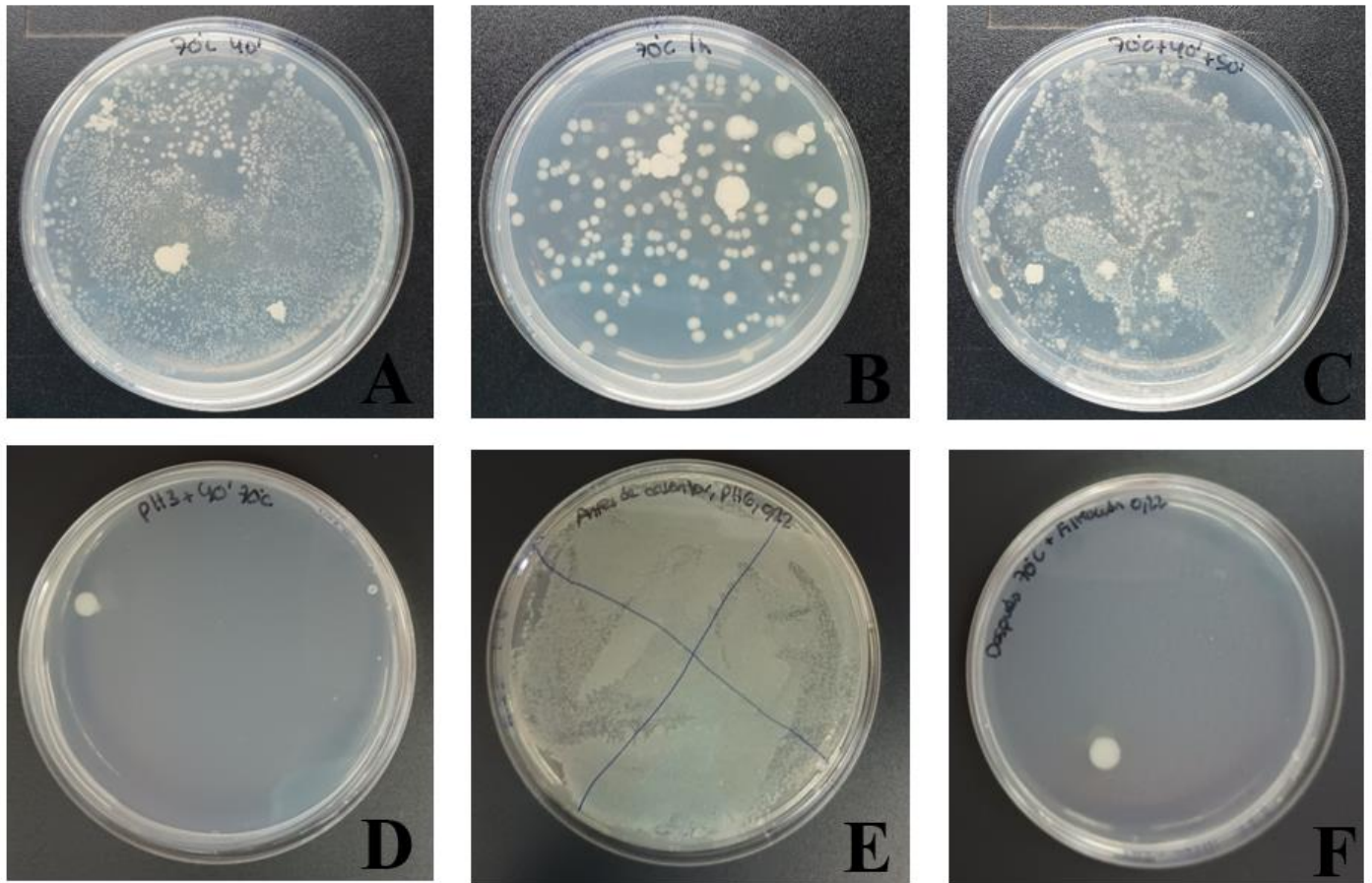


Figura 24.- Resultado microbiológico tras los tratamientos térmicos. (A) Muestra de savia calentada a 70 °C durante 40 minutos. (B) Muestra de savia calentada a 70 °C durante 1 hora. (C) Muestra de savia calentada 70 °C durante 40 minutos y posteriormente 50 minutos. (D) Muestra de savia con pH 3 y calentada a 70 °C durante 40 minutos. (E) Muestra de savia con pH 6 antes de ser calentada a 70 °C durante 40 minutos. (F) Muestra de savia con pH 6 después de ser calentada a 70 °C durante 40 minutos.

Para poder conocer qué tipo de microorganismos pudieron crecer en las distintas condiciones, se realizó la tinción de Gram, y como resultados se obtuvieron múltiples ejemplos de microorganismos en forma de bacilo Gram Negativos y levaduras (Figura 25.A y Figura 25.B), es decir, mismos microorganismos presentes en la savia que con un pretratamiento térmico y cambio de pH. Como ya se comentó anteriormente, estos bacilos pueden pertenecer a microorganismos como *Escherichia coli* que aparecieron durante la siembra debido a una posible contaminación durante el proceso de manipulación de la savia de abedul o pueden ser pertenecientes a las especies de *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas Hydrophila*, *Sphingomonas paucimobilis* (Nikolajeva y Zommere, 2018). En cuanto a la presencia de levaduras, éstas pueden aparecer debido a que algunas de ellas son termoestables tal y como ocurre con las especies de bacilos nombradas.

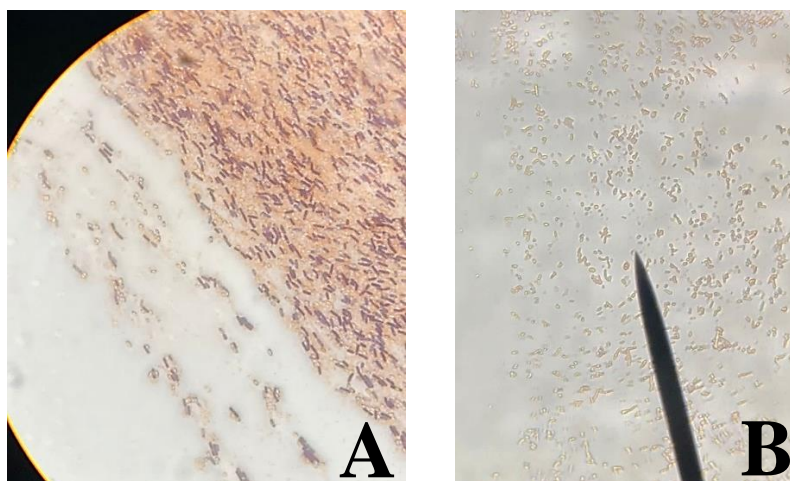


Figura 25.- Microbiología resultante del tratamiento térmico y de pH. (A): Posibles bacilos Gram Negativos resultantes de la siembra de la savia de abedul pretratada. (B): Posibles levaduras resultantes de la siembra de la savia de abedul pretratada.

4.3.- Ultrafiltración y su efecto sobre los biopolímeros de la savia

Al realizar todos los análisis de biopolímeros antes y después de la ultrafiltración (Tabla 8), se observan escasas distinciones entre la savia de abedul fresca y el permeado o el concentrado de la savia ultrafiltrada, teniendo en cuenta que la ultrafiltración se ha llevado a cabo con una membrana de 5 kDa de MWCO y que el permeado se ha concentrado 3 veces, los resultados sólo se pueden explicar suponiendo que todos los polímeros tienen un tamaño inferior a dicho tamaño de poro o a que la membrana presenta algún tipo de deterioro.

Tabla 8.- Resultados de la caracterización de la savia antes y después de ultrafiltrar (en el concentrado, permeado y recirculado).

Muestra	Proteínas	Hidratos de carbono	Azúcares reductores	Fenoles
<i>Savia antes de ultrafiltrar</i>	0,03 ± 0,01	0,38 ± 0,002	0,41 ± 0,002	0,0028 ± 0,0003
<i>Concentrado después de ultrafiltrar</i>	0,03 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,001	0,0017 ± 0,002
<i>Permeado después de ultrafiltrar</i>	0,02 ± 0,003	0,22 ± 0,005	0,33 ± 0,001	0,0012 ± 0,002

Como se puede observar en la Tabla 19, aparecen prácticamente la misma cantidad de proteínas, fenoles, hidratos de carbono y azúcares reductores en el concentrado y permeado. Teniendo en cuenta que, tal y como se discutió anteriormente, y de acuerdo con la bibliografía consultada, las proteínas de la savia presentan un tamaño de entre 20 y 30 kDa, se realizó una electroforesis de las muestras de savia de permeado y concentrado, para de esta manera poder evaluar de manera más precisa la efectividad de la ultrafiltración. En la Figura 26.A, se observa como no se aprecian proteínas en la savia de concentrado, simplemente, se reconocen los tamaños de las proteínas del marcador, y por otra parte, en la Figura 26.B se concluye que tampoco existen proteínas de ningún tipo de tamaño en la muestra de savia del permeado resultante de la ultrafiltración. Por todos estos motivos, se puede concluir que las proteínas no se concentraron en la fracción del retenido durante la ultrafiltración, lo cual sugiere que la membrana sufría algún tipo de deterioro.

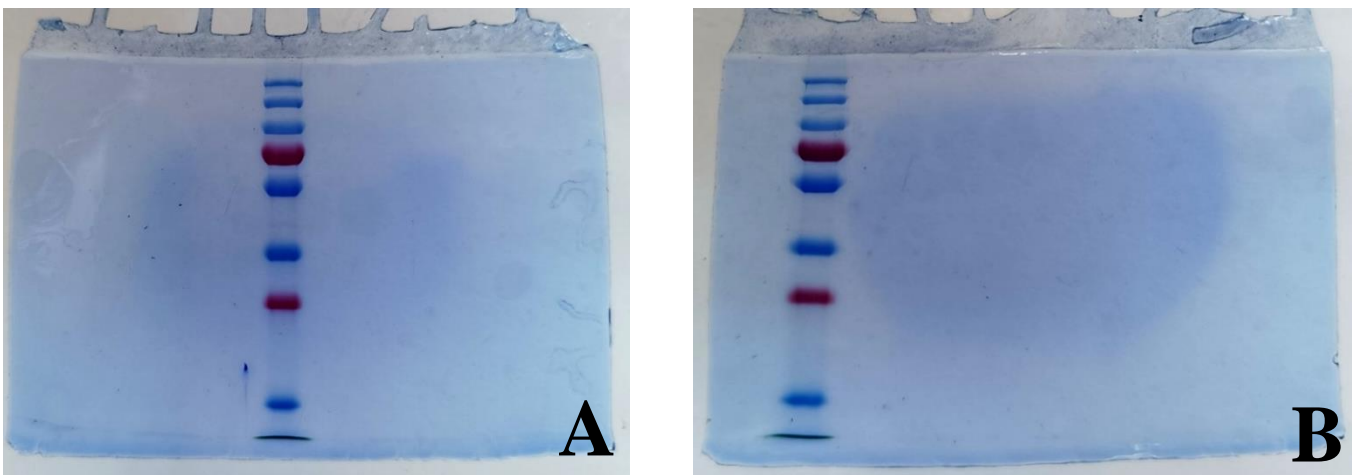


Figura 26.- Electroforesis resultante de la savia. (A): Electroforesis resultante de la muestra de savia extraída del concentrado de la ultrafiltración. (B): Electroforesis resultante de la muestra de savia extraída del permeado de la ultrafiltración.

4.4.- *Elaboración de films a partir de la savia*

Se prepararon *films* con gelatina y alternativamente con caseína aditivados con savia, de tal manera que dichas proteínas fueron disueltas directamente en la savia para formar la solución formadora de *films*. Además, también se elaboraron estos bioplásticos concentrando la savia tres veces previa liofilización, tal y como se describió en la sección

de *Metodología*, con el objetivo de poder evaluar el efecto de la savia concentrada sobre las propiedades de los materiales preparados.

Como se observa en la Figura 27, se llevó a cabo la elaboración de dos tipos de biopelículas biodegradables, realizadas con savia junto con biopolímeros como la gelatina y la caseína, de tal manera que puedan ser una alternativa al plástico de embalaje habitual en la industria alimentaria. Cabe destacar que, en el caso del *film* de caseína, es de tonalidad más amarillenta con respecto al *film* de gelatina, posiblemente, debido a la concentración de azúcares que existe en la savia. Sin embargo, los *films* de gelatina presentan una tonalidad menos amarillenta, siendo más transparente. Se consiguieron despegar de la placa de plástico sin dañar la superficie de éstos, mostraron un aspecto homogéneo y bastantes opacos.

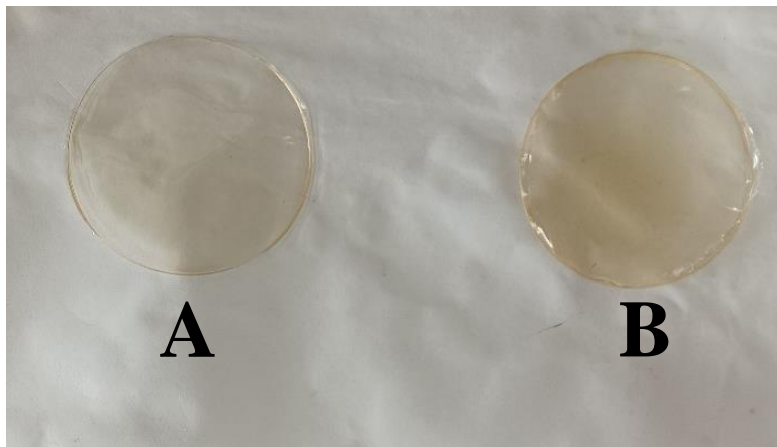


Figura 27.- *Films* resultantes. (A): *Film* de gelatina, glicerol y savia. (B): *Film* de caseína, glicerol y savia.

4.4.1. Transmitancia y transparencia

Las propiedades de transmisión de luz de estos *films*, se evaluaron en longitudes de onda desde los 200 hasta los 800 nm, y se calculó el porcentaje de transmitancia de luz (Tabla 9). Los *films* elaborados con savia de abedul y gelatina muestran unos valores de transmitancia muy similares a los elaborados con agua destilada y gelatina, no obstante, presentan mayor porcentaje los realizados con savia, y en concreto, poseen un mayor porcentaje los realizados con savia concentrada. En el caso de los *films* con caseína, aquellos realizados como grupo control, es decir, con agua destilada, presentan un mayor porcentaje de transmitancia, lo cual se puede apreciar visualmente, en comparación con los realizados con savia, tanto sin concentrar como concentrada. Esto quiere decir que, en

el caso de los *films* realizados a partir de caseína, la savia, les aporta una capacidad de actuar como una barrera contra la luz ultravioleta (200-300 nm) y contra la luz visible (300-600 nm), mientras que, en el caso de los *films* con gelatina, ocurre totalmente lo contrario. Por ello, aquellos que presentan un bajo porcentaje de transmitancia pueden suponer una mejor barrera frente a la luz solar como a la radiación ultravioleta, dos potentes agentes oxidantes de compuestos fotosensibles como los lípidos, presentes en los alimentos. Por lo tanto, la concentración de la savia junto con la incorporación de caseína les aporta mejores características en cuanto a resistencia a la luz tanto ultravioleta como visible.

Tabla 9.- Valores de transmitancia de los *films* de gelatina y caseína con savia y savia concentrada y con agua destilada (grupo control).

% TRANSMITANCIA								
<i>Films</i>	%T (200)	%T (280)	%T (350)	%T (400)	%T (500)	%T (600)	%T (700)	%T (800)
<i>Control Gelatina</i>	0,28 ± 69,66	53,24 ± 66,1	79,9 ± 28,43	88,6 ± 16,05	93,8 ± 8,77	95,2 ± 6,79	95,45 ± 6,4	95,6 ± 6,22
<i>Savia Gelatina</i>	97,45 ± 2,61	99,55 ± 0,35	99,75 ± 0,21	99,8 ± 0,14	99,8 ± 0,07	99,8 ± 0,07	99,9 ± 0,14	99,8 ± 0,14
<i>Savia Concentrada Gelatina</i>	96,75 ± 0,78	99,4 ± 0,14	99,05 ± 0,07	99,65 ± 0,07	99,5 ± 0,07	99,6 ± 0,07	99,6 ± 0,0	99,7 ± 0,07
<i>Control Caseína</i>	97,65 ± 0,63	99,85 ± 0,07	99,85 ± 0,07	99,95 ± 0,07	100 ± 0	99,8 ± 0,28	99,8 ± 0,28	99,8 ± 0,21
<i>Savia Caseína</i>	42,1 ± 48,36	46,75 ± 45,3	53,95 ± 35,1	78,45 ± 0,65	78,45 ± 0,5	82,5 ± 5,94	83,9 ± 7,92	84,2 ± 9,91
<i>Savia Concentrada Caseína</i>	41,15 ± 1,06	39,45 ± 1,48	43,6 ± 0,14	41,75 ± 1,48	41,1 ± 0,07	42,2 ± 0,07	40,4 ± 0	43,2 ± 0,06

En cuanto a la transparencia de estas biopelículas, se observa una disminución con la adición de la savia a ambos tipos de *films* (Tabla 10), consiguiendo un mayor porcentaje en aquellos que se realizaron con agua destilada. Los valores de transparencia se muestran como un número que correlaciona la absorbancia del *film* con su grosor, por lo que, cuanto más luz absorba el *film*, menor es la transmitancia y por lo tanto la transparencia. Por ello, cuanto mayor sea el valor de la relación A_{600}/x , menor es el valor de transparencia. En

concordancia con lo citado, al añadir savia y savia concentrada a los *films* de gelatina y caseína, aumenta la relación $A_{600/x}$ y por tanto disminuye la transparencia de los *films*, pero aumenta el efecto barrera. Además, existen diferencias significativas entre los distintos tipos de *films* de manera que se puede concluir que la adicción de savia concentrada produce una disminución de la transparencia, lo cual puede deberse a una mayor concentración de compuestos coloreados aportados por la savia, presumiblemente fenoles.

4.4.2. Colorimetría

En el caso de las propiedades colorimétricas (Tabla 10), se observan en primer lugar los valores de L^* que aumentan en el caso de los *films* preparados con savia y con savia concentrada, mientras que los *films* de caseína y savia y savia concentrada presentan unos valores más bajos que en los *films* control de caseína. Estos resultados muestran que el empleo de savia como solvente para elaborar los *films* permite obtener biopelículas más opacas y oscuras, es decir, una disminución de la luminosidad. Además, no existen diferencias que puedan considerarse significativas entre todos los tipos de *films* dentro de este parámetro, aunque el análisis estadístico exprese que las haya. En el caso de los valores de a^* , ambos tipos de *films*, tanto con gelatina como con caseína, superan los valores aportados por los *films* control, por lo que tienen un gran peso en la coordenada a^* , la cual es la que comprende el rojo/verde, por lo que, en este caso, debido a que los *films* presentan un color marrón, los valores de a^* aumentan. Por otro lado, al añadir savia de abedul simplemente, y concentrada a los *films* de caseína, se observa un aumento de los valores de b^* , debido a esto los bioplásticos realizados adquirieron una coloración amarillenta. Sin embargo, en los *films* de gelatina, existen valores más bajos que con respecto a los *films* grupo control, por esta razón no tienen tanta tonalidad amarillenta, sino más azulada, siendo los *films* con una menor tonalidad de este tipo, los *films* realizados con savia concentrada. Estos valores de a^* y b^* son acordes a estudios de otros autores, en los que la adición de gelatina disminuye estos parámetros, teniendo así una tonalidad más azulada, mientras que con la caseína ocurre lo contrario (Saikia y Badwaik, 2017).

Respecto a la diferencia total de color (ΔE^*) de los *films* de gelatina con ambos tipos de savia, sí aparecen diferencias debido a que, tras la concentración, se aumenta el contenido de biopolímeros. Mientras que, con los *films* de caseína, no aparecen

distinciones entre los dos tipos de materia prima, es decir, la savia. Estos resultados, concuerdan con los resultados de *chroma* o cantidad total de color, ya que estos aumentan al elevar la concentración de savia. No obstante, con los valores de *WI* ocurre totalmente lo opuesto, aumentan a medida que disminuyen los valores de savia concentrada añadida, habiendo diferencias significativas entre los *films* control y los que presentan la savia; ya que como se ha mencionado previamente la adición de savia produce una pérdida de luminosidad de los *films*.

Por último, se encuentra el valor de *YI* o índice de amarillez, que relaciona los parámetros de b^* y L^* . Este parámetro presenta mayores valores, en los *films* de caseína y savia concentrada frente al control; mientras que los *films* de gelatina y savia presentan menor porcentaje de amarillez que los realizados a partir del agua destilada, lo cual concuerda con los valores de *WI* y b^* . Así mismo, se pueden observar diferencias significativas entre los distintos tipos de savia, siendo mayor el índice de amarillez en el caso de la savia pasteurizada.

Tabla 10.- Transparencia y atributos de color de los *films* de savia y savia concentrada tanto con caseína como de gelatina, y los *films* con agua destilada (*films* control).

<i>Films</i>	Transparencia	L^*	a^*	b^*	ΔE^*	<i>WI</i>	<i>Chroma</i>	<i>YI</i>
<i>Control Gelatina</i>	$0,377 \pm 0,002^a$	$91,3 \pm 0,14^a$	$1,7 \pm 0^a$	$0,4 \pm 0,14^a$	-----	$91,12 \pm 0,13^a$	$1,75 \pm 0,03^b$	$0,62 \pm 0,22^a$
<i>Savia Gelatina</i>	$0,41 \pm 0,06^a$	$91,55 \pm 0,21^a$	$1,75 \pm 0,07^a$	$-0,45 \pm 0,78^a$	$0,91 \pm 0,8^b$	$91,34 \pm 0,15^a$	$1,88 \pm 0,25^b$	$-0,7 \pm 1,21^a$
<i>Savia Concentrada Gelatina</i>	$0,47 \pm 0,15^a$	$91,35 \pm 1,48^a$	$2,4 \pm 0,85^a$	$-4,65 \pm 0,92^b$	$4,88 \pm 6,5^a$	$89,02 \pm 1,88^a$	$5,2 \pm 1,2^a$	$-7,36 \pm 1,57^b$
<i>Control Caseína</i>	$0,03 \pm 0,009^c$	$91,4 \pm 0,7^a$	$2,55 \pm 0,21^a$	$-1,6 \pm 1,7^b$	-----	$75,73 \pm 37,04^a$	$1,95 \pm 1,22^b$	$-0,48 \pm 1,96^b$
<i>Savia Caseína</i>	$0,81 \pm 0,07^b$	$86,55 \pm 0,35^a$	$3,35 \pm 0,35^a$	$12,6 \pm 3,82^a$	$14,9 \pm 5,5^a$	$81,17 \pm 2,74^b$	$13,07 \pm 3,59^a$	$20,81 \pm 6,38^a$
<i>Savia Concentrada Caseína</i>	$1,22 \pm 0,27^a$	$85,65 \pm 0,92^b$	$3,00 \pm 0,14^a$	$12,1 \pm 4,53^a$	$17,1 \pm 2,4^a$	$80,77 \pm 2,18^b$	$13,49 \pm 4,42^a$	$21,14 \pm 7,33^a$

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

En definitiva, los *films* de caseína y gelatina resultaron presentar una mayor diferencia de color o ΔE y *chroma* a medida que aumenta la concentración de savia, sin embargo, en el resto de parámetros, disminuye su valor cuando se concentra la savia, es decir, presenta una tonalidad menos amarillenta y con menos tendencia a los colores rojizos y azules; además de poseer menos luminosidad ya que decrece el valor de *WI*.

4.4.3. Propiedades mecánicas

En el caso de las propiedades mecánicas, en primer lugar, se observa que en ambos tipos de *films* la adición de savia provoca una tendencia a disminuir su grosor, siendo el efecto mucho más notable en los *films* de caseína que en los de gelatina. Estos resultados sugieren que este compuesto puede alterar la microestructura del *film*, compactándola (Tabla 11).

Tabla 11.- Valores de grosor, resistencia a la punción (PS) y deformación por punción (PD) de los *films* de gelatina y caseína con savia y savia concentrada, y con agua destilada (grupo control).

<i>Films</i>	Grosor (mm)	PS (N/mm)	PD (%)
<i>Control Gelatina</i>	0,13 ± 0,019 ^a	520268,6 ± 139403,74 ^a	52,75 ± 1,58 ^a
<i>Savia Gelatina</i>	0,11 ± 0,021 ^a	59916,89 ± 16450,14 ^b	102,56 ± 33,49 ^b
<i>Savia Concentrada Gelatina</i>	0,125 ± 0,007 ^a	61293,37 ± 2828,88 ^b	220,73 ± 52,26 ^c
<i>Control Caseína</i>	0,24 ± 0,07 ^a	26282,04 ± 36426,16 ^a	25,46 ± 2,71 ^a
<i>Savia Caseína</i>	0,082 ± 0,035 ^b	35797,77 ± 3218,14 ^a	69,04 ± 10,62 ^b
<i>Savia Concentrada Caseína</i>	0,133 ± 0,03 ^b	102000,92 ± 18152,3 ^a	79,13 ± 4,32 ^c

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P<0,05).

En segundo lugar, la adición de esta savia de abedul afectó a otros parámetros como la resistencia a la punción (*PS*) y la deformación por punción (*PD*), provocando que la formación de *films* con savia, tanto de caseína como de gelatina, presenten un aumento en los valores de *PS* y *PD* con respecto a los *films* control. No obstante, estos valores se alcanzan de forma más acusada con la adición de savia concentrada. El aumento

en *PS* indica que existe un aumento de elasticidad en un grosor disminuido (Guilbert et al., 2000), por lo que resulta interesante para emplear estos materiales como medio de embalaje de alimentos. Por otro lado, los valores de *PD*, se refieren a la cantidad de energía que se necesita para romper un determinado grosor del *film*, por lo que a mayor valor de *PD*, mayor energía se requerirá, de manera que mayor resistencia a la rotura tiene este *film*. En este último parámetro, aparecen diferencias significativas entre los distintos tipos de película, siendo los de mayor valor los que presentan la savia de abedul concentrada, lo cual debería quedar reflejado en la microestructura de estos materiales, tal y como se verá en apartados siguientes mediante microscopía electrónica.

4.4.4. Permeabilidad al vapor de agua (WVP) y solubilidad

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) de este tipo de *films* con biopolímeros, depende de la concentración del biopolímero (caseína y gelatina), el tipo y la cantidad de plastificador utilizado y la cantidad y tipo de aditivos añadidos a la solución de los *films*, en este caso la savia de abedul (Weng et al., 2021). Los valores de WVP obtenidos reflejan un aumento de la permeabilidad en los *films* de caseína a medida que se eleva la concentración de savia; sin embargo, en el caso de los *films* de gelatina con ambos tipos de savia, ocurre lo contrario, se observa una disminución de los valores de permeabilidad con respecto a los *films* de gelatina realizados con agua destilada (Tabla 12). Este decrecimiento en el valor de WVP que presentan los *films* de gelatina con savia puede deberse a que la acción conjunta de estos compuestos conlleva una acción plastificante, tapando los poros de estas biopelículas y disminuyendo la permeabilidad o mejorando la estructura y uniones de la matriz del material en cuestión. A su vez, una posible causa del aumento del porcentaje de WVP en los *films* de caseína y savia, puede deberse a que la caseína es una sustancia que cuenta con menor grado de organización proteica, es decir, sus cadenas son más voluminosas (Chen, 1995), pero con cierto movimiento dejando pasar al agua entre sus cadenas, además de una posible presencia de poros que hayan aparecido en los *films*.

Tabla 12.- Valores de permeabilidad al vapor de agua (WVP) y tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) de los *films* de gelatina y caseína con savia y savia concentrada, y con agua destilada (grupo control).

<i>Films</i>	WVTR (g/h×m ²)	WVP (g×mm/ m ² ×h×kPa)
<i>Control Gelatina</i>	37,31 ± 4,74 ^b	2,16 ± 0,35 ^a
<i>Savia Gelatina</i>	38,43 ± 3,23 ^b	1,84 ± 0,3 ^a
<i>Savia Concentrada Gelatina</i>	59,95 ± 6,86 ^a	1,72 ± 0,89 ^a
<i>Control Caseína</i>	42,41 ± 6,02 ^b	1,31 ± 0,59 ^b
<i>Savia Caseína</i>	34,82 ± 5,18 ^b	1,48 ± 0,32 ^b
<i>Savia Concentrada Caseína</i>	119,403 ± 34,63 ^a	6,76 ± 0,84 ^a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P<0,05).

En el caso de la solubilidad de los *films*, se observa que, en los *films* con caseína y savia, existe un 100% de solubilidad (Tabla 13), no obstante, la caseína es un tipo de proteína que es insoluble en disolventes orgánicos, y por tanto la solubilidad en un disolvente polar como es el agua es nula, sin embargo, la adición de savia puede que favorezca la solubilidad total de los *films* aunque estén realizados con caseína. A su vez, en el caso de los *films* de gelatina con savia, se observan valores elevados de solubilidad, sobre todo cuando el pH es 9, ya que la gelatina sumergida en un disolvente polar frío o a temperatura ambiente, se solidifica, y junto con la concentración de la savia, esta solidificación se ve favorecida. Sin embargo, estos resultados no son acordes a los obtenidos por otros autores, ya que la adición de estas proteínas siempre ha provocado una disminución de solubilidad, aunque nunca a valores de 0%. Este decrecimiento puede deberse a que se crea una película inaccesible al agua cuando se añade a la solución estas proteínas (Gennadios y Weller, 1990).

Tabla 13.- Valores de solubilidad de los *films* de gelatina y caseína con savia y savia concentrada, y con agua destilada (grupo control) a distintos valores de pH.

<i>Films</i>	% Solubilidad
<i>Control Gelatina pH 5</i>	25,51 ± 5,97 ^c
<i>Savia Gelatina pH 5</i>	66,18 ± 10,008 ^b
<i>Savia Concentrada Gelatina pH 5</i>	67,8 ± 8,12 ^a
<i>Control Gelatina pH 7</i>	35,67 ± 5,72 ^c
<i>Savia Gelatina pH 7</i>	78,66 ± 2,63 ^b
<i>Savia Concentrada Gelatina pH 7</i>	79,08 ± 2,56 ^a
<i>Control Gelatina pH 9</i>	40,81 ± 11,15 ^c
<i>Savia Gelatina pH 9</i>	83,23 ± 3,65 ^b
<i>Savia Concentrada Gelatina pH 9</i>	84,07 ± 3,95 ^a
<i>Control Caseína pH 5</i>	100 ± 0 ^a
<i>Savia Caseína pH 5</i>	100 ± 0 ^a
<i>Savia Concentrada Caseína pH 5</i>	100 ± 0 ^a
<i>Control Caseína pH 7</i>	100 ± 0 ^a
<i>Savia Caseína pH 7</i>	100 ± 0 ^a
<i>Savia Concentrada Caseína pH 7</i>	100 ± 0 ^a
<i>Control Caseína pH 9</i>	100 ± 0 ^a
<i>Savia Caseína pH 9</i>	100 ± 0 ^a
<i>Savia Concentrada Caseína pH 9</i>	100 ± 0 ^a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P<0,05).

4.4.5. Microestructura

En las micrografías de la Figura 28 se observan las microestructuras de la sección transversal de los *films* de gelatina y caseína con savia, savia concentrada y aquellos tomados como control, es decir, realizados con agua destilada. Tal y como se pudo observar con las propiedades mecánicas y en los resultados de permeabilidad al vapor de agua, el empleo de savia como solvente de los biopolímeros, gelatina y caseína, para la elaboración de los *films* afectó a su microestructura, siendo el efecto mucho más notorio en el caso de los *films* elaborados con caseína frente a los de gelatina. Esto es debido a que a medida que aumenta la concentración de savia añadida se pueden reconocer numerosos poros que hace que sea menos compacta la microestructura de los *films* de caseína que de gelatina. No obstante, en el resto de *films*, se obtienen matrices homogéneas y compactas, lo cual podría estar relacionado con el aumento en el porcentaje de elasticidad de los *films* realizados con gelatina, ya que representa las fibrillas de colágeno que componen la gelatina (Chambi y Grosso, 2006). Por otra parte, algunos trabajos indican los espacios vacíos presentes en los *films* de caseína, como espacios ocupados por el glicerol que se incorpora como plastificante a la solución formadora de *films*. Este hecho parece estar relacionado con la separación de fases del plastificante dentro de la matriz proteica que ocurre normalmente durante el secado en la estufa del *film*. Sin embargo, la ausencia de estos espacios vacíos en los *films* de gelatina, indican una correcta compatibilidad del plastificante con la gelatina (Chambi y Grosso, 2006).

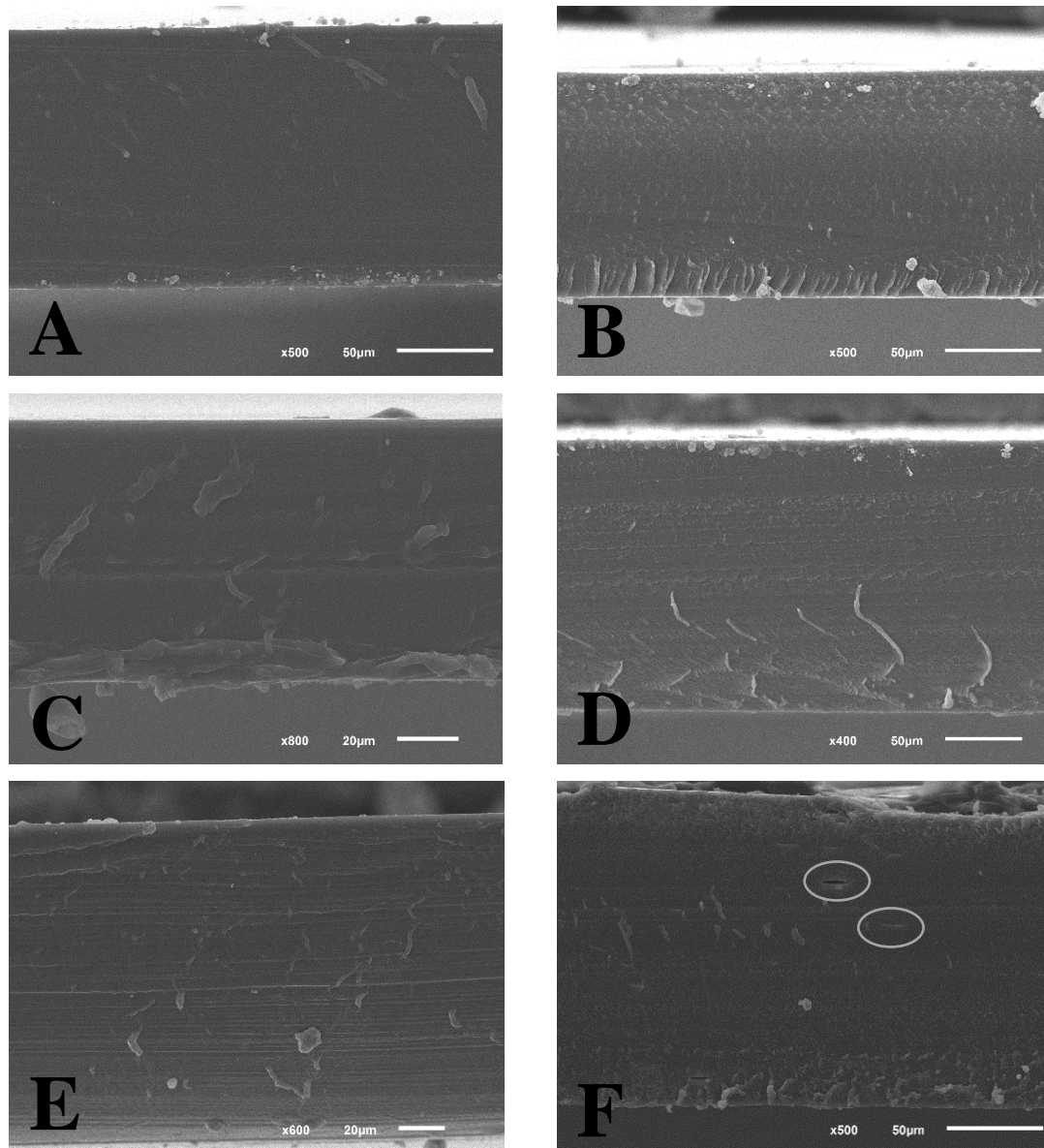


Figura 28.- Micrografías de los *films* de gelatina y caseína con savia de abedul y concentrada. (A): *Film* control con gelatina. (B): *Film* control con caseína. (C): *Film* con gelatina y savia. (D): *Film* con caseína y savia. (E): *Film* con gelatina y savia concentrada. (F): *Film* con caseína y savia concentrada, en el que se señalan los espacios vacíos formados.

4.4.6. Propiedades antioxidantes

Los resultados del estudio de las propiedades antioxidantes medidas mediante el método del DPPH de los *films* de gelatina y caseína elaborados con savia se pueden observar en la Tabla 14. Se puede apreciar que en todos los casos, tanto con gelatina como con caseína y con mayor o menor concentración de savia, se alcanzaron valores de capacidad antioxidante tras 24 horas de ensayo de aproximadamente el 90%. En cuanto al método ABTS, no se pudo llevar a cabo el ensayo ya que los *films* se disolvían en el

medio de reacción y resultaba imposible realizar la medida de absorbancia con el espectrofotómetro.

Tabla 14.- Resultados de la capacidad antioxidante de los *films* de gelatina y caseína junto con savia y savia concentrada, tras la realización del método DPPH.

Tiempo (Horas)	% Antioxidante de <i>films</i> de gelatina y savia	% Antioxidante de <i>films</i> de gelatina y savia concentrada	% Antioxidante de <i>films</i> de caseína y savia	% Antioxidante de <i>films</i> de caseína y savia concentrada
0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
0,5	15,41 ± 0,03	51,35 ± 0,006	15,88 ± 0,03	31,8 ± 0,1
4	30,98 ± 0,02	52,44 ± 0,17	54,4 ± 0,01	31,93 ± 0,09
6	50,25 ± 0,02	59,85 ± 0,07	73,87 ± 0,02	79,22 ± 0,003
24	90,55 ± 0,07	91,91 ± 0,002	88,92 ± 0,004	90,6 ± 0,004

En general, como se puede observar en la Tabla 14, ambos tipos de *films* experimentaron un aumento del porcentaje de la capacidad antioxidante a medida que pasan las horas, llegando a tener un porcentaje de capacidad antioxidante muy semejante al final, tanto si es con savia como si es con savia concentrada. Sin embargo, la estabilidad en cuanto a la actividad antioxidante se consigue más rápidamente con *films* realizados con la savia concentrada, ya que se concentran todos los compuestos que aportan este tipo de capacidad antioxidante, como los ácidos orgánicos o los fenoles, consiguiendo una liberación en el medio más rápida. Esta idea es respaldada por otros autores que afirman que las biopelículas basadas en la gelatina enriquecida con compuestos bioactivos mostraron mayores capacidades antioxidantes que aquellas que presentan solamente gelatina (Salem et al., 2021). En cuanto a los *films* de caseína, se observa un aumento de actividad antioxidante debido a que la proteína láctica, kappa-caseína, puede liberar péptidos antioxidantes (Kudoh et al., 2001), aunque ésta dependa.

4.4.7. Propiedades quelantes

Como se muestra en la Tabla 15, se observa que la savia en *films* de gelatina presenta una gran capacidad quelante (35,08 ± 0,01%) y en *films* de caseína aparece una mayor propiedad quelante (40,52 ± 0,05%), por tanto, es capaz de formar complejos con metales pesados. Esta capacidad es de gran importancia, ya que los metales pesados no pueden ser metabolizados por el cuerpo humano, y cuando persisten en el organismo,

pueden ejercer efectos nocivos para las funciones fisiológicas normales cuando se combinan con uno o más grupos reactivos (ligandos) esenciales (Robles y Pastor, 1993). Los quelantes, se diseñan para competir con los metales por los grupos reactivos fisiológicos, evitando o revirtiendo así, sus efectos tóxicos e incrementando su excreción. El interés biológico de los quelantes se origina a partir de los esfuerzos para controlar los restos de metales que contribuyen al deterioro de los alimentos. De manera que, si se encuentran capacidad quelante por parte del *film* encargado del *packaging* del alimento, éste prevendría la presencia excesiva de metales pesados en el producto.

Tabla 15.- Resultados de la capacidad quelante de los *films* de gelatina y caseína con savia y savia concentrada, y agua destilada.

Muestra	% Capacidad Quelante
<i>Film Control Gelatina</i>	-----
<i>Film Savia Gelatina</i>	35,08 ± 0,01
<i>Film Savia Concentrada Gelatina</i>	41,29 ± 0,01
<i>Film Control Caseína</i>	-----
<i>Film Savia Caseína</i>	40,52 ± 0,05
<i>Film Savia Concentrada Caseína</i>	59,6 ± 0,002

Como se observa en la Figura 29 y 30, los *films* de gelatina, con ambos tipos de savia, mostraron una gran capacidad quelante.. Por otra parte en los *films* de caseína se observa un aumento de capacidad quelante con respecto a los *films* de gelatina, debido a que existen fosfopéptidos de caseína que son péptidos bioactivos que tienen la capacidad de captación de metales pesados como el hierro o el cinc (García, 2012).

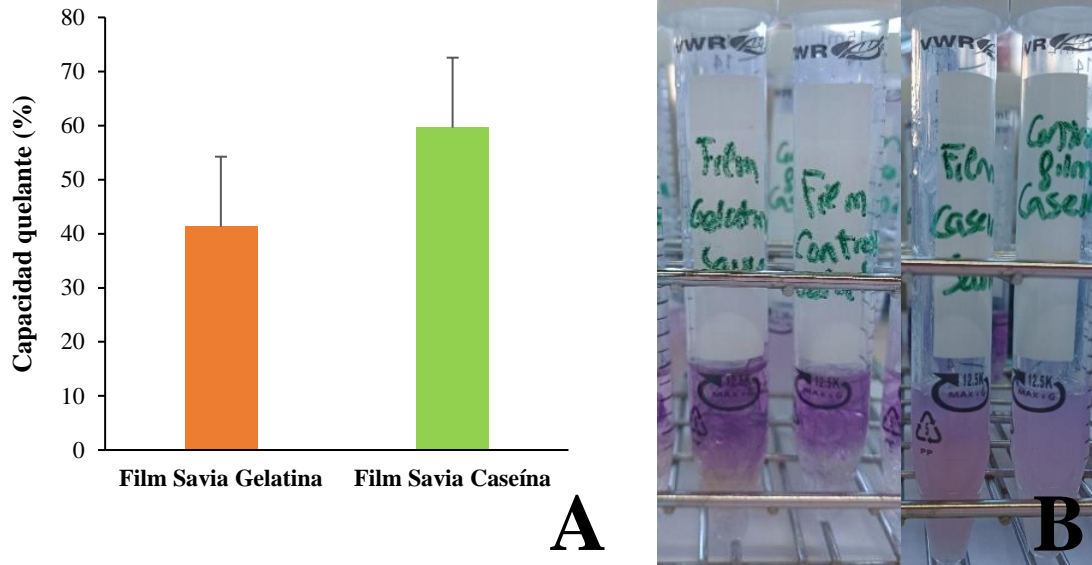


Figura 29.- Resultado de la propiedad quelante de los *films* de savia con caseína y gelatina en comparación con el *film* control. (A): Representación de la actividad quelante de los *films* de savia con gelatina y caseína. (B): Propiedad quelante de los *films* de savia con gelatina y caseína, y sus respectivos *films* controles.

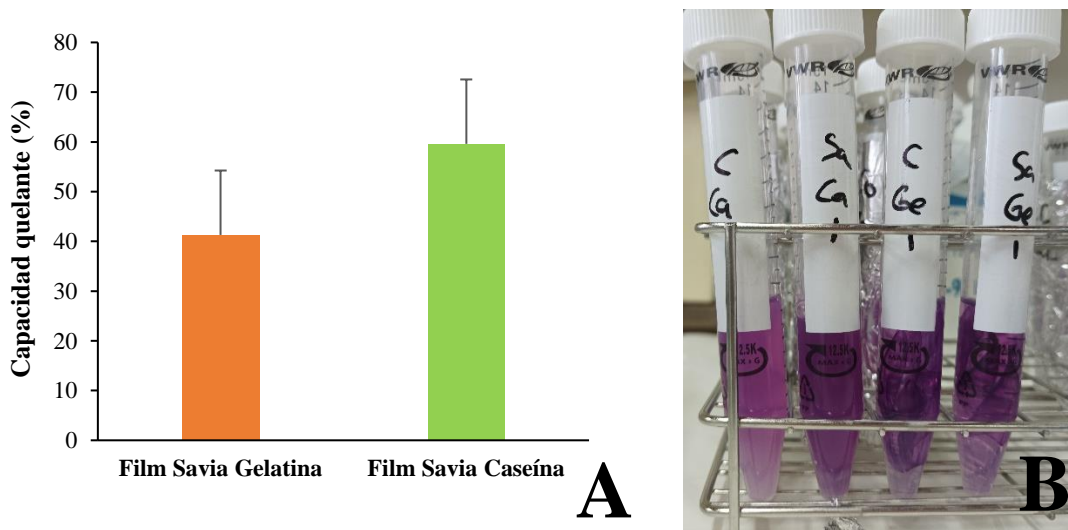


Figura 30.- Resultado de la propiedad quelante de los *films* de savia concentrada con caseína y gelatina en comparación con el *film* control. (A): Representación de la actividad quelante de los *films* de savia concentrada con gelatina y caseína. (B): Propiedad quelante de los *films* de savia concentrada con gelatina y caseína, y sus respectivos *films* controles.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio han permitido evaluar el uso alternativo de la savia de abedul como aditivo para la elaboración de bioplásticos con capacidades antioxidantes y quelantes extendidas. De forma individualizada, las conclusiones obtenidas en este trabajo son:

- La savia de abedul recolectada resulta tener 0,02 g/100 mL de proteínas, 0,5 g/100 mL de carbohidratos totales, 0,4 g/100 mL de azúcares reductores y 0,001 g/100 mL de compuestos fenólicos. Existen variaciones entre las concentraciones de estos compuestos detectada y la encontrada en la bibliografía, lo cual se podría explicar debido a que existen diferencias en la composición de la savia de abedul según la especie que se esté investigando o de las condiciones climáticas de la estación en la que se recolecta esta savia.
- Los altos porcentajes de capacidad antioxidante y quelante de la savia de abedul, indican la multitud de propiedades bioactivas que puede aportar la ingesta de este tipo de producto.
- Si se persigue aumentar el periodo de conservación de la savia, el mejor tratamiento térmico resultó ser el calentamiento de la savia a 100 °C y un pH con valor de 4, no obstante, el calentamiento a 70 °C y la variación de pH a 3 o 6 también resultan efectivos.
- La ultrafiltración llevada a cabo con una membrana de 5 kDa MWCO debería conllevar teóricamente a una redistribución de al menos algunos de los biopolímeros presentes en la savia, sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos, la ultrafiltración no tuvo ningún efecto sobre la composición del concentrado ni del permeado, resultando idénticos.
- El empleo de savia de abedul concentrada o sin concentrar como solvente en la elaboración de bioplásticos, con biopolímeros como la gelatina y la caseína, provoca una mejoría en los valores de las propiedades físicas de estos *films* como son: los valores de transparencia y transmitancia, propiedades mecánicas, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad, capacidad antioxidante y quelante.
- Las propiedades antioxidantes y quelantes que presentan los *films* de savia, tanto con gelatina como con caseína, sugieren el posible uso de éstos como *packaging* alimentario.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahtonen, S. y Kallio, H. (1989) "Identification and seasonal variations of amino acids in birch sap used for syrup production". *Food Chemistry*, 33, pp.125-132.

Akhtar, M.J., Jacquot, M., Jamshidian, M., Imran, M., Arab-Tehrany y E., Desobry, S. (2013) "Fabrication and physicochemical characterization of HPMC *films* with commercial plant extract: influence of light and film composition". *Food Hydrocolloids*. 31, 420–427.

Alonso, S., Herrero, M., Rendueles, M. y Díaz, M. (2014) "Physiological heterogeneity in *Lactobacillus casei* fermentations on residual yoghurt whey". *Process Biochemistry*, 49(5), pp.732–739.

Atarés, L. y Chiralt, A. (2016) "Essential oils as additives in biodegradable *films* and coatings for active food packaging". *Trends Food Science Technology*, 48, pp.51-62.

Asadi, S. y Pirsa, S. (2020) "Production of biodegradable *films* base don polylactic acid, modified with lycopene pigment and TiO₂ and studying its physicochemical properties". *Journal of Polymers and the Environment*, 28(2), pp.433-444.

Ball, C.O. y Olson, F.C.W. (1957) *Sterilization in Food Technology*. New York: McGraw-Hill.

Berg G. (1933) "Nordskandinaviskt-nordeuropeiskt". *Rig*, 16, pp.118-139.

Bernadette, A. y Flórez-Castillo, J.M. (2020) *Biopolímeros como sistemas de bioencapsulación*. Universidad de Santander, Grupo de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas para la Sostenibilidad-CIBAS. doi: 10.13140/RG.2.2.19521.17767/1.

Bilek M., Kuźniar P. y Cieślik E. (2016) "Cadmium content in the drinking birch sap collected from the agriculture area". *Medycyna Środowiskowa - Environmental Medicine*, 19(3), pp.31-35.

Bilek M., Pytko J. y Sosnowski S. (2016) "Shelf life of birch tree sap". *Polish Journal for Sustainable Development*, 20, pp.7-14.

Bilek M., Pytko J., Dżugan M. y Sosnowski S. (2016) "The possibility of shelf life extension of birch tree sap by creating a beverage with improved taste and health-promoting properties". *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*, 71, pp.5-19.

Bilek M., Szwerc W. y Kocjan R. (2017) "Heavy metals (Pb, Cd, Cr, Ni) content as a potential risk factor, limiting birch tree sap usefulness". *Postępy Fitoterapii*, 18, pp.183-189.

Bilek, M., Wawer, J., Szwerc, W., Słowik, K. y Sosnowski, S. (2018) "Birch sap concentrate as a potential modern food product". *Econtechmod: scientific journal*, 1(1), pp.5-9.

Bilek, M., Cebula, E., Krupa, K., Lorenc, K., Adamowicz, T. y Sosnowski, S. (2018) "New technologies for extending shelf life of birch tree sap". *Econtechmod. an International Quarterly Journal*, 7(4), pp.3-8.

Bilek, M., Pilch, K., Wawer, J. y Sosnowski, S. (2020) "Microfiltered birch sap concentrate as an innovative, sustainable food with high nutritional value". *Czytelnia Medyczna*, 23(2), pp.48-55.

Boroduškis, M., Kaktina, E., Blāke, I., Nakurte, I., Dzabijeva, D., Kusina, I., Mičule, S. y Ramata-Stunda, A. (2017) "Chemical characterization and *in vitro* evaluation of birch sap and a complex of plant extracts for potential use in cosmetic anti-ageing products". *Environmental and Experimental Biology*, 15, pp.29-36.

Cabanillas, B., Maleki, S.J, Rodríguez, J., Cheng, H., Teuber, S.S, Wallowitz, M.L, Muzquiz, M., Pedrosa, M.M, Linacero, R., Burbano, C., Novak, N., Cuadrado, C. y Crespo, J.F (2014) "Allergenic properties and differential response of walnut subjected to processing treatments". *Food Chemistry*, 157, pp.141-147.

Casas, I.A. y Dobrogosz, W.J. (2000) "Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals". *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12(4), pp.247-285.

Casado, M. (2014) *Aplicaciones de la Electroforesis Capilar en el estudio de Errores Congénitos del Metabolismo*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.

Chambi, H. y Grosso, C. (2006) "Edible *films* produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase". *Food Research International*, 39, pp.458-466.

Chen, H. (1995) "Functional properties and applications of edible *films* made of milk proteins". *Journal of Dairy Science*, 78, pp.2563-2583.

Christensen, K. V., Valgren, M., Toft, L. y Hansen, K. (2008) "Concentration of birch sap using MF, RO and DCMD". Nordic Filtration Symposium, København, Denmark.

Da Rocha, M., De Souza, M.M. y Prentice, C. (2018) "Chapter 9: Biodegradable *films*: an alternative food packaging". En A.M. Grumezescu y A.M. Holban (Eds.), *Food Packaging and Preservation*, pp.307-342. Academic Press. doi: doi.org/10.1016/B978-0-12-811516-9.00009-9.

Debeaufort, F., Voilley, A. (2009) "Lipid-based edible *films* and coatings". En Embuscado, M.E., Huber, K.C. (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Springer, New York, pp.135-168.

Decker, E.A., Crum, A.D. y Calvert, J.T. (1992) "Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(5), pp.756-759.

De Man, J.C, Rogosa, M. y Sharpe, M.E. (1960) "A Medium for the cultivation of *Lactobacilli*". *Journal of Applied Microbiology*, 23(1), pp.130-135.

Díaz, A.I., Laca, A., Laca, A. y Díaz, M., (2017) "Treatment of supermarket vegetable wastes to be used alternative substrates in bioprocesses". *Waste Management*, 67, pp.59-66.

Dick, M., Costa, T.M.H., Gomaa, A., Subirade, M., Ríos, A. O. y Flôres, S.H. (2015) "Edible *film* production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties". *Carbohydrate Polymers*, 130, pp.198-205.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. (1956) "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances". *University of Minnesota*, 28(3), pp.350-356.

Durán-Maestro, R. y Borja-Padilla, R. (1993) "Actividad antioxidante de esteroides y ácidos orgánicos naturales". *Grasas y aceites*, 44(3), pp.208.

Elzoghby, A.O., El-Fotoh, W.S.A. y Elgindy, N.A. (2011) "Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems". *Journal of Controlled Release*, 153(3), pp.206–216.

Francis, F. J. y Clydesdale, F. M. (1977). *Food colorimetry: Theory and applications*. doi: <https://doi.org/10.1002/food.19770210122>.

García, M.J. (2012) *Efectos biológicos de los fosfolípidos de la caseína en ensayos in vitro*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

Gennadios, A., y Weller, L. (1990) "Edible *films* and coatings from wheat and corn proteins". *Food Technology*, 44, pp.63-69.

Gratzfeld-Hüsgen, A. y Schuster, R. (2001) *HPLC for food analysis*. Alemania: Agilent Technologies Company.

Górska K. y Pietkiewicz J. (2009) "Technological functions and characteristic of food acids". *Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu*, 57, pp.141-158.

Guilbert, S., Gontard, N., Morel, M. H., Chalier, P., Micard, V., y Redl, A. (2002) "Formation and properties of wheat gluten *films* and coatings". En A. Gennadios (Eds.). *Protein-based films and coatings*, pp.69-122.

Helffferich, D. (2021) *Birch: white gold in the boreal forest*. Agricultural and Forestry Experiment Station, School of Natural Resources and Agricultural Sciences, University of Alarka Fairbanks.

Heatherbell, D. A. (1974) "Rapid concurrent analysis of fruit sugars and acids by gas-liquid chromatography". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25, pp.1095-1107.

Hongzhou, J., Yuichi, S., Yutaka, T. y Minoru, T. (2001) "Proteins in the exudation sap from birch trees, *Betula platyphylla sukatchev* var. *japonica* and *Betula verrucosa her*". *Eurasian Journal Forest Research*, 2, pp.59-64.

Jeong, S.J., Jeong, H.S., Woo, S.H. y Shin, C.S. (2013) "Consequences of ultrafiltration and ultraviolet on the quality of white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) sap during storage". *Australian Journal of Crop Science*, 7(8), pp.1072-1077.

Jiang, H., Sakamoto, Y., Tamai, Y. y Terazawa, M. (2001) "Proteins in the exudation sap from birch trees, *Betula platyphylla sukatchev* var. *japonica hara* and *Betula verrucosa her*". *Eurasian Journal of Forest Research*, 2, pp.59-64.

Kaillo, H., Karppinen, T. y Holmbom, B. (1985) "Concentration of birch sap by reverse osmosis". *Journal of Food Science*, 50, pp.1330-1332.

Kallio, H., Ahtonen, S., Raulo, J. y Linko, R. R. (1985) "Identification of the sugars and acids in birch sap". *Food Science*, 50, pp.266-269.

Kallio, H. y Ahtonen, S. (1987) "Seasonal variations of acids in birch sap". *Food Chemistry*, 25, pp. 285-292.

Kallio, H., Teerinen, T., Ahtonen S., Suihko, M. y Linko, R.R. (1989) "Composition and properties of birch syrup (*Betula pubescens*)" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, pp.51-54.

Kallio, H., Lahdenoja, M. y Penttinen, R. (1995) "Electrophoretic profiles of Birch sap proteins of *Betula pubescens*, *B. pendula* and *B. pendula forma carelica* in Finland with reference to overall composition of sap". En: Terazawa, M., McLeod, C.A., Tamai, Y. (Eds.). *Proceedings of the 1st International Symposium on Sap Utilization*, pp.13-21.

Khalil, H.P.S.A., Banerjee, A., Saurabh, C.K., Tye, Y.Y., Suriani, A.B., Mohamed, A., Karim, A.A., Rizal, S. y Paridah, M.T. (2018) "Biodegradable *films* for fruits and vegetables packaging application: Preparation and Properties". *Food Engineering Reviews*, 10(3), pp.139-153.

Khan, M.R., Volpe, S., Valentino, M., Miele, N.A., Cavella, S. y Torrieri, E. (2021) "Active casein coatings and *films* for perishable foods: structural properties and shelf-life extensión". *Coatings*, 11, pp.899.

Klinger, W., Hirschelmann, R. y Suss, J. (1989) "Birch sap and birch leaves extract - screening for antimicrobial, phagocytosis influencing, antiphlogistic and antipyretic activity". *Die Pharmazie*, 44(8), pp.558-560.

Kudoh, Y., Matsuda, S., Igoshi, K. y Oki, T. (2001) "Antioxidative peptide from milk fermentes with *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* IFO13953". *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, 48, pp.44-55.

Kûka, M., Èakste, I. y Gerðebeka, E. (2013) "Determination of bioactive compounds and mineral substances in latvian birch and maple saps". *Proceedings of the latvian Academy of Sciences*, 67(685/686), pp.437-441.

Kumar, A., Karthick, K. y Arumugam, K.P. (2011) "Properties of biodegradable polymers and degradation for sustainable development". *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 2, pp.164-167.

Kuźniar W., Kawa M. y Kuźniar P. (2016) "Consumers towards safe solutions for food production". *Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*, 16, pp.243-250.

Lepeschkin, W. W. (1928) "Untersuchungen fiber das Friihlingsbluten der Birke und des Ahorns". *Planta*, 4, pp.113-39Łuczaj, L., Bilek. M. y Stawarczyk, K. (2014) "Sugar content in the sap of birches, hornbeams and maples in southeastern Poland". *Central European Journal of Biology*, 9(4), pp.410-416.

Luo, Q., Hossen, Md.A., Zeng, Y., Dai, J., Li, S., Qin, W. y Liu, Y. (2022). "Gelatin-based composite *films* and their application in food packaging: a review". *Journal of Food Engineering*, 313.

Łysoniewska E., Kalisz S. y Mitek M. (2011) "Sensory quality of black currant nectars and beverages enriched with echinacea and green tea extracts". *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 79, pp.167-177.

Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr A.L. y Randall, R.J. (1951) "Protein measurement with the Folin-Phenol reagents". *Journal of Biological Chemistry*, 193, pp.265-275.

Madera-Santana, T.J., Freile-Pelegrín, Y. y Azamar-Barrios, J.A. (2014) "Physicochemical and morphological properties of plasticized poly(vinyl alcohol)–agar biodegradable *films*". *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, pp.176-184.

Medlicott, A. y Thompson, A. (1985) "Analysis of sugars and organiz acids in riperning mango fruits (*Mangifera indica* L. var Keitt) by High Performance Liquid Chromatography". *Journal of the Science of food and agricultura*, 36, pp.561-566.

Mihai, C. (2017) "Collection and use of birch sap, a less known non-wood forest product in Romania". *Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development*, 17(1).

Morillon, V., Debeaufort, F., Blondo, G., Capelle, M. y Voilley, A. (2002) "Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, pp.67-89.

Nikolajeva V. y Zommere Z. (2018) "Changes of physicochemical properties and predominant microbiota during storage of birch sap". *International Food Research Journal*, 25, pp.527–533.

Peev, C., Dehelean, C., Mogosanu, C., Feflea, S. y Corina, T. (2010) "Spring drugs of *Betula Pendula* roth.: biologic and pharmacognostic evaluation". *Studia Universitatis "Vasile Goldis", Seria Stiintele Vietii*, 20(3), pp.41-43.

Robles, J. y Pastor, A. (1993) "Toxicología química". *Revista de Química*, 7(1), pp.49-61.

Salem, A., Fakhfakh, N., Jridi, M., Abdelhedi, O., Nasri, M., Debeaufort, F. y Zouari, N. (2020) "Microstructure and characteristic properties of dogfish skin gelatin gels prepared by freeze/spray-drying methods". *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, pp.1-10.

Sancho, I.A., Birk, T., Gregersen, J.M., Rønne, T., Hornest S.E., Madsen, A.M. y Bøgh, K.L. (2022) "Microbial safety and protein composition of birch sap". *Journal of Food Composition and Analysis*, 107.

Sauter, J.J. y Van Cleve, B. (1992) "Seasonal variation of amino acids in the xylem sap of "Populus x canadensis" and its relation to protein body mobilization". *Trees*, 7, pp.26–32.

Schroeder, J. (1865) "Ueber den Friihjahrssaft der Birke". *Jahresber, Agrikulturchem.* 8, pp.157-69.

Semjonovs, P., Denina, I., Formina, A., Patetko, A., Auzina, L., Upite, D., Upitis, A. y Danilevics, A. (2014) "Development of birch (*Betula pendula* Roth.) sap based probiotic fermented beverage". *International Food Research Journal*, 21(5), pp.1763-1767.

Stoll, L., Rech, R., Fôres, S.H., Nachtigall, S.M.B. y Rios, A de O. (2018) "Carotenoids extracts as natural colorants in poly(lactic acid) films". *Journal of Applied Polymer Science*, 135(33), 46585.

Svanberg, I., Soukand, R., Luczaj, L., Kalle, R., Zyryanova, O., Denes, A., Papp, N., Nedelcheva, A., Šeškauskaitė, D., Kolodziejska-Degorska, I. y Kolosova, V. (2012) "Use of tree saps in northern and Eastern parts of Europe". *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81(4), pp.343-357.

Teixeira, A.A. (2015). *Conventional and Advanced Food Processing Technologies*. 1ª.ed. Florida: John Wiley & Sons, Ltd.

Tomchuk, R.I., Korolyak, I.S, Fedchuk, N.F., y Kiba, J.G. (1973) "The use of birch sap in the food Industry". *Nauchno-Issled Rab Lesn Khoz*, 6, pp.80.

Vilaplana, M. (2007) "Antioxidantes presentes en los alimentos". *Offarm*, 26(10), pp.11-141.

Wawer J. y Bilek M. (2017) "Simple reverse osmosis apparatus for the concentration of the local birch tree sap". *Econtechmod: scientific journal*, 72, pp.51-67.

Weng, S., López, A., Sáez-Orviz, S., Marcet, I., García, P., Rendueles, M. y Díaz, M. (2021) "Effectiveness of bacteriophages incorporated in gelatine films against *Staphylococcus aureus*". *Food Control*, 121, 107666.

Wihodo, M. y Moraru, C.I. (2013) "Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein *films*: a review." *Journal of Food Engineering*, 114, pp.292-302.