



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

**Instituto Tecnología de Alimentos - Centro de Investigación de Agroindustria – Castelar-
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria**

Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre la calidad y vida útil de duraznos mínimamente procesados. Aspectos bioquímicos, fisicoquímicos, higiénico-sanitarios, nutricionales y sensoriales

Lic. Gabriela Inés Denoya

Director de tesis: Dr. Gustavo Alberto Polenta

Consejero de estudios: Dra. Patricia Ronayne de Ferrer

Año 2015

“La ciencia no sirve sino para darnos una idea de cuán vasta es nuestra ignorancia”

Félicité Robert de Lamennais (1782-1854)

Dedicada a mi familia

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar, a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Buenos Aires por acompañarme no solamente en mi formación de grado, sino también por brindarme la oportunidad de llevar a cabo el Doctorado. En particular, quisiera agradecer especialmente a la Comisión de Doctorado y a la Escuela de Graduados por el inmejorable trato recibido en todo momento.

Por otra parte, agradezco al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por otorgarme una beca para que pueda realizar este estudio de posgrado y al Programa Nacional de Agroindustria y Valor Agregado de dicha institución que a través del proyecto PE 1130033 financió el trabajo de tesis. Además, quiero agradecer al Instituto de Tecnología de Alimentos del Centro de Investigación de Agroindustria de INTA Castelar por ceder las instalaciones para realizar el trabajo de tesis y a la Estación Experimental INTA San Pedro por brindar la materia prima para poder realizar los ensayos.

Un agradecimiento especial al Departamento de Sanidad, Nutrición, Bromatología y Toxicología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, por dejarme participar del ciclo de seminarios que organizan. En particular, quiero agradecer al Dr. Luis Dyner, por toda su ayuda en lo referente a mi participación en ese ciclo.

También quiero agradecer a la Universidad Nacional de Luján y al Servicio de Microscopía de INTA Castelar, por permitirme utilizar los microscopios para realizar los estudios de micro y ultraestructura.

Además, me gustaría expresar mi más sincero y profundo agradecimiento al Dr. Gustavo Polenta, por su dirección, dedicación, estímulo continuo, criterio, experiencia y paciencia que me ayudaron tanto en mi crecimiento como profesional; a la Dra. Patricia Ronayne de Ferrer, por su gran ayuda, orientación y predisposición a la hora de resolver problemas; al Dr. Sergio Vaudagna, por brindarme tantas oportunidades de crecimiento, por creer y apostar por mí, a la Dra. Claudia González, por confiar en mi potencial como investigadora.

Un especial agradecimiento a la Ing. Yanina Barrio por ser, además de una amiga entrañable, una excelente profesional que sabe compartir todos sus conocimientos con sus pares y por su ayuda en los ensayos, a la Lic. Ana María Sancho, además de por toda su ayuda en el análisis estadístico, por ser esa mano amiga que está siempre dispuesta a ayudar sin pedir nada a cambio, a la Dra. Natalia Szerman, no solo por su ayuda desde su valiosa experiencia como investigadora, sino también por alentarme a que termine el Doctorado, reconociendo el esfuerzo y lo importante que es para mí llevarlo a cabo; a Claudio Sanow, por sus consejos prácticos y porque sin él no podría haber procesado tantas muestras para los ensayos; a los coordinadores Dra. Adriana Pazos, Msc.

Marcelo Massana y Med. Vet. Fernando Carduza por permitirme realizar determinaciones en las áreas del ITA que coordinan y brindarme su asesoramiento en los temas de su experiencia; a la Ing. Celia Benítez, con quien realicé los primeros ensayos en el área procesamiento de alimentos del ITA.

Una mención especial a la Dra. Mariana Nanni, por su colaboración desinteresada para poder realizar las determinaciones correspondientes a expresión relativa de enzimas y ayudarme en la discusión de resultados correspondientes a ese tema; a la Dra. Nancy Apóstolo, que con su vasta experiencia en microscopía colaboró con los estudios de micro y ultraestructura, y me ayudó a interpretar las micrografías en los tejidos; a la Lic. Verónica Chamorro, experta en HPLC, por colaborar en la optimización de la determinación de ácido ascórbico y a la Bioq. Fernanda Godoy, otra excelente profesional, por su colaboración en la determinación de fenoles totales. Al Dr. Claudio Budde y a la Lic. Julieta Gabilondo, por ayudarme a obtener y caracterizar la materia prima, a la Vet. Trinidad Soteras, y a la Vet. Mariana Cap, por su aporte en el ensayo de vida útil, a mis compañeras de área Ing. María Laura Vranic, Msc. Paula Ormando, Dra. Anabel Rodríguez y Vet. Amparo Ecoña Sota, por compartir tantas horas de trabajo juntas. Del área de bioquímica un especial agradecimiento a Marta Signorelli, Cecilia Barreto y Vilma Calderón por ayudarme siempre en el laboratorio cuando las horas de la jornada laboral no alcanzaban.

Y a todos los demás compañeros de trabajo, a los que no puedo nombrar uno por uno porque la lista sería interminable, pero que también estuvieron siempre ahí, ayudándome desde su lugar en cada uno de los problemas laborales y personales que se me fueron presentando a través de este largo camino que fue transitar el doctorado.

A mi familia y amigos fuera de ITA, por acompañarme, ayudarme, comprenderme y porque sin ellos seguramente esto no hubiera sido posible ni tampoco hubiera tenido sentido.

A esa persona especial, que hoy está lejos de mí, pero que fue mi inspiración para poder llegar tan lejos.

Antecedentes

Los resultados presentados están parcialmente incluidos en los trabajos que se detallan a continuación:

“Aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas en duraznos mínimamente procesados” Denoya, G., Del Castillo, L., Pirola, P., Sanow, C., Vaudagna, S., & Benítez, C. (2010). Congreso de Ingeniería 2010. Buenos Aires. (Trabajo completo publicado en Acta de Congreso)

“Effect of High Pressure Processing and vacuum packaging on the preservation of fresh-cut peaches” Denoya, G., Vaudagna, S., & Polenta, G. (2015). LWT-Food Science and Technology, 62 (1), 801-806. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.036>. Editorial Elsevier.

Otras publicaciones afines o relacionadas:

“Comparison of the contents of bioactive compounds and quality parameters in selected mango cultivars” Sellamuthu, P., Denoya, G., Sivakumar, D., Polenta, G., & Soundy, P. (2013). Journal of Food Quality, 36(6), 394-402.

“Alternative sugar substitutes in canned cherries with improved nutritional value suitable for special diet consumers” Maldonado, M., Fonzar, M., Carparelli, A., Polenta, G., Vaudagna, S., Denoya G., Bauzá M, Videla I, Sanow C., Robles, N. (2014). Int. J. Biotechnol. Food Sci. 2(7): 116-120.

“Influence of alternating air injection on the color and “alambrado” of natural black olives var. Arauco, as compared with the traditional Argentine method” Juarez Romero, J., Denoya, G., Polenta, G. (2015). A publicarse en Grasas y Aceites en <http://dx.doi.org/10.3989/gya.0946142> (manuscrito aprobado).

Los resultados presentados en esta tesis fueron parcialmente incluidos en las siguientes comunicaciones en formato resumen y póster a:

Congresos Científicos Internacionales:

“Effects of high hydrostatic pressure in preventing enzymatic browning and fermentation of fresh cut vacuum-packaged peaches” Denoya, G., Gabilondo, J., Budde, C., Guidi, S., Nanni, M., Sanow, C., Vaudagna, S., Polenta, G. *2nd All Africa Horticulture Congress*. Parque Kruger – Sudáfrica 15-20 Enero 2012

“Optimizing high hydrostatic pressure processing for fresh-cut peaches preservation” Denoya, G., Polenta, G., Sancho, A., Budde, C., Sanow, C., Vaudagna, S. *International Nonthermal Food Processing Workshop*. Florianópolis, Brasil, 30 Septiembre- 02 Octubre 2013

“Effect of High Pressure Processing and refrigerated storage on the shelf life of minimally processed peaches” Denoya, G., Polenta, G., Soteras, T., Cap, M., Sanow, C., Vaudagna, S. *International Nonthermal Food Processing Workshop*. Columbus, Ohio, USA. 22 y 23 Octubre 2014

“Do novel technologies lead to the redefinition of freshness in minimally processed fruits?” Denoya, G., Nanni, M., Apóstolo, N., Vaudagna, S., Polenta, G. *International Nonthermal Food Processing Workshop*. Columbus, Ohio, USA. 22 y 23 Octubre 2014 (La exposición de este poster recibió un premio en el concurso organizado en el Workshop para estudiantes de posgrado)

Congresos Científicos Nacionales:

“Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre la calidad de duraznos mínimamente procesados” Denoya, G., Gabilondo, J., Budde, C., Sanow, C., Vaudagna, S., Polenta, G. Cytal. Buenos Aires 19-21 de Octubre 2011

“Efectos de aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas sobre la preservación de duraznos cortados y su comparación con el tratamiento térmico” Denoya, G., Gabilondo, J., Budde, C., Sanow, C., Vaudagna, S., Polenta. VII Congreso Ibeoramericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones (AITEP). La Plata, Argentina. 28-30 Noviembre 2012

“Aplicación de altas presiones hidrostáticas en duraznos mínimamente procesados: efectos de la variedad utilizada y optimización de parámetros de proceso” Denoya, G., Vaudagna, S., Budde, C., Valentini, G., Sanow, C. y Polenta, G. XIV Congreso Cytal, Rosario, Argentina 23-25 Octubre 2013

Comunicación oral a través de seminarios, charlas y conferencias:

“Aplicaciones de la tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas en el procesamiento de alimentos”. II Jornadas de Actualización Profesional en la Industria Alimentaria- Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA. 31 Mayo 2013

“Fundamentos, Características y Aplicaciones de la Tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas en el procesamiento de Alimentos”. Facultad Regional Buenos Aires de la Universidad Tecnológica Nacional. 4 Julio 2013

“Utilización de Altas Presiones Hidrostáticas para el procesamiento y preservación de alimentos vegetales”. Departamento de Sanidad, Nutrición, Bromatología y Toxicología Facultad de Farmacia y Bioquímica- UBA. 21 Octubre 2013

“Aplicación de Altas Presiones hidrostáticas en la preservación de duraznos mínimamente procesados: Efectos de la variedad utilizada y optimización de parámetros de proceso”. XIV Congreso Cytal, Centro de Eventos y convenciones Metropolitano Rosario, Santa Fe, Argentina. 24 Octubre 2013

“Aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas para la preservación de duraznos mínimamente procesados”. Departamento de Sanidad, Nutrición, Bromatología y Toxicología Facultad de Farmacia y Bioquímica- UBA. 17 Noviembre 2014

Abreviaturas

- **a***: Parámetro que representa cromaticidad del verde al rojo.
- **$\Delta a^*/\text{min}$** : Cambio del parámetro a* en el tiempo
- **A₄₂₀**: Absorbancia a 420 nm
- **AA**: Ácido ascórbico
- **ADH**: Alcohol deshidrogenasa
- **ADN**: Ácido desoxirribonucleico
- **ADNc**: Ácido desoxirribonucleico complementario
- **AG**: Ácido gálico
- **ANOVA**: Análisis de Varianza
- **APH**: Altas Presiones Hidrostáticas
- **ARN**: Ácido ribonucleico
- **ARNm**: Ácido ribonucleico mensajero
- **atm**: Atmósferas
- **ATPasas**: Adenosintrifosfatasa
- **b***: Parámetro que indica cromaticidad del azul al amarillo
- **C***: Parámetro chroma que indica la saturación o intensidad del color.
- **CH₃OH**: Metanol
- **cm**: Centímetros
- **CTAB**: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- **CT**: Ciclo umbral de la Real Time PCR
- **DEPC**: Dietil pirocarbonato
- **DNAsa**: Desoxirribonucleasa
- **EC**: Comisión de enzimas
- **EDTA**: Ácido etilendiaminotetracético
- **Ef**: Eficiencia de la PCR
- **EF1**: Factor de elongación 1

- **Ej.:** Ejemplo
- **etc.:** Etcétera
- **FDA:** Diacetato de fluoresceína
- **fig.:** Figura
- **FyHMP:** Frutas y hortalizas mínimamente procesadas
- **g:** Gramos
- **GC:** Cromatografía gaseosa
- **h°:** Parámetro cromático que representa el tono o ángulo de color
- **HCl:** Ácido clorhídrico
- **HClO:** Ácido hipocloroso
- **i. e:** En otras palabras
- **IRAM:** Instituto Argentino de Normalización y Certificación
- **KPO₄H₂:** Fosfato diácido de potasio
- **kg:** Kilogramos
- **kV:** Kilovoltios
- **L*:** Parámetro cromático que representa “Luminosidad”
- **LC:** Cromatografía líquida
- **LDH:** Lactato dehidrogenasa
- **LFD:** Detector de campo largo
- **LSD:** Mínima diferencia significativa (*Least Significant Difference*)
- **LiCl:** Cloruro de litio
- **LV-SEM:** Microscopía electrónica de barrido en modo bajo vacío
- **µg:** Microgramos
- **µl:** Microlitros
- **M:** Molar
- **mg:** Miligramos
- **min:** Minutos
- **mM:** Milimolar
- **mm:** Milímetros
- **ml:** Mililitros
- **MPa:** Megapascales

- **MRS:** Medio de cultivo "*Man Rogosa Sharpe*"
- **N:** Newtons
- **N₂:** Nitrógeno
- **NaCl:** Cloruro de sodio
- **Na₂CO₃:** Carbonato de sodio
- **nm:** Nanómetros
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **OsO₄:** Tetróxido de Osmio
- **PA:** Medio de cultivo *Plate Count Agar*
- **PAL:** Fenilalanin amonio-liasa
- **pb:** Pares de bases
- **PCA:** Análisis estadístico de componentes principales
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (polimerase chain reaction)
- **PDC:** Piruvato decarboxilasa
- **P_{H20}:** Presión parcial de agua
- **PME:** Pectinmetilesterasa
- **PG:** Poligalacturonasa
- **PMSF:** Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
- **POD:** Peroxidasa
- **ppm:** Partes por millón
- **PPO:** Polifenoloxidasa
- **p/v:** Peso en volumen
- **PVP:** Polivinilpirrolidona
- **PVPP:** Polivinilpolipirrolidona
- **R²:** Coeficiente de determinación
- **ROS:** Especies reactivas del oxígeno
- **RT-PCR:** Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (reverse transcription and polimerase chain reaction)
- **SDS:** Dodecilsulfato sódico
- **seg:** Segundos
- **SEM:** Microscopía electrónica de barrido

- **STEC:** *Escherichia coli* productora de toxina SHIGA
- **t-ARN:** Ácido ribonucleico de transferencia
- **TEF2:** Factor de elongación traslacional 2
- **TEM:** Microscopía de transmisión electrónica
- **ton:** Toneladas
- **Torr:** Torricelli
- **TPA:** Análisis de Perfil de Textura
- **TRIS:** Hidroximetilaminometano
- **UE:** Unidades de enzima
- **UFC:** Unidades Formadoras de Colonias
- **UV:** Ultravioleta
- **YEDC:** Medio de cultivo "Yeast Extract Dextrose Chloramphenicol"

Resumen

Actualmente, los consumidores demandan productos de conveniencia que conserven sus características naturales, como las frutas y hortalizas mínimamente procesadas (FyHMP), con un mínimo agregado de aditivos. La tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas (APH) se presenta como una alternativa para la preservación de FyHMP, ya que a diferencia de los procesos térmicos convencionales, no altera a compuestos de interés como pigmentos y componentes nutricionales y del *flavor*. Sin embargo, las APH pueden modificar las características texturales de frutas. Además, algunas enzimas que producen alteraciones son barorresistentes. El objetivo general de la presente tesis fue realizar aportes significativos desde el punto de vista científico-tecnológico que permitan entender mejor el efecto de las APH en combinación con otras estrategias de barrera (acidificación, envasado al vacío, refrigeración) sobre la calidad y vida útil de duraznos mínimamente procesados.

Dentro de la estrategia del trabajo, primeramente se determinó la necesidad de combinar las APH con el envasado al vacío para evitar el pardeamiento enzimático del producto y se definió el proceso de producción del mismo. Así, cubos o cilindros de durazno fueron sumergidos en solución de 20ppm HClO, para descontaminación superficial y luego en 1%(p/v) ácido ascórbico y 1%(p/v) ácido cítrico, para control del pardeamiento enzimático. Posteriormente, los duraznos fueron envasados en bolsas *Cryovac-BB2800* y procesados en un equipo *Stansted Fluid Power* a temperatura ambiente de acuerdo a diferentes tratamientos.

En el capítulo 1 se utilizó un proceso de 500MPa-5min, según lo recomendado en bibliografía. Se observó que las muestras presurizadas preservaron mejor el color y la textura durante el almacenamiento con mínimas alteraciones de textura y de apariencia (traslucidez). Además, a diferencia de las muestras control, no acumularon etanol, por lo que se evitó el desarrollo de fermentaciones.

Una vez comprobada la eficacia de las APH como factor de preservación de duraznos mínimamente procesados, se optimizaron las condiciones del tratamiento (nivel de presión-tiempo de mantenimiento) para lograr la mayor inactivación de enzimas con la mínima alteración

de la textura y el color, determinándose que la aplicación de 600MPa-5min producía los mejores resultados.

Seguidamente se estudió la aptitud para el proceso de dos cultivares de durazno (uno, pavía y otro, prisco), determinándose la importancia de seleccionar aquellos con menor actividad PPO y con mejores características nutricionales, para obtener un producto de óptima calidad y vida útil extendida. Entre los resultados, se destaca la importancia de estudiar más variedades e incluso otras especies frutales, para identificar las más aptas para presurizar y expandir la oferta de productos.

A continuación se profundizó el conocimiento del efecto de la tecnología sobre aspectos bioquímicos y estructurales, tratando al producto en las condiciones establecidas como óptimas. Se encontró que si bien se modifican algunas propiedades de los tejidos vivos, los vegetales presurizados pueden ser aún considerados como “frescos”, dadas sus características de apariencia, textura y *flavor*, además de que en sus tejidos se mantienen activos ciertos procesos bioquímicos (expresión a nivel de ARNm y actividad de enzimas). Se concluyó también que la translucidez causada por el tratamiento podría ser consecuencia de los cambios estructurales provocados en los tejidos, aunque estos cambios no tendrían un impacto importante en la textura.

Finalmente, mediante un ensayo de vida útil se determinó que las muestras presurizadas almacenadas a 4°C fueron las que se preservaron mejor en términos de pardeamiento enzimático y textura, sin deterioro microbiológico ni sensorial por 42 días, aunque notoriamente, se encontró que sería posible mantener el producto a 20°C sin alteraciones importantes.

Como conclusión general, puede afirmarse que las APH constituyen una tecnología promisoría para preservar duraznos mínimamente procesados, siendo conveniente realizar a futuro ensayos con consumidores para evaluar la aceptabilidad del producto.

Índice

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Aspectos productivos y comerciales del durazno.....	2
1.2	Importancia de las frutas y hortalizas mínimamente procesadas.....	4
1.3	Prevención de alteraciones en FyHMP: Caso del pardeamiento enzimático.....	6
1.4	Altas Presiones Hidrostáticas como tecnología de preservación.....	9
1.5	Envasado de productos para ser tratados por APH.....	11
1.6	Principios en los que se basa la tecnología APH y sus efectos en la bioquímica de los alimentos... 12	
1.7	Aplicación comercial de las APH.....	15
1.8	Inactivación de microorganismos por APH.....	18
1.9	Efecto de las APH sobre las enzimas y reacciones enzimáticas.....	20
1.10	Efecto de las APH sobre la textura de FyHMP.....	23
1.11	Efecto de las APH sobre el <i>flavor</i> de productos vegetales.....	28
1.12	Efecto de las APH sobre compuestos de interés nutricional de productos vegetales.....	31
1.13	Combinación de las APH con envasado al vacío para prevenir el pardeamiento enzimático en FyHMP	34
1.14	Metabolismo anaeróbico.....	35
1.15	Consideraciones sobre las metodologías utilizadas.....	36
1.15.1	Medición de los parámetros de calidad en frutas mínimamente procesadas.....	36
1.15.2	Enzimas.....	44
1.15.3	Microscopía.....	49
1.16	Objetivo General.....	52
1.17	Objetivos específicos.....	52

2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
2.1	Materia prima y preparación de la muestra.....	56
2.1.1	Material vegetal.....	56
2.1.2	Preparación de las muestras.....	57
2.1.3	Tratamiento por Altas Presiones Hidrostáticas (APH).....	57
2.2	Ensayos realizados.....	58
2.2.1	Ensayo preliminar. Diseño y puesta a punto de un sistema experimental para evaluar la aplicación de APH en duraznos mínimamente procesados.....	58
2.2.2	Capítulo 1: Efecto de la aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas y del envasado al vacío sobre la preservación de duraznos mínimamente procesados.....	59
2.2.3	Capítulo 2: Optimización del tratamiento de APH para la preservación de duraznos mínimamente procesados.....	61
2.2.4	Capítulo 3: Determinación de la aptitud varietal para el procesamiento de duraznos por APH.....	64
2.2.5	Capítulo 4: Aspectos morfológicos y bioquímicos del efecto de las APH sobre duraznos MP.....	65
2.2.6	Capítulo 5: Estudio de la vida útil de duraznos mínimamente procesados preservados con APH..	66
2.3	Métodos.....	68
2.3.1	Parámetros cromáticos.....	68
2.3.2	Análisis de perfil de textura (TPA).....	68
2.3.3	Actividad de Enzimas.....	69
2.3.4	Potencial de pardeamiento.....	71
2.3.5	Concentración de etanol.....	71
2.3.6	pH.....	71
2.3.7	Ácido ascórbico.....	71
2.3.8	Fenoles totales.....	72
2.3.9	Expresión relativa de enzimas a nivel de ARNm.....	72
2.3.10	Análisis microbiológicos.....	77
2.3.11	Análisis sensorial.....	77
2.3.12	Microscopía.....	78
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	80
3.1	Diseño y puesta a punto de un sistema experimental para evaluar la aplicación de APH en duraznos mínimamente procesados.....	81
3.1.1	Introducción.....	82
3.1.2	Resultados.....	82
3.1.3	Discusión.....	83
3.1.4	Conclusiones.....	84
3.2	Capítulo 1: Efecto de la aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas y del envasado al vacío sobre la preservación de duraznos mínimamente procesados.....	86
3.2.1	Introducción.....	87
3.2.2	Resultados.....	87
3.2.3	Discusión.....	91

3.2.4	Conclusiones.....	97
3.3	Capítulo 2: Optimización del tratamiento con APH para la preservación de duraznos mínimamente procesados.....	98
3.3.1	Introducción.....	99
3.3.2	Resultados.....	102
3.3.3	Discusión.....	113
3.3.4	Conclusiones.....	120
3.4	Capítulo 3: Determinación de la aptitud varietal para el procesamiento de duraznos por APH y selección de condiciones de proceso.....	123
3.4.1	Introducción.....	124
3.4.2	Resultados.....	125
3.4.3	Discusión.....	129
3.4.4	Conclusiones.....	135
3.5	Capítulo 4: Aspectos morfológicos y bioquímicos del efecto de las APH sobre duraznos MP.....	137
3.5.1	Introducción.....	138
3.5.2	Resultados.....	139
3.5.3	Discusión.....	151
3.5.4	Conclusiones.....	156
3.6	Capítulo 5: Estudio de la vida útil de duraznos mínimamente procesados preservados con APH.....	159
3.6.1	Introducción.....	160
3.6.2	Resultados.....	161
3.6.3	Discusión.....	170
3.6.4	Conclusiones.....	180
4	CONCLUSIONES GENERALES.....	183
5	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	188

1. Introducción



1. Introducción

1.1 Aspectos productivos y comerciales del durazno

El durazno (*Prunus persica* L. Batsch), pertenece al género *Prunus* de la familia Rosaceae (rosa). El árbol tiene unas decorativas flores rosadas y una fruta (drupa) dulce y jugosa, muy apreciada mundialmente como alimento debido a su *flavor*, valor nutritivo, textura y apariencia. El durazno está categorizado como una “fruta de carozo”, dado que su semilla está encerrada en un endocarpio duro. Es originario de China, posteriormente introducido en Persia, y luego distribuido por los romanos por toda Europa, siendo los españoles los responsables de la introducción de muchas variedades en América.

Comercialmente, el durazno se clasifica en dos tipos: pavía (el carozo se mantiene adherido a la pulpa) o prisco (el carozo está relativamente separado de la pulpa). Debido a su valiosa composición nutricional, el durazno era considerado por los antiguos chinos como un símbolo de larga vida e inmortalidad (Siddiq, 2006). Una fruta media pesa aproximadamente 75 g y aporta 30 calorías, 7 g de carbohidratos (6 g de azúcares y 1 g de fibra), 1 g de proteína, 50 µg de cobre, 20 µg de zinc y 5 mg de vitamina C (Matei y col., 2013). Sin embargo, estos valores varían de acuerdo a la variedad, región de cultivo, estado de madurez y factores climáticos.

Esta fruta es además rica en carotenoides (provitamina A), compuestos fenólicos y otros antioxidantes (Tareen y col., 2012). Los principales compuestos fenólicos que contiene son la catequina, la epicatequina, el ácido cloragénico y el ácido neocloragénico, y los derivados de cianidina y quercetina, mientras que los principales carotenoides incluyen a los α , β y γ carotenos y las xantofilas (carotenoides mono- o di-hidroxilados), zeaxantina, luteína, β -criptoxantina y violaxantina. Los compuestos antioxidantes han adquirido en la actualidad una gran relevancia por parte de los consumidores, ya que su presencia en la dieta tiende a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y diferentes tipos de cánceres. Existen compuestos carotenoides que además juegan un rol en la visión, entre ellos la luteína y la zeaxantina, los cuales cuentan con una capacidad demostrada para prevenir la degeneración de la mácula (Campbell y Padilla, 2013). Aunque los duraznos tienen menor contenido de estos compuestos que otras frutas tales como las frutillas, kiwis, manzanas y naranjas, los mismos tienen una gran importancia económica y nutricional, dado que constituyen un componente de presencia frecuente en las comidas durante los meses de primavera y verano, además de que las porciones son generalmente mayores (masa consumida por persona y por día) que las de otras frutas (Remorini y col., 2008).

1. Introducción

En Argentina, la superficie plantada para la producción de esta fruta en el año 2011 fue de 27.240 hectáreas de las cuales 13.240 hectáreas fueron con destino a industria y 14.000 hectáreas para consumo en fresco. La producción nacional de duraznos para ese año fue de 361.100 ton, de las cuales 140.000 ton fueron para consumo en fresco y 221.100 ton para industria. El consumo de esta fruta en Argentina es de 1 kg por año por habitante (Ficha técnica del Mercado Central de Buenos Aires, 2011).

La superficie implantada de las variedades de durazno para consumo en fresco se distribuye principalmente entre las provincias de Mendoza, Buenos Aires, Córdoba y Río Negro, representando alrededor del 90% del total nacional. En los últimos años se han incorporado al panorama productivo algunas provincias del Noroeste y Noreste del país, las cuales se han concentrado en los cultivares tempranos, ampliando así la oferta temporal en el mercado interno. Si bien Mendoza es la principal provincia productora de durazno para industria, actualmente se están produciendo en esta provincia más variedades para consumo en fresco.

En relación a los duraznos industrializados, los principales productores son EE.UU, Grecia y España, mientras que los consumidores más importantes son EE.UU, Alemania, España, Japón y Francia, quienes representan el 70% del consumo total mundial. En nuestro país existen alrededor de 50 empresas que elaboran conservas de frutas, siendo aproximadamente un tercio de ellas de medianas a grandes. Las 5 firmas principales concentran el 50% de la producción nacional. Algunas de las más importantes son: Agroindustrias Inca, Nieto y Cía., Industrias Alimenticias Mendocinas S.A., Arcor SAIC, Canale S.A., La Campagnola, La Colina, Agroindustrias Molto S.A. y Alco. La mayor parte de las plantas grandes elaboran también otros productos, tales como derivados de tomate, dulces y mermeladas, muchos de ellos como línea principal. Sólo algunas empresas de menor dimensión están especializadas únicamente en la elaboración de conservas de frutas. El personal total ocupado en actividades de la cadena, incluyendo la producción primaria, el empaque, y la industrialización de duraznos, ciruela, manzana y pera se estima en 33.000 personas (Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas- SENASA, 2009), por lo que la actividad representa una importante fuente de mano de obra.

Desde el punto de vista comercial, las ventas al exterior de conservas de durazno mostraron una tendencia variable a lo largo de la última década, con una caída en los últimos años debido a un incremento de los costos y la pérdida de competitividad frente a otros países exportadores. En

1. Introducción

2011, estas ventas se concentraron en Brasil, que totalizó el 60% de los embarques de un total de 20.000 ton (Franco, 2012).

Desde el punto de vista nutricional, uno de los mayores problemas asociados a los duraznos que se someten a un proceso tradicional de conservación por enlatado es la necesidad de agregado de cantidades relativamente elevadas de azúcar en forma de jarabe. En consecuencia, el consumo de estos productos genera elevados niveles de glucosa postprandial en el plasma (alto índice glicémico del producto), lo cual ocasiona un efecto negativo para la población en general y especialmente para los consumidores diabéticos (Miller y col., 1995). Este problema, sumado a la pérdida de compuestos de valor nutricional debido al procesamiento (que llega hasta el 60% en el caso de algunos nutrientes -Rickman y col., 2007-), ha generado una clara tendencia en la preferencia de los consumidores actuales, hacia el reemplazo progresivo de los productos elaborados por métodos tradicionales de preservación como el enlatado, por productos listos para consumir con un mínimo procesamiento (Oke y col., 2006). En el caso de las frutas y hortalizas, sería particularmente importante que se desarrollen nuevos productos sin azúcar agregado ni pérdida de nutrientes.

En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informa, según los últimos datos registrados para el país, que la prevalencia de la diabetes en la Argentina aumentó de un 2,7% en 1986 a un 11,1% en el 2003 (World Health Organization, 2014). Más aún, este organismo predice que el número de muertes alrededor del mundo debido a la diabetes y a enfermedades y complicaciones relacionadas se incrementará en más del 50% en los próximos 10 años. En consecuencia, se considera que las oportunidades del mercado para alimentos bajos en azúcar o con bajo índice glicémico (alimentos que contienen carbohidratos que no causan un gran aumento de la glucosa en sangre) serán altamente promisorias, presentando un importante potencial de crecimiento (Informe de Mercado del Gobierno de Canadá, 2011).

1.2 Importancia de las frutas y hortalizas mínimamente procesadas

Históricamente, las exportaciones nacionales presentan como rasgo característico un limitado valor agregado debido al bajo nivel de transformación y de diferenciación de los productos. Se estima que menos del 20% de las exportaciones de productos de origen agropecuario constituyen bienes con algún grado de diferenciación, predominando el comercio de productos del tipo *commodities*. Resulta entonces altamente estratégico para el país el agregado de valor a través del

1. Introducción

procesamiento de materias primas de origen agropecuario. A nivel de consumo, existe una demanda creciente de los denominados productos de conveniencia (listos para usar, listos para consumir) de alta calidad sensorial y nutricional, particularmente en el segmento de los productos refrigerados. En ese rubro, las ventas conjuntas en Europa y EEUU crecieron desde U\$S 6,1 billones en 1999 hasta U\$S 9,0 billones en 2009. En Argentina, el aumento del turismo internacional impulsó el crecimiento de los sectores vinculados al circuito HORECA (hoteles, restaurantes y catering), demandantes de productos de conveniencia.

Las frutas y hortalizas en particular son cada vez más apreciadas por parte de los consumidores, ya que diversos estudios sobre salud humana confirman la asociación entre su ingesta y el bajo riesgo de sufrir enfermedades crónicas. Los vegetales representan una rica fuente de nutrientes, que incluyen vitaminas, minerales, fibras y otras sustancias bioactivas. Los mecanismos de acción de este tipo de compuestos promotores de la salud son a menudo complejos, mostrando muchos de ellos un cierto nivel de superposición y/o complementariedad. Entre los mecanismos de acción se pueden mencionar: la modulación de enzimas de detoxificación, el estímulo del sistema inmunitario, la reducción de agregación plaquetaria, la modulación de la síntesis del colesterol y del metabolismo hormonal, la reducción de la presión sanguínea, y los efectos antibacterianos, antivirales y antioxidantes (Lampe, 1999).

Este hecho, sumado al aporte que hacen las frutas y hortalizas de micronutrientes (minerales y vitaminas), hace que se fomente cada vez más su ingesta, recomendando la OMS un consumo diario de 400 g por día. Sin embargo, el consumo mundial de este tipo de productos está muy por debajo del nivel mínimo recomendado, estimándose que actualmente representa solo entre el 20% y el 50% de lo sugerido (FAO/WHO, 2004).

Por otra parte, el ritmo de vida actual, hace que se reduzca cada vez más el tiempo disponible para las preparaciones culinarias que incorporen a las mismas para su consumo. En consecuencia, la practicidad que ofrecen las frutas y hortalizas mínimamente procesadas (FyHMP) representa una oportunidad para que estos productos tengan un mayor nivel de difusión en el mercado nacional y que puedan convertirse, como ya acontece en muchos países desarrollados, en la principal fuente de nutrientes y de compuestos que contribuyen a prevenir enfermedades en un segmento importante de la población. Este grupo abarca a personas con problemas de movilidad (ancianos), personas que utilizan regularmente comedores colectivos (escolares, trabajadores, estudiantes,

1. Introducción

internados, etc.), y personas que están habituadas a comer viandas preparadas (Oms-Oliu y col., 2010; Abadias y col., 2008; Montero-Calderon y col., 2009; Wiley, 1997).

Según el Código Alimentario Argentino, las frutas y hortalizas mínimamente procesadas son aquellas que se comercializan “frescas, limpias, peladas, enteras y/o cortadas de diferentes maneras, cuyo mínimo procesamiento permite mantener sus propiedades naturales y tornarlas fáciles de utilizar por el consumidor, ya sea para consumo directo crudo o para preparaciones culinarias. Estos productos deben envasarse al vacío o en atmósferas modificadas con o sin utilización de gases” (Código Alimentario Argentino, Artículo 925 tris – (Resolución Conjunta SPReI N° 192/2012 y SAGyP N° 799/2012).

La elaboración de FyHMP se convirtió en un verdadero desafío tecnológico, ya que por un lado son muy pocas las estrategias de preservación que pueden utilizarse para mantener adecuadamente la calidad de estos productos, y por otra parte, las operaciones como el pelado o el cortado provocan un cierto nivel de daño a los tejidos que limita de manera importante su vida útil. Entre estas alteraciones se pueden mencionar el ablandamiento, el incremento del metabolismo, la inducción de la producción de etileno, el aumento de la pérdida de peso (principalmente por pérdida de agua), y el incremento en la susceptibilidad al pardeamiento enzimático y a la contaminación microbiana. En los últimos años, el estudio de la preservación de FyHMP se enfoca cada vez más en mantener sus propiedades naturales, y en la aplicación combinada de tratamientos suaves, capaces de actuar de manera sinérgica, o al menos aditiva, lo que se conoce genéricamente como “tecnología de barreras” (Barret y col., 2010; González-Buesa y col., 2011).

Si bien existen estudios que utilizan a los duraznos como materia prima para el desarrollo de productos mínimamente procesados, su adopción a nivel comercial es limitada, debido a su corta vida útil, la cual está condicionada principalmente por la aparición de pardeamiento en la superficie cortada, por la rápida pérdida de la firmeza y por la ruptura de los tejidos (González-Buesa y col., 2011; Tossetti y col., 2012).

1.3 Prevención de alteraciones en FyHMP: Caso del pardeamiento enzimático

El pardeamiento enzimático constituye una de las principales alteraciones de las FyHMP, ya que su desarrollo deteriora el color de los productos, afecta al *flavor* y disminuye la calidad nutricional. Desde el punto de vista químico, este fenómeno se inicia con la oxidación de compuestos fenólicos

1. Introducción

produciendo o-quinonas por acción de enzimas, principalmente la polifenoloxidasasa (PPO). Subsecuentemente, estas quinonas se condensan y reaccionan de manera no enzimática con otras sustancias tales como compuestos fenólicos y aminoácidos, para producir polímeros marrones complejos (melaninas). La susceptibilidad al pardeamiento enzimático depende de muchos factores, entre los que se pueden mencionar: la actividad intrínseca de la PPO, el contenido de fenoles, el contacto con el oxígeno atmosférico, y la descompartmentalización de enzimas y sustratos. En función de esto, muchas de las investigaciones realizadas sobre la prevención del pardeamiento enzimático se enfocan generalmente en el control de la interacción de la PPO con los compuestos fenólicos y el oxígeno (González-Buesa y col., 2011).

La síntesis de los compuestos fenólicos comienza en el retículo endoplasmático. Una vez formados, estos compuestos son glicosilados y transportados en vesículas a la vacuola, que representa el principal sitio de almacenamiento, aunque también pueden encontrarse en los cromoplastos, citoplasma y, en cantidades muy pequeñas, en mitocondrias (Toivonen y Brummel, 2008). Por su parte, la enzima PPO se ubica exclusivamente en los cloroplastos. Esta compartimentalización, típica de un tejido vegetal intacto, evita la ocurrencia de reacciones de pardeamiento en forma significativa, dada la separación física entre enzima y sustrato (Yoruk y Marshall, 2003). Por lo tanto, el evento inicial en el proceso de pardeamiento oxidativo es la ruptura de las membranas de las células de los tejidos vegetales, lo que permite el contacto entre los compuestos que inicia las reacciones mencionadas. Esta descompartmentalización puede ocurrir como consecuencia de un estrés físico, o por un proceso de deterioro, por ejemplo por daño mecánico o senescencia (Toivonen y Brummel, 2008).

Según la comisión de enzimas (EC), la PPO (1.10.3.1) pertenece al grupo de las oxidoreductasas, que actúan sobre los difenoles con el oxígeno como aceptor (Nevin, 2009). Esta enzima actúa sobre dos tipos de sustratos, los monohidroxifenoles, hidroxilándolos en posición orto con respecto al grupo hidroxilo original (EC 1.18.14.1, actividad de hidroxilación), y los o-dihidroxifenoles, oxidándolos a quinonas por remoción del hidrógeno del grupo hidroxilo (EC 1.10.3.1, actividad de oxidación) (Ramírez y Whitaker, 2003; Ayaz y col., 2007), lo cual es seguido por la formación no enzimática de melaninas. La reacción de hidroxilación es relativamente lenta y provoca la formación de productos incoloros, mientras que la reacción de oxidación es relativamente rápida y produce quinonas coloreadas. Las reacciones subsecuentes de las quinonas

1. Introducción

conducen a la acumulación de melaninas, que son los pigmentos marrones, negros o rojizos asociados al pardeamiento en los tejidos vegetales (Toivonen y Brummel, 2008).

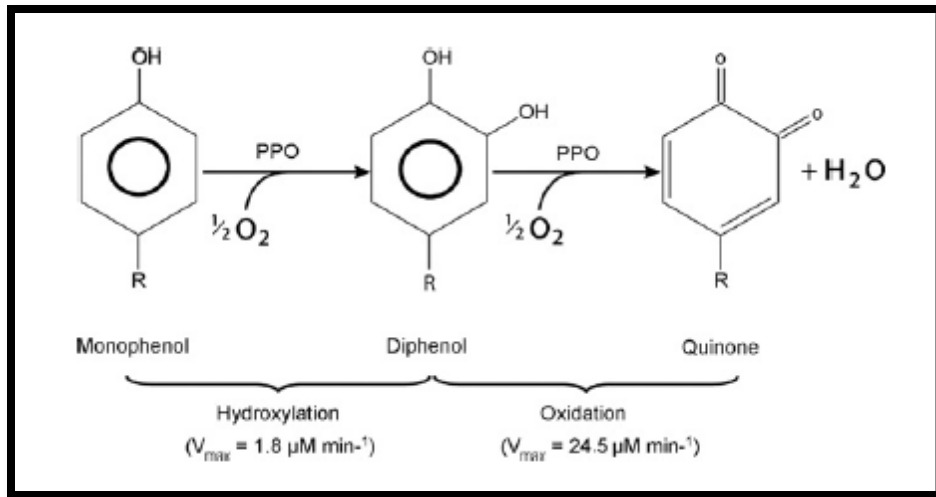


Fig. 1 Mecanismo de acción de la PPO sobre los mono- y difenoles, en el cual la actividad de hidroxilación tiene una menor velocidad máxima que la actividad de oxidación (Toivonen y Brummel, 2008).

La característica estructural más importante de la PPO es la presencia, en su centro activo, de dos átomos de cobre unidos a histidina. Alrededor de ellos, se sitúan aminoácidos hidrofóbicos con anillos aromáticos, importantes para su unión a los sustratos (Calvo, 2007). La tecnología más tradicional para controlar el pardeamiento enzimático está representada por la adición de sulfitos (Sapers, 1993), los cuales actúan como agentes reductores transformando las o-quinonas en difenoles menos reactivos, previniendo de esta forma el desarrollo de melaninas. Si bien de esta manera se evita el pardeamiento enzimático con una alta efectividad y bajo costo, su utilización ha sido restringida en vegetales y frutas por la Administración de Fármacos y Alimentos de EEUU (Langdon, 1987). En nuestro país, la Resolución Conjunta 57/2010 y la Modificación 548/2010 de la ANMAT, desalienta el uso de esta sustancia, debido a la posibilidad de inducción de reacciones alérgicas en individuos asmáticos (Pizzocaro y col., 1993).

Si bien existen otros aditivos tales como 4-hexylresorcinol, cisteína, acidulantes y agentes quelantes, que han empezado a utilizarse últimamente como opción a los sulfitos, generalmente no poseen su efectividad ni presentan su multifuncionalidad, considerando su adicional poder microbicida, por lo que hasta el momento no se ha encontrado una alternativa adecuada (Perera y col., 2010; Wiley, 1997; Smith, 1993)

1. Introducción

La posibilidad de reemplazo de los sulfitos representa un tema de gran interés, ya que existe una creciente demanda de los consumidores para que la industria sustituya los conservantes y otros aditivos por sustancias naturales. En los últimos años, muchas investigaciones se han focalizado en el desarrollo de nuevas formas de procesamiento y en la búsqueda de alternativas naturales a los compuestos químicos sintéticos, para reducir tanto la aparición del pardeamiento enzimático como el desarrollo de microorganismos, y mejorar así la calidad integral de las frutas mínimamente procesadas. Estas estrategias incluyen el almacenamiento refrigerado, el almacenamiento en atmósferas modificadas, la inmersión en soluciones de compuestos naturales y baños de agua caliente, el calentamiento intermitente y la radiación gamma, entre otros (Tareen y col., 2012).

1.4 Altas Presiones Hidrostáticas como tecnología de preservación

La tecnología de Altas Presiones hidrostáticas (APH) surge como una alternativa a los tratamientos térmicos utilizados en la industria para pasteurizar y alargar la vida útil de los productos alimenticios. Esta tecnología tiene además un gran potencial en FyHMP, ya que además de disminuir la carga microbiana, representa una opción capaz de prevenir ciertas reacciones enzimáticas que causan alteraciones tales como el pardeamiento enzimático (Perera y col., 2010).

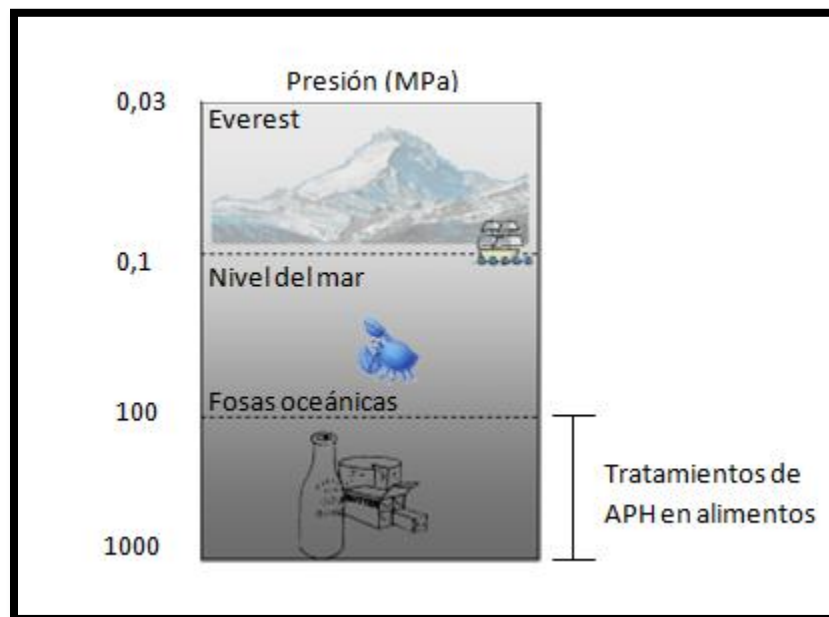


Fig. 2 Representación esquemática que representa la magnitud de las presiones utilizadas en el procesamiento de alimentos en comparación con niveles de presión que se dan naturalmente en la Biosfera (traducida y modificada de Considine, 2008)

1. Introducción

La presión representa una variable termodinámica que se puede asociar a muchos fenómenos que se desarrollan en la Biosfera. Por ejemplo, en los mares, la presión hidrostática aumenta aproximadamente 1 MPa cada 100 m de profundidad, por lo que la magnitud de esta variable en el fondo de las Fosas Marianas del Océano Pacífico (una de las zonas marítimas más profundas de la Tierra) alcanza los 116 MPa (fig.2). A fines comparativos, se puede mencionar que en el procesamiento de alimentos se utilizan niveles de hasta más de 10 veces ese valor de presión (Yaldagard y col., 2008).

La tecnología de APH aplicada a alimentos consiste en someter a un alimento envasado a presiones de entre 100 y 1400 MPa por tiempos cortos (< 10 min) y a temperaturas en el rango de -40°C a 110°C . Actualmente, estas condiciones sólo pueden alcanzarse en equipos de laboratorio, ya que a nivel industrial la máxima presión que alcanzan los equipos es de 600 MPa. Un equipo típico de APH consiste en una cámara de presurización, un sistema generador de la presión y un sistema de control de la temperatura y de la presión. Como se observa en la fig. 3, un ciclo típico de proceso comienza con la carga del alimento previamente envasado en la cámara de presurización del equipo de APH, el llenado del resto del espacio con un fluido transmisor de la presión (que en los equipos industriales es agua y en los equipos para investigación mezclas de alcoholes y agua, aceite de siliconas, etc.), y el cierre del sistema (Welti-Chanes y col., 2005; Mor-Mur, 2010). Posteriormente, en los equipos pequeños (escala laboratorio), el volumen de la cámara se reduce por acción de la presión hidráulica aplicada sobre un pistón (sistemas de compresión directa). En los equipos de mayor capacidad (a escala piloto e industrial), se utiliza un intensificador o bomba de alta presión para bombear e introducir el fluido transmisor dentro de la cámara, hasta alcanzar la presión requerida (sistemas de compresión indirecta). Este intensificador logra generar altos niveles de presión mediante un sistema de pistones de diferente área (fig.4). Así, en este dispositivo, se introduce aceite a una presión de 20 MPa del lado de alta presión del pistón principal, que tiene una relación de áreas de 30:1 con respecto al otro pistón que es el que finalmente impulsará al fluido de presurización hacia la cámara. Cuando el pistón principal alcanza el final de su desplazamiento, el sistema se revierte y en el otro lado del pistón principal se introduce aceite a alta presión, mientras en el otro lado de la bomba, el fluido de presurización se libera (Torres y Velázquez, 2005). Luego de mantener la presión durante el tiempo estipulado, la cámara se descomprime mediante la liberación del fluido transmisor. A modo de ejemplo, se puede mencionar que la reducción del volumen del fluido y de los alimentos de alta humedad

1. Introducción

durante un tratamiento de presurización de 600 MPa a temperatura ambiente es de aproximadamente un 15% (Koutchma, 2014).

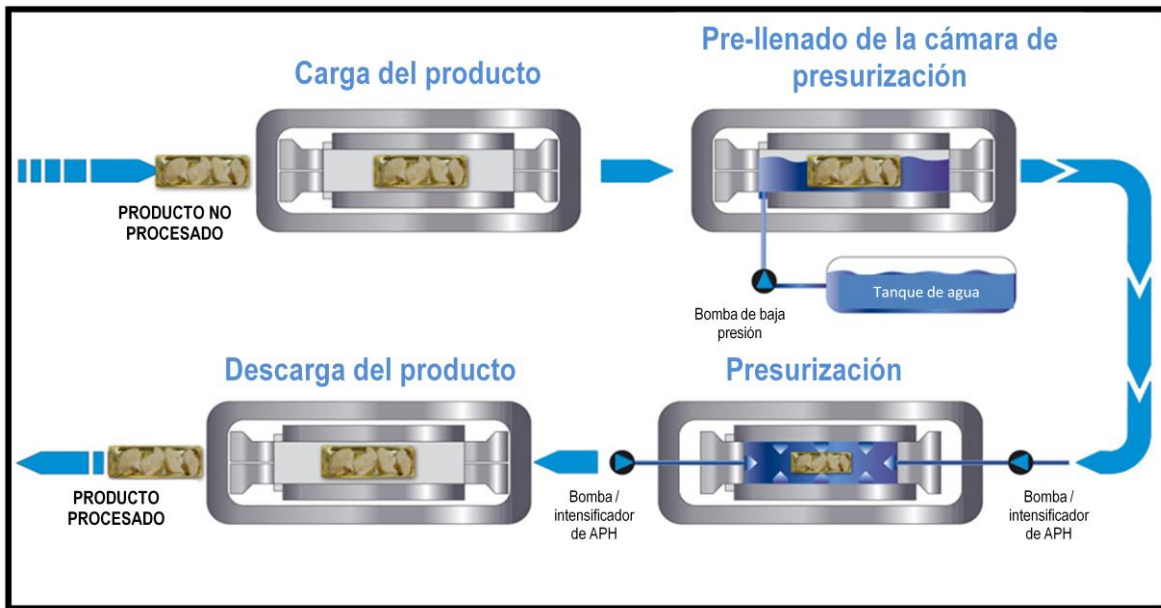


Fig. 3 Diagrama de operación de un equipo de APH (Traducido de: <http://www.hiperbaric.com/en/high-pressure>)

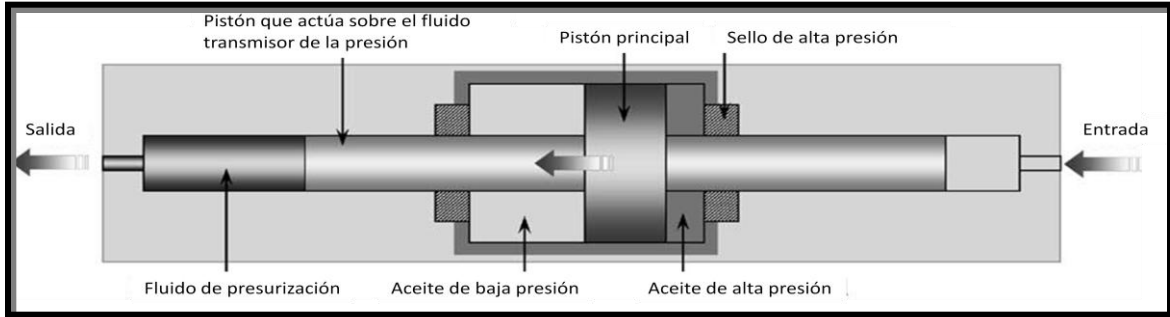


Fig. 4 Esquema de funcionamiento de un intensificador de presión, componente de los equipos de APH de compresión indirecta (Traducido de Torres y Velázquez, 2005)

1.5 Envasado de productos para ser tratados por APH

Considerando que el producto experimenta una reducción de volumen durante la presurización y una expansión durante la descompresión, el mismo debe ser empacado de manera tal de absorber esta variación, estimada luego del tratamiento en aproximadamente entre el 10 y 20% del volumen original (Tao y col., 2014). Es importante mencionar que el envasado es un factor vital para el éxito de cualquier método de preservación, dado que protege al alimento de la recontaminación luego del procesamiento y posterior exposición durante el almacenamiento en

1. Introducción

condiciones ambientales adversas. Al aplicar APH sobre el alimento pre-empacado, tanto el producto como el envase son sometidos a las condiciones de proceso, por lo que debe considerarse al conjunto como una unidad segura, garantizando que las condiciones se mantendrán inalteradas hasta que el consumidor abra el envase (Koutchma, 2014).

Para la elección de los materiales de envasado de los productos a presurizar se deben tener en cuenta varios factores, incluyendo la seguridad del material, la posible formación de compuestos que puedan influenciar en el olor y el sabor del alimento, y el efecto que pudiera causar la presión sobre las propiedades mecánicas y físicas del material de empaque (por ejemplo, las propiedades de barrera y de resistencia). Considerando que el material de empaque debe ser lo suficientemente flexible como para transmitir la presión y soportar un cambio de volumen, se excluyen materiales como vidrio, metal y papel. Los materiales que mejor se adaptan a los requerimientos son los poliméricos, entre los que se incluyen al tereftalato de polietileno, polietileno, polipropileno, copolímeros de etilen-vinil alcohol y sus combinaciones. Para mejorar las propiedades de barrera de los films poliméricos, los mismos deberán ser cubiertos por capas extremadamente finas (de unos pocos nanómetros) de compuestos inorgánicos tales como óxido de aluminio y óxido de silicón, o metalizados por deposición de una fina capa de aluminio.

Se puede considerar también el desarrollo específico de materiales que sean impermeables al oxígeno y opacos a la luz, a fin de garantizar la preservación del color y del *flavor* de los alimentos presurizados. Igualmente, se ha comprobado que la mayoría de los materiales sintéticos de uso común para el envasado de alimentos pueden soportar también los tratamientos APH sin cambios en su estructura, y con variaciones menores a un 15% en sus propiedades funcionales (Tao y col., 2014).

El tamaño y la forma del envase también son críticos para maximizar la cantidad de producto que se puede acomodar en la cámara de presurización en cada ciclo. Por lo tanto, es importante considerar que el diseño adecuado del envase puede contribuir de manera importante a reducir los costos del proceso (Koutchma, 2014).

1.6 Principios en los que se basa la tecnología APH y sus efectos en la bioquímica de los alimentos

La tecnología APH se basa en la aplicación de presiones elevadas mediante un fluido transmisor según el principio isostático, es decir que si un producto está contenido en un envase flexible y el

1. Introducción

mismo está sumergido dentro del medio de presurización, la presión será transmitida de manera uniforme y cuasi-instantánea, independientemente del tamaño y forma del producto. Por lo tanto y contrariamente a lo que sucede con los tratamientos térmicos, el tiempo de proceso es independiente de las dimensiones del producto (Tao y col., 2014).

El efecto de las APH en la química y microbiología de los alimentos está gobernada por el principio de *Le Chatelier*. Éste indica que cuando se perturba un sistema en equilibrio, el mismo responde de forma tal de minimizar esa perturbación. Aunque los alimentos no son sistemas en equilibrio, esto explicaría por qué las APH estimulan algunos procesos (por ejemplo, transiciones de fase, cambios en la configuración molecular, reacciones químicas) que están acompañadas por un decrecimiento de volumen y, por otra parte, inhiben reacciones que involucren un incremento de volumen (Norton y Sun, 2008). Además, esta sería la razón por la cual, a temperaturas relativamente bajas (0-40°C), las uniones covalentes (que tienen baja compresibilidad) son prácticamente inalteradas por las APH, mientras que las interacciones iónicas e hidrofóbicas, que mantienen las estructuras terciarias y cuaternarias de moléculas resultarían afectadas, sobre todo por presiones mayores a 200 MPa (Yaldagard y col., 2008; Heinz y Buckow, 2010). En la práctica, esto se traduce en que los componentes de bajo peso molecular presentes en los alimentos (principalmente aquellos que influyen sobre la calidad nutricional y sensorial), permanecerán inalterados luego del tratamiento, mientras que componentes de alto peso molecular (aquellos cuya estructura terciaria o cuaternaria es importante para su funcionalidad), podrían efectivamente ser alterados en distinta medida. Por ejemplo, en el caso de las uniones puente de hidrógeno, dado que las mismas están acompañadas de un decrecimiento de volumen, su formación se verá favorecida por la aplicación de presión. Si bien se ha constatado que las APH provocan la desnaturalización de proteínas, la velocidad de desnaturalización se reduce a presiones moderadas (<100 MPa) debido a la generación de uniones puente de hidrógeno que son responsables del mantenimiento de la estructura secundaria de los péptidos.

En el caso de las interacciones hidrofóbicas se ha comprobado que las mismas están también influenciadas por la presión. A presiones menores a 100 MPa, estas interacciones causan un aumento de volumen, por lo que serán destruidas por tratamientos que utilicen estos niveles. A presiones mayores, este tipo de uniones está asociado a una reducción de volumen y a la estabilización de la estructura. En ese sentido, el grado de hidrofobicidad o hidrofiliidad de una proteína determinará la magnitud de la desnaturalización a una dada presión.

1. Introducción

Otro principio que gobierna el efecto de la aplicación de APH sobre los alimentos es el ordenamiento microscópico, que implica que a una temperatura constante, un incremento en la presión incrementará el grado de ordenamiento de las moléculas de una sustancia (Tewari, 2008).

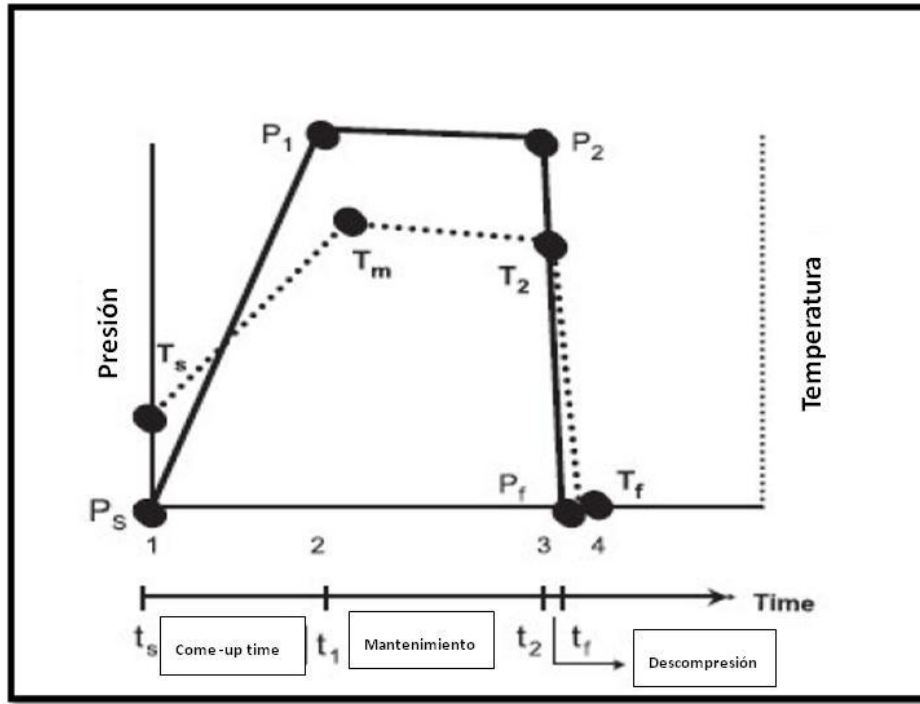


Fig. 5 Variables típicas (Presión, temperatura y tiempo) que definen las condiciones de tratamientos de APH. P_s y P_f representan a las presiones atmosféricas inicial y final respectivamente, generalmente 0,1 MPa. T_m es la temperatura máxima a la presión de proceso. La diferencia entre la temperatura ambiente antes y después del proceso (T_s y T_f) generalmente indica la extensión de la pérdida de calor durante el proceso (Balasubramaniam y col., 2004).

Como muestra la fig. 5, el trabajo de compresión realizado durante el tratamiento de APH aumentará la temperatura de los alimentos, por su transformación en calentamiento adiabático, en aproximadamente 3°C cada 100 MPa, de acuerdo con el calor de compresión del agua. Para el alimento, esta tasa de aumento dependerá de la composición. Por ejemplo, si el mismo presenta una alta humedad, será similar al del agua, pero si tiene un alto contenido de lípidos, el valor será mayor. Con la descompresión, y en caso de que no haya pérdida ni ganancia de calor a través de las paredes de la cámara de presurización durante el proceso, los alimentos se enfriarán hasta llegar a la temperatura inicial (Farkas y Hoover, 2000).

Generalmente, el agua es el componente mayoritario en los alimentos y está presente como base de soluciones o dispersiones y suspensiones de proteínas, carbohidratos y lípidos. Dado que la presión afecta las propiedades del agua, también se modificarán la tensión superficial, la densidad, la viscosidad, el momento dipolar, la constante dieléctrica y las propiedades térmicas del alimento.

1. Introducción

Esos cambios, sumados a los cambios en la compresibilidad del agua, alterarán el efecto de la presión sobre los microorganismos, enzimas y reacciones presentes en el medio acuoso del alimento. Los alimentos de alta humedad tienen una compresibilidad similar a la del agua, entonces cuando son tratados con APH, se obtiene un incremento en la densidad (Welti-Chanes y col., 2005).

Una de las mayores ventajas de las APH es el hecho de que, aplicadas a temperaturas cercanas a la ambiente, producen la inactivación de microorganismos vegetativos y algunas enzimas, mientras que no modifican los atributos sensoriales y las propiedades nutricionales (particularmente el contenido de vitaminas) del producto (Terefe y col., 2014). Su característica más importante es la preservación de la “frescura” del mismo. Además, los tratamientos con APH permiten duplicar o triplicar la vida útil de los alimentos respecto a la que tendrían los mismos sometidos a tratamientos convencionales de preservación (Welti-Chanes y col, 2005). La viabilidad de las células vegetativas de microorganismos es afectada principalmente por la inducción de cambios estructurales en las membranas celulares o por la inactivación de sistemas enzimáticos responsables del control de reacciones metabólicas (Rivalain y col. 2010).

Más aun, con la aplicación de esta tecnología se puede modificar la estructura de todo tipo de macromoléculas, lo cual induce cambios en la textura, la funcionalidad e incluso la apariencia de los alimentos. En consecuencia, la tecnología de APH también puede ser utilizada para el desarrollo de ingredientes y productos con características novedosas, así como para optimizar procesos convencionales de la industria de los alimentos (Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2011).

1.7 Aplicación comercial de las APH

La tecnología de APH, se utilizó en sus comienzos principalmente en la industria de los materiales (producción de cerámica, acero y otras aleaciones). La aplicación de APH en alimentos comenzó a ser ensayada en la última década del siglo XIX por Hite, quien utilizaba un equipamiento que permitía alcanzar 689 MPa para tratar diferentes alimentos y bebidas, tales como leche y carne, además de estudiar la inactivación de algunos virus. Entre los primeros investigadores que realizaron pruebas con APH puede mencionarse a Bridgman, quien en 1914 desnaturizó proteína de huevo; a Timson y Short, quienes en 1965 estudiaron el efecto de la tecnología sobre los microorganismos de leche cruda; a Wilson, quien en 1974 mediante la aplicación de APH preservó

1. Introducción

algunos alimentos de baja acidez y a Elgasim y Kennick, quienes en 1980 estudiaron el efecto de APH en la calidad de proteínas de carne. En 1990, la empresa Meidi-ya Food Co. (Osaka, Japón) introdujo en el mercado jaleas de manzana, frutilla y kiwi que fueron preservadas utilizando solamente APH. En 1995, Hayashi presentó una lista de alimentos procesados por APH que eran comercializados en el mercado japonés. La misma incluía postres en base a fruta y aderezos, jugos de uva y mandarina, calamar crudo y salchichas de pescado (Welti-Chanes y col., 2005). En la actualidad, se ha constatado que las APH representan la tecnología emergente no térmica más difundida en comparación con otras tecnologías contemporáneas (campos eléctricos pulsantes de alta intensidad, pulsos lumínicos, ultrasonido, etc.). En los países desarrollados, se comercializan diferentes productos pasteurizados mediante esta tecnología, por ejemplo, jugos y licuados de frutas (Ulti, Francia), guacamole (Fresherized Foods, USA), jamón cocido/curado (Espuña, España), presas y productos de pollo cocidos (Tyson Foods y Foster Farms, USA), salsa de tomate (Simply Fresco, USA), rellenos de sándwiches (Rodilla, España), arroz y cereales modificados (mediante cambios en la estructura de las proteínas y los almidones, aceleración de reacciones enzimáticas, cambio en la permeabilidad al agua y los gases, etc.) (Echigo Seika, Japón), productos basados en calostro (Fonterra, Nueva Zelandia), ostras (APH se utiliza para abrir las ostras) (Mitsunori, Japón), purés, salsas y jugos de frutas (Donny Boy, Australia), etc.

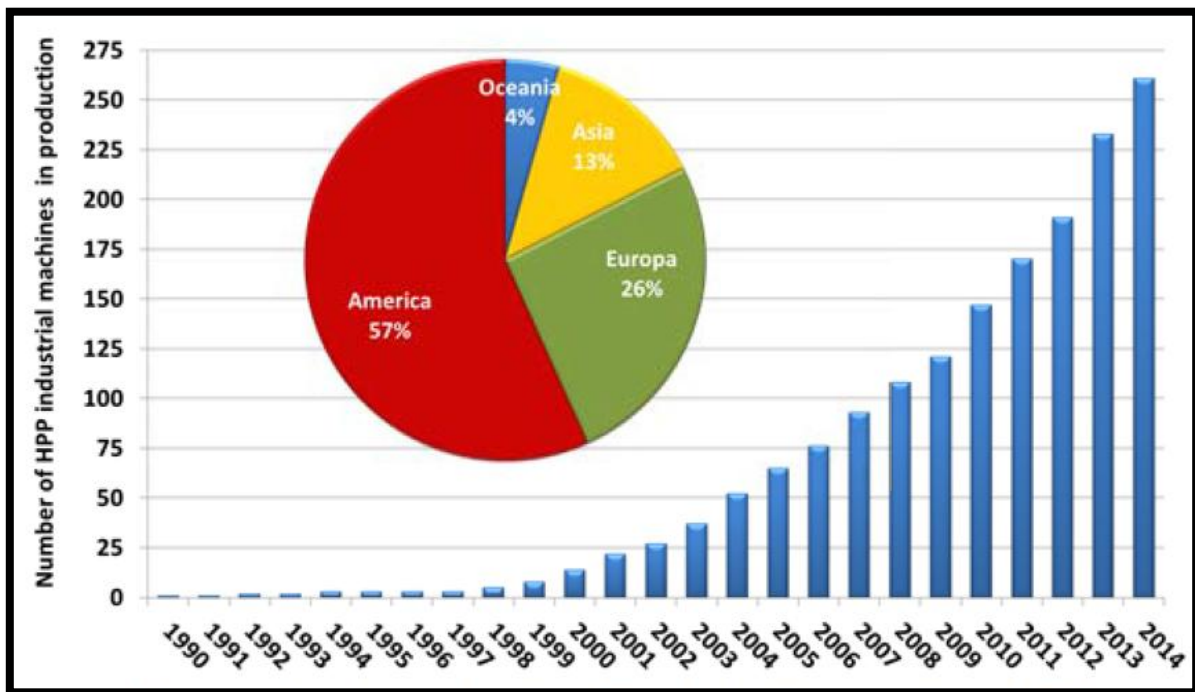


Fig. 6 Crecimiento mundial del uso de la tecnología de APH en la industria de alimentos (Tonello, 2014).

1. Introducción

Al año 2014, alrededor de 260 equipos industriales de APH se encontraban en funcionamiento para el procesamiento de alimentos a nivel mundial. Alrededor del 85% de esos equipos fueron instalados después del 2000. La lenta velocidad inicial del crecimiento en la aplicación de APH para el procesamiento de alimentos puede atribuirse a lo novedoso del proceso (existían pocas experiencias) y a una falta de conocimiento de los beneficios del marketing de la tecnología. Otro problema estaba representado por las limitaciones de los equipos de APH ofrecidos por los proveedores de equipos antes del año 2000. Actualmente, alrededor del 57% de los equipos de APH están localizados en EEUU, México y Canadá. Algunas unidades se encuentran en Perú y en Chile. Europa tiene el 26% de los equipos con unidades en España, Italia, Portugal, Francia, Reino Unido, República Checa, Alemania, Bélgica y Holanda. El 13% se encuentra en Asia, especialmente en Japón, China y Corea. Algunos equipos se encuentran localizados en Australia y Nueva Zelanda, y al momento, no hay equipos en África. Las APH parecen avanzar sobre todo en países donde los consumidores quieren productos *premium* y listos para consumir (Tonello, 2014).

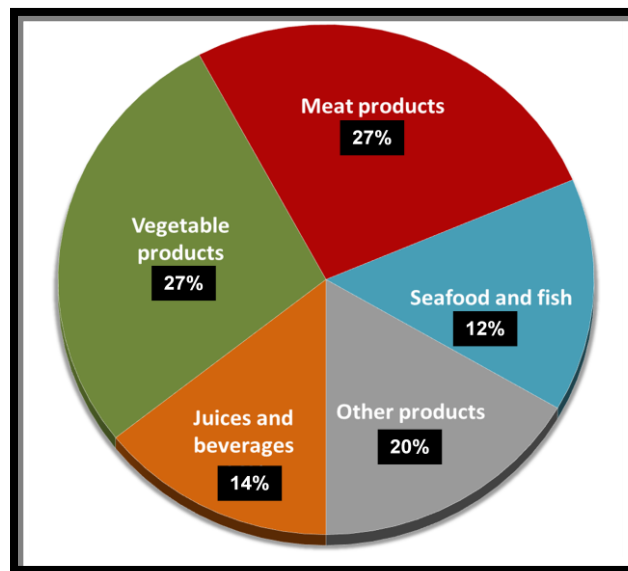


Fig. 7 Distribución de productos presurizados por tipo de alimentos (Tonello, 2014).

Aproximadamente un tercio de los equipos de APH se utilizan para procesar vegetales listos para consumir, principalmente productos de palta como el guacamole. Un tercio de los equipos instalados son utilizados para procesar productos cárnicos tales como jamón de cerdo en rodajas o troceado, pollo y pavo. El último tercio se utiliza para procesar jugos y bebidas, productos de mar y pescado y otros productos como lácteos o para co-procesamiento (Tonello, 2014).

1. Introducción

Si bien los volúmenes producidos son aún pequeños y el costo de inversión es todavía elevado, la tecnología de APH presenta importantes ventajas, como un menor consumo de energía en relación a las tecnologías convencionales de procesamiento térmico, por lo que los productos tratados con altas presiones resultan competitivos a nivel comercial (Tonello, 2011). Dependiendo de los parámetros operativos aplicados y de la escala de producción (tamaño del equipo), los costos de aplicación de esta tecnología son de U\$S 0,08-0,50 por kilo de producto, incluyendo la amortización y los costos operativos. Con el incremento de la demanda y las innovaciones en el diseño de equipamientos, se esperan reducciones tanto en la inversión inicial como en los costos operativos (Terefe y col., 2014).

1.8 Inactivación de microorganismos por APH

La eficacia de la aplicación de APH en alimentos como tecnología de preservación se debe principalmente a la capacidad de destrucción de los microorganismos, lo cual se traduce en un aumento de la vida útil del producto, con una mayor garantía de inocuidad (Considine y col., 2008). En general, cuanto más grande y complejo es el organismo, más fácil resulta su inactivación por APH. Así, los cocos son más resistentes a la presión que los bacilos, y las bacterias gram positivas son más resistentes que las gram negativas debido a la complejidad y la abundancia de proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos en la pared externa de las últimas. Por su parte, las esporas bacterianas son los microorganismos más resistentes, no pudiendo inactivarse solamente por el efecto de las altas presiones. Por lo tanto, como método para preservar alimentos de baja acidez, estables a temperatura ambiente, se propusieron tratamientos combinados de presión y temperatura. De esta manera, para inactivar bacterias espora-formadoras como *Clostridium Botulinum* y *Bacillus Amyloliquefaciens*, fueron utilizadas con éxito temperaturas en el rango de 90-110°C, en combinación con presiones de 500-700 MPa (Castro y Saraiva, 2014).

La capacidad de inactivación de los microorganismos por las APH puede explicarse por distintos mecanismos, entre los que pueden mencionarse a la inducción de cambios en la morfología, y alteraciones en las membranas celulares y en las reacciones bioquímicas de los microorganismos. Se considera que la membrana celular representa el punto más sensible para la inactivación inducida por presión, siendo que el daño causado provoca la muerte celular por pérdida de constituyentes intracelulares. Sin embargo, si la presión aplicada no es lo suficientemente elevada como para inducir una permeabilización total de la membrana, la alteración será solo parcial y limitada a la membrana externa, pudiendo el organismo recuperarse rápidamente luego de la

1. Introducción

despresurización. La fluidez de la membrana celular juega también un rol importante en la susceptibilidad a los tratamientos de APH. Los microorganismos con membranas celulares menos fluidas son los más sensibles a esos tratamientos, por lo que el incremento en la fluidez de la membrana los protegerá contra la inactivación por APH. Otra posible causa de muerte celular por la presión está representada por la desnaturalización de las enzimas clave. Por ejemplo, se ha sugerido, que la ATPasa unida a membrana podría resultar afectada por los tratamientos de APH (Yaldagard y col., 2008).

En relación a las macromoléculas, se ha demostrado que los ácidos nucleicos son más resistentes a las APH que las proteínas. La explicación sería que la estructura helicoidal del ADN, es básicamente el resultado de la formación de uniones puente de hidrógeno. Entonces, la reducción de volumen inherente a la formación de estas uniones (como ya se mencionó), se favorecerá por la aplicación de altas presiones. En estudios realizados en *Escherichia coli*, se demostró que los procesos de replicación, transcripción y traducción resultaron inhibidos por tratamientos relativamente leves (<100 MPa) aunque cuando el microorganismo volvía a presión atmosférica, éstos volvían a la normalidad. Por su parte, dentro del mecanismo de síntesis proteica, tanto el sistema ribosoma-polisoma como la unión de t-ARN a los polisomas son considerados los puntos más sensibles del proceso al tratamiento de APH (Wolti-Chanes y col., 2005).

En el caso de las esporas bacterianas, se sugiere que su mecanismo de inactivación sería diferente al de las células vegetativas, lo que podría estar relacionado con su barorresistencia. Se asume que la presión causa la inactivación de las esporas induciendo primero la germinación y luego inactivando las formas germinadas (Yaldagard y col., 2008).

En contraste con las bacterias, las levaduras son células eucariotas y por lo tanto poseen mitocondrias. Además de la injuria/disrupción en la membrana, se considera que la mitocondria sería otro elemento que podría alterarse por la presión en el proceso de inactivación. La respuesta de las levaduras, hongos y bacterias vegetativas a la presión es altamente variable, ya que depende de factores tales como la especie, la cepa, la temperatura de procesamiento y el sustrato (Castro y Saraiva, 2014). El efecto de la presión sobre los microorganismos presentes en los alimentos depende de distintos factores tales como la temperatura a la cual se aplica el tratamiento de APH, la composición del alimento y las propiedades y el estado fisiológico de los microorganismos (Yaldagard y col., 2008).

1. Introducción

En el caso de frutas y hortalizas mínimamente procesadas, las fuentes de contaminación incluyen a la materia prima, al contacto con los equipos, al personal y a las instalaciones de procesamiento. Los microorganismos alterantes extraen nutrientes del vegetal utilizando enzimas líticas extracelulares que degradan polímeros para liberar agua y otros componentes intracelulares del tejido. Los hongos, en particular, producen abundantes pectinasas y hemicelulasas extracelulares que constituyen un factor importante en el deterioro causado por estos microorganismos. La alta acidez ($\text{pH} < 4,6$) de la mayoría de las frutas, como es el caso de los duraznos, no permite el crecimiento de patógenos ni de la mayoría de las esporas bacterianas. Se ha demostrado que la aplicación de APH puede inactivar las células vegetativas de hongos presentes ya sea en las frutas sin otro procesamiento previo como en productos derivados de las mismas. Generalmente, un tratamiento de 300 a 400 MPa aplicado por 5 a 15 min a una temperatura de 20 a 30°C es suficiente para inactivar células vegetativas de la mayoría de los hongos y levaduras. Contrariamente, las ascosporas termo-resistentes que producen algunos hongos son altamente resistentes a los tratamientos con APH y muchos autores mencionan que para su inactivación sería necesario un nivel mínimo de presión de 600 MPa por 10 a 15 min, en combinación con temperaturas de 60 a 90 °C. Sin embargo, la presencia de esos hongos y sus ascosporas puede ser usualmente controlada con una buena selección de la materia prima y la implementación de buenas prácticas de manufactura durante el procesamiento. Mediante las APH es posible también inactivar en frutas los patógenos de baja dosis infectiva como *Escherichia coli*, productora de toxina SHIGA (STEC), y los que pertenecen al género *Salmonella*. En la mayoría de los casos, una reducción de 5 reducciones logarítmicas solo se puede lograr con una presión relativamente alta (por ej. 500 MPa por 5 a 15 min y 10 a 25°C), aunque muchos autores sugieren que durante el almacenamiento de productos ácidos presurizados se produciría una inactivación secundaria de estos patógenos. Un aspecto positivo es que la sensibilidad de los patógenos a las APH en medios ácidos permitiría entonces la utilización de tratamientos más leves para inactivarlos (Vercammen y col., 2012).

1.9 Efecto de las APH sobre las enzimas y reacciones enzimáticas

La efectividad de las APH en productos frutihortícolas resulta a veces disminuido por el hecho de que algunas enzimas son baroresistentes a temperatura ambiente (Yaldagard y col., 2008). Cuando se evalúa el efecto de la presión sobre las reacciones enzimáticas, se deben considerar tanto las alteraciones producidas a nivel de la interacción enzima-sustrato como las consecuencias sobre la

1. Introducción

etapa catalítica en sí. Ambos procesos tienen su origen en alteraciones de las interacciones polares e hidrofóbicas, en reordenamientos provocados sobre las moléculas de agua, y en los cambios conformacionales inducidos (Wolti-Chanes y col., 2005). Se ha constatado que la aplicación de presiones por encima de los 300 MPa a temperatura ambiente puede causar la desnaturalización irreversible de las proteínas, mientras que a presiones menores, los cambios inducidos en gran parte de la estructura proteica son de naturaleza reversible (Knorr y col., 2006).

Las enzimas son proteínas cuya actividad biológica depende de su sitio activo, el cual queda determinado por la configuración tridimensional de la molécula. La desnaturalización de la enzima, junto con los cambios conformacionales que generalmente conlleva, puede alterar la funcionalidad de la misma, resultando en un incremento o pérdida de la actividad biológica, así como en cambios en la especificidad al sustrato (Hendrickx y col., 1998).

Es notorio el hecho de que al ser sometidas a tratamientos de APH, las proteínas muestran cambios en su estructura nativa similares a los inducidos por altas temperaturas. La conformación nativa de las proteínas es estable solamente en un rango pequeño de presiones y temperaturas. La estructura de una proteína se estabiliza por un delicado balance de uniones di-sulfuro y distintas fuerzas no covalentes tales como puentes de hidrógeno, e interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y de Van der Waals. Con el calentamiento, todas las fuerzas de unión se debilitan debido a fluctuaciones moleculares, y de esta manera la molécula de la proteína puede sufrir la desnaturalización o el desdoblamiento. Dado que los residuos de aminoácidos que forman el centro activo de la enzima se encuentran próximos solamente en la estructura nativa, las alteraciones mencionadas resultarán en el desensamble de ese dominio y afectarán la actividad de la enzima. En el caso de las altas presiones, el mecanismo de inactivación es diferente, ya que usualmente no está acompañado por cambios en las uniones covalentes, afectándose principalmente las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas (Terefe y col., 2014). En esta condición, se favorece la disociación de proteínas oligoméricas o de sistemas macromoleculares complejos, pudiendo producirse también el desplegamiento de las cadenas proteicas (Tewari, 2007).

Es importante mencionar que las proteínas oligoméricas se pueden disociar en sus subunidades individuales incluso a presiones relativamente bajas (150-200 MPa). Esta disociación se produce cuando los átomos presentes en la interfase de las subunidades presentan un empaquetamiento imperfecto, pudiendo alterarse las interacciones hidrofóbicas y/o electrostáticas en esa área. En

1. Introducción

caso de que esta situación resulte en una reducción de volumen, el proceso estará favorecido por las APH. La perturbación de la estructura terciaria, la cual también está estabilizada por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, tiene lugar usualmente a presiones por debajo de los 200 MPa (Terefe y col., 2014).

En contraste con lo que sucede con la temperatura, la cual desestabiliza la macromolécula por transferencia de hidrocarburos no polares del centro hidrofóbico hacia el agua, la presión induce la desnaturalización por penetración del agua hacia el interior de la proteína. El desdoblamiento parcial de la molécula puede deberse a una pérdida de contacto entre dominios no polares. Por lo tanto, la baroestabilidad de una enzima depende principalmente de su habilidad para compensar las pérdidas de uniones no covalentes debido a la relocalización de moléculas de agua (Terefe y col., 2014). En consecuencia, la alteración del volumen de hidratación afectará la susceptibilidad de la enzima a desnaturalizarse por la exposición a altas presiones (Chakraborty y col., 2014).

Notoriamente, dependiendo de la presión aplicada y del tipo de enzima, las APH pueden causar inactivación o activación de enzimas. Su comportamiento dependerá también de factores intrínsecos y extrínsecos tales como el origen de la enzima, el pH, la composición del medio y la temperatura. La presencia de solutos puede tener un efecto protector, aunque también puede conducir a una fuerte desestabilización.

En algunos casos, la exposición a niveles de APH moderados puede utilizarse para potenciar el efecto benéfico de ciertas reacciones enzimáticas sobre los tejidos vegetales debido a que luego de la ruptura de los tejidos, esta exposición incrementará la interacción enzima-sustrato. Otro efecto posible de los tratamientos de APH es el de aumentar la termoestabilidad de algunas enzimas, permitiendo que determinadas reacciones puedan llevarse a cabo a temperaturas mayores y, por lo tanto, se producirá un aumento en la velocidad de catálisis. Esto se podría explicar considerando que bajo ciertas condiciones de presión, se induce en la proteína la formación de uniones del tipo fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno, lo cual provoca una reducción en el volumen total de la proteína. Dado que presión y temperatura tienen efectos opuestos sobre estas interacciones, esto podría explicar la estabilidad inducida por presión frente a la desnaturalización provocada por el calor. La presión también puede afectar la interacción enzima-sustrato por cambios en la conformación del sustrato, lo cual puede resultar tanto en un potenciamiento como en una inhibición de la reacción catalizada por enzimas. Otra característica de las APH es la capacidad de inducir en células vegetales reacciones de respuesta al estrés, tales

1. Introducción

como el incremento en la síntesis de fenilalaninamonioliasa (PAL) lo cual aumenta la síntesis de polifenoles. Esto constituye una estrategia interesante, pudiendo ser beneficioso para algunas aplicaciones (Terefe y col., 2014).

Entre las distintas enzimas vegetales, la PPO es una de las más baroresistentes estudiadas hasta el momento. Sin embargo, esta estabilidad depende del vegetal del cual provenga y de las condiciones de aplicación del tratamiento. En el caso de durazno, Guerrero -Beltrán y col. (2005) observaron en extractos de puré de esa fruta que contenía ácido ascórbico, que la exposición a presiones de entre 100 y 300 MPa provocaban la activación de la PPO, mientras que valores entre 400 y 500 MPa causaban su inhibición. En concordancia con estos resultados, Kingsly y col. (2009) encontraron que los tratamientos de APH mayores a 300 MPa en combinación con ácido cítrico (1-1.2%) eran capaces de inactivar la PPO en rodajas de durazno.

1.10 Efecto de las APH sobre la textura de FyHMP

La textura de un producto vegetal constituye un importante parámetro de calidad que guarda una estrecha relación con la estructura del tejido que lo compone. La parte comestible de frutas y hortalizas está generalmente formada por tejido parenquimático, siendo éste un tejido no especializado formado por células y espacios intercelulares. Las células parenquimáticas (fig 8-A) presentan la clásica organización eucariota vegetal, con un núcleo, citoplasma (que contiene a las organelas subcelulares), una membrana (llamada plasmalema), y una pared celular. Las células vegetales maduras contienen una gran vacuola con contenido acuoso, que ocupa el 80-90% del total del volumen de la célula y es la responsable del potencial osmótico celular. Esta estructura está rodeada por otra membrana denominada tonoplasto. Por otra parte, el citoplasma está conectado al citoplasma de células adyacentes por canales llamados plasmodesmos que atraviesan la pared celular primaria (Van Buggenhout y col., 2009).

Las paredes celulares son estructuras complejas constituidas por una red de celulosa inmersa en una matriz de polisacáridos (pectinas y hemicelulosas) y proteínas (glicoproteínas y enzimas) (Fig.8-B). El procesamiento de un vegetal puede alterar la composición de la pared celular, ya que cualquier alteración en la misma induce la activación de ciertas enzimas de pared que provocarán cambios estructurales en la fracción de polisacáridos, lípidos y proteínas (Cano y de Ancos, 2005).

Las células adyacentes se adhieren unas con otras mediante la denominada laminilla media, compuesta principalmente por pectinas. Es sabido que la resistencia de un tejido vegetal está

1. Introducción

determinada por las propiedades mecánicas de las paredes celulares, en conjunto con la presión interna de las células y la adhesión intercelular; en consecuencia, el comportamiento del complejo pared celular-laminilla media resultará preponderante para determinar los cambios de textura experimentados por las frutas y hortalizas (Van Buggenhout y col., 2009). En condiciones normales, la pared celular provee la rigidez que permite que en el interior se genere una cierta presión de turgor. Por otra parte, el carácter semipermeable del plasmalema determina las propiedades de difusión y hace posible los procesos de ósmosis (Van Buggenhout y col., 2009).

Las membranas biológicas son bicapas compuestas por fosfolípidos y proteínas insertas dentro de la matriz lipídica. Muchas de estas proteínas forman canales a través de los cuales las células se comunican con el medio externo. A temperaturas fisiológicas, las membranas celulares son fluidas, aunque esta fluidez puede perderse bajo diferentes condiciones, con la consecuente disminución en la movilidad de los fosfolípidos. Un fenómeno que puede alterar las características de las membranas está determinado por la exposición de las mismas a una determinada temperatura en la cual se produce la transición de los lípidos de líquido cristalino a una fase gel, en la cual las cadenas no polares están totalmente extendidas y las cabezas polares están empacadas y deshidratadas. Cuando la fase gel y la líquida coexisten, los lípidos no se empaquetan bien y se puede perder alguna de las propiedades como la semipermeabilidad (González y Barrett, 2010).

La compartimentalización, determinada por las estructuras de membranas y otras organelas celulares, resulta necesaria para que se lleven a cabo en forma organizada las reacciones bioquímicas esenciales para la vida. Cabe destacar que las membranas celulares son las principales receptoras del estrés en los tejidos vegetales y cualquier alteración en su estructura puede causar modificaciones en la compartimentalización.

Desde un punto de vista biológico, el procesamiento mínimo del tejido vegetal significa la exposición a una condición de estrés, por lo que el conocimiento del efecto de las operaciones utilizadas en el procesamiento sobre el tejido vegetal es fundamental para comprender las respuestas fisiológicas, garantizar la calidad y optimizar el proceso.

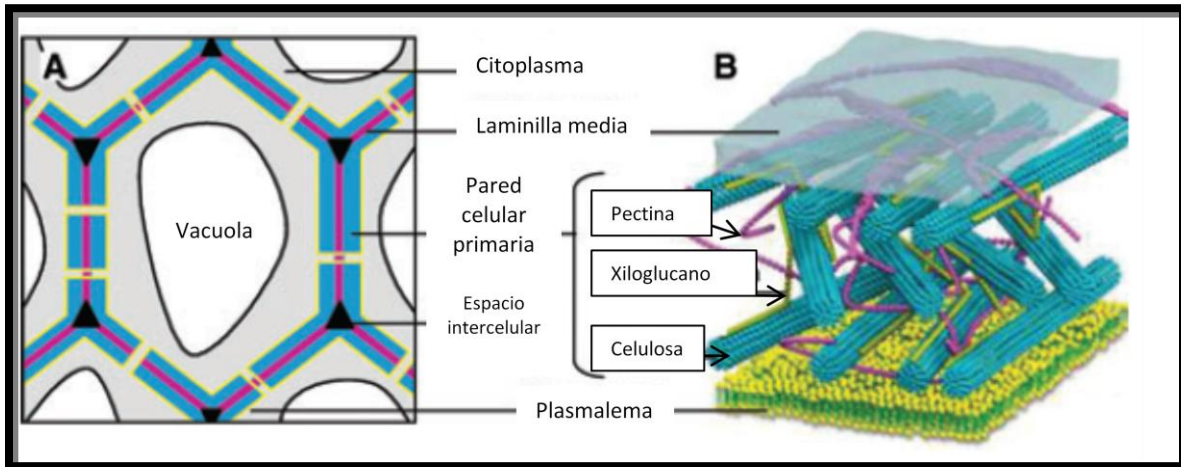


Fig. 8 Presentación esquemática de tejido parenquimático (A) y pared celular de una célula vegetal (B) (Van Buggenhout y col., 2009).

Se ha comprobado que durante la exposición de un vegetal a un tratamiento de APH, se producen cambios en distintos biopolímeros celulares, como polisacáridos, proteínas (alteraciones de la estructura, desdoblamiento, agregación, gelación) y lípidos (cristalización). Estos cambios (físicos, fisicoquímicos y bioquímicos) inducen alteraciones importantes en la morfología del tejido y en las organelas y membranas celulares, pudiendo afectar la funcionalidad y la textura de los productos. La magnitud de la alteración será altamente dependiente de las condiciones del tratamiento de APH (nivel de presión, tiempo de mantenimiento, temperatura de proceso) (Cano y de Ancos, 2005). Luscher y col. (2005) sugirieron que la intensidad del daño a las membranas de los tejidos podría estar influenciada por la rigidez de las mismas en fase gel, y que el estado que presentan las mismas luego de los tratamientos de APH (con o sin cambios de transición de fase) estaría estrechamente relacionado con la viabilidad de las células, la producción de exudado y los cambios de textura asociados a la presión de turgor de los tejidos.

En general, los tratamientos de APH inducen un aumento pronunciado de la permeabilidad de la membrana por la disrupción y/o desnaturalización de las proteínas presentes en la misma, con el consecuente movimiento de agua desde adentro hacia afuera de la célula. Como resultado, los tejidos vegetales adquieren una apariencia aguachenta o mojada, tornándose translúcidos (Rastogi, 2009). Muchos autores sugieren que los cambios en la permeabilidad de las células son la principal causa de alteración textural o de la microestructura. Además, esto puede traer aparejado el desarrollo de reacciones bioquímicas que afecten la textura final del producto (Préstamo y Arroyo, 1998; Rastogi y Niranjana 1998; Kingsly y col., 2009-b).

1. Introducción

Las APH pueden también causar plegamientos y corrugación de la pared celular, lo cual sería la causa de alteraciones en la textura por los cambios inducidos en la microestructura y la pérdida de turgor, firmeza e integridad de los tejidos. Otro aspecto relacionado con la textura está dado por la alteración de la capacidad de retención de agua inducida por las APH. En este sentido, Butz y col (2002) observaron que este parámetro era mayor en pulpa de tomate tratada con 600 MPa por 60 min que en el mismo producto expuesto a 95°C por el mismo tiempo, e incluso mayor que en productos no tratados. Los autores atribuyeron este cambio en la retención de agua precisamente al fuerte efecto de las APH sobre la estructura de las macromoléculas.

Generalmente, el efecto de las APH sobre la textura depende del tipo de vegetal procesado y de sus características morfológicas y estructurales. Una de las posibilidades es que no se generen cambios perceptibles, por los que el aspecto será muy similar al de un producto fresco, como acontece en el caso de vegetales con estructura firme y compacta (como coliflor, zanahoria). Contrariamente, en el caso de los productos altamente porosos (ej. frutilla), puede inducirse el colapso total de la estructura, provocándose un ablandamiento marcado como consecuencia de la gran compresibilidad de la fase gaseosa. Esta última situación sería la consecuencia de la compactación de la estructura al aplicar APH, y el posterior desarrollo del daño luego del brusco ingreso de aire.

Todos los efectos sobre la textura mencionados hasta acá limitan en parte la aplicabilidad de las APH en vegetales, por lo cual hasta el momento se considera que esta tecnología se adapta mejor para el tratamiento de productos como jugos, purés o vegetales de tejido firme que no presenten aire atrapado en su estructura (Tangwongchai y col., 2000).

Es importante considerar que el origen de los cambios texturales inducidos en frutas y hortalizas puede estar relacionado con transformaciones en los polímeros de las paredes celulares tanto debidas a reacciones enzimáticas como no enzimáticas (Sila y col., 2008). Como fuera comentado anteriormente, el procesamiento por APH induce el desarrollo de reacciones como consecuencia de la descompartmentalización que ocurre en las células. De esta manera, sustratos, iones y enzimas que estaban localizados en diferentes compartimentos en las células pueden liberarse e interactuar entre sí. Por otra parte, los tratamientos de APH pueden también aumentar la actividad de la enzima pectinmetilesterasa (PME) y reducir la de la poligalacturonasa (PG) (Oey y col., 2008).

1. Introducción

La acción de estas enzimas endógenas provoca transformaciones bioquímicas en las pectinas (fig. 9), las cuales constituyen el principal componente de la laminilla media y cuya función es adherir las paredes celulares entre sí, aportando firmeza y elasticidad a los tejidos. Entre estas enzimas, la PME cataliza la desesterificación de los grupos metilo de la pectina (los cuales forman uniones del tipo metil-éster con el ácido galacturónico) produciendo metanol, moléculas de pectina con un grado menor de metilación y ácido galacturónico. Por su parte, la PG hidroliza posteriormente las uniones glicosídicas de las sustancias pécticas desesterificadas, lo cual conduce a un drástico ablandamiento tisular. En este sentido, dado que las APH provocan un aumento de la actividad PME y una reducción de la actividad PG, un tratamiento de este tipo podría transformarse en una importante herramienta para aumentar la firmeza de los productos vegetales, ya que de esta manera se propiciaría la formación de moléculas de pectina con menor grado de metilación por acción de la PME, las cuales no podrían ser posteriormente degradadas por la PG. Esto induciría a su vez un mayor grado de entrecruzamiento entre las cadenas de pectina de bajo metoxilo y los cationes divalentes tales como calcio, con la consecuente formación de una estructura de red de gel capaz de retener agua y aumentar la rigidez de la laminilla media y de la pared celular (Cano y de Ancos, 2005).

Por otra parte, se comprobó que las APH eran capaces de retardar las reacciones de β -eliminación (Oey y col., 2008), la cual se da en las pectinas de las paredes celulares en condiciones alcalinas y/o de altas temperaturas (por ejemplo mediante el procesamiento térmico) y se traduce en el ablandamiento de productos vegetales. Durante este proceso, se cliva una unión glicosídica de la cadena de ácido galacturónico debido a la remoción de un hidrógeno ácido por un ión hidroxilo, formándose finalmente un doble enlace en la zona de clivaje. En este sentido, una de las ventajas de las APH es que, a diferencia de los tratamientos térmicos, no se inducirían las reacciones de β -eliminación, por lo que las frutas y vegetales presurizados no estarían sometidos al proceso de ablandamiento típico de los tratamientos térmicos, en los cuales se produce una pronunciada depolimerización y solubilización de las pectinas (Jolie y col., 2012). Este efecto, junto con la acción de las APH sobre las enzimas de pared, hace que el producto presurizado mantenga mejor sus propiedades texturales durante el almacenamiento (Oey y col., 2008). Es importante mencionar que si bien puede observarse una pequeña pérdida de firmeza en los productos luego de un tratamiento de APH, este fenómeno se atribuye principalmente a la ruptura de las membranas y la concomitante pérdida de turgencia.

1. Introducción

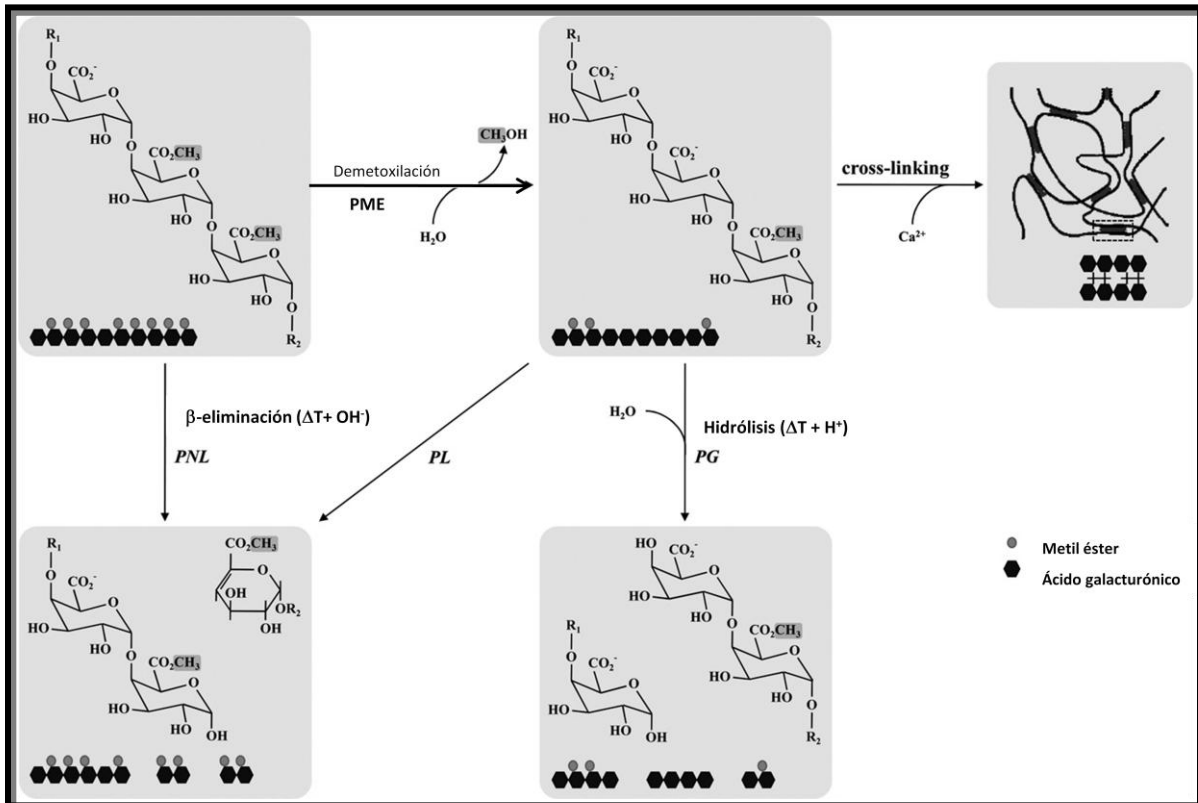


Fig. 9 Reacciones esquemáticas de reacciones enzimáticas y no enzimáticas de conversión que ocurren sobre la cadena de pectina. PME: pectinmetilesterasa, PNL: pectinliasa, PL pectato liasa, PG poligalacturonasa, R1/R2 fragmento de inicio y terminación de la pectina, ΔT : calor (Jolie y col., 2012).

Es indudable que el mayor conocimiento de los cambios en la estructura celular que ocurren como resultado de la aplicación de nuevas tecnologías de procesamiento como las APH, permitirá prolongar la vida útil y optimizar la calidad de productos vegetales mínimamente procesados, lo cual se traducirá en una mejor preservación de las características de frescura.

1.11 Efecto de las APH sobre el *flavor* de productos vegetales

Se define como *flavor* a la percepción sensorial de un alimento determinada principalmente por los sentidos del gusto y del olfato. Es sabido que la lengua humana puede distinguir solo cinco tipos de sabores, de los cuales los sabores ácido, dulce y amargo son los más relacionados con el *flavor* de frutas y hortalizas. Contrariamente, la nariz humana puede distinguir un gran número de compuestos volátiles, incluso en muy bajas concentraciones. En consecuencia, cualquier cambio en cantidad o calidad de los compuestos responsables de los sabores o los olores de frutas y hortalizas podrá resultar en cambios apreciables en el *flavor* de las mismas (Oey y col., 2008).

1. Introducción

Generalmente, los tratamientos de APH no alteran el *flavor* de frutas y hortalizas, ya que los compuestos que lo determinan poseen un bajo peso molecular, y por lo tanto sus estructuras no serán directamente afectadas por la presión. Esto se comprobó, tanto en los aspectos de composición química como en los sensoriales, en numerosos trabajos realizados en diversos productos como puré de frutilla, jugo de mandarina, mezcla de jugo de naranja, limón y zanahoria, jugo de uva y de guayaba, tratados con presiones en el rango de 200-600 MPa. Sin embargo, dado que las altas presiones pueden tanto potenciar como retardar las reacciones químicas o enzimáticas, es importante considerar que esto podría afectar indirectamente el contenido relativo de algunos compuestos y por lo tanto alterar el *flavor* de productos a base de frutas y hortalizas, principalmente durante el almacenamiento (Cano y de Ancos, 2005; Oey y col., 2008).

Por ejemplo, en el caso de productos presurizados a base de tomate, se ha informado sobre el desarrollo de sabores rancios, lo cual alteró de forma importante las características sensoriales. Este fenómeno estaría aparentemente ligado a la baroresistencia diferencial de las enzimas lipoxigenasa e hidroperoxidoliasa, las cuales están naturalmente presentes en el tomate y catalizan la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Castro y Saraiva, 2014). Así, a presiones menores a 500 MPa, se comprobó que la hidroperoxidoliasa presenta una menor estabilidad que la lipoxigenasa, mientras que a presiones mayores la situación se revierte. Esta propiedad diferencial afectaría la concentración de n-hexanal, un compuesto volátil asociado con el aroma a follaje y a fresco. Este compuesto, cuya concentración aumenta considerablemente luego del procesamiento, contribuye al *flavor* típico a tomate fresco a bajas concentraciones, aunque a mayores concentraciones imparte un *flavor* asociado a la rancidez en estos productos (Porretta y col., 1995). En cebollas presurizadas, se reportó, además de un aumento en la concentración de hexanal, la generación de olor a frito o cocido probablemente debido al aumento en el contenido de propil trans-propenil disulfuro y 3,4 dimetiltiofeno (Oey y col., 2008).

Otro fenómeno asociado al *flavor* está dado por el hecho de que ciertos compuestos, conocidos como precursores glicosídicos del aroma (compuestos glicoconjugados), están generalmente presentes en cantidades importantes en muchas frutas. Si bien estos compuestos no son volátiles, pueden ser hidrolizados a agliconas volátiles por la acción de β -glucosidasas, que son enzimas naturalmente presentes en muchas plantas. Una vez producida la hidrólisis, se generan compuestos como linalool, nerol, geraniol y citronellol que son los principales responsables del *flavor* de muchos productos de origen vegetal. Dado que los tratamientos de APH aplicados en

1. Introducción

niveles moderados pueden incrementar la actividad β -glucosidasa, un uso potencial de estos tratamientos sería el de incrementar la liberación de estos compuestos y por lo tanto realzar el *flavor* de determinados alimentos vegetales (Zabetakis y col., 2000).

Dado que los resultados reportados hasta el momento sobre el efecto de los tratamientos de APH sobre el *flavor* de frutas han sido bastante variables, es importante la realización de ensayos específicos que permitan conocer lo que sucede con cada especie en particular. Por ejemplo, en frutilla se informó en varios estudios sobre cambios en el perfil de aromas de productos presurizados, inclusive la formación de nuevos compuestos como γ -lactona, el cual está fuertemente asociado al *flavor* de duraznos. (Oey y col., 2008). En contraste, Baxter y col. (2005) no encontraron diferencias en la concentración de compuestos volátiles en jugo de naranja congelado, ya sea tratado térmicamente (85°C 25 seg) o tratado por APH (600 MPa 60 seg). En el caso de duraznos, los tratamientos de APH (400 MPa 10 min) indujeron un aumento en la concentración de benzaldehído. Este aumento, atribuido al incremento de la actividad β -glucosidasa, se exacerbó con la presencia de ácido ascórbico como aditivo (0,1% p/p). Dado que el benzaldehído contribuye a resaltar el *flavor* típico a durazno (también se lo relaciona con aroma a almendras dulces), su aumento podría ser considerado como un efecto positivo sobre el producto (Sumitani y col., 1994; Sumitani y col., 1997).

En resumen, si bien los tratamientos de APH aplicados a temperatura ambiente, no afectan directamente al *flavor* de frutas o productos a base de frutas, se debe tener en cuenta que ciertas situaciones, como la activación o inactivación de enzimas podrían afectar indirectamente al *flavor* de los productos (Castro y Saraiva, 2014). Aunque las propiedades sensoriales del producto fresco pueden resultar alteradas, las APH son consideradas igualmente un método altamente promisorio para la preservación de frutas y hortalizas, ya que las propiedades sensoriales de muchos productos presurizados son generalmente superiores que la de los mismos productos tratados con tratamientos térmicos convencionales.

Debido a la complejidad de su estudio, resulta difícil estimar de antemano en qué magnitud los cambios en los compuestos volátiles inducidos por las APH afectarán las características del *flavor* de frutas y hortalizas. Como prueba de esta complejidad, se ha informado en frutillas que los responsables de su *flavor* son una mezcla de más de 350 compuestos volátiles entre los cuales se encuentran furanona, ésteres, aldehídos, alcoholes y compuestos azufrados. Por otra parte, se sabe que debido a diferencias en el umbral de percepción olfativa, algunos compuestos tienen un

1. Introducción

impacto mucho mayor sobre el *flavor* global que otros. Además, se ha comprobado que como consecuencia de interacciones entre compuestos individuales, incluso un pequeño cambio en la concentración de un compuesto puede tener un impacto grande en las características sensoriales de un producto. Por este motivo, además del análisis químico y textural, resulta necesario recurrir a un análisis sensorial profundo para tener un mejor entendimiento de los efectos de la aplicación de APH sobre las propiedades sensoriales de los productos vegetales (Oey y col., 2008).

1.12 Efecto de las APH sobre compuestos de interés nutricional de productos vegetales

Como ya se mencionara anteriormente, la incorporación de frutas y hortalizas a la dieta diaria resulta altamente beneficiosa debido a su aporte tanto de micronutrientes como de otras sustancias bioactivas. Sin embargo, se ha comprobado que muchos de estos compuestos pueden verse afectados negativamente por los tratamientos térmicos convencionales de preservación. En este contexto, las tecnologías no térmicas de procesamiento ofrecen una alternativa interesante ya que no tienen los efectos negativos de las altas temperaturas sobre esos compuestos (Oms-Oliu y col., 2012). Diversos estudios sobre la estabilidad de vitaminas mostraron que las APH no afectan o afectan sólo moderadamente el contenido de vitaminas de productos frutihortícolas, excepto a combinaciones de presiones y temperaturas extremas (Oey y col., 2008-b).

En lo que respecta al ácido ascórbico (AA), el cual tiene actividad como vitamina C, se comprobó que su concentración en diferentes productos vegetales no se altera significativamente por los tratamientos de APH. Si bien la concentración de este compuesto puede mostrar una cierta disminución durante el almacenamiento, esto sería debido a diferencias en la concentración de oxígeno y posiblemente a la actividad de enzimas endógenas pro-oxidativas (Oms-Oliu y col., 2012). Se sabe que el oxígeno presente en el producto juega un importante papel en la degradación del AA, tanto a presión atmosférica como a presiones más elevadas, por lo que la degradación del AA podría limitarse si se reduce la concentración inicial de oxígeno. En otras palabras, la estabilidad del AA a la presión sería altamente dependiente de la relación molar entre las concentraciones de vitamina y de oxígeno presentes en el producto. Por lo tanto, la degradación del AA durante el procesamiento y almacenamiento subsecuente puede limitarse mediante la eliminación del oxígeno del envase (Oey y col., 2008; Polydera y col., 2003).

1. Introducción

La degradación de AA con la temperatura está en mayor medida relacionada con la energía de activación de la reacción, la cual es independiente del nivel de presión. En general, puede considerarse que el AA es inestable a niveles muy altos de APH cuando se combina el tratamiento con alta temperatura (por arriba de 65°C). En ese caso, la mayor degradación del compuesto es causada por un mecanismo oxidativo, especialmente durante el calentamiento adiabático (Oey y col., 2008-b). En diferentes productos (néctar de frutilla, jugo de naranja, brotes de alfalfa acidificados con cítrico) se ha comprobado que si bien puede ocurrir una cierta disminución en el nivel de AA durante el almacenamiento, luego del tratamiento por APH, esta situación podría ser controlada, reduciendo la temperatura de conservación (Gabrovska y col., 2005; Oey y col., 2008-b; Nienaber y Shellhammer, 2001; Polydera y col., 2003).

Se ha demostrado también que diferentes condiciones de aplicación de los tratamientos de APH afectan de modo variable a la estabilidad de la vitamina C durante el almacenamiento. Así, en productos como el puré de guayaba tratado con APH (400 MPa a temperatura ambiente, 15 min), el contenido de AA comienza a disminuir luego de 20 días, mientras que en el control, este proceso se inicia ya a los 10 días. Para el caso de mayores niveles de presión (600MPa/temperatura ambiente/15min) este compuesto se mantuvo constante durante 40 días. Se considera que esto puede deberse a la inactivación de enzimas endógenas pro-oxidativas durante tratamientos de APH a altos niveles de presión (Yen y Lin, 1996; Oey y col., 2008-b).

En el caso de las vitaminas B1 y B2, no se observaron pérdidas significativas en sistemas modelo luego de la aplicación de tratamientos de entre 400 y 600 MPa, mostrando niveles de estos compuestos significativamente mayores en comparación a la aplicación de tratamientos térmicos. Es de destacar que la B1 (tiamina), es una vitamina muy sensible al calor (Castro y Saraiva, 2014).

Otro tipo de compuestos altamente apreciados por los consumidores actuales por sus propiedades antioxidantes son los compuestos fenólicos, los cuales representan un variado grupo de fitoquímicos encontrados en muchas partes comestibles de los productos vegetales. De esta manera, los fenoles pueden neutralizar a las denominadas especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas endógenamente y estrechamente ligadas al desarrollo de cáncer, envejecimiento y enfermedades coronarias. Dentro de los fenoles, los flavonoides constituyen el tipo de compuesto más común y mejor distribuido. Entre ellos se encuentran las flavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas, antocianinas e isoflavonas (Oms-Oliu y col., 2012). Los compuestos fenólicos juegan un rol importante en distintas características asociadas a las frutas, tales como la apariencia visual, el

1. Introducción

sabor y el aroma. Por ejemplo, estos compuestos son los responsables de la mayoría de los colores azules, violetas, rojos y colores intermedios de las frutas, por lo que un aumento en el contenido de fenoles producirá frutas más coloridas. Por otra parte, los sabores amargos, dulces, pungentes y astringentes también están relacionados con algunos compuestos fenólicos (Altuner y Tokusoglu, 2013). Según diversos estudios, los tratamientos de APH favorecen la extractabilidad de estos compuestos, lo cual constituye una promisoriosa alternativa de uso para este tipo de tratamiento (Oms-Oliu y col., 2012).

Se ha comprobado que la aplicación de APH a temperatura ambiente tiene *per se* un mínimo efecto sobre el contenido de antocianinas de los productos vegetales (Oey y col., 2008-a). Durante el almacenamiento refrigerado, la estabilidad de las antocianinas está mayormente relacionada con la actividad de enzimas como β -galactosidasa, PPO y POD residual, que inducen una rápida oxidación de antocianinas y otros polifenoles en presencia de oxígeno (Oms-Oliu y col., 2012). En general, puede decirse que los tratamientos de APH no causan grandes pérdidas en la capacidad antioxidante de los productos vegetales, aunque los resultados son altamente dependientes de la matriz vegetal, de los parámetros de proceso (nivel de presión, tiempo de mantenimiento y temperatura), y del método seleccionado para medir capacidad antioxidante (Cano y de Ancos, 2005).

Otro grupo de compuestos que presentan estabilidad frente a las APH lo conforman los carotenos. Al igual que lo que sucede con las antocianinas, los tratamientos de APH pueden favorecer de forma importante el rendimiento de extracción de estos compuestos. Esta tecnología ha sido utilizada con éxito para extraer licopeno del residuo de la pasta de tomate, cuya eficacia estuvo afectada por el nivel de presión utilizado. Notoriamente, el efecto de las APH en el rendimiento de extracción, está influenciado por los cultivares y por los niveles de presión, pero no por los tiempos de mantenimiento de los mismos (Oey y col., 2008-b). Este aumento en la extractabilidad de carotenoides podría deberse a la alteración de la unión de los mismos a las proteínas debido a la presión (Oms-Oliu y col., 2012).

Al igual que en el caso de los compuestos volátiles, la inestabilidad de las vitaminas en frutas y hortalizas no está únicamente asociada al desarrollo de reacciones químicas, sino que también puede relacionarse con las reacciones de conversión enzimática. Por ejemplo, los folatos naturales (formas reducidas del ácido fólico) existen en la forma de monoglutamato y poliglutamato. En el intestino humano, las formas poliglutamato deben ser hidrolizadas por la gama glutamil-hidrolasa

1. Introducción

antes de la absorción, ya que la forma de monoglutamato es la que presenta una mayor digestibilidad. Se ha demostrado que la aplicación de un tratamiento de APH aumenta la biodisponibilidad de los folatos a través de la inducción de la depolimerización enzimática de los poliglutamatos a cadenas de folatos más cortos. Este tipo de tratamiento ha sido exitoso en distintas combinaciones de presión-temperatura (300 MPa a temperatura ambiente; 600 MPa a 40°C). Diversos estudios en seres humanos demostraron que esta y otras vitaminas se mantienen en los productos alimenticios presurizados en un estado que favorece su biodisponibilidad, por ejemplo en jugo de naranja presurizado y en sopas vegetales (gazpacho) (Oey y col., 2008-b).

En relación a los azúcares, los cuales constituyen componentes importantes asociados a los productos vegetales, tanto a nivel sensorial como nutricional, no se han observado cambios significativos en el contenido de fructosa, glucosa y sacarosa luego de la aplicación de tratamientos de entre 500 y 800 MPa por 5 min en jugo de naranja ni en sistemas modelo de soluciones azucaradas (Cano y de Ancos, 2005).

1.13 Combinación de las APH con envasado al vacío para prevenir el pardeamiento enzimático en FyHMP

Debido a la barorresistencia de la PPO, el control del pardeamiento enzimático utilizando únicamente la tecnología de APH resultaría dificultoso, por lo que es necesario considerar la combinación con otras estrategias de preservación. Entre las posibles alternativas, el envasado al vacío presenta una opción interesante, ya que esta tecnología permite reducir la concentración de oxígeno a niveles muy bajos, con lo cual se restringe uno de los reactivos necesarios para la reacción. La mayor dificultad del uso de vacío en tejidos metabólicamente activos, como es el caso de los productos mínimamente procesados, es la posibilidad de inducción del metabolismo anaeróbico. Sin embargo, algunas investigaciones sugieren que la aplicación de APH antes del almacenamiento bajo vacío puede prevenir este problema, con lo cual ambas tecnologías podrían actuar en forma sinérgica, evitando el pardeamiento y previniendo los efectos colaterales no deseados. Por ejemplo, en un vegetal con alto contenido de azúcar como es la zanahoria, Trejo Araya y col. (2009) encontraron que las APH eran capaces de evitar la importante acumulación de etanol evidenciada en muestras control luego de 14 días de almacenamiento. Un efecto benéfico adicional del envasado al vacío es que al remover el aire (en particular, el oxígeno atmosférico) fuera del envase del alimento, se protege al producto de la alteración microbiana, limitando el crecimiento de bacterias aeróbicas y hongos, prolongando así su vida útil (Margas y Holah, 2011).

1.14 Metabolismo anaeróbico

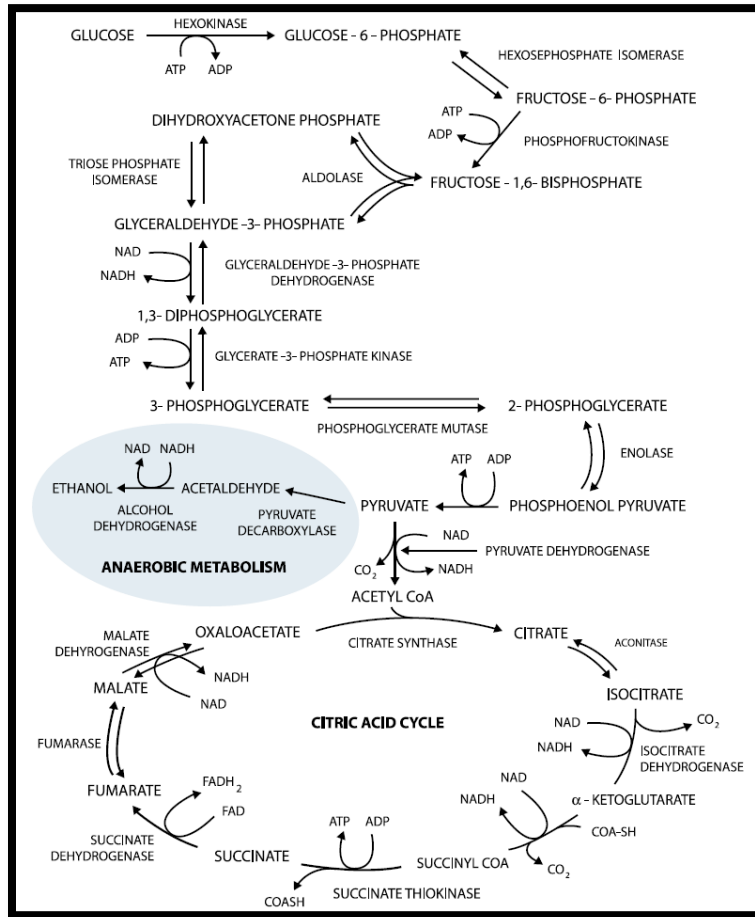


Fig. 10 Catabolismo de los azúcares a través de la glicólisis y el ciclo del ácido cítrico (Paliyath y Murr, 2006)

Para poder estudiar el efecto de las APH sobre el metabolismo anaeróbico, es importante conocer en profundidad el mecanismo de desarrollo de este proceso. Es sabido que normalmente durante el almacenamiento de frutas, se genera en los tejidos una situación de restricción de oxígeno, la cual podría ser exacerbada por agentes externos como el envasado al vacío. Bajo esta situación de anoxia, se inhibe la producción normal de ATP a través del ciclo del ácido cítrico y de la cadena de transporte de electrones. La inducción del metabolismo anaeróbico le permite al tejido la regeneración del NAD^+ necesario para que pueda continuar con la glicólisis y obtener pequeñas cantidades de ATP. Bajo anoxia y condiciones de bajo pH, la enzima piruvato descarboxilasa cataliza la descarboxilación del piruvato formado en la glicólisis, transformándolo en acetaldehído. Este compuesto se reduce a etanol mediante una reacción catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa, en la cual se usa al NADH como agente reductor, generándose NAD^+ . Así, en frutas expuestas a esta condición generalmente se observa la producción de acetaldehído y etanol, lo cual es indicativo de la ocurrencia de la respiración anaeróbica. En paralelo con el

1. Introducción

decrecimiento en piruvato y con la acumulación de etanol, se observa también un incremento en los niveles de actividad de la piruvato decarboxilasa y alcohol dehidrogenasa. Dada su volatilidad, el etanol producido puede ser liberado, o puede utilizarse para la biosíntesis de esteres volátiles (Paliyath y Murr, 2006).

1.15 Consideraciones sobre las metodologías utilizadas

1.15.1 Medición de los parámetros de calidad en frutas mínimamente procesadas

El término calidad tiene varias acepciones, relacionándose con el grado de excelencia de un producto o servicio, o su capacidad para adecuarse a un determinado uso. En su sentido genérico, se podría definir a la calidad como “la combinación de características que establecen la aceptabilidad de un producto”. En la industria alimenticia, es importante que esta definición se traduzca en una medida integral de características del producto, considerando atributos como la pureza, el *flavor*, la textura, el color y la apariencia, aunque también deban considerarse factores relacionados con los actores involucrados (productores, elaboradores, proveedores, consumidores) y con el sistema productivo en su conjunto. Según Abbott (1999), la calidad es una construcción humana que comprende la consideración, desde el momento del diseño, de distintas propiedades o características, que permiten diferenciar a un determinado producto y determinar el grado de aceptabilidad de ese producto por el consumidor.

En el caso de frutas y hortalizas, las características que generalmente se consideran para alcanzar una calidad distintiva pueden describirse por cuatro diferentes tipos de atributos: 1) color y apariencia, 2) *flavor* (sabor y aroma), 3) textura y 4) valor nutricional. Diversos estudios demuestran que estos cuatro atributos afectan en este orden la percepción de la calidad por parte del consumidor, y pueden ser evaluadas desde la compra hasta el consumo. Por ejemplo, el consumidor evaluará en primer lugar la apariencia visual y el color, y seguidamente evaluará el gusto, el aroma y la textura. La apariencia de un producto determinará generalmente si un producto es aceptado o rechazado, y por lo tanto puede considerarse como uno de los atributos críticos de calidad. El valor nutricional presenta sus particularidades, ya que es una característica que no puede detectarse con los sentidos pero que afecta al consumidor, sin que éste pueda percibirlo de manera directa. Sin embargo, este atributo de calidad es cada vez más valorado por consumidores, científicos y profesionales de la salud, ya que existe un nivel de concientización creciente de que los nutrientes son críticos para el crecimiento y desarrollo saludable del

1. Introducción

organismo. Es interesante considerar también la existencia de asociaciones entre los diferentes atributos, por ejemplo los texturales con el *flavor* y entre el color y el valor nutricional de frutas y hortalizas (Barrett y col., 2010).

Para la determinación de los atributos de calidad, se prefiere el uso de métodos instrumentales en lugar de los métodos de apreciación subjetiva, ya que el uso de instrumentos garantiza en general una menor variabilidad en las mediciones en relación a las apreciaciones subjetivas. Por otro lado, al poder estandarizarse, se genera un lenguaje de entendimiento común entre los investigadores, la industria y los consumidores. El tipo de instrumento a utilizar para las mediciones de calidad dependerá del parámetro a evaluar. De esta forma, la apariencia de una fruta puede ser evaluada mediante distintas propiedades electromagnéticas (generalmente relacionadas con las propiedades ópticas), la textura se vincula a propiedades mecánicas, y el *flavor* se relaciona con las propiedades químicas. Sin embargo, debe considerarse y validarse tanto como sea posible la relación entre la medición instrumental y los atributos sensoriales, así como la relación entre estos atributos y la aceptabilidad del consumidor (Abbott, 1999).

1.15.1.1 Color

El color está estrechamente relacionado con la apariencia, y es el primer atributo que percibe el consumidor para juzgar la calidad de un producto. El mismo puede ser definido como el impacto de la luz correspondiente al espectro visible (390 nm a 760 nm) en la retina humana. Las células en la retina envían una señal a través del nervio óptico hasta el cerebro, el cual emite una respuesta en términos de lo que nosotros llamamos color. Hay dos tipos de células en la retina: las llamadas bastones, que son sensibles al negro y al blanco y las llamadas conos, que son sensibles a las luces de longitudes de onda correspondientes al rojo, verde y azul (Francis, 1995). A la par de los avances tecnológicos de los últimos años, numerosas investigaciones están logrando una creciente objetividad en las mediciones de color, así como una mejor correlación con lo percibido por los sentidos (Lozano, 2006).

En cuanto a la medición del color, existen en la actualidad diversas alternativas, aunque tres de ellas son las predominantes: la primera compara el objeto en estudio con una serie de estándares visuales; la segunda utiliza un sistema físico en el cual el espectro de reflexión o transmisión es obtenido como una medición directa, o bien convertido en un sistema triestímulo, y la tercera utiliza un sistema colorimétrico triestímulo, en donde las señales de una muestra obtenidas por

1. Introducción

reflexión o transmisión son calculadas directamente en unidades relacionadas con la forma en la que el ojo humano percibe el color. Un colorímetro triestímulo contiene usualmente combinaciones de tres fotocélulas con filtros que asemejan la respuesta de los conos del ojo al rojo, verde y azul. Independientemente del sistema de medición, los datos son convertidos en las coordenadas de un sólido tridimensional de color. Por lo tanto los parámetros asociados a este tipo de medición permitirían ubicar a cualquier color en este espacio (Francis, 1995).

El principio de medición de estos instrumentos se basa en el hecho de que, cuando un producto vegetal es expuesto a la luz, aproximadamente el 4% de la luz incidente se refleja en su superficie, provocando de esta forma la denominada reflectancia especular. El 96% restante se transmite hacia la estructura celular, en donde puede ser desviada por las pequeñas interfaces del tejido o absorbida por los constituyentes celulares. La estructura física compleja de los tejidos forma un producto ópticamente denso que altera la trayectoria recorrida por la luz, en donde la mayoría de la energía lumínica penetra solo una corta distancia y vuelve a salir cerca del punto de entrada. (Abbott, 1999).

Los colorímetros permiten obtener las denominadas *coordenadas triestímulo XYZ*, tal como fueran definidas por la CIE (*Comisión Internationale de l'Eclairage*) en 1931, con el fin de normalizar las mediciones. El mayor problema que presenta el sistema XYZ (rojo, verde, azul) es la dificultad para establecer diferencias entre dos estímulos, ya que no se estaría representando un espacio de color uniforme. Esto dificulta a su vez la interpretación de los parámetros en términos de las dimensiones psicofísicas de la percepción del color (tono, luminosidad y saturación). Con el fin de mejorar este sistema, se introdujeron una serie de transformaciones no lineales que dieron origen en el año 1976 al sistema CIE $L^*a^*b^*$ (fig. 11), el cual representa a un espacio de color de tres dimensiones. El eje L^* representa la luminosidad y va del color negro (valor 0) al blanco (valor 100). El eje a^* muestra la contribución al color que tienen los componentes rojo (valores positivos) y verde (valores negativos). Por otra parte, el eje b^* corresponde a los componentes amarillo (valores positivos) y azul (valores negativos). De esta manera, todos los colores que se pueden percibir visualmente pueden ser ubicados en este espacio de color (Rocha y Morais, 2003). Para el caso de las frutas y desde el punto de vista práctico, una disminución en el valor de L^* estará asociada a la pérdida de blancura, un aumento de a^* se asociará a un mayor nivel de pardeamiento, mientras que un aumento en b^* se traducirá como un amarillamiento (Soliva-Fortuny y col., 2002; Rupasinghe y col., 2005; Perez-Gago y col., 2006).

1. Introducción

Además, estos tres valores pueden transformarse mediante fórmulas matemáticas a otro sistema de color denominado $L^*C^*h^\circ$ (fig. 11). En este sistema, el parámetro h° ($=\arctg [b^*/a^*]$) representa a un ángulo que define el tono, en donde 0° (o 360°) representa al rojo, 90° representa al amarillo, 180° al verde y 270° al azul. EL parámetro C^* (matemáticamente calculado como $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) representa al valor cromático o saturación, para el cual el 0 representa colores grisáceos, apagados, o sin pigmentar, y 60 a los colores muy vívidos y saturados. Este sistema es fácil de interpretar porque refiere de manera más directa a nuestra percepción visual de las características cromáticas (Korkut, 2012).

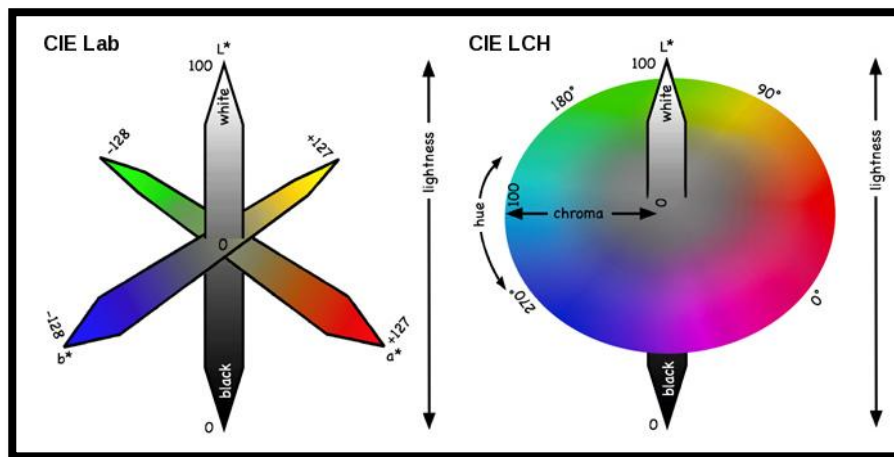


Fig. 11 Representación de los Espacios de color CIE $L^*a^*b^*$ y CIE $L^*C^*h^\circ$ (Graphic Quality Consultancy http://www.colourphil.co.uk/lab_lch_colour_space.html)

1.15.1.2 Análisis de perfil de textura (TPA)

La textura refleja a nivel sensorial y funcional las propiedades estructurales, mecánicas y superficiales de los alimentos, tales como son percibidas a través de los sentidos de la visión, el oído, el tacto y la cinestesia. Esta última comprende la sensación de presencia, movimiento y posición resultante de la estimulación de las terminales nerviosas. Al ser una propiedad sensorial, sólo los seres humanos pueden percibir y describir la textura de un producto.

Los instrumentos diseñados para evaluar la textura pueden detectar y cuantificar solo ciertos parámetros físicos, los cuales deben ser interpretados en términos de la percepción sensorial. Dado que la textura es un atributo multiparamétrico, la misma comprende, además de parámetros más familiares como la terneza o la masticabilidad, a toda una gama de características que se derivan de la estructura del alimento (molecular, microscópica o macroscópica) y que pueden ser detectadas por varios sentidos (Szczesniak, 2002).

1. Introducción

Los primeros intentos por evaluar la textura de un alimento mediante instrumentos se hicieron a través de la determinación de una única característica textural, la cual no siempre explicaba adecuadamente los cambios observados en las propiedades texturales. Los análisis más utilizados inicialmente fueron los tests de compresión simple y los tests de penetración, aunque proveían muy poca información acerca de la textura de los productos.

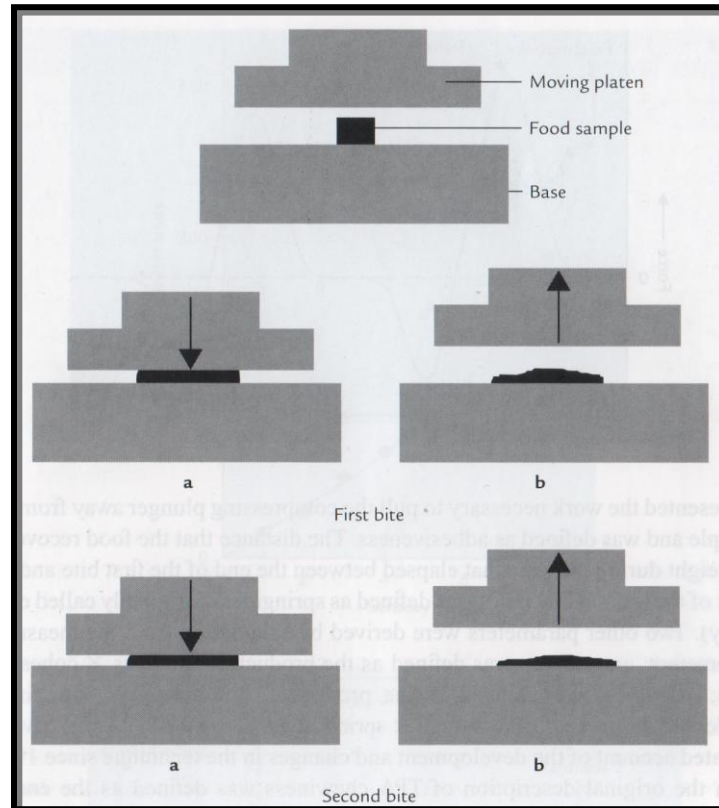


Fig. 12 Diagrama esquemático de las dos compresiones requeridas para el TPA. (a) acciones descendentes durante la primera y la segunda mordida (b) acciones ascendentes durante la primera y la segunda mordida (Bourne, 2002).

El Análisis de Perfil de Textura (TPA) fue desarrollado por Szczesniak y su grupo de investigación en la década del '60. Este grupo adaptó posteriormente el TPA a un instrumento de laboratorio llamado texturómetro. El uso del TPA se generalizó con la aparición de texturómetros más versátiles asistidos por computadoras, tales como el que se utiliza en los ensayos de la presente tesis (TA-XT plus, Stable Micro Systems Ltd., Surrey, Inglaterra). Con este tipo de aparatos es posible obtener mediante una medición, toda una gama de parámetros asociados, los cuales son calculados a través del software del equipo. Como se observa en la fig. 12, el TPA consiste en someter a muestras del tamaño de un bocado, a una doble compresión (simulando la masticación), mediante la cual se obtienen curvas de fuerza vs tiempo que permiten calcular los parámetros mencionados (Al-Haq y col., 2004). Los numerosos trabajos realizados sobre esta

1. Introducción

temática en distintos alimentos han mostrado una buena correlación entre los parámetros texturales del TPA y el análisis sensorial de textura (Bourne, 2002).

Es importante tener en cuenta que el TPA ha sido utilizado en muchos casos sin un conocimiento adecuado que permita interpretar correctamente sus parámetros, o seleccionar adecuadamente las condiciones experimentales. Los resultados del TPA dependen en gran medida del tamaño y forma de la muestra, de la relación de tamaño de la sonda que comprime con el de la muestra, del grado de compresión y de la velocidad de deformación, por lo cual estos datos deben ser debidamente registrados e informados (Álvarez y col., 2002).

La fig. 13 muestra una curva típica de TPA de un alimento, en donde se observa un pico de fuerza en el primer ciclo de compresión (primera mordida), cuya altura se define como dureza o firmeza (en la figura, indicado como *firmness*). Por su parte, la fracturabilidad (*fracturability*) es definida como un quiebre significativo en la curva de la primera mordida. Este punto se observa solamente en productos quebradizos (no es el caso de los duraznos, por lo cual este parámetro no fue incluido en el presente estudio) (Bourne, 2002). La relación de áreas positivas durante la primera y segunda compresión (en la figura, $[\text{área } 1 + \text{área } 2] / [\text{área } 4 + \text{área } 5]$) se define como cohesividad, mientras que al área negativa de la primera mordida (Área 3), que representa la fuerza total necesaria para separar a la sonda de la muestra luego de la primera compresión, se la define como adhesividad. Por otra parte, la relación de la duración de contacto de la sonda con la muestra durante la segunda compresión con respecto a la de la primera, se define como elasticidad (en la figura, $\text{length } 2 / \text{length } 1$) (Gómez y col., 2011), la cual, en otras palabras, es la altura que el alimento recupera durante el tiempo que transcurre entre el final de la primera mordida y el comienzo de la segunda. Otro parámetro que surge del TPA es resiliencia, definida como la relación entre el área de compresión y descompresión de la primera mordida ($\text{área } 2 / \text{área } 1$) (Aday y Caner, 2013). Dos parámetros derivados del cálculo de los otros parámetros son la gomosidad, que se define como el producto de dureza por cohesividad y se aplica a alimentos semi-sólidos (por lo tanto no se aplica en productos como los duraznos) y la masticabilidad, definida como el producto de dureza por cohesividad por elasticidad y se aplica a productos sólidos, como los tejidos vegetales (Bourne, 2002).

Con respecto al significado práctico de los parámetros asociados al TPA, puede decirse que la dureza representa la fuerza necesaria para alcanzar una determinada deformación; la cohesividad, mide cuánto puede ser deformado un material antes de su ruptura, y también puede interpretarse

1. Introducción

como una medida de la velocidad a la cual un material se desintegra bajo una determinada acción mecánica. Por su parte, la adhesividad representa el trabajo necesario para superar las fuerzas de atracción entre la superficie de un alimento y la superficie de otros materiales con los cuales se lo pone en contacto. Si la adhesividad es baja comparada con la cohesividad, entonces la sonda tenderá a mantenerse limpia, ya que el producto tendrá la capacidad de mantenerse unido pese a la acción mecánica aplicada. La elasticidad es el grado de recuperación y la velocidad con la que un determinado material deformado puede volver al estado previo a la deformación luego de que se deja de aplicar la fuerza deformante, mientras que la masticabilidad es un índice de la energía requerida para masticar un alimento sólido hasta el estado listo para ser tragado (Szczesniak, 2002). Esta es una de las características más difíciles de medir en forma precisa, ya que la masticación involucra la compresión, la cizalla, perforación, molienda, desgarrado y corte acompañados por una adecuada lubricación con saliva a la temperatura del cuerpo (Stable Micro-System Ltd., 1997).

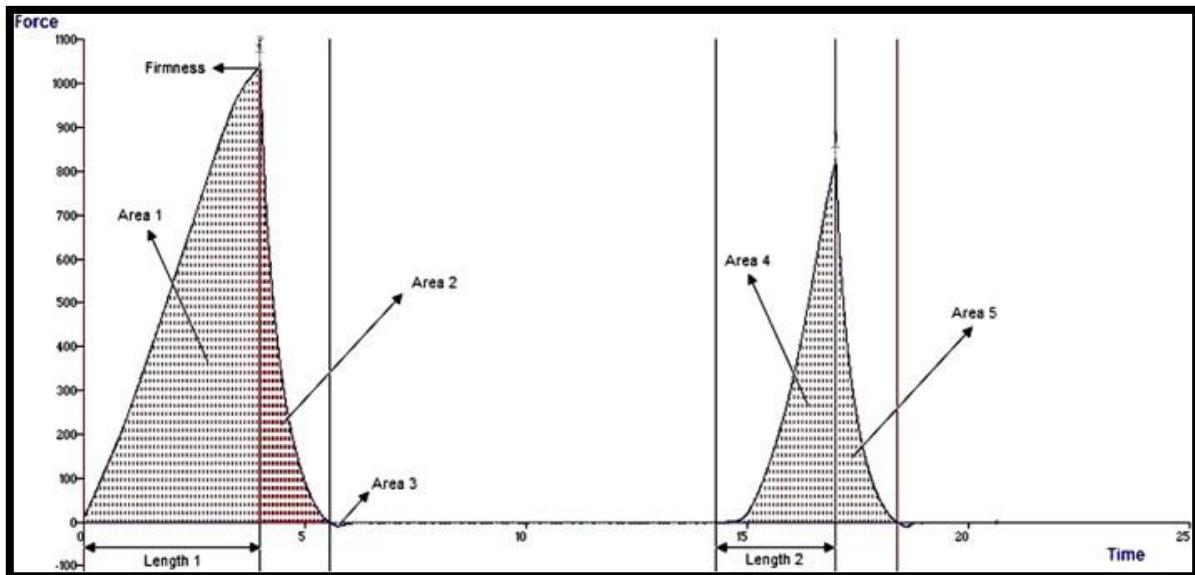


Fig. 13 Una curva de análisis de perfil de textura generalizada obtenida con un texturómetro (Aday y Caner, 2013).

La resiliencia expresa la capacidad de un producto para recuperar su posición original a medida que se va descomprimiendo la muestra. Puede considerarse como una elasticidad instantánea, dado que la misma se mide en la descompresión del primer ciclo, antes de que comience el período de espera, luego del cual se realiza la segunda compresión (Al-Haq y col., 2004).

1. Introducción

Se ha demostrado que el TPA es un método que permite una aproximación instrumental adecuada a la textura de un amplio rango de alimentos, dado que los parámetros obtenidos están estrechamente relacionados a la percepción sensorial de los mismos (Lu y Abbott, 2004).

1.15.1.3 Ácido Ascórbico

El contenido de ácido ascórbico en frutas y vegetales puede ser determinado por titrimetría, basándose en la reducción del colorante 2,6 dicloroindofenol por una solución ácida de ácido ascórbico (AOAC, 1990). En el punto final, el exceso no reducido de colorante aparece rosa en la solución ácida. En muestras coloreadas, como es en el caso de duraznos, el punto final puede ser detectado de manera potenciométrica (se busca llegar a pH 8,2), aunque en esa condición puede interferir la presencia de algunos iones (Nisperos-Carriedo y col., 1992). Dado que en la industria se está utilizando cada vez más como antioxidante el ácido eritórbico, un isómero del ácido ascórbico que carece de actividad vitamínica, existe una tendencia a reemplazar los métodos titrimétricos por otros más específicos, ya que se hace muy difícil detectar la diferencia entre ácido ascórbico y eritórbico (Vanderslice, 1992).

El uso de la espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis) para la determinación del AA, es ampliamente utilizado en investigaciones de alimentos, ya que este ácido presenta transiciones electrónicas fuertes en la región UV, facilitando su identificación y cuantificación por esta técnica. Actualmente, los métodos de preferencia para determinar AA se basan en principios separativos como la electroforesis capilar y las cromatografías gaseosa (GC) y líquida (LC). Esta última evita el problema de interferencias no específicas y pares iónicos (Hernández y col., 2006). La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con detección UV permite llegar a límites de detección y cuantificación más bajos, facilitando además la eliminación de las interferencias causadas por la matriz (Gutiérrez y col., 2007). Sin embargo, es importante optimizar la extracción de la muestra para inactivar enzimas que pueden destruir el compuesto durante el proceso y mantener el AA estable hasta su cuantificación (Hernández y col., 2006).

1.15.1.4 Fenoles totales

Con algunas excepciones como los carotenoides, los antioxidantes en alimentos son en su mayoría compuestos del tipo de los fenoles. El efecto antioxidante de estos compuestos se basa en su capacidad de reacción con oxidantes como el oxígeno, con el cual tienen una alta tendencia a reaccionar, por lo que otros compuestos de interés quedan protegidos de la oxidación. Además,

1. Introducción

estos antioxidantes tienen la capacidad de interactuar con los radicales libres, frenando las reacciones en cadena e interfiriendo con la oxidación de lípidos y otras especies. La técnica de Folin y Ciocalteu se basa en el uso de un reactivo heteropoli-fosfo-tungstato-molibdato con sulfato de litio el cual reacciona con la totalidad de fenoles presentes (fenoles totales). Si bien la química de los tungstatos y los molibdatos es muy compleja, puede mencionarse que los isopolifosfotungstatos del reactivo presentan un color incoloro en el estado de valencia completamente oxidada (+6) del metal, mientras que los componentes análogos de molibdeno son amarillos. Al mezclarse estos dos compuestos, se forman heteropolifosfotungstato-molibdatos, los cuales existen en solución ácida como complejos octaédricos de los óxidos metálicos coordinados alrededor de un fosfato central. Se considera que los tungstatos no presentan una tendencia tan alta a la reducción como los molibdatos para dar formas azules, pero son más susceptibles a transferir electrones. De esta manera, los fenoles presentes en la muestra, que actuarían como proveedores de electrones, son oxidados por el reactivo de Folin-Ciocalteu obteniéndose azul de tungsteno y azul de molibdeno.

La determinación de fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu es simple y requiere solo de equipamiento básico de laboratorio, permitiendo la cuantificación de distintos tipos de fenoles presentes en la naturaleza. Como los diferentes fenoles reaccionan en distinto grado, se hace necesaria la expresión arbitraria de los resultados refiriéndolos a número de equivalentes de un compuesto, generalmente el ácido gálico. Hay que tener en cuenta que esta determinación cuantifica todos los componentes oxidables bajo las condiciones de reacción, por lo que podría haber interferencias. Sin embargo, esta técnica continua siendo en la actualidad ampliamente utilizada para la cuantificación de fenoles totales en muestras vegetales (Singleton y col., 1999).

1.15.2 Enzimas

Las siguientes enzimas fueron seleccionadas para evaluar el efecto de los tratamientos sobre los procesos de alteración de los frutos, por su estrecha relación con el mecanismo de desarrollo de las principales alteraciones fisiológicas (pardeamiento enzimático y fermentación):

-Polifenoloxidasas (PPO): la PPO es la principal enzima asociada al pardeamiento enzimático. Además, por su elevada barorresistencia, representa un marcador de gran relevancia para estudiar el efecto de los tratamientos de APH sobre la prevención de alteraciones en este tipo de producto.

1. Introducción

-Fenilalaninamonioliase (PAL): La PAL fue elegida por representar una enzima clave dentro del metabolismo de fenoles, ya que cataliza la deaminación de L-fenilalanina para dar amonio y ácido trans-cinámico. De esta forma, al formarse este precursor, se induce la síntesis de compuestos fenólicos en lugar de aminoácidos. Debido a que el pardeamiento enzimático utiliza como sustrato a compuestos fenólicos, esta enzima está indirectamente relacionada con ese proceso, al generar sustratos para la reacción. Se ha comprobado que la misma representa una enzima clave en la respuesta de tejidos vegetales ante distintos tipos de estrés. Es así como, situaciones que generan una amplia gama de estreses como daño mecánico, deficiencias nutricionales, exposición a temperaturas extremas etc., incrementan la síntesis de PAL en muchas especies (Hussain y col., 2010).

-Piruvato decarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH): Estas enzimas son claves en el desarrollo del metabolismo fermentativo. La ADH cataliza la conversión reversible de aldehídos a sus correspondientes alcoholes y también está involucrada en la respuesta de plantas al estrés, sobre todo en lo que respecta a condiciones de anaerobiosis, estando involucrada en la última fase de la producción de etanol (Manríquez y col., 2006). La actividad de estas enzimas puede estar fuertemente incrementada en productos mínimamente procesados sometidos a una condición de anaerobiosis, como podría ser en el presente estudio, el caso de los duraznos envasados al vacío.

1.15.2.1 Actividad PPO

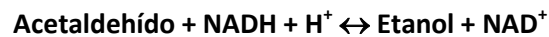
La PPO es una enzima con un amplio rango de especificidad de sustrato, lo cual se ve reflejado en los numerosos métodos propuestos para medir su actividad. Entre estos métodos se pueden mencionar a los radiométricos, los electrométricos, los cronométricos y los espectrofotométricos, siendo estos últimos los más utilizados por su rapidez y su factibilidad de realización en la mayoría de los laboratorios. Así, la actividad enzimática puede medirse en base a la propiedad de los o-difenoles de absorber fuertemente en longitudes de onda cercanas a los 280 nm, lo que permite medir la formación de estos compuestos a partir de sustratos monofenólicos (actividad de hidroxilación). Por otra parte, la actividad oxidativa de la enzima puede ser evaluada midiendo el consumo de oxígeno, mediante polarografía con un electrodo sensible al oxígeno. En la actualidad, la forma más generalizada de medición es por espectrofotometría visible (400-500 nm), a través

1. Introducción

de la medición de la velocidad de formación de la correspondiente o-quinona a partir de compuestos o-difenólicos (Yoruk y Marshall, 2003).

1.15.2.2 Actividad ADH

Las deshidrogenasas representan un grupo importante de enzimas cuya actividad puede ser rápidamente medida por espectrofotometría UV. Estas enzimas utilizan NAD^+ o NADP^+ como coenzima, la cual es reducida durante la deshidrogenación. Particularmente, la ADH cataliza la siguiente reacción:



El NAD^+ reducido (NADH) presenta una fuerte absorción a 340 nm (UV), mientras que la forma oxidada no tiene prácticamente absorción a esa longitud de onda. Por lo tanto, si se parte de una mezcla de etanol, NAD^+ y enzima en buffer, la reacción puede monitorearse midiendo el aumento de absorbancia de la solución a 340 nm, lo cual reflejará la formación de NADH (Walker, 1992).

1.15.2.3 Evaluación de la expresión de enzimas a nivel transcripcional

Es sabido que las plantas están confinadas al lugar en donde crecen, por lo cual deben tener una cierta capacidad de contrarrestar las posibles condiciones desfavorables en su entorno, tales como luz insuficiente o excesiva, falta de agua, temperaturas, presiones extremas o daño mecánico si no cuentan con la posibilidad de trasladarse. En consecuencia, las plantas han desarrollado sofisticadas estrategias químico-moleculares para dar respuesta a la exposición a estreses del tipo biótico o abiótico. Se define al estrés como una condición inducida por factores externos que provocan una influencia desfavorable en la planta (Galindo y col., 2007). La respuesta celular al estrés puede incluir cambios en el metabolismo, que lleven a la síntesis de proteínas específicas como enzimas (Bassett y col., 2009). Desde un punto de vista biológico, los tratamientos industriales aplicado a los tejidos vegetales podrían ser comparables al estrés que sufren las plantas en su entorno. Entonces, el conocimiento de cómo el vegetal responderá a este tipo de situación será fundamental para comprender y optimizar el proceso (Galindo y col., 2007).

Así, la exposición a una alta presión, como parte de un tratamiento de APH, puede considerarse una situación de estrés, por lo que sería esperable que una fruta responda con los mecanismos antes mencionados. Resulta interesante por lo tanto, estudiar el efecto de esta tecnología sobre la

1. Introducción

expresión, a nivel transcripcional, de genes de enzimas relacionadas con los mecanismos de defensa del vegetal.

En el caso de frutas, diversos trabajos han informado sobre la expresión a nivel de ARN de enzimas asociadas a mecanismos bioquímicos en respuesta a tratamientos de poscosecha (Lara y col. 2011; Manríquez y col., 2006; Kim y col. 2001; Pavez y col. 2013; Scattino y col., 2014). El hecho de contar con esta información será de gran importancia para comprender los procesos bioquímicos desencadenados a partir del tratamiento aplicado, y prevenir de esta forma los efectos no deseados. En la actualidad existe escasa información disponible relacionada con la evaluación a nivel transcripcional del efecto de las APH sobre enzimas. Es importante abordar este aspecto, sobre todo en enzimas cuya actividad afecta a la calidad y condiciona la vida útil del producto.

Una de las herramientas más poderosas para determinar los niveles de transcripción de un gen de interés está representada por la transcripción reversa del ARN, seguida de la reacción polimerasa en cadena (RT-PCR). Para normalizar los datos obtenidos por RT-PCR y poder comparar distintos efectos, como por ejemplo la aplicación de distintas tecnologías sobre la expresión de un gen, se utilizan genes denominados de referencia, cuya expresión sirve para relativizar el nivel de variación en la expresión del gen en estudio. Por otra parte, de esta manera se evita además la interferencia de los posibles errores experimentales, ya que los genes de referencia están expuestos a los mismos pasos de preparación que los genes de interés. Los genes más adecuados para actuar como referencia en este tipo de estudio son los denominados constitutivos (aquellos que están presentes en todas las células, dado que son necesarios para su supervivencia básica), ya que su expresión no se verá afectada por el efecto de la tecnología a estudiar. En este sentido, es importante que el gen de referencia y el gen a estudiar tengan rangos similares de expresión en las muestras analizadas (Tong y col., 2009).

La tecnología de Real-Time RT-PCR ha demostrado ser altamente sensible, permitiendo la cuantificación de transcritos que se encuentran en baja concentración, así como la detección de pequeños cambios en la expresión génica. El análisis por Real Time RT-PCR se basa en la detección y cuantificación de marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción de la PCR. En este sentido, uno de los colorantes más adecuados para determinar la expresión relativa de genes candidatos por Real-Time RT-PCR es el colorante fluorescente *SYBR Green I*, que se une específicamente al surco menor de la doble cadena de ADN (Pfaffl, 2001). Esta técnica permite medir la cantidad de

1. Introducción

fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, donde un aumento significativo del producto de la PCR se correlaciona con la cantidad inicial de ADN o ADNc en estudio. Para esto, debe obtenerse el valor umbral de ciclo (Ct), el cual indica el ciclo de la PCR en el cual la cantidad de amplificado alcanza cierto valor umbral prefijado. De esta forma, mediante la cuantificación relativa, se puede describir el cambio en la expresión del gen en estudio en relación a algún grupo de referencia, tal como un control no tratado, o la muestra a tiempo 0 en el caso de un estudio cinético (Livak y Schmittgen, 2001).

Para cuantificar los cambios relativos en la expresión génica utilizando Real-Time RT-PCR es necesario recurrir a ciertas ecuaciones. Entre las alternativas disponibles, el método "Delta-delta", que fuera desarrollado por *PE Applied Biosystem* (Perkin Elmer, Forster City, CA), permite comparar resultados de expresiones relativas entre tratamientos:

$$Relación = \frac{2^{-(\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ control})}}{2^{-(\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ control})}} \frac{\text{enzima}}{\text{referencia}}$$

Si bien este método supone una eficiencia óptima e idéntica de amplificación de 2 para todos los genes, Pfaffl (2001) sugiere optimizar la ecuación utilizando la eficiencia obtenida (Ef) mediante el cálculo del rango dinámico de cada secuencia amplificada mediante la siguiente ecuación:

$$Relación = \frac{E_f^{(\Delta Ct \text{ control} - \Delta Ct \text{ muestra})}}{E_f^{(\Delta Ct \text{ control} - \Delta Ct \text{ muestra})}} \frac{\text{enzima}}{\text{referencia}}$$

La eficiencia se obtiene a partir del parámetro a , que representa a la pendiente del gráfico de rango dinámico de cada secuencia amplificada.

$$E = 10^{-1/a}$$

Para encontrar el rango dinámico de cada uno de los productos a amplificar, se grafican concentraciones crecientes de la muestra, (las cuales representarán también una concentración proporcional de ARN) versus el Ct obtenido en la RT-PCR. Las concentraciones en las que se podrá trabajar estarán limitadas a aquellas que se ajusten en la curva a una función lineal de regresión. Esta última tiene pendiente negativa ya que, cuanto mayor sea la concentración del ARN a amplificar, menor será el ciclo en el que se maximice la amplificación.

1.15.3 Microscopía

1.15.3.1 Viabilidad celular

El estudio profundo de las modificaciones inducidas por daño celular en tejidos vegetales, que conlleve a la pérdida de integridad de la membrana, permitiría correlacionar los cambios en la estructura celular que ocurren a nivel molecular y microscópico, con la funcionalidad y la calidad de los productos vegetales. El deterioro de la membrana celular puede evaluarse de diferentes formas, como por ejemplo analizando los cambios en la composición o la alteración de su estructura o función, lo cual puede reflejarse en alteraciones en la fluidez o en la permeabilidad, o bien en la pérdida de funcionalidad de las proteínas. Entre las técnicas que permitirían detectar estos cambios, se pueden mencionar: la medición de la conductividad, la dispersión de la luz (*light scattering*) o la impedancia eléctrica. También pueden realizarse estudios de microscopía de fluorescencia o de resonancia magnética nuclear (González y col., 2010-b).

La viabilidad celular se puede determinar evaluando la integridad de las membranas por microscopía. Para esto, pueden utilizarse los denominados colorantes supravitales como el rojo neutro o la fluoresceína, los cuales permiten evaluar su incorporación y retención activa por parte de células vivas. También pueden utilizarse tinciones pasivas como la que se realiza con azul *Evans*, que colorea los contenidos de células muertas (González y col., 2010-c).

El método con fluoresceín diacetato (FDA) se ha utilizado en forma exitosa para estudiar el tejido de uvas (Krasnow y col., 2008) y de pepinos (Sajnín y col., 2003). Este método permite detectar la presencia de un metabolismo celular activo por la conversión del FDA en un compuesto fluorescente. EL FDA es un compuesto no polar, análogo de la fluoresceína, capaz de atravesar la membrana celular y que, una vez adentro de la célula, su grupo diacetato puede ser clivado por las esterasas intracelulares. Este proceso genera un producto altamente fluorescente, que se acumula en las células con membranas intactas y puede ser analizado por microscopía de fluorescencia (Krasnow y col., 2008).

Entre los estudios realizados en vegetales sometidos a la tecnología de APH, González y col. (2010-c), mediante el colorante rojo neutro, fueron capaces de evaluar la viabilidad celular en tejidos de cebolla sometidos a tratamientos en un rango de 50 a 600 MPa. En el caso de este colorante, las células viables pueden identificarse cuando el compuesto es incorporado y retenido por la vacuola, impartiendo un intenso color rojo. Las células inviables son aquellas que no adquieren el color rojo o tienen una textura granulada con un color rosa suave, lo cual es solamente indicativo

1. Introducción

de la presencia de paredes celulares y restos celulares, así como de la pérdida de integridad de la membrana de la vacuola. En este trabajo se observó que en las muestras tratadas a 50 MPa, prácticamente todas sus células se mantenían viables, en una proporción similar a la que presentaban las muestras control o las muestras envasadas al vacío. Así mismo, a 200 MPa se observó una disminución significativa de la proporción de células viables, mientras que a niveles de 300 MPa o superiores se observó una completa ausencia de células viables.

1.15.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM) bajo vacío

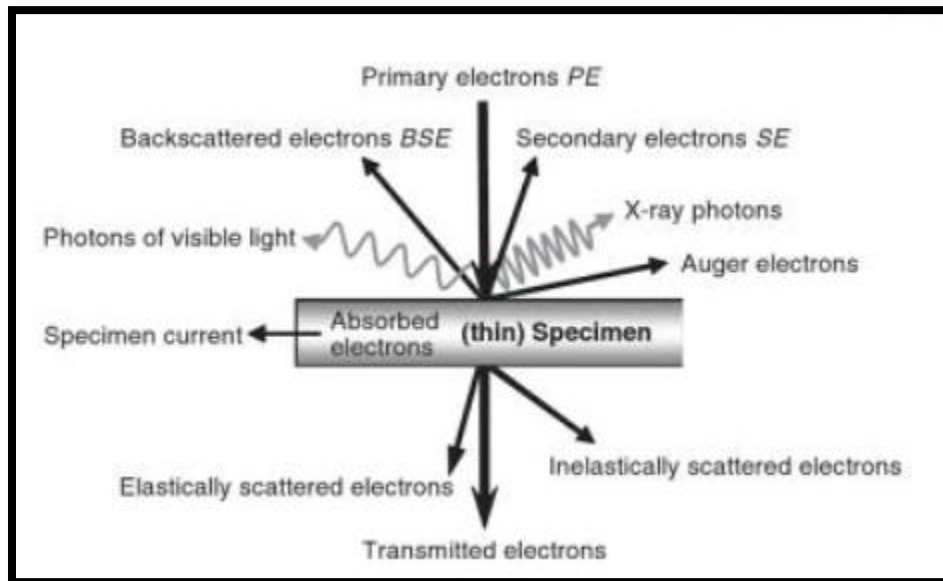


Fig. 14 Algunas de las señales útiles que se generan cuando un haz de electrones colisiona con una muestra. Es de destacar que para una muestra de gran espesor, los electrones se absorben por la muestra y por lo tanto no son transmitidos (Stokes, 2008).

La microscopía electrónica de barrido es una técnica que tiene muchas y variadas aplicaciones en distintas áreas, como las ciencias biológicas, la ciencia de los materiales y las ingenierías eléctrica y mecánica. Los microscopios de barrido electrónico producen imágenes de una muestra a nivel de su superficie, cuya extensión estará limitada por las dimensiones del dispositivo de observación, y en donde no son importantes ni el espesor ni el tamaño de la muestra. Al igual que en la microscopía de transmisión, en la SEM convencional se requiere la existencia de un sistema de vacío, así como, la remoción de cualquier componente acuoso o volátil eléctricamente conductor (Karcz, 2009). Los nuevos desarrollos en el diseño de SEM, como el uso de un bajo vacío, permiten la observación de un tejido fresco, por lo que en la actualidad se pueden obtener imágenes de la muestra hidratada y sin cubrir (Karcz, 2009). Así, para muestras con pocos o incluso ningún componente volátil, es posible utilizar este modo de observación de bajo vacío, que permite

1. Introducción

controlar la carga de la muestra, no siendo necesaria su impregnación con ningún material conductor. Esta técnica, utiliza solamente una pequeña presión parcial de vapor de agua en la cámara de observación (generalmente entre 0,1 y 2,5 torr), lo cual permite conformar un mecanismo de amplificación de la señal, así como la compensación de las cargas (Stokes, 2003).

En microscopía electrónica, los electrones son extraídos de distintas fuentes y posteriormente conducidos por un potencial eléctrico a lo largo de una columna en la que previamente se aplicó vacío. Los electrones generados de esta manera, conocidos como electrones primarios, pueden ser alineados en un haz y utilizados para escanear electrónicamente una superficie de interés. Cuando los electrones primarios colisionan con la superficie de una muestra, puede ocurrir un amplio rango de interacciones, generándose varios fotones y partículas cargadas. Los fotones que son emitidos pueden recolectarse y utilizarse para formar una imagen, un patrón de difracción o un espectro químico. Además, en el caso de muestras de bajo espesor, los electrones primarios pueden transmitirse a través del material y ser utilizados de igual manera. Las señales que se producen típicamente por el choque de electrones con la muestra se esquematizan en la fig. 14. En SEM, se utilizan principalmente los electrones retrodispersados y los secundarios, los cuales como consecuencia de las diferencias en la composición de la muestra y la topografía de la superficie, afectarán la generación, transporte y escape de esas señales (Stokes, 2008). Las imágenes formadas en SEM se producen a partir de variaciones en la intensidad de la señal de los electrones, provocadas por la mayor o menor refracción de los electrones cuando interactúan con la muestra. Las zonas con mayor presencia del medio de contraste serán las más electrodensas, por lo que la desviación de los electrones será mayor y en consecuencia, aparecerán en la pantalla como zonas más oscuras. En el caso contrario, cuando los electrones atraviesan el material sin desviarse, se observarán zonas más claras (Jurado y col., 2007). De esta manera, este instrumento permite la observación tridimensional de la superficie de las muestras analizadas.

1.15.3.3 Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

El microscopio de transmisión electrónica (TEM) es un instrumento que tiene una gran capacidad de resolución que puede llegar hasta los 1.200.000 aumentos, lo cual permite observar estructuras celulares y subcelulares. Este instrumento utiliza un haz de electrones primarios generado por un filamento de tungsteno incandescente y acelerado por una diferencia de potencial. Este haz, es guiado por condensadores y lentes hasta el objeto que se ha de examinar. Al atravesar la muestra,

1. Introducción

los rayos electrónicos se debilitan de acuerdo con el espesor y la composición del material. El sistema de formación de la imagen consta de una serie de lentes electromagnéticas capaces de proyectar un campo magnético circular y preciso en una región específica. Estas lentes son utilizadas para enfocar y dirigir los electrones, dando origen a una imagen definitiva, la cual es recogida en una pantalla fluorescente que posee una superficie impregnada con fósforo o sulfuro de cinc, transformando la energía de los electrones que chocan sobre ella en luz. El registro permanente de la imagen se obtiene mediante el uso de placas fotográficas que luego se digitalizan, aunque en los sistemas más modernos la imagen se obtiene directamente de manera digital. Inicialmente, los materiales biológicos no podían ser examinados con el TEM debido a las condiciones ambientales extremas a las que había que someter a las muestras dentro del instrumento (alto vacío, calor generado por el haz de electrones, etc.). A partir de 1950, con el avance en las técnicas de preparación (mejoramiento de los fijadores, las resinas y los ultramicrotómicos), el TEM pudo ser finalmente utilizado de manera rutinaria para la observación de materiales biológicos (Jurado y col., 2007).

1.16 Objetivo General

El objetivo general de la presente tesis fue la evaluación del efecto de la aplicación de las altas presiones hidrostáticas, en combinación con otras estrategias de barrera (acidificación, envasado al vacío, refrigeración), sobre la calidad y vida útil de duraznos mínimamente procesados, y su implicancia sobre parámetros fisiológicos y bioquímicos de relevancia en este producto.

1.17 Objetivos específicos

- I. Definir y poner a punto un sistema experimental representativo del proceso de elaboración de duraznos mínimamente procesados, adaptado a la aplicación de un tratamiento de APH como una de las barreras de preservación
- II. Estudiar el efecto las APH en combinación con el envasado al vacío en la preservación de duraznos mínimamente procesados
- III. Optimizar mediante la determinación de los parámetros de proceso adecuados (Nivel de presión-tiempo de mantenimiento) al tratamiento de APH que aplicado a duraznos mínimamente procesados permita la inactivación de enzimas de deterioro con el mínimo efecto sobre los parámetros de calidad.

1. Introducción

- IV. Determinar la influencia de la materia prima (aptitud varietal para el procesamiento de duraznos por APH) sobre la calidad del producto final y validar los parámetros de proceso establecidos como óptimos.
- V. Estudiar los aspectos bioquímicos subyacentes asociados al procesamiento por APH de duraznos mínimamente procesados (microestructura, viabilidad de tejido, expresión a nivel de ARN y actividad de enzimas clave asociadas a la alteración del producto).
- VI. Estudiar el efecto del procesamiento por APH y del almacenamiento refrigerado sobre la vida útil de duraznos mínimamente procesados.

2. Materiales Y Métodos



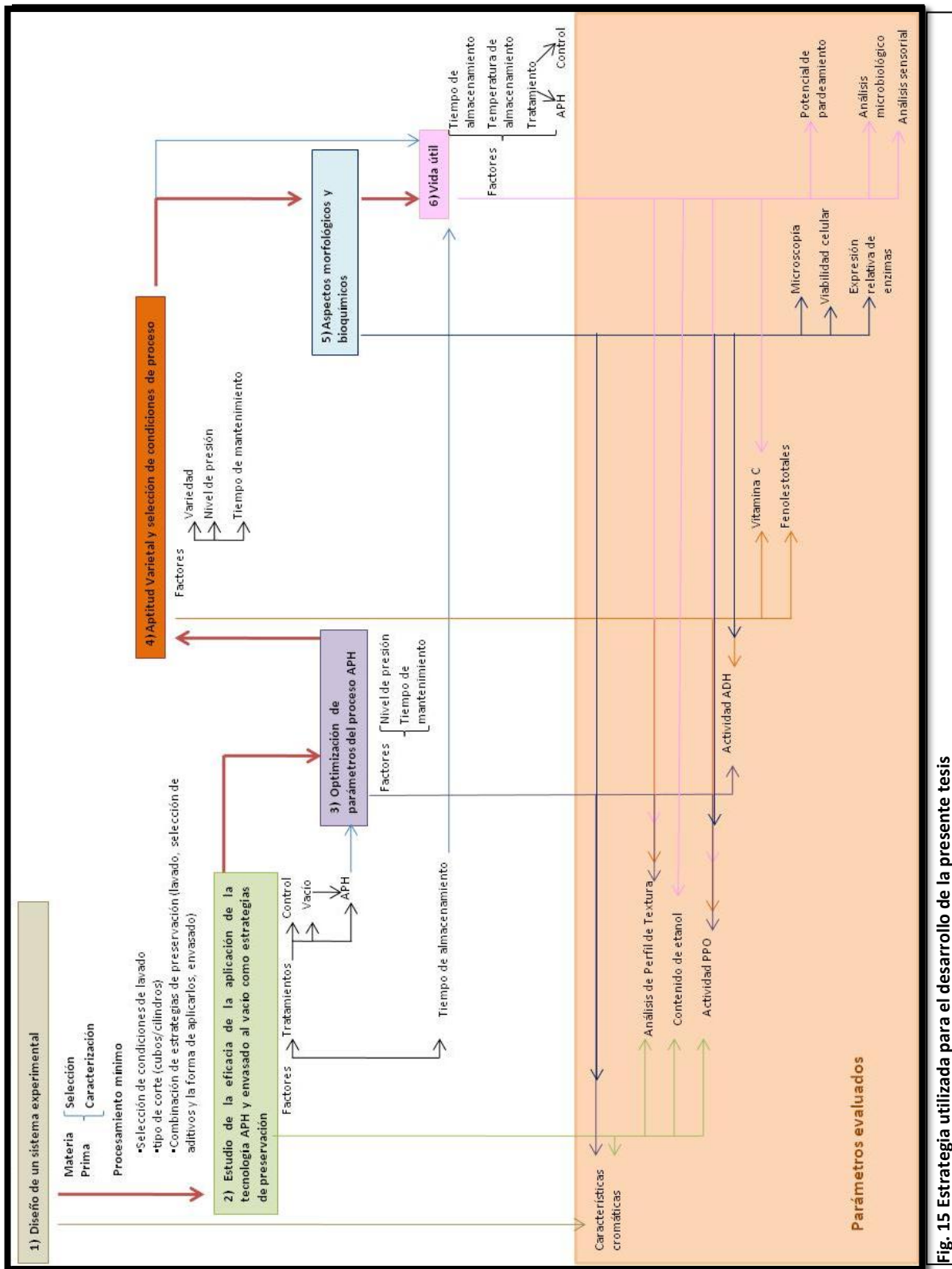


Fig. 15 Estrategia utilizada para el desarrollo de la presente tesis

2. Materiales y métodos

La estrategia utilizada para encarar el estudio de la presente tesis se resume en el diagrama de la figura 15. En primer lugar se diseñó un modelo experimental apropiado, para lo cual se seleccionó la materia prima a utilizar y se estableció la forma de caracterizarla, se definió además el proceso de elaboración de duraznos mínimamente procesados que mejor se adecuaba a la aplicación de APH como una de las barreras de preservación del producto y se probó a continuación la eficacia de esa tecnología en combinación con el envasado al vacío para preservar el producto. Una vez estudiado su efecto, se optimizaron las condiciones del procesamiento por APH y se comparó la aptitud para el proceso de dos variedades de duraznos. Posteriormente se profundizó el estudio incorporando el análisis de distintos aspectos bioquímicos y morfológicos de relevancia, a fin de comprender mejor el efecto de los tratamientos sobre la calidad del producto presurizado. Para finalizar, se realizó un estudio de vida útil tomando como base todo lo investigado previamente. Paralelamente, se fueron incorporando a los ensayos diferentes parámetros para caracterizar al producto y evaluar los efectos de la tecnología sobre el mismo.

2.1 Materia prima y preparación de la muestra

2.1.1 Material vegetal

Se utilizaron diferentes variedades (doble propósito o para industria) de duraznos (*Prunus persica* L. Batsch) provenientes de cultivos experimentales de la Estación Experimental INTA San Pedro. Para minimizar la variabilidad debida a la materia prima, se tomó un especial cuidado en que las frutas utilizadas en los distintos ensayos sean recolectadas en un mismo momento de cosecha y provengan de la misma plantación. Alternativamente, cuando las circunstancias lo requirieron, se utilizaron duraznos de calidad “elegido” procedentes del Mercado Central de Buenos Aires, identificándose el origen y la variedad. En este sentido, es importante resaltar que para la producción de frutas mínimamente procesadas, la calidad del producto final será altamente dependiente de la calidad de la materia prima. Una vez seleccionado el material vegetal, el mismo fue colocado en cámaras a 0°C hasta el momento del ensayo. Debe destacarse que en duraznos, el principal indicador de la maduración es la firmeza, por lo cual este parámetro fue utilizado para la selección de las frutas, reduciéndose así la variabilidad en la materia prima.

2. Materiales y métodos

2.1.2 Preparación de las muestras

Los duraznos seleccionados fueron lavados en primer lugar con agua corriente con 150 ppm de HClO para remover cualquier impureza y desinfectar la superficie, y luego enjuagados únicamente con agua. Posteriormente, se cortaron las dos rodajas centrales (15 mm de espesor) entre la epidermis y el carozo de cada fruta con un cuchillo de filo liso de acero inoxidable. Estas rodajas fueron transformadas en cubos con una grilla cortante, o en cilindros con un sacabocados, los que fueron sumergidos por 2 min en agua conteniendo 20 ppm de HClO. Luego de ser escurridas, las piezas fueron sumergidas en una solución acuosa conteniendo 1% (p/v) ácido ascórbico y 1% (p/v) ácido cítrico por otros 2 min, para prevenir el pardeamiento superficial y eliminar el HClO remanente. Los cubos o cilindros de durazno fueron escurridos nuevamente y envasados en bolsas *Cryovac BB2800* (tasa de transmisión de O₂ 6-14 cc/m²/24 hs a 22-24°C y a 0 % HR) a razón de ocho unidades por bolsa.

2.1.3 Tratamiento por Altas Presiones Hidrostáticas (APH)

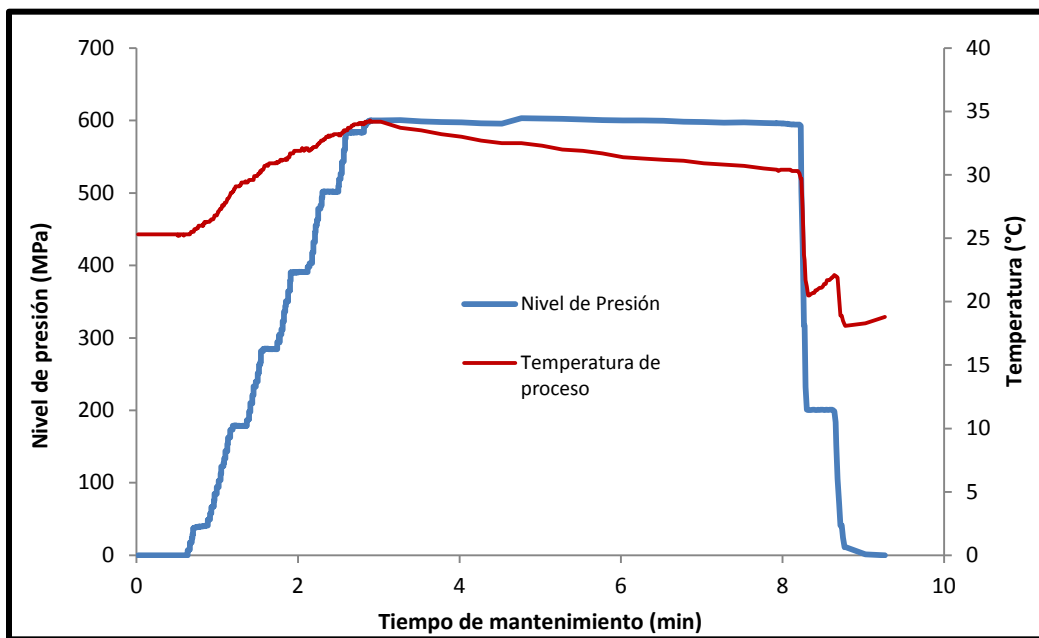


Fig. 16 Evolución de la temperatura y el nivel de presión en un equipo de APH *Stansted Fluid Power Ltd.* modelo Iso-Lab FPG9400:922 que corresponde a un tratamiento de 600 MPa por 5 min a partir de una temperatura inicial del sistema de 25°C. Datos provenientes de una de las corridas de los ensayos realizados en la presente tesis.

Los tratamientos con Altas Presiones Hidrostáticas se aplicaron con un equipo *Stansted Fluid Power Ltd.* modelo Iso-Lab FPG9400:922 (cilindro de 2 l, presión máxima de trabajo 900 MPa,

2. Materiales y métodos

rango de temperatura de trabajo: -20 a 120 °C; Stansted, Reino Unido) que se encuentra instalado en el Instituto Tecnología de Alimentos (ITA), CIA, INTA Castelar. Como medio de transmisión de la presión se utilizó una mezcla homogénea de propilenglicol y agua (30:100). En todos los casos, el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente (25°C) la cual sólo se modificó levemente por el calentamiento adiabático debido a la compresión, como muestra la figura 16. El nivel de presión requerido se alcanzó a una velocidad de compresión de 5 MPa/seg.

2.2 Ensayos realizados

2.2.1 Ensayo preliminar. Diseño y puesta a punto de un sistema experimental para evaluar la aplicación de APH en duraznos mínimamente procesados

A continuación se describen brevemente las modificaciones adoptadas en la presente actividad para la preparación de la muestra, dado que por el carácter preliminar de la misma, las condiciones fueron ligeramente diferentes del resto de las actividades.

2.2.1.1 *Material vegetal*

Se utilizaron duraznos (*Prunus Persica* (L.) Batch) cv. O'Henry adquiridas en el Mercado Central de Buenos Aires, procedentes de una empresa rionegrina. Los frutos para el ensayo fueron seleccionados de acuerdo a su tamaño, firmeza al tacto y color de fondo. Los duraznos, que en promedio presentaban 11,33 °Brix, se mantuvieron en cámara refrigerada ($0 \pm 1^\circ\text{C}$) hasta el momento del procesado.

2.2.1.2 *Determinaciones realizadas*

Características cromáticas

2.2.1.3 *Preparación de la muestra, tratamientos y diseño experimental*

Las muestras para este ensayo (ocho cubos de durazno por bolsa) fueron preparadas de manera similar al resto de los ensayos (ver punto 2.1.2), con la excepción del envasado, para el cual se utilizaron bolsas *Cryovac PD-960* con una mayor permeabilidad a los gases que las finalmente adoptadas (tasa de transmisión de oxígeno 6.000-8.000 cc/m²/24 hs y para el CO₂ de 19.000-22.000 cc/m²/24hs a 73°F, 1 atm). Finalmente, todas las muestras se colocaron individualmente en bolsas protectoras *Cryovac BB2800* (tasa de transmisión de O₂ 6-14 cc/m²/24 hs a 22-24°C y a 0 % HR), las cuales fueron cerradas al vacío. Las bolsas fueron divididas en 3 lotes, uno de los cuales no

2. Materiales y métodos

fue sometido a ningún tratamiento (control). Los dos lotes restantes fueron sometidos a tratamientos de APH de 300 MPa y 450 MPa respectivamente durante 5 min. Luego del tratamiento se quitaron las bolsas protectoras *Cryovac BB2800* y, como se observó que las muestras tratadas por APH se oscurecían casi instantáneamente, se determinaron solamente las características cromáticas de las muestras.

Para el presente ensayo se aplicó un diseño totalmente aleatorizado, con tres repeticiones y cada bolsa fue considerada como una unidad experimental. Los resultados obtenidos se analizaron mediante un ANOVA, y las medias correspondientes a los diferentes tratamientos se compararon utilizando el test de Tukey, con un nivel de significancia del 95%.

2.2.2 Capítulo 1: Efecto de la aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas y del envasado al vacío sobre la preservación de duraznos mínimamente procesados

Es importante mencionar que en el presente capítulo, los tratamientos de APH fueron aplicados en las condiciones recomendadas por bibliografía para productos similares, siendo las mismas optimizadas en los ensayos posteriores.

2.2.2.1 *Material vegetal*

Se utilizaron duraznos (*Prunus Persica* (L.) Batch) cv. Limón Marelli provenientes de una plantación experimental de San Pedro, Buenos Aires, Argentina (Latitud 33°41 S, Longitud 59°41 W), seleccionados de acuerdo a su tamaño, firmeza al tacto y color de fondo. Luego de ser procesadas, las muestras se mantuvieron a 4°C hasta que se realizaron todas las determinaciones. El pH de las muestras estuvo en el rango de 3,6-3,7, no variando estos valores luego del tratamiento con APH. De esta forma, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los distintos tratamientos ensayados. El promedio de grados brix fue de 11,2°, mientras que la firmeza estuvo en el rango de 30 a 40 N.

2.2.2.2 *Determinaciones realizadas*

Características cromáticas, TPA, actividad PPO, contenido de etanol.

2.2.2.3 *Tratamientos y diseño experimental*

Las muestras fueron sometidas a tres tratamientos de acuerdo con la tabla 1:

2. Materiales y métodos

Tabla 1. Descripción de los tratamientos aplicados a las muestras para evaluar su efecto sobre la calidad y la preservación de duraznos mínimamente procesados

Tratamientos	Nomenclatura
Envasado al vacío en combinación con APH	V-P
Envasado al vacío sin aplicación de APH	V
Control: los duraznos son envasados sin aplicación de vacío ni de APH	C

En relación a las condiciones operativas, el nivel de presión aplicado en el tratamiento de APH de las muestras V-P fue de 500 MPa, manteniéndose este nivel durante 5 min. El establecimiento de estas condiciones se basó en estudios previos, habiéndose informado que las mismas fueron capaces de inactivar el 99% de la actividad PPO en puré de durazno (Guerrero-Beltrán y col., 2004). Luego de la aplicación de los tratamientos, las muestras fueron almacenadas a 10°C por 21 días, llevándose a cabo las determinaciones en el momento inicial, y luego de 15 y 21 días de almacenamiento refrigerado.

Desde el punto de vista estadístico, el ensayo se realizó siguiendo un diseño factorial totalmente aleatorizado (3x3). Así, fueron preparadas 27 bolsas, de las cuales tres fueron evaluadas por tratamiento y por día de evaluación. Los factores definidos fueron: “tratamiento” (3 niveles: control-C-, envasado al vacío, -V-, envasado al vacío con aplicación de APH -VP-) y “tiempo de almacenamiento” (3 niveles: 0, 15 y 21 días). En el caso de las determinaciones de textura y de color, fueron analizados ocho cubos extraídos de diferentes bolsas y diferentes duraznos, por cada tratamiento y por cada día de evaluación. En el caso de las determinaciones bioquímicas (actividad PPO y contenido de alcohol), se prepararon tres *pooles* de muestras obtenidas de diferentes duraznos.

Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de variancia (ANOVA) usando el procedimiento GLM (General Linear Model) del programa estadístico SAS (Versión 9.2 2002-2003 SAS Institute Inc. Cary, NC, USA), para determinar la existencia de diferencias significativas entre distintos tratamientos. Cuando los efectos principales no presentaron interacciones entre ellos, la separación de medias fue realizada mediante el test de rangos múltiples de Duncan y el test LSD (*Least Significant Difference*) (Snedecor y Cochran, 1989).

2. Materiales y métodos

2.2.3 Capítulo 2: Optimización del tratamiento de APH para la preservación de duraznos mínimamente procesados

2.2.3.1 *Material vegetal*

En el presente capítulo se utilizaron duraznos (*Prunus Persica* (L.) Batch) cv. Flavorcrest provenientes de una plantación experimental de San Pedro, Buenos Aires, Argentina (Latitud 33°41 S, Longitud 59°41 W), seleccionados de acuerdo a su tamaño uniforme, su firmeza al tacto y su color de fondo. El pH de las muestras estuvo en el rango de 3,4-3,5, no variando estos valores luego del tratamiento con APH. El contenido promedio de azúcar fue de 12° Brix, mientras que la firmeza estuvo en el rango de 30 a 40 N. Luego de ser procesadas, las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta la realización de las determinaciones.

Determinaciones realizadas: En cada muestra fueron realizados los siguiente análisis: Parámetros cromáticos, Análisis de Perfil de Textura, Actividad de enzimas (PPO y ADH) y análisis de microestructura por microscopía óptica.

2.2.3.2 *Diseño experimental y definición de los tratamientos*

Los cilindros de duraznos fueron obtenidos según se describiera anteriormente (punto 2.1.2). Luego de ser colocadas en las bolsas, las piezas de duraznos fueron envasadas al vacío y divididas en lotes. Las condiciones de procesamiento por APH para cada tratamiento se seleccionaron de acuerdo a un diseño experimental uniforme de Doehlert (Ferreira y col., 2004; Araujo y Janagap, 2012; Mayor y col, 2011) con dos factores: nivel de presión (P) y tiempo de mantenimiento (t). Es importante mencionar que el número de experimentos requerido para los diseños de Doehlert es de $N = k^2 + k + C_0$, en donde k representa el número de factores y C_0 es el número de réplicas en el centro. Debe destacarse que en este tipo de diseño, el número de niveles no es el mismo para todos los factores. Como regla general, en este tipo de diseño se elige típicamente la variable con el efecto más importante, incluyéndose cinco niveles de la misma, lo cual permitirá obtener un mayor nivel de información de los ensayos. De esta forma, el diseño es definido considerando el número de variables y los valores codificados (C_i) en la matriz experimental. Dado que en el ensayo 2 se incluyeron 2 factores, el diseño requerirá la aplicación de nueve tratamientos, los cuales representan a seis puntos uniformemente distribuidos en el dominio experimental, y un punto central aplicado por triplicado para poder determinar el error experimental.

2. Materiales y métodos

Los niveles de los factores fueron codificados de acuerdo a la ecuación 1:

$$C_i = \frac{X_i - X_i^0}{\Delta X} \quad (1)$$

en donde C_i es el valor codificado (adimensional) para el nivel del factor i , X_i es el valor real para ese nivel del factor i , X_i^0 es el valor del nivel de ese factor en el punto central del dominio experimental, y ΔX es la medida de cambio (diferencia entre dos niveles reales del factor i que difieren en una unidad en valores codificados).

La tabla 2 muestra los valores codificados y reales correspondientes a los distintos niveles de los dos factores estudiados. Tanto los niveles de presión como los tiempos de mantenimiento fueron definidos de acuerdo con la información obtenida en distintos ensayos preliminares.

Tabla 2. Valores reales y codificados de los niveles de las variables independientes en el diseño experimental uniforme de Doehlert

Valores codificados		Valores reales	
Y1	Y2	Nivel de Presión (MPa)	Tiempo de mantenimiento (min)
-1	0	400	5
0	0	500	5
1	0	600	5
-0,5	-0,866	450	1
-0,5	0,866	450	9
0,5	-0,866	550	1
0,5	0,866	550	9

Para el análisis de los resultados, se utilizó la metodología de superficie de respuesta. Para cada variable respuesta definida (parámetros texturales y cromáticos y actividad de las enzimas seleccionadas), se estudiaron los efectos lineales, cuadráticos y la interacción entre los factores. Cada variable respuesta (Y) se analizó como una función que incluye tanto a los dos factores independientes (P, t), como al error experimental ε :

$$Y = b_0 + b_1P + b_2t + b_{11}P^2 + b_{22}t^2 + b_{12}Pt + \varepsilon \quad (2)$$

Donde b_0 es el efecto principal, b_1 , es el efecto lineal de la presión, b_2 es el efecto lineal del tiempo de mantenimiento, b_{11} es el efecto cuadrático del nivel de presión, b_{22} es el efecto cuadrático del

2. Materiales y métodos

tiempo de mantenimiento, b_{12} es el efecto de la interacción entre el nivel de presión y el tiempo de mantenimiento.

El nivel de significancia de los coeficientes de la ecuación para cada variable respuesta obtenida por análisis de regresión múltiple se evaluó utilizando un test F con un valor $p = 0,05$.

De esta manera, la optimización de las condiciones del tratamiento por APH fue llevada a cabo según dos enfoques diferentes:

-En un primer enfoque se seleccionaron las condiciones de proceso (P, t) ensayadas que permitieron preservar mejor al producto en términos de las variables estudiadas, luego de la aplicación de un análisis estadístico multivariado de componentes principales (PCA). Es importante destacar que el PCA se basa en el cálculo de combinaciones lineales de dos variables, utilizándose para su aplicación una matriz de correlación para estandarizar las variables, ya que las mismas presentan en general diferentes escalas. De esta manera, los datos fueron transformados a un nuevo sistema de coordenadas llamadas componentes principales. Estas componentes permiten condensar un gran número de variables a unas pocas que son ortogonales y explican la mayor parte de la variancia de los datos. Las variables y componentes principales se presentan en un gráfico *Bi-plot*, en donde las mismas aparecen juntas cuando se correlacionan positivamente. Por otra parte, mediante el denominado *score plot*, que representa la proyección de cada muestra en los componentes principales, se puede establecer el tratamiento que tuvo una mejor *performance*.

-En un segundo enfoque, la optimización fue realizada mediante la determinación de los valores óptimos de cada factor. Para ello, los factores y variables se combinaron en la denominada función *desirability* de aceptación global. En este estudio, la función *desirability* se definió de acuerdo con la consigna de que el tratamiento óptimo debía causar un mínimo efecto sobre los parámetros de color y textura y un máximo efecto sobre la inactivación enzimática.

Los procedimientos de este ensayo se llevaron a cabo mediante el software STATISTICA (trial version 12, Stat Soft, Tulsa, OK, USA). En el caso del PCA fue utilizado el paquete estadístico SPSS® versión 12 (SPSS Inc., Illinois).

2. Materiales y métodos

2.2.4 Capítulo 3: Determinación de la aptitud varietal para el procesamiento de duraznos por APH y selección de condiciones de proceso

2.2.4.1 *Material vegetal*

Se utilizaron duraznos (*Prunus Persica* (L.) Batch) provenientes de una plantación experimental de San Pedro, Buenos Aires, Argentina (Latitud 33°41 S, Longitud 59°41 W) de dos variedades: cv. Flavorcrest (doble propósito) y cv. Romea (para industria, conservero) seleccionados de acuerdo a su tamaño uniforme, su firmeza al tacto y su color de fondo. La variedad Flavorcrest presentó un contenido promedio de sólidos solubles de 12°Brix, mientras que el contenido de la Romea fue de 14°Brix. La firmeza de ambas variedades estuvo entre 20 y 30 N. El pH de las muestras de la variedad Flavorcrest estuvo en el rango de 3,4-3,5, no variando estos valores luego del tratamiento con APH, mientras que para Romea, el rango fue de 3,5-3,6. Luego de ser procesadas, las muestras se mantuvieron a 4°C hasta la realización de las determinaciones.

2.2.4.2 *Determinaciones realizadas*

En el presente capítulo se llevaron a cabo las siguientes determinaciones: TPA, actividad PPO, actividad ADH, vitamina C y fenoles totales.

2.2.4.3 *Tratamientos y diseño experimental*

Luego de ser procesadas según fuera detallado en el punto 2.1.2 y colocadas en las bolsas, las muestras fueron envasadas al vacío y divididas en lotes. Para cada variedad, los tratamientos APH fueron aplicados según un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial de 3x2, con los factores: nivel de presión aplicado en 3 niveles (500-600-700 MPa) y tiempo de mantenimiento aplicado en dos niveles (1 y 5 min).

En el caso de las determinaciones de textura, se analizaron ocho cubos de diferentes bolsas y diferentes duraznos por cada tratamiento. En el caso de las determinaciones bioquímicas (actividad PPO y ADH), se prepararon tres *pools* de muestras obtenidas de diferentes duraznos.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de variancia (ANOVA) para determinar la existencia de diferencias significativas entre diferentes tratamientos usando el procedimiento GLM (*General Linear Model*) del programa estadístico SAS (Versión 9.2 2002-2003 SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Cuando los efectos principales no presentaban interacciones, se realizó la separación de medias por el test de rangos múltiples de Duncan y el test LSD (*Least Significant Difference*) (Snedecor y Cochran, 1989).

2. Materiales y métodos

2.2.5 Capítulo 4: Aspectos morfológicos y bioquímicos del efecto de las APH sobre duraznos mínimamente procesados

2.2.5.1 *Material vegetal*

El presente estudio fue realizado utilizando duraznos (*Prunus Persica* (L.) Batch) de dos variedades. Para la evaluación de los aspectos bioquímicos se utilizaron frutos de la variedad Flavorcrest provenientes de una plantación experimental de San Pedro, Buenos Aires, Argentina (Latitud 33°41 S, Longitud 59°41 W), seleccionados de acuerdo a su tamaño uniforme, su firmeza al tacto y su color de fondo. Para los estudios morfológicos se utilizaron frutos de calidad “elegido” de la variedad Orange Cling, obtenidos de una producción comercial proveniente de la provincia de Mendoza, Argentina.

La variedad Flavorcrest presentó un contenido promedio de sólidos solubles de 12°Brix, mientras que la Orange Cling presentó un contenido de entre 16 y 17 °Brix. La firmeza de la variedad Flavorcrest estuvo entre 20 y 30 N, mientras que la firmeza de Orange Cling estuvo entre 30 y 40 N. El pH de las muestras de la variedad Flavorcrest estuvo en el rango de 3,4-3,5, mientras que el de Orange Cling estuvo alrededor de 4,5. En ambos casos, los frutos dañados o heterogéneos en cuanto a tamaño y color fueron descartados.

2.2.5.2 *Determinaciones realizadas*

Los siguiente análisis fueron llevados a cabo en las muestras: ensayo de viabilidad (microscopía de fluorescencia), Microscopía electrónica de barrido en modo bajo vacío (LV-SEM), microscopía de transmisión electrónica (TEM), expresión relativa de ARN de enzimas relacionadas al pardeamiento (fenilalaninamonio liasa-PAL-, polifenoloxidasas-PPO-) y relacionadas al metabolismo anaeróbico (alcohol deshidrogenasa-ADH-, piruvato decarboxilasa-PDC-) y actividad de las enzimas PPO y ADH.

2.2.5.3 *Aplicación de los tratamientos y diseño experimental:*

Las muestras se procesaron según fuera detallado en el punto 2.1.2. Luego de ser colocadas en las bolsas, todas las muestras fueron envasadas al vacío y divididas en lotes.

Los tratamientos ensayados fueron los siguientes:

- 1- P (tratadas con APH)**
- 2- C (sin tratamiento de APH-Control)**

2. Materiales y métodos

Las condiciones operativas del tratamiento aplicado a las muestras P fueron las siguientes: el nivel de presión fue de 600 MPa, aplicado a temperatura ambiente, manteniéndose esta condición durante 5 min. Estas condiciones fueron definidas en base a los ensayos de optimización descritos previamente (capítulos 2 y 3).

Se realizaron 4 réplicas biológicas para cada tratamiento y 3 réplicas técnicas por cada réplica biológica.

En el caso de actividad de enzimas y del parámetro $\Delta a^*/\text{min}$, al tratarse de la comparación de dos tratamientos, para determinar la existencia de diferencias significativas las medias fueron sometidas al test t de student ($p < 0,05$).

La expresión relativa de los genes candidatos (ADH, PPO, PAL y PDC) se calculó utilizando el método “delta-delta” detallado en la introducción en el punto 1.15.2.3, analizándose los resultados mediante el software InfoStat (Di Rienzo y col., 2010). Los resultados de las muestras presurizadas fueron expresaron en términos relativos, calculándose este valor como un porcentaje en relación al control.

2.2.6 Capítulo 5: Estudio de la vida útil de duraznos mínimamente procesados preservados con APH

2.2.6.1 *Material vegetal*

El presente estudio fue realizado utilizando duraznos (*Prunus Persica* (L.) Batch) cv. Summer Set de calidad “elegido”, provenientes de una producción comercial ubicada en la provincia de Mendoza, Argentina. Los frutos dañados o heterogéneos en cuanto a tamaño y color fueron descartados. Los frutos presentaron un contenido promedio de sólidos solubles de 12°Brix. La firmeza estuvo entre 10 y 20 N, mientras que el pH fue de aproximadamente 3,5.

2.2.6.2 *Determinaciones realizadas*

En el presente capítulo se llevaron a cabo los siguientes análisis: TPA, actividad PPO, potencial de pardeamiento, contenido de etanol, análisis microbiológico, análisis sensorial y ácido ascórbico.

2. Materiales y métodos

2.2.6.3 *Tratamientos y diseño experimental*

Las muestras fueron procesadas según se detalla en el punto 2.1.2. Luego de ser colocadas en las bolsas, todas las muestras fueron envasadas al vacío y divididas en lotes. Los tratamientos ensayados fueron los que se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos aplicados a los duraznos mínimamente procesados para el estudio de vida útil

Tratamiento	Nomenclatura
Aplicación de APH seguida de conservación a 4°C	P -4
Aplicación de APH seguida de conservación a 20°C	P-20
Muestras no tratadas por APH (control) conservadas a 4°C	C-4
Muestras no tratadas por APH (control) conservadas a 20°C	C-20

Las condiciones operativas del tratamiento de APH (tratamientos P) fueron las siguientes: aplicación de un nivel de presión de 600 MPa mantenido durante 5 min. Estas condiciones fueron definidas en base a los ensayos de optimización descriptos previamente (capítulos 2 y 3).

Luego de los tratamientos, las muestras fueron almacenadas durante 42 días. Las determinaciones se llevaron a cabo el día posterior a la aplicación de los tratamientos y periódicamente a los 14, a los 28 y a los 42 días de almacenamiento.

Los tratamientos de APH fueron aplicados según un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial de 2x2x4. Así, se prepararon un total de 96 bolsas, destinándose 48 bolsas para las determinaciones microbiológicas (tres por tratamiento y por día de evaluación) y 48 bolsas para las determinaciones sensoriales y bioquímicas. Los factores fueron: “tratamiento” aplicado en 2 niveles (control-C- y tratamiento de APH -P-), “temperatura de almacenamiento” considerándose 2 niveles (4 y 20°C) y “tiempo de almacenamiento” incluyendo 4 niveles (0, 14, 28, 42 días). En el caso de las determinaciones sensoriales, se analizaron ocho cubos por cada tratamiento y por cada día de evaluación, obtenidos de diferentes bolsas y de diferentes duraznos. En el caso de las determinaciones bioquímicas (actividad de enzimas, contenido de alcohol, fenoles y contenido de vitamina C), se prepararon tres *pool*es de muestras obtenidas de diferentes duraznos.

2. Materiales y métodos

2.3 Métodos

2.3.1 Parámetros cromáticos

Los parámetros cromáticos de la superficie de las muestras de duraznos se determinaron con un colorímetro Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc. Osaka, Japan), usando la escala CIE $L^*a^*b^*$ donde L^* representa "Luminosidad", con una escala que va del 0-negro al 100-blanco; a^* representa cromaticidad en un eje que va del verde (-) al rojo (+) y b^* representa cromaticidad en un eje que va del azul (-) al amarillo (+). En algunos casos con estos parámetros se calcularon: C^* , el chroma, que representa la saturación o intensidad de color y h° , que es el tono o ángulo de color (0° = púrpura-rojizo y 90° = amarillo). El colorímetro se configuró para el iluminante D_{65} y el ángulo de observador a 2° y se calibró utilizando un plato cerámico estándar blanco. Las superficies de ocho piezas de durazno se evaluaron por cada tratamiento de cada ensayo en el que se realizó esta determinación. En los casos en los que se determinó el $\Delta a^*/\text{min}$, el mismo se calculó evaluando el valor de a^* inmediatamente después de abrir los paquetes y luego de 180 min. El cambio de a^* en el tiempo fue calculado como la variación del parámetro dividido por los 180 min transcurridos entre una medición y otra.

2.3.2 Análisis de perfil de textura (TPA)

Para el resto de los ensayos, se buscó un método que permita obtener más información acerca de la textura del producto. Entonces, se realizó una aproximación instrumental de la textura de los duraznos mínimamente procesados mediante un Análisis de Perfil de Textura (TPA). Se analizaron 8 piezas por tratamiento de cada ensayo en el que se realizó esta determinación. Cada pieza, se comprimió dos veces hasta el 75% de su altura original (con 1 seg de intervalo entre cada compresión) simulando la masticación. La determinación se llevó a cabo en un analizador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems LTD. Surrey, Inglaterra) a temperatura ambiente, con una sonda cilíndrica de 35 mm de diámetro (P/35) para asegurar que la superficie de la muestra de durazno haya quedado totalmente cubierta con la sonda. Se utilizaron las siguientes condiciones, las cuales fueron seleccionadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante: velocidad de la sonda previa a la determinación de 3 mm/seg, velocidad de la sonda durante la determinación de 0,8 mm/seg, velocidad de la sonda después de la determinación de 3,0 mm/seg y 25% de compresión. Datos de Fuerza-Distancia-tiempo se registraron para los dos ciclos. Parámetros de TPA: dureza, elasticidad, adhesividad, resilencia y masticabilidad fueron calculados de los datos de

2. Materiales y métodos

fuerza, distancia y tiempo utilizando el software Texture Exponent 32 (Stable Micro Systems LTD. Surrey, Inglaterra). El desplazamiento de la sonda recorrida en mm cuando la fuerza que opone el material es de 5 N, se midió como un parámetro adicional en el capítulo 2 para evaluar cómo se deforma el material bajo la acción de una fuerza determinada.

2.3.3 Actividad de Enzimas

2.3.3.1 Actividad PPO

La actividad PPO se determinó de acuerdo al método descrito por González y col. (1999), con algunas modificaciones.

2.3.3.1.1 Extracción de la enzima

Todos los pasos de la extracción de la PPO se llevaron a cabo a 0° C en baño de hielo, para evitar la inactivación enzimática. Para la extracción se homogeneizaron 7 g de durazno con 20 ml de 0,1 M buffer fosfato pH 7,3 conteniendo 1% p/v polivinilpolipirrolidona insoluble (PVPP) como un secuestrante de fenoles y 0,5 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) como inhibidor de proteasas, mediante la utilización de un Homogenizador Power Gen 1000 (Fisher Scientific, Germany). Posteriormente, el homogenato se mantuvo en agitación por 30 min, luego de lo cual se centrifugó a 10000 x g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se utilizó como extracto de la enzima.

2.3.3.1.2 Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la PPO se determinó inicialmente mediante un método espectrofotométrico basado en la velocidad inicial de incremento de absorbancia a 420 nm. Un volumen de 2,55 ml de buffer fosfato 0,01M pH 5,5 con 0,01 M de catecol como sustrato y 50 µl del extracto de la enzima (preparado en 2.3.3.1.1) se pipeteó en un tubo de ensayo y se mezcló vigorosamente. Luego, la mezcla se transfirió rápidamente a una cubeta de 1 cm de paso óptico. La absorbancia a 420 nm se registró continuamente a 30°C utilizando un espectrofotómetro UV-visible (Gilford, USA). La actividad se expresó como unidades por mg de proteína. Una unidad se representó la cantidad de enzima necesaria para cambiar A_{420} en 0.01 nm/min a 30°C.

Luego el método se optimizó según el método descrito por Jiménez y García-Carmona (1997) con algunas modificaciones, utilizando tert-butilcatecol como sustrato que da como producto una

2. Materiales y métodos

quinona más estable que el catecol. La actividad catecolasa de la PPO se evaluó utilizando también un método espectrofotométrico pero esta vez basado en la velocidad inicial de incremento de absorbancia a 400nm debido a la producción de 4-tert-butil-benzoaquinona. Un volumen de 1ml de 50 mM buffer fosfato pH 6,5 con 4,95 mM 4-tert-butilcatecol como sustrato y 100 μ l del extracto de la enzima se pipetearon en un tubo de ensayo y se mezclaron vigorosamente. Luego, la mezcla fue rápidamente transferida a una cubeta de 1cm de paso óptico. La absorbancia a 400nm se registró continuamente a 30°C por 5 min mediante la utilización de un espectrofotómetro UV-visible (Gilford, USA). La actividad se expresó como unidades por gramo de fruta. Una unidad quedó determinada como la cantidad de enzima necesaria para cambiar la absorbancia a 400 nm en 0,01 por minuto a 30°C.

2.3.3.1.3 *Determinación del contenido de proteína*

La concentración de proteína de los extractos en los casos que la actividad de la enzima se expresó por mg de proteína, se determinó mediante el método de Lowry (1976), midiendo la absorbancia a 660 nm, con albúmina bovina como estándar.

2.3.3.2 **Actividad ADH**

2.3.3.2.1 *Extracción de la enzima*

Ídem 2.3.3.1.1

2.3.3.2.2 *Determinación de la actividad enzimática*

La actividad ADH se determinó de acuerdo al método espectrofotométrico descrito por Walker (1992), con algunas modificaciones. El mismo se basa en la velocidad inicial de incremento de absorbancia a 340nm. Un volumen de 1ml de buffer TRIS 200 mM pH 8,8 con 100 mM de etanol como sustrato, 100 μ L del extracto de la enzima (preparado en 2.3.3.2.1) y 1 mM NAD⁺. Luego, la mezcla se transfirió rápidamente a una cubeta de 1 cm de paso óptico. La absorbancia se registró continuamente a 30°C utilizando un espectrofotómetro UV-visible (Gilford, USA). La actividad se expresó como unidades por miligramo de proteína. La unidad quedó determinada como la cantidad de μ M de NADH producidos por minuto a 30°C.

2. Materiales y métodos

2.3.4 Potencial de pardeamiento

Diez gramos de fruta se homogeneizaron con 20 gr de agua destilada. El homogenato se centrifugó a 10000 x g por 10 min, se tomó una alícuota de 1ml del sobrenadante y 1 hora después de la homogeneización, se agregaron 1,5 ml de etanol, se agitó en vórtex y se centrifugó esta última mezcla a 10000 x g por 10 min. El potencial de pardeamiento se determinó midiendo la absorbancia de la solución a 440 nm utilizando un espectrofotómetro (Brandelli y Lopes, 2005).

2.3.5 Concentración de etanol

El contenido de etanol en los duraznos mínimamente procesados se determinó utilizando un método enzimático (Boehringer Mannheim GMBH, Alemania). La concentración de etanol se expresó como mg de alcohol /100 g de muestra.

2.3.6 pH

Se determinó según la técnica de Brandelli y Lopes (2005). Se pesaron 10 g de fruta homogeneizándolos con 20 g de agua destilada con un Homogenizador Power Gen 1000 (Fisher Scientific, Germany). Luego, se determinó el pH del homogenato con un peachímetro digital 744 Metrohm equipado con electrodos de platino pH 0 – 14/0 – 80 °C Pt 1000/b/2/3 M de KCl (Metrohm, Suiza).

2.3.7 Ácido ascórbico

2.3.7.1 Extracción

Se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Valente y col. (2011) con algunas modificaciones.

Las muestras de tejido previamente congeladas a -80°C se homogeneizaron con un Homogenizador Power Gen 1000 (Fisher Scientific, Germany) en frío y protegidas de la luz. Se pesaron 2 g (por duplicado) de cada homogenato y se mezclaron con 20 ml de una solución acuosa que contenía 10% p/v de ácido perclórico y 1% p/v de ácido metafosfórico. Las muestras así tratadas se agitaron 2 min en vórtex y se sonicaron durante 10 min. Luego se centrifugaron durante 20 minutos a 10000 x g a 4°C. El sobrenadante se separó y se filtró luego por filtro de nylon de 20 µm, para analizarlo inmediatamente. El extracto así obtenido, tenía un pH muy bajo (<1) por lo cual podría dañar el inyector del equipo. Entonces, previamente a la inyección, se

2. Materiales y métodos

diluyó al ½ con una solución de fosfato de sodio 5,5 M, para lograr un pH similar al de la fase móvil (2,5).

2.3.7.2 Determinación

Se realizó por HPLC en fase reversa con un cromatógrafo SHIMADZU SCL-10AVP equipado con dos bombas SPD-10AVi y detector SPD-10 AVP UV/vis de doble longitud de onda (Shimadzu, Japón). La columna que se utilizó fue una C₁₈ Hypersil GOLD de 4,6 mm ID x 250 mm. Las condiciones de corrida fueron: Fase móvil: Buffer : CH₃OH (90:10). El buffer consistió en una solución acuosa KPO₄H₂ 0.01M cuyo pH se ajustó a 2,5 con ácido fosfórico. El flujo de corrida fue de 0,5ml/min, el volumen de inyección de 5 µl y la longitud de onda de lectura de 254 nm. Los resultados se expresaron como mg de ácido ascórbico/100 g de tejido fresco.

2.3.8 Fenoles totales

La extracción de fenoles totales se llevó a cabo de acuerdo a Pace y col. (2011) con algunas modificaciones y la determinación se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Singleton y Orthofer (1999).

Se tomaron porciones homogéneas de durazno de 2 g y se homogeneizaron con 2 ml de CH₃OH:H₂O (90:10). Las muestras así tratadas se agitaron en vórtex por 2 min, se sonicaron durante 10 min, y se centrifugaron a 10000 x g por 10 min a 4°C. Se tomaron 0,5ml de la muestra y se le agregaron 2,5 ml de reactivo de Folin-Cicoteau. La mezcla se agitó en vórtex y se dejó reposar por 8 min. A continuación se agregaron 4 ml de solución de Na₂CO₃ de 75 g/l, se mezcló la solución obtenida y se dejó reposar 2 hs a 23°C. Se determinó la absorbancia de las muestras a 760 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible Perkin Elmer, modelo Lambda Bio 20. Se realizó una curva estándar con ácido gálico (AG) y se realizaron diluciones de las muestras de forma tal de poder utilizar el rango de la curva estándar. Los resultados se expresaron como equivalentes de AG (mg AG/100 g).

2.3.9 Expresión relativa de enzimas a nivel de ARNm

Se procedió al desarrollo de la metodología para la extracción, amplificación y evaluación de la expresión relativa de las enzimas Polifenoloxidasas (PPO), Fenilalaninamonioliasa (PAL), Piruvato Decarboxilasa (PDC) y Alcohol Deshidrogenasa (ADH).

2. Materiales y métodos

Se utilizaron para relativizar la expresión, dos genes de expresión constitutiva en durazno: Factor de elongación traslacional 2 (TEF2) y Factor de elongación 1 (EF1) y que se recomiendan en bibliografía para utilizar como referencia (Tong y col., 2009 y Lara y col., 2011 respectivamente). Se observó la estabilidad de los mismos frente a los tratamientos y se seleccionó el más estable para obtener los resultados de expresión relativa de las enzimas de interés.

2.3.9.1 *Extracción de ARN*

Se optimizó la extracción de ARN en la matriz de pulpa de durazno probando diferentes métodos. Se evaluó reproducibilidad, rendimiento y pureza del ARN total extraído, y se determinó el método óptimo. Las muestras de pulpa de durazno fueron extraídas finalmente por el Método de Meisel y col. (2005), ya que resultó ser el que mejor se adecuaba a la amplificación por Real Time RT-PCR.

2.3.9.1.1 *Método de extracción de ARN total de durazno para análisis de genómica funcional (Meisel y col., 2005)*

Se procedió a moler tejido de fruta con N₂ líquido en un mortero. Se transfirieron 4 g del polvo obtenido a un tubo tipo *Falcon* de 50 ml. Posteriormente se le agregaron 10 ml del buffer de extracción (2% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), 2% de polivinilpirrolidona (PVP), 100 mM de buffer TRIS-HCl pH 8, 25 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 2 M de NaCl y 2% de β-Mercaptoetanol) precalentado a 65°C. Las suspensiones se incubaron a 65°C por 15 min con agitación en vórtex cada 3 min. Luego, se agregaron 10 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se agitaron en vórtex. Se centrifugaron las muestras a 12000 x g por 20 min a 4°C. Se separó y recuperó la fase acuosa. Se le agregó a la misma otros 10 ml de la mezcla clorofórmica (24:1) y nuevamente se mezcló por vórtex. Se volvió a centrifugar a 12000 x g por 20 min. Se recuperó la fase superior. Se le agregó ¼ de volumen de una solución de LiCl 10 M. Se mezcló la solución obtenida por inversión y se dejó *overnight* a 4°C. Se centrifugó la solución a 12000 x g por 35 min a 4°C y se descartó cuidadosamente el sobrenadante. Se resuspendió el pellet obtenido con buffer SSTE (1M NaCl, 0,5% de dodecilsulfato sódico (SDS), 10mM Buffer TRIS-HCl pH 8 y 1 ml EDTA pH 8). Se transfirió el pellet resuspendido a un tubo pequeño. Se extrajo la muestra con igual volumen de la mezcla clorofórmica, se agitó en vórtex y se centrifugó a 14000 x g por 10 min a 4°C. La fase acuosa se resuspendió en 2 volúmenes de Etanol 100% y se centrifugó a 14000 x g por 20 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol 75%. Se centrifugó a 14000 x g por 10 min a 4°C y se removió nuevamente el sobrenadante. Se secó el pellet en un

2. Materiales y métodos

concentrador Eppendorf Modelo Concentrator 5301 (Eppendorf, Alemania) a 45°C por 10 min bajo vacío. Se resuspendió el pellet de ARN con 15 µl de agua DEPC (Agua tratada con dietil pirocarbato al 1%). Se almacenaron los extractos de ARN a -80°C hasta el momento de la amplificación.

2.3.9.1.2 *Tratamiento con DNAsa*

El tratamiento con DNAsa se realizó previo a la amplificación del ARN, con el fin de eliminar posibles contaminaciones de ADN presente en la muestra, las cuales habrían podido interferir en la determinación y amplificación por RT-PCR en tiempo Real.

El tratamiento se realizó con Deoxiribonucleasa I (Invitrogen, USA-Cat. N°18068-015). Se realizó el tratamiento según las indicaciones del fabricante: Para un volumen final de 20 µl, se colocaron 2 µl de buffer, se agregaron 2 µl de la enzima DNAsa I, 5 µl de extracto de ARN total (1 µg) preparado según 2.3.9.2 y 11 µl de agua DEPC. Se incubó 30 min a 25°C y, para inactivar la enzima, se agregó 1 µl de solución de EDTA 25 mM ya que el EDTA es quelante del calcio que es cofactor de la enzima, y se incubó 10 min a 65°C. Luego las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de la amplificación.

2.3.9.2 *Determinación de la concentración de ARN*

La determinación de la concentración de ARN de los extractos se realizó en un fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Life Technologies, Austria) con el kit que provee la empresa para tal fin. Se seleccionó el método de extracción que permitiera obtener el mayor rendimiento de ácidos nucleicos para la futura amplificación.

2.3.9.3 *Diseño de primers*

Las secuencias de ácidos nucleicos para el diseño de los *primers* correspondientes a las enzimas estudiadas se obtuvieron del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI-www.ncbi.nlm.nih.gov). Las mismas se encuentran resumidas en la tabla 4:

2. Materiales y métodos

Tabla 4. Secuencias de ácidos nucleicos utilizadas para el diseño de los *primers* correspondientes a las enzimas estudiadas

Gen	Nº Acceso GeneBank	Fuente	Largo secuencia (pb)
PPO	JQ388483.1	<i>Prunus persica</i>	2356
PPO	AY865623.2	<i>Prunus salicina</i>	2155
ADH	HM240512.2.	<i>Prunus dulcis</i> x <i>Prunus persica</i>	1360
PDC	HM362681.1	<i>Prunus dulcis</i> x <i>Prunus persica</i>	2275
PAL	HM543574.1	<i>Prunus Persica</i>	2663
TEF2	JQ732180.1	<i>Prunus Persica</i>	3060
EF1	FJ267653.1	<i>Prunus Persica</i>	1771

En el caso de la PPO, las secuencias de ARNm de durazno (*Prunus Persica*) no se encontraban aún publicadas , aunque se disponía de la secuencia completa del gen (GenBank: JQ388483.1) y las secuencias de ARNm de especies relacionadas como *Prunus salicina* (GenBank: AY865623.2), entonces, homologando secuencias, se pudieron encontrar regiones conservadas que pudieron utilizarse para diseñar los *primers*. Para ADH se utilizó la secuencia encontrada para ARNm de ADH de *Prunus dulcis* x *Prunus persica* (GenBank: HM240512.2). Para PDC se utilizó la secuencia encontrada para ARNm de PDC de *Prunus dulcis* x *Prunus persica* (GenBank: HM362681.1). Para PAL se utilizó la secuencia encontrada para ARNm de PAL de *Prunus Persica* (Gen Bank: HM543574.1). Para TEF2 se utilizó la secuencia encontrada para ARNm de TEF2 de *Prunus Persica* (GenBank: JQ732180.1). Para EF1 se utilizó la secuencia encontrada para ARNm de EF1 de *Prunus Persica* (Gen Bank: FJ267653.1).

El diseño de los *primers* para la amplificación por Real Time RT-PCR, se realizó con el software PRIMER EXPRESS 3.0 (PE-Applied Biosystems, 2004). En la tabla 5 se presentan los *primers* utilizados.

2. Materiales y métodos

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos (*primers*) utilizados para el Real Time RT-PCR

Gen	Forward <i>primer</i> (5'-3')	Reverse <i>primer</i> (5'-3')	Producto de amplificación
<i>EF1</i>	5'- ccaaggcaaggtacgatgaaa -3'	5'- tgtaccaaccttcttcagatagga -3'	63 pb
<i>TEF2</i>	5'- tttccagtgggcttcaaagg-3'	5'- caaagcaaatacccctcatgttt -3'	62 pb
<i>PAL</i>	5'- caatggaaatcggcaataagg -3'	5'- gccccacgcaaaacga -3'	60 pb
<i>PPO</i>	5'- tggtttccggtgccaaaa -3'	5'- ggtccccggccctgtac -3'	60 pb
<i>ADH</i>	5'-cggggaagccactactatcaa-3'	5'-cgtaaatacgagggaaca-3'	150 pb
<i>PDC</i>	5'- ggcgtcaccgacgtcttc -3'	5'- tggtcgaggagggtcaagtt -3'	56 pb

En la última columna, se encuentra indicada la longitud del producto (en pares de bases) amplificada por los primers correspondientes.

2.3.9.4 Amplificación por Real Time RT-PCR

La amplificación por *Real Time RT-PCR*, de los genes candidatos, fue realizada utilizando 1 µl del extracto de ARN total extraído según 2.3.9.1, previamente diluido al ¼ en agua DEPC. De esta manera, se pudo trabajar con todas las enzimas dentro del rango dinámico determinado en la puesta a punto de la técnica en un volumen total de 25 µl usando el kit *QuantiFast® SYBR® Green RT-PCR* (Qiagen, USA, cat.N°204154) en un equipo de *PCR Real Time StepOne Plus* (Applied Biosystems, Singapur). La concentración de los *primers* fue en todos los casos de 370 nM. Las condiciones de la RT-PCR fueron las recomendadas por el fabricante: Para la transcripción reversa, 10 min a 50°C, seguidos de 5 min a 95°C (la HotStar Taq Plus DNA polimerasa se activó en este paso en el que se sometió a las muestras a alta temperatura). Luego, las muestras se sometieron a 40 ciclos de: 95°C por 10 seg (desnaturalización); 60°C por 30 seg (combinación de *annealing*-extensión). Todas las muestras se corrieron por triplicado, con cuatro réplicas biológicas por tratamiento. Para cada muestra, un valor de Ct (ciclo umbral de la muestra) fue calculado de las curvas de amplificación mediante la selección de la óptima relación entre la emisión del cromóforo utilizado en la determinación (SYBR Green) sobre la fluorescencia inicial de base (ROX) en la porción exponencial de la curva de amplificación. Diferencias en la expresión relativa de las enzimas se calcularon utilizando como referencia a la expresión de EF1, que resultó más estable al tratamiento y se analizó mediante el software Infostat- Aplicación fqStatistics (Di Rienzo, J., 2010).

2. Materiales y métodos

2.3.10 Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos se hicieron de acuerdo a lo propuesto por Costa y col. (2011) con algunas modificaciones:

En todas las muestras de duraznos mínimamente procesados a evaluar, se realizaron diluciones seriadas a partir de un homogenato de 20 g de muestra y 180 ml de agua peptonada (1/10).

Las determinaciones realizadas fueron:

Recuento de microorganismos aeróbicos viables a 37°C: las diluciones se sembraron en PA (*Plate Count Agar*, Oxoid, Inglaterra) y se incubaron a 37°C durante 48 hs.

Recuento de microorganismos psicrótrofos: se sembraron en PA y se incubaron a 4°C por 15 días.

Recuento de bacterias ácido lácticas: se sembraron las diluciones en medio MRS (*Man Rogosa Sharpe*, Britania, Argentina) agarizado y se incubaron a 30°C; en jarra de anaerobiosis con atmósfera modificada por kit (AnaeroGen, Oxoid, Inglaterra) durante 3 días.

Recuento de hongos y levaduras: las diluciones se sembraron en YEDC (*Yeast Extract Dextrose Chloramphenicol*, Oxoid, Reino Unido) y se incubaron a 20°C por 5 días.

2.3.11 Análisis sensorial

Para realizar la evaluación sensorial, cada salida se analizó en forma separada e independiente. Se utilizó un panel de jueces entrenados los cuales evaluaron las muestras de durazno siguiendo los lineamientos generales de la normativa de IRAM para análisis sensorial (IRAM 20001/2/3:1995, IRAM 20004/5:1996, IRAM 20014:1998, IRAM 20015). Teniendo en cuenta las principales características de deterioro durante la vida útil de este tipo de producto (Boynton y col., 2002; Cano-Salazar y col., 2013) los atributos evaluados fueron: *flavor* a durazno; sabor fermentado; dureza, facilidad de ruptura y otros sabores extraños. Se utilizó para evaluar cada atributo, una escala continua de 10 cm con los extremos rotulados como “extremadamente débil” y “extremadamente intenso”. Para entrenar el panel, se realizaron sesiones previas a la evaluación para definir los atributos, las escalas y los extremos con muestras de durazno fresco de la variedad utilizada en el ensayo para poder definir además, el material de referencia con el cual poder comparar.

2. Materiales y métodos

2.3.12 Microscopía

2.3.12.1 Microscopía óptica

2.3.12.1.1 Campo claro

Muestras de tejido de las piezas de durazno (principalmente tejido parenquimático) se seccionaron manualmente utilizando una navaja afilada y se montaron en un portaobjeto con una gota de agua destilada. Las secciones fueron examinadas utilizando un microscopio óptico (Nikon Eclipse E200, Tokio, Japón) con cámara digital Moticam® (Laboratorio de Botánica, Universidad Nacional de Luján).

2.3.12.1.2 Fluorescencia

Viabilidad Celular: La viabilidad de las células se determinó según Martínez y col. (2007) en el tejido de durazno evaluando su habilidad para acumular fluoresceína producida por clivaje enzimático de diacetato de fluoresceína (FDA). Esto se basa en que las células muertas no pueden clivar el compuesto y entonces no fluorescen, indicando pérdida de compartimentalización y de la funcionalidad de la membrana.

Entonces, para esta determinación se preparó una solución de FDA 5mg/ml en acetona que luego se diluyó con buffer fosfato 0.05 M pH 6 para dar una concentración final de 0.01%.

Secciones transversales de las muestras fueron teñidas con esta mezcla de reacción por 5 min y luego examinadas con un microscopio óptico con epifluorescencia Axiolab HB050X (Carl Zeiss, Alemania) acoplado a una cámara digital (Moticam 2.0) utilizando un filtro azul (excitación: 450-500 nm y emisión: 520 nm) (Laboratorio de Microscopia, Universidad Nacional de Luján).

2.3.12.2 Microscopía electrónica

2.3.12.2.1 Microscopía electrónica de barrido en modo bajo vacío (LV-SEM)

Esta determinación se realizó según Laurienzo, y col. (2013) con algunas modificaciones. Para ello, se utilizó un equipo FEI Quanta 250, operando en modo bajo vacío ($P_{H_{20}} = 0.7$ Torr) usando un detector de campo largo (LFD). Muestras de 1 cm³ fueron observadas a 5 kV de voltaje de aceleración (Servicio de Microscopia Electrónica, INTA Castelar).

2. Materiales y métodos

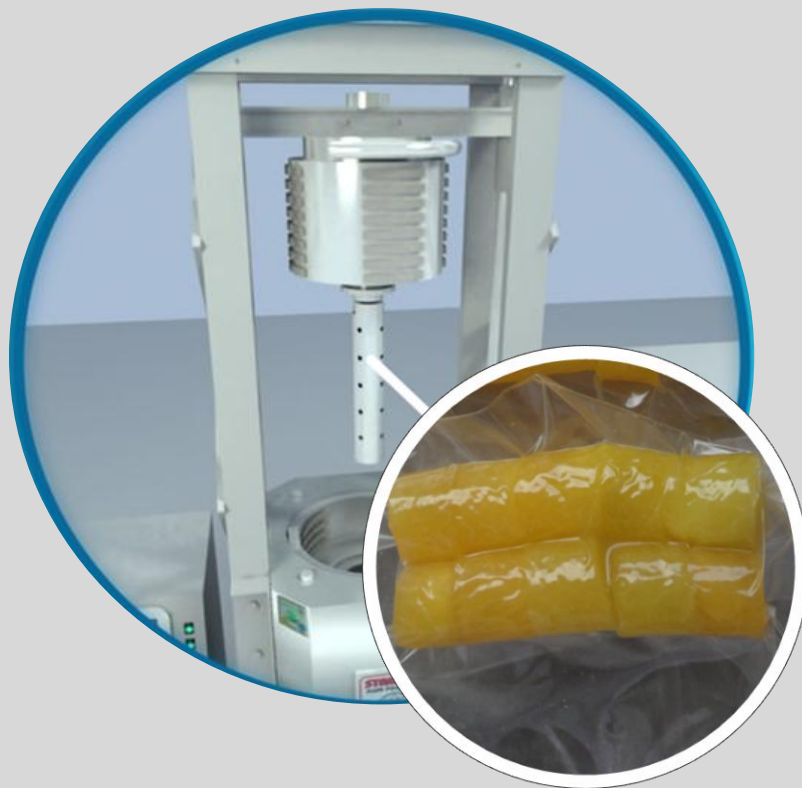
2.3.12.2.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 3 % en buffer Milloning. Luego, se realizaron 3 lavados con el mismo buffer, se postfijó en tetróxido de osmio (OsO_4) al 2% en solución acuosa por 2 horas en frío. Posteriormente, se lavó con agua destilada y se deshidrató con soluciones de concentración de alcohol ascendente (50, 70, 96, 100 % v/v), 3 lavados de 5 min c/u, luego 3 lavados de acetona, se realizó la pre-inclusión (resina Spurr al 1/2 con acetona) durante toda la noche, se confeccionaron los tacos con resina Spurr pura y se colocaron en estufa a 60°C durante 72 hs. Luego se los talló y cortó con un ultramicrotomo Ultracut-E Reichert Jung con navaja de vidrio, levantando los cortes en grillas de cobre con posterior contraste con Acetato de uranilo al 2 % en agua bidestilada 1 hora 20 min, 3 lavados con agua bidestilada y luego con citrato de plomo de Reynolds 2 min y nuevamente 3 lavados con agua bidestilada (coloración uranilo-Reynold's).

Las grillas con los materiales fueron observaron y fotografiados con microscopio de transmisión JEOL 1200EX (Servicio de Microscopia Electrónica, CICVyA- INTA Castelar).

A partir de los tacos que se prepararon para TEM, se obtuvieron además secciones semifinas para observar por microscopía óptica (campo claro). Estos cortes se colorearon con azul de toluidina al 1%, adicionada de borato de sodio.

3. Resultados Y Discusión



3.1

Diseño y puesta a punto de un sistema experimental para evaluar la aplicación de APH en duraznos mínimamente procesados

3.1 Resultados y Discusión-Diseño de un sistema experimental

3.1.2 Introducción

El presente ensayo se realizó con el objetivo de poner a punto un sistema experimental a ser utilizado en el trabajo de tesis, estableciendo las distintas variables y elementos que lo constituyen. En base al relevamiento bibliográfico y a la experiencia previa del grupo en la aplicación de esta tecnología en otros productos alimenticios (sobre todo en productos cárnicos y productos lácteos), se establecieron las condiciones del diseño del sistema que mejor habían resultado en estas experiencias, como por ejemplo: el tipo de film a utilizar, el sistema de sellado, el tamaño y forma de los trozos de durazno, entre otros para establecer el proceso de elaboración de los duraznos mínimamente procesados. Una vez definidas estas variables, se llevó a cabo el presente ensayo preliminar para evaluar el funcionamiento del sistema. Si bien estaba planificada la evaluación de diversas variables, el deterioro visual evidente, debido en mayor medida al pardeamiento enzimático, hizo que se considere oportuno limitar las evaluaciones solamente a la determinación de características cromáticas.

3.1.3 Resultados

Los distintos parámetros cromáticos determinados durante el almacenamiento son mostrados en la Tabla 6. Puede apreciarse que todos los parámetros cromáticos mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras tratadas por APH con respecto al control (sin aplicación de APH). Las mediciones instrumentales permitieron cuantificar las diferencias, las cuales pudieron ser apreciadas visualmente, dado que como se observa en la fig. 17, las muestras tratadas por APH sufrieron un claro proceso de pardeamiento enzimático inmediatamente después de aplicar el tratamiento y exponer a las bolsas a una atmósfera normal.

Entre los parámetros de color, se observa que el valor de a^* de las muestras presurizadas fue muy superior al de las muestras control, mientras que tanto el parámetro L^* como el h° (tono) fueron significativamente más bajos ($p < 0,05$) para las muestras presurizadas. Según el valor de este último parámetro, las muestras control se ubicarían dentro del círculo de color en el rango de los colores amarillos (aprox. 90°), mientras que las muestras presurizadas se aproximarían a los colores rojos (aprox. 0°), lo que en general se asocia al desarrollo de pardeamiento. Este resultado indicaría que la PPO no pudo ser completamente inhibida con el tratamiento de APH, y que incluso se produjo una aceleración de este tipo de alteración, favorecida posiblemente por el daño estructural de las células que indujo un proceso de descompartimentalización, permitiendo el contacto entre la enzima y el sustrato.

3.1 Resultados y Discusión-Diseño de un sistema experimental

Tabla 6. Parámetros cromáticos determinados en cubos de durazno *cv. O'Henry* durante el almacenamiento

Tratamientos aplicados	Parámetros cromáticos				
	L*	a*	b*	C*	h°
450 MPa-5min	46 ± 3 c	8 ± 1 a	21 ± 2 b	23 ± 2 b	68 ± 3 c
300 MPa-5 min	51 ± 3 b	7 ± 1 a	25 ± 2 b	26 ± 2 b	74 ± 4 b
Sin APH	87 ± 1 a	1 ± 1 b	45 ± 2 a	45 ± 2 a	91 ± 2 a

Los valores con letras iguales no difieren significativamente entre sí, según test de Duncan ($p=0,05$). Los datos son expresados como los promedios ± el desvío estándar (n=8).

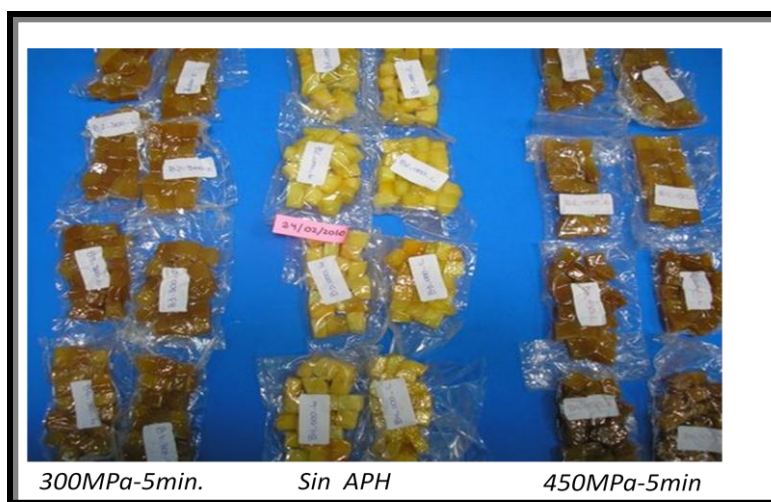


Fig. 17 Apariencia de los duraznos mínimamente procesados, acondicionados en bolsas de alta permeabilidad al oxígeno ($6.000-8.000 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24 \text{ hs}$ a 23°C , 1 atm) luego de la aplicación de los tratamientos de APH.

En el caso del parámetro C* (saturación), las muestras presurizadas mostraron una disminución significativa en el valor de este parámetro. El comportamiento de C*, en conjunto con la disminución en los valores de L*, estaría evidenciando un aumento en la traslucidez de las muestras inducida probablemente por el procesamiento.

3.1.4 Discusión

3.1.4.1 Características cromáticas

Entre las variables cromáticas ensayadas, la literatura sugiere que la evaluación del grado de pardeamiento puede realizarse a través de la disminución de L* y del aumento de a*, habiéndose comprobado la correlación de las mismas con el grado de desarrollo de esta alteración (Gorny y col. 1998; Rocha y Morais, 2003). De esta manera, la medición instrumental de los mencionados

3.1 Resultados y Discusión-Diseño de un sistema experimental

parámetros corroboró lo apreciado visualmente, lo cual evidenció que el tratamiento de APH aplicado en las condiciones utilizadas (300 MPa-450 MPa por 5 min y en el producto envasado en bolsas de alta permeabilidad al oxígeno) tenía un efecto contrario al deseado, acelerando el proceso de pardeamiento enzimático. Es sabido que la descompartimentalización de las enzimas y sustratos presentes en el tejido lleva a que las mismas entren en contacto, lo cual hace posible el desarrollo de la reacción (Toivonen y Brummell, 2008). De esta manera, el daño inducido por las APH en las membranas celulares provocó probablemente la desorganización del tejido, resultando en el contacto entre la PPO y los fenoles, lo cual es sabido que junto con la presencia de oxígeno conduce al desarrollo del pardeamiento (Hendrickx y col., 1998). Se ha informado en la literatura que la enzima PPO es altamente baroresistente, habiéndose comprobado que, la aplicación de APH en la mayoría de los productos vegetales es insuficiente para lograr la inactivación completa de la enzima (Chakraborty y col., 2014), aunque en algunos casos se ha conseguido alcanzar una reducción significativa de su actividad (Perera y col., 2010; Rao y col. 2014). Resulta evidente que la PPO constituyó de por sí un factor limitante, al no ser completamente inactivada, ya que la permanencia de una actividad residual luego de la aplicación del tratamiento fue suficiente para el desarrollo de la reacción de pardeamiento en los duraznos. Es importante mencionar que para que esta alteración haya tenido lugar, debió haber estado presente en el medio el oxígeno, el cual representa, además de la enzima y los compuestos fenólicos, el tercer elemento necesario para que la reacción tenga lugar.

3.1.5 Conclusiones

La primer parte del trabajo de tesis permitió determinar la necesidad de aumentar el nivel de presión para lograr un porcentaje adecuado de inactivación de la enzima PPO, además de resaltar la importancia de combinar el efecto de las APH con el envasado al vacío en bolsas de alta barrera al oxígeno para limitar la reacción de pardeamiento. Dado que las APH constituyen una tecnología emergente, en el tiempo durante el cual se desarrolló el trabajo de tesis, se generó por parte de los distintos grupos internacionales dedicados al tema un importante volumen de información. Sin embargo, al comienzo del trabajo de tesis, eran escasos los estudios sobre la aplicación de APH en productos frutihortícolas mínimamente procesados. Como consecuencia de esto, las condiciones fijadas para esta etapa preliminar (aplicación de tratamientos de APH de 300 y 450 MPa por 5 min a temperatura ambiente y envasado en bolsas con alta permeabilidad al oxígeno), resultaron insuficientes para la obtención de un producto de calidad. Así, se observó que bajo estas

3.1 Resultados y Discusión-Diseño de un sistema experimental

condiciones, las APH aceleraban significativamente el pardeamiento enzimático, a tal punto de que el producto se alteraba de manera importante ya a los pocos minutos de aplicar el tratamiento y de haber retirado la bolsa protectora de baja permeabilidad al oxígeno. En base al resultado del ensayo, pudo diseñarse un sistema experimental que probó ser exitoso para el desarrollo del trabajo. Posteriormente al desarrollo del primer ensayo y en concordancia con los resultados obtenidos en el mismo, un grupo de una universidad china publicó una importante información que demostraba que la enzima PPO presente en jugo de durazno se activaba con tratamientos de 400 MPa-5 min, siendo necesario un mayor nivel de presión (500-600 MPa por 5 - 25 min) para inactivarla en un 80% (Rao y col., 2014). En función de esto, puede concluirse que nuestros resultados fueron comparables a los obtenidos posteriormente por otros grupos de investigación.

3.2 Capítulo I

Efecto de la aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas y del envasado al vacío sobre la preservación de duraznos mínimamente procesados

3.2 Resultados y Discusión-Capítulo 1

3.2.1 Introducción

Dado que las condiciones de procesamiento y envasado definidas en el ensayo preliminar inducían el pardeamiento del producto, el presente capítulo se realizó con el objetivo de combinar las APH con otras estrategias de preservación (ácidos orgánicos, envasado al vacío, almacenamiento refrigerado), para prevenir el mencionado problema y obtener un producto de alta calidad con vida útil extendida.

Es importante considerar que en los últimos años se han realizado grandes esfuerzos para el desarrollo y la optimización de tecnologías que permitan la producción de frutas y hortalizas mínimamente procesadas seguras, nutritivas y sensorialmente atractivas, que tengan además la capacidad de prolongar la vida útil de estos productos minimizando la pérdida de calidad. Sin embargo, hasta el momento ha sido muy difícil preservar este tipo de productos con una aceptabilidad comercial adecuada más allá de un par de semanas, por lo que se hace evidente la necesidad de incorporar tecnologías emergentes innovativas para lograr un aumento significativo en su vida útil. Teniendo en cuenta estas cuestiones, el presente capítulo se focalizó principalmente en la combinación de dos tecnologías: APH y envasado al vacío, cuya aplicación en frutas mínimamente procesadas ha sido hasta el momento muy limitada, por lo cual la información disponible es muy escasa.

Con este fin, cubos de esa fruta fueron sometidos a diferentes tratamientos, y posteriormente almacenados a 10°C (temperatura límite para una heladera particular/comercial). Periódicamente durante la conservación se extrajeron muestras, sobre las que se determinaron los principales parámetros de calidad. El trabajo fue complementado con el análisis de distintos parámetros bioquímicos asociados a las dos principales alteraciones fisiológicas que presentan este tipo de productos: el pardeamiento enzimático y la fermentación. A continuación se presentan los principales resultados:

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 *Parámetros cromáticos*

La fig. 18 muestra los parámetros de color ($L^*C^*h^*$) determinados en los cubos de durazno sometidos a los tratamientos control, envasados al vacío y presurizados (V-P) y sin presurizar (V), durante el almacenamiento por 21 días a 10°C. Durante todo el periodo evaluado, los valores de L^* y C^* fueron significativamente ($p < 0,05$) menores en las muestras envasadas al vacío (V) y envasadas al vacío y presurizadas (V-P) que en las muestras control (C). Esta diferencia pudo

3.2 Resultados y Discusión-Capítulo 1

percibirse visualmente como el desarrollo de un efecto de translucidez y aspecto húmedo sobre la superficie de la fruta. Por otro lado, si bien los cubos presurizados (V-P) presentaron mayores valores de h° que las muestras control y que las muestras envasadas al vacío a lo largo de todo el período de almacenamiento, estas diferencias solo se volvieron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) al final del período evaluado.

3.2.2.2 *Análisis de perfil de textura (TPA)*

Aunque en el presente capítulo fue determinada la totalidad de los parámetros incluidos en el TPA, solo se presentarán los resultados para los parámetros dureza, cohesividad y masticabilidad (Tabla 7), dado que fueron los únicos que mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos. Puede observarse que inmediatamente después del procesamiento, los valores de dureza y masticabilidad de las muestras envasadas al vacío (V y V-P) resultaron menores que los de las muestras control (C). Durante el almacenamiento, todas las muestras se tornaron más blandas, lo que se vio reflejado en una disminución del valor de dureza, produciéndose este cambio a una mayor velocidad en las muestras control. Luego de 21 días de almacenamiento, las muestras presurizadas mostraron valores mayores de dureza y masticabilidad que los otros tratamientos, lo que evidencia la capacidad de las APH de prevenir el ablandamiento de la fruta, contribuyendo a preservar mejor la aptitud comercial del producto.

Por su parte, el parámetro cohesividad no mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos inmediatamente luego del procesamiento. Sin embargo, este parámetro mostró en todas las muestras un aumento durante el almacenamiento, siendo los valores al final de la evaluación mayores ($p < 0,05$) para las muestras V y V-P que para las muestras control (C).

3.2.2.3 *Actividad PPO*

Es importante mencionar que si bien el sustrato más utilizado para medir la actividad de la PPO espectrofotométricamente es el catecol, el cual fuera utilizado en el presente capítulo, posteriormente se refinó la técnica en base a resultados recientes obtenidos con tert-butylcatecol, el cual ofrece la ventaja de formar como producto una quinona más estable (García-Molina y col., 2007). En consecuencia, la técnica fue modificada en ensayos posteriores, para incorporar este sustrato y obtener una medición más confiable y reproducible de la actividad de esta enzima.

3.2 Resultados y Discusión-Capítulo 1

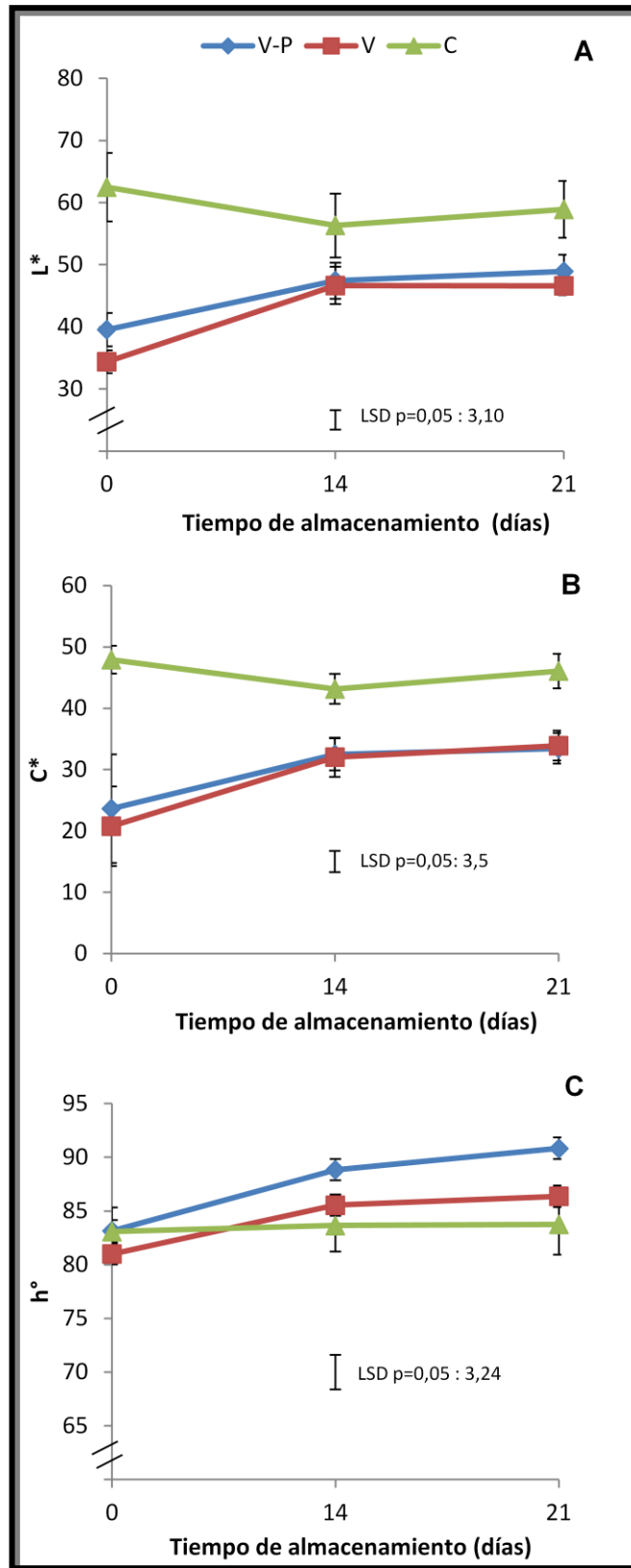


Fig.18 Parámetros cromáticos L* (A), C* (B), h° (C) medidos en cubos de durazno envasados en bolsas plásticas flexibles: Control (C), envasado al vacío (V) o sometido a 500 MPa por 5 min (V-P) durante el almacenamiento a 10°C.

3.2 Resultados y Discusión-Capítulo 1

Tabla 7. Evolución de distintos parámetros del TPA evaluados en los durazos sometidos a los diferentes tratamientos durante el almacenamiento a 10°C. Solo se muestran los resultados de los parámetros con diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Tratamiento	Días de almacenamiento a 10°C		
	0	14	21
Dureza (N)			
V-P	44,3 ± 0,5 b A	23,3 ± 0,2 b B	26,7 ± 0,6 a B
V	49,5 ± 0,6 b A	23,0 ± 0,2 b B	20,2 ± 0,2 ab B
C	64,6 ± 0,5 a A	29,9 ± 0,2 a B	17,8 ± 0,3 b C
Cohesividad (adimensional)			
V-P	0,366 ± 0,004 a B	0,596 ± 0,002 a A	0,579 ± 0,002 a A
V	0,358 ± 0,003 a C	0,529 ± 0,002 b B	0,569 ± 0,003 a AB
C	0,409 ± 0,003 a C	0,472 ± 0,001 c B	0,499 ± 0,005 b AB
Masticabilidad (N)			
V-P	9,7 ± 0,2 b A	9,8 ± 0,1 a A	10,9 ± 0,3 a A
V	10,9 ± 0,2 b A	8,6 ± 0,1 a A	8,0 ± 0,1 b A
C	15,8 ± 0,2 a A	9,4 ± 0,1 a B	6,0 ± 0,1 b C

Los datos son expresados como los promedios ± error estándar (n=8). Tratamientos: cubos de fruta envasados en bolsas plásticas flexibles (C), envasadas al vacío (V) o sometidas a 500 MPa por 5 min (V-P). Para cada tiempo de evaluación, los promedios de los diferentes tratamientos seguidos por la misma letra minúscula no mostraron diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($p=0,05$). Para cada tratamiento, los promedios para los diferentes tiempos de mantenimiento seguidos por la misma letra mayúscula no mostraron diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($p=0,05$).

La tabla 8 muestra la actividad de la PPO medida en extractos de durazno sometidos a los diferentes tratamientos. La evolución de este parámetro a lo largo del almacenamiento no permitió identificar un patrón regular de actividad para ninguno de los tratamientos en forma individual, probablemente debido a los múltiples factores que influyen la actividad PPO en un producto complejo como este. Sería de esperar que los dos factores más relevantes que determinaron este comportamiento hayan sido por un lado, la liberación de esta enzima causada por la pérdida de compartimentalización y por otra parte, su inactivación, para los tiempos más largos. Si se comparan los tratamientos entre sí para los diferentes tiempos, se observa que las muestras presurizadas (VP) mostraron una menor actividad de esta enzima para todos los tiempos estudiados, aunque la misma no pudo ser totalmente inhibida, por lo que se detectó una cierta actividad residual.

3.2 Resultados y Discusión-Capítulo 1

Tabla 8 Actividad polifenoloxidasa (PPO) y concentración de etanol medidas en cubos de duraznos sometidos a diferentes tratamientos durante el almacenamiento a 10°C

Tratamiento	Días de almacenamiento a 10°C		
	0	14	21
Actividad PPO(UE/mg π)			
V-P	106 ± 1 c A	64 ± 1 c B	113 ± 2 c A
V	151 ± 1 b B	98 ± 1 b C	217 ± 2 a A
C	232 ± 2 a A	119 ± 1 a C	192 ± 1 b B
Etanol (mg/100g)			
V-P	5,6 ± 0,1 cB	5,9 ± 0,2 cB	7,6 ± 0,2 bA
V	4,1 ± 0,1 bC	44,4 ± 0,3 bB	80 ± 1 aA
C	13,8 ± 0,1 aC	57,1 ± 0,9 aB	83 ± 4 aAB

Los datos están expresados como promedios ± Error estándar (n=3). Tratamientos: cubos de durazno envasados en bolsas plásticas flexibles (C), envasados al vacío (V) o sometidos a 500 MPa por 5 min (V-P). Para cada tiempo de evaluación, los promedios correspondientes a diferentes tratamientos seguidos de la misma letra minúscula no presentaron diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan (p=0,05). Para cada tratamiento, los promedios para diferentes tiempos de almacenamiento seguidos por la misma letra mayúscula no mostraron diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan (p=0,05).

3.2.2.4 Concentración de etanol

La tabla 8 muestra la concentración de etanol medida en los cubos de durazno sujetos a los diferentes tratamientos. Se observa que al final del período de almacenamiento, las muestras presurizadas (V-P) presentaron un contenido significativamente menor ($p < 0,05$) de este metabolito que las muestras correspondientes a los otros tratamientos, lo que evidencia que una o más de las reacciones asociadas al metabolismo fermentativo fueron efectivamente inhibidas. En contraposición, en las muestras envasadas al vacío sin aplicación de APH (V) y en las control (C), se evidenció visualmente un hinchamiento de las bolsas asociado a una importante producción de gas, así como la consecuente producción de etanol, lo que indica la inducción de reacciones fermentativas en el tejido del fruto.

3.2.3 Discusión

3.2.3.1 Parámetros cromáticos

Como fuera mencionado, el principal objetivo del presente capítulo fue el de prevenir y controlar el pardeamiento enzimático, ya que fue la alteración que tuvo un efecto más negativo en el ensayo preliminar. Desde el punto de vista de la evaluación cromática, diversos estudios previos

3.2 Resultados y Discusión-Capítulo 1

informan que el desarrollo del pardeamiento enzimático en productos hortofrutícolas puede ser evaluado de forma adecuada a través de la disminución tanto en el valor de L^* (asociada al oscurecimiento de la fruta) como en el valor del ángulo h° (asociada al pardeamiento en la superficie) (Rocha y Morais, 2003; Gorny y col., 1998). Dado a que en el presente capítulo ninguna de las muestras evaluadas presentó una disminución en el valor de estos parámetros, puede concluirse que las combinaciones de tratamientos ensayadas fueron exitosas, no evidenciándose desarrollo del pardeamiento enzimático. Es importante destacar que la presencia de oxígeno en la atmósfera de las muestras del ensayo anterior pudo ser limitada en el presente ensayo mediante el envasado al vacío, el cual se sabe que genera un ambiente libre de ese gas. Es probable que la eficacia de esta tecnología para excluir el oxígeno, necesario para el desarrollo de la reacción oxidativa de pardeamiento, haya sido el principal factor de éxito del tratamiento V-P (Perera y col., 2010).

Dentro de los parámetros de color evaluados, la tonalidad de la pulpa, representada por el ángulo h° (h° , también llamado tono), es considerada en la actualidad como el indicador que sintetiza de forma más adecuada la apariencia general de frutas mínimamente procesadas tal como son percibidas por los consumidores, ya que traduce la percepción del color por el ojo humano (Robles-Sánchez y col., 2009). Así, dentro del denominado círculo de color, que representa los ángulos de 0° a 360° , los valores asociados con el color rojo están cercanos a 0° , mientras que el amarillo está representado por valores cercanos a 90° (Chang y col., 2000).

En duraznos, el color rojo está generalmente asociado a un alto contenido de antocianinas, estando estos compuestos presentes generalmente en las vacuolas de las células de la piel o distribuidas a lo largo de la pulpa. Así, Bible y Singha (1993) encontraron una correlación entre el valor h° medido en la pulpa del durazno y la concentración de estos pigmentos. Por otra parte, Lewallen (2000) reportó que la degradación de antocianinas resulta generalmente en un proceso de “amarillamiento” de los duraznos, lo cual se traduce en un incremento del valor h° . Es probable que el aumento en el valor de ese parámetro evidenciado en el presente capítulo durante el almacenamiento en las frutas sometidas a los tratamientos V y V-P haya estado relacionado con la degradación de esos pigmentos, ya que si bien las antocianinas se mantienen estables durante la aplicación de tratamientos de APH, su estabilidad puede perderse durante el almacenamiento (Oms-Oliu y col., 2012).

La presencia de color rojo en duraznos y su efecto sobre la preferencia de los consumidores constituye un aspecto que ha generado ciertas controversias. Así, algunos autores (Iglesias y

3.2 Resultados y Discusión-Capítulo 1

Echeverría, 2009; Shen y col., 2013) consideran al mismo como una característica que contribuye al atractivo de estas frutas, mientras que otros (Lurie y Crisosto, 2005) mencionan que un color amarillo en la pulpa se apreciaría mejor por los consumidores que uno más rojizo, dada la asociación del color rojo con el “sangrado de la pulpa” uno de los síntomas del daño por frío. Desde este último punto de vista, puede considerarse que las APH tendrían un efecto positivo en la apariencia del producto.

Se ha encontrado que los cambios cromáticos producidos en la superficie del producto durante la aplicación de tratamientos de APH se deben a fenómenos físicos más que a cambios químicos asociados a la inestabilidad de los pigmentos (Miguel-Pintado y col., 2013). Es importante mencionar que si bien en términos generales, la combinación de tratamientos resultó altamente positiva para el producto, la aplicación de los mismo indujo en la fruta una ligera apariencia translúcida y húmeda, la cual fuera también descrita por Préstamo y Arroyo (1998) en coliflor tratado por APH. Aunque se estima que este cambio no afectaría la aceptabilidad del producto por parte del consumidor, la apariencia general podría ser mejorada optimizando el nivel de vacío y de presión aplicados.

La translucidez observada podría ser el resultado del efecto comprobado de las APH de cambiar la permeabilidad de las células en tejidos vegetales, lo cual genera un movimiento de agua y metabolitos a través de las células (Oey y col. 2008-a). Por otro lado, el aspecto húmedo a nivel de la superficie de la fruta puede ser asociado al exudado del tejido provocado por los tratamientos. Ambos fenómenos, translucidez y exudación, serían responsables de la disminución del parámetro L^* (Lewallen, 2000) constatada en el análisis de los parámetros cromáticos.

3.2.3.2 *Análisis de perfil de textura (TPA)*

El objetivo del TPA es evaluar las características mecánicas del alimento a través de la aplicación de una fuerza controlada sobre las muestras y de la evaluación y registro de la deformación de las mismas. De esta manera se obtienen parámetros que pueden ser correlacionados con la percepción de textura por parte de los consumidores (Szczesniak, 2002). Se sabe que en frutas como el caqui las APH inducen una disminución en el valor de dureza y masticabilidad, habiéndose relacionado este efecto con la ruptura de las paredes celulares y membranas, así como con la separación entre células producida por este tratamiento (Vázquez-Gutiérrez, 2011). Sin embargo, en el presente trabajo, es probable que la disminución observada en los valores iniciales de dureza y masticabilidad se haya debido mayormente al efecto del vacío aplicado antes del tratamiento de

3.2 Resultados y Discusión-Capítulo 1

APH. Es promisorio el hecho de que al final del almacenamiento, las propiedades texturales se hayan preservado mejor en las muestras presurizadas, las cuales presentaron mayores valores de dureza y masticabilidad que los otros tratamientos. Un comportamiento similar fue también observado en otros productos frutihortícolas tratados por APH y conservado por varias semanas, entre los que se pueden mencionar a zapallos (Zhou y col., 2014), duraznos amarillos (Zhang y col., 2012), nectarinas (Miguel-Pintado y col., 2013) y raíces de loto (Dong y col., 2013).

Las variaciones en la textura de las frutas mínimamente procesadas están generalmente asociadas a la transformación de los polímeros de la pared celular, lo cual puede deberse tanto a reacciones enzimáticas como no enzimáticas (Sila y col., 2008). En este sentido, diversos estudios evidencian que las presiones en el rango generalmente utilizado en los tratamientos de APH pueden incrementar la actividad catalítica de la enzima pectinmetilesterasa (PME), aunque notoriamente inhiben la actividad de la enzima poligalacturonasa (PG), siendo esta última la mayor responsable del ablandamiento enzimático de los tejidos vegetales (Oey y col., 2008-a; Sila y col., 2008). Por lo tanto, es posible que la inactivación de esta última enzima por las APH haya disminuido la velocidad de ablandamiento de los duraznos durante el almacenamiento, lo cual se habría reflejado en una disminución más lenta de la dureza y la masticabilidad. Hernández-Carrión y col. (2014), quienes observaron que la dureza se mantenía invariable en pimientos tratados por APH, también asociaron este fenómeno a la inhibición de la PG. Por otra parte, debe considerarse que la PME cataliza la demetoxilación de la pectina, y que esta molécula demetoxilada tiene dos destinos alternativos principales: por un lado puede formar uniones con cationes divalentes, generándose arreglos supramoleculares y/o geles, lo cual tendría un efecto endurecedor, y como segundo destino puede ser sustrato de la PG para la depolimerización, lo cual contribuiría al ablandamiento de los tejidos. Es factible que en el presente trabajo, el aumento observado en la cohesividad haya sido el resultado del efecto combinado de un incremento en la actividad PME y una inhibición de la PG (Sila y col., 2008).

3.2.3.3 *Actividad PPO*

El pardeamiento enzimático representa uno de los problemas más importantes relacionados con la alteración de frutas y hortalizas procesadas, y a pesar de los grandes esfuerzos realizados, todavía no existe una solución para su control total. Hasta el presente, los métodos desarrollados para prevenir esa alteración se han enfocado en aspectos particulares como el control de las reacciones asociadas y la inhibición de la PPO, siendo esta la principal enzima asociada al proceso. De esta

3.2 Resultados y Discusión-Capítulo 1

forma, las estrategias se han basado en eliminar uno o más compuestos necesarios para el desarrollo de esa reacción (ej. Oxígeno, la PPO, el cobre (grupo prostético de la enzima) o los sustratos fenólicos.

Dado que la aplicación de APH en frutas mínimamente procesadas es incipiente, una mayor profundización en el conocimiento del efecto del tratamiento sobre la actividad de la PPO sería de suma utilidad (Villamiel y Corzo, 2006) Se sabe que esta enzima presenta una alta baroresistencia, lo cual se ha constatado en diversos vegetales tales como papas, paltas, hongos, ciruelas, peras y uvas (Gomes y Ledward, 1996; Weemaes y col., 1998). Existen algunas particularidades relacionadas con el efecto de las APH sobre esta enzima, como el hecho de que las presiones de entre 100 y 300 MPa causen en duraznos la activación de la PPO, mientras que para inactivar la enzima serían necesarias presiones de más de 400 MPa, en combinación con alguna otra estrategia, como la adición de ácido ascórbico (Guerrero-Beltrán y col., 2004). Este último estudio previo sirvió en el presente trabajo de tesis para la definición de las condiciones del tratamiento (500 MPa por 5 min), el cual probó ser efectivo, aunque se constató en el ensayo que la inhibición alcanzada de la actividad PPO era solo parcial. Así, el porcentaje de inhibición alcanzado en el presente estudio (54% inmediatamente luego del tratamiento) resultó similar al previamente reportado por Guerrero-Beltrán y col. (2004), quienes mostraron que en puré de durazno, luego del procesamiento por 5 min a 517 MPa, más el agregado concomitante de ácido ascórbico, la disminución de la actividad de la PPO era del 60%. En otro ensayo, Keenan y col. (2012) lograron también mediante un tratamiento de 600 MPa por 10 min una reducción considerable de la actividad PPO en licuados de fruta.

De los resultados del presente capítulo puede concluirse que, si bien la aplicación de APH contribuye a la prevención del pardeamiento enzimático del producto durante el almacenamiento mientras está envasado (donde la baja concentración de oxígeno por el tratamiento de vacío evita que se desarrolle la reacción), el efecto inhibitorio de la presurización sobre la enzima resulta altamente relevante cuando el producto se abre y queda expuesto a la alta concentración de oxígeno del aire.

Es importante considerar también otros factores que pueden afectar el desarrollo de esta alteración tales como: el contenido intrínseco de compuestos fenólicos en los tejidos, el pH, la temperatura de almacenamiento, y la disponibilidad de oxígeno. Además, refiriéndonos al efecto del proceso en sí, la inactivación de la PPO inducida por las APH será altamente dependiente de factores tales como la acidez del medio (Hendrickx y col., 1998; Terefe y col., 2014). Teniendo en

cuenta este aspecto, es probable que otros factores pudieran haber jugado también un rol importante favoreciendo la inactivación de la PPO, entre ellos la aplicación de ácido ascórbico y ácido cítrico durante la preparación del producto.

3.2.3.4 *Concentración de etanol*

El último aspecto estudiado en el primer capítulo fue el efecto de las APH sobre la inducción de un metabolismo fermentativo, que podría desencadenarse por el efecto conjunto del tratamiento de vacío y la baja permeabilidad al oxígeno del film utilizado en la experiencia. Es ampliamente conocido que la concentración de oxígeno en la atmósfera que rodea a una fruta influye directamente sobre su velocidad de respiración. Cuando la disponibilidad de este compuesto disminuye, la respiración también disminuirá hasta que la concentración de oxígeno alcance el denominado *punto de extinción*, por debajo del cual se producen cambios metabólicos significativos, entre los que se pueden mencionar a la inducción o activación de las enzimas piruvato decarboxilasa (PDC), alcohol dehidrogenasa (ADH) y lactato dehidrogenasa (LDH) (Wills y col. 1998). En el presente capítulo, entre los compuestos que se acumulan como resultado de la inducción de un metabolismo fermentativo (acetaldehído, etanol, etil acetato y/o lactato), se eligió al etanol como marcador bioquímico del desarrollo de la fermentación, considerando su rol como producto final de esta ruta metabólica (Kader, 2004).

Así, los resultados mostraron que en las muestras control se acumuló un alto contenido de alcohol, el cual se fue incrementando permanentemente durante el almacenamiento. Por el contrario, el bajo contenido de etanol encontrado en las muestras presurizadas, que mostraron solo un ligero incremento luego de 21 días de almacenamiento bajo vacío, evidencia que la inducción de la fermentación fue casi completamente prevenida por la aplicación de APH. Este hallazgo resulta altamente relevante, dado que el uso del envasado al vacío se encuentra hasta el presente muy limitado en frutas y hortalizas frescas, precisamente debido a la generación de *off flavors* y/o a la total alteración que se ocasiona a los productos. Este efecto inhibitorio de las APH sobre la acumulación de etanol fue observado también en zanahorias mínimamente procesadas, envasadas al vacío y presurizadas (Trejo Araya y col., 2009).

Es importante considerar que no se descarta la existencia en los duraznos control de otras fuentes posibles de etanol, además del metabolismo anaeróbico del tejido, tales como la flora microbiana que no fuera totalmente inactivada con los pasos de lavado y desinfección. Entre los microorganismos incluidos en esta flora, se deben considerar especialmente a las bacterias lácticas

3.2 Resultados y Discusión-Capítulo 1

y levaduras, las cuales pueden proliferar en este tipo de productos envasados al vacío y producir etanol como parte de su metabolismo. En este sentido, se ha informado que las formas vegetativas de microorganismos, como las levaduras, pueden ser inactivadas mediante la aplicación de tratamientos de APH, en condiciones similares a las de este ensayo (Guerrero-Beltrán y col., 2005-a). También fue informado que un tratamiento de APH de 500 MPa por 1 min es capaz de producir la destrucción de bacterias lácticas en jugo de manzana presurizado (McKay y col., 2011). La determinación de la fuente del etanol producido (tejido de fruta y/o metabolismo microbiano), así como su relativa contribución al contenido final de este metabolito en el producto no fue determinada en el presente trabajo, ya que requeriría la disponibilidad de metodologías de análisis más complejas. Se planteó entonces la necesidad de estudiar en capítulos posteriores la expresión y actividad de enzimas vinculadas al metabolismo anaeróbico y realizar análisis microbiológicos para saber si al menos era acertado considerar las fuentes mencionadas como posibles responsables de la producción de etanol.

3.2.4 Conclusiones

El trabajo llevado a cabo en este capítulo demostró la factibilidad de aplicar APH como tecnología de preservación en duraznos mínimamente procesados, comprobándose los beneficios de la misma sobre la calidad y la extensión de la vida útil del producto. De igual manera, se demostró la gran capacidad de las APH, en combinación con las estrategias de preservación adecuadas (ácidos orgánicos, envasado al vacío y almacenamiento refrigerado), para preservar los principales parámetros asociados al color y a la textura del producto final. Mediante la combinación propuesta, principalmente la asociación de APH con el envasado al vacío, se pudo conservar al producto por al menos 21 días bajo almacenamiento refrigerado (10°C), con solamente alteraciones menores, tales como la traslucidez de los tejidos.

En este capítulo pudo comprobarse además que el envasado al vacío, una tecnología altamente eficiente para garantizar la ausencia de oxígeno dentro del envase, aunque muy poco utilizada en este tipo de productos, contribuyó de manera positiva a la preservación del color, al favorecer la inhibición del pardeamiento enzimático del producto.

Desde el punto de vista bioquímico, se comprobó que las APH prevenían el desarrollo de un metabolismo fermentativo, que de otra manera hubiera sido inducido por el envasado al vacío.

3.2 Resultados y Discusión-Capítulo 1

Este efecto fue evidenciado por las bajas concentraciones de etanol encontradas en las muestras presurizadas durante todo el almacenamiento.

3.3 Capítulo II

**Optimización del tratamiento de APH
para la preservación de duraznos
mínimamente procesados**

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

3.3.1 Introducción

Los resultados obtenidos en los primeros ensayos demostraron la factibilidad de aplicación de la tecnología de APH para productos mínimamente procesados a base de frutas, ofreciendo una promisorio alternativa “no-térmica” para la extensión de la vida útil de este tipo de productos. La gran ventaja de esta tecnología es su capacidad de causar un efecto similar a una pasteurización sin la necesidad de aplicar un tratamiento térmico, por lo cual muchos de los compuestos beneficiosos para la calidad del producto, tales como pigmentos, volátiles y vitaminas, no se alteran luego de su aplicación (Oms Oliu y col., 2012).

Sin embargo, la tecnología de APH utilizada para preservar frutas mínimamente procesadas presenta también algunos obstáculos que podrían, en algunos casos, limitar su aplicabilidad. Uno de estos obstáculos está representado por la baroresistencia de la PPO, la cual fue comprobada en el ensayo preliminar. Consecuentemente, las reacciones de pardeamiento enzimático no pueden ser totalmente controladas, lo que hace necesaria la combinación de las APH con otras tecnologías, tales como el envasado en películas con propiedades de barrera, que limiten el contacto del oxígeno con el producto. Como fuera observado previamente, esta combinación logró prevenir de forma exitosa el pardeamiento enzimático, evitando durante el almacenamiento el acceso del oxígeno al interior del envase, junto con la inhibición parcial de la PPO por efecto de las APH, lo cual favorecería la inalterabilidad del producto una vez abierto el envase. Se ha informado en estudios previos que esta estrategia puede ser de utilidad para mantener el color del producto por varias horas luego de la exposición a una atmósfera normal (Perera y col., 2010).

Se ha mencionado también que debido a la anaerobiosis generada dentro de los envases, resulta riesgoso el uso de vacío para envasar tejidos vivos, dado que esta condición puede inducir un metabolismo fermentativo. Aunque la literatura sobre el efecto de las APH en el desarrollo de un metabolismo fermentativo es escasa, algunos estudios sugieren que la aplicación de esta tecnología inmediatamente luego de la generación de vacío en el envase puede prevenir este problema. Entre estos estudios, Trejo Araya y col. (2009) encontraron que, la aplicación de APH en zanahorias crudas envasadas bajo vacío, puede prevenir la acumulación de productos de la fermentación tales como etanol y ácido acético luego de 14 días de almacenamiento. En el presente trabajo de tesis, se comprobó que la acumulación de etanol en duraznos mínimamente

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

procesados almacenados a 10°C puede prevenirse durante al menos 21 días mediante un tratamiento por APH (Denoya y col., 2015).

Desde un punto de vista textural, uno de los problemas asociados a la aplicación de APH es que debido a la utilización de niveles de presión muy altos, esta tecnología puede provocar disrupciones celulares, aumentando la permeabilidad de las células de frutas y vegetales y permitiendo el movimiento de agua y metabolitos a través de la célula. Como consecuencia, sustratos y enzimas que están compartimentalizadas en las células intactas pueden liberarse, lo cual favorece su interacción y el desarrollo de alteraciones tales como el pardeamiento. Se ha comprobado que en tejidos firmes que presentan bajos niveles de aire atrapado (ej. coliflor), la textura se mantiene casi inalterada luego de la aplicación de APH, aunque este tipo de tratamiento puede provocar alteraciones tales como la inducción de una apariencia aguachenta (Préstamo y Arroyo, 1998).

Considerando el gran número de factores que pueden afectar el resultado final de la aplicación de las APH, y que pueden ser difíciles de prever, resulta evidente la necesidad de optimizar las condiciones de aplicación de las APH, especialmente en alimentos complejos como frutas y hortalizas frescas. En este sentido, para maximizar la calidad del producto final, diversas variables de respuesta deben monitorearse y ajustarse de acuerdo a un estándar deseable a ser obtenido. Este proceso resulta a veces complejo ya que en muchos casos, la mejora en una de las variables puede tener efectos negativos sobre otras.

Dada la complejidad del proceso de optimización de las variables que permitan maximizar la calidad del producto final, el monitoreo y ajuste de datos requiere de herramientas matemáticas y estadísticas para el análisis de estos datos y la predicción del comportamiento de los procesos. En el presente estudio se utilizaron diferentes estrategias para manejar esta situación. En primer lugar se realizó una Regresión Linear Múltiple para establecer la relación entre las condiciones de proceso y las principales variables de respuesta asociadas a la calidad del producto. Además se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA), el cual fue diseñado para evaluar la influencia de los parámetros de proceso sobre el color, la textura y la actividad de enzimas. Otra de las estrategias consistió en la utilización de la metodología de superficies de respuesta (SRM) y de la llamada función *desirability* para condensar todas esas respuestas en un solo valor, y sacar las conclusiones respectivas sobre el modelo obtenido. El estudio se complementó con la

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

observación mediante microscopía, del efecto de los distintos tratamientos sobre los tejidos, lo cual permitió sacar conclusiones más directas y validar las interpretaciones teóricas.

De esta forma, mediante las herramientas de optimización se estudiaron las principales variables de proceso (nivel de presión y tiempo de mantenimiento), asociadas a la aplicación del tratamiento de APH en duraznos mínimamente procesados. El objetivo general de este capítulo fue establecer las mejores condiciones del procesamiento por APH capaces de inactivar las enzimas relacionadas al deterioro, preservando al mismo tiempo la textura y el color del producto final. Para monitorear el efecto de los tratamientos se estudió la actividad de dos enzimas, consideradas como marcadores bioquímicos de los principales procesos de alteración: la PPO (la principal enzima que cataliza el pardeamiento) y la ADH (una enzima relacionada con la inducción de la fermentación bajo condiciones anaeróbicas).

3.3.2 Resultados

La tabla 9 muestra los coeficientes de regresión lineal múltiple obtenidos mediante análisis de variancia. Este estudio permite relacionar al nivel de presión y al tiempo de mantenimiento del tratamiento de APH, definidos como variables independientes, con seis variables de respuesta ($\Delta a^*/\text{min}$, dureza, masticabilidad, deformación al aplicar una fuerza de 5 N, % actividad PPO, % actividad ADH). También se indican, en la última fila, los coeficientes de determinación (R^2) para cada ecuación. Estos valores dan una idea del grado de ajuste del modelo y refieren también al grado de variabilidad considerado por el análisis de regresión en las variables dependientes (Sin y col., 2006). Las ecuaciones obtenidas para cada variable respuesta explican adecuadamente la variación del modelo ($R^2 > 0,8$), aunque varios coeficientes de regresión fueron no significativos al nivel de 5%.

Tabla 9 Coeficientes de regresión y valores de R^2 para seis variables de respuesta de duraznos mínimamente procesados, en función de las condiciones del proceso de APH

Coeficientes de regresión	$\Delta a^*/\text{min}$	Dureza (N)	Masticabilidad (N)	Deformación a los 5 N (mm)	%Act. PPO	%Act. ADH
b_0	0,0365*	37,65*	15,91*	1,182*	47,08*	51,58*
b_1	-0,006*	-2,34	-0,94	0,137*	-12,72*	-13,11*
b_2	-0,001	-14,64*	-5,78*	0,131	-6,12	-2,07
b_1^2	-0,002	-1,44	-1,06	0,008	2,44	-9,09
b_2^2	0,004	10,33	1,76	-0,399*	7,72	9,68
b_{12}	-0,004	3,11	0,88	-0,048	-4,36	2,72
R^2	0,863	0,905	0,895	0,958	0,936	0,891

Subíndices 1=Nivel de presión 2=Tiempo de mantenimiento

*Significancia al nivel de 0,05.

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

3.3.2.1 *Parámetros cromáticos*

En el presente capítulo se determinaron los parámetros cromáticos ($L^*a^*b^*$) de las muestras inmediatamente luego de abrir los envases, no observándose diferencias significativas ($p>0,05$) entre ninguno de los tratamientos (datos no mostrados).

Los coeficientes de regresión para $\Delta a^*/\text{min}$ fueron estimados por análisis de regresión lineal múltiple (tabla 9). Los resultados muestran que, luego de 180 min de exposición al aire, las muestras sometidas a los tratamientos con los niveles más bajos de presión eran las que presentaban una mayor variación de a^* . Esto se vio reflejado por el coeficiente significativo ($p<0,05$) de regresión para el nivel de presión, el cual fue negativo. Este signo estaría indicando que los mayores niveles de presión serían más efectivos para inhibir las reacciones de pardeamiento.

3.3.2.2 *Análisis de perfil de textura (TPA)*

En la tabla 9 se observan los coeficientes de regresión obtenidos para los parámetros dureza y masticabilidad. Los valores obtenidos para el parámetro cohesividad en los distintos tratamientos estuvieron en un rango de entre 0,50 y 0,59, mientras que, para elasticidad el rango estuvo comprendido entre 0,67 y 0,71. Estos parámetros no presentaron diferencias significativas ($p<0,05$) entre tratamientos.

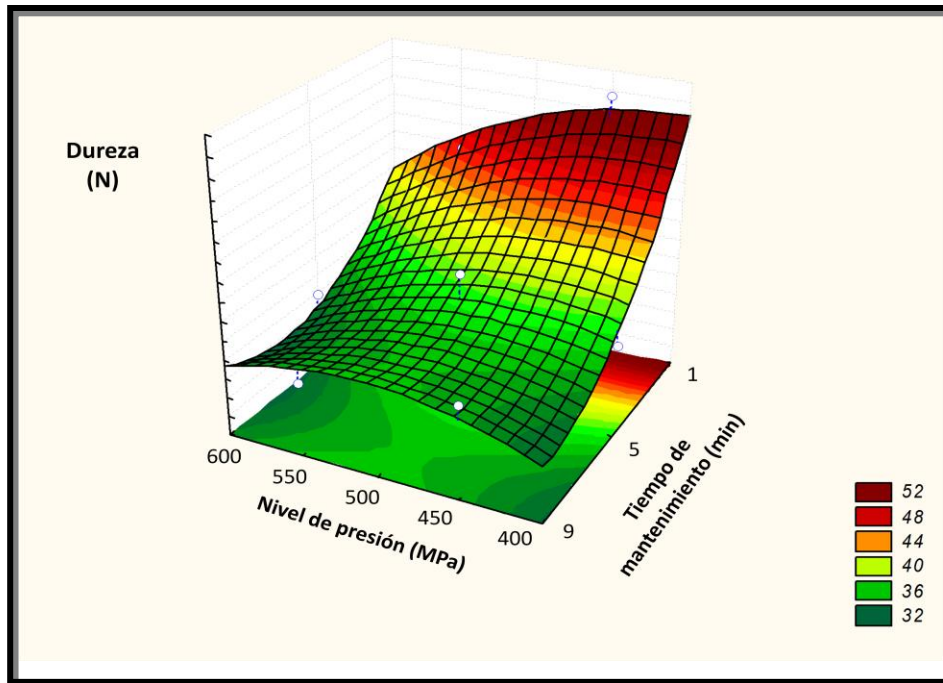


Fig. 19 Efecto del nivel de presión ($P= 400\text{-}600$ MPa) y tiempo de mantenimiento ($t=1\text{-}9$ min) en los valores de dureza correspondientes a cilindros de durazno mínimamente procesados. Valores experimentales (-o-)

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

En el caso de dureza y masticabilidad, se encontró una correlación negativa con el tiempo de mantenimiento para ambos parámetros (tabla 9), lo que indicaría que los tratamientos más largos son los que más afectan la textura de las muestras, disminuyendo los valores de esos parámetros. Los valores obtenidos se ajustaron a una superficie de respuesta (la falta de ajuste fue no significativa a $p=0,05$) considerando al nivel de presión y al tiempo de mantenimiento como variables independientes y al parámetro dureza como variable respuesta (fig. 19).

Del análisis de los resultados surge que para el rango estudiado (400-600 MPa), el nivel de presión no tuvo efecto sobre ninguno de los parámetros de textura, lo que se vio reflejado en la falta de significancia del coeficiente de regresión ($p>0,05$).

La tabla 9 muestra también los coeficientes de regresión para el parámetro denominado “Distancia a 5N”, el cual representa básicamente el desplazamiento de la sonda de medición cuando se imparte al tejido una fuerza de 5N y da una idea de la deformación sufrida por la fruta al aplicarle esa fuerza. El nivel de presión tuvo un efecto apreciable sobre la deformación y esto se reflejó en un coeficiente de regresión estadísticamente significativo ($p<0.05$) y positivo.

3.3.2.3 *Microscopía óptica*

La textura de un alimento es una característica sensorial cuya evaluación integral resultaría muy dificultosa mediante una sola determinación instrumental dada su alta complejidad. En este sentido, uno de los grandes desafíos actuales es la comprensión de la relación existente entre textura y estructura. Lo cual permitirá mejorar y optimizar las características texturales de los productos (Alzamora y col., 1997).

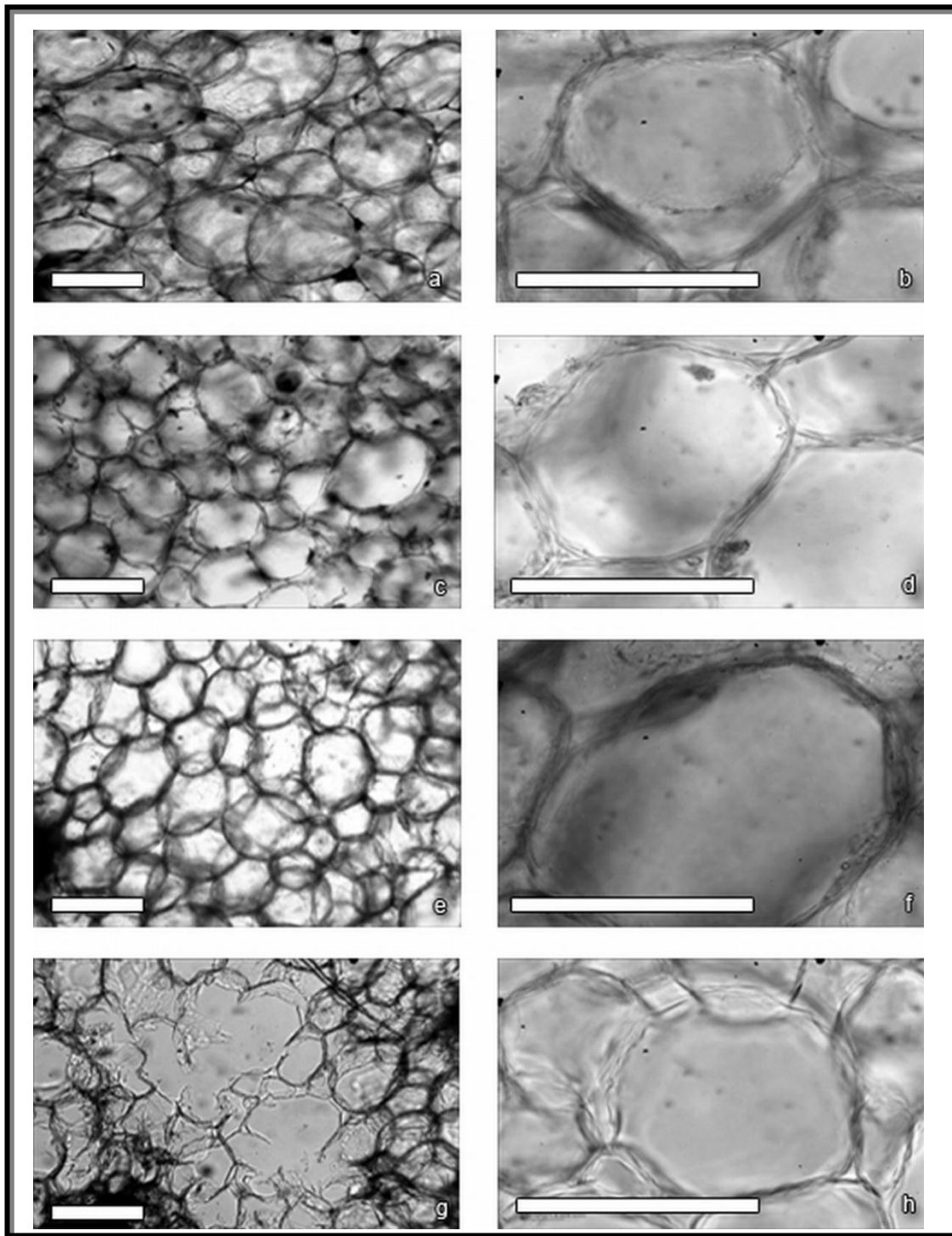


Fig. 20 Observaciones con microscopio óptico (campo claro), cortes a mano alzada. a, b, Parénquima de mesocarpo de durazno fresco (control) c, d; tejido parenquimático de cilindros de durazno tratados con una presión de 500 MPa por 5 min; e, f, tejido parenquimático de cilindros de durazno tratados con una presión de 600 MPa por 5 min; g, h, tejido parenquimático de cilindros de durazno tratados con una presión de 550 MPa por 9 min (tiempo de mantenimiento más largo). Barras blancas: 100 μ m. En tejido de durazno fresco (a, b) se puede distinguir la microestructura celular intacta. En tejido presurizado (c-h) se puede observar que la lisis de las membranas inducida por el proceso provocó a su vez la desorganización del citoplasma. En los tratamientos más largos (9 min, g y h), se evidenció la ruptura de las paredes celulares, una disminución del contacto célula-célula y el colapso de la estructura de la célula.

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

Las micrografías de la figura 20 muestran el tejido parenquimático de mesocarpo de duraznos sometidos a distintas condiciones: duraznos frescos no tratados (a y b), sometidos durante 5 min a 500 MPa (c y d) y 600 MPa (e y f) que son tratamientos de APH con diferentes niveles de presión, o presurizados con un tiempo de mantenimiento mayor (9 min) a 550 MPa (g y h).

Si bien mediante microscopía óptica no es posible la observación directa del estado de las membranas (campo claro), esta técnica permite sacar conclusiones sobre el aspecto general de los tejidos. Así, en duraznos frescos (control), se observa que la integridad celular está bien preservada, con células que presentan un buen estado de turgencia, además de la presencia de cromoplastos y vacuola, lo cual sugiere que las membranas permanecieron intactas (Figura 20-b). Por el contrario, los tejidos sometidos a un tratamiento de APH de 5 min (Fig. 20 c-f), sufrieron la ruptura del plasmalema, provocando la plasmólisis celular y la consiguiente desorganización del citoplasma, con la aglomeración de las organelas y del contenido citoplasmático. Cuando las muestras se trataron con presiones de 550 MPa por 9 min, las paredes celulares se destruyeron parcialmente, llevando la pérdida del contenido celular a la formación de espacios intercelulares lisígenos en algunos sectores del tejido (Fig. 20 g-h).

3.3.2.4 *Actividad PPO*

Mediante la aplicación de análisis de regresión lineal múltiple, se estimaron los coeficientes de regresión para el porcentaje de inhibición de la PPO (calculada como la tasa de actividad relativa a la actividad de esta enzima en la materia prima sin tratar y expresada como % en la tabla 9). Los valores de inhibición de esta enzima para los diferentes tratamientos se situaron en el rango entre 38% y 62%. Los resultados muestran que, independientemente del tiempo de mantenimiento de la presión en cada tratamiento, la inactivación de la PPO fue más efectiva para los mayores niveles de presión, lo cual se vio reflejado en el coeficiente de regresión negativo ($p < 0,05$). En consecuencia, para el rango de presión considerado en este estudio (400-600 MPa), el incremento en el nivel de presión resultó en la disminución del porcentaje de actividad PPO. Esto también se observa claramente en la superficie de respuesta de la fig. 21 (Falta de ajuste no significativa, $p = 0,05$) obtenida considerando como variables independientes al nivel de presión y al tiempo de mantenimiento de la presión, y como variable de respuesta al % de actividad PPO.

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

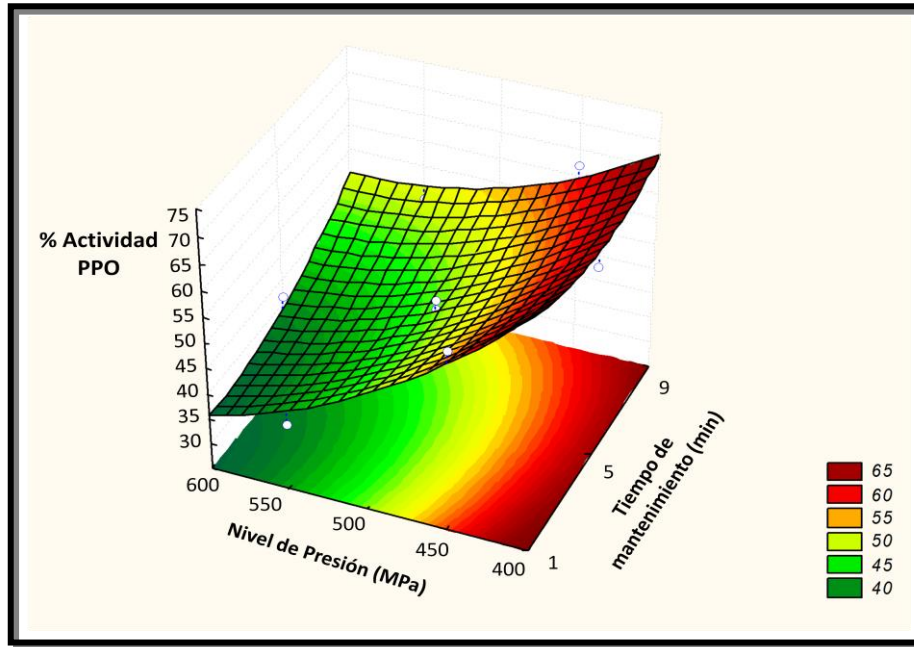


Fig. 21 Efecto del nivel de presión (P= 400-600 MPa) y tiempo de mantenimiento (t=1-9 min) sobre los valores de % actividad PPO en los cilindros de durazno mínimamente procesados. Valores experimentales (-o-)

3.3.2.5 Actividad ADH

La determinación de la actividad remanente ADH (enzima que interviene en una reacción clave del metabolismo fermentativo) luego de la aplicación de los tratamientos permite evaluar el efecto de los diferentes parámetros de proceso (nivel de presión y tiempo de mantenimiento) sobre la inactivación de esta enzima. La tabla 9 muestra los coeficientes de regresión para el porcentaje de disminución de la actividad ADH (calculados como la tasa de actividad relativa a la actividad de esta enzima en la materia prima sin tratar y expresada como %).

Los valores de inactivación correspondientes a los diferentes tratamientos estuvieron comprendidos en el rango entre 40 y 90%. Los resultados muestran que para los mayores niveles de presión, hubo mayor inhibición de la ADH, independientemente del tiempo de mantenimiento de la presión de cada tratamiento. Esto se refleja en un coeficiente de regresión negativo para el porcentaje de actividad versus el nivel de presión, el cual fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) para el rango de presiones evaluado (400-600 MPa). Lo mismo puede observarse en la superficie de respuesta de la figura 22 considerando como variables independientes al nivel de presión y al tiempo de mantenimiento, y como variable de respuesta al % de actividad ADH (falta de ajuste no significativa para $p = 0,05$).

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

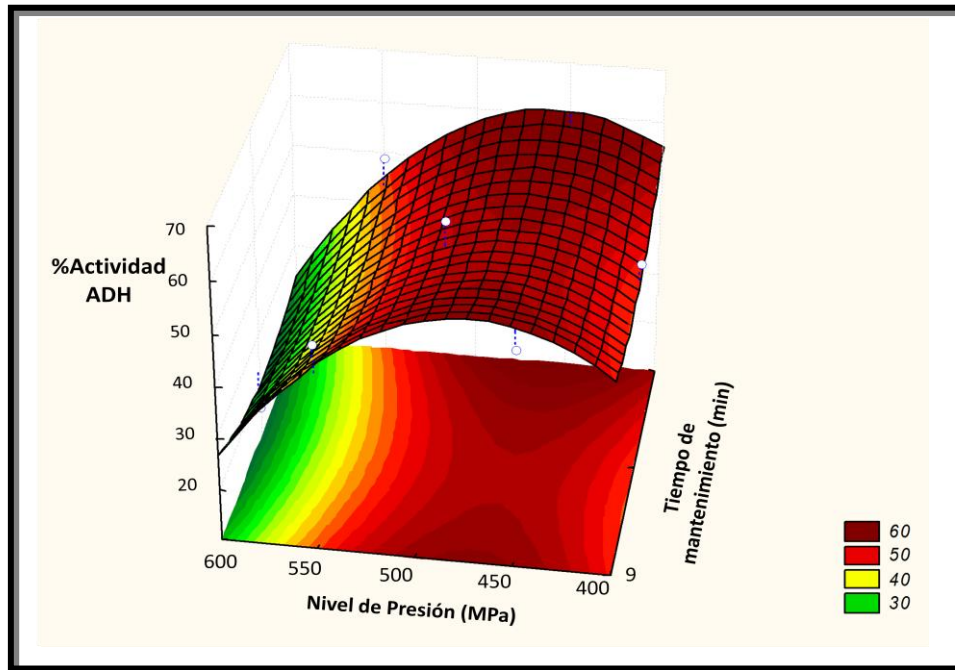


Fig. 22 Efecto del nivel de presión (P= 400-600 MPa) y tiempo de mantenimiento (t=1-9 min) sobre los valores de % actividad ADH en cilindros de durazno mínimamente procesados. Valores experimentales (-o-)

3.3.2.6 *Análisis de componentes principales (PCA)*

Como fuera mencionado anteriormente, como parte de la estrategia de optimización de los tratamientos se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA), el cual permitió describir el comportamiento de todas las variables dependientes estudiadas en conjunto y, en base a esta información, seleccionar el tratamiento de APH más adecuado para preservar al producto final. Las variables incluidas en este análisis explicaron el 86,34% de la variabilidad total observada en el modelo. Dentro de las componentes individuales, la primera de ellas (PC1), explicó el 59,78% de la variancia del modelo, con una correlación positiva con las variables: dureza, masticabilidad, actividad ADH y PPO, mientras que, la segunda componente (PC2), explicó un 26,56% de la variancia, con una correlación positiva con la variación del parámetro a^* de color luego de 180 min de exposición al aire del producto ($\Delta a^*/\text{min}$) (Tabla 10).

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

Tabla 10 Análisis de los valores *Eigen* de la matriz de correlación de las componentes principales

Variables	Componentes	
	1	2
Δa^* /min	.675	.707
% Actividad ADH (U/g Fruta)	.752	.482
% Actividad PPO (U/g Fruta)	.783	.071
Dureza (N)	.818	-.550
Masticabilidad (N)	.829	-.538

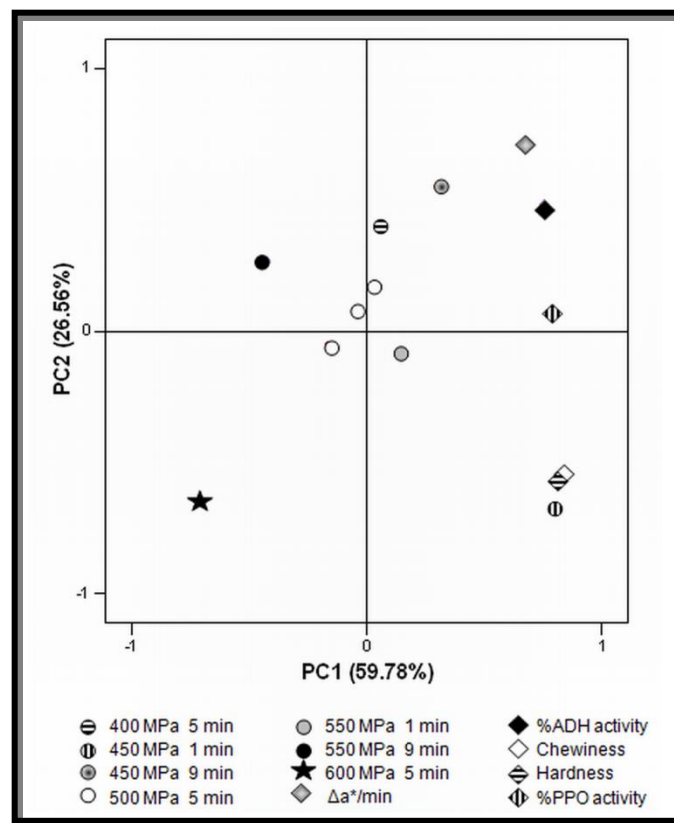


Fig. 23 Gráfico Biplot de dos componentes principales: Los tratamientos y las variables están representados con círculos y diamantes, respectivamente. El tratamiento sugerido como óptimo por el análisis es el representado por una estrella.

La figura 23 muestra el gráfico de *Biplot*, el cual permitió ubicar a los distintos tratamientos en función de las componentes definidas en el análisis PCA. La primer componente (PC1), graficada en el eje X, estaría indicando que los tratamientos en el lado derecho del *Biplot* presentarían una mayor actividad enzimática y mayores valores de dureza y masticabilidad, mientras que la segunda

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

componente (PC2), asignada al eje Y, estaría indicando que los tratamientos en el cuadrante de abajo presentarían una menor tendencia al pardeamiento al ser expuestos al aire (valores menores de $\Delta a^*/\text{min}$), así como mayores valores de dureza y masticabilidad. Aunque con la PC2 solo se explicó 26,56% de la variancia del modelo, es importante resaltar que la misma presentó un coeficiente negativo de correlación con los parámetros de textura, y un coeficiente de correlación positivo con la actividad de las enzimas PPO y ADH, y con el parámetro $\Delta a^*/\text{min}$. Por lo tanto, el tratamiento óptimo debería seleccionarse entre aquellos situados en el cuadrante inferior del *Biplot*, ya que esa posición estaría reflejando los menores valores de actividad enzimática (una inhibición más efectiva), y los mayores valores de dureza y masticabilidad. Por otra parte, el PC1 explicó un mayor porcentaje de la variancia del modelo (59,78%), con una correlación positiva con todas las variables, por lo que un tratamiento ubicado en el lado derecho del *Biplot* presentaría valores más adecuados de dureza y masticabilidad (valores mayores), aunque tendría el inconveniente de una mayor actividad de las enzimas alterantes y una mayor tendencia al pardeamiento (mayor valor de $\Delta a^*/\text{min}$). Teniendo en cuenta todo esto, el estudio permitió inferir que los tratamientos óptimos serían aquellos ubicados en el cuadrante inferior del *Biplot*, dado que PC2 condensó las características asociadas con una mejor calidad del producto (adecuada preservación del color y textura, y efectiva inactivación enzimática). En conclusión, el análisis por PCA sugirió que el tratamiento óptimo estaría determinado por un nivel de presión de 600 MPa y un tiempo de mantenimiento de 5 min (representado con una estrella en la figura 23). Esta información concuerda con los análisis previos realizados mediante superficies de respuesta, así como con las ecuaciones de regresión obtenidas para cada variable. Este último estudio sugería que los tratamientos con mayores niveles de presión permitían alcanzar mayores porcentajes de inactivación enzimática, sin efectos negativos significativos ($p > 0,05$) sobre los parámetros texturales. Por el contrario, tratamientos más largos tenían un efecto negativo ($p < 0,05$) sobre la dureza y la masticabilidad, sin mostrar una eficacia adecuada para la inactivación de enzimas.

3.3.2.7 Optimización utilizando la función *Desirability*

Los estudios de optimización de los tratamientos mediante Regresión Lineal Múltiple y PCA se complementaron mediante un método multi-respuesta que utiliza la función llamada *Desirability*, la cual permite optimizar los parámetros (nivel de presión y tiempo de mantenimiento) (Derringer y Suich, 1980). Básicamente, este método integra las ecuaciones de regresión obtenidas para cada variable con la transformación de cada variable respuesta (Y_i) en una función individual

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

(*desirability*, d_i) (Ec. 3 y 4) cuyos valores están comprendidos entre 0 y 1. De esta manera, si el valor de la respuesta se encuentra fuera de una región aceptable, se le asigna un valor de 0, mientras que si la respuesta se ajusta a lo deseable, se le asigna un valor de 1.

En el presente trabajo, la función *desirability* fue diseñada de forma tal de optimizar la inactivación de las enzimas relacionadas a alteraciones, manteniendo a su vez el color y la textura adecuados para el producto. Así, como objetivos de la optimización, se establecieron la maximización de la dureza y masticabilidad y la minimización de otros parámetros de interés como la deformación al aplicar una fuerza de 5N (lo cual se traduciría en minimizar la aparición de una textura tipo “gomosa”), el valor $\Delta a^*/\text{min}$ (traducido en minimizar el pardeamiento) y el % de actividad de las enzimas PPO y ADH.

Entonces, para las variables para las cuales el objetivo era maximizar su respuesta, se trabajó sobre la ecuación:

$$d_i = \frac{Y_i - Y_{\min}}{Y_{\max} - Y_{\min}} \quad (3)$$

Donde Y_{\min} es el valor mínimo de respuesta que tuvo la variable, e Y_{\max} es el valor respuesta máximo que alcanzó, utilizándose esta ecuación para dureza y masticabilidad.

En el caso de deformación luego de aplicar una fuerza de 5N, el parámetro $\Delta a^*/\text{min}$, y los porcentajes de actividad de las enzimas (% PPO y % ADH), se utilizó una función rediseñada, con el objetivo de definir como valores óptimos a los mínimos obtenidos de las respuestas para esas variables:

$$d_i = \frac{Y_{\max} - Y_i}{Y_{\max} - Y_{\min}} \quad (4)$$

De esta manera, las d_i s de las respuestas se combinaron en una única función llamada *desirability* general (D), la cual representa el promedio geométrico de las funciones *desirability* individuales (Ec. 5).

El valor D se maximizó luego utilizando el software STATISTICA.

$$D = (d_1, d_2, \dots, d_k)^{1/k} \quad (5)$$

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

Donde k es el número de variables. Entonces, como $0 \leq D \leq 1$, un valor cercano a 1 de D indica que todas las funciones *desirability* individuales se acercarán al valor deseable, y por lo tanto, el máximo de esa función será considerado como la solución óptima del sistema.

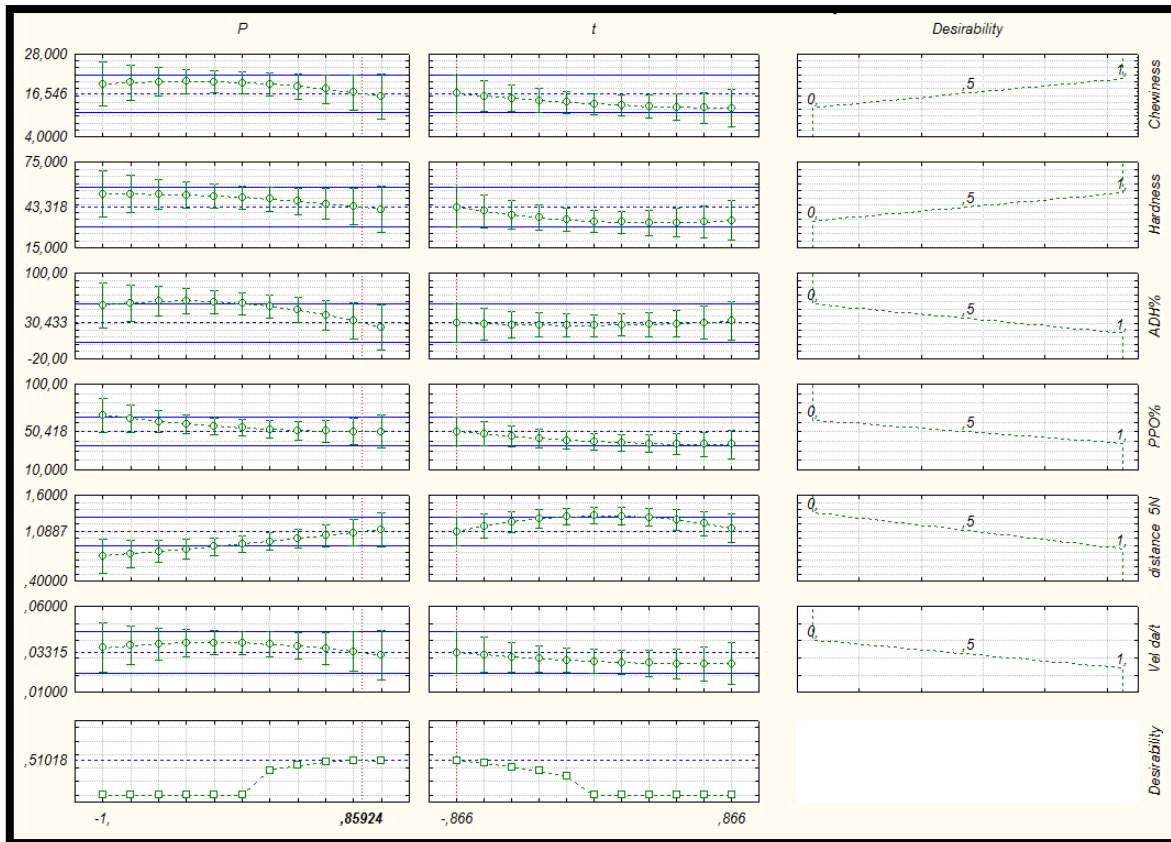


Fig. 24 Optimización simultánea de las condiciones del proceso por APH para durazos mínimamente procesados en función de las variables de proceso, variables de respuesta predichas y perfiles de la función *desirability*.

La fig. 24 muestra los gráficos de los perfiles predichos, obtenidos para cada variable respuesta (dureza, masticabilidad, deformación a los 5N -textura "tipo gomosa"-, $\Delta a^*/\text{min}$, % actividad PPO y % actividad ADH), junto con los respectivos perfiles de la función *desirability* para las variables de proceso incluidas en este estudio (nivel de presión y tiempo de mantenimiento).

Mediante el análisis de esta información, se pudo predecir que las condiciones de procesamiento óptimas (es decir, las que condujeron al valor máximo de la función *desirability* general -D- igual al valor 0,51) para la aplicación del tratamiento de APH, estarían representadas por la combinación de una presión de 585 MPa, aplicada durante 1 min. Esto conduciría a un producto con los siguientes valores predichos para las variables respuesta: 43,32 N para dureza, 16,55 N para masticabilidad, 30,43 % para actividad ADH, 50,42% para actividad PPO, 1,08 mm para deformación a 5N y 0,03 para el parámetro $\Delta a^*/\text{min}$.

3.3.3 Discusión

3.3.3.1 *Parámetros cromáticos*

Es sabido que la preservación del color en productos a base de frutas sometidas a procesamiento dependerá mayormente de la estabilidad de los pigmentos y de la inhibición de las enzimas relacionadas con el pardeamiento. Otro de los factores que tienen una estrecha relación con los cambios cromáticos del producto es el material de envasado, ya que las características del mismo (ej. la permeabilidad al oxígeno), pueden ser críticas para prevenir el desarrollo de las reacciones oxidativas (Perera y col., 2010). Considerando que el presente ensayo incluyó al envasado al vacío de los productos en films del tipo de alta barrera al oxígeno (muy baja permeabilidad), se atribuye a esta estrategia el hecho de que no se haya observado el desarrollo de pardeamiento enzimático. En conformidad con esto, los valores de los parámetros $L^*a^*b^*$ medidos inmediatamente después de abrir los envases se mantuvieron inalterados, para todos los tratamientos. Resultados similares fueron informados por Miguel-Pintado y col. (2013) en los parámetros L^* y a^* medidos en nectarinas tratadas con presiones entre 200 y 600 MPa por 3 min. Por otra parte, Boynton y col. (2002) trabajando con carambolas presurizadas, encontraron que independientemente del nivel de presión y de la duración del tratamiento, los parámetros de color se mantenían inalterados, lo cual es una evidencia de la estabilidad de los pigmentos a las APH (Oey y col., 2008).

La disminución en el valor del parámetro L^* ha sido propuesto en diversos trabajos como un indicador para medir el desarrollo del pardeamiento enzimático (Gorny y col. 1998; Rocha y Morais, 2003). Sin embargo, dado que en el presente ensayo la traslucidez causada por el envasado al vacío produjo una importante disminución del parámetro L^* , este criterio no se utilizó, ya que este fenómeno hubiera interferido con el análisis de resultados, como fuera también comprobado en el capítulo anterior.

Se ha visto que el parámetro a^* representa también otro indicador adecuado para evaluar el desarrollo de pardeamiento, dado que indica el carácter rojo-verde en ausencia del componente amarillo o azul. Así, los valores positivos corresponderán a tonos con mayor intensidad de rojo, mientras que valores negativos corresponderán a tonos con mayor intensidad de verde. El fundamento de su uso es que las reacciones de pardeamiento hacen que los tejidos adquieran un color más rojizo, lo que se verá reflejado en un aumento del valor de a^* . Un estudio profundo llevado a cabo por Rocha y Morais (2003) permitió establecer una correlación positiva entre este parámetro y la intensidad de la reacción de pardeamiento.

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

La capacidad de los tratamientos de APH para prevenir el pardeamiento en frutas ha sido informada en diversos trabajos llevados a cabo con otras especies. Entre ellos, Guerrero-Beltrán y col. (2004), observaron en puré de durazno tratado con tratamientos de entre 100 y 500 MPa, que el grado de prevención del pardeamiento era proporcional al nivel de presión aplicado. Palau y col. (1999) también observaron un comportamiento similar en puré de banana usando presiones de entre 500 y 700 MPa aplicadas durante 10 min.

Para el desarrollo de un tratamiento efectivo es aconsejable establecer previamente en la matriz del producto el nivel mínimo de presión requerido para lograr el resultado deseado, ya que se ha informado que en frutas como las manzanas, los tratamientos de presión en el rango de 200-600 MPa no fueron suficientes para prevenir el pardeamiento, aumentando incluso el grado de pardeamiento luego de una hora de almacenamiento a 22°C. Sin embargo, cuando el nivel de presión se incrementaba a 800 MPa, el pardeamiento era efectivamente prevenido tanto inmediatamente después del tratamiento como al cabo de 1 hora de exposición al aire (Gomes y Ledward, 1996).

3.3.3.2 *Análisis de perfil de textura (TPA)*

Considerando que es inevitable que la aplicación de niveles tan altos de presión sobre un tejido con las características estructurales de las frutas provoque algún grado de alteración en su textura, resulta necesaria una profunda evaluación de este efecto, a fin de evitar que el mismo tenga consecuencias negativas sobre la percepción de los consumidores. En este sentido, diversas investigaciones han sido focalizadas en el efecto de las APH sobre los parámetros texturales. Entre ellas, Kingsly y col. (2009-b) encontraron en ananá procesado, que la exposición a presiones de entre 100 y 700 MPa por 10 min no ocasionaba ningún efecto significativo sobre los parámetros del TPA como la cohesividad y la elasticidad.

En el presente ensayo, el tiempo de mantenimiento de la presión afectó de manera diferente a los parámetros dureza y masticabilidad, siendo los tratamientos más largos los que mostraron un efecto más importante. Este hallazgo es coincidente con lo informado por Park y col. (2013) en papas expuestas a APH, quienes encontraron que si bien el índice de crocancia (un parámetro textural obtenido por punción denominado "*crunchiness index*") no era afectado por el nivel de presión aplicado (entre 400 y 600 MPa), el mismo era afectado en forma importante por el tiempo al que estos productos se exponían a esos niveles de presión (en un rango de entre 1 y 10 min),

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

observándose que los tratamientos más prolongados provocaban una mayor disminución en este índice.

En el presente ensayo, el nivel de presión dentro del rango estudiado (400-600 MPa) no tuvo efecto sobre ninguno de los parámetros de textura incluidos en el TPA. Resultados similares se encontraron en mitades de durazno sometidas a presiones de entre 200 y 600 MPa por 3 min (Miguel-Pintado y col., 2013). Aparentemente, en ciertas frutas, el efecto del nivel de presión sobre la textura es altamente dependiente del rango de presión considerado. Así, en piezas de ananá, Rastogi y Niranján (1998) encontraron que para presiones entre 100 y 700 MPa, las pérdidas de textura se incrementaban con el aumento en el nivel de presión hasta los 300 MPa, no observándose ningún efecto adicional para niveles superiores a este valor. Notoriamente, un efecto similar, con el mismo valor umbral fue informado para zanahorias en un estudio realizado en un rango entre 100 y 700 MPa (Trejo Araya y col., 2007). Estos autores sugieren que este nivel de presión a partir del cual no hay mayor daño, dependería de la estructura de los productos, siendo que el mismo estaría relacionado con la máxima compresión a la que puede ser sometida el agua que contiene el producto, no pudiendo producirse en los tejidos ninguna deformación adicional por más que se apliquen presiones mayores.

Otro aspecto interesante que surge de este capítulo es la alta correlación positiva obtenida entre el parámetro “Distancia a 5N” y el nivel de presión. En ensayos preliminares realizados con la misma variedad de duraznos (cv. Flavorcrest), se había observado un desplazamiento de la sonda mayor en la fruta presurizada en comparación a la fruta sin presurizar. Esto indicaría que las APH imparten al tejido una especie de textura “gomosa”, dado que un valor mayor de este parámetro corresponde a un material más deformable con una menor integridad celular. El incremento en este parámetro debido a la exposición a presiones mayores se determinó también en otras especies, como zanahorias y nabo (Trejo Araya y col., 2007; Clariana y col., 2011). En un trabajo en el cual se analizaron las curvas de fuerza-deformación, pudo establecerse que el comportamiento inicial de cebollas tratadas con diferentes niveles de presión se correspondía con el de una estructura altamente viscoelástica (González y col., 2010-d).

3.3.3.3 *Microscopía óptica*

La observación de la estructura de los tejidos a nivel microscópico resulta altamente relevante para este tipo de estudio, ya que puede ofrecer información importante para entender la relación entre los tratamientos aplicados y los parámetros de calidad, especialmente la textura. De esta

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

forma, las imágenes de los duraznos tratados a 550 MPa por 9 min, siendo este el tratamiento más intenso de los estudiados, permiten observar la lisis de las membranas y paredes celulares, así como la formación de espacios lisígenos, lo cual podría estar relacionado con la menor dureza de las muestras tratadas con APH en comparación con las muestras control. Butz y col. (1994) también encontraron en cebollas tratadas a 300 MPa, que las vacuolas de las células epidérmicas se dañaban con severidad, perdiéndose completamente los componentes celulares. Boynton y col. (2002) sugieren que la pérdida de textura observada en fruta presurizada puede estar relacionada con la reducción de la turgencia de las células, ocasionada precisamente por la disrupción de las membranas. Según San Martín y col. (2002), la ruptura de las membranas producida como consecuencia de la exposición a altas presiones podría ser una consecuencia de la disminución de la fluidez de las mismas, resultante a su vez de su estado en fase de transición.

Préstamo y Arroyo (1998) consideran que los tratamientos de APH pueden provocar en tejidos vegetales, además de la disrupción de membranas celulares, la desnaturalización de proteínas como las ATPasas. Estas proteínas tienen un efecto directo en regular el turgor de la célula, dado que están localizadas en la membrana plasmática y proveen energía a la célula transfiriendo iones Na^+ y K^+ a lo largo de la misma. En consecuencia, las ATPasas pueden causar el hinchamiento o encogimiento de las células a través de la regulación de las fuerzas osmóticas, por lo que la aplicación de un tratamiento de APH puede alterar el tránsito de H^+ a través de las ATPasas, disminuyendo la fluidez de la membrana. Según Kato y col. (2002) la severa alteración de la estructura de la membrana sería la consecuencia del efecto conjunto de la desnaturalización irreversible de proteínas y la fragmentación de la bicapa lipídica, verificándose este efecto a presiones de 220 MPa o superiores.

Es probable que el cambio en la permeabilidad celular debido a la exposición de un tejido a APH induzca el movimiento de agua a través de la célula, el cual a nivel macroscópico se evidenciaría por una apariencia aguachenta o traslúcida, como la que pudo observarse en el presente trabajo en las muestras presurizadas. Es notorio el hecho de que, aunque las membranas de los duraznos se vieron claramente afectadas por la presión, las paredes celulares hayan sido capaces de soportar un tratamiento de hasta 5 min (Fig. 20 c-f). Resultados similares se obtuvieron en tejidos de cebolla sujetos a presiones de entre 300 y 600 MPa, en donde se observó la pérdida de integridad de las membranas de las vacuolas, aunque las paredes celulares se mantuvieron intactas. En este sentido, el daño sufrido por las membranas, lo cual se tradujo en un producto

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

más deformable y menos dúctil que las muestras sin tratar, se relacionó con el cambio de textura experimentado por los tejidos al ser expuestos a las altas presiones (González y col., 2010-d).

Otras alteraciones observadas en el presente trabajo en los tejidos sometidos a los tratamientos más prolongados (9 min), fueron: la ruptura de las paredes celulares, la aparición de espacios lisígenos, la disminución del contacto célula-célula, y el colapso de la estructura celular (Fig. 20 g, h). En este sentido, Norton y Sun (2008) sugieren que la firmeza y la turgencia del tejido vegetal pueden perderse por los efectos del tratamiento, como la ruptura ocasionada a las paredes celulares. Por su parte, Rastogi (2009) considera que alteraciones como el plegamiento y deformación de estas paredes pueden eventualmente afectar muchas de las propiedades texturales del tejido.

Desde el punto de vista físico, se ha comprobado que la aplicación de las APH en frutas y hortalizas puede alterar la morfología de los tejidos y provocar cambios en las organelas celulares y las membranas (Norton y Sun, 2008), lo cual fue confirmado en el presente trabajo en todas las muestras presurizadas. Otro aspecto interesante fue el hallazgo de la relación existente entre el daño sufrido por la microestructura y el comportamiento de las muestras de durazno en el TPA. Resulta interesante destacar que cuanto más largo fue el tiempo de mantenimiento de los tratamientos de APH aplicados, mayor resultó la pérdida textural de las muestras, lo cual se reflejó en valores más bajos de dureza y masticabilidad.

Un hallazgo interesante fue que el nivel de presión no tuvo un impacto significativo ($p > 0,05$) en los parámetros de textura. De hecho, el efecto sobre la microestructura se correlacionó con lo observado en los parámetros de textura, siendo que el mayor daño en la microestructura se produjo en la fruta tratada con el tiempo de mantenimiento más largo (9 min), el cual provocó alteraciones en las paredes celulares del tejido parenquimático. Contrariamente, en la fruta sometida a tratamientos de APH por 5 min, no se observó ningún daño en las paredes celulares, independientemente del nivel de presión aplicado. Puede concluirse, por lo tanto, que los tratamientos más prolongados provocarán mayores daños texturales y mayores cambios en la microestructura de los tejidos, por lo que la duración de los tratamientos debe ser cuidadosamente establecida.

3.3.3.4 *Actividad PPO*

Uno de los beneficios potenciales que pueden ofrecer las APH es la capacidad de prevenir el desarrollo de reacciones alterantes, sin afectar los aspectos benéficos nutricionales y sensoriales

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

de las frutas y hortalizas, como el contenido de vitaminas, antioxidantes, compuestos aromáticos, etc. En este sentido, el presente capítulo evidenció que los tratamientos de APH aplicados a temperatura ambiente son capaces de disminuir la actividad de la enzima PPO, y en consecuencia contribuir a la prevención del desarrollo de pardeamiento enzimático. En relación al establecimiento de la intensidad del tratamiento a aplicar, es de gran importancia la información generada, en cuanto a que para el rango de presiones (400-600 MPa) y tiempos de mantenimiento (1-9 min) estudiados, el aumento en el nivel de presión tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de inactivación alcanzado, mientras que un aumento en el tiempo de mantenimiento de la presión no provocó cambios importantes en la actividad de la enzima.

Existen numerosos trabajos realizados en diferentes tejidos vegetales, en los cuales se estudiaron las condiciones de tratamiento requeridas para la inactivación de la PPO. Entre ellos, López-Malo y col. (1998) informaron que en puré de palta, el nivel de presión (en un rango entre 300 y 689 MPa) tuvo un efecto significativo en la actividad PPO residual, independientemente de la duración del tratamiento. Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas (2004) encontraron que en un rango entre 100 y 500 MPa, a mayor nivel de presión, mayor era la efectividad del tratamiento para inactivar esta enzima en puré de durazno, mientras que a partir de un determinado nivel de presión, la efectividad no se incrementaba significativamente con el aumento en la duración del tratamiento. Por ejemplo, estos autores reportaron que a 517 MPa, un aumento en el tiempo de mantenimiento de 5 a 25 min provocaba solamente un aumento en el porcentaje de inhibición alcanzado del 81,5 al 95,1%. En puré de mango, la aplicación de un tratamiento de 550 MPa fue más efectivo sobre la enzima que niveles de presión menores (Guerrero-Beltrán y col., 2006). En el caso de uvas, Rapeanu y col. (2005) también observaron que la inactivación de la enzima era altamente dependiente del nivel de presión. Estos autores obtuvieron 75% de inactivación con un tratamiento de 800 MPa, mientras que al aplicar un tratamiento de 600 MPa (considerado el umbral para obtener algún efecto sobre la PPO en este tipo de producto) la disminución en la actividad fue de solamente un 20%.

Habida cuenta de que por la aplicación de APH se logra solo una inhibición parcial de la PPO, resulta evidente la necesidad de complementar al tratamiento de APH con algún otro factor de inhibición. Así, Kingsly y col., 2009-a proponen para la inactivación de la PPO en la elaboración de rodajas de durazno deshidratadas una combinación de un pre-tratamiento por inmersión en 1% de ácido cítrico seguido del tratamiento de APH a una presión de 300 MPa. En el presente trabajo, el

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

pre-tratamiento aplicado mediante inmersión en la solución de ácido cítrico y ácido ascórbico jugaron seguramente un rol importante para prevenir el pardeamiento enzimático del producto.

Es interesante el hecho de que la velocidad de cambio en el color debido al pardeamiento enzimático luego de 180 min de exposición al aire (expresada como $\Delta a^*/\text{min}$) haya tenido un comportamiento similar al de la inactivación de la PPO. Correlacionando ese parámetro con el nivel de presión, se obtuvo un coeficiente de regresión negativo y estadísticamente significativo ($p < 0,05$), lo que evidencia la estrecha relación entre la actividad PPO remanente y el grado de pardeamiento.

3.3.3.5 *Actividad ADH*

Uno de los hallazgos más significativos del presente capítulo fue el hecho de que en el rango de presión estudiado (400-600 MPa), un incremento en el nivel de presión resultara en una disminución en la actividad ADH. Este aspecto resulta altamente relevante considerando que hasta la fecha existen muy pocos estudios en los cuales se haya evaluado el efecto de los tratamientos de APH sobre la enzima ADH, sobre todo en productos en donde esta enzima tiene una gran importancia como es el caso de las frutas. Entre las investigaciones realizadas en otro tipo de organismos, Dallet y Legoy (1996) encontraron en levaduras que la ADH era menos resistente a las APH que otro tipo de enzimas, alcanzando 28% y 62% de inactivación con tan solo 5 min de tratamiento a 50 y 150 MPa respectivamente. Aparentemente, para niveles de presión menores a 200 MPa, la inactivación es la consecuencia del reordenamiento de los monómeros de la enzima, los cuales generan una forma polimérica inactiva. A presiones mayores a 200 MPa y tiempos largos de mantenimiento, es probable que directamente ocurra la inactivación por desnaturalización de la enzima. Sin embargo, es importante considerar que según algunos autores, bajos niveles de presión (<100 MPa) aplicados a enzimas de la familia de las deshidrogenasas resultan en algunos casos en la activación de las mismas (Eisenmenger y Reyes-De-Corcuera, 2009). Posiblemente, esto suceda debido al efecto que ejerce la presión, evitando las reacciones que aumenten el volumen del sistema, como sería el caso de la desnaturalización de estas enzimas. Evidentemente, al trabajar con presiones marcadamente mayores como las utilizadas en el presente ensayo (400-600 MPa), esta situación sería sobrepasada, resultando en la inactivación de la enzima.

3.3.3.6 Optimización

La optimización realizada a través de la estimación de las variables de proceso capaces de producir los efectos deseados en el producto final constituye un importante aporte a nivel práctico, para la difusión comercial de esta tecnología. En este sentido, la función *desirability* ha sido utilizada previamente con éxito por otros autores para la optimización de procesos de desarrollo de alimentos, habiendo mostrado su capacidad para establecer satisfactoriamente las condiciones de procesamiento óptimas en procesos industriales, como la producción de films a partir de bananas, o para determinar las variables más adecuadas para un proceso de secado (Pelissari y col., 2013; Rouissi y col., 2013).

Es auspicioso el hecho de que los resultados obtenidos mediante la aplicación de esta función en el presente ensayo hayan sido comparables a los obtenidos con el PCA, el cual indicaba que entre las condiciones de proceso ensayadas, la mejor combinación de las mismas estaba representada por el mayor nivel de presión (600 MPa), aplicado por un tiempo relativamente corto (5 min). Mediante el análisis predictivo realizado con la función *desirability* se consiguió extrapolar las mejores condiciones, estimándose que el tratamiento óptimo sería la combinación de un nivel de presión relativamente alto, aplicado durante un corto tiempo (585 MPa- 1 min).

Este tipo de estudio predictivo para la optimización de tratamiento resulta altamente promisorio para el trabajo en el desarrollo de procesos, y encuentra en la actualidad cada vez más aplicaciones a nivel industrial.

3.3.4 Conclusiones

El trabajo llevado a cabo en este capítulo permitió generar información relevante relacionada con el efecto de distintas combinaciones nivel de presión-tiempo de mantenimiento (en el rango de presiones de 400-600 MPa, aplicados por entre 1 y 9 min) sobre distintas variables asociadas a la calidad y al desarrollo de alteraciones en duraznos mínimamente procesados. Mediante esta información, fue posible determinar las condiciones óptimas de aplicación de los tratamientos de APH para evitar de manera efectiva dichas alteraciones. Los resultados probaron que independientemente del nivel de presión, la prolongación del tiempo de aplicación del tratamiento lleva a un mayor nivel de daño. Esto se vio reflejado especialmente en algunos parámetros texturales (dureza y masticabilidad) y se corroboró mediante la observación microscópica de la estructura, la cual evidenció que los tratamientos más largos provocaban la ruptura de las paredes celulares, la alteración del contacto entre células y el colapso de la

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

estructura celular. Por el contrario, en los tratamientos más cortos, el efecto sobre la microestructura fue menor, no alterándose de manera significativa las paredes celulares. Además, aunque se evidenció mediante el análisis instrumental que a todos los niveles de presión ensayados, las APH tornaban a los duraznos más sensibles a la deformación mecánica que los mismos frutos sin presurizar, con las condiciones optimizadas del tratamiento de APH se consiguió que la mayoría de los parámetros texturales del TPA se mantuvieran inalterados.

Los cambios en el parámetro de color a^* (atribuibles al pardeamiento enzimático) registrados luego de exponer las muestras al aire por 180 min sugieren cómo sería el desempeño del producto en una situación normal de consumo (luego de la apertura del envase y posterior exposición a una concentración normal de oxígeno). Al ser estos cambios mínimos en el caso del tratamiento optimizado, puede considerarse que esta alteración fue exitosamente prevenida por más de dos horas (tiempo suficiente para su consumo), gracias al efecto inhibitorio de la combinación del tratamiento de APH y la inmersión del producto en la solución de ácidos orgánicos sobre la enzima PPO.

Igualmente los resultados de este capítulo evidenciaron la necesidad de profundizar la información en cuanto al efecto de las APH sobre la microestructura para entender mejor los cambios producidos en el producto final, por lo cual en un capítulo posterior se complementaron los análisis tradicionales con técnicas más precisas, como la microscopía de transmisión electrónica (TEM) y la microscopía electrónica de barrido (SEM), las cuales brindaron información de relevancia acerca del estado del tejido.

Desde el punto de vista bioquímico, se comprobó, además, que los mayores niveles de presión ensayados fueron más efectivos para inactivar a la ADH y a la PPO, independientemente del tiempo de mantenimiento de la presión. Por otra parte, los cambios en el parámetro de color a^* registrados luego de exponer las muestras al aire por 180 min (atribuibles al pardeamiento enzimático), siguieron un patrón similar al de la inactivación de la PPO, lo que evidenció la estrecha relación que existe en este tipo de producto, entre la actividad remanente de la PPO y el grado de pardeamiento.

Por otra parte, se demostró que las APH tenían la capacidad de inhibir la actividad de la ADH, por lo que la aplicación de esta tecnología inmediatamente después del envasado al vacío tiene la capacidad de prevenir el desarrollo de los procesos metabólicos fermentativos, provocados en el

3.3 Resultados y Discusión-Capítulo 2

tratamiento control al exponer a estos productos a las condiciones anaeróbicas generadas durante el envasado al vacío. Esta capacidad, junto con el efecto de los tratamientos combinados sobre la prevención de alteraciones como el pardeamiento enzimático y el crecimiento de microorganismos, resulta altamente relevante y promisoria, ya que podría alentar el uso del envasado al vacío para preservar tejidos metabólicamente activos como frutas y hortalizas mínimamente procesadas.

3.4 Capítulo III

Determinación de la aptitud varietal para el procesamiento de duraznos por APH y selección de condiciones de proceso

3.4.1 Introducción

La elección de las variedades que mejor se adapten para un determinado uso constituye uno de los aspectos clave para la obtención de un producto final que responda a los requerimientos del mercado y/o de los consumidores, ya que es sabido que la calidad del producto final dependerá en gran medida de la aptitud de la materia prima. Este hecho está relacionado con la gran variabilidad en cuanto a características sensoriales, resistencia a enfermedades, desórdenes fisiológicos y aptitud para la conservación y para el procesamiento que presentan los distintos cultivares de una especie frutal u hortícola. En el caso de frutas como el durazno, una primera clasificación en este sentido se puede realizar dividiendo a las variedades en aptas para consumo en fresco, aptas para industrialización, o variedades multi-propósito. Respondiendo a la necesidad de complementar el desarrollo de un producto de calidad con la elección de una variedad que se adapte mejor a los procesos seleccionados, el presente ensayo fue realizado con el objetivo de comparar la aptitud de dos variedades de durazno para el procesamiento mínimo, y definir los principales parámetros (nivel de presión y tiempo de mantenimiento) del tratamiento de APH. Es importante mencionar que el presente ensayo se llevó a cabo en base a un diseño experimental del tipo factorial, el cual incluyó entre los niveles de los factores ensayados (nivel de presión-tiempo de mantenimiento), a las condiciones determinadas como óptimas en el capítulo anterior, por lo que la realización del mismo sirvió además a modo de validación de la información teórica obtenida anteriormente.

De esta manera, se probaron experimentalmente y aplicadas a diferentes variedades, tanto la combinación óptima hallada con el PCA como la obtenida con la función *desirability* para terminar de definir las condiciones óptimas de proceso.

Desde un punto de vista práctico, se procuró definir las condiciones que maximizaran la inactivación de las enzimas marcadoras de la alteración (PPO, que cataliza el pardeamiento enzimático, y ADH, relacionada con la inducción de la fermentación en condiciones anaeróbicas), sin alterar significativamente la textura de la fruta. Dado que en el capítulo anterior se estableció que un tratamiento de 600 MPa provocaba la máxima (aunque incompleta) inactivación de enzimas, no observándose efectos adversos sobre la textura al aumentar el nivel de presión, se consideró oportuno comprobar si mayores niveles de presión (700 MPa) eran capaces de aumentar la inactivación de enzimas, preservando la textura. Además, como forma de ajustar el proceso de optimización, se ensayaron tratamientos en los que se mantuvieron las condiciones de presión por períodos relativamente cortos (1 y 5 min). Estos tiempos fueron establecidos

3.4 Resultados y Discusión-Capítulo 3

basándose tanto en el análisis de componentes principales (PCA), en el cual se concluyó que el tratamiento óptimo para preservar la textura con la mayor inactivación de enzimas era de 600 MPa por 5 min, como en el análisis predictivo mediante la función *desirability*, que estimó que el tratamiento óptimo estaría representado por un nivel de presión similar, pero aplicado por 1 min.

Es importante mencionar que a pesar de la importancia de la temática, son muy escasos en la actualidad los trabajos que se focalizan en la aptitud varietal para el procesamiento. En el caso particular de la aplicación de APH en frutas, Wolbang y col. (2008) encontraron que el cultivar utilizado de melón para el procesamiento por APH tenía un efecto altamente significativo sobre aspectos de calidad como el contenido y retención de vitamina C y la variación de color del producto final. Es por ello que se considera imprescindible contar con un mayor nivel de información relacionada con el efecto diferencial de los tratamientos, en su interacción con las características genéticas de cada cultivar sobre el producto final para que el mismo responda a las exigencias de los más altos estándares de calidad.

3.4.2 Resultados

3.4.2.1 *Análisis de perfil de textura (TPA)*

Si bien en el presente capítulo se evaluaron todos los parámetros incluidos en el TPA, la tabla 11 muestra únicamente los datos de dureza, dado que es el parámetro que mostró de forma más representativa las diferencias texturales entre las distintas variedades y tratamientos. En relación al nivel de presión, el tratamiento a 700 MPa fue el que provocó la mayor disminución en ambas variedades, la cual fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para el factor tiempo de mantenimiento en ninguna de las dos variedades estudiadas.

3.4 Resultados y Discusión-Capítulo 3

Tabla 11. Valores obtenidos para dureza, uno de los parámetros del Análisis de Perfil de Textura, actividad de enzimas, contenido de ácido ascórbico y fenoles totales en dos variedades y para diferentes tratamientos con APH en durazno mínimamente procesado

	Variedad Flavorcrest		Variedad Romea	
Nivel de Presión	Tiempo de Mantenimiento			
Dureza (N)	1min	5min	1min	5min
500MPa	26 ± 3 aA	21 ± 3 aA	20 ± 3 aA	21 ± 4 aA
600MPa	23 ± 2 aA	19 ± 1 aA	18 ± 4 aA	16 ± 3 aA
700MPa	17 ± 3 bA	16 ± 2 bA	12 ± 2 bA	12 ± 2 bA
Act. PPO (UE/g)	1min	5min	1min	5min
500MPa	160 ± 4 aA	156 ± 2 aA	49 ± 1 A	34 ± 1 A
600MPa	120 ± 2 bA	104 ± 2 bB	ND	ND
700MPa	110 ± 2 cA	112 ± 2 bA	ND	ND
Act. ADH (UE/g)	1min	5min	1min	5min
500MPa	0,068 ± 0,002 aA	0,050 ± 0,004 aA	0,098 ± 0,003 aA	0,074 ± 0,004 aA
600MPa	0,039 ± 0,004 bA	0,013 ± 0,001 bB	0,034 ± 0,006 bA	0,021 ± 0,001 bB
700MPa	0,010 ± 0,001 cA	0,001 ± 0,001 bA	0,010 ± 0,001 cA	0,012 ± 0,003 bA
A. ascórbico (mg/100 g)	1min	5min	1min	5min
500MPa	30 ± 1 b A	29 ± 3 a A	55 ± 1 b A	54 ± 1 b A
600MPa	39 ± 1 a A	35 ± 2 a A	66 ± 1 a A	65 ± 1 a A
700MPa	39 ± 1 a A	37 ± 1 a B	65 ± 2 a A	65 ± 2 a A
Fenoles T (mgAG/100g)	1min	5min	1min	5min
500MPa	69 ± 4 c A	79 ± 1 c A	107 ± 2 b A	103 ± 1 b A
600MPa	81 ± 2 b B	91 ± 1 b A	120 ± 3 a A	128 ± 2 a A
700MPa	90 ± 3 a A	99 ± 2 a A	130 ± 1 a A	127 ± 1 a A

Las letras minúsculas indican diferencias significativas al efecto "Nivel de presión" y las letras mayúsculas al efecto "tiempo de mantenimiento" según test de Duncan p=0,05. Los datos están expresados como promedios ± Desvío estándar (Dureza n=8, Actividad de enzimas, ácido ascórbico y fenoles totales n=3).

3.4 Resultados y Discusión-Capítulo 3

3.4.2.2 *Actividad PPO*

Los resultados obtenidos en cuanto a la actividad de la PPO, muestran la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) muy marcadas, para ambas variedades, entre los duraznos sometidos a los diferentes tratamientos (tabla 11). Es importante destacar la existencia de diferencias importantes en los niveles de actividad enzimática entre las dos variedades ensayadas, previos a la aplicación de APH, lo cual resalta el efecto que puede tener la materia prima sobre el desarrollo de alteraciones en el producto final. Así, la actividad PPO en Flavorcrest fue de 308,1 UE/g, mientras que la actividad PPO en Romea fue de 135,9 UE/g. Luego del tratamiento de APH, no se detectó ninguna actividad remanente para los tratamientos de 600 y 700 MPa en Romea, mientras que en Flavorcrest pudo medirse en todos los casos una cierta actividad residual, con un mayor nivel de reducción (estadísticamente significativa $-p < 0,05-$) para los mayores niveles de presión. En el caso de esta última variedad, si bien la enzima no se inhibió completamente por la aplicación de APH, su actividad se redujo significativamente ($p < 0,05$) por los tratamientos, lo que sugiere el efecto positivo que puede tener este tipo de tratamiento previniendo el desarrollo del pardeamiento enzimático. En el caso de Flavorcrest, el tiempo de mantenimiento de la presión tuvo efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la actividad enzimática únicamente para el nivel de 600 MPa.

3.4.2.3 *Actividad ADH*

En el caso de la enzima ADH, los niveles de actividad enzimática previos a la aplicación de APH fueron bastante similares en las dos variedades. Así, la actividad fue de 0,159 UE/g para Flavorcrest, mientras que Romea presentó una actividad de 0,121 UE/g. En el caso de esta enzima, se observó un efecto significativo ($p < 0,05$) tanto del nivel de presión como del tiempo de mantenimiento sobre el porcentaje remanente de actividad para ambas variedades, siendo las combinaciones de 600 MPa-5 min y de 700 MPa 1 y 5 min las que presentaron los menores niveles de actividad. Además, como muestra la tabla 11, el patrón de inhibición fue bastante similar para las dos variedades.

3.4.2.4 *Ácido ascórbico*

La tabla 11 muestra el contenido de ácido ascórbico en los duraznos de ambas variedades, sometidos a los distintos tratamientos del ensayo. Puede observarse que en todos los casos, los valores obtenidos para la variedad Romea fueron marcadamente mayores que los de la variedad Flavorcrest. Esta diferencia ya era notoria en el producto sin presurizar, en donde la variedad

3.4 Resultados y Discusión-Capítulo 3

Flavorcrest presentó un contenido de 41 mg/100 g, mientras que la concentración en la variedad Romea fue de 53 mg/100 g. Se observa que, para ambas variedades, los duraznos sometidos a tratamientos de 500 MPa mostraron los valores más bajos de ácido ascórbico dentro de los presurizados, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en relación a los otros tratamientos. La mayor pérdida se produjo para los duraznos de la variedad Flavorcrest, que presentaron una merma del 30% del ácido ascórbico con respecto al producto sin presurizar, mientras que en los otros tratamientos, la retención del compuesto fue de hasta un 95%. Contrariamente, en la variedad Romea la retención fue del 100% con respecto al producto sin presurizar, e incluso mostró un aumento de hasta un 24% con respecto al control en los tratamientos de mayor nivel de presión. Por su parte, el tiempo de mantenimiento del nivel de presión, no tuvo efecto significativo ($p < 0,05$) en ninguno de los tratamientos.

3.4.2.5 *Fenoles totales*

La tabla 11 muestra también el contenido de fenoles totales en duraznos de ambas variedades, sometidos a los distintos tratamientos del ensayo. Los valores obtenidos en todos los tratamientos de la variedad Romea fueron marcadamente superiores a los obtenidos para la variedad Flavorcrest. Es importante destacar que en el producto sin presurizar no se encontraron diferencias apreciables entre ambas variedades, siendo el contenido de 73 mg AG /100 g para la variedad Flavorcrest, y de 80 mg AG/100 g para Romea. Se observa que en ambas variedades, los duraznos sometidos a tratamientos de 500 MPa presentaron los valores más bajos de fenoles totales entre los tratamientos con APH, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en relación al resto de los tratamientos. En el caso de Flavorcrest, también se observaron diferencias entre los tratamientos de 600 y 700 MPa, mostrando los duraznos tratados con el mayor nivel de presión el mayor contenido de fenoles totales. Al igual que para el caso del ácido ascórbico, el tiempo de mantenimiento del nivel de presión no tuvo efecto significativo ($p > 0,05$) en ninguno de los tratamientos.

En términos porcentuales, los resultados muestran que en el caso de Romea, la aplicación de cualquiera de los tratamientos de APH ensayados indujo un aumento en la concentración de fenoles totales en relación al control, siendo este incremento de un 30% para los tratamientos de 500 MPa y de entre un 50 y 60% para los tratamientos de mayor nivel de presión. En el caso de Flavorcrest, el contenido de fenoles totales permaneció invariable luego de la aplicación del

3.4 Resultados y Discusión-Capítulo 3

tratamiento de 500 MPa, mientras que aumentó entre un 20 y un 30% en los tratamientos de 600 y 700 MPa respectivamente.

3.4.3 Discusión

3.4.3.1 *Análisis de perfil de textura (TPA)*

La textura del producto final representa uno de los aspectos más relevantes considerados a lo largo del presente trabajo, siendo uno de los parámetros de calidad clave que fueron contemplados en los estudios de optimización. Como fuera mencionado anteriormente, si bien en estos estudios se concluyó que el nivel de presión no tenía efecto significativo sobre el cambio textural en un rango de entre 400 y 600 MPa, en el presente ensayo se amplió este rango hasta los 700 MPa. En este sentido, los resultados mostraron que este nivel de presión ya provocaba una disminución significativa del parámetro dureza con respecto a los tratamientos de menor nivel de presión. Un efecto similar fue informado por Kingsly y col. (2009-b) en cilindros de ananá, quienes observaron al comparar tratamientos de 50, 100, 300, 500 y 700 MPa de presión, que el parámetro dureza incluido en el TPA comenzaba a mostrar una disminución significativa en el tratamiento de mayor nivel de presión ensayado (700 MPa). En base al presente ensayo y a los estudios realizados en otras especies, puede sugerirse para este tipo de producto, en donde se busca una característica similar a la de un producto fresco, la no conveniencia de trabajar con presiones mayores a 600 MPa. Es interesante mencionar que el efecto observado fue similar tanto para la variedad Flavorcrest como para Romea, lo que sugiere que las propiedades de resistencia mecánica son similares para ambas variedades.

3.4.3.2 *Actividad PPO*

Como fuera mencionado, la actividad PPO puede brindar información relevante para definir la aptitud de una determinada variedad para el procesamiento, ya que está estrechamente relacionada con el potencial de pardeamiento de la misma. De hecho, este parámetro fue el que mostró las mayores diferencias entre las dos variedades, las cuales ya pudieron determinarse previamente a la aplicación de los tratamientos, lo que indica que son propias de la materia prima y están relacionadas con la genética varietal. Diferencias varietales fueron informadas también en otras especies como frutillas, en donde la actividad residual PPO luego de diferentes tratamientos de APH resultó significativamente distinta (Terefe y col., 2013).

3.4 Resultados y Discusión-Capítulo 3

En el caso de la variedad Flavorcrest se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos de 600 MPa aplicados por diferentes tiempos, siendo el tratamiento de 600 MPa por 5 min más efectivo para inactivar la PPO que el de 600 MPa por 1 min. En un trabajo previo en el cual se aplicaba un tratamiento de 600 MPa a puré de duraznos, Khalil y col. (2011) observaron que un aumento en el tiempo de exposición a esta presión de 1 a 3 min tenía un efecto significativo en la reducción del índice de pardeamiento (un parámetro muy relacionado con la actividad PPO). Este hecho demuestra que la elección adecuada de la intensidad del tratamiento, definida por la dupla presión-tiempo, será clave en la determinación de la efectividad del tratamiento para limitar el potencial de pardeamiento de un producto.

3.4.3.3 *Actividad ADH*

La efectividad que tendrá un tratamiento de APH para prevenir la inducción del metabolismo fermentativo en los tejidos de una fruta resulta de gran relevancia, dado que la elaboración de este tipo de producto incluirá el envasado en films de baja permeabilidad al oxígeno, los cuales deberán ser cuidadosamente seleccionados para maximizar la calidad del producto. Esto alcanza una importancia aún mayor en el presente trabajo de tesis, dado que se estableció la gran utilidad de incorporar la tecnología de envasado al vacío como estrategia de preservación, la cual conlleva al riesgo de inducción en el tejido de un metabolismo del tipo anaeróbico. De esta manera, resulta promisorio el efecto inhibitor conseguido con los tratamientos de APH sobre la actividad ADH, la cual fue afectada significativamente en ambas variedades, y tanto por el nivel de presión como por el tiempo de mantenimiento. En este sentido, los tratamientos de 600 MPa -5 min y de 700 MPa por 1 y 5 min fueron los más efectivos, mostrando los menores niveles de actividad ADH. Como ya se observó en los capítulos previos del presente trabajo, la enzima ADH resultó sensible a los tratamientos de APH en los niveles de presión aplicados. Es posible que la sensibilidad a estos tratamientos esté relacionada con la naturaleza multimérica de esta enzima, ya que es sabido que las APH pueden tener un efecto importante sobre la estabilidad de enzimas, principalmente aquellas formadas por más de un monómero (Dallet y Legoy, 1996).

3.4.3.4 *Ácido ascórbico*

El ácido ascórbico representa a un compuesto de enorme interés tanto en biología como en tecnología de poscosecha de frutas y hortalizas, dado que por un lado juega un rol activo como metabolito intermediario en reacciones relacionadas con el estrés oxidativo, aunque también

3.4 Resultados y Discusión-Capítulo 3

tiene un creciente uso tecnológico como protector de la oxidación en alimentos. En el presente trabajo, este compuesto fue utilizado como un marcador relacionado a los aspectos nutricionales del producto, considerando su gran sensibilidad a las reacciones de oxidación, siendo su pérdida representativa de la pérdida de otras vitaminas y compuestos bioactivos.

Los resultados mostraron que el pre-tratamiento por inmersión en solución 1% de ácido ascórbico al que se sometieron los duraznos mínimamente procesados hizo aumentar el contenido de ese compuesto en los productos procesados con respecto al contenido original de la materia prima (3-12mg/100 g según la variedad). Esto demostraría que esta estrategia de preservación, además de contribuir a prevenir el pardeamiento del producto, estaría brindando un aporte sustancial para mejorar su calidad nutricional (Lee y Kader, 2000; Gil y col., 2002; Buendía y col., 2008; Tavarini y col., 2008; Zhou y col., 2002; Koukounaras y col., 2008).

En el caso de la variedad Romea, el contenido de ácido ascórbico de los duraznos mínimamente procesados fue preservado en un 100%, detectándose incluso un aumento de hasta un 24 % con respecto al control en los tratamientos de mayor nivel de presión (600 y 700 MPa). En concordancia con esto, Kaushik y col. (2014) registraron un aumento similar con respecto al control (29%) en puré de mango presurizado (600 MPa-1seg –pulso-). Estos autores atribuyen este efecto a una mayor extractabilidad del compuesto inducida por las APH a causa de la permeabilización de las células por la compresión, lo cual provocaría la liberación del contenido citosólico al espacio extracelular. Este hallazgo sugiere que la aplicación de las APH podría potenciar la extracción de compuestos bioactivos de fuentes vegetales, lo cual representa un efecto positivo adicional de esta tecnología. Aparentemente, en el caso de mango, este efecto sería altamente dependiente de la presión aplicada ya que en el rango de 300-600 MPa se preservaría/aumentaría el contenido de ácido ascórbico, mientras que para presiones de hasta 200 MPa se reduciría el contenido del mismo. En *gooseberry*, el aumento de ácido ascórbico osciló entre 9 y 53% luego de someter las frutas a un tratamiento de APH de 500 MPa por 30-90 seg (Briones-Labarca y col., 2013).

Es interesante el hecho de que en la literatura exista una cierta controversia en relación al efecto de las APH sobre este metabolito. Por ejemplo, en néctar de mango no se encontraron variaciones significativas en el contenido de ácido L-ascórbico luego de la aplicación de un tratamiento de 600 MPa por 1 min (Liu y col., 2014). Esto resulta similar a lo informado en purés de frutilla y *blackberry*, en donde se encontró que los tratamientos de APH (400 a 600 MPa por 15 min a 10-

3.4 Resultados y Discusión-Capítulo 3

30°C) no afectaban el contenido de este metabolito (Patras y col., 2009). Contrariamente, en puré de manzana presurizado a 600 MPa por 5 min la pérdida del contenido de ácido ascórbico fue superior al 80% (Landl y col., 2010). Distintos autores consideran que las diferencias observadas entre los distintos trabajos de investigación se deberían a la influencia del oxígeno presente tanto en el medio como en la matriz del alimento, ya que el mismo, en conjunto con pro-oxidantes como iones metálicos y enzimas, puede afectar el contenido de este compuesto (Oms-Oliu y col., 2012; Oey y col., 2008). En este sentido, se sabe que el oxígeno juega un papel importante en la degradación de AA tanto a presión atmosférica como a presiones elevadas, por lo que este fenómeno podría limitarse si se reduce la concentración de este gas en contacto con el alimento. En otras palabras, la estabilidad del AA a la presión sería altamente dependiente de la relación molar existente entre ese compuesto y el oxígeno, por lo que al eliminar a este último del envase podría reducirse la degradación del AA durante el procesamiento y el subsecuente almacenamiento.

Es importante destacar el efecto diferencial encontrado que tienen las APH sobre las distintas variedades, ya que la variedad Flavorcrest, a diferencia de la variedad Romea, mostró una disminución del contenido de ácido ascórbico del 30% para los tratamientos de menor nivel de presión (500 MPa), aunque la retención para los tratamientos de mayor nivel de presión fue de alrededor del 95%. Esto respalda las consideraciones de Oms-Oliu y col. (2012) y Oey y col. (2008) de que el efecto de las APH sobre el ácido ascórbico, depende de muchos factores, por lo cual los estudios de aptitud varietal como el presente resultan de mucho interés práctico.

3.4.3.5 *Fenoles totales*

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas generalmente sintetizados a través de la ruta del ácido shikímico. Desde el punto de vista estructural, estos compuestos presentan uno o más grupos hidroxilos unidos directamente a un anillo bencénico u otra estructura aromática más compleja (Altuner y Tokusoglu, 2013). Es sabido que los tratamientos de APH provocan alteraciones en la microestructura de la fruta tales como interrupciones de las paredes celulares y cambios en las uniones hidrofóbicas de la membrana celular, lo cual resulta en un aumento en la permeabilidad de la misma. Estas alteraciones modifican la distribución y agregación de los compuestos fenólicos, incrementando a su vez la velocidad de transferencia de masa en el interior del tejido. Todos estos efectos potenciarían la penetración del solvente en las

3.4 Resultados y Discusión-Capítulo 3

células, favoreciendo los procesos de extracción de los fenoles ya que permitiría a los compuestos solubles salir del interior de las células (Vega-Gálvez y col., 2014).

Los resultados del presente capítulo muestran que, tanto para la variedad Flavorcrest como para la variedad Romea, el contenido de fenoles totales se incrementó luego de la aplicación de los tratamientos de APH, siendo mayor la diferencia con respecto al control para los mayores niveles de presión aplicados. Estos resultados fueron coincidentes con distintos estudios realizados previamente, en los cuales el contenido de fenoles aumentaba luego de los tratamientos en productos como puré de manzana presurizado 600 MPa por 5 min (Landl y col., 2010), puré de frutilla procesado a 600 MPa por 15 min (Patras y col., 2009), puré de nectarina expuesto a 600 MPa por 10 min (García-Parra y col. 2011), licuados de frutas tratados a 450 MPa por 1-3 min (Keenan y col., 2010), puré de ciruela sometidos a 400-600 MPa por 7 min (González-Cebrino y col., 2012) y néctar de damasco presurizado a 500 MPa por 15 min (Huang y col. 2013).

En términos cuantitativos, se encontró que en el caso de la variedad Romea, se produjo un aumento de un 30% con respecto al control para los tratamientos de 500 MPa por 1-5 min y de entre un 50 y 60% para los tratamientos de 600 y 700 MPa. En el caso de la variedad Flavorcrest, el contenido de fenoles totales no se modificó con los tratamientos de 500 MPa por 1-5 min, mientras que aumentó entre un 20% y un 30% en los tratamientos de 600 y 700 MPa respectivamente. En términos comparativos, los porcentajes de aumento son comparables, o incluso algo superiores en relación a estudios realizados en otras frutas. Así, Patras y col. (2009) informaron que el aumento de fenoles totales en puré de frutilla, luego del tratamiento de 600 MPa por 15 min fue de un 9,8%, siendo este porcentaje mayor que en los tratamientos a menor presión. Barba y col. (2013) explican que los compuestos fenólicos son relativamente resistentes a los tratamientos de APH, habiendo encontrado que el contenido fenólico para jugo de arándano aumentaba entre 13 y 27% luego de un tratamiento a 200 MPa por 5 y 15 min respectivamente, y un 24% para un tratamiento de 400 MPa por 15 min. En cebolla presurizada se reportó un aumento del contenido de fenoles totales del 66% para combinaciones de 300 MPa por 3 min, y de 600 MPa por 2 min (Vázquez-Gutierrez y col., 2013). Por su parte, Kaushik y col. (2014) observaron que la extracción de compuestos fenólicos luego de someter a puré de mango a presiones de entre 100 y 600 MPa por 1 seg aumentaba entre un 9 y un 19%. El incremento en el contenido de fenoles totales observado luego de un tratamiento de APH estaría relacionado con la

3.4 Resultados y Discusión-Capítulo 3

mayor extractabilidad inducida por el tratamiento, de manera similar a lo mencionado anteriormente para el caso del ácido ascórbico (Keenan y col., 2010).

Aunque en general en la literatura se menciona que como consecuencia de la aplicación de las APH se produce un aumento en el contenido de fenoles, en algunos casos se han mencionado otros efectos. En el trabajo de Kaushik y col. (2014), por ejemplo, cuando trataron el puré de mango con tratamientos más largos (10 min de tiempo de mantenimiento), el contenido de fenoles totales disminuyó para los niveles de 100 y 200 MPa mientras que fue similar al control para los niveles de 300-600 MPa. La disminución encontrada luego del procesamiento podría atribuirse a un mayor nivel de oxidación química sufrida por estos compuestos, así como a la oxidación enzimática debido a las PPO activas remanentes luego de la aplicación de las APH. En otros estudios, González-Cebrino y col. (2013) no encontraron diferencias significativas entre muestras de puré de ciruela tratadas por APH (400- 600 MPa aplicados por hasta 5 min) y sin tratar, un resultado similar al informado por Liu y col. (2014) en néctar de mango presurizado (600 MPa-1 min) y sin presurizar, y por los mismos autores en otro estudio con jugo de sandía presurizado (con tratamientos de entre 200-600 MPa por 5-60 min) y sin presurizar (Liu y col., 2013). Estos autores sugieren que, si bien es probable que en otras matrices como jugo o puré aumentaría la extractabilidad de algunos fenoles provenientes del interior de células (intactas en el producto sin tratar) como consecuencia de la permeabilización inducida por los tratamientos de APH, en el caso de jugo de sandía no se observó ese efecto, ya que estos compuestos se encontraban previamente dispersos en el jugo, razón por la cual su contenido se mantuvo invariable. Por otra parte, se observó que al reducirse en gran medida la actividad PPO, los compuestos fenólicos fueron más estables en el jugo presurizado.

El mayor contenido de fenoles encontrado en el presente ensayo en duraznos sometidos a tratamientos de APH resulta coincidente con la información de trabajos anteriores con otras especies. Este hallazgo ofrece una interesante alternativa para incrementar mediante este proceso el contenido de uno de los compuestos bioactivos más apreciados por los consumidores en la actualidad, como son los compuestos fenólicos, lo cual permitiría incluir a este tipo de productos dentro de lo que se conoce como alimentos funcionales. Este concepto reconoce a alimentos y/o componentes que tienen la capacidad de influenciar en forma benéfica sobre las funciones del cuerpo, ayudando a mejorar el estado de bienestar y salud, y reducir el riesgo de enfermedades. De hecho, la Comisión Europea de Acción Concertada sobre Bromatología Funcional en Europa

3.4 Resultados y Discusión-Capítulo 3

(*Functional Food Science in Europe*, FUFOSE) incorpora a la definición de alimentos funcionales a distintas variantes como por ejemplo a alimentos naturales en los cuales el contenido de alguno de sus componentes ha sido aumentado de forma natural y/o en el cual se ha aumentado la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes para mejorar la absorción del mismo. Entre una vasta gama de definiciones de alimentos funcionales, muchas se focalizan textualmente en “la incorporación de algún procedimiento tecnológico que fortifique, enriquezca, o agregue algún ingrediente funcional, o bien remueva algún alérgeno o compuesto nocivo para la salud” (Ashwell, 2002; *European Commission*, 2010). Este aspecto novedoso pudo además ser complementado en el presente capítulo con información tecnológica que permitió relacionar a las diferentes combinaciones tiempo-presión con el incremento en el contenido de estos compuestos debido al tratamiento.

3.4.4 Conclusiones

El trabajo llevado a cabo en este capítulo permitió evaluar la influencia de la materia prima sobre la calidad del producto final, para lo cual se evaluó la aptitud para el procesamiento de dos variedades de durazno. Se afinaron además las condiciones óptimas del procesamiento capaces de inducir una mayor inactivación enzimática, con el mínimo efecto sobre propiedades sensoriales como la textura. Además, se estudió el efecto de las APH sobre características nutricionales como el contenido de fenoles y de ácido ascórbico.

Se comprobó que un aumento en el nivel de presión aplicado hasta 600 MPa no provocaba un mayor ablandamiento en los duraznos mínimamente procesados en ninguna de las dos variedades, aunque las presiones a partir de este valor provocaban una disminución significativa en la dureza del producto. En el caso de la actividad PPO presente en los tejidos, se observó una marcada diferencia entre las dos variedades estudiadas, por lo que se concluye que la elección de la materia prima constituirá un aspecto de suma importancia para la obtención de un producto de óptima calidad. En este sentido, las variedades con baja actividad PPO como Romea serían más recomendables para el procesamiento con APH para evitar el pardeamiento enzimático, habida cuenta de que un tratamiento de 600 MPa resultó suficiente para la inhibición total de la enzima. Contrariamente, con la aplicación de este nivel de presión en la variedad Flavorcrest se logró solamente una inhibición parcial, no consiguiéndose la inactivación total de la enzima. Con respecto a la enzima ADH, tanto el tratamiento de 600 MPa-5 min como el de 700 MPa por 1 y 5 min lograron su máxima inactivación, en ambas variedades. Puede concluirse en consecuencia que

3.4 Resultados y Discusión-Capítulo 3

los tratamientos con las condiciones más severas fueron los más efectivos para inactivar esta enzima en este tipo de producto.

En el caso del ácido ascórbico, resulta interesante el hecho de que el baño de inmersión (1%) haya aumentado el contenido final de este compuesto, mejorando la calidad nutricional de los duraznos mínimamente procesados. Las variedades estudiadas presentaron diferentes contenidos iniciales de ácido ascórbico, así como un diferente nivel de estabilidad frente al tratamiento. En este sentido, Romea mostró tanto un mayor contenido inicial, como una mayor retención del compuesto luego del procesamiento. Por otra parte, los duraznos sometidos a los tratamientos de mayor nivel de presión, presentaron un mayor contenido de este compuesto, posiblemente por favorecer la extractabilidad a partir de los tejidos. Además, los tratamientos de APH favorecieron también la extracción de fenoles, por lo que la aplicación de este tratamiento otorgaría al producto un carácter funcional por su mayor contenido de antioxidantes, una características muy valoradas por los consumidores actuales.

En relación al efecto de las diferentes intensidades del tratamiento, se hizo evidente que la exposición a mayores niveles de presión (600 y 700 MPa) mejoraban las características del producto, ya que conducían a una mayor inactivación de enzimas y a una mayor extractabilidad de ácido ascórbico y de compuestos fenólicos. Sin embargo, dado que los tratamientos de 700 MPa indujeron una disminución significativa de la dureza, se concluye en base a lo analizado para este producto, que 600 MPa representa el nivel de presión óptimo. Con respecto al tiempo de mantenimiento de ese nivel de presión, el tratamiento que mostró una mejor performance fue el de 5 min, consiguiéndose con el mismo una mayor inactivación de enzimas sin provocar efectos adversos sobre la textura del producto.

El trabajo evidencia la importancia de la elección adecuada de la materia prima, considerándose uno de los aspectos clave conducentes a la optimización del procesamiento. En este sentido, la elección de variedades como Romea permitiría obtener un producto con un mejor control del desarrollo de pardeamiento enzimático (por inactivarse la enzima PPO con el tratamiento APH), con la ventaja adicional de presentar un mayor contenido de ácido ascórbico y fenoles totales.

3.5 Capítulo IV

Aspectos morfológicos y bioquímicos del efecto de las APH sobre duraznos mínimamente procesados

3.5.1 Introducción

Como ya se comentó anteriormente, las frutas mínimamente procesadas se definen como frutas que han sido sometidas a procesos que no modifican substancialmente las características de la materia prima original y son destinadas a un uso conveniente por parte de los consumidores o servicios de catering/restaurantes. Dado que los productos bajo esta categoría requieren implícitamente una condición de fresca, algunas definiciones sugieren que estos productos deberían estar constituidos exclusivamente por tejidos vivos (Wiley, 1997; Artés Calero y Artés Hernández, 2003). En el caso de aplicar tratamientos térmicos convencionales de preservación, sería clara la diferencia entre producto procesado y fresco, ya que estas tecnologías provocan la interrupción de todos los procesos metabólicos, causando cambios significativos en el *flavor*, color, textura y consecuentemente, resultan en la pérdida de la apariencia fresca. Sin embargo, mediante la incorporación de tecnologías emergentes de preservación clasificadas como “no-térmicas” como es el caso de las APH, sería necesario revisar y adaptar las definiciones más tradicionales, disociando por ejemplo el concepto de “frescura” del producto respecto de la condición de “tejido viviente”. Considerando la creciente difusión con resultados promisorios de las APH para preservar la fresca de los alimentos, uno de los objetivos de este capítulo fue el de profundizar el conocimiento a nivel bioquímico y fisiológico precisamente de esta condición de “frescura”. De esta manera, dado los avances tecnológicos recientes, los estudios se focalizaron en establecer la relación entre esta condición y diferentes características como la viabilidad de los tejidos y la preservación de procesos metabólicos tales como la expresión génica y la actividad de enzimas involucradas en reacciones de deterioro del producto.

Otro de los aspectos considerados en el presente capítulo fueron los cambios estructurales experimentados por los tejidos como consecuencia de la aplicación de los tratamientos de APH. Estos cambios pueden estar relacionados a cuestiones fisiológicas y bioquímicas, como transformaciones enzimáticas y no enzimáticas de los polímeros de las paredes celulares, y/o a la compresión de la estructura celular luego de la desgasificación del tejido. Como se comprobó en los ensayos anteriores, la aplicación optimizada de tratamientos de APH no genera cambios relevantes en la textura que impacten negativamente en el producto final. Sin embargo, la profundización de estos aspectos permitirá relacionar los cambios morfológicos y microestructurales de los tejidos con alteraciones de la apariencia como la translucidez del producto y con aspectos relacionados con la viabilidad celular.

3.5 Resultados y Discusión-Capítulo 4

La aplicación de APH para la preservación de frutas constituye un área bastante reciente, por lo que son escasos hasta el momento los estudios que aborden el efecto de ese tratamiento sobre las características estructurales y bioquímicas de los tejidos vegetales, y que permitan entender mejor el comportamiento y la respuesta de los mismos a una exposición a presiones elevadas. Entre las investigaciones realizadas, se pueden mencionar las de Vázquez-Gutiérrez y col. (2012), quienes estudiaron el efecto del tratamiento de APH sobre la microestructura, textura y contenido de compuestos bioactivos del caqui y las de Van der Plancken y col. (2012), quienes estudiaron el efecto de APH sobre algunas reacciones bioquímicas relevantes que se llevan a cabo en tejidos vegetales.

El objetivo del presente capítulo fue mostrar la respuesta bioquímica y estructural de los tejidos a las APH, expresadas mediante la observación microscópica de cortes histológicos, y las determinaciones de viabilidad de tejido y expresión relativa de ARN de enzimas relacionadas con el pardeamiento enzimático (fenilalaninamonio liasa-PAL-, polifenoloxidasas-PPO-) y el metabolismo anaeróbico (alcohol deshidrogenasa-ADH-, piruvato decarboxilasa-PDC-) y la medición directa de la actividad de las enzimas relacionadas (PPO y ADH).

3.5.2 Resultados

3.5.2.1 *Viabilidad celular*

La fig. 25 muestra las micrografías obtenidas con el fin de evaluar la viabilidad celular mediante el método del Diacetato de Fluoresceína (FDA). En la misma se comparan muestras sin tratar (control) con muestras obtenidas en las distintas etapas del procesamiento mínimo de duraznos tratados por APH (600 MPa-5 min).

Se observa en la figura que las muestras de duraznos sin tratar presentaron la mayor intensidad de fluorescencia, reflejando la total viabilidad de las células. En el caso de los duraznos mínimamente procesados, se observa que aunque no se les haya aplicado un tratamiento por APH, la fluorescencia decreció en intensidad en relación al tejido fresco, constatándose incluso la presencia de zonas oscuras. Es probable que este efecto haya sido reflejo de la pérdida de integridad por parte de las membranas de algunas células como consecuencia del envasado al vacío y/o del procesamiento mínimo. En el caso de las muestras tratadas por APH se evidenció la ausencia total de fluorescencia, lo cual denotó la falta de viabilidad de las células como consecuencia del tratamiento.

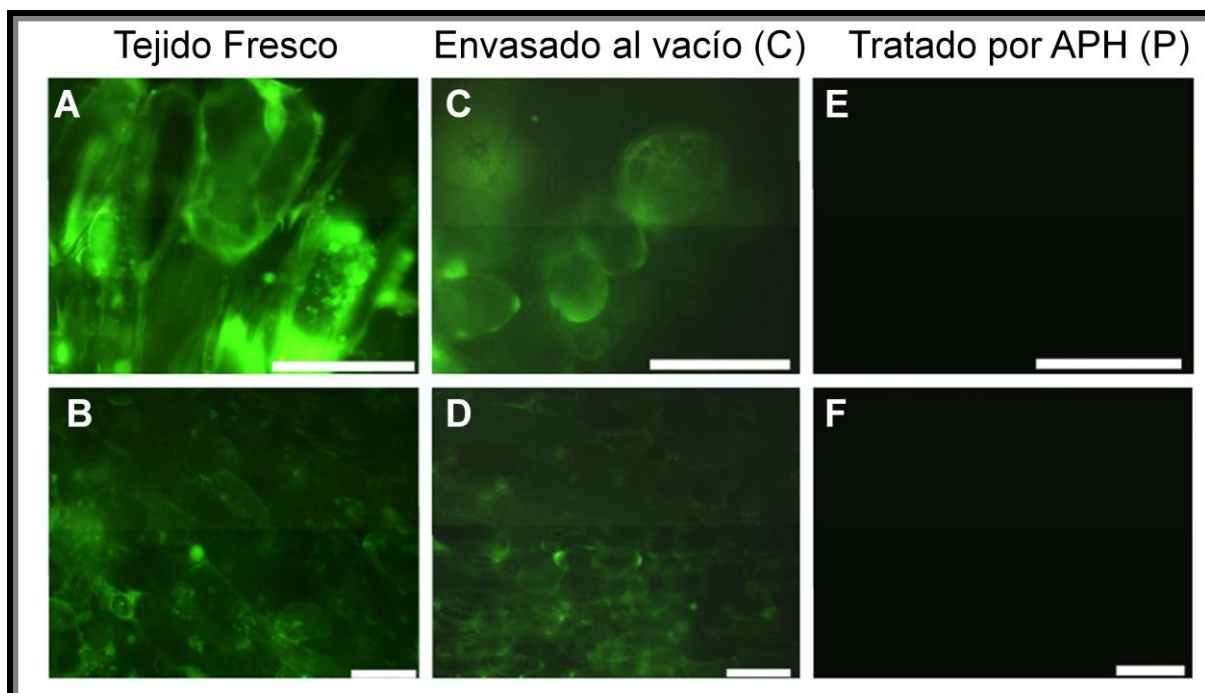


Fig. 25 Determinación de viabilidad utilizando FDA como reactivo de tinción (microscopía de fluorescencia). A, B - Tejido parenquimático de duraznos frescos; C, D, Tejido parenquimático de duraznos mínimamente procesados y envasados al vacío sin presurizar; E, F -Tejido parenquimático de duraznos tratado por APH. La fluorescencia brillante en el interior celular es un indicio de la viabilidad del tejido. Barras 100 μm . Referencia: FDA: Diacetato de Fluoresceína; APH: Altas Presiones Hidrostáticas

3.5.2.2 *Expresión relativa de enzimas a nivel de ARNm y su comparación con la actividad enzimática*

En las fig. 26, 27 y 28 se observa la expresión relativa, con respecto al control, de los genes que codifican para las enzimas ADH, PPO, PAL y PDC en las muestras de durazno mínimamente procesadas tratadas por APH. Los parámetros de proceso del tratamiento fueron seleccionados según las condiciones óptimas definidas en los capítulos previos (600 MPa-5 min-25°C), mientras que las muestras control fueron obtenidas mediante el mismo procesamiento que las tratadas (según se detalló en el punto 2.1.2), pero sin la aplicación de APH. En este capítulo se evaluó la expresión a nivel transcripcional (síntesis de ARNm mediante la tecnología de PCR en tiempo real - Real Time PCR) de genes asociados a los principales alteraciones de este tipo de producto: pardeamiento enzimático (PPO y PAL) y desarrollo de un metabolismo fermentativo (PDC y ADH).

3.5 Resultados y Discusión-Capítulo 4

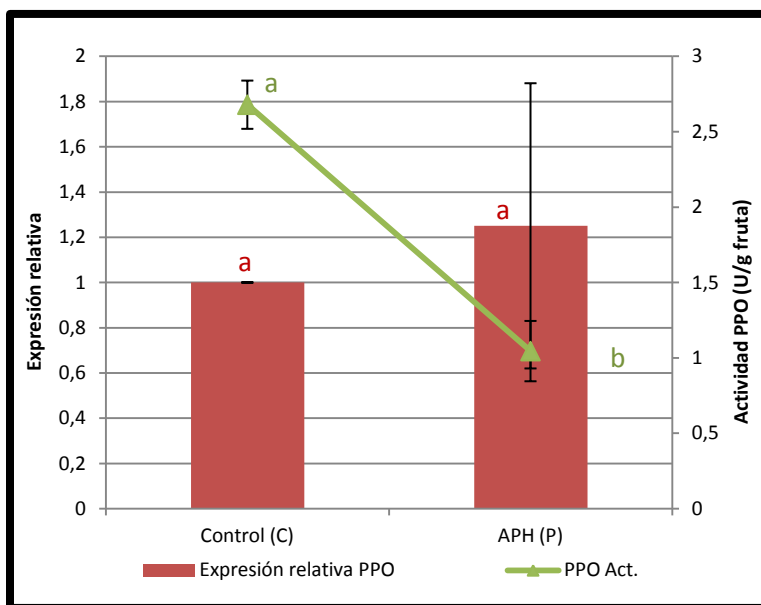


Fig. 26 Expresión relativa de la enzima PPO correspondiente a muestras de duraznos mínimamente procesados y tratados por APH (P-600 MPa-5 min-25°C) en relación a las muestras sin tratar (C-control). Los valores fueron obtenidos mediante el análisis del nivel de ARNm por PCR en tiempo real (RT-PCR) y representan las medias calculadas utilizando cuatro ARNms como templados. El eje Y representa la diferencia de cambio en el nivel de transcritos presentes en las muestras P relativas a la cantidad presente en las muestras control. El eje Y secundario representa la actividad PPO. Las barras corresponden a las desviaciones estándar. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Se observa en las figuras el efecto inhibitorio de los tratamientos de APH sobre la expresión de las enzimas ADH, PAL y PDC, cuyas diferencias con el control fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Por el contrario, este efecto no se observa en el caso de la enzima PPO, relacionada con el pardeamiento enzimático, para la cual los niveles de ARNm resultaron similares entre muestras control y tratadas. Sin embargo, al medir directamente el nivel de actividad enzimática se observa una disminución significativa en las muestras tratadas (figura 26), lo que sería un indicio de que la enzima presente en el tejido se inactivó por el tratamiento, sin alterarse el mecanismo de expresión de la misma a nivel de ARNm.

La fig. 27 muestra el efecto del tratamiento de APH sobre la expresión relativa de PAL y PPO, dos enzimas relacionadas con el pardeamiento enzimático en tejidos vegetales, y sobre el parámetro $\Delta a^*/\text{min}$, el cual es indicativo de la velocidad a la que se desarrolla esta alteración. La enzima PAL también está relacionada, aunque más indirectamente con el fenómeno de pardeamiento, ya que la misma está involucrada en la síntesis de los compuestos (fenoles) que representan a los sustratos en esa reacción.

3.5 Resultados y Discusión-Capítulo 4

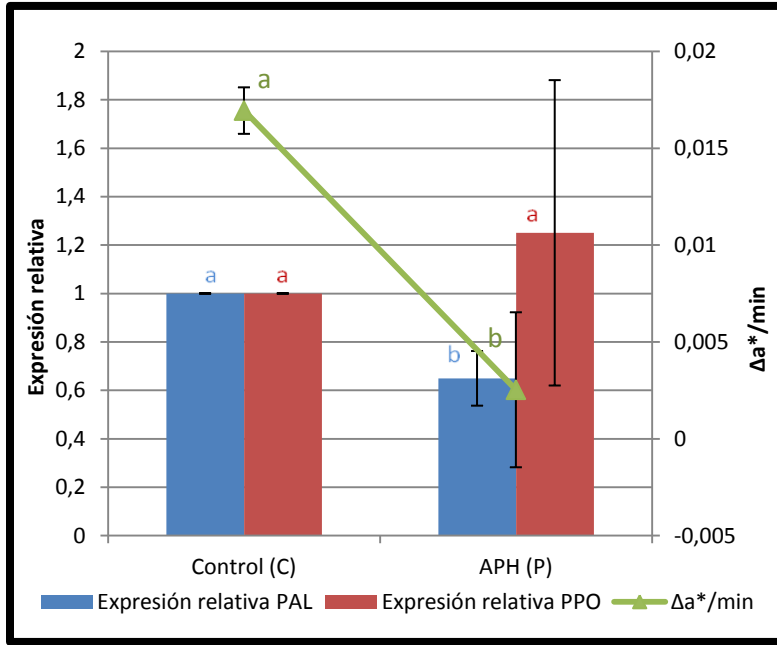


Fig. 27 Expresión relativa de enzimas PAL y PPO correspondientes a muestras de duraznos mínimamente procesados y tratados por APH (P-600 MPa-5min-25°C) en relación a las muestras sin tratar (control-C). Los valores fueron obtenidos mediante el análisis del nivel de ARNm por PCR en tiempo real (RT-PCR) y representan las medias calculadas utilizando cuatro ARNms como templates. El eje Y representa la diferencia de cambio en el nivel de transcritos presentes en las muestras P relativas a la cantidad presente en las muestras control. El eje Y secundario representa el parámetro $\Delta a^*/\text{min}$. Las barras corresponden a las desviaciones estándar. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Estas figuras muestran claramente que los tratamientos de APH tuvieron un efecto tanto sobre la inhibición de la expresión de PAL como sobre la inactivación de PPO ya presente en los tejidos; no así sobre la expresión de esta enzima que no habría sido afectada por la presurización. Este efecto se tradujo en una disminución en la velocidad de pardeamiento, reflejado por la disminución del parámetro $\Delta a^*/\text{min}$.

La fig. 28 muestra las expresiones relativas a nivel de ARNm de los genes de PDC y ADH, dos enzimas relacionadas con el metabolismo anaeróbico en tejidos vegetales, así como la medición directa de la actividad de la enzima ADH, siendo ésta la última enzima que interviene en esa vía metabólica. Al comparar los resultados obtenidos para la expresión de esas enzimas y para la actividad de ADH, se observa que la inhibición a nivel génico de esta enzima por los tratamientos de APH es coincidente con la disminución en la actividad de la enzima, con lo cual se esperaría que la presurización provoque una inhibición del metabolismo fermentativo.

3.5 Resultados y Discusión-Capítulo 4

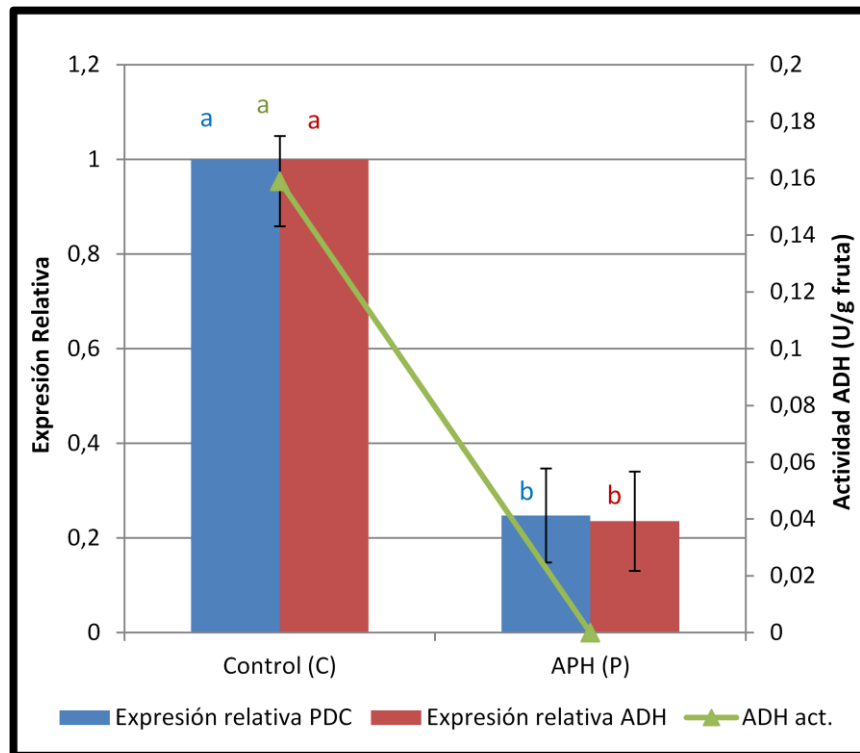


Fig. 28 Expresión relativa de enzimas PDC y ADH correspondientes a muestras de duraznos mínimamente procesados y tratados por APH (P-600 MPa-5min-25°C) en relación a las muestras sin tratar (control-C). Los valores fueron obtenidos mediante análisis del nivel de ARNm por PCR en tiempo real (RT-PCR) y representan las medias calculadas utilizando cuatro ARNms como templados. El eje Y representa la diferencia de cambio en el nivel de transcritos presentes en las muestras P relativas a la cantidad presente en las muestras control. El eje Y secundario representa la actividad ADH. Las barras corresponden a las desviaciones estándar. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

3.5.2.3 Microscopía electrónica de barrido en modo bajo vacío (LV-SEM)

La fig. 29 permite comparar, mediante microfotografías obtenidas en LV-SEM, los aspectos morfológicos entre los tejidos de duraznos frescos y duraznos mínimamente procesados y tratados por APH. De esta forma, se observa que en los duraznos presurizados no hubo cambios en la forma de las células (determinada por las paredes celulares) con respecto a las células del tejido sin tratar. Sin embargo, es posible la identificación en el tejido presurizado de zonas en las que las células no se conservaron íntegras, no habiendo límites claros y bien definidos que permitan considerar la ausencia de zonas dañadas en las paredes celulares, como sucede en el caso del tejido sin tratar. Se hace notoria en este último, la mayor homogeneidad de tamaño y distribución de células. En el caso del tejido tratado por APH, se observa la buena conservación de las zonas centrales, similares a las del tejido de frutas no tratadas. Por otro lado, en la microfotografía obtenida con el mayor aumento es posible distinguir en las células del tejido tratado por APH un cierto engrosamiento de las paredes.

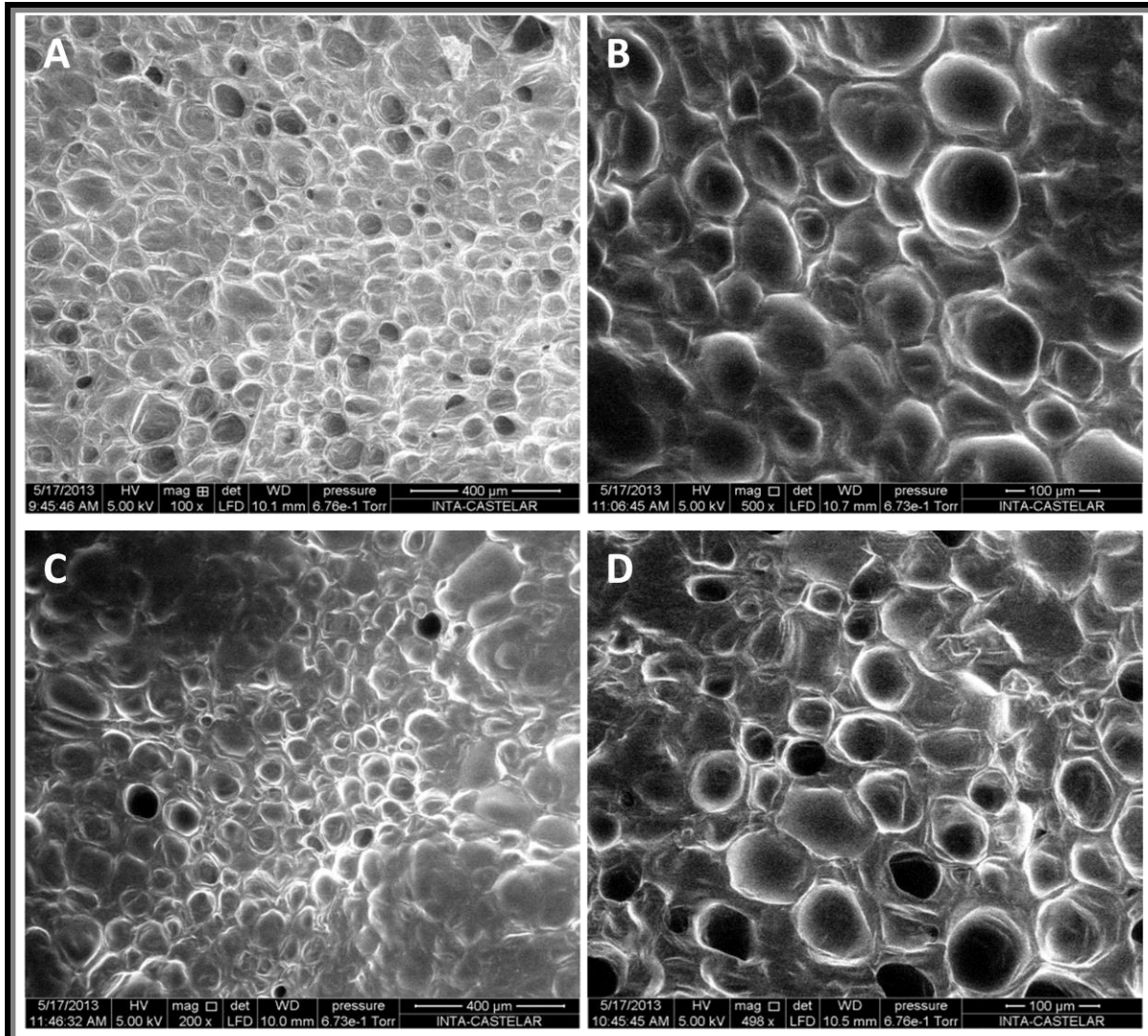


Fig. 29 Micrografía del tejido parenquimático de duraznos (Microscopía Electrónica de Barrido, bajo vacío – LV-SEM) A, B, tejido de duraznos sin ningún tipo de tratamiento; C, D, tejido de duraznos mínimamente procesados, envasados al vacío y tratados por APH (600 MPa- 5 min- T°C=25°C). Barras: A, C: 400 μm; B, D: 100 μm. Referencias: APH: Altas Presiones Hidrostáticas

3.5.2.4 Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Las figuras 30, 31, 32 y 33 permiten comparar, mediante micrografías obtenidas en los microscopios óptico y de transmisión electrónica, los aspectos morfológicos de los tejidos de duraznos sin ningún tipo de tratamiento (fig. 30 a-f), de duraznos mínimamente procesados y envasados al vacío (fig. 31 a-f), y de duraznos mínimamente procesados, envasados al vacío y tratados por APH (fig. 32 a-f y 33 a-f).

Se observa en los cortes semifinos de tejido de duraznos sin ningún tipo de tratamiento, que las células aparecen homogéneamente teñidas con azul de toluidina (fig. 30-a). Las células que

3.5 Resultados y Discusión-Capítulo 4

componen este tejido parenquimático presentan una forma redondeada y un aspecto turgente, con espacios intercelulares bien conservados, de forma típicamente triangular y sin evidencia de trasvase de contenido citoplasmático proveniente del medio intracelular. Cuando se observa con mayor detalle mediante TEM (Fig. 30 d-f), las paredes celulares aparecen homogéneas y con la membrana celular (plasmalema) estrechamente asociada a las mismas.

Por otro lado, se observa que el tejido de duraznos mínimamente procesados y envasados al vacío mantiene características similares a las descritas para el material fresco. Sin embargo, la forma de las células se encuentra algo alterada, adquiriendo estas un aspecto más alargado. Además, los bordes adquieren amplias lobulaciones, con los espacios intercelulares más reducidos que en el material fresco, apreciándose en algunos casos una disrupción de la membrana plasmática y una separación de la misma de la pared celular (Fig. 31 c). En las micrografías con mayor detalle (TEM), puede observarse que las paredes celulares conservan una estructura homogénea, aunque aparecen irregularidades en los márgenes internos de la pared celular (Fig. 31 e y f), permaneciendo la membrana celular (plasmalema) estrechamente adherida a la pared celular.

Por otra parte, los cortes semifinos de los duraznos tratados por APH, muestran células de forma muy irregular, con lobulaciones que invaden los espacios intercelulares. De esta manera, los espacios intercelulares aparecen drásticamente reducidos en tamaño, hasta incluso desaparecer por completo (fig. 32-a). Además, se observa en algunos de ellos restos de material citoplasmático. Las paredes celulares (fig. 32-b y c) exhiben un espesor mayor que en el tejido de los restantes tratamientos, con zonas (fig. 32 c) que presentan un desdoblamiento o separación en capas de la pared celular. Esto sugiere la posibilidad de que hayan sufrido un hinchamiento por hidratación como consecuencia de la exposición a las APH. Con respecto a las membranas celulares, se observa la aparición de disrupciones y la separación de la misma con respecto a la pared, lo cual evidencia el efecto sufrido por el tratamiento.

Al observar el tejido con mayor detalle por TEM (fig. 32 d-f), es posible identificar en la pared celular, la existencia de zonas más claras en el centro que en los bordes, lo que evidencia el cambio sufrido, con signos de desorganización y de un proceso de hidratación de su estructura. Esto podría ser el resultado de la separación de las uniones entre las fibrillas de celulosa como consecuencia de la hidratación de la matriz de la pared, lo que a su vez podría derivar en la solubilización de esta matriz. Como resultado, las paredes aparecen engrosadas en determinadas zonas de la célula, mostrando un espesor variable en todo el contorno celular. Estos

3.5 Resultados y Discusión-Capítulo 4

engrosamientos están asociados a las lobulaciones que se producen en la célula y que, en algunos casos, invaden los espacios intercelulares. En cuanto a la membrana celular, la misma aparece muy delgada y dañada, llegando a separarse de la pared celular en algunos sectores.

Las figuras 33 a-f muestran las micrografías del tejido de durazno presurizado, en donde pueden observarse todos los efectos antes mencionados: la pared celular con lobulaciones y aspecto hinchado, la presencia de dobleces/esquinas pronunciadas en los contornos de las células, una intensidad en el tono de la pared celular mucho menor que en las muestras control, lo cual podría deberse a la desorganización de las fibras de celulosa, ya no tan empaquetadas. Además, las membranas plasmáticas aparecen dañadas, por lo que se pierde su continuidad, separándose a su vez de la pared. Por otra parte, se observa que mientras la estructura interna citoplasmática de las células se alteró luego de la aplicación de las APH, algunos componentes complejos celulares no presentaron alteraciones, como por ejemplo los plasmodesmos (fig. 33 c), que representan a estructuras que conectan los protoplasmas de células adyacentes.

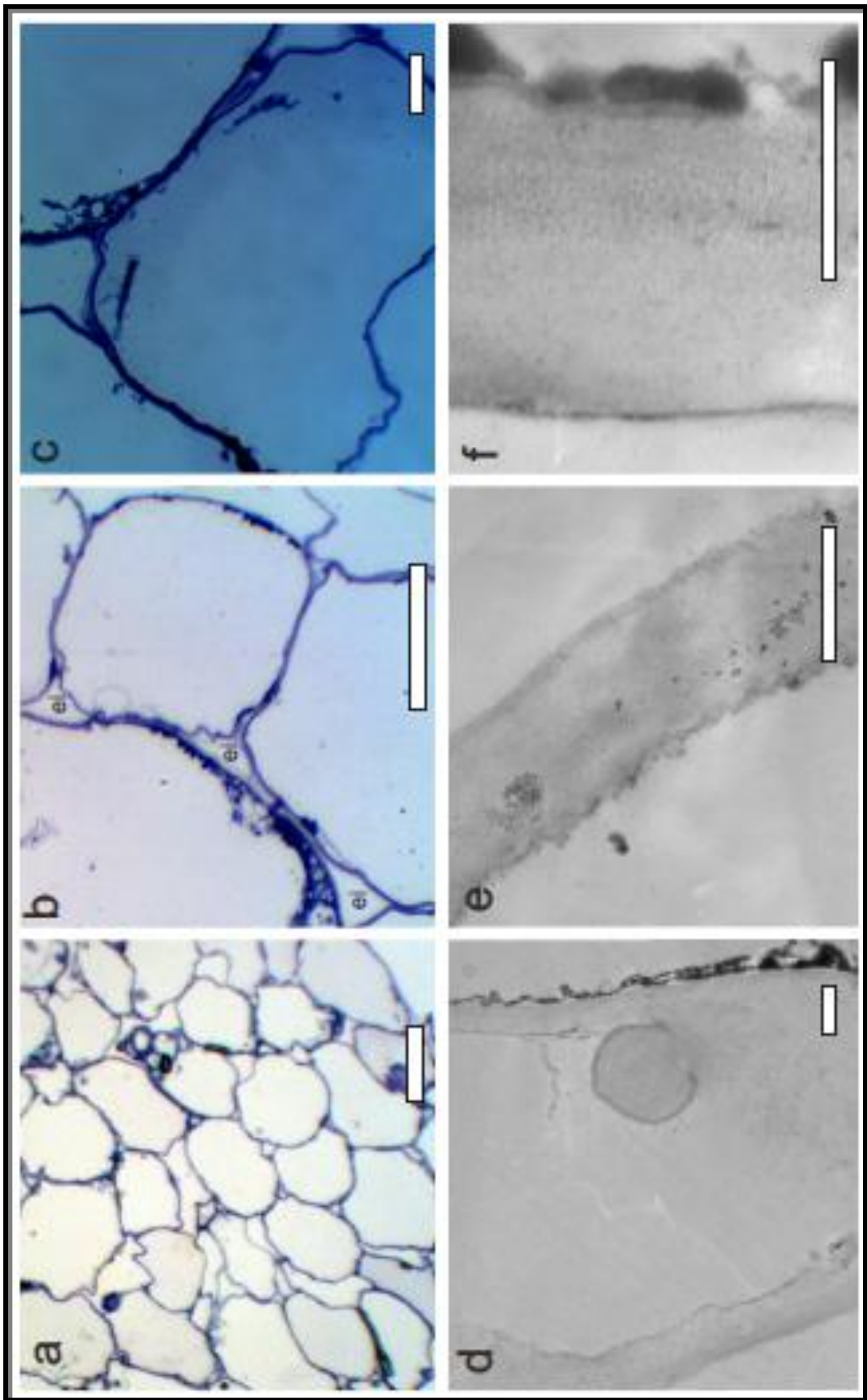


Fig. 30 Tejido parenquimático de durazno fresco. (A- C, observaciones de cortes semifinos con microscopio óptico; D-F, observaciones con microscopio electrónico de transmisión. Referencias: ei- espacio intercelular. Barras a-100 μ m; b-50 μ m; c-10 μ m; d, e -1 μ m; f-0,5 μ m

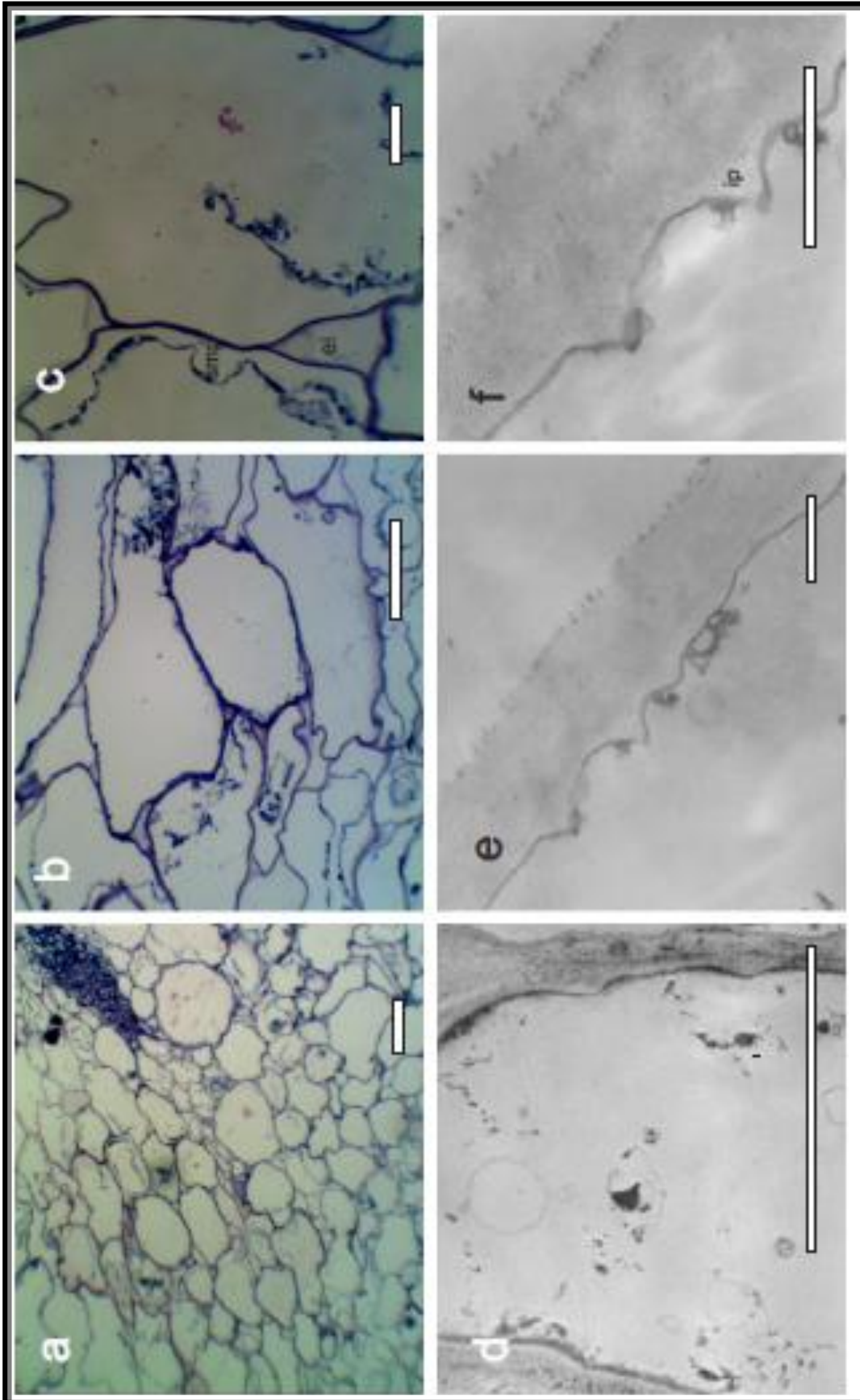


Fig. 31 Tejido parenquimático de durazno mínimamente procesado y envasado al vacío. A-C, observaciones con microscopio óptico; D-F, observaciones con microscopio electrónico de transmisión. Referencias: ei- espacio intercelular ip-irregularidad de la pared; smp-separación membrana pared. Barras: a-100 μm ; b-50 μm ; c, d-10 μm ; e, f- 1 μm .

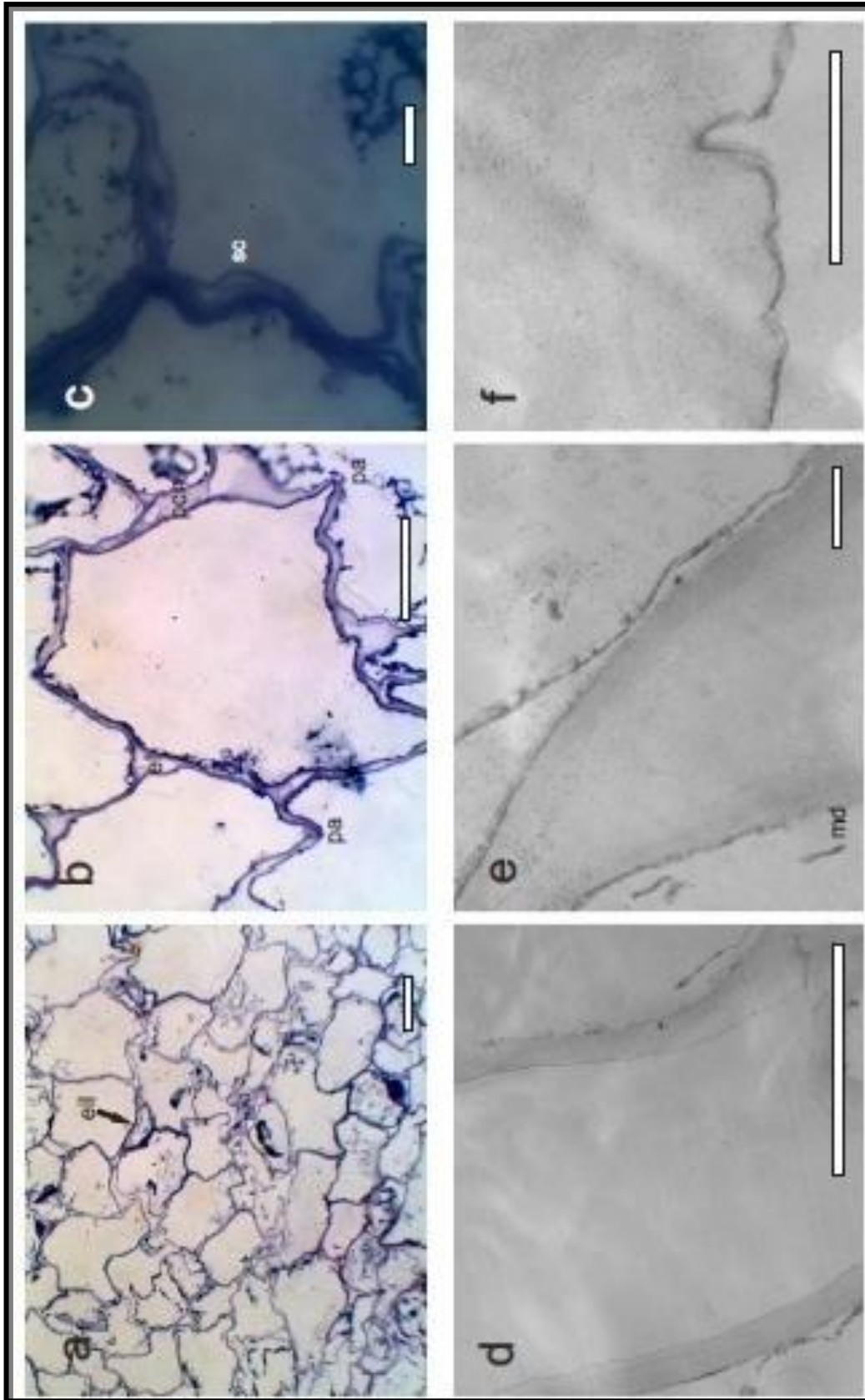


Fig. 32 Tejido parenquimático de durazno mínimamente procesado, envasado al vacío y tratado por APH (600 MPa- 5 min- T°C=25°C). Referencias: eil- espacio intercelular lleno de material citoplasmático, md- membrana celular dañada pa- lobulación que invade espacio intercelular; pca- pared celular hinchada sc- desorganización de la pared celular. Barras: a-100 µm; b-50 µm; c, d -10 µm; e, f-1 µm

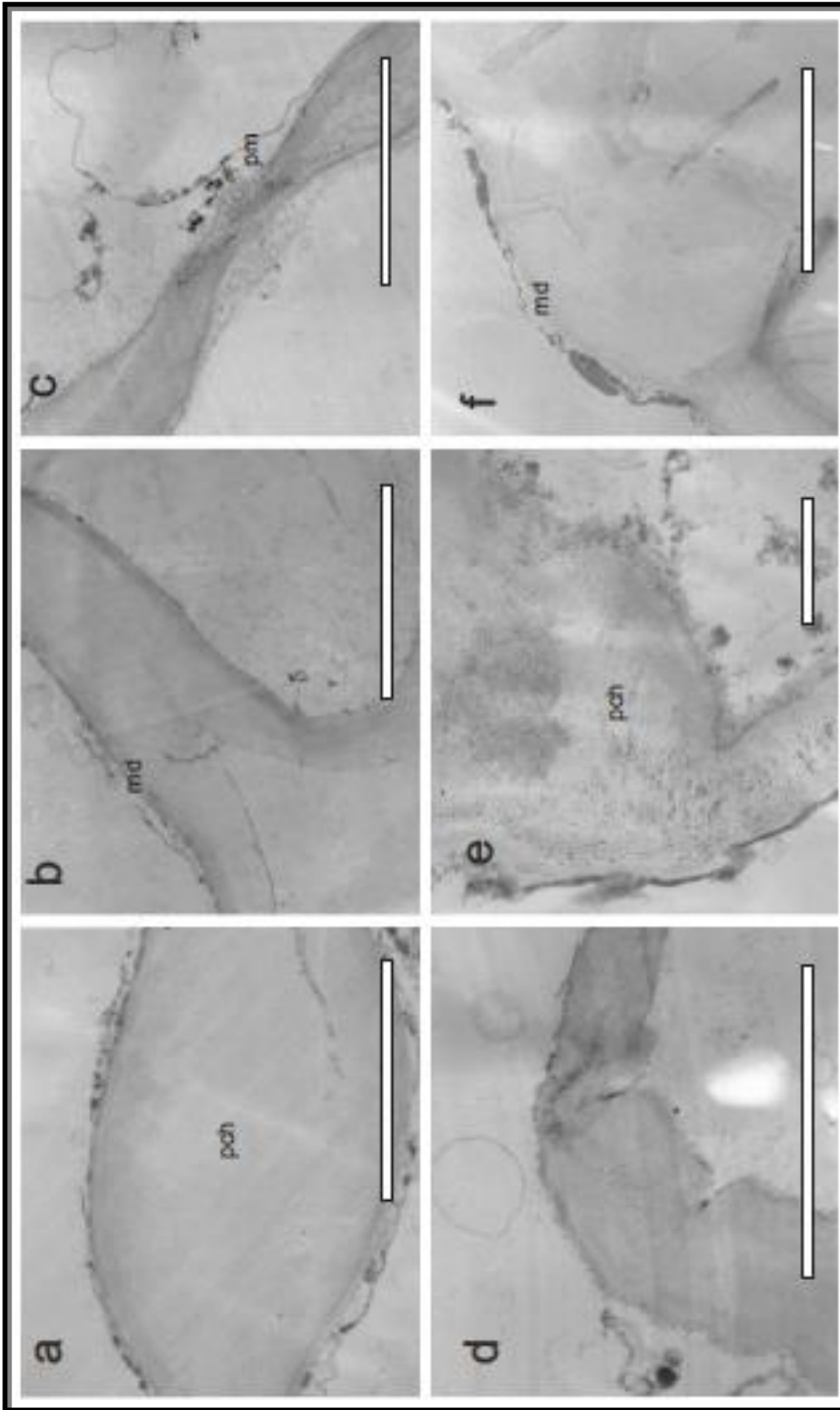


Fig. 33- Tejido parenquimático de durazno mínimamente procesado, envasado al vacío y tratado por APH (600 MPa- 5 min- 1°C=25°C). Referencias: md- membrana celular dañada; pch- pared celular hinchada; pm-plasmodesmo. Barras: a-d, f: 5 μ m; e-2 μ m

3.5.3 Discusión

3.5.3.1 *Viabilidad celular*

El estudio de la viabilidad celular permite determinar mediante la evaluación de la integridad de sus membranas, si las células de un tejido conservan intactas las características metabólicas y fisiológicas. Esta técnica se basa en establecer la capacidad de incorporación y retención activa, por parte de una célula viva, de colorantes supravitales, tales como el rojo neutro o la fluoresceína, o mediante la tinción pasiva de los contenidos de células muertas con colorantes tales como azul *Evans*, que tiene la capacidad de drenar a través de células dañadas. El método con FDA ha sido utilizado en frutas para estudiar el tejido parenquimático de especies como uvas (Krasnow y col., 2008) y pepinos (Sajón y col. 2003). Este método detecta la existencia de un metabolismo celular activo, al visualizar la fluorescencia resultante del transporte del FDA a través de membranas y su posterior conversión en un compuesto fluorescente. En el caso de que las membranas estén intactas, este compuesto no podrá pasar a través de las mismas llegando al interior de la célula, en donde se encuentran enzimas intracelulares del tipo esterasa capaces de clivar al grupo diacetato produciendo un producto altamente fluorescente.

De acuerdo con este principio, los resultados del presente ensayo evidencian la ausencia total de fluorescencia en el tejido de durazno tratado por APH, a diferencia del tejido sin presurizar, en donde esta propiedad pudo ser observada en la mayoría de las células. Es importante destacar que este hecho podría ser consecuencia tanto de la pérdida total de integridad de las membranas debido a la presurización como de la inactivación completa de esterasas intracelulares, que son las encargadas de clivar al compuesto fluoróforo.

La falta de viabilidad de células expuestas a APH fue también observada por González y col. (2010-d) en tejido de cebolla presurizado (en un rango de 50 a 600 MPa por 5 min) aunque en esta investigación se utilizó la técnica del colorante rojo neutro. En relación al nivel de viabilidad encontrado por estos autores, las muestras tratadas a 50 MPa mostraban prácticamente todas sus células viables, en una proporción similar a las muestras control o las envasadas al vacío. Así mismo, a 200 MPa había una disminución significativa de la proporción de células viables, mientras que a niveles de 300 MPa o superiores había una completa ausencia de células viables. Por otra parte, Domenburg y Knorr (1997) encontraron que solamente alrededor de un tercio de células de papa expuestas a 150 MPa por 10 min resultaban viables, mientras que la exposición a 200 MPa por 10 min causaba la pérdida total de viabilidad de las células. A ese nivel de presión,

3.5 Resultados y Discusión-Capítulo 4

estos autores observaron fenómenos celulares como la pérdida de compartimentalización, la liberación de enzimas líticas y compuestos ácidos contenidos en las vacuolas hacia el citoplasma, resultando en la muerte celular. Además, en esa investigación se encontró que a partir de 175 MPa se producía un aumento en el contenido de proteína y fenoles en el medio, indicando la permeabilización irreversible del tonoplasto que rodea a la vacuola. En la presente tesis, también se observó un aumento significativo en la concentración de fenoles en duraznos mínimamente procesados luego de tratamientos de APH de entre 500 y 700 MPa por 1-5 min, lo cual podría relacionarse con la permeabilización de las membranas celulares.

En relación al mecanismo que torna inviables a las células, Préstamo y Arroyo (1999) sugieren que las APH producen alteraciones en los canales iónicos, lo cual resulta en cambios de la permeabilidad celular. Estos canales son estructuras dinámicas que cambian entre estado abierto y cerrado, regulando de esta forma la permeabilidad celular y manteniendo el turgor necesario en un tejido vegetal, de forma análoga a las porinas bacterianas. En otro estudio en el que se utilizó la técnica de relajación de protones por resonancia magnética nuclear, se observó que las APH causaban una redistribución microscópica de agua, junto con una gelatinización de biopolímeros celulares, lo cual constituye una evidencia adicional de los cambios en la permeabilidad de membranas producidos por la exposición a las APH (Hills y col., 2005; Marigheto y col., 2004).

3.5.3.2 *Expresión relativa de enzimas a nivel de ARNm y su comparación con la actividad enzimática*

Los resultados del presente capítulo muestran que las APH tienen un efecto claramente inhibitorio sobre la mayoría de las enzimas estudiadas (PAL, PDC y ADH). La única enzima dentro de las estudiadas que no resultó afectada por los tratamientos a nivel transcripcional fue la PPO, que si bien mostró un cierto nivel de activación, este no fue estadísticamente significativo. Por otra parte, al medir en forma directa la actividad enzimática, se observa que los tratamientos provocaron una disminución en la actividad de esta última enzima en relación al control. Es sabido que la enzima PAL cataliza la conversión de la L-fenilalanina a ácido *trans*-cinámico, la cual constituye el primer paso de la ruta metabólica de los fenilpropanoides (Li-Qin y col., 2009). Analizando el efecto conjunto sobre esta enzima y la PPO, ambas relacionadas con el pardeamiento, puede concluirse que los tratamientos de APH tendrían un efecto inhibitorio sobre este tipo de alteración. Esta conclusión se basa en que por un lado se estaría limitando la síntesis del sustrato de la reacción (fenoles) a través de la inhibición de la transcripción de la enzima PAL y por otra parte, se afectaría la funcionalidad de la enzima PPO, ya que si bien el presente ensayo su

3.5 Resultados y Discusión-Capítulo 4

expresión no fue inhibida, su actividad se redujo significativamente con respecto al control. En este sentido, Mentré y Hoa (2001) consideran que las APH tienen la capacidad de inhibir la traducción genética en organismos unicelulares, sugiriendo que la sensibilidad de los ribosomas a la presión sería el factor que más contribuye a este fenómeno. Estos autores determinaron que ya una presión de 70 MPa tendría un efecto sobre el complejo ribosomal.

Se ha informado que la aplicación de condiciones de estrés como las APH y los procesos de cortado en tejidos vegetales pueden inducir la activación de genes relacionados con los mecanismos de defensa, entre ellos la biosíntesis de enzimas como la PPO (Jacobo-Velázquez y Hernández-Brenes, 2010; Orozco-Cárdenas y col., 2001). Sin embargo, en el presente trabajo, el efecto inhibitorio sobre la actividad de las enzimas PPOs presentes y sobre la síntesis de fenoles sería más preponderante que la activación de dichos mecanismos. En este sentido, el efecto directo sobre el producto que fuera observado en la práctica en relación a la disminución en la velocidad de pardeamiento, reflejado por la disminución del parámetro $\Delta a^*/\text{min}$, respalda esta aseveración.

En relación al metabolismo fermentativo, los análisis por RT-PCR mostraron que las APH provocaron una inhibición estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de los niveles de ARNm de las dos enzimas más importantes involucradas en esta alteración: PDC y ADH. Además, al medir directamente la actividad enzimática de la ADH se observó la inhibición total de la misma. Este estudio concuerda con el efecto observado en ensayos anteriores, en donde las APH previnieron la acumulación de etanol en productos tratados.

El efecto de APH sobre la expresión génica de plantas superiores es un tema muy poco estudiado hasta el momento. Existen trabajos realizados con arroz, en donde se comprobó que las APH provocan diversos efectos como la inhibición de la expresión de esterases y la disminución de la actividad de las enzimas α - y β -amilasa. Estos cambios sugieren que las APH tienen la capacidad de inducir respuestas adaptativas en semillas y plantas de arroz mediante cambios en la expresión de genes involucrados en la regulación transcripcional, el metabolismo y la respuesta al estrés (Liu y col., 2008). Mentré y Hoa (2001) encontraron en organismos unicelulares que las APH afectaban la expresión de genes tanto a nivel transcripcional como traduccional. En la mayoría de los casos, la expresión de genes se inhibe a niveles de presión inferiores a 100 MPa aunque a esos niveles de presión puede inducirse la expresión de algunas proteínas relacionadas con la respuesta al estrés.

3.5 Resultados y Discusión-Capítulo 4

Este último aspecto discutido ha sido hasta el momento muy poco abordado, por lo cual representa un interesante campo de estudio a desarrollar en el futuro.

3.5.3.3 *Microscopía electrónica de barrido en modo bajo vacío (LV-SEM)*

Los resultados del presente ensayo mostraron que la estructura general del tejido de duraznos sometidos a un tratamiento de APH de 600 MPa por 5 min no presentaba alteraciones significativas al analizarse por esta técnica de microscopía. En un estudio previo realizado con zanahorias, Knockaert y col. (2011) tampoco encontraron cambios notorios en las paredes celulares luego de la aplicación de un tratamiento de intensidad comparable (500 MPa por 15 min). Contrariamente, Tangwongchai y col. (2000) observaron en tomate un efecto marcado sobre la topografía del tejido, incluso con presiones inferiores. Así, estos autores concluyeron que las APH pueden ser destructivas para los tejidos de esta especie a partir de los 200 MPa. Si bien en esa investigación se encontró que a 200 MPa, la estructura del tejido no presentaba grandes diferencias con respecto a las muestras sin presurizar, se pudo observar una cierta injuria celular de los tejidos de tomate incluso a ese nivel de presión. Los mayores daños observados se correspondieron con las mayores presiones aplicadas, aunque las diferencias fueron menores por encima de 300 MPa. Entre las alteraciones detectadas, estos autores mencionaron el plegamiento y ondulación de la pared celular como consecuencia del colapso celular sufrido, lo cual se tradujo macroscópicamente como una pérdida de turgor y firmeza de los frutos.

3.5.3.4 *Microscopía de transmisión electrónica (TEM)*

Las imágenes obtenidas mediante la tecnología TEM evidencian que aunque las células del tejido de duraznos sometidos a los tratamientos de APH sufrieron ciertos cambios morfológicos, la alteración fue sólo parcial, pudiendo identificarse claramente los bordes celulares, lo cual denota que el daño no fue masivo. Por otra parte, si bien las paredes presentaron algún signo de desorganización, observándose un proceso de hidratación de su estructura, las mismas no presentaron evidencias de ruptura. En estudios similares, Woolf y col. (2013) también informaron que este tipo de tratamiento no producía daños considerables en la microestructura de paltas. Por otra parte, muchas de las estructuras subcelulares permanecieron inalteradas, lo cual indicaría que su funcionalidad también estaría conservada. Entre estas estructuras, una de las que no presentaron prácticamente cambios fueron los plasmodesmos, lo cual fue también informado en un estudio previo realizado con pimientos (Hernández-Carrion y col., 2014-a)

3.5 Resultados y Discusión-Capítulo 4

Más allá de los cambios microestructurales observados, el hecho de que la estructura global de los tejidos permanezca conservada, constituye una evidencia de que las propiedades estructurales del durazno no sufrirán en general grandes alteraciones luego de las APH. Entre las alteraciones morfológicas encontradas se pueden mencionar la presencia de células lobuladas de aspecto hinchado, los espacios intercelulares reducidos, la presencia de dobleces en el contorno celular y una cierta desorganización de las fibras de celulosa. Estos hallazgos son similares a los descritos en cebollas por Vázquez-Gutiérrez y col. (2014), quienes incluso observaron la solubilización de la pared celular, con la membrana celular separada de la misma. Por su parte, Hernandez-Carrión (2014-a) también observaron en pimientos presurizados la presencia de células deformadas, paredes celulares ensanchadas, con un grado importante de ruptura y pérdida de agregación de fibras. En ese trabajo se probaron tratamientos de entre 100 y 500 MPa por 15 min y los autores indicaron que, notoriamente, los tratamientos de mayor nivel de presión eran los que provocaban menores daños en la estructura del vegetal. En esa especie, las paredes celulares se observaron incluso completamente separadas entre sí, incrementando la porción de apoplasto, con grandes espacios intercelulares, ruptura de la membrana celular y salida del contenido citoplasmático hacia los espacios intercelulares.

Estas importantes diferencias entre lo encontrado en el presente trabajo y lo informado en otras especies como el pimiento, en conjunto con la conocida capacidad de los duraznos de soportar la exposición a condiciones de anaerobiosis severas sin grandes alteraciones (Polenta y col., 2005) como las producidas por el envasado en vacío, sugieren que la especie utilizada en el presente trabajo de tesis como modelo experimental, representa una materia prima especialmente adecuada para la combinación de tratamientos propuesta (APH + envasado al vacío).

En relación al aumento del grosor/hinchamiento de las paredes celulares, este fenómeno fue también informado en especies como zanahorias sometidas a tratamientos de 300-400 MPa (Trejo Araya y col., 2007). En esta especie, el porcentaje de aumento del grosor de la pared celular se estimó en un 10%, aunque los autores de este trabajo destacan que a pesar de los cambios conformacionales en la pared, se observaron pocas áreas rotas, por lo cual sugieren que la estructura no habría sufrido grandes alteraciones. Hartmann y Delgado (2004) explican que las alteraciones que se producen en las paredes celulares son consecuencia de las intensas condiciones del tratamiento, el cual provoca una excesiva tensión en las membranas y transmite una fuerza considerable a las paredes celulares.

3.5 Resultados y Discusión-Capítulo 4

Es interesante también el fenómeno observado de reducción de espacios intercelulares y el llenado de los mismos con material citoplasmático, producido como consecuencia de la aplicación del tratamiento de APH, lo cual fue también observado en duraznos amarillos presurizados (600 MPa- 5 a 30 min) por Zhang y col. (2012) y por Hernández-Carrion y col. (2014-b) en caqui presurizado (200 MPa- 5 min). Estos últimos autores sugieren que los cambios estructurales provocados por el tratamiento de APH favorecen el movimiento de contenido citoplasmático a nivel celular, probablemente utilizando rutas de transporte apoplásticas, simplásticas y transmembrana. Dado que este fenómeno aumenta de manera importante la extractabilidad y disponibilidad de algunos compuestos bioactivos, favoreciendo su difusión desde el interior hacia el exterior de la célula, este hecho refuerza lo mencionado para estos tratamientos en relación a su utilidad para otorgarle a los productos vegetales procesados características de alimentos funcionales.

El único efecto de las APH sobre la microestructura de productos vegetales tratados que tiene un impacto negativo en la apariencia macroscópica es el aumento de permeabilidad celular y el consecuente movimiento de agua hacia el exterior de la célula, lo cual resulta en un aspecto traslúcido o aguachento (Rastogi, 2009). Sin embargo, es importante mencionar que en el presente trabajo, este efecto ya se había producido en la fruta luego del envasado al vacío.

3.5.4 Conclusiones

El trabajo del presente capítulo permitió profundizar los conocimientos sobre la relación existente entre la exposición de un producto vegetal a las APH y la viabilidad de los tejidos. Así, se comenzó a incursionar sobre un aspecto emergente y que probablemente será un tema importante en los próximos años, relacionado con el enfoque tradicional de la definición de fruta u hortaliza mínimamente procesada. De esta manera, se plantean nuevos interrogantes que deberán ser resueltos con el avance de las investigaciones y la revisión de los conceptos. Los interrogantes se originan en el hecho de que, si bien se demostró en el presente trabajo que los tejidos presurizados no son viables en términos de los ensayos de viabilidad clásicos, el análisis de distintos procesos bioquímicos presentes en las muestras presurizadas, como la expresión relativa del ARN de los genes relacionados con las enzimas analizadas, evidenciaron que estos procesos metabólicos se encuentran aún activos en los tejidos luego de la aplicación del tratamiento.

3.5 Resultados y Discusión-Capítulo 4

Aunque la expresión de la enzima PPO no se vio afectada significativamente por el tratamiento de APH, la disminución de su actividad por efecto de la presión, junto con la expresión disminuida del gen de la PAL, una enzima relacionada con la síntesis de fenoles, fueron suficientes para limitar el desarrollo de pardeamiento. Esto se vio reflejado en una disminución significativa de la velocidad de cambio del valor a^* de los duraznos (un parámetro relacionado con la magnitud de desarrollo del pardeamiento) luego de abrir los paquetes y exponer los tejidos al oxígeno atmosférico.

Por otra parte, la exposición a las APH inhibieron totalmente a la enzima ADH, aunque la fruta se encontraba en un ambiente anaeróbico por el envasado al vacío. Los estudios de ARN y de actividad enzimática determinaron que la expresión de las enzimas ADH y PDC estaba reprimida, constatándose al mismo tiempo una disminución de la actividad de la ADH, lo que en conjunto resultó en la prevención del desarrollo de un metabolismo fermentativo en el producto envasado al vacío.

En relación a los aspectos estructurales, los estudios de microscopía determinaron que la estructura general del tejido de durazno permaneció conservada luego del tratamiento definido como óptimo (600 MPa por 5 min a 25°C). Así, este estudio demostró que en el tejido del durazno, las células se mantuvieron identificables, mientras que las paredes celulares no mostraron evidencia de ruptura luego de la aplicación del tratamiento, presentando solamente un cierto engrosamiento por la absorción de líquido. Esta última observación puede relacionarse con la evaluación textural de los capítulos anteriores, en donde se detectó una cierta “gomosidad” en los productos presurizados, resultando más sensibles a la deformación mecánica que los duraznos sin tratar, razón por la cual se buscó minimizar este aspecto en los estudios de optimización.

Los estudios de microscopía permitieron a su vez comprender mejor el efecto de translucidez que confieren estos tratamientos al producto, lo cual puede explicarse estructuralmente por la reducción de los espacios intercelulares, el llenado de estos últimos con material citoplasmático, y la alteración en las membranas celulares observados en las micrografías.

Los resultados del presente capítulo constituyen una fuerte evidencia de que, aunque se induce una modificación menor en algunas propiedades propias de un tejidos vivo, los duraznos presurizados preservan gran parte de los aspectos que caracterizan a un producto “fresco”. En consecuencia, sería necesaria una profunda revisión de las definiciones clásicas, especialmente aquellas que relacionan a la fisiología y bioquímica los tejidos con los aspectos que pueden tener

3.5 Resultados y Discusión-Capítulo 4

un impacto significativo en la percepción de los consumidores, y que sin duda se verán reflejados en sus preferencias a la hora de elegir un producto. Uno de los aspectos más importantes está relacionado con la condición de “frescura” de las frutas y hortalizas mínimamente procesadas, cuya redefinición podría alentar la difusión y adopción de las nuevas tecnologías de preservación como las APH.

3.6 Capítulo V

**Estudio de la vida útil de duraznos
mínimamente procesados preservados
con APH**

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

3.6.1 Introducción

La parte final del presente trabajo de tesis se llevó a cabo con el objetivo de profundizar el conocimiento del efecto de un paquete tecnológico optimizado que incluya a las APH junto con otras tecnologías de barrera (acidificación, envasado al vacío, refrigeración) sobre el producto final, con el fin de obtener un producto mínimamente procesado a base de duraznos con altos estándares de calidad y vida útil extendida. En función de esto, se eligieron los análisis que permitieran evaluar los aspectos ligados a la preservación de la calidad, a la prevención de las principales alteraciones fisiológicas (pardeamiento y desarrollo de metabolismo anaeróbico) y a la extensión de la vida útil.

Si bien las APH se han consolidado como una alternativa eficaz para mejorar la estabilidad microbiológica de distintos productos alimenticios, en el caso de los productos frutihortícolas mínimamente procesados, en donde los tejidos aún presentan actividad metabólica, la vida útil puede estar limitada por otros factores, como por ejemplo, el deterioro de las propiedades sensoriales, asociado al desarrollo de alteraciones fisiológicas. Por lo tanto, para poder evaluar y definir su vida útil, se hace imprescindible considerar en el diseño de este tipo de estudio la mayor cantidad posible de aspectos relacionados con la calidad del producto y su preservación adecuada durante el almacenamiento (Jacobo-Velázquez y col, 2010).

Existen hasta el momento escasas experiencias sobre la aplicación de este tipo de tecnologías para la conservación de productos similares al considerado en el presente trabajo de tesis. Entre ellos, puede mencionarse un estudio realizado por Guerrero-Beltrán y col. (2005-b) con puré de duraznos, en el cual se utilizaron las APH en combinación con agentes inhibidores del pardeamiento y con la frigo-conservación, para preservar al producto. Estos autores llegaron a la conclusión de que la estrategia de combinación de tecnologías adecuadamente elegidas representa una alternativa válida para reducir la carga microbiana del producto e incrementar su vida útil, logrando una buena preservación del color mediante la inhibición de las PPOs y en consecuencia del pardeamiento. En otro trabajo llevado a cabo con mitades de nectarinas, Miguel-Pintado y col. (2013) informaron que el procesamiento por APH resultó adecuado para la preservación del producto en condiciones adecuadas de comercialización por al menos un mes.

Una vez establecidas las condiciones óptimas del tratamiento de APH en base a los ensayos realizados a lo largo del trabajo experimental de tesis, en el presente capítulo se buscó obtener un conocimiento más profundo sobre el efecto de esta tecnología aplicada en duraznos, utilizando

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

conjuntamente las otras estrategias definidas durante la investigación: acidificación, envasado al vacío y refrigeración. El procesamiento por APH se realizó mediante la exposición de las piezas de duraznos a 600 MPa durante 5 min a temperatura ambiente, evaluándose dos temperaturas de conservación (4 y 20°C). De esta forma, el estudio se focalizó particularmente en la preservación de las características de calidad y la ausencia de alteraciones durante la vida útil de los duraznos mínimamente procesados.

3.6.2 Resultados

3.6.2.1 *Análisis de perfil de textura (TPA)*

Aunque en el presente capítulo fueron determinados todos los parámetros incluidos en el TPA, solo se presentan los resultados de los parámetros dureza, adhesividad, masticabilidad y resiliencia, dado que fueron los únicos en los cuales se encontraron diferencias estadísticamente significativas, ya sea entre tratamientos y/o durante el período de almacenamiento.

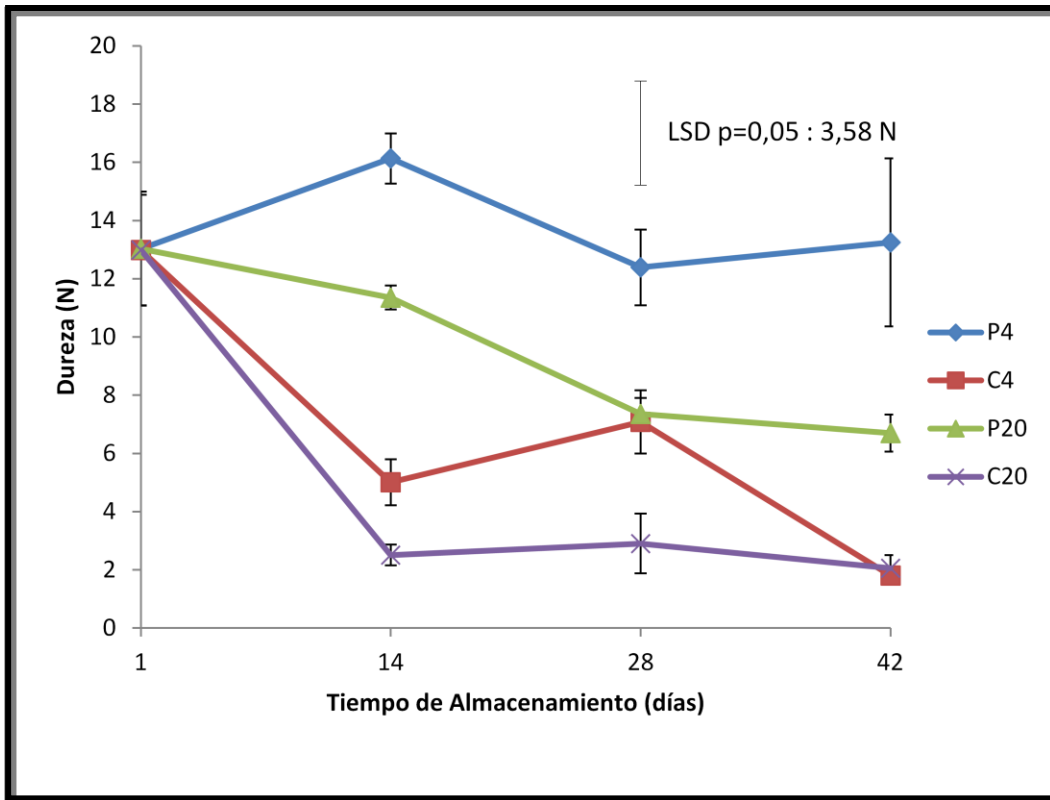


Fig. 34 Evolución del parámetro dureza incluido en el TPA, en cilindros de duraznos envasados en bolsas flexibles y sometidos a 600 MPa por 5 min (P) o sin presurizar (C), durante el almacenamiento a 4°C (P4 y C4) y a 20°C (P20 y C20). Las barras verticales representan la desviación estándar.

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

Las figuras 34, 35, 36 y 37 muestran respectivamente la evolución de los parámetros dureza, adhesividad, masticabilidad y resiliencia en duraznos mínimamente procesados envasados, sin tratamiento de APH (C: Control) o tratados por APH (P: sometidos a 600 MPa por 5 min), durante el almacenamiento (0, 14, 28 y 42 días) a dos temperaturas diferentes (4°C y 20°C).

Se observa en la figura 34 que los distintos tratamientos (control y las presurizadas) no presentaron diferencias significativas ($p>0,05$) de dureza en el momento inicial (un día después de aplicados los tratamientos). A los 14 días y a ambas temperaturas ensayadas, las muestras control presentaron valores significativamente menores ($p<0,05$) que las presurizadas. Por otra parte, entre las muestras sometidas a tratamiento de APH, las almacenadas a 20°C presentaron una mayor tasa de ablandamiento que las almacenadas a 4°C. Es importante mencionar que las muestras presurizadas almacenadas a 4°C no mostraron durante la conservación, una variación significativa ($p>0,05$) en relación al valor inicial de este parámetro, a diferencia de las muestras control que presentaron una reducción significativamente marcada ($p<0,05$). A los 28 días, las muestras presurizadas almacenadas a 20°C mostraron un valor de dureza significativamente ($p<0,05$) menor con respecto a las muestras sometidas al mismo tratamiento y almacenadas a 4°C, como consecuencia de una mayor velocidad de ablandamiento a lo largo del tiempo. Por su parte, las muestras control conservadas a 20°C mostraron un ablandamiento marcado, presentando el menor valor de dureza en ese momento de evaluación (28 días), mientras que las muestras control conservadas a 4°C no presentaron diferencias significativas con respecto a las muestras presurizadas y almacenadas a 20°C. Luego de 42 días de almacenamiento, las muestras control mostraron el menor valor de dureza, sin encontrarse diferencias significativas entre las muestras almacenadas a 4°C y a 20°C. Las muestras presurizadas y almacenadas a 4°C fueron las que tuvieron una menor tasa de ablandamiento, presentando una dureza significativamente mayor ($p<0,05$) con respecto al resto de los tratamientos. En comparación con el día 28, solo las muestras control a 4°C mostraron una reducción significativa de este parámetro.

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

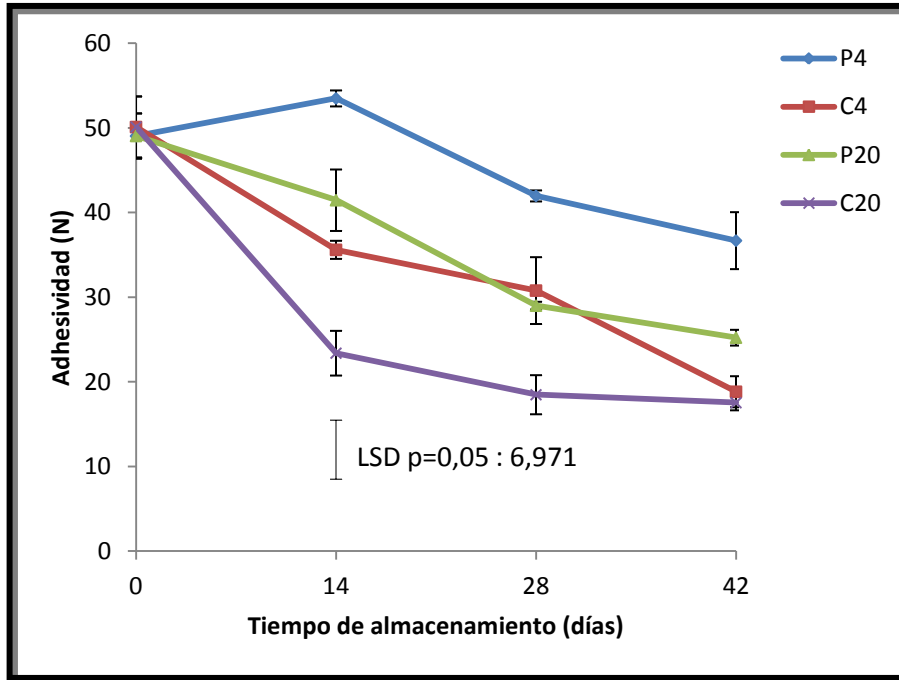


Fig. 35 Evolución del parámetro adhesividad (incluido en el TPA) en cilindros de duraznos envasados en bolsas flexibles y sometidos a 600 MPa por 5 min (P), o sin presurizar (C) durante el almacenamiento a 4°C (P4 y C4) y a 20°C (P20 y C20). Las barras verticales representan la desviación estándar.

Por otra parte, con respecto a los resultados obtenidos para adhesividad, otro parámetro incluido en el TPA, es importante mencionar que sus valores son mostrados en valor absoluto, ya que el mismo representa una fuerza contraria a la que ejerce la sonda del texturómetro, por lo que en realidad su signo es negativo. La figura 35 muestra que en el momento inicial no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras control y las presurizadas, siendo estos valores iniciales los mayores, si se consideran todos los registrados a lo largo del ensayo. Durante el almacenamiento, las muestras sometidas al tratamiento por APH conservadas a 4°C mostraron la menor variación, manteniéndose en valores similares al valor inicial, y por encima del resto de los tratamientos. A los 14 días, las muestras control almacenadas a 20°C presentaron un valor de adhesividad significativamente menor ($p < 0,05$) que el resto de los tratamientos. Luego de 28 días de conservación, se observó una disminución de los valores de este parámetro en todos los tratamientos, manteniéndose la tendencia anterior. A los 42 días, las muestras control almacenadas a 4°C mostraron una importante reducción en la adhesividad, alcanzando valores similares a los de las muestras del mismo tratamiento conservadas a 20°C. Notoriamente, las muestras presurizadas a 4°C fueron las que presentaron los mayores valores de adhesividad (estadísticamente significativos, $p < 0,05$) en relación al resto de los tratamientos.

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

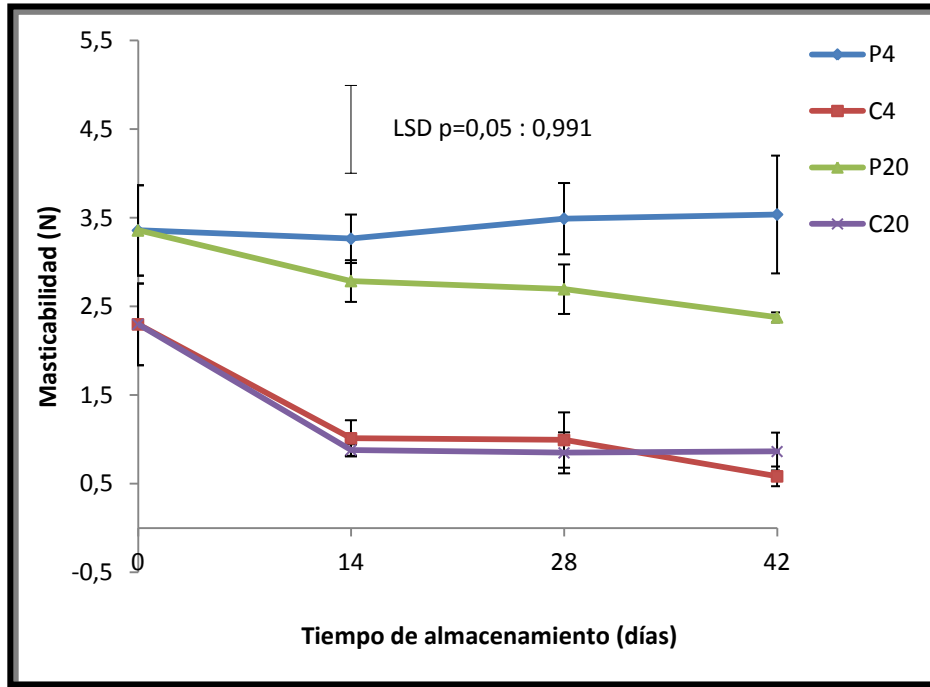


Fig. 36 Evolución del parámetro masticabilidad incluido en el TPA, en cilindros de duraznos envasados en bolsas flexibles y sometidos a 600 MPa por 5 min (P) o sin presurizar (C) durante el almacenamiento a 4°C (P4 y C4) y a 20°C (P20 y C20). Las barras verticales representan la desviación estándar.

En cuanto a masticabilidad, la figura 36 muestra que, independientemente del tiempo de almacenamiento y de la temperatura de conservación, las muestras presurizadas presentaron mayores valores ($p < 0,05$) que las muestras control. Luego de 42 días de almacenamiento, las muestras presurizadas y almacenadas a 4°C presentaron un mayor valor de masticabilidad ($p < 0,05$) que las muestras sometidas al mismo tratamiento y almacenadas a 20°C. Por otra parte, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos temperaturas de almacenamiento estudiadas (4°C y 20°C) en las muestras control, independientemente del tiempo analizado.

En lo referido a resiliencia (fig. 37), las muestras tratadas por APH presentaron al momento inicial valores significativamente mayores ($p < 0,05$) que las control. Las muestras presurizadas y almacenadas a 20°C mostraron los mayores valores de este parámetro en todos los momentos de evaluación, presentando diferencias significativas ($p < 0,05$) con las muestras control almacenadas a ambas temperaturas, independientemente del tiempo de evaluación. En general, y al igual que en el parámetro masticabilidad, el factor temperatura de almacenamiento tuvo un menor efecto sobre este parámetro que el factor tratamiento. Por otra parte, las muestras control mostraron un

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

aumento de la resiliencia con el tiempo, a diferencia de las muestras presurizadas, que no mostraron variaciones a lo largo del almacenamiento.

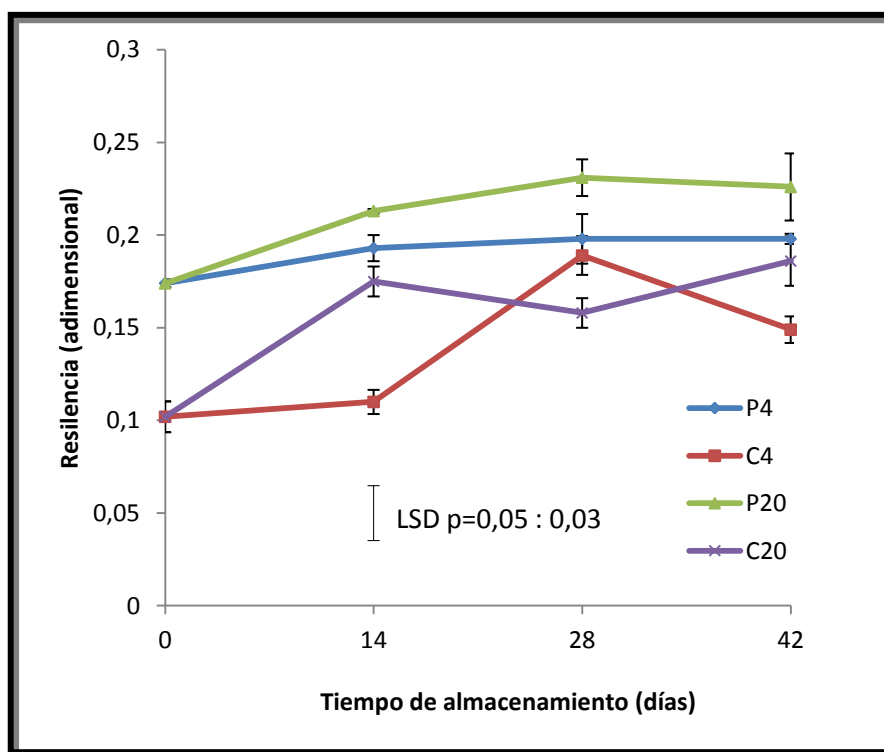


Fig. 37 Evolución del parámetro resiliencia (incluido en el TPA), en cilindros de duraznos envasados en bolsas flexibles y sometidos a 600 MPa por 5 min (P) o sin presurizar (C) durante el almacenamiento a 4°C (P4 y C4) y a 20°C (P20 y C20). Las barras verticales representan la desviación estándar.

3.6.2.2 Actividad PPO

La figura 38 muestra la actividad de la enzima PPO en duraznos mínimamente procesados sin tratamiento de APH (C: control) o tratados por APH (P: sometidos a 600 MPa por 5 min), durante el almacenamiento (0, 14, 28 y 42 días), a las dos temperaturas de conservación (4°C y 20°C).

Tanto en el momento inicial (un día después de aplicados los tratamientos) como a lo largo del almacenamiento, e independientemente de la temperatura de conservación (4°C y 20°C), las muestras presurizadas mostraron una actividad enzimática significativamente menor ($p < 0,05$) que las muestras control, lo cual es un indicio de que las altas presiones ejercieron un efecto inhibitorio sobre la PPO.

Durante el almacenamiento a 20°C, todas las muestras (tratadas y control) mostraron un aumento significativo ($p < 0,05$) en la actividad PPO hasta el día 14, seguido por una disminución hacia el final de la conservación.

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

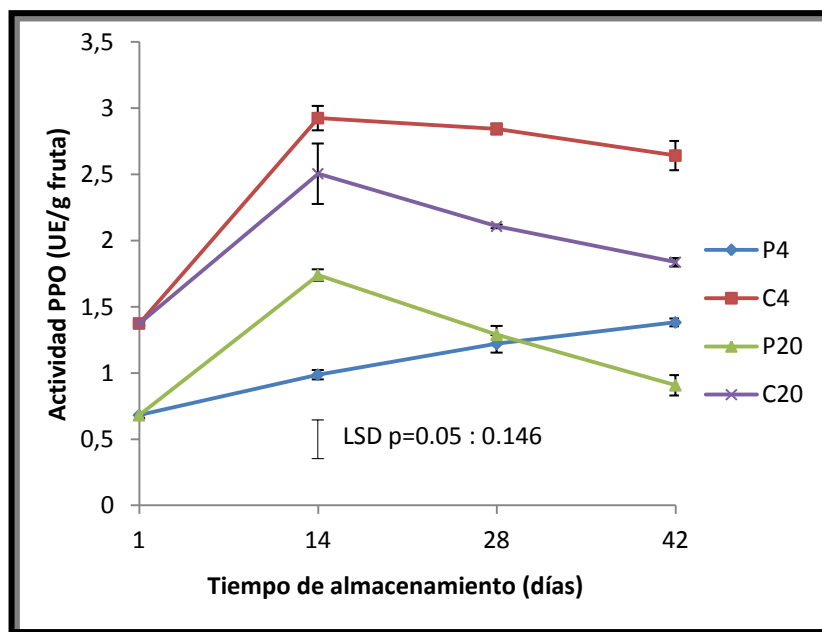


Fig. 38 Evolución de la actividad PPO en cilindros de duraznos envasados en bolsas flexibles y sometidos a 600 MPa por 5 min (P) o sin presurizar (C), durante el almacenamiento a 4°C (P4 y C4) y a 20°C (P20 y C20). Las barras verticales representan la desviación estándar.

Durante el almacenamiento a 4°C, las muestras presurizadas mostraron un aumento gradual de la actividad PPO con el tiempo, siendo este incremento significativo en los dos momentos finales (28 y 42 días) con respecto al valor inicial. Por su parte, las muestras control mostraron un aumento marcado hacia el día 14 de almacenamiento, no mostrando luego variaciones importantes (sin diferencias significativas, $p < 0,05$) durante el resto de la frigoconservación.

3.6.2.3 Potencial de pardeamiento

La figura 39 muestra el potencial de pardeamiento en duraznos mínimamente procesados sin tratamiento de APH (C: control) o tratados por APH (P: sometidos a 600 MPa por 5 min), durante el almacenamiento (0, 14, 28 y 42 días) a dos temperaturas diferentes (4°C y 20°C).

Si bien existió una cierta dispersión en los datos, se observa que las muestras presurizadas tuvieron, en general, un menor potencial de pardeamiento (menor tendencia a pardearse) que las control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el día 14. Este parámetro ha demostrado tener una estrecha relación con la actividad de la PPO, por lo que el presente análisis, además de ser coincidente, agregó una evidencia adicional a la reducción en la actividad PPO observada en el análisis anterior. Luego de 28 días de almacenamiento, las muestras control almacenadas a 4°C mostraron una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de este parámetro con respecto al día 14, no encontrándose diferencias significativas con respecto a las

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

presurizadas. Sobre el final del ensayo (día 42), no se detectó una diferenciación clara entre las muestras control conservadas a 4°C y las presurizadas y almacenadas a 20°C. Es posible que en las últimas evaluaciones haya sido más preponderante el efecto de la baja temperatura, limitando el desarrollo del pardeamiento, que el efecto del tratamiento. Igualmente, puede constatarse claramente que las muestras presurizadas a 4°C mostraron una separación estadísticamente significativa, con respecto a las muestras control a 20°C, las cuales mostraron la mayor tendencia al pardeamiento a lo largo de todo el ensayo.

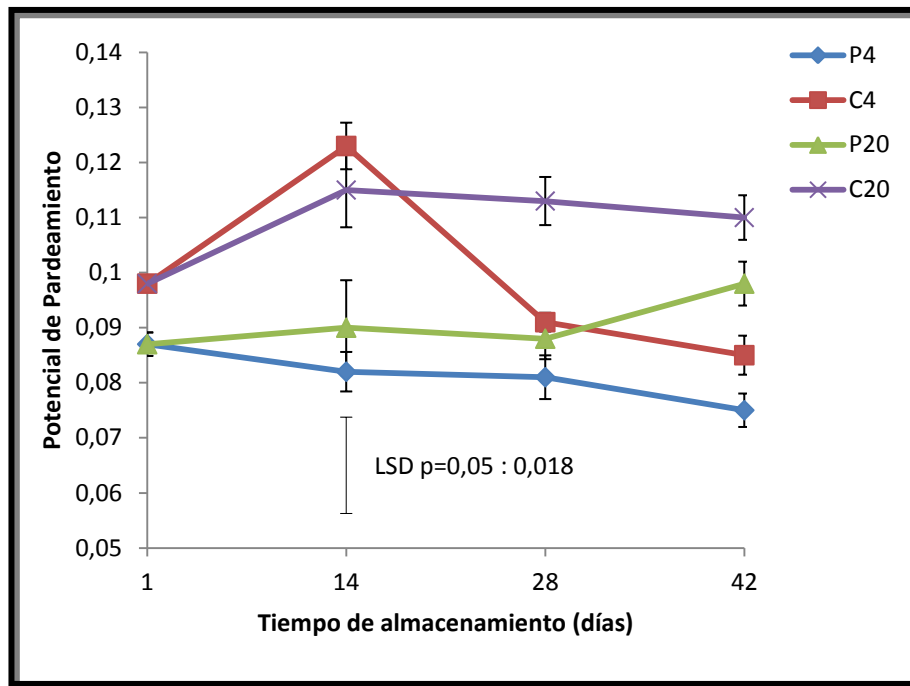


Fig. 39 Evolución del potencial de pardeamiento en cilindros de duraznos envasados en bolsas flexibles y sometidos a un tratamiento de APH de 600 MPa por 5 min (P) o sin presurizar (C), durante el almacenamiento a 4°C (P4 y C4) y a 20°C (P20 y C20). Las barras verticales representan la desviación estándar.

3.6.2.4 Concentración de etanol

La figura 40 muestra las concentraciones de etanol en duraznos mínimamente procesados sin tratamiento de APH (C: control) o tratados por APH (P: sometidos a 600 MPa por 5 min), durante el almacenamiento (0, 14, 28 y 42 días) a dos temperaturas diferentes (4°C y 20°C).

Se observa que las muestras control presentaron un contenido mayor de etanol ($p < 0,05$) que las muestras presurizadas, durante todo el almacenamiento. Las muestras control almacenadas a 4°C no mostraron variaciones con respecto a las almacenadas a 20°C hasta el día 28, a partir del cual

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

se habría inducido un metabolismo fermentativo con la consiguiente producción de este metabolito. Es importante mencionar que no es posible diferenciar con la medición de la concentración de etanol según la metodología utilizada en este capítulo (ver 2.3.5), el origen de este compuesto, pudiendo ser producido a partir del mismo tejido vegetal, o a partir de la flora microbiana contaminante. De esta forma, en el día 42 las muestras control almacenadas a 20°C mostraron un importante aumento en la concentración de este metabolito, la cual fue significativamente mayor ($p < 0,05$) a la de las muestras almacenadas a 4°C. Por el contrario, las muestras presurizadas mostraron un valor bajo, sin variaciones importantes en el tiempo, manteniéndose esta situación hasta el final del ensayo, independientemente de la temperatura de conservación.

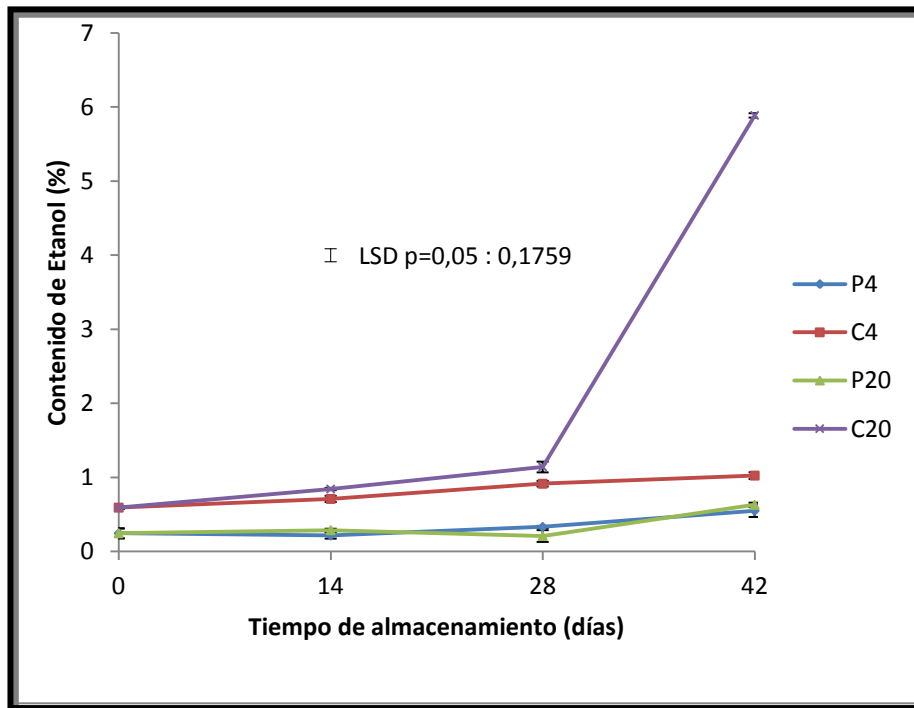


Fig. 40 Evolución del contenido de etanol en cilindros de duraznos envasados en bolsas flexibles y sometidos a 600 MPa por 5 min (P) o sin presurizar (C), durante el almacenamiento a 4°C (P4 y C4) y a 20°C (P20 y C20). Las barras verticales representan la desviación estándar.

3.6.2.5 Análisis microbiológicos

En relación a las evaluaciones microbiológicas, los resultados mostraron que tanto las muestras presurizadas almacenadas a ambas temperaturas como las muestras control almacenadas a 4°C resultaron negativas para todos los análisis realizados (Recuento de microorganismos aeróbicos viables, psicrótrofos, de bacterias ácido lácticas y de hongos y levaduras). Esto se verificó en todos

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

los muestreos, inclusive luego de 42 días de conservación (Límite de detección: 100 UFC/ml). En el caso de las muestras control almacenadas a 20°C, solamente se constató el desarrollo de colonias de mohos y levaduras (medio YEDC), con recuentos promedio de 7,31 log UFC/ml. Coincidentemente, en esas mismas muestras se observó también una abundante producción de gas que alteró el envase (hinchamiento). Las colonias desarrolladas en el medio utilizado en este análisis (YEDC) fueron caracterizadas a través de la tinción de gram, observándose en todos los casos las morfologías típicas de levaduras.

3.6.2.6 *Análisis sensorial*

La figura 41 muestra los diagramas de araña de los distintos atributos sensoriales evaluados (dureza, facilidad de ruptura, *flavor* a durazno y sabor fermentado) en duraznos mínimamente procesados sin tratamiento de APH (C: control) o tratados por APH (P: sometidos a 600 MPa por 5 min), durante el almacenamiento (0, 14, 28 y 42 días) a dos temperaturas diferentes (4°C y 20°C). El único atributo no graficado fue “otros sabores extraños”, dado que no fueron percibidos por los evaluadores en ninguna de las muestras analizadas. Las escalas utilizadas fueron:

Para *flavor* y sabor fermentado: 0= Extremadamente débil; 10= Extremadamente intenso

Para dureza: 0= Extremadamente tierno; 10= Extremadamente duro

Para facilidad de ruptura: 0= Mínima facilidad; 10= Máxima facilidad

En general, no hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en ninguno de los parámetros analizados, tanto entre los tratamientos como entre las temperaturas de almacenamiento (4°C y 20°C). Cabe aclarar, que en un análisis sensorial de las características del realizado en este ensayo (2.3.11), los evaluadores informan sobre diferencias en cada comparación en particular, por lo tanto no son evaluadas las diferencias a lo largo del tiempo para un mismo tratamiento.

En el momento inicial, los evaluadores percibieron a todas las muestras como “duras”, con “moderada facilidad de ruptura” con *flavor* “débil” y “sin sabor fermentado”. El día 14 y 28, las muestras se percibieron dentro del rango “duras” a “algo tiernas” y con “moderada” facilidad de ruptura con *flavor* “muy débil” y sin sabor fermentado. El día 42, las muestras se percibieron como “muy tiernas” con ruptura “algo fácil” y presentaron *flavor* “muy débil” y sabor a fermentado “muy débil” en el caso del tratamiento control conservado a 20°C.

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

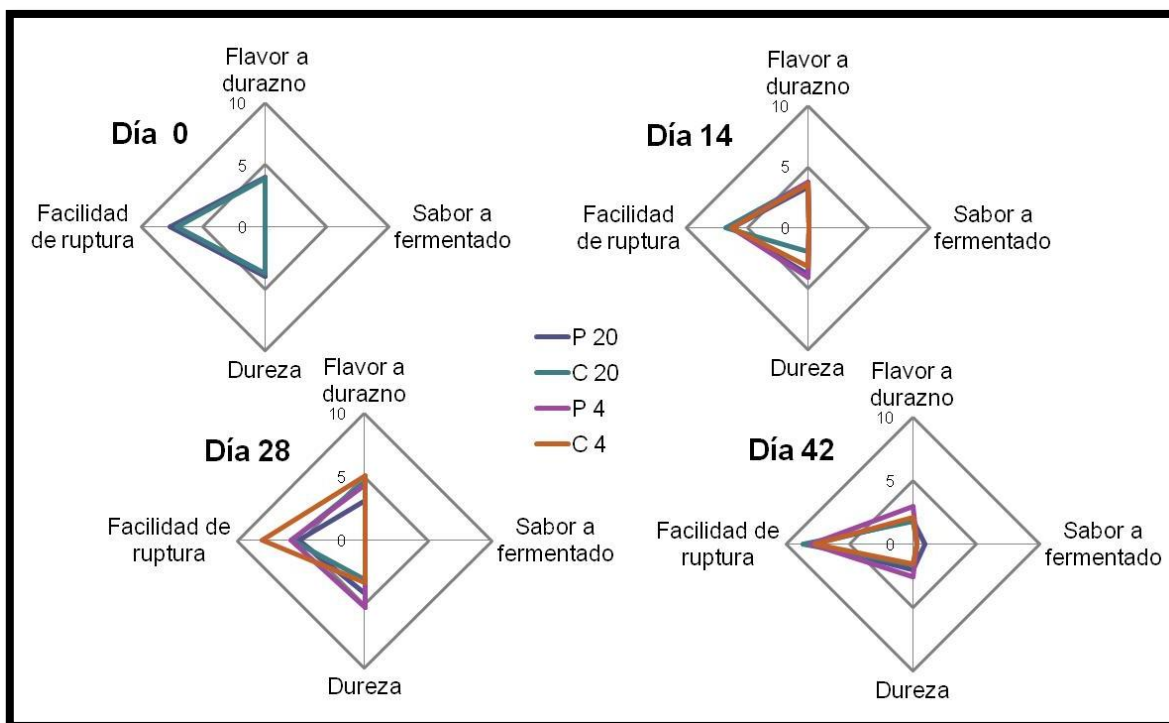


Fig. 41 Gráficos de araña correspondientes al análisis sensorial de cilindros de durazno envasados en bolsas flexibles, sometidos a 600 MPa por 5 min (P) y sin presurizar (C) durante el almacenamiento a 4°C (P4 y C4) y a 20°C (P20 y C20).

3.6.2.7 *Ácido ascórbico*

Los resultados muestran que el contenido de este compuesto no se modificó por la aplicación del tratamiento de APH ni por el almacenamiento, no habiéndose detectado diferencias significativas entre las diferentes muestras evaluadas. Las mismas presentaron un contenido de ácido ascórbico en el rango de 30-50mg/100g de fruta fresca, tanto para las muestras presurizadas como para las control y para los diferentes días de almacenamiento a ambas temperaturas de conservación (4°C y 20°C).

3.6.3 *Discusión*

3.6.3.1 *Análisis de perfil de textura (TPA)*

Si bien la percepción de la textura como propiedad sensorial, sólo puede ser experimentada en la práctica por los consumidores, las determinaciones instrumentales para su evaluación son una aproximación interesante para detectar y cuantificar objetivamente algunos parámetros físicos que pueden ser traducidos en términos de percepción sensorial. Es importante tener en cuenta que la textura debe ser considerada como un atributo multiparamétrico, por lo cual es incorrecto asociarla solamente con parámetros como la dureza o masticabilidad. En consecuencia, para su

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

evaluación en forma adecuada, debería incluirse en su análisis toda una gama de características derivadas de la estructura del alimento y pasible de ser detectadas por distintos sentidos. Para poder sacar conclusiones con un sentido práctico, es importante también realizar los mayores esfuerzos para correlacionar estos parámetros objetivos con la experiencia de una persona en el momento del consumo. Por ejemplo, la dureza puede describirse físicamente como la fuerza necesaria para obtener una cierta deformación, aunque en términos sensoriales, debe considerarse como la fuerza requerida para comprimir una sustancia entre los dientes molares (Szczesniak, 2002).

Los resultados obtenidos en el presente capítulo para la dureza de los duraznos muestran que al momento inicial, este parámetro no fue afectado por el tratamiento de APH, no encontrándose diferencias significativas con el control. Aparentemente y a pesar de que los tejidos vegetales presentan una cierta compresibilidad, este parámetro no fue afectado en términos físicos luego de la exposición de los duraznos de este ensayo a las APH. Esto ha sido informado en diversos productos como duraznos amarillos en mitades presurizados a 600 MPa por 5 min (Zhang y col., 2012), discos de zanahoria presurizados entre 100 MPa y 700 MPa por 45 min (Kato y col., 1997), brotes de bambú expuestos a 600 MPa por 10 min (Miao y col., 2011), jícama presurizada a 600 MPa por 5 min (Nguyen y col. (2010), y cubos de manzanas sometidos a diferentes niveles de presión y tiempo (Perera y col., 2010) o acondicionados en jarabe y tratados a 600 MPa por 5 min (Veercaamen y col., 2012). Boyton y col. (2002) evaluaron mediante panel sensorial la firmeza de cubos de mangos Keitt presurizados a 600 MPa por 1 min, sin encontrar diferencias entre las muestras presurizadas y las control.

En cuanto al efecto de las APH sobre la evolución de este parámetro, resulta relevante el hecho de que las muestras presurizadas hayan mantenido en forma adecuada la dureza a lo largo del almacenamiento, a diferencia de las muestras control, en las cuales este parámetro disminuyó drásticamente. Una evolución similar del parámetro dureza fue informada por Veercaamen y col. (2012) en su estudio con cubos de manzana presurizados. Este hallazgo constituye una importante evidencia de la gran utilidad de este tratamiento para preservar este parámetro textural del producto. Respecto al efecto de la temperatura de almacenamiento, se puede observar que la frigo-conservación contribuyó significativamente a preservar la dureza en el caso de las muestras presurizadas y en menor medida en las muestras control. Coincidentemente, Zhang y col. (2012)

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

podieron retrasar exitosamente el ablandamiento de duraznos presurizados a 600 MPa mediante la conservación a bajas temperaturas.

Es sabido que la adhesividad constituye un importante atributo relacionado con la textura, que en términos sensoriales representa a la fuerza requerida para remover el material que se adhiere a la boca (generalmente al paladar) durante el proceso normal de masticar (Szczeniak, 2002). Físicamente, se describe como el trabajo necesario para superar las fuerzas de atracción entre la superficie del alimento y la superficie de otros materiales con los cuales el alimento entra en contacto, por lo que este parámetro está relacionado con las características superficiales que resultan de fuerzas adhesivas y cohesivas (Aday y col. 2013).

Es importante mencionar que no se encontró en la bibliografía, información relacionada con el efecto de los tratamientos de APH sobre la evolución de este parámetro en matrices vegetales, por lo que el presente trabajo representa uno de los primeros que se realiza analizando en profundidad la evolución de este tipo de parámetro. Los resultados en este sentido, muestran que tanto en el presente capítulo con la variedad Summerset, como con variedades utilizadas en los capítulos anteriores (Limón Marelli y Flavorcrest) no fueron detectadas diferencias significativas inmediatamente después del tratamiento entre las muestras presurizadas (a 500 MPa y 600 MPa por 5 min) y las muestras control (sin tratamiento de APH).

Con respecto a la evolución de la adhesividad durante el almacenamiento, los resultados muestran que este parámetro se mantuvo en valores similares al inicial en las muestras presurizadas conservadas a 4°C, presentando una leve caída hacia el final de la conservación, mientras que en el resto de las muestras la disminución fue más marcada y regular a lo largo de todo el almacenamiento. Como fue mencionado anteriormente, no se dispone de estudios similares, por lo que a fines comparativos se consideraron investigaciones en condiciones diferentes. Entre estas, Tu y Baerdemaeker (1996) estudiaron este parámetro durante la maduración y el almacenamiento de manzanas, encontrando una cierta relación con ciertos aspectos fisiológicos de la pared celular. Estos autores explican que al madurar la fruta, las células del tejido parenquimático tienden a mantener la rigidez de la pared celular, aunque se tiende a perder la adhesión entre las mismas. En consecuencia, las células individuales se tornan más difíciles de romper y frente a una deformación, el tejido tiende a agrietarse entre las células en las cuales las uniones se volvieron más débiles, dando como resultado un aumento de la adhesividad. Otro de los factores que puede afectar a este parámetro es un aumento en la concentración de

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

compuestos naturales de la fruta en la superficie de contacto, siendo que al aumentar la sensación pegajosa de una superficie aumentará la adhesividad (Ferreira y col. 2008). Considerando estos aspectos, es posible que la pérdida de adhesividad durante el almacenamiento se haya debido a la liberación de agua de los tejidos, lo que llevaría a una menor concentración de polisacáridos del tipo de las pectinas en la superficie de la fruta. En este sentido, Aday y Caner (2014) sugieren que las pectinas presentes en la superficie (provenientes de la solubilización y la desorganización de la pared celular) contribuyen de forma importante a la adhesividad de la fruta.

Por su parte, la masticabilidad, otro de los parámetros incluidos en el TPA, se define como el producto de la dureza por la cohesividad y la elasticidad, por lo tanto se la determina indirectamente. Desde el punto de vista sensorial, este parámetro se asocia al tiempo en segundos que, a una fuerza de aplicación constante, permita masticar la muestra para reducir su consistencia y llevarla a una condición adecuada para ser tragada. Físicamente, este valor representa a la energía requerida para masticar un alimento sólido, hasta llevarlo a la mencionada condición. (Szczesniak, 2002).

Los resultados del presente ensayo muestran que inmediatamente después del procesamiento, ese parámetro fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en las muestras presurizadas que en las control. Vázquez-Gutiérrez y col. (2011) sugieren que el mayor valor en las muestras presurizadas puede estar relacionado con la formación de una red de gel entre las pectinas y cationes divalentes, ya que es sabido que las APH pueden inducir la gelificación en frío de este tipo de polímeros. Estos autores encontraron un resultado similar luego de exponer a caquis a una presión de 400 MPa por 4 min, mientras que Kaushik y col. (2013) también informaron sobre este fenómeno en frutos de litchi pelados y tratados por 100-200 MPa por 15 min.

En relación a los factores considerados en el diseño experimental, se encontró que la temperatura de almacenamiento tuvo una influencia significativa sobre la masticabilidad de las muestras presurizadas, lo cual se hizo más notorio para los mayores tiempos de conservación. En esta última condición, los valores disminuyeron en las muestras presurizadas y conservadas a 20°C, mientras que se mantuvieron constantes a 4°C. Se ha mencionado que durante el almacenamiento, la disminución en los parámetros de textura se debería principalmente a la solubilización y despolimerización de componentes de la pared celular (pectinas). Dado que este es un fenómeno de naturaleza enzimática, cuanto más alta es la temperatura de almacenamiento, mayor será la actividad de enzimas que actúan sobre las paredes celulares como la poligalacturonasa y la

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

pectinmetilesterasa (Yang y col., 2007). Otros de los factores mencionados en la literatura que afectan a este parámetro durante el almacenamiento son la pérdida de turgor de las células y la senescencia de los tejidos (Kaushik y col. 2013).

El término resiliencia representa la capacidad de una muestra de recuperar su posición/forma original luego de una deformación. En términos prácticos, se la considera una elasticidad instantánea, dado que en el TPA este parámetro se determina cuando la sonda se retira luego de la primera compresión, antes de que el periodo de espera entre compresión y compresión haya comenzado (Ferreira y col., 2008).

Los resultados del presente ensayo muestran que los duraznos sometidos a los tratamientos de APH presentaron los mayores valores para este parámetro. Para las muestras presurizadas, se encontraron además diferencias entre las dos temperaturas de almacenamiento, aunque este factor tuvo un menor efecto que el que tuvo el factor tratamiento. Es importante mencionar que las diferencias se presentaron en la capacidad de recuperación instantánea (resiliencia) siendo entonces diferentes solo los tiempo de relajación, ya que las muestras finalmente tuvieron una recuperación final similar (elasticidad) (Ferreira y col. 2008).

3.6.3.2 *Actividad PPO*

Los resultados del presente ensayo evidenciaron una actividad PPO significativamente menor ($p < 0,05$) en los duraznos sometidos al tratamiento de APH con respecto al control, lo cual confirma los resultados de los ensayos anteriores en cuanto a la capacidad de esta tecnología de inactivar parcialmente a la enzima. En este sentido, en el presente ensayo, que representa las condiciones optimizadas de aplicación del tratamiento, se alcanzó una inhibición del 57% en relación a la actividad de la materia prima. Cabe destacar que un tratamiento aplicado en frutillas en condiciones similares de nivel de presión y tiempo de mantenimiento del mismo (600 MPa-5min) resultó en una reducción parcial de la actividad PPO del 65% (Sulaiman y Silva, 2013), lo cual indicaría que la eficacia del tratamiento sería similar, aunque las especies tratadas sean diferentes.

Resulta interesante además el aumento de la actividad PPO observado hacia el final del período de conservación en las muestras presurizadas almacenadas a 4°C, lo cual puede deberse a la activación de formas latentes de la enzima. En este sentido González-Bueza y col. (2011) consideran que este fenómeno puede producirse por varios factores, como por ejemplo por la

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

proteólisis debido a la acción de enzimas liberadas por la disrupción celular provocada por el tratamiento, como así también por la descompartmentalización de sustrato y enzima.

En el presente capítulo, se observó además que la temperatura de almacenamiento tuvo una influencia significativa sobre la actividad PPO, verificándose que al final del almacenamiento, la actividad fue significativamente menor en las muestras almacenadas a 20°C que a 4°C, tanto en las muestras control como en las presurizadas. Guerrero-Beltrán y col. (2005-b), quienes observaron este mismo fenómeno en puré de duraznos, en un estudio en el cual incluyeron un rango mayor de temperaturas (3°C, 21°C y 35°C), encontraron que a mayor temperatura de almacenamiento, menor era la actividad al final de la conservación.

Resulta también interesante el hecho de que en el presente ensayo se haya registrado en la mayoría de los tratamientos un pico en la actividad hacia el día 14, con una posterior disminución hacia el final de la conservación. En una investigación relacionada con la conservación de duraznos enteros, Brandelli y Lopes (2005) encontraron un pico similar en el día 8 del almacenamiento. Es probable que este fenómeno sea debido al equilibrio existente entre la activación/liberación de enzimas y su posterior inactivación como resultado de los mecanismos de *turn over* enzimático. Este aspecto debería tenerse en cuenta al definirse el tiempo estimado de conservación del producto, ya que probablemente de retirarse al mismo del envase en un momento en el cual la actividad enzimática presenta un valor elevado, resulte en una mayor tasa de pardeamiento.

3.6.3.3 *Potencial de pardeamiento*

El potencial de pardeamiento representa a uno de los indicadores de calidad más importantes en productos frutihortícolas, y que puede ser evaluado tanto durante el procesamiento como en la conservación. Como se ha discutido a lo largo de la tesis, el pardeamiento enzimático de frutas es un proceso complejo que involucra a diversos factores: la cantidad de sustratos disponibles (compuestos fenólicos, oxígeno), la actividad de la enzima PPO y la presencia de inhibidores o promotores que tengan influencia sobre la reacción (Brandelli y Lopes, 2005). En función de esto, determinar este parámetro significa contar con una visión integral de la probabilidad de desarrollo de esta alteración, ya que la medición de la actividad de la enzima PPO presentaría solo un aspecto del problema. De esta manera, este parámetro representa una mayor aproximación a la situación real de la enzima en las condiciones de la matriz del alimento, la cual estará afectada, no solo por la concentración de enzima activa medida en condiciones óptimas y controladas, sino también por

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

factores como la cantidad de sustrato disponible, el pH del medio y la presencia de inhibidores, entre otros. Así, situaciones como el hecho de que las APH aumenten la extractabilidad de fenoles, como se comprobó en ensayos anteriores, podrían resultar en una mayor disponibilidad de sustrato (los compuestos fenólicos), exacerbando la reacción de pardeamiento. Este riesgo potencial pasaría desapercibido si se midiese únicamente la actividad enzimática.

Los resultados del presente capítulo muestran que los duraznos sometidos al tratamiento de APH en las condiciones optimizadas previamente (600 MPa-5min) presentaron una disminución en este parámetro, lo cual refuerza el valor de esta tecnología como preventiva del desarrollo de pardeamiento enzimático. Este efecto ha sido atribuido en trabajos anteriores principalmente a la inactivación de la enzima PPO, habiéndose observado en otros productos presurizados como jugo de sandía una correlación entre el grado de inactivación de la enzima y la reducción de este parámetro (Liu y col., 2013). Préstamo y Arroyo (1999) comprobaron que el agregado de ácido ascórbico a trozos de manzana potenciaba la capacidad del tratamiento de APH (400 MPa - 30 min) para reducir el pardeamiento. Aparentemente, el ácido ascórbico interactúa con las membranas celulares, previniendo el desarrollo de pardeamiento. Además de la PPO, este compuesto es capaz de inactivar otras enzimas que pueden estar involucradas en la alteración como las peroxidasas.

Resulta promisorio el hecho de que las condiciones establecidas como óptimas a través de los ensayos realizados a lo largo del presente trabajo de tesis (600 MPa - 5 min) sean similares a las definidas en otro estudio como las más adecuadas para minimizar el potencial de pardeamiento en puré de duraznos (600 MPa – 3 min) (Khalil y col., 2011). Estos autores determinaron además, que los mayores tiempos de aplicación eran más efectivos para disminuir este parámetro, lo que confirma que el tiempo de mantenimiento del nivel de presión del tratamiento establecido como óptimo (5 min) fue una elección adecuada.

Otro hecho interesante que surge del presente capítulo es el aumento del potencial de pardeamiento observado al aumentar la temperatura de almacenamiento (de 4 a 20°C). Esto fue también observado por Khalil y col., 2011 en puré de duraznos y por Liu y col., 2014 en néctar de mango. Dado que, contrariamente, se observó una disminución de la actividad enzimática para esta misma condición, este hecho evidenciaría que la concentración de enzima activa no siempre representa un factor limitante para el desarrollo del pardeamiento enzimático.

3.6.3.4 *Concentración de etanol*

De forma similar a lo observado en ensayos anteriores, las muestras presurizadas presentaron un menor contenido de etanol respecto de las sin presurizar, a lo largo de todo el almacenamiento. Notoriamente, las diferencias en cuanto al contenido de etanol entre tratamientos son menores en el presente capítulo en relación al primero. Es probable que, además de la acumulación de este metabolito en el interior del tejido como consecuencia del desarrollo de un metabolismo fermentativo, exista alguna fuente adicional que represente una variable no controlada, como la producción por parte de la flora microbiana presente en la materia prima. De esta manera, la diferencia en el contenido analizado entre los dos ensayos puede ser un reflejo de la diferente carga microbiana de las materias primas. El desarrollo de levaduras fue efectivamente comprobado en el presente ensayo al final del almacenamiento en las muestras control conservadas a 20°C (Ver resultados y discusión de análisis microbiológicos, puntos 3.6.2.5 y 3.6.3.5) en donde, coincidentemente, la concentración de etanol en el producto se incrementó abruptamente. Por su parte, la diferencia observada antes de los 42 días entre muestras presurizadas y muestras control, fue probablemente consecuencia del desarrollo de un metabolismo anaeróbico, el cual fue prevenido en los duraznos presurizados por la inactivación de las enzimas relacionadas.

De todos modos, independientemente del mecanismo de acumulación de etanol (sea por proliferación microbiana o por el desarrollo de un metabolismo anaeróbico), los resultados de los ensayos realizados en el presente trabajo de tesis demostraron que la aplicación de APH resulta altamente efectiva para prevenir la acumulación de etanol, con el consecuente beneficio para la calidad del producto final, al evitar la alteración del mismo. Esta efectividad fue también comprobada en otras especies especialmente sensibles a la alteración por la fermentación del producto, como es el caso de las zanahorias (Trejo Araya y col., 2007).

3.6.3.5 *Análisis microbiológicos*

Los resultados indican que tanto para las muestras presurizadas como para las muestras control, no se registró hasta el día 42 ningún desarrollo microbiano de los organismos analizados (aeróbicos, psicrótrofos, bacterias ácido lácticas y hongos y levaduras). Resulta en consecuencia evidente que los diferentes factores de preservación utilizados en el ensayo en forma combinada, incluyendo la baja temperatura, el pH ácido y la ausencia de oxígeno en las muestras presurizadas fueron suficientes para neutralizar las posibilidades de crecimiento de los mencionados

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

microorganismos. La hipótesis de que una combinación como la utilizada en el presente capítulo resulte exitosa en productos frutihortícolas fue comprobada también por González-Cebrino y col. (2013) en puré de ciruelas. Wang y col. (2012) tampoco registraron crecimiento microbiano durante el almacenamiento de néctar de batata presurizado (400-600 MPa 10-2,5 min). Estos autores incorporaron otros parámetros como contenido de antocianinas para definir la vida útil del producto. Préstamo y Arroyo (1999) evaluaron durante dos meses de almacenamiento a 5°C los parámetros de alteración de cubos de manzana presurizados (400 MPa 30 min), concluyendo que éstos podían ser consumidos de manera segura, a diferencia de las muestras sin tratar, que estaban fermentadas y fueron consideradas como no aptas para su comercialización. Es importante destacar que el establecimiento de estándares bien diseñados y validados para la definición y evaluación de la vida útil constituye un área relevante de vacancia en productos frutihortícolas mínimamente procesados.

3.6.3.6 *Análisis sensorial*

Como fuera informado en la sección de resultados, los evaluadores pudieron distinguir un sabor a fermentado únicamente en el caso del tratamiento control conservado a 20°C, no encontrándose en el caso de los tratamientos de APH ningún aspecto negativo asociado.

Existen en la literatura muy pocos estudios en los cuales se hayan evaluado y se reporten modificaciones del *flavor* de productos vegetales sometidos a APH. Entre éstos, se ha comprobado que los jugos de fruta tratados por APH generalmente no presentan *off-flavors*, ni siquiera asociados a la producción de dimetil sulfuro, que representa el compuesto más relacionado al desarrollo de *off flavors* en jugos. Los productos presurizados a base de distintas especies como kiwi, frutilla, naranja, tomate fueron en general bien aceptados en términos de *flavor*, por lo que considerando este aspecto, esta tecnología no presentaría inconvenientes para su aplicabilidad. En cuanto a la influencia que podrían tener los envases sobre los aspectos sensoriales, se ha comprobado que los materiales como polipropileno y polietileno no provocan cambios en el olor ni en el *flavor* de jugo de naranja presurizado, incluso luego de 20 días a 4°C (Cano y de Ancos, 2005).

Resulta promisorio el hecho de que en productos frutihortícolas procesados, en los cuales la preservación de las características asociadas al producto fresco son de gran relevancia, no se encuentren en general diferencias apreciables entre los productos tratados y no tratados, lo cual fue verificado para el caso de jugos y homogenatos de jugo y pulpa denominados *smoothies*

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

(Polydera y col., 2005; Laboissière y col., 2007; Keenan y col., 2011). En cuanto al período de vida útil, Baxter y col. (2005) encontraron que el jugo de naranja presurizado (600 MPa por 1 min a 20°C) se mantenía estable por 12 semanas almacenado a 4°C y 10°C con perfiles de aroma y *flavor* comparables a los del jugo fresco control almacenado a -20°C.

Según explican Oey y col. (2008-a) la base de la ausencia de alteración de los aspectos sensoriales asociados al *flavor* por parte de las APH radica en el hecho de que los compuestos responsables de este atributo sensorial en frutas y vegetales son moléculas de bajo peso molecular, las cuales se sabe que no son directamente afectadas por la aplicación de esta tecnología.

3.6.3.7 *Ácido ascórbico*

La determinación de ácido ascórbico se utiliza como marcador de la calidad nutricional de los duraznos, ya que por su gran labilidad a la oxidación y a la temperatura, el hecho de que un tratamiento no afecte su concentración sería indicativo de que la mayoría de las otras vitaminas y compuestos nutricionales tampoco se habrían alterado.

Si bien los resultados indican que tanto los tratamientos de APH como la conservación no afectaron el contenido de este compuesto, es importante mencionar que se encontró una cierta variabilidad entre las diferentes muestras analizadas. Entre las causas de este fenómeno se podrían mencionar a la variabilidad propia de la materia prima y, principalmente, a las diferencias en la impregnación del compuesto durante el baño de ácido ascórbico en la preparación de las muestras. Es interesante el hecho de que en uno de los ensayos previos del presente trabajo se haya comprobado que este pre-tratamiento represente la mayor fuente de aporte del compuesto en el producto. A pesar de la variabilidad observada, la cual no permitió encontrar diferencias entre los diferentes factores, resulta relevante el hallazgo de la estabilidad mostrada por este compuesto en el producto, tanto luego de la aplicación del tratamiento de APH como durante el almacenamiento a ambas temperaturas de conservación ensayadas (4 y 20°C). Esta evidencia reflejaría que las propiedades nutricionales del producto se mantendrían inalteradas, al menos hasta los 42 días de almacenamiento.

Existe un gran número de publicaciones llevadas a cabo con otras especies frutihortícolas, en donde se comprobó también la estabilidad del ácido ascórbico frente a los tratamientos de APH y durante la conservación. Entre estos, Fernández-Sestello y col. (2013), reportaron que los contenidos de vitamina C en puré de kiwi presurizado (500 MPa 3min) tuvieron una disminución

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

inicial de solamente el 6% con respecto a la materia prima, manteniéndose luego constante durante el almacenamiento a 4°C por 40 días. Resultados similares fueron informados en puré de guayaba presurizado (600 MPa 15 min) conservado por 40 días a 4°C (Yen y Lin, 1996), en jugo de *bayberry* presurizado (400-600 MPa 10 min), en donde además se comprobó la mejor retención del compuesto durante el almacenamiento en las muestras tratadas en relación al control (Yu y col., 2013), en puré de frutilla tratado a presiones de entre 100 y 400 MPa por 15 min (Bodelón y col., 2013), y en cebollas tratadas entre 100-600 MPa por 1-3 min (Vázquez-Gutiérrez y col., 2013). En diversos productos frutícolas se ha estimado que luego del tratamiento, este compuesto puede mantenerse estable en el producto final por más de 2 meses (Préstamo y Arroyo, 1999).

Es interesante considerar que el proceso de enlatado en frutas y vegetales, mediante el cual se obtiene también un producto de vida útil extendida, provoca inmediatamente después del tratamiento una pérdida de hasta el 90% del ácido ascórbico según la matriz vegetal que se trate (Rickman y col., 2007), por lo que las APH ofrecen la gran ventaja de preservar un compuesto sumamente lábil frente a los tratamientos térmicos.

Además, resulta relevante destacar que a pesar de haberse utilizado en el presente trabajo al ácido ascórbico como marcador de las características nutricionales del producto, el mismo representa en sí un importante compuesto promotor de la salud. Así, Sánchez-Moreno y col. (2003) en un estudio realizado con voluntarios sanos que no consumían suplementos vitamínicos ni minerales, encontraron que el consumo de jugo de naranja presurizado producía un incremento de la concentración plasmática de vitamina C y un descenso de los marcadores de inflamación. En este sentido, se comprobó que el consumo diario de dos raciones (500 ml) de jugo tratado por APH permitía mantener la biodisponibilidad de vitamina C y la reducción del estrés oxidativo (Mor-Mur, 2010). Este hecho pone de relieve las importantes ventajas desde el punto de vista nutricional que supondrían la mayor difusión de la tecnología de APH.

3.6.4 Conclusiones

El trabajo del presente capítulo permitió validar y profundizar los conocimientos sobre el efecto del procesamiento mediante APH aplicado en los niveles y condiciones definidos como óptimos en los ensayos anteriores. Así, mediante la estrategia de las tecnologías de barrera (acidificación, envasado al vacío, refrigeración) fue posible la obtención de un producto mínimamente procesado a base de duraznos con altos estándares de calidad y vida útil extendida.

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

Este capítulo permitió comprobar la estabilidad del producto a las dos temperaturas ensayadas, una representativa de las condiciones previstas de conservación bajo refrigeración (4°C), y otra simulando un ambiente sin refrigeración (20°C, que correspondería a una temperatura ambiente en climas templados).

Los resultados demostraron que aplicando el tratamiento de APH en las condiciones definidas como óptimas (600 MPa-5 min), es posible preservar la calidad del producto por al menos 42 días (el triple de la vida útil generalmente estimada para este tipo de producto), garantizándose la ausencia de las principales alteraciones fisiológicas (pardeamiento y desarrollo de metabolismo anaeróbico).

Entre los aspectos evaluados, se demostró, tanto mediante un análisis instrumental multiparamétrico como es el TPA, como por la evaluación de un panel sensorial, que la textura de los productos tratados no experimenta alteraciones significativas que puedan afectar la preferencia de los consumidores. Es interesante el hecho de que los parámetros texturales se preservaran mejor en las muestras presurizadas, aunque estas diferencias no se observaron en el análisis sensorial, lo que sugiere que el umbral de percepción de esos cambios a nivel sensorial sería más elevado. Probablemente, estos cambios comenzarían a ser detectables si se prolongara el estudio para tiempos mayores de conservación. Por otra parte, este tipo de análisis permitió concluir que el tratamiento de APH no imparte cambios significativos al *flavor* de los duraznos.

Desde el punto de vista nutricional, se comprobó que el tratamiento de APH no altera la concentración de ácido ascórbico en el producto durante al menos 42 días de almacenamiento, tanto a 4°C como a 20°C, garantizando la estabilidad a las condiciones definidas de otros compuestos promotores de la salud.

Uno de los aspectos más relevantes encontrados en el presente trabajo está dado por la capacidad de las APH de prevenir el desarrollo de pardeamiento enzimático, siendo este un factor limitante para el desarrollo de productos a base de duraznos. Así, no sólo se verificó el efecto del tratamiento de APH sobre la actividad PPO, sino que se validó, mediante la incorporación en este capítulo de la determinación del potencial de pardeamiento, la efectividad del tratamiento en la prevención del desarrollo de las reacciones asociadas en las condiciones de la matriz (sustrato, pH, etc.). Es importante mencionar que, si bien se encontraron diferencias importantes en la actividad PPO entre las muestras presurizadas y las sin tratar, las APH no inhibieron totalmente a esta

3.6 Resultados y Discusión-Capítulo 5

enzima, por lo que la combinación con otros tratamientos, especialmente el envasado al vacío, resultó esencial para controlar el desarrollo del pardeamiento. Es importante mencionar que el efecto inhibitorio de las APH sobre la enzima cobra una especial preponderancia al abrir los paquetes y re-exponer el producto al aire.

Por otra parte, los tratamientos de APH resultaron muy efectivos para inhibir el desarrollo del metabolismo fermentativo en los productos. Este hallazgo resulta altamente promisorio, ya que abre un interesante campo de aplicación para el envasado al vacío como estrategia de preservación de frutas mínimamente procesadas. Esta tecnología, cuya aplicación es muy limitada en la actualidad en productos frutihortícolas frescos, dado el riesgo de desarrollo de fermentaciones, resulta altamente efectiva por su capacidad multifacética de prevenir el pardeamiento enzimático, limitar la proliferación de microorganismos aerobios, reducir la respiración de los tejidos y evitar la pérdida de humedad.

Si bien en las muestras control conservadas a temperatura ambiente hubo un importante desarrollo de un proceso fermentativo, lo cual quedó evidenciado por la generación de gas y el hinchamiento de las bolsas al final del almacenamiento, el panel sensorial no detectó ningún *off-flavor* en momentos previos al aumento exponencial del día 42. Cabe aclarar que en este tiempo, las muestras fermentadas con evidente desarrollo de levaduras no se analizaron sensorialmente por motivos de seguridad. Los análisis sensoriales sugieren que un cierto nivel de desarrollo del metabolismo anaeróbico no produciría una alteración importante en las características sensoriales de la fruta.

Si bien en términos de pardeamiento enzimático, preservación de la textura, y ausencia de deterioro microbiológico y sensorial, las muestras presurizadas almacenadas a 4°C fueron las que se preservaron mejor luego de 42 días de conservación, los resultados muestran que también sería posible conservar las muestras tratadas a 20°C, manteniéndolas con aptitud comercial. Este hallazgo, al igual que la posibilidad de uso del envasado en vacío, abre un muy interesante campo de desarrollo de nuevos productos frutihortícolas similares a los frescos, sin necesidad de frío para su conservación. Igualmente, dado que los productos tratados se conservaron de forma adecuada por el período de los ensayos (42 días), sería interesante a futuro investigar la posibilidad de extender aún más la vida útil de los productos, lo cual sería interesante sobre todo en el caso de frutas estacionales.

4. Conclusiones Generales



4. Conclusiones Generales

Mediante el diseño de la tecnología combinada, consistente en la aplicación de ácidos orgánicos, el envasado al vacío, la aplicación de un tratamiento de APH y la refrigeración, se logró obtener un producto con alta calidad sensorial y nutricional, similar al producto fresco, y con vida útil extendida, llegando en buenas condiciones al final del período ensayado (42 días).

El pre-tratamiento de inmersión en ácido ascórbico, además de cumplir adecuadamente su función como antioxidante dentro de las estrategias de preservación, mejoró la calidad nutricional del producto, incrementando el contenido final de este compuesto.

El ensayo de optimización de las condiciones del tratamiento de APH, junto con la posterior validación, permitió concluir que para el rango ensayado (400-600 MPa de nivel de presión y 1-9 min de tiempo de mantenimiento), a mayor nivel de presión, mayor es la inactivación de enzimas alterantes, mientras que un tiempo de mantenimiento más prolongado de la presión induce una mayor alteración de los parámetros texturales, independientemente del nivel de presión aplicado.

Esto hizo necesario realizar un cuidadoso ajuste de las condiciones del proceso, con el fin de obtener una solución de compromiso que tenga en cuenta este tipo de situaciones. Así, a través de la interpretación de los datos experimentales mediante modelos matemáticos, se llegó a la combinación establecida como óptima, que consistió en un tratamiento de 600 MPa por 5 min a temperatura ambiente, lo cual permite maximizar la inactivación de enzimas con una alteración mínima de las características de textura y color.

A pesar de las diversas combinaciones ensayadas, puede concluirse que el tratamiento APH no logra inactivar totalmente la enzima PPO, la principal catalizadora del pardeamiento enzimático. En función de esto, se hizo necesaria la utilización del envasado al vacío, el cual controló exitosamente el desarrollo de reacciones mientras el producto se mantenía en el envase, debido a las condiciones anaeróbicas generadas en el interior del envase. Este hecho, junto con la inhibición parcial de la enzima lograda mediante la presurización, permitió prevenir el desarrollo de la alteración una vez abiertos los envases.

Los resultados obtenidos en cuanto a la prevención del pardeamiento enzimático pueden mejorarse sensiblemente mediante la elección de las variedades más aptas para este tipo de procesamiento, como Romea. En este sentido, se concluye que la elección de la materia prima para el proceso es determinante de la calidad del producto final. La aptitud de la variedad para el procesamiento está determinada por aspectos tales como la inactivación de enzimas, la

4. Conclusiones Generales

extractabilidad de fenoles y el contenido de ácido ascórbico. Sería interesante estudiar a futuro el efecto de las APH sobre un mayor número de variedades de duraznos, así como sobre otras especies de frutas. Otro de los aspectos a optimizar, que también influye en la aptitud de la materia prima, está dado por el estado de madurez óptima, en función del cual sería necesario determinar el momento oportuno de cosecha de los frutos.

Una alteración que se observó en todos los niveles de presión ensayados fue la aparición en los análisis instrumentales de una textura tipo gomosa del producto, lo cual se relacionaría con los cambios observados a nivel microscópico en la pared celular (hinchamiento, solubilización de las pectinas). Sin embargo, esto no se detectó en el análisis sensorial de las muestras.

Otra alteración sobre la cual se logró un mayor grado de conocimiento mediante el estudio de la microestructura fue la traslucidez de las muestras, observándose en las muestras que sufrían esta alteración un mayor achicamiento de los espacios intercelulares, junto con la aparición de líquido en los mismos y la alteración de las membranas plasmáticas. Esto también explicaría el resultado negativo en el ensayo de viabilidad para las muestras presurizadas, ya que esta determinación resulta positiva solamente en caso de que las membranas estén intactas (para poder retener el compuesto fluorescente en el interior de las células) y las esterasas intracelulares presenten actividad. Un aspecto positivo es que la alteración de las membranas observada en las muestras tratadas se vería reflejada en la mayor extractabilidad de compuestos promotores de la salud, como fenoles y ácido ascórbico.

Uno de los aspectos más interesantes encontrados en las investigaciones fue el hecho de que, si bien las muestras presurizadas resultaron negativas para el test de viabilidad con FDA y evidenciaron ciertas alteraciones estructurales, presentaron características bioquímicas similares a las del tejido fresco como la expresión de ARNm relacionado con ciertas enzimas alterantes y la actividad de enzimas. Esto indica que diversos procesos metabólicos se encuentran activos en los duraznos presurizados, lo cual sumado a que las características como la apariencia, la textura, y el *flavor* de estos productos son similares a los de la fruta fresca, hace evidente que al incorporarse nuevas tecnologías de preservación como las APH se deberían redefinir algunos conceptos, como aquellos que relacionan los aspectos fisiológicos de los tejidos con parámetros asociados a la percepción de los consumidores, como es el caso de la condición de “frescura” de las frutas y hortalizas mínimamente procesadas.

4. Conclusiones Generales

Otro aspecto de gran relevancia fue el hecho de poder mantener al producto tratado por APH según las condiciones optimizadas, a temperatura ambiente (sin necesidad de refrigeración), en buenas condiciones de conservación y por un tiempo prolongado (42 días). Teniendo en cuenta que un producto de vida útil y forma de conservación comparable como los duraznos enlatados necesitan para su conservación la ayuda de tratamientos térmicos exhaustivos, así como del agregado de jarabes concentrados, puede concluirse que los duraznos presurizados presentarán características nutricionales ampliamente superiores a las de un durazno enlatado. Considerando además la importancia de reducir la ingesta de azúcares como consecuencia del creciente número de consumidores diabéticos y la necesidad por parte de la población de aumentar la ingesta diaria de frutas y hortalizas para llegar al estándar recomendado por la OMS, resulta de suma relevancia el poder ofrecer a los consumidores un producto similar al fresco, sin el agregado de azúcares y con un alto estándar nutricional. Se plantea a futuro la profundización de las evaluaciones sensoriales de este tipo de producto a través de panel de consumidores, para evaluar la aceptabilidad de los duraznos mínimamente procesados preservados mediante la tecnología de APH.

A través del diseño y ejecución de los diferentes ensayos, del desarrollo de distintas técnicas de laboratorio y del análisis de los resultados, se logró cumplir de manera satisfactoria con cada uno de los objetivos propuestos en el plan inicial del trabajo de tesis. Los resultados obtenidos y las metodologías desarrolladas proveerán de información valiosa para el desarrollo de futuras investigaciones que permitan establecer en forma más precisa el efecto de nuevas tecnologías como las APH para la preservación y desarrollo de productos vegetales.

Es importante resaltar que el procesamiento de frutas y hortalizas ha ido evolucionando con los avances tecnológicos y con las exigencias crecientes de los consumidores en cuanto a disponibilidad de productos en distintas épocas del año, practicidad de preparación y consumo. Esto ha llevado a estimular la producción de alimentos fáciles de preparar o listos para consumir en todo lugar y momento, de excelente calidad nutricional y sensorial, y con uso mínimo de aditivos, privilegiando los tratamientos físicos sobre los químicos, y respetando al medio ambiente, tanto durante su elaboración, transporte y consumo. En función de estos aspectos, el producto estudiado en la presente tesis intenta satisfacer las demandas de los consumidores más exigentes, ya que la tecnología desarrollada permite la elaboración de un producto fresco, de buena calidad nutricional, con un mínimo agregado de aditivos y listo para consumir. Esto ha sido

4. Conclusiones Generales

alcanzado en gran medida por la utilización de la tecnología de APH, la cual es considerada limpia, relativamente de bajo gasto energético y que utiliza como fluido transmisor de la presión, solamente agua potable que a su vez se puede recircular.

En función de los beneficios determinados en el presente trabajo de tesis, como en el desarrollo de otros trabajos de investigación, puede concluirse que la aplicación de APH a nivel industrial tendrá en los próximos años un impacto económico y comercial de gran relevancia.

5. Referencias

Bibliográficas



5. Referencias Bibliográficas

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1–2), 121-129.
- Abbott, J. (1999). Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 15(3), 207-225.
- Aday, M., & Caner, C. (2013). The shelf life extension of fresh strawberries using an oxygen absorber in the biobased package. *LWT-Food Science and Technology*, 52(2), 102-109.
- Aday, M., & Caner, C. (2014). Individual and combined effects of ultrasound, ozone and chlorine dioxide on strawberry storage life. *LWT-Food Science and Technology*, 57(1), 344-351.
- Aday, M., Temizkan, R., Büyükcan, M., & Caner, C. (2013). An innovative technique for extending shelf life of strawberry: Ultrasound. *LWT-Food Science and Technology*, 52(2), 93-101.
- Al-Haq, M., & Sugiyama, J. (2004). Effect of degree of compression on texture. *Journal of texture studies*, 35(4), 341-352.
- Altuner, E., & Tokuşoğlu, Ö. (2013). The effect of high hydrostatic pressure processing on the extraction, retention and stability of anthocyanins and flavonols contents of berry fruits and berry juices. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(10), 1991-1997.
- Alvarez, M., Canet, W., & López, M. (2002). Influence of deformation rate and degree of compression on textural parameters of potato and apple tissues in texture profile analysis. *European food research and technology*, 215(1), 13-20.
- Alzamora, S., Gerschenson, L., Vidales, S., & Nieto, A. (1997). Structural changes in the minimal processing of fruits: Some effects of blanching and sugar impregnation. *Food Engineering 2000*, 117-139.
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington VA, 1058-1059.
- Araujo, P., & Janagap, S. (2012). Doehlert uniform shell designs and chromatography. *Journal of Chromatography B*, 910, 14-21.
- Artés, F., & Artés-Hernández, F. (2003). Etapas decisivas y diseño de instalaciones para la elaboración de productos procesados en fresco. *Productos hortofrutícolas mínimamente procesados*. Editores: MG Lobo y M. González. Edit. Gobierno de Canarias, 57-78.
- Ashwell, M. (2002). Concepts of functional foods. ILSI Europe Concise Monograph Series. *ILSI Press*. Bélgica. ISBN 1-57881-145-7
- Ayaz, F., Demir, O., Torun, H., Kolcuoglu, Y., & Colak, A. (2007). Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. *Food Chemistry*, 106, 291-298.
- Balasubramaniam, V., Ting, E., Stewart, C., & Robbins, J. (2004). Recommended laboratory practices for conducting high-pressure microbial inactivation experiments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(3), 299-306.

5. Referencias Bibliográficas

- Barba, F., Esteve, M., & Frigola, A. (2013). Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. *Food Research International*, 50(2), 545-549.
- Barrett, D., Beaulieu, J. & Shewfelt, R. (2010). Color, Flavor, Texture, and Nutritional Quality of Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Desirable Levels, Instrumental and Sensory Measurement, and the Effects of Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(5), 369-389.
- Bassett, C., Wisniewski, M., Artlip, T., Richart, G., Norelli, J., & Farrell Jr, R. (2009). Comparative expression and transcript initiation of three peach dehydrin genes. *Planta*, 230(1), 107-118.
- Baxter, I., Easton, K., Schneebeli, K., & Whitfield, F. (2005). High pressure processing of Australian navel orange juices: Sensory analysis and volatile flavor profiling. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(4), 372-387.
- Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. (2011). An update on high hydrostatic pressure, from the laboratory to industrial applications. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 44-61.
- Bible, B., & Singha, S. (1993). Canopy position influences CIELAB coordinates of peach color. *HortScience*, 28(10), 992-993.
- Bodelón, O., Avizcuri, J., Fernández-Zurbano, P., Dizy, M., & Préstamo, G. (2013). Pressurization and cold storage of strawberry purée: Colour, anthocyanins, ascorbic acid and pectin methylesterase. *LWT-Food Science and Technology*, 52(2), 123-130.
- Bourne, M. (2002) Principles of objective texture measurement. Chapter 4 in: *Food Texture and Viscosity. Concept and Measurement*. 2nd edition. Academic Press, London, 182-186.
- Boynton, B., Sims, C., Sargent, S., Balaban, M., & Marshall, M. (2002). Quality and Stability of Precut Mangos and Carambolas Subjected to High-Pressure Processing. *Journal of food science*, 67(1), 409-415.
- Brandelli, A., & Lopes, C. (2005). Polyphenoloxidase activity, browning potential and phenolic content of peaches during postharvest ripening. *Journal of food biochemistry*, 29(6), 624-637.
- Briones-Labarca, V., Giovagnoli-Vicuña, C., Figueroa-Alvarez, P., Quispe-Fuentes, I., & Pérez-Won, M. (2013). Extraction of β -carotene, vitamin C and antioxidant compounds from *Physalis peruviana* (Cape Gooseberry) assisted by high hydrostatic pressure. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 109-118.
- Buendía, B., Allende, A., Nicolás, E., Alarcón, J., & Gil, M. (2008). Effect of regulated deficit irrigation and crop load on the antioxidant compounds of peaches. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(10), 3601-3608.
- Butz, P., Edenharder, R., García, A. F., Fister, H., Merkel, C., & Tauscher, B. (2002). Changes in functional properties of vegetables induced by high pressure treatment. *Food Research International*, 35(2), 295-300.
- Calvo, M. (2007). Bioquímica de los Alimentos. Página web: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/enzimas/tirosinasa.html> (Actualizada Febrero 2013)
- Campbell, O., & Padilla-Zakour, O. (2013). Phenolic and carotenoid composition of canned peaches (*Prunus persica*) and apricots (*Prunus armeniaca*) as affected by variety and peeling. *Food Research International*, 54(1), 448-455.

5. Referencias Bibliográficas

Cano, M. & de Ancos, B. (2005). Advances in Use of High Pressure to Processing and Preservation of Plant Foods. Chapter 13 in: Barbosa-Cánovas, G., Tapia, M., & Cano, M. (Eds.). *Novel Food Processing Technologies*. CRC Press, USA, 283-309.

Cano-Salazar, J., López, M., Crisosto, C., & Echeverría, G. (2013). Volatile compound emissions and sensory attributes of 'Big Top' nectarine and 'Early Rich' peach fruit in response to a pre-storage treatment before cold storage and subsequent shelf-life. *Postharvest Biology and Technology*, 76(0), 152-162.

Castro, S., & Saraiva, J. (2014). High Pressure Processing of Fruits and Fruit Products. Chapter 4 in: Sun, D.-W. (Ed.). *Emerging technologies for food processing* (2nd Ed.). Academic Press, USA, 3-24.

Chakraborty, S., Kaushik, N., Rao, P., & Mishra, H. (2014). High-Pressure Inactivation of Enzymes: A Review on Its Recent Applications on Fruit Purees and Juices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 578-596.

Chang, S., Tan, C., Frankel, E., & Barrett, D. (2000). Low-density lipoprotein antioxidant activity of phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in selected clingstone peach cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 147-151.

Clariana, M., Valverde, J., Wijngaard, H., Mullen, A., & Marcos, B. (2011) High pressure processing of swede (*Brassica napus*): Impact on quality properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(2), 85-92.

Código Alimentario Argentino- Se puede acceder al mismo en la página web:

http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp (Actualizada Enero 2015)

Considine, K., Kelly, A., Fitzgerald, G., Hill, C., & Sleator, R. (2008). High-pressure processing—effects on microbial food safety and food quality. *FEMS microbiology letters*, 281(1), 1-9.

Costa, C., Conte, A., Buonocore, G., & Del Nobile, M. (2011). Antimicrobial silver-montmorillonite nanoparticles to prolong the shelf life of fresh fruit salad. *International journal of food microbiology*, 148(3), 164-167.

Cruse, P. Introduction to Colour Spaces. Colour management information. *Graphic Quality Consultancy*. Página Web: http://www.colourphil.co.uk/lab_lch_colour_space.html (Actualizada Enero 2015)

Dallet, S., & Legoy, M. (1996). Hydrostatic pressure induces conformational and catalytic changes on two alcohol dehydrogenases but no oligomeric dissociation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1294(1), 15-24.

5. Referencias Bibliográficas

- Denoya, G., Vaudagna, S., & Polenta, G. (2015). Effect of high pressure processing and vacuum packaging on the preservation of fresh-cut peaches. *LWT-Food Science and Technology*, 62 (1), 801-806.
- Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12(4): 214-219
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2010). *InfoStat. Software estadístico*.
- Dong, P., Kong, M., Yao, J., Zhang, Y., Liao, X., Hu, X., & Zhang, Y. (2013). The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and physicochemical properties of lotus root during refrigerated storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19(0), 79-84.
- Dörnenburg, H., & Knorr, D. (1997). Evaluation of elicitor-and high-pressure-induced enzymatic browning utilizing potato (*Solanum tuberosum*) suspension cultures as a model system for plant tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 4173-4177.
- Eisenmenger, M., & Reyes-De-Corcuera, J. (2009). High pressure enhancement of enzymes: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(5), 331-347.
- European Commission-Directorate General for Research FP7 Cooperation – Food (2010) Functional Foods. Publications Office of the European Union. Luxembourg. ISBN 978-92-79-14239-0
- FAO/WHO Workshop on Fruit and Vegetables for Health (2004) Fruit and vegetables for health: Report of a Joint FAO/WHO Workshop, Kobe, Japan. ISBN: 92 4 159281 8
- Farkas, D., & Hoover, D. (2000). High pressure processing. *Journal of Food Science*, 65(s8), 47-64.
- Fernández-Sestelo, A., de Saá, R., Pérez-Lamela, C., Torrado-Agrasar, A., Rúa, M., & Pastrana-Castro, L. (2013). Overall quality properties in pressurized kiwi purée: Microbial, physicochemical, nutritive and sensory tests during refrigerated storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 64-72.
- Ferreira, D., Da Silva, J., Pinto, G., Santos, C., Delgadillo, I., & Coimbra, M. (2008). Effect of sun-drying on microstructure and texture of S. Bartolomeu pears (*Pyrus communis* L.). *European Food Research and Technology*, 226(6), 1545-1552.
- Ferreira, S., Dos Santos, W., Quintella, C., Neto, B., & Bosque-Sendra, J. (2004). Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. *Talanta*, 63(4), 1061-1067.
- Ficha Técnica del Mercado Central de Buenos Aires. Gerencia de Calidad y Tecnología de la Secretaría de Comercio Interior - 2011- Durazno (*Prunus pérsica* L.). Página web: <http://www.mercadocentral.gov.ar/ziptecnicas/FichaTecnica-Durazno.pdf> (Actualizada Noviembre 2012)
- Francis, F. (1995). Quality as influenced by color. *Food quality and preference*, 6(3), 149-155.
- Franco, D. (2012) Durazno en conserva. Boletín digital Alimentos Argentinos. http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/conservas/productos/ConservaDurazno/Duraznos_conserva_2012_08Ago.pdf (Actualizada Agosto 2012).

5. Referencias Bibliográficas

- Gabrovska, D., Paulickova, I., Maskova, E., Fiedlerova, V., Kocurova, K., Pruchova, J, Strohalm, J. & Houska, M. (2005). Changes in selected vitamins, microorganism counts, and sensory quality during storage of pressurised sprouted seed of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Czech journal of food sciences*, 23(6), 246-250.
- Galindo, F., Sjöholm, I., Rasmusson, A., Widell, S., & Kaack, K. (2007). Plant stress physiology: opportunities and challenges for the food industry. *Critical reviews in food science and nutrition*, 47(8), 749-763.
- García-Molina, F., Muñoz, J., Varón, R., Rodríguez-López, J., García-Cánovas, F., & Tudela, J. (2007). A review on spectrophotometric methods for measuring the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(24), 9739-9749.
- García-Parra, J., González-Cebrino, F., Delgado, J., Lozano, M., Hernández, T., & Ramírez, R. (2011). Effect of Thermal and High-Pressure Processing on the Nutritional Value and Quality Attributes of a Nectarine Purée with Industrial Origin during the Refrigerated Storage. *Journal of food science*, 76(4), C618-C625.
- Gil, M., Tomás-Barberán, F., Hess-Pierce, B., & Kader, A. (2002). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4976-4982.
- Gomes, M., & Ledward, D. (1996). Effect of high-pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidases. *Food Chemistry*, 56(1), 1-5.
- Gómez, P., García-Loredo, A., Salvatori, D., Guerrero, S., & Alzamora, S. (2011). Viscoelasticity, texture and ultrastructure of cut apple as affected by sequential anti-browning and ultraviolet-C light treatments. *Journal of Food Engineering*, 107(2), 214-225.
- González-Buesa, J., Arias, E., Salvador, M. L., Oria, R., & Ferrer-Mairal, A. (2011). Suitability for minimal processing of non-melting clingstone peaches. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(4), 819-826.
- González, E., de Ancos, B., & Cano, M. (1999). Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4068-4072.
- Gonzalez, M., & Barrett, D. (2010-a). Thermal, high pressure, and electric field processing effects on plant cell membrane integrity and relevance to fruit and vegetable quality. *Journal of food science*, 75(7), R121-R130.
- Gonzalez, M., Anthon, G., & Barrett, D. (2010-b). Onion cells after high pressure and thermal processing: comparison of membrane integrity changes using different analytical methods and impact on tissue texture. *Journal of food science*, 75(7), E426-E432.
- Gonzalez, M., Jernstedt, J., Slaughter, D., & Barrett, D. (2010-c). Microscopic quantification of cell integrity in raw and processed onion parenchyma cells. *Journal of food science*, 75(7), E402-E408.
- Gonzalez, M., Jernstedt, J., Slaughter, D., & Barrett, D. (2010-d) Influence of cell integrity on textural properties of raw, high pressure, and thermally processed onions. *Journal of Food Science*, 75(7), E409-E416.

5. Referencias Bibliográficas

- González-Cebrino, F., Durán, R., Delgado-Adámez, J., Contador, R., & Ramírez, R. (2013). Changes after high-pressure processing on physicochemical parameters, bioactive compounds, and polyphenol oxidase activity of red flesh and peel plum purée. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 34-41.
- González-Cebrino, F., García-Parra, J., Contador, R., Tabla, R., & Ramírez, R. (2012). Effect of High-Pressure Processing and Thermal Treatment on Quality Attributes and Nutritional Compounds of "Songold" Plum Purée. *Journal of food science*, 77(8), C866-C873.
- Gorny, J., Hess-Pierce, B., & Kader, A. (1998). Effects of fruit ripeness and storage temperature on the deterioration rate of fresh-cut peach and nectarine slices. *HortScience*, 33(1), 110-113.
- Guerrero-Beltrán, J., Barbosa-Cánovas, G., & Swanson, B. (2005-a). High hydrostatic pressure processing of fruit and vegetable products. *Food Reviews International*, 21(4), 411-425.
- Guerrero-Beltrán, J., Barbosa-Cánovas, G., & Swanson, B. (2004). High hydrostatic pressure processing of peach puree with and without antibrowning agents. *Journal of food processing and preservation*, 28(1), 69-85.
- Guerrero-Beltrán, J., Swanson, B., & Barbosa-Cánovas, G. (2005-b). Shelf life of HHP-processed peach puree with antibrowning agents. *Journal of Food Quality*, 28(5-6), 479-491.
- Guerrero-Beltrán, J., Barbosa-Cánovas, G., Moraga-Ballesteros, G., Moraga-Ballesteros, M., & Swanson, B. (2006). Effect of pH and ascorbic acid on high hydrostatic pressure-processed mango puree. *Journal of food processing and preservation*, 30(5), 582-596.
- Gutiérrez, T., Hoyos, O., & Páez, M. (2007). Ascorbic acid determination in Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.), for high-performance liquid chromatography (HPLC). *Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 5(1), 70-79.
- Hartmann, C., & Delgado, A. (2004). Numerical simulation of the mechanics of a yeast cell under high hydrostatic pressure. *Journal of biomechanics*, 37(7), 977-987.
- Heinz, V., & Buckow, R. (2010). Food preservation by high pressure. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 5(1), 73-81.
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., & Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 9(5), 197-203.
- Hernández, Y., Lobo, M. G., & González, M. (2006). Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chemistry*, 96(4), 654-664.
- Hernández-Carrión, M., Hernando, I., & Quiles, A. (2014-a). High hydrostatic pressure treatment as an alternative to pasteurization to maintain bioactive compound content and texture in red sweet pepper. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26, 76-85.
- Hernández-Carrión, M., Vázquez-Gutiérrez, J., Hernando, I., & Quiles, A. (2014-b). Impact of High Hydrostatic Pressure and Pasteurization on the Structure and the Extractability of Bioactive Compounds of Persimmon "Rojo Brillante". *Journal of food science*, 79(1), C32-C38.

5. Referencias Bibliográficas

Hills, B., Costa, A., Marigheto, N., & Wright, K. (2005). T 1– T 2 NMR correlation studies of high-pressure-processed starch and potato tissue. *Applied Magnetic Resonance*, 28(1-2), 13-27.

Hiperbaric. Información de la página web de esta empresa proveedora de equipos de Altas Presiones Hidrostáticas: <http://www.hiperbaric.com/en/high-pressure> (Actualizada Enero 2015)

Huang, W., Bi, X., Zhang, X., Liao, X., Hu, X., & Wu, J. (2013). Comparative study of enzymes, phenolics, carotenoids and color of apricot nectars treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 18, 74-82.

Hussain, P., Wani, A., Meena, R., & Dar, M. (2010). Gamma irradiation induced enhancement of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and antioxidant activity in peach (*Prunus persica Bausch*, Cv. Elberta). *Radiation Physics and Chemistry*, 79(9), 982-989.

Iglesias, I., & Echeverría, G. (2009). Differential effect of cultivar and harvest date on nectarine colour, quality and consumer acceptance. *Scientia Horticulturae*, 120(1), 41-50.

Informe de análisis de mercado, Gobierno de Canadá (2011). Consumer Trends: Food for Individuals with Diabetes in the United States. Her Majesty the Queen in Right of Canada ISSN 1920-6593.

Jacobo-Velázquez, D., & Hernández-Brenes, C. (2010). Biochemical changes during the storage of high hydrostatic pressure processed avocado paste. *Journal of food science*, 75(6), S264-S270.

Jiménez, M., & García-Carmona, F. (1997). 4-Substituted resorcinols (sulfite alternatives) as slow-binding inhibitors of tyrosinase catecholase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6), 2061-2065.

Jolie, R., Christiaens, S., De Roeck, A., Fraeye, I., Houben, K., Van Buggenhout, S., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2012). Pectin conversions under high pressure: Implications for the structure-related quality characteristics of plant-based foods. *Trends in Food Science & Technology*, 24(2), 103-118.

Jurado, S., Sarmiento, P., Faisal, F., & Igal, S. (2007). El microscopio electrónico de transmisión: Generalidades y aplicaciones. *Manual de Microscopia Electrónica de Transmisión y Barrido: técnicas básicas para el procesamiento de especímenes biológicos*, 6-20.

Kader, A. (2004). Controlled Atmosphere Storage. The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks (Vol. 66). *Agriculture Handbook*, USDA, USA.

Karcz J., (2009) Scanning electron microscopy in biology. Laboratory of Scanning Electron Microscopy. *University of Silesia, Faculty of Biology and Environmental Protection*, Katowice, Poland.

Kato, N., Teramoto, A., & Fuchigami, M. (1997). Pectic substance degradation and texture of carrots as affected by pressurization. *Journal of Food Science*, 62(2), 359-362.

Kato, M., Hayashi, R., Tsuda, T., & Taniguchi, K. (2002). High pressure-induced changes of biological membrane. *European Journal of Biochemistry*, 269(1), 110-118.

5. Referencias Bibliográficas

- Kaushik, N., Kaur, B., & Rao, P. (2013). Application of high pressure processing for shelf life extension of litchi fruits (*Litchi chinensis* cv. Bombai) during refrigerated storage. *Food Science and Technology International*, 20(7), 527-541.
- Kaushik, N., Kaur, B., Rao, P., & Mishra, H. (2014). Effect of high pressure processing on color, biochemical and microbiological characteristics of mango pulp (*Mangifera indica* cv. Amrapali). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22, 40-50.
- Keenan, D., Brunton, N., Gormley, T., Butler, F., Tiwari, B., & Patras, A. (2010). Effect of thermal and high hydrostatic pressure processing on antioxidant activity and colour of fruit smoothies. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(4), 551-556.
- Keenan, D., Brunton, N., Gormley, R., & Butler, F. (2011). Effects of thermal and high hydrostatic pressure processing and storage on the content of polyphenols and some quality attributes of fruit smoothies. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 59(2), 601-607.
- Keenan, D., Rößle, C., Gormley, R., Butler, F., & Brunton, N. (2012). Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies. *LWT - Food Science and Technology*, 45(1), 50-57.
- Khalil, T., Al-Zubaidy, M., & Abdulaziz, O. (2011). Browning reaction kinetics of high hydrostatic pressure-treated peach puree during storage. *International Journal of Food Engineering*, 7(4), article 2.
- Kim, J., Seo, Y., Kim, J., Sung, S., Song, K., An, G., & Kim, W. (2001). Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. *Plant Science*, 161(6), 1145-1152.
- Kingsly, A., Balasubramaniam, V., & Rastogi, N. (2009-a). Influence of high-pressure blanching on polyphenoloxidase activity of peach fruits and its drying behavior. *International Journal of Food Properties*, 12(3), 671-680.
- Kingsly, A., Balasubramaniam, V., & Rastogi, N. (2009-b). Effect of high-pressure processing on texture and drying behavior of pineapple. *Journal of food process engineering*, 32(3), 369-381.
- Knockaert, G., De Roeck, A., Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2011). Effect of thermal and high pressure processes on structural and health-related properties of carrots (*Daucus carota*). *Food chemistry*, 125(3), 903-912.
- Knorr, D., Heinz, V., & Buckow, R. (2006). High pressure application for food biopolymers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1764(3), 619-631.
- Korkut, S. (2012). Performance of three thermally treated tropical wood species commonly used in Turkey. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 355-362.
- Koukounaras, A., Diamantidis, G., & Sfakiotakis, E. (2008). The effect of heat treatment on quality retention of fresh-cut peach. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), 30-36.
- Koutchma, T. (2014). *Adapting High Hydrostatic Pressure (HPP) for Food Processing Operations*. Academic Press, USA.

5. Referencias Bibliográficas

- Krasnow, M., Matthews, M., & Shackel, K. (2008). Evidence for substantial maintenance of membrane integrity and cell viability in normally developing grape (*Vitis vinifera* L.) berries throughout development. *Journal of experimental botany*, 59(4), 849-859.
- Laboissière, L., Deliza, R., Barros-Marcellini, A., Rosenthal, A., Camargo, L., & Junqueira, R. (2007). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on sensory characteristics of yellow passion fruit juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(4), 469-477.
- Lampe, J. (1999). Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3), 475s-490s.
- Landl, A., Abadias, M., Sárraga, C., Viñas, I., & Picouet, P. (2010). Effect of high pressure processing on the quality of acidified Granny Smith apple purée product. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(4), 557-564.
- Langdon, T. (1987). Prevention of browning in fresh prepared potatoes without the use of sulfating agents. *Food Technology*, 41, 64-67.
- Lara, M., Budde, C., Porrini, L., Borsani, J., Murray, R., Andreo, C., & Drincovich, M. (2011). Peach (*Prunus persica*) fruit response to anoxia: reversible ripening delay and biochemical changes. *Plant and cell physiology*, 52(2), 392-403.
- Laurienzo, P., Cammarota, G., Di Stasio, M., Gentile, G., Laurino, C., & Volpe, M. (2013). Microstructure and olfactory quality of apples de-hydrated by innovative technologies. *Journal of Food Engineering*, 116(3), 689-694.
- Lee, S., & Kader, A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest biology and technology*, 20(3), 207-220.
- Lewallen, K. (2000). Effects of light availability and canopy position on peach fruit quality (Tesis de Maestría en Ciencia), Virginia Polytechnic Institute and State University. Disponible en: <http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-04262000-13090002/unrestricted/part1.pdf>
- Li-Qin, Z., Jie, Z., Shu-Hua, Z., & Lai-Hui, G. (2009). Inhibition of browning on the surface of peach slices by short-term exposure to nitric oxide and ascorbic acid. *Food Chemistry*, 114(1), 174-179.
- Liu, F., Wang, Y., Li, R., Bi, X., & Liao, X. (2014). Effects of high hydrostatic pressure and high temperature short time on antioxidant activity, antioxidant compounds and color of mango nectars. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 21, 35-43.
- Liu, X., Zhang, M., Duan, J., & Wu, K. (2008). Gene expression analysis of germinating rice seeds responding to high hydrostatic pressure. *Journal of plant physiology*, 165(18), 1855-1864.
- Liu, Y., Zhao, X., Zou, L., & Hu, X. (2013). Effect of high hydrostatic pressure on overall quality parameters of watermelon juice. *Food Science and Technology International*, 19(3), 197-207.
- Livak, K., & Schmittgen, T. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408.

5. Referencias Bibliográficas

- López-Malo, A., Palou, E., Barbosa-Cánovas, G., Welti-Chanes, J., & Swanson, B. (1998). Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree. *Food Research International*, 31(8), 549-556.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem*, 193, 265-275.
- Lozano, J. (2006). Color, turbidity, and other sensorial and structural properties of fruits and fruits products. Chapter 5 in: *Fruit manufacturing: scientific basis, engineering properties, and deteriorative reactions of technological importance*. Springer, USA, 99-133.
- Lu, R., & Abbott, J. (2004). *Force/deformation techniques for measuring texture*. Chapter 5 in: *D. Kilcast (Ed.) Texture in Food, Vol. 2: Solid Foods, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England*, 109-145.
- Lurie, S., & Crisosto, C. (2005). Chilling injury in peach and nectarine. *Postharvest Biology and Technology*, 37(3), 195-208.
- Luscher, C., Schlüter, O., & Knorr, D. (2005). High pressure–low temperature processing of foods: impact on cell membranes, texture, color and visual appearance of potato tissue. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(1), 59-71.
- Manríquez, D., El-Sharkawy, I., Flores, F., El-Yahyaoui, F., Regad, F., Bouzayen, M., Latché, A. & Pech, J. (2006). Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics. *Plant molecular biology*, 61(4-5), 675-685.
- Margas, E., & Holah, J. (2011). Guidelines on good manufacturing practice for high pressure processed foods. *Guideline 67. Campden BRI, UK*. ISBN: 978 0 907503 69 9
- Marigheto, N., Vial, A., Wright, K., & Hills, B. (2004). A combined NMR and microstructural study of the effect of high-pressure processing on strawberries. *Applied Magnetic Resonance*, 26(4), 521-531.
- Martínez, V., Nieto, A., Castro, M., Salvatori, D., & Alzamora, S. (2007). Viscoelastic characteristics of Granny Smith apple during glucose osmotic dehydration. *Journal of food engineering*, 83(3), 394-403.
- Matei, N., Popescu, A., Munteanu, M., & Lucian Radu, G. (2013). The assessment of Cd, Zn, Pb, Cu and vitamin C in peaches. *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, 75(1), 73-79.
- Mayor, L., Moreira, R., & Sereno, A. (2011). Shrinkage, density, porosity and shape changes during dehydration of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) fruits. *Journal of Food Engineering*, 103(1), 29-37.
- McKay, A., Linton, M., Stirling, J., Mackle, A., & Patterson, M. (2011). A comparative study of changes in the microbiota of apple juice treated by high hydrostatic pressure (HHP) or high pressure homogenisation (HPH). *Food microbiology*, 28(8), 1426-1431.

5. Referencias Bibliográficas

- Meisel, L., Fonseca, B., González, S., Baeza-Yates, R., Cambiazo, V., Campos, R., González, M., Orellana, A., Retamales, J. & Silva, H. (2005). A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. *Biological research*, 38(1), 83-88.
- Mentré, P., & Hoa, G. (2001). Effects of high hydrostatic pressures on living cells: a consequence of the properties of macromolecules and macromolecule-associated water. *International review of cytology*, 201, 1-84.
- Miguel-Pintado, C., Nogales, S., Fernández-León, A. M., Delgado-Adámez, J., Hernández, T., Lozano, M., Cañada-Cañada, F., & Ramírez, R. (2013). Effect of hydrostatic high pressure processing on nectarine halves pretreated with ascorbic acid and calcium during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology*, 54(1), 278-284.
- Miller, J. B., Pang, E., & Broomhead, L. (1995). The glycaemic index of foods containing sugars: comparison of foods with naturally-occurring v. added sugars. *British Journal of Nutrition*, 73(04), 613-623.
- Miao, M., Wang, Q., Zhang, T., & Jiang, B. (2011). Effect of high hydrostatic pressure (HHP) treatment on texture changes of water bamboo shoots cultivated in China. *Postharvest Biology and Technology*, 59(3), 327-329.
- Mitcham, B., Cantwell, M., & Kader, A. (1996). Methods for determining quality of fresh commodities. *Perishables handling newsletter*, 85, 1-5.
- Montero-Calderón, M., Graü, R., Soliva Fortuny, R., & Martín Belloso, O. (2009). Trends in the minimal processing of fresh fruits and vegetables. *Revista de Industria, Distribución y Socioeconomía Hortícola. Fresh Produce Technology, Marketing and Commercialization*.
- Mor-Mur, M. (2010). Alimentos tratados por alta presión. Aspectos nutricionales. *Actividad Dietética*, 14(2), 53-58.
- Nevin, R. (2009). Enzyme structures database. London. Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/thorntonsrv/databases/enzymes/> (Actualizada Enero 2015).
- Nguyen, L., Tay, A., Balasubramaniam, V., Legan, J., Turek, E., & Gupta, R. (2010). Evaluating the impact of thermal and pressure treatment in preserving textural quality of selected foods. *LWT-Food Science and Technology*, 43(3), 525-534.
- Nienaber, U., & Shellhammer, T. (2001). High-Pressure Processing of Orange Juice: Combination Treatments and a Shelf Life Study. *Journal of Food Science*, 66(2), 332-336.
- Nisperos-Carriedo, M., Buslig, B., & Shaw, P. (1992). Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic, and some organic acids in fruits and vegetables by HPLC. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(7), 1127-1130.
- Norton, T., & Sun, D. (2008). Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 2-34.

5. Referencias Bibliográficas

- Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008-a). Effect of high-pressure processing on colour, texture and *flavour* of fruit-and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19(6), 320-328.
- Oey, I., Van der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008-b). Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems?. *Trends in Food Science & Technology*, 19(6), 300-308.
- Oke, M., Jacob, J., & Paliyath, G. (2006). Biochemistry of fruit processing. *Food Biochemistry and Food Processing, Second Edition*, 554-568.
- Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2012). Stability of health-related compounds in plant foods through the application of non thermal processes. *Trends in Food Science & Technology*, 23(2), 111-123.
- Oms-Oliu, G., Rojas-Graü, M., González, L., Varela, P., Soliva-Fortuny, R., Hernando, M., Munuera, I., Fiszman, S., & Martín-Belloso, O. (2010). Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 57(3), 139-148.
- Orozco-Cárdenas, M., Narváez-Vásquez, J., & Ryan, C. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell Online*, 13(1), 179-191.
- Paliyath, G. & Murr, D. (2006). Biochemistry of fruits. Chapter 21 en: Hui, Y., Nip, W., Nollet, L., Paliyath, G., & Simpson, B. (Eds.). *Food biochemistry and food processing*. Blackwell Publishing, USA, 487-515.
- Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G., Welti-Chanes, J., & Swanson, B. (1999). Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. *Journal of Food Science* 64 (1), 42-45.
- Patras, A., Brunton, N., Da Pieve, S., & Butler, F. (2009). Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(3), 308-313.
- Park, S., Balasubramaniam, V., & Sastry, S. (2013). Estimating pressure induced changes in vegetable tissue using *in situ* electrical conductivity measurement and instrumental analysis. *Journal of Food Engineering*, 114(1), 47-56.
- Pavez, L., Hödar, C., Olivares, F., González, M., & Cambiazo, V. (2013). Effects of postharvest treatments on gene expression in *Prunus persica* fruit: Normal and altered ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 75, 125-134.
- Pelissari, F., Andrade-Mahecha, M., Sobral, P., & Menegalli, F. (2013). Optimization of process conditions for the production of films based on the flour from plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *LWT-Food Science and Technology*, 52(1), 1-11.
- Perera, N., Gamage, T., Wakeling, L., Gamlath, G., & Versteeg, C. (2010). Colour and texture of apples high pressure processed in pineapple juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 39-46.

5. Referencias Bibliográficas

- Perez-Gago, M., Serra, M., & Del Rio, M. (2006). Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 39(1), 84-92.
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Pizzocaro, F., Torregiani, D., & Gilardi, G. (1993). Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric and sodium chloride. *Journal of Food Processing Preservation*, 17, 21–30.
- Polenta, G., Budde, C., & Murray, R. (2005). Effects of different pre-storage anoxic treatments on ethanol and acetaldehyde content in peaches. *Postharvest Biology and Technology*, 38(3), 247-253.
- Polydera, A., Stoforos, N., & Taoukis, P. (2003). Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. *Journal of Food Engineering*, 60(1), 21-29.
- Polydera, A., Stoforos, N., & Taoukis, P. (2005). Quality degradation kinetics of pasteurised and high pressure processed fresh Navel orange juice: Nutritional parameters and shelf life. *Innovative food science & emerging technologies*, 6(1), 1-9.
- Porretta, S., Birzi, A., Ghizzoni, C., & Vicini, E. (1995). Effects of ultra-high hydrostatic pressure treatments on the quality of tomato juice. *Food Chemistry*, 52(1), 35-41.
- Préstamo, G., & Arroyo, G. (1998). High hydrostatic pressure effects on vegetable structure. *Journal of Food Science*, 63(5), 878-881.
- Prestamo, G., & Arroyo, G. (1999). Protective effect of ascorbic acid against the browning developed in apple fruit treated with high hydrostatic pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3541-3545.
- Ramirez, E., Whitaker, J. (2003). Polyphenol oxidase. En: Whitaker, J., Voragen, A. & Wong D. (Eds.). *Handbook of Food Enzymology*. Marcel Dekker Inc. New York, 509-523.
- Rao, L., Guo, X., Pang, X., Tan, X., Liao, X., & Wu, J. (2014). Enzyme activity and nutritional quality of peach (*Prunus persica*) juice: effect of high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Properties*, 17(6), 1406-1417.
- Rapeanu, G., Loey, V., Smout, C., & Hendrickx, M. (2005). Effect of pH on thermal and/or pressure inactivation of victoria grape (*Vitis vinifera sativa*) polyphenol oxidase: A kinetic study. *Journal of Food Science*, 70(5), E301-E307.
- Rastogi, N. (2009). Effect of high pressure on textural and microstructural properties of fruits and vegetables. Chapter 16 in: Ahmed, J., Ramaswamy, H., Kasapis, S., Boye, J. (Eds.) *Novel Food Processing. Effect on Rheological and Functional Properties*. CRC Press, USA, 301-319.
- Rastogi, N., & Niranjana, K. (1998). Enhanced mass transfer during osmotic dehydration of high pressure treated pineapple. *Journal of Food Science*, 63(3), 508-511.

5. Referencias Bibliográficas

- Remorini, D., Tavarini, S., Degl'Innocenti, E., Loreti, F., Massai, R., & Guidi, L. (2008). Effect of rootstocks and harvesting time on the nutritional quality of peel and flesh of peach fruits. *Food Chemistry*, 110(2), 361-367.
- Rickman, J., Barrett, D., & Bruhn, C. (2007). Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins C and B and phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(6), 930-944.
- Rivalain, N., Roquain, J., & Demazeau, G. (2010). Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies. *Biotechnology Advances*, 28(6), 659-672.
- Robles-Sánchez, R., Rojas-Graü, M., Odriozola-Serrano, I., González-Aguilar, G., & Martín-Belloso, O. (2009). Effect of minimal processing on bioactive compounds and antioxidant activity of fresh-cut 'Kent' mango (*Mangifera indica* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 51(3), 384-390.
- Rocha, A., & Morais, A. (2003). Shelf life of minimally processed apple (cv. Jonagored) determined by colour changes. *Food Control*, 14(1), 13-20.
- Rouissi, T., Mahmoudi, A., Tyagi, R., Brar, S., Prévost, D., & Surampalli, R. (2013). Optimisation of spray drying by response surface methodology for the production of *Sinorhizobium meliloti* powder formulation by using starch industry wastewater. *Biosystems engineering*, 114(3), 334-343.
- Rupasinghe, H., Murr, D., Deell, J., & Odumeru, J. (2005). Influence of 1-methylcyclopropene and natureseal on the quality of fresh-cut "empire" and "crispin" apples. *Journal of food quality*, 28(3), 289-307.
- Sajnin, C., Gamba, G., Gerschenson, L., & Rojas, A. (2003). Textural, histological and biochemical changes in cucumber (*Cucumis sativus* L) due to immersion and variations in turgor pressure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(7), 731-740.
- San Martin, M., Barbosa-Cánovas, G., & Swanson, B. (2002) Food processing by high hydrostatic pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(6), 627-645.
- Sanchez-Moreno, C., Cano, M., De Ancos, B., Plaza, L., Olmedilla, B., Granado, F., & Martín, A. (2003). High-pressurized orange juice consumption affects plasma vitamin C, antioxidative status and inflammatory markers in healthy humans. *The Journal of nutrition*, 133(7), 2204-2209.
- Sapers, G. (1993). Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. *Food Technology*, 68, 75-84.
- Scattino, C., Castagna, A., Neugart, S., Chan, H., Schreiner, M., Crisosto, C., Tonutti, P. & Ranieri, A. (2014). Post-harvest UV-B irradiation induces changes of phenol contents and corresponding biosynthetic gene expression in peaches and nectarines. *Food Chemistry*, 163, 51-60.
- Shen, Z., Confolent, C., Lambert, P., Poëssel, J.-L., Quilot-Turion, B., Yu, M., Ma, R., Pascal, T. (2013). Characterization and genetic mapping of a new blood-flesh trait controlled by the single dominant locus DBF in peach. *Tree Genetics & Genomes*, 9(6), 1435-1446.

5. Referencias Bibliográficas

Siddiq, M. (2006). Peach and Nectarine. Chapter 27 in Hui, Y. H., Barta, J., Cano, M. P., Gusek, T. W., Sidhu, J. S., & Sinha, N. *Handbook of fruits and fruit processing*. Blackwell Publisher Ltd., UK, 519-531.

Sila, D., Duvetter, T., De Roeck, A., Verlent, I., Smout, C., Moates, G., Hills, B., Waldron, K., Hendrickx, M. & Van Loey, A. (2008). Texture changes of processed fruits and vegetables: potential use of high-pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*, 19(6), 309-319.

Sin, H., Yusof, S., Sheikh Abdul Hamid, N., & Rahman, R. (2006). Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 73(4), 313-319.

Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas SENASA (2009). Ficha técnica: Duraznero
Página web: <http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/duraznero> (Actualizado Enero 2015).

Smith, J., (1993). Antimicrobial preservative-reduced foods en Smith, J. (Ed.). *Technology of reduced additive foods*. John Wiley & Sons, 132.

Snedecor, G. & Cochran, W. (1989). Statistical methods (8th Ed.). *Iowa State University Press*. Ames, Iowa, 503.

Soliva-Fortuny, R. , Oms-Oliu, G., & Martín-Belloso, O. (2002). Effects of Ripeness Stages on the Storage Atmosphere, Color, and Textural Properties of Minimally Processed Apple Slices, *Journal of Food Science*, 67(5), 1958-1963.

Stable Micro Systems Ltd. (1997). Introduction to Texture Analysis. Application Guide. *Stable Micro Systems*, Surrey, England

Stokes, D. (2003). Investigating biological ultrastructure using environmental scanning electron microscopy (ESEM). *Science, Technology and Education of Microscopy: An Overview*, 1, 564-570.

Stokes, D. (2008). Principles of SEM. Chapter 2 in: *Principles and Practice of Variable Pressure: Environmental Scanning Electron Microscopy (VP-ESEM)*. RMS - Royal Microscopical Society. John Wiley & Sons, Cornwall, UK, 17-62.

Sulaiman, A., & Silva, F. (2013). High pressure processing, thermal processing and freezing of 'Camarosa' strawberry for the inactivation of polyphenoloxidase and control of browning. *Food Control*, 33(2), 424-428.

Sumitani, H., Suekane, S., Nakatani, A., & Tatsuka, K. (1994). Changes in composition of volatile compounds in high pressure treated peach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(3), 785-790.

Sumitani, H., Suekane, S., Nakatani, A., & Tatsuka, K. (1997). The effect of added L-ascorbic acid, and sodium chloride on the change in concentration of some volatiles in pressurised peach homogenate during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(1), 73-79.

5. Referencias Bibliográficas

- Szczesniak, A. S. (2002). Texture is a sensory property. *Food quality and preference*, 13(4), 215-225.
- Tangwongchai, R., Ledward, D., & Ames, J. (2000). Effect of high-pressure treatment on the texture of cherry tomato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1434-1441.
- Tao, Y., Sun, D., Hogan, E. & Kelly, A. (2014). High-Pressure Processing of Foods: An Overview. Chapter 1 in: Sun, D.-W. (Ed.). *Emerging technologies for food processing (2nd Ed.)*. Academic Press, USA, 3-24.
- Tareen, M.; Abbasi, N. & Hafiz, I. (2012). Postharvest application of salicylic acid enhanced antioxidant enzyme activity and maintained quality of peach cv. 'Flordaking' fruit during storage. *Scientia Horticulturae*, 142, 221-228.
- Tavarini, S., Degl'Innocenti, E., Remorini, D., Massai, R., & Guidi, L. (2008). Preliminary characterisation of peach cultivars for their antioxidant capacity. *International journal of food science & technology*, 43(5), 810-815.
- Terefe, N., Buckow, R., & Versteeg, C. (2014). Quality-Related Enzymes in Fruit and Vegetable Products: Effects of Novel Food Processing Technologies, Part 1: High-Pressure Processing. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(1), 24-63.
- Terefe, N., Kleintschek, T., Gamage, T., Fanning, K., Netzel, G., Versteeg, C., & Netzel, M. (2013). Comparative effects of thermal and high pressure processing on phenolic phytochemicals in different strawberry cultivars. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 57-65.
- Tewari, G. (2008). High Pressure Processing of foods-Chapter 12 in: Tewari, G., & Juneja, V. (Eds.). *Advances in thermal and non-thermal food preservation*. John Wiley & Sons.
- Toivonen, P., & Brummell, D. A. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), 1-14.
- Tonello, C. (2011). Case Studies on High-Pressure Processing of Foods-Chapter 4 in: Zhang, H.; Barbosa-Cánovas, G.; Balasubramaniam, V., Dunne, C.; Farkas, D.; & Yuan, J. (Eds.) *Nonthermal processing technologies for food*. Wiley-Blackwell, USA, 36-50.
- Tonello, C. (2014). Advances in high pressure processing (HPP): equipment and commercial implementations. Oral presentation on the 2014 International Nonthermal Processing Workshop. The Ohio State University. Columbus, Ohio, USA.
- Tong, Z., Gao, Z., Wang, F., Zhou, J., & Zhang, Z. (2009). Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 10(1), 71.
- Torres, J., & Velazquez, G. (2005). Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, 67(1), 95-112.
- Tosetti, R., Martinelli, F., Tonutti, P. & Barupal, D.K. (2012). Metabolomics Approach to Studying Minimally Processed Peach (*Prunus persica*) Fruit. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 934, 1017-1021.
- Trejo Araya, X., Hendrickx, M., Verlinden, B., Van Buggenhout, S., Smale, N., Stewart, C., & John Mawson, A. (2007). Understanding texture changes of high pressure processed fresh carrots: A microstructural and biochemical approach. *Journal of food engineering*, 80(3), 873-884.

5. Referencias Bibliográficas

- Trejo Araya, X., Smale, N., Zabarás, D., Winley, E., Forde, C., Stewart, C., & Mawson, A. (2009). Sensory perception and quality attributes of high pressure processed carrots in comparison to raw, *sous-vide* and cooked carrots. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 420-433.
- Tu, K., & De Baerdemaeker, J. (1996). Instrumental measurements to investigate apple mealy texture. *Int. Agrophysics*, 10, 97-102.
- Valente, A., Albuquerque, T., Sanches-Silva, A., & Costa, H. (2011). Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases. *Food Research International*, 44(7), 2237-2242.
- Van Buggenhout, S., Sila, D., Duvetter, T., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2009). Pectins in processed fruits and vegetables: Part III—Texture engineering. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(2), 105-117.
- Van der Plancken, I., Verbeyst, L., De Vleeschouwer, K., Grauwet, T., Heiniö, R., Husband, F., Lille, M., Mackie, A., Van Loey, A., Viljanen, K., & Hendrickx, M. (2012). (Bio) chemical reactions during high pressure/high temperature processing affect safety and quality of plant-based foods. *Trends in Food Science & Technology*, 23(1), 28-38.
- Vanderslice, J. (1992). Vitamin C: Present State of Methodology. Content Variability in Food Samples. Update on Methods and Values I. *Proceedings 17th National Nutrient Databank Conference*, Baltimore, Mariland.
- Vázquez-Gutiérrez, J., Hernández-Carrión, M., Quiles, A., Hernando, I., & Pérez-Munuera, I. (2012). Impact of high hydrostatic pressures on the structure, diffusion of soluble compounds and textural properties of persimmon 'Rojo Brillante'. *Food Research International*, 47(2), 218-222.
- Vazquez-Gutierrez, J., Hernandez-Carrion, M., Quiles, A., & Hernando, I. (2014). Influence of Storage at 4 C on the Stability of High Hydrostatic Pressure Treated Onion. *Czech J. Food Sci. Vol*, 32(1), 96-101.
- Vázquez-Gutiérrez, J., Plaza, L., Hernando, I., Sánchez-Moreno, C., Quiles, A., de Ancos, B., & Cano, M. (2013). Changes in the structure and antioxidant properties of onions by high pressure treatment. *Food & function*, 4(4), 586-591.
- Vázquez-Gutiérrez, J., Quiles, A., Hernando, I., & Pérez-Munuera, I. (2011). Changes in the microstructure and location of some bioactive compounds in persimmons treated by high hydrostatic pressure. *Postharvest Biology and Technology*, 61(2), 137-144.
- Vega-Gálvez, A., López, J., Torres-Ossandón, M., Galotto, M., Puente-Díaz, L., Quispe-Fuentes, I., & Di Scala, K. (2014). High hydrostatic pressure effect on chemical composition, color, phenolic acids and antioxidant capacity of Cape gooseberry pulp (*Physalis peruviana* L.). *LWT-Food Science and Technology*, 58(2), 519-526.
- Vercammen, A., Vanoirbeek, K., Lemmens, L., Lurquin, I., Hendrickx, M., & Michiels, C. (2012). High pressure pasteurization of apple pieces in syrup: Microbiological shelf-life and quality evolution during refrigerated storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 259-266.

5. Referencias Bibliográficas

- Villamiel, M., & Corzo, N. (2006). Browning Reactions. In: Hui, W., Nollet, L., Paliyath, G., & Simpson, B. (Eds.). *Food Biochemistry and Food Processing*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 71-100.
- Walker, J. (1992) Spectrophotometric determination of enzyme activity: Alcohol Dehydrogenase (ADH). *Biochemical Education*, 20 (1), 42-43.
- Wang, Y., Liu, F., Cao, X., Chen, F., Hu, X., & Liao, X. (2012). Comparison of high hydrostatic pressure and high temperature short time processing on quality of purple sweet potato nectar. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 326-334.
- Weemaes, C., Ludikhuyze, L., Van Den Broeck, I., & Hendrickx, M. (1998). High Pressure Inactivation of Polyphenoloxidases. *Journal of Food Science*, 63(5), 873-877.
- Welti-Chanes J., López-Malo A., Palou E, Bermúdez D., Guerrero-Beltrán J. & Barbosa-Cánovas G. (2005). Fundamentals and Applications of High Pressure Processing of Foods. In: Barbosa-Cánovas, G., Tapia, M., & Cano. M. (Eds.). *Novel Food Processing Technologies*. CRC Press, USA, 157-181.
- Wiley, R. (1997). *Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas*. Acribia S.A., Zaragoza, España.
- Wills, R., McGlasson, B., Graham, D., & Joyce, D. (1998). Postharvest. *An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit, Vegetables and Ornamentals*. UNSW Press, Australia.
- Wolbang, C., Fitos, J., & Treeby, M. (2008). The effect of high pressure processing on nutritional value and quality attributes of *Cucumis melo* L. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 196-200.
- Woolf, A., Wibisono, R., Farr, J., Hallett, I., Richter, L., Oey, I., Wohlers, M., Zhou, J., Fletcher, G. & Requejo-Jackman, C. (2013). Effect of high pressure processing on avocado slices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 18, 65-73.
- World Health Organization (WHO) (2014) "Diabetes Prevalence, Argentina" consultado de <https://apps.who.int/infobase/Indicators.aspx> (Actualizado diciembre 2014).
- Yaldagard, M., Mortazavi, S., & Tabatabaie, F. (2008). The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects. *African Journal of Biotechnology*, 7(16).
- Yang, Z., Zheng, Y., Cao, S., Tang, S., Ma, S., & Li, N. (2007). Effects of storage temperature on textural properties of Chinese bayberry fruit. *Journal of texture studies*, 38(1), 166-177.
- Yen, G., & Lin, H. (1996). Comparison of high pressure treatment and thermal pasteurization effects on the quality and shelf life of guava puree. *International journal of food science & technology*, 31(2), 205-213.
- Yoruk, R., & Marshall, M. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *Journal of Food Biochemistry*, 27(5), 361-422.

5. Referencias Bibliográficas

Yu, Y., Lin, Y., Zhan, Y., He, J., & Zhu, S. (2013). Effect of high pressure processing on the stability of anthocyanin, ascorbic acid and color of Chinese bayberry juice during storage. *Journal of Food Engineering*, 119(3), 701-706.

Zabetakis, I., Koulentianos, A., Orruño, E., & Boyes, I. (2000). The effect of high hydrostatic pressure on strawberry *flavour* compounds. *Food Chemistry*, 71(1), 51-55.

Zhang, F., Dong, P., Feng, L., Chen, F., Wu, J., Liao, X., & Hu, X. (2012). Textural Changes of Yellow Peach in Pouches Processed by High Hydrostatic Pressure and Thermal Processing During Storage. *Food and Bioprocess Technology*, 5(8), 3170-3180.

Zhou, C., Liu, W., Zhao, J., Yuan, C., Song, Y., Chen, D., Ni, Y & Li, Q. (2014). The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and physical–chemical characteristics of Pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.) during refrigerated storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 21(0), 24-34.

Zhou, T., Xu, S., Sun, D., & Wang, Z. (2002). Effects of heat treatment on postharvest quality of peaches. *Journal of Food Engineering*, 54(1), 17-22.