

Alimentos funcionales a partir de manzana mínimamente procesada

Es creciente la demanda de los consumidores por alimentos naturales, que resulten seguros, fáciles de consumir y sensorialmente agradables. En este libro se describen investigaciones sobre tecnologías emergentes de preservación como alternativa a las convencionalmente empleadas, con el objetivo de asegurar la inocuidad y mantener la calidad de manzana mínimamente procesada. En la Parte 1 se describe la aplicación de recubrimientos activos enriquecidos con preservantes naturales para mejorar la calidad y seguridad de cubos de manzana. En la Parte 2 se detalla la aplicación de recubrimientos activos combinados con altas presiones y su impacto sobre parámetros de calidad de cubos de manzana. El consumo de alimentos probióticos se ha incrementado en los últimos años y la mayoría de los productos disponibles son de base láctea. Las frutas mínimamente procesadas con agregado de prebióticos y probióticos resultan una alternativa innovadora para el mercado. Así, en la Parte 3 se detalla el desarrollo de recubrimientos comestibles de alginato de sodio enriquecidos con compuestos prebióticos y bacterias probióticas, aplicados sobre manzana mínimamente procesada refrigerada.

Los autores de estas investigaciones somos investigadoras pertenecientes al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Trabajamos en el Grupo de Investigación en Ingeniería en Alimentos de la Facultad de Ingeniería de la UNMdP en Mar del Plata Argentina, que cuenta con más de 25 años de experiencia en este campo de estudio.



editorial académica **española**

eae
editorial académica **española**



María Florencia Bambace · María Victoria Alvarez ·
María del Rosario Moreira

Alimentos funcionales a partir de manzana mínimamente procesada

Aplicación de técnicas de biopreservación sobre manzanas cortadas y su evaluación como alimento funcional probiótico

Bambace, Alvarez, Moreira

María Florencia Bambace
María Victoria Alvarez
María del Rosario Moreira

Alimentos funcionales a partir de manzana mínimamente procesada

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

**María Florencia Bambace
María Victoria Alvarez
María del Rosario Moreira**

Alimentos funcionales a partir de manzana mínimamente procesada

**Aplicación de técnicas de biopreservación sobre
manzanas cortadas y su evaluación como
alimento funcional probiótico**

Editorial Académica Española

Imprint

Any brand names and product names mentioned in this book are subject to trademark, brand or patent protection and are trademarks or registered trademarks of their respective holders. The use of brand names, product names, common names, trade names, product descriptions etc. even without a particular marking in this work is in no way to be construed to mean that such names may be regarded as unrestricted in respect of trademark and brand protection legislation and could thus be used by anyone.

Cover image: www.ingimage.com

Publisher:

Editorial Académica Española

is a trademark of

Dodo Books Indian Ocean Ltd. and OmniScriptum S.R.L publishing group

120 High Road, East Finchley, London, N2 9ED, United Kingdom

Str. Armeneasca 28/1, office 1, Chisinau MD-2012, Republic of Moldova,
Europe

Printed at: see last page

ISBN: 978-620-2-25635-3

Copyright © María Florencia Bambace, María Victoria Alvarez,
María del Rosario Moreira

Copyright © 2023 Dodo Books Indian Ocean Ltd. and OmniScriptum S.R.L
publishing group

FOR AUTHOR USE ONLY

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE BIOPRESERVACIÓN SOBRE MANZANAS
CORTADAS Y SU EVALUACIÓN COMO ALIMENTO FUNCIONAL
PROBIÓTICO**

María F. Bambace^{1,2}, Maria V. Alvarez^{1,2}, María del R. Moreira^{1,2*}

¹ Grupo de Investigación en Ingeniería en Alimentos (GIIA), Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Ambiente (INCITAA, CIC-UNMDP), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata, Juan B. Justo 4302, B7602AYL Mar del Plata, Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CCT-Mar del Plata, Argentina.

*moreira_maria@fi.mdp.edu.ar

FOR AUTHOR USE ONLY

INDICE

Parte 1. Aplicación de recubrimientos activos enriquecidos con preservantes naturales como estrategia para mejorar la calidad y seguridad de cubos de manzana

.....	5
1.1 Introducción	5
Primera etapa: Aplicación de recubrimientos activos de quitosano sobre cubos de manzana	
1.2 Materiales y métodos	8
1.2.1 Sustrato vegetal	8
1.2.2 Formulación y aplicación de los recubrimientos	8
1.2.3 Análisis microbiológicos	9
1.2.4 Efecto de los recubrimientos activos de quitosano sobre <i>E. coli</i> O157:H7 FP605/03 y <i>L. innocua</i> CIP 80.11 inoculados en cubos de manzana	9
1.2.5 Análisis sensorial	10
1.2.6 Análisis estadístico	11
1.3 Resultados y discusión	11
1.3.1 Evolución de la microflora nativa de cubos de manzana tratados con recubrimientos activos de quitosano	11
1.3.2 Efecto de recubrimientos de quitosano sobre la evolución de <i>E. coli</i> O157:H7 FP605/03 y <i>L. innocua</i> CIP 80.11 inoculados en cubos de manzana	14
1.3.3 Evaluación sensorial de cubos de manzana recubiertos con quitosano	16
Segunda etapa: Aplicación de recubrimientos activos de goma gelano sobre cubos de manzana	
1.4 Materiales y métodos	18
1.4.1 Fibra alimentaria	18
1.4.2 Formulación y aplicación de los recubrimientos	19
1.4.3 Evaluación de la microflora nativa	20
1.4.4 Modelado de bacterias aerobias mesófilas y de mohos y levaduras	20
1.4.5 Determinación de color y firmeza	22

1.4.6 Análisis de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante	22
1.4.7 Análisis sensorial	23
1.4.8 Efecto de recubrimientos activos de goma gelano sobre <i>E. coli</i> O157:H7 FP605/03 y <i>L. innocua</i> CIP 80.11 inoculados en cubos de manzana	24
1.4.9 Análisis estadístico	24
1.5 Resultados y discusión	25
1.5.1 Calidad microbiológica	25
1.5.2 Parámetros de color	30
1.5.3 Firmeza de cubos de manzana	34
1.5.4 Propiedades antioxidantes	35
1.5.5 Evaluación sensorial	39
1.5.6 Efecto de recubrimientos activos de gelano enriquecidos con preservantes naturales sobre la evolución de <i>E. coli</i> O157:H7 FP605/03 y <i>L. innocua</i> CIP 80.11 inoculados en cubos de manzana	42
1.6 Conclusiones	45

Parte 2. Recubrimientos activos combinados con altas presiones y su impacto sobre compuestos fenólicos, calidad microbiológica y principales parámetros fisicoquímicos de cubos de manzana

2.1 Introducción	47
2.2 Materiales y métodos.....	49
2.2.1 Biopolímero formador de recubrimientos y compuesto bioactivo	49
2.2.2 Sustrato vegetal	49
2.2.3 Formulación y aplicación de los recubrimientos	49
2.2.4 Procesamiento con altas presiones	50
2.2.5 Efecto de los tratamientos combinados sobre la calidad microbiológica y la supervivencia de <i>E. coli</i> y <i>L. monocytogenes</i>	50
2.2.6 Determinación de color y firmeza	52

2.2.7 Actividad enzimática de polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (POD)	52
2.2.8 Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	53
2.2.9 Análisis de compuestos fenólicos y propiedades antioxidantes	54
2.2.10 Análisis estadístico	56
2.3 Resultados y discusión	56
2.3.1 Efectos del tratamiento HPP sobre la calidad microbiológica de cubos de manzana y patógenos inoculados	56
2.3.2 Firmeza y color de cubos de manzana tratados con HPP	58
2.3.3 Actividad enzimática de cubos de manzana	61
2.3.4 Análisis de compuestos fenólicos por HPLC	62
2.3.5 Compuestos fenólicos determinados por Folin-Ciocalteu	69
2.3.6 Capacidad antioxidante de cubos de manzana	71
2.4. Conclusiones	73

Parte 3. Recubrimientos de alginato en cubos de manzana como vehículo para lactobacilos y bifidobacterias probióticos: viabilidad probiótica y calidad global del producto funcional

3.1 Introducción	74
3.2 Materiales y métodos	76
3.2.1 Biopolímero formador de recubrimiento y microorganismos probióticos	76
3.2.2 Compuestos prebióticos	76
3.2.3. Sustrato vegetal y formulación de los recubrimientos funcionales de alginato	76
3.2.4 Aplicación de los recubrimientos sobre cubos de manzana	76
3.2.5 Evaluación de la microflora nativa de cubos de manzana	77
3.2.6 Análisis de microestructura superficial por microscopía electrónica de barrido	77
3.2.7 Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	78

3.2.8 Monitoreo de la viabilidad de <i>L. rhamnosus</i> CECT 8361 y <i>B. lactis</i> CECT 8145 en cubos de manzana	79
3.2.9 Análisis de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante	79
3.2.10 Determinación de color y firmeza	80
3.2.11 Análisis sensorial	80
3.2.12 Evaluación del potencial antagonico de probióticos frente a patógenos en cubos de manzana	81
3.2.13 Análisis estadístico	82
3.3 Resultados y discusión	82
3.3.1 Calidad microbiológica de cubos de manzana tratados con recubrimientos funcionales de alginato	83
3.3.2 Observación de la microestructura superficial mediante microscopía electrónica de barrido	85
3.3.3 Viabilidad de probióticos en cubos de manzana en el almacenamiento refrigerado y durante la DGI	86
3.3.4. Evolución de compuestos bioactivos durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> ..	91
3.3.5 Color y textura de cubos de manzana tratados con recubrimientos funcionales de alginato	95
3.3.6 Impacto de los recubrimientos funcionales sobre la calidad sensorial de cubos de manzana	99
3.3.7 Efecto antagonico de recubrimientos funcionales con probióticos frente a <i>E. coli</i> O157:H7 FP605/03 y <i>L. innocua</i> 80.11 en cubos de manzana	100
3.4 Conclusiones	102
Referencias	104

Parte 1: Aplicación de recubrimientos activos enriquecidos con preservantes naturales como estrategia para mejorar la calidad y seguridad de cubos de manzana

1.1 Introducción

Al momento de definir la buena calidad general de un producto fresco cortado son varias las características que deben considerarse: apariencia fresca, textura aceptable, buen sabor y aroma, seguridad microbiológica y vida útil suficientemente larga que permita incluir al producto dentro de un sistema de distribución. Obtener un producto con estas características representa un desafío tanto para el ámbito científico como para el industrial, por lo que actualmente se dirigen grandes esfuerzos hacia el control de aquellos factores que de una u otra manera puedan desencadenar reacciones que perjudiquen la calidad del producto final. En este sentido, es sabido que los vegetales frescos cortados se deterioran de manera mucho más rápida que los productos intactos como resultado directo de las heridas provocadas por el pelado y corte, las cuales conducen a cambios físicos y fisiológicos que afectan la calidad del alimento (Ramos *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2015b). Los síntomas de deterioro de los productos frescos cortados incluyen cambios en la textura (pérdida de turgencia debido a pérdida de agua en los tejidos), en el color (especialmente atribuible a la aparición de pardeamiento enzimático en las superficies cortadas) (Barrett *et al.*, 2010) y suponen un riesgo de contaminación microbiológica debido a la mayor superficie expuesta y a la manipulación a la que son sometidos durante su elaboración.

Hasta el momento, muchas investigaciones se han llevado adelante con el objetivo de inhibir las reacciones de pardeamiento y el ablandamiento en los productos frescos cortados. Por ejemplo, la aplicación combinada de cloruro de calcio al 0.5 % como tratamiento estabilizante de la textura y de ácido ascórbico al 1 % mostró un notable efecto en la conservación de manzana mínimamente procesada, incrementándose dicho efecto con una atmósfera libre de oxígeno (Moreira *et al.*, 2015b). De este modo, el empleo de sustancias que retrasen o inhiban la acción enzimática, así como el uso de envases con atmósfera modificada, son los tratamientos aplicados con mayor frecuencia en productos frescos cortados (Ma *et al.*, 2017). Otro punto muy importante a considerar es que las frutas pueden actuar como vehículo de patógenos causantes de ETA. Aunque las manzanas

tienen un pH bajo, se ha demostrado el crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* sobre el tejido de esta fruta almacenada en atmósfera de aire (Abadías *et al.*, 2009, 2011; Alegre *et al.*, 2010). La manzana es una fruta muy popular, la segunda más consumida después de la banana en todo el mundo (Hyun y Jang, 2016). Los beneficios para la salud relacionados con el consumo de manzana están asociados con la función vascular, la presión arterial, la disminución de la absorción de grasas debido a interacciones entre lípidos y los polifenoles de la manzana, efectos antiinflamatorios y la prevención de la hiperglucemia como resultado de la inhibición de la expresión de genes inflamatorios y de la actividad de transportadores de glucosa, entre otros (Bondonno *et al.*, 2017). Estos beneficios se atribuyen principalmente a sus altos valores nutraceuticos y al contenido de polifenoles que aportan. Aunque la pulpa de manzana contiene menos compuestos fenólicos en comparación con la cáscara (Chen *et al.*, 2012), muchos consumidores prefieren la manzana fresca pelada. Por lo tanto, su susceptibilidad al deterioro enzimático y microbiano durante las operaciones de poscosecha, manipulación y procesamiento representan aspectos importantes desde el punto de vista de la ciencia y la tecnología de los alimentos.

De este modo, los recubrimientos comestibles constituyen una estrategia con potencial para reducir los efectos perjudiciales que el procesamiento mínimo podría ocasionar sobre los tejidos de las frutas frescas cortadas, conformando un campo innovador en el área de la conservación de alimentos mínimamente procesados. Estos recubrimientos pueden estar constituidos por finas películas de polímeros naturales biodegradables (polisacáridos, proteínas animales y vegetales, lípidos), con lo cual representan además una tecnología respetuosa con el medio ambiente. Los recubrimientos comestibles funcionan como una barrera selectiva a los gases (O_2 , CO_2 , etileno), reduciendo o ralentizando la pérdida de agua, los procesos oxidativos, el crecimiento microbiano y aumentando la resistencia mecánica del producto. Además, pueden ser utilizados como envases activos al incorporar en la matriz polimérica aditivos naturales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes reafirmantes de la textura, compuestos nutricionales o ingredientes bioactivos con el objetivo de incrementar la seguridad y mantener las características sensoriales, nutricionales y funcionales de las frutas mínimamente procesadas (De Ancos *et al.*, 2015; Kumar y Sethi, 2018).

Entre los polisacáridos empleados para la formulación de recubrimientos comestibles, la goma gelano resulta apropiada debido a sus propiedades coloidales y a su habilidad para

formar geles en presencia de cationes tales como K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} (Zia *et al.*, 2018). Los recubrimientos formulados a base de gelano presentan buenas propiedades mecánicas y de barrera, además de formar geles de apariencia transparente. Rojas-Grau *et al.* (2008) estudiaron la aplicación de un recubrimiento de gelano (0.5 %) sobre trozos de manzana Fuji, observando una moderada resistencia al vapor de agua, además de una buena formación y adhesión del recubrimiento sobre los trozos de fruta. Como se mencionó anteriormente, estos recubrimientos pueden funcionalizarse mediante el enriquecimiento de los mismos con ciertos compuestos que mejoren alguna de sus características, por ejemplo, el aporte nutricional. Entre ellos, es posible incluir fibras alimentarias. En este sentido, las fibras dietéticas obtenidas de las manzanas son de mayor calidad que las extraídas de fuentes alternativas como los cereales, destacando la importancia de su fracción soluble y las propiedades antioxidantes que presenta, proporcionando efectos adicionales que promueven la salud (Shalini y Gupta, 2010). Moreira *et al.* (2015a) demostraron la factibilidad de adicionar fibra de manzana a formulaciones de diferentes polisacáridos, logrando recubrimientos comestibles funcionales y aumentando de esta manera el valor nutricional de cubos de manzanas, sin comprometer el resto de los atributos de calidad. Adicionalmente, entre los preservantes naturales que podrían ser agregados a los recubrimientos y que aún no han sido evaluados en manzanas se encuentran la vainillina y el geraniol, posibilitando la obtención de un producto seguro y con atributos de calidad aceptables.

Por lo tanto, en primer lugar, se propuso la aplicación de los recubrimientos de quitosano enriquecidos con vainillina y geraniol sobre cubos de manzana, evaluando los efectos sobre esta matriz alimentaria, con el objetivo de mantener la calidad y asegurar la inocuidad del producto. Se analizó el efecto de los recubrimientos enriquecidos con Vai y Ge sobre las características microbiológicas (tanto sobre la evolución de la microflora nativa como sobre *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 artificialmente inoculados), y se realizó también un análisis sensorial durante un período de almacenamiento de 12 días. En segundo lugar, se estudió la aplicación de un recubrimiento activo de goma gelano con fibra de manzana, evaluando el enriquecimiento del mismo con preservantes naturales como la vainillina y el geraniol. El objetivo propuesto fue analizar la efectividad de los recubrimientos funcionales de gelano con fibra de manzana (enriquecidos con compuestos bioactivos) para mantener la calidad y la asegurar la inocuidad de los cubos de manzana. De este modo, se evaluaron los efectos de estos

recubrimientos sobre la supervivencia de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 inoculados en los cubos de manzana, así como también sobre otras características de calidad tales como color, textura, propiedades antioxidantes, calidad microbiológica y sensorial del producto durante 12 días de almacenamiento a 5 °C.

Primera etapa: Aplicación de recubrimientos activos de quitosano sobre cubos de manzana

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Sustrato vegetal

Las manzanas (*Malus domestica* var. Red Delicious) fueron adquiridas en un mercado local con adecuado grado de madurez comercial y almacenadas a 5 °C hasta su procesamiento.

1.2.2 Formulación y aplicación de los recubrimientos

Se preparó la solución formadora de recubrimiento (SFR) de quitosano (Qui) y posteriormente, a una parte de la SFR de Qui se le añadió vainillina (1.2 mg/ml) o geraniol (0.7 µl/ml) como preservantes naturales. Además, se preparó una solución de cloruro de calcio (Cl_2Ca) al 2 % (m/v) con ácido ascórbico al 1 % (m/v) para utilizar como solución de pretratamiento (anterior a la aplicación de los recubrimientos), con el objetivo de evitar el desarrollo de pardeamiento luego de las operaciones de pelado y corte. De esta forma, se obtuvieron 3 soluciones de inmersión: Qui, Qui+Vai y Qui+Ge, además de la solución de pretratamiento de cloruro de calcio y ácido ascórbico.

En primer lugar, las manzanas fueron lavadas con una solución de ácido cítrico al 0.5 % (m/v), enjuagadas con agua corriente y secadas. Posteriormente se pelaron, se removió la parte central de las frutas y se cortaron en cubos de 1.5 cm³ manualmente con un cuchillo. Para minimizar la exposición de los tejidos al aire y evitar el pardeamiento enzimático, se procesaron un máximo de cuatro frutas a la vez que fueron sometidas a los diferentes tratamientos de forma inmediata. Para ello, los cubos de manzana se sumergieron en la solución de ácido ascórbico durante 1 min. Luego, se escurrieron durante 1 min y se sumergieron en las diferentes soluciones de quitosano durante 2 min.

Nuevamente se dejó escurrir el exceso de solución de cada recubrimiento durante 1 min. Luego de la aplicación de los recubrimientos, los cubos de manzana se secaron en una cámara de bioseguridad utilizando aire a 25 °C, durante 30 min. Como muestras control (C) se consideraron cubos de manzana tratados en la solución de pretratamiento (cloruro de calcio y ácido ascórbico), sin la aplicación posterior de recubrimiento.

Por último, 50 g de fruta se envasaron en contenedores de polipropileno de 200 ml (espesor 0.4 mm) y se cubrieron con una película de poliolefina (PD 960, Cryovac, Argentina, permeabilidad al O₂: 7000 ml/m²d; permeabilidad al CO₂: 20000 ml/m²d) sellada con una máquina de termosellado horizontal para bolsas de plástico (HL, FS-300, Argentina). Las muestras fueron almacenadas a 5 °C. En cada día de muestreo (0: inmediatamente después del tratamiento, 4, 8 y 12 días de almacenamiento) dos contenedores fueron retirados de la cámara de almacenamiento al azar para ser utilizados en los diferentes análisis.

1.2.3 Análisis microbiológicos

A cada tiempo de muestreo (0, 4, 8 y 12 días de almacenamiento refrigerado), se evaluó el efecto de los recubrimientos activos de quitosano sobre la evolución de la microflora nativa, determinada por las poblaciones de bacterias aerobias mesófilas (MES), y mohos y levaduras (MyL). Estas muestras también se utilizaron para determinar la presencia o ausencia de *E. coli* y *Listeria* spp en las manzanas. Los resultados se expresaron como log UFC/g. Todos los recuentos se realizaron por duplicado, en 3 experimentos independientes.

1.2.4 Efecto de los recubrimientos activos de quitosano sobre *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 inoculados en cubos de manzana

- Preparación de los inóculos

A partir de un cultivo *stock* de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 mantenido a -20 °C, se realizó la reactivación de los microorganismos y la preparación de los inóculos.

- Inoculación de las muestras y aplicación de los recubrimientos activos de quitosano

Con el objetivo de estudiar el efecto de los recubrimientos activos de quitosano sobre la supervivencia de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 inoculados durante el

almacenamiento refrigerado, los cubos de manzana (obtenidos con la metodología descrita previamente) se inocularon mediante aspersión con las suspensiones de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11, previamente a la aplicación de las diferentes SFR (Qui, Qui+Vai y Qui+Ge). Los cubos de manzana inoculados se secaron durante 30 min empleando una cámara de bioseguridad clase II. Luego, fueron sometidos a los diferentes tratamientos: recubrimiento de quitosano (Qui), recubrimiento de quitosano con agregado de geraniol (Qui+Ge) y recubrimiento de quitosano con agregado de vainillina (Qui+Vai). La aplicación de los recubrimientos y el envasado de las muestras inoculadas se realizaron de igual manera que lo descrito para muestras no inoculadas. Los contenedores se almacenaron a 5 °C, realizando análisis microbiológicos periódicos durante el almacenamiento a fin de evaluar el potencial efecto antimicrobiano de los tratamientos frente a *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 inoculados en los cubos de manzana.

- Evolución de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 inoculados en cubos de manzana

A cada tiempo de muestreo (0, 4, 8 y 12 días de almacenamiento refrigerado), se evaluó el efecto de los recubrimientos activos de quitosano sobre la evolución de los microorganismos inoculados. El recuento de *L. innocua* CIP 80.11 se llevó a cabo en el medio *Oxford Agar* (base) con suplemento selectivo *Oxford* (BS003) (Biokar Diagnostics, Francia), utilizado para la diferenciación, aislamiento y enumeración de cepas de *Listeria*. Los resultados se expresaron como log UFC/g. Todos los recuentos se realizaron por duplicado, en 3 experimentos independientes.

1.2.5 *Análisis sensorial*

Se realizó un análisis descriptivo cuantitativo de muestras de manzana (no inoculadas) sometidas a los diferentes tratamientos durante el almacenamiento refrigerado. El análisis sensorial efectuado fue realizado por nueve panelistas del Grupo de Ingeniería de Alimentos de la UNMDP (edad entre 25 a 50 años), con experiencia en evaluación de calidad sensorial de frutas y hortalizas empleando una escala no estructurada de cinco puntos para calificar los siguientes atributos:

- Calidad visual general (OVQ), parámetro dentro del cual se evalúan todas las características visuales tales como frescura, uniformidad de tamaño, brillo,

presencia de restos de recubrimiento, ausencia de pardeamiento, ausencia de daños mecánicos o pudriciones.

- Aroma y sabor extraño

Los atributos sensoriales fueron evaluados a los 0, 4, 8 y 12 días de almacenamiento. El límite de aceptabilidad se estableció en el 50 % de la escala (2.5 cm).

1.2.6 Análisis estadístico

Los resultados de la aplicación de los diferentes recubrimientos sobre los cubos de manzana se obtuvieron por duplicado en tres ensayos experimentales independientes. Los resultados informados se presentan como valores medios acompañados de sus correspondientes desviaciones estándar. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con dos factores (tratamiento y tiempo de almacenamiento), y se aplicó un ANOVA ($p < 0.05$) para comparar los efectos de cada factor. Las diferencias entre tratamientos y a través del tiempo de almacenamiento se determinaron utilizando la prueba LSD con un nivel de confianza del 95 %. Para analizar los datos se utilizó el software estadístico InfoStat (v2013) (Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina).

1.3 Resultados y discusión

1.3.1 Evolución de la microflora nativa de cubos de manzana tratados con recubrimientos activos de quitosano

En la Tabla 1.1 se muestran los resultados obtenidos para la evolución de las diferentes poblaciones de la microflora nativa de los cubos tratados con recubrimientos activos de quitosano, así como también de los cubos sin tratar. Esta muestra control puede utilizarse como indicador de la calidad microbiológica inicial del producto. En la misma se reflejan las prácticas higiénicas con las que se llevó adelante el procesamiento de las manzanas, considerando que la materia prima original fue sometida a operaciones preliminares de lavado y desinfección con una solución de ácido cítrico. Esto implica una disminución de la carga microbiana original, sumado a las operaciones de pelado en la cual se removió la superficie de la fruta que estuvo en contacto con el medio ambiente desde su recolección hasta el procesado. En este sentido, la muestra control presentó una carga inicial baja de microorganismos aerobios mesófilos (MES), mientras que no se detectó ($< 2.00 \log$

UFC/g) la presencia de mohos y levaduras (MyL). En las muestras tratadas con los recubrimientos activos, la población de MES sufrió una reducción significativa inmediatamente después de la aplicación de los recubrimientos (tiempo cero), mostrando recuentos por debajo del límite de detección del método ($< 2.00 \log \text{ UFC/g}$), independientemente del enriquecimiento o no de las formulaciones de quitosano con vainillina o geraniol. Durante el almacenamiento (12 días), las muestras control mostraron un aumento mayor a $3.00 \log \text{ UFC/g}$ para la población de MES. Las muestras tratadas con recubrimientos de Qui y Qui+Ge presentaron desarrollo de estas poblaciones hacia el final del almacenamiento, aunque en magnitudes significativamente ($p < 0.05$) menores que el control. Sin embargo, en muestras tratadas con recubrimientos enriquecidos con vainillina (Qui+Va) no se detectó la presencia de MES durante todo el período de almacenamiento refrigerado ($< 2.00 \log \text{ UFC/g}$). En el caso de MyL, a partir del día 4 de almacenamiento se observó desarrollo de MyL en las muestras C, aumentando sus recuentos progresivamente hasta el final del almacenamiento. Respecto a las muestras con recubrimiento activo, las tratadas con Qui fueron las únicas que presentaron desarrollo de MyL a partir del día 8 de almacenamiento refrigerado, aunque con recuentos significativamente menores que los obtenidos para las muestras C. Las muestras tratadas con recubrimientos de quitosano enriquecido con geraniol y vainillina (Qui+Ge y Qui+Vai) no presentaron desarrollo detectable de MyL durante los 12 días de almacenamiento a 5°C , lo que evidencia el fuerte sinergismo antifúngico mostrado por la combinación de quitosano y vainillina o geraniol.

Tabla 1.1 Efecto de los recubrimientos de quitosano con y sin preservantes naturales sobre la microflora nativa de cubos de manzana almacenados durante 12 días a 5 °C.

Población (UFC/g)	Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)			
		0	4	8	12
MES	C	2.94 ± 0.31 ^a	3.47 ± 0.65 ^a	5.12 ± 1.42 ^{bA}	6.31 ± 0.19 ^{bA}
	Qui	< 2.00 [*]	< 2.00 [*]	4.11 ± 0.73 ^A	< 2.00 [*]
	Qui+Ge	< 2.00 [*]	< 2.00 [*]	< 2.00 [*]	3.81 ± 1.28 ^B
	Qui+Vai	< 2.00 [*]	< 2.00 [*]	< 2.00 [*]	< 2.00 [*]
MyL	C	< 2.00 [*]	2.72 ± 1.08 ^a	4.79 ± 0.16 ^{bB}	6.84 ± 0.23 ^{cB}
	Qui	< 2.00 [*]	< 2.00 [*]	2.48 ± 0.34 ^{aA}	2.25 ± 0.35 ^{aA}
	Qui+Ge	< 2.00 [*]	< 2.00 [*]	< 2.00 [*]	< 2.00 [*]
	Qui+Vai	< 2.00 [*]	< 2.00 [*]	< 2.00 [*]	< 2.00 [*]

C: muestras sin recubrimiento; Qui: muestras recubiertas con quitosano; Qui+Ge: muestras recubiertas con quitosano+geraniol; Qui+Vai: muestras recubiertas con quitosano+vainillina. Los resultados se muestran como valores medio ± la desviación estándar. Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre días de almacenamiento para un mismo tratamiento. Letras mayúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos para el mismo tiempo de almacenamiento.

* Debajo del límite de detección del método ($< 2.00 \log \text{ UFC/g}$).

Otros autores han investigado el uso de recubrimientos de quitosano y sus combinaciones con preservantes naturales para controlar la microflora nativa de frutas mínimamente procesadas. Por ejemplo, Zhelyazkov *et al.* (2014) aplicaron recubrimientos de quitosano formulado a distintas concentraciones (0.1, 0.25, 0.5 y 1 %) sobre cubos de manzana almacenados a 4 °C e informaron que todas las concentraciones de quitosano empleadas fueron capaces de reducir significativamente los recuentos de microorganismos aerobios totales y de mohos, inicialmente y al ser evaluados a los 8 días. Respecto a las combinaciones con preservantes naturales, Tomadoni *et al.* (2018) aplicaron recubrimientos de quitosano con y sin el enriquecimiento de vainillina y geraniol sobre frutillas mínimamente procesadas, estudiando la evolución de mesófilos, psicrótrofos y mohos y levaduras durante 7 días de almacenamiento refrigerado. Estos autores informaron que inicialmente se obtuvieron reducciones significativas para todas las poblaciones microbianas evaluadas, de acuerdo con los resultados obtenidos en este capítulo. Además, informaron que las reducciones observadas en las muestras recubiertas se mantuvieron durante los 7 días de almacenamiento, con excepción de la población de MES, la cual a partir del segundo día de almacenamiento presentó recuentos similares al control no recubierto. En un estudio llevado adelante por Azevedo *et al.* (2014), la aplicación de recubrimientos formulados con 1.6 % de almidón de mandioca, 0.6 % de quitosano y 2.4

% de aceite de *Lippia gracilis* sobre frutilla mínimamente procesada ejerció un efecto bactericida sobre la microflora nativa, evaluada a través de los recuentos de mohos y levaduras, bacterias psicrótrofas, coliformes totales y coliformes termo-tolerantes durante 7 días de almacenamiento a 4 °C.

Como se detalla en la literatura, la aplicación de recubrimientos activos además de ejercer efectos antimicrobianos o de vehiculizar sustancias con acción antimicrobiana (en el caso de recubrimientos que no presentan actividad antimicrobiana por sí mismos), actúan a modo de barrera semipermeable entre el alimento y el medio, creando una microatmósfera modificada interna que puede inhibir o ralentizar el crecimiento tanto de microorganismos alterantes nativos como de patógenos (Dhall, 2013).

1.3.2 Efecto de recubrimientos de quitosano sobre la evolución de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 inoculados en cubos de manzana

Los resultados de la evolución de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 inoculados en cubos de manzana recubiertos con formulaciones de quitosano y almacenados durante 12 días a 5 °C se presentan en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Efectos de los recubrimientos de quitosano con y sin preservantes naturales sobre *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 inoculadas sobre cubos de manzana almacenados durante 12 días a 5 °C.

Población (UFC/g)	Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)			
		0	4	8	12
<i>E. coli</i> O157:H7	C	4.39 ± 0.23 ^{bB}	4.45 ± 0.54 ^{bB}	3.52 ± 0.25 ^{aB}	4.68 ± 0.22 ^{bB}
	Qui	2.00 ± 0.00 ^{aA}	2.00 ± 0.00 ^{aA}	2.00 ± 0.00 ^{aA}	2.70 ± 0.61 ^{aA}
	Qui+Ge	< 2.00*	< 2.00*	< 2.00*	< 2.00*
	Qui+Vai	2.50 ± 0.71 ^A	< 2.00*	< 2.00*	< 2.00*
<i>L. innocua</i>	C	5.03 ± 0.31 ^{bB}	3.77 ± 0.15 ^{aB}	4.43 ± 0.05 ^{abC}	3.48 ± 0.19 ^{aA}
	Qui	2.85 ± 0.20 ^{bA}	2.00 ± 0.00 ^{aA}	3.75 ± 0.83 ^{cB}	4.49 ± 0.07 ^{dA}
	Qui+Ge	< 2.00*	< 2.00*	3.51 ± 0.09 ^{aB}	4.03 ± 0.08 ^{bA}
	Qui+Vai	2.70 ± 0.49 ^{bA}	2.00 ± 0.00 ^{aA}	2.70 ± 0.49 ^{abA}	3.68 ± 0.63 ^{cA}

C: muestras sin recubrimiento; Qui: muestras recubiertas con quitosano; Qui+Ge: muestras recubiertas con quitosano+geraniol; Qui+Vai: muestras recubiertas con quitosano+vainillina. Los resultados se muestran como valores medio ± la desviación estándar. Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre días de almacenamiento para un mismo tratamiento. Letras mayúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos para el mismo tiempo de almacenamiento.

* Debajo del límite de detección del método (< 2.00 log UFC/g).

La presencia de *Listeria* spp. y *E. coli* endógenos en las muestras no inoculadas se monitoreó durante todo el período de almacenamiento, sin detectarse presencia de estos microorganismos en los cubos de manzana. Como puede observarse, *E. coli* O157:H7 FP605/03 se mantuvo constante durante todo el almacenamiento en las muestras control (sin recubrimiento), siendo incapaz de crecer en las manzanas mínimamente procesadas (Tabla 1.2). En este sentido, el hecho de ser artificialmente inoculado a la matriz y las condiciones de refrigeración a las que fue sometido ejercieron un efecto bacteriostático sobre el microorganismo. La temperatura mínima necesaria para que *E. coli* enterotoxigénico se desarrolle es de 7 °C (FDA, 2001). A pesar de la ausencia de crecimiento, la supervivencia de *E. coli* O157:H7 inoculada en frutas y verduras recién cortadas almacenadas a 5 °C ha sido reportado por varios autores (Abadías *et al.*, 2009; Abadías *et al.*, 2011; Alegre *et al.*, 2010).

Con respecto al efecto de los recubrimientos activos, se observó que todas las formulaciones ejercieron efecto bactericida significativo ($p < 0.05$) sobre *E. coli* O157:H7 FP605/03 inoculada. En el caso del recubrimiento de Qui, los recuentos quedaron en el límite de detección (2.00 log UFC/g) inmediatamente después de la aplicación, y este hecho se mantuvo hasta el final del almacenamiento (día 12). Sin embargo, para los recubrimientos enriquecidos con preservantes naturales, a pesar de que inicialmente (tiempo cero) en las muestras tratadas con Qui+Vai el microorganismo sobrevivió en niveles apenas detectables (2.50 log UFC/g), durante el resto del almacenamiento *E. coli* O157:H7 FP605/03 se mostró por debajo del límite de detección, sin presentar recuperación durante los 12 días de almacenamiento a 5 °C. En el caso de *L. innocua* CIP 80.11, este microorganismo se mantuvo estable durante el almacenamiento refrigerado y al igual que *E. coli* O157:H7 FP605/03, tampoco fue capaz de desarrollarse en los cubos de manzana no recubiertos (C). Al ser un microorganismo psicrótrofo, este hecho podría deberse a una competencia de nutrientes con la microflora competitiva (microflora nativa), que presenta mejores características de adaptación a la matriz, ejerciendo un efecto de biocontrol. Sumado a esto, el hecho de que *L. innocua* CIP 80.11 fue inoculado sobre cubos de manzana sin recubrir podría también verse afectado por la pérdida del contenido de agua de la fruta durante el almacenamiento (Sangsuwan *et al.*, 2008). De manera similar a lo ocurrido con *E. coli* O157:H7 FP605/03, *L. innocua* CIP 80.11 mostró reducciones significativas ($p < 0.05$) en todos los tratamientos aplicados. A pesar de esto, este microorganismo resultó más resistente a los tratamientos. Hasta el día 8 de

almacenamiento las muestras con los diferentes recubrimientos presentaron recuentos significativamente más bajos que el control, manteniendo el efecto sinérgico de la combinación de los compuestos bioactivos y el quitosano. Sin embargo, al final del almacenamiento (día 12) *L. innocua* CIP 80.11 se recuperó y los recuentos no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al control no recubierto (C).

De acuerdo con los resultados aquí presentados, Sangsuwan *et al.* (2008) trabajaron con melón mínimamente procesado recubierto con formulaciones de quitosano y quitosano enriquecido con vainillina. Estos autores evaluaron el efecto de los recubrimientos sobre la población de *E. coli* inoculada en los trozos de fruta, durante 8 días de almacenamiento a 10 °C. Los recubrimientos de quitosano disminuyeron significativamente la población del patógeno luego del primer día de almacenamiento, mientras que los recubrimientos de quitosano enriquecidos con vainillina mostraron reducciones a partir del cuarto día de almacenamiento. A pesar de que el recubrimiento de quitosano presentó efectos antimicrobianos significativos al comienzo del almacenamiento, es decir más tempranamente respecto al efecto observado con los recubrimientos que contenían vainillina en la formulación, las reducciones obtenidas con esta última formulación fueron mayores, del orden de los 4 log a partir del sexto día de almacenamiento.

1.3.3 Evaluación sensorial de cubos de manzana recubiertos con quitosano

Inmediatamente luego de la aplicación de los recubrimientos (día cero) las muestras presentaron puntuaciones aceptables para todos los atributos sensoriales evaluados (OVQ, sabor y aroma), aunque los cubos de manzanas que habían sido recubiertos con las formulaciones de quitosano (Qui, Qui+Vai y Qui+Ge) obtuvieron puntajes más bajos que el control, debido exclusivamente a un leve desarrollo de pardeamiento que afectó significativamente la calidad visual (OVQ) de las muestras. Con respecto al sabor y aroma, las muestras con vainillina obtuvieron puntajes similares al control, sin embargo, en los cubos de manzana que contenían geraniol en el recubrimiento estos atributos se vieron afectados y el compuesto bioactivo fue percibido en gran medida por los panelistas. Al día 4 de almacenamiento, todas las muestras recubiertas se encontraron por debajo del límite de aceptabilidad para el parámetro OVQ, mientras que el control (muestra sin recubrir) aún mantenía todas características sensoriales evaluadas en niveles aceptables. Dado que todas las muestras tratadas se hallaban inaceptables al día 4, no se continuó con la evaluación sensorial en los días de muestreo subsiguientes (día 8 y 12). Debe destacarse que las

muestras tratadas con los recubrimientos que contenían vainillina en su formulación afectaron en menor medida que el geraniol los atributos de sabor y aroma de los cubos de manzana.

Varios autores han informado resultados similares a los presentados, en referencia a efectos indeseables del quitosano sobre diversos parámetros de calidad de frutas cortadas y jugos. En un trabajo de investigación desarrollado por Sapers (1992), se postuló que la aparente aceleración del pardeamiento en algunos jugos de fruta tratados con quitosano podría deberse a la complejación o precipitación de algún inhibidor endógeno del pardeamiento, como algún ácido orgánico. Además, se ha informado que el medio ácido utilizado para la preparación de la solución de quitosano promovería respuestas relacionadas con el estrés abiótico (Simões *et al.*, 2009), catalizando la degradación oxidativa de las enzimas PPO en las frutas y reduciendo de este modo la biocompatibilidad del recubrimiento, con profundos efectos sobre el color y el sabor (Britto y Assis, 2012). Esto podría estar relacionado con el hecho de que el pH de la solución de quitosano es cercano al pH óptimo de la actividad de tirosinasa. Con respecto al efecto sobre fruta mínimamente procesada, Rico Rodríguez (2013) aplicó recubrimientos de quitosano sobre mango mínimamente procesado. Este autor observó diferencias significativas en la variación del parámetro de cromaticidad, informando que la muestra de mango sin recubrimiento presentó menor variación en la saturación del color a diferencia de las muestras recubiertas con quitosano, las cuales presentaron una mayor variación durante el almacenamiento. En ese estudio, también se observaron diferencias en el parámetro a^* (verdes-rojos), presentando la muestra recubierta con quitosano mayor variación en el cambio de color. El autor relacionó tanto el cambio en la cromaticidad como en el parámetro a^* con la tasa respiratoria de las muestras de mango mínimamente procesado y con un mayor pardeamiento enzimático debido a la activación de la PPO. Al aplicarlo sobre manzanas, Qi *et al.* (2011) informaron un aumento significativo en la actividad de la PPO de manzana Fuji mínimamente procesada luego de 4 días de almacenamiento a 5 °C cuando utilizaron distintos recubrimientos a base de quitosano, en comparación con el control no recubierto. Consistentemente con esto, Xiao *et al.* (2011) utilizaron recubrimientos de quitosano aplicados sobre pera mínimamente procesada e informaron la activación de la PPO, lo que también se correlacionó con un aumento en el parámetro a^* .

Los resultados de los experimentos de esta Primera Parte demostraron que la inmersión de los cubos de manzana en una solución con 1 % (m/v) de ácido ascórbico como paso

previo al tratamiento con quitosano no logró contrarrestar estos efectos sobre la activación enzimática. Al respecto del modo de acción de este agente antipardeante, algunos informes atribuyeron su efecto a la reducción de las quinonas formadas hacia difenoles incoloros originales (Son *et al.*, 2001; Limbo y Piergiorganni, 2006). En estudios enzimáticos utilizando PPO extraída de lechuga, Ali *et al.* (2015) observaron que la utilización de ácido ascórbico como agente antipardeante en concentraciones de 0.5 % no logró reducir el color formado, aunque disminuyó el aumento de color en el tiempo en comparación con el control. A concentraciones superiores (1 y 1.5 %), el ácido ascórbico se comportó de manera similar a los sulfuros, pudiendo reducir instantáneamente el color formado y actuando como reductor de quinona. Por lo tanto, el desarrollo de pardeamiento observado en este trabajo podría ser explicado por la magnitud de las reacciones provocadas por el quitosano que podrían haber agotado la capacidad reductora del ácido ascórbico.

Dado que los recubrimientos activos de quitosano afectaron negativamente la calidad sensorial de los cubos de manzana, se diseñó un nuevo experimento utilizando otro biopolímero capaz de actuar como *carrier* de los preservantes naturales en estudio (vainillina y geraniol) con el objetivo de conseguir el efecto antimicrobiano de los mismos sin perjudicar los atributos sensoriales de los cubos de manzana.

Segunda etapa: Aplicación de recubrimientos activos de goma gelano sobre cubos de manzana.

Como se mencionó previamente en la introducción, en investigaciones previas Moreira *et al.* (2015a) y Moreira *et al.* (2015b) realizaron estudios sobre cubos de manzana utilizando como tratamiento recubrimientos a base de goma gelano enriquecidos con fibra de manzana, obteniendo buenos resultados en las características de calidad global del producto. En esta Segunda etapa de trabajo se utilizaron entonces recubrimientos activos de gelano enriquecidos con fibra de manzana, evaluando la adición de preservantes naturales (vainillina o geraniol) sobre la calidad microbiológica, fisicoquímica y sensorial de cubos de manzana durante el almacenamiento refrigerado.

1.4 Materiales y métodos

1.4.1 Fibra alimentaria

En esta Segunda Parte los recubrimientos activos fueron adicionados con extracto de fibra de manzana, provista por Indulleida SL (España). Características: 55.9 % de pureza; porcentaje de fibra soluble: 13.10 %; porcentaje de fibra insoluble: 42.80 %; método de obtención: secado del bagazo lavado remanente del procesamiento de manzana para la obtención de jugo.

1.4.2 Formulación y aplicación de los recubrimientos

La SFR a base de goma gelano (GG) se preparó con el agregado de glicerol a una concentración de 6 % (m/v) como agente plastificante. Una vez obtenida, se le incorporó fibra de manzana a una concentración del 2 %. Esta concentración fue seleccionada en base a trabajos previos realizados con manzana mínimamente procesada llevados a cabo por Moreira *et al.* (2015a) y Moreira *et al.* (2015b).

Posteriormente, una parte de la SFR de gelano con fibra de manzana (GGF) fue enriquecida con vainillina (2.5 mg/ml) o geraniol (0.6 µl/ml) como agentes de preservación natural. Estas concentraciones habían sido evaluadas en jugo de frutilla en otros trabajos del grupo de investigación (Cassani *et al.*, 2016; Tomadoni *et al.*, 2015), logrando reducciones significativas en los recuentos microbiológicos tanto de microflora nativa como de patógenos inoculados, obteniendo además resultados sensoriales aceptables en el producto durante el almacenamiento. De este modo, la nueva concentración de vainillina propuesta para emplearse es mayor que la utilizada en la Primera Parte, con lo que se intentaría mantener un efecto antimicrobiano similar respecto al observado con la combinación de quitosano y vainillina, considerando que el gelano no presenta acción antimicrobiana *per se*. Además, dado que la vainillina fue el preservante natural que afectó en menor medida los atributos sensoriales de los cubos de manzana en la Primera etapa de trabajo, sería factible emplearla en mayores concentraciones en estos nuevos ensayos. Por otro lado, la concentración de geraniol que se propone aquí aplicar es ligeramente menor, con lo cual podría esperarse que las características sensoriales de los cubos de manzana resulten afectadas en menor medida respecto a la concentración superior empleada en los ensayos previos. Según lo detallado en la Primera parte, el uso de este agente antimicrobiano (0.7 ml/l) causó un gran impacto en el sabor y aroma del producto, que fueron fuertemente percibidos como extraños por los panelistas en el ensayo sensorial.

Además de las SFR de GG, se preparó una solución de Cl_2Ca al 2 % (m/v) y ácido ascórbico al 1 % (m/v) con el objetivo de lograr el entrecruzamiento del polímetro y de

este modo la formación del recubrimiento y, simultáneamente, evitar el desarrollo de pardeamiento enzimático de manera casi inmediata luego de las operaciones de pelado y corte de las manzanas. De esta forma, se obtuvieron 3 soluciones de inmersión: GGF, GGF+Vai y GGF+Ge, además de la solución de entrecruzamiento de cloruro de calcio y ácido ascórbico.

Para la aplicación de los recubrimientos, los cubos de manzana se sumergieron en las diferentes soluciones de gelano durante 2 min. Se dejó escurrir el exceso de solución de cada recubrimiento durante 1 min antes de sumergir las frutas nuevamente durante 2 min en la solución de entrecruzamiento. Para el secado de los recubrimientos aplicados, los cubos de manzana se llevaron a una cámara de bioseguridad utilizando aire a 25 °C durante 30 min. Las muestras control (C) fueron representadas por cubos de manzana sumergidos en solución de entrecruzamiento de cloruro de calcio y ácido ascórbico, sin la aplicación de recubrimiento. Luego de la etapa de secado del recubrimiento, las muestras se envasaron y almacenaron a 5 °C. A cada tiempo de muestreo (día 0 inmediatamente después del tratamiento, 4, 8 y 12 días de almacenamiento) dos contenedores fueron retirados de la cámara de almacenamiento al azar para ser utilizados para los diferentes análisis.

1.4.3 Evaluación de la microflora nativa

La evolución de las poblaciones microbianas nativas presentes en manzana mínimamente procesada se evaluó durante todo el almacenamiento refrigerado. El procesamiento de las muestras, la siembra y el recuento de bacterias aerobias mesófilas (MES) y de los mohos y levaduras (MyL) se realizó según se detalló previamente. Los resultados se expresaron como log UFC/g de producto fresco. Los recuentos se realizaron por duplicado en cada experimento.

1.4.4 Modelado de bacterias aerobias mesófilas y de mohos y levaduras

La microbiología predictiva utiliza modelos matemáticos para describir cuantitativamente el efecto combinado de los factores ambientales, y de este modo, predecir el crecimiento, supervivencia o inactivación de microorganismos, aportando información importante acerca de la inocuidad y vida útil del alimento. Los modelos primarios describen la evolución de la multiplicación microbiana mediante la determinación de los parámetros microbiológicos cinéticos correspondientes a las fases de multiplicación de los microorganismos. Con la determinación de estos parámetros es

posible generar un gráfico correspondiente a las cuatro fases de crecimiento bacteriano: adaptación (o *lag*), exponencial, estacionaria y muerte. Los modelos secundarios describen la dependencia de los parámetros cinéticos con los factores ambientales, como por ejemplo los cambios causados por la modificación de la temperatura. Por su parte, los modelos terciarios son representados por *softwares* que se basan en modelos primarios y secundarios para predecir el comportamiento del microorganismo de interés en función de las condiciones a las cuales fueron sometidos.

Entre estos, ComBase Predictive Models es una colección de herramientas de *software* basada en datos de ComBase para predecir el crecimiento o la inactivación de microorganismos. Dentro de esta colección, DMFit es una herramienta complementaria de Excel utilizada para ajustar curvas y extraer parámetros tales como la tasa de crecimiento o el tiempo de adaptación, basado en los modelos descritos por Baranyi y Roberts (1994). Este modelo utiliza los cuatro parámetros principales de una curva bacteriana sigmoidea y dos parámetros de curvatura, que describen la curvatura al principio y al final de la fase de crecimiento.

$$y = y_0 + \frac{y_1}{\ln 10} + \frac{y_2}{\ln 10}$$

$$y_1 = \mu_m t + \ln[e^{-\mu_m t} - e^{-\mu_m(t+t_{lag})} + e^{\mu_m t_{lag}}]$$

$$y_2 = \ln[1 + 10^{(y_0 - y_{max})}(e^{-\mu_m(t-t_{lag})} - e^{-\mu_m t_{lag}})]$$

Donde:

- y_0 (valor inicial): describe el logaritmo inicial de la densidad de células bacterianas (en $\log_{10}$ UFC/g)
- t_{lag} (tiempo de latencia): definida generalmente como la intersección entre la tangente de la fase de crecimiento exponencial y el valor inicial, en unidades de tiempo según los datos utilizados para el modelo (ej. días).
- μ_m : representa la velocidad o tasa máxima de crecimiento. Las unidades de las estimaciones están relacionadas con las unidades de los datos {por ejemplo $\log_{10}$ (UFC/g)/día}.
- y_{max} (valor final): representa el logaritmo de la densidad celular final ($\log_{10}$ UFC/g)

Tanto para la población de MES como para la de MyL se obtuvieron curvas de crecimiento microbiano de las muestras sometidas a los diferentes tratamientos. Los datos experimentales se ajustaron a la función Baranyi descrita anteriormente. Los parámetros cinéticos, que incluyen el recuento inicial (y_0), la tasa de crecimiento específica máxima (μ_m) y el recuento máximo alcanzado en la fase estacionaria (y_{max}) para cada curva de crecimiento, se calcularon a partir de los valores de Baranyi generados. También se calculó el coeficiente de determinación (R^2) que indica el grado de ajuste del modelo. En todos los casos, se utilizó un modelo bifásico sin fase de latencia debido a un mejor ajuste observado.

1.4.5 *Determinación de color y firmeza*

El color superficial de los cubos de manzanas con y sin la aplicación de los diferentes recubrimientos de GG se evaluó utilizando un colorímetro (Lovibond, RT Series, Inglaterra). El color se registró utilizando el espacio de color uniforme CIE, determinando los parámetros L^* a^* b^* . Para la calibración del equipo se usó una placa estándar blanca ($Y = 94.00$, $x = 0.3158$, $y = 0.3322$). El color fue evaluado en quince cubos de manzanas ($n = 15$). Las modificaciones en el color fueron evaluadas mediante cambios en la luminosidad (L^*) y el ángulo de tono (h°). Este último se calculó a partir de los valores cromáticos a^* (verde/rojo) y b^* (azul/amarillo) como;

$$h^\circ = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right)$$

La firmeza de los cubos fue determinada con un penetrómetro digital (FHT-803; Test Equipment Depot, EEUU), empleando un puntal de 11.1 mm de diámetro. Se registró la fuerza máxima requerida para penetrar la fruta y se expresó como N/cm^2 . Las determinaciones de firmeza se realizaron sobre quince cubos de manzanas ($n = 15$) en cada experimento.

1.4.6 *Análisis de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante*

- Extracción de compuestos antioxidantes

La obtención de los extractos se realizó homogeneizando 10 g de manzana de cada recipiente muestreado al azar con 20 ml de etanol al 80 % (v/v) durante 2 min. Luego, la mezcla se trató con ultrasonido a 40 kHz durante 30 min y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se separó y se filtró usando papel de filtro

Whatman #1. El extracto obtenido de esta manera se almacenó a -20 °C hasta su utilización para la determinación del contenido de fenoles totales (CFT) y la actividad antioxidante por el método DPPH.

- Contenido de fenoles totales

El contenido fenólico total (CFT) se determinó de acuerdo con la metodología propuesta por Viacava *et al.* (2015) con ligeras modificaciones. Para ello, se utilizó una microplaca de 96 pocillos (con fondo cónico) en la cual 15 µl de cada solución de extracto (obtenidos como se detalló previamente) diluido se añadieron a un pocillo con 75 µl de reactivo Folin Ciocalteu previamente diluido con agua (1:10). Luego de 3 min de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 60 µl de solución de Na₂CO₃ al 7.5 % (m/v) (Biopack, Argentina) y la mezcla se incubó durante 2 h a la misma temperatura. La absorbancia de cada muestra se determinó a 765 nm en un lector de microplacas espectrofotométrico (ELx800, Biotek, EEUU) y el CFT se calculó usando una curva de calibración con ácido gálico (Biopack, Argentina) como estándar. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico cada 100 g de producto fresco (mg EAG/100 g PF). Las determinaciones se realizaron por triplicado en cada experimento.

- Capacidad antioxidante por DPPH

La capacidad antioxidante de los extractos de manzanas se estudió empleando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Sigma-Aldrich, Argentina), de acuerdo con el método descrito por Viacava *et al.* (2015), con modificaciones. Inicialmente, el radical DPPH (Sigma-Aldrich, Argentina) se ajustó a una absorbancia de 0.7 a 515 nm utilizando etanol como disolvente. Luego, a un pocillo de una microplaca se le añadieron 140 µl de solución DPPH ajustada y una alícuota de 10 µl del extracto correspondiente. La mezcla se incubó en la oscuridad durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia a 515 nm utilizando un lector de microplacas espectrofotométrico (ELx800, Biotek, EEUU). Las reducciones en la solución de DPPH se calcularon comparando las absorbancias con una curva estándar de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilmecanocarboxílico (trolox). La actividad antioxidante se expresó como mg de equivalente de trolox por 100 g de producto fresco (mg ET/100 g PF). Las mediciones se realizaron por triplicado en cada experimento.

1.4.7 Análisis sensorial

Los atributos sensoriales de los cubos de manzana con y sin recubrimientos de GG se evaluaron según la metodología descrita en la sección previamente.

1.4.8 Efecto de recubrimientos activos de GG sobre *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 inoculados en cubos de manzana

- Preparación de inóculos

Los microorganismos utilizados fueron *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11, reactivados según fue descrito previamente.

- Inoculación de las muestras y aplicación de los recubrimientos activos

Los cubos de manzana se inocularon mediante aspersión con las suspensiones de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11, como paso previo a la aplicación de los diferentes SFR. Los cubos de manzana inoculados se secaron durante 30 min en una cámara de bioseguridad clase II. Una vez secos, fueron sometidos a los diferentes tratamientos: recubrimiento de gelano con fibra de manzana (GGF), recubrimiento de gelano y fibra de manzana con agregado de geraniol (GGF+Ge) y recubrimiento de gelano y fibra de manzana con agregado de vainillina (GGF+Vai). La aplicación de los recubrimientos en muestras inoculadas con *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 y el envasado de las mismas se realizaron tal como se describió para muestras no inoculadas. Los contenedores se almacenaron en la oscuridad a 5 °C, realizando los análisis microbiológicos a lo largo del almacenamiento a fin de evaluar el potencial efecto antimicrobiano de los recubrimientos activos de GG frente a *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11.

- Evolución de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 inoculados en cubos de manzana

Tanto la siembra como el recuento de ambos microorganismos se realizaron de acuerdo a la metodología previamente detallada. Los resultados se expresaron en log UFC/g. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

1.4.9 Análisis estadístico

Los resultados referidos a la aplicación de los diferentes recubrimientos sobre los cubos de manzana se obtuvieron al menos por duplicado en tres ensayos experimentales

independientes. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado considerando dos factores (tratamiento y tiempo de almacenamiento). Los resultados informados se presentan como valores medios acompañados de sus desviaciones estándar. Con el objetivo de evaluar los efectos de cada factor se empleó un ANOVA ($p < 0.05$). Se utilizó la prueba LSD con un nivel de confianza del 95 % para detectar diferencias entre tratamientos y tiempos de almacenamiento. Para analizar los datos se utilizó el software estadístico InfoStat (v2013) (Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina). Las curvas para el modelado del crecimiento de la microflora nativa se realizaron mediante el software DMFit, empleando una herramienta complementaria de Microsoft Excel (D-model, J. Baranyi, Institute of Food Research, Norwich, Reino Unido).

1.5 Resultados y discusión

1.5.1 Calidad microbiológica

Las principales causas del deterioro microbiológico en frutas y derivados están relacionadas tanto con el desarrollo de bacterias como así también de mohos y levaduras. Debido al bajo pH que presenta la mayoría de las frutas, los mohos y levaduras se consideran los principales agentes de descomposición (Spadaro y Droby, 2016). Sin embargo, los recuentos de bacterias aerobias mesófilas dan una estimación de las poblaciones viables totales presentes en el producto y son indicativos tanto de su microflora endógena como del grado de contaminación. Por este motivo, resulta importante realizar también la cuantificación de bacterias totales en el producto durante su almacenamiento. La Figura 1.1 (A) muestra la evolución durante el período de almacenamiento refrigerado de los recuentos de bacterias aerobias mesófilas (MES) en cubos de manzana con y sin la aplicación de recubrimientos comestibles formulados con gelano y fibra de manzana, con el agregado de vainillina o geraniol durante el almacenamiento refrigerado.

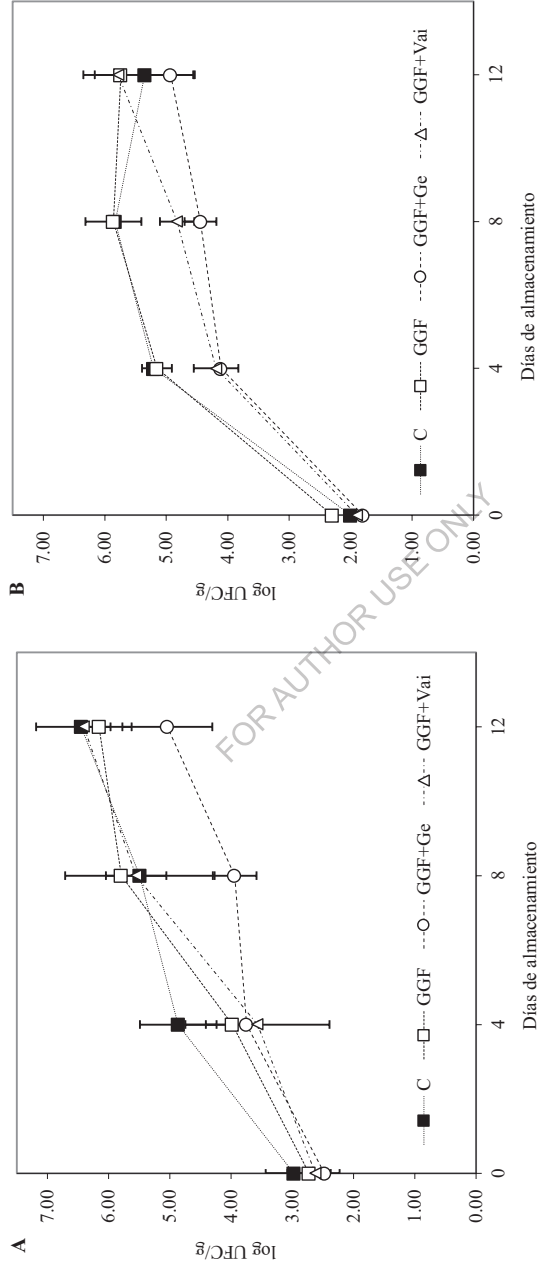


Figura 1.1. Evolución de la microflora nativa de cubos de manzana recubiertos con gelano+fibra de manzana+preservantes naturales durante el almacenamiento a 5 °C: (A) bacterias aerobias mesófilas; (B) mohos y levaduras. C: muestra sin recubrimiento; GGF: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana; GGF+Ge: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana+geraniol; GGF+Vai: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana+vainillina. Los resultados se muestran como el valor medio de tres determinaciones independientes realizadas por duplicado. Las barras indican la desviación estándar.

Tabla 1.3. Parámetros cinéticos de crecimiento de la microflora nativa de cubos de manzana recubiertos con gelano+fibra de manzana+preservantes naturales obtenidos mediante el Modelo de Baranyi (sin fase *lag*).

Parámetros cinéticos de crecimiento					
Población	Tratamiento	Recuento inicial (log UFC/g)	Velocidad máxima (log UFC/g/día)	Recuento máximo (log UFC/g)	R ²
Bacterias aerobias mesófilas	C	3.18 ± 0.46 ^a	0.32 ± 0.07 ^a	6.49 ± 0.66 ^a	0.88
	GGF	2.63 ± 0.25 ^{ab}	0.39 ± 0.06 ^a	6.20 ± 0.29 ^a	0.97
	GGF+Ge	2.62 ± 0.27 ^{ab}	0.20 ± 0.04 ^b	ND	0.91
	GGF+Vai	2.50 ± 0.16 ^b	0.32 ± 0.02 ^a	ND	0.99
Mohos y levaduras	C	2.00 ± 0.34 ^a	0.84 ± 0.16 ^a	5.60 ± 0.24 ^a	0.96
	GGF	2.30 ± 0.25 ^a	0.73 ± 0.03 ^a	5.80 ± 0.06 ^a	0.95
	GGF+Ge	1.80 ± 0.21 ^a	0.59 ± 0.08 ^b	4.69 ± 0.15 ^b	0.95
	GGF+Vai	2.16 ± 0.33 ^a	0.56 ± 0.12 ^b	5.32 ± 0.24 ^a	0.91

C: muestra sin recubrimiento; GGF: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana; GGF+Ge: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana+geraniol; GGF+Vai: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana+vanilina. Los resultados se muestran como valores medio ± la desviación estándar. Letras diferentes entre filas para una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Como puede observarse, inmediatamente después de la aplicación del recubrimiento (día 0), los recuentos de MES en muestras que contenían vainillina y geraniol en sus formulaciones no mostraron diferencias significativas respecto a las muestras control (cubos de manzana no recubiertos y cubos de manzana recubiertos con gelano+fibra de manzana; C y GGF, respectivamente). A este tiempo de muestreo los recuentos obtenidos estuvieron en 2.48 y 2.98 log UFC/g, estableciendo la carga inicial de bacterias aerobias mesófilas totales presentes en el producto. Sin embargo, al día 4 de almacenamiento se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los recuentos de MES correspondientes a muestras de manzana recubierta con gelano con y sin el agregado de preservantes naturales. Particularmente para muestras tratadas con GGF+Ge, la adición de geraniol en la formulación inhibió significativamente el crecimiento de MES. De este modo, los recuentos de MES en muestras recubiertas con GGF+Ge almacenadas durante 12 días fueron al menos 1.50 log UFC/g inferiores a los observados para las otras muestras. Por otro lado, los cubos de manzana recubiertos con gelano+fibra de manzana enriquecidos con vainillina (GGF+Vai) no presentaron diferencias significativas con respecto a las muestras controles (C y GGF). Este hecho se mantuvo durante todo el almacenamiento.

Luego de obtener los recuentos de microorganismos para cada tratamiento, se ajustaron las curvas de crecimiento a través del programa DMFit utilizando la función de Baranyi y Roberts. En la Tabla 1.3 se pueden observar los valores obtenidos del modelado para el valor inicial, la velocidad máxima de crecimiento y el valor final de los recuentos, así como los coeficientes de correlación (R^2), que en la mayoría de los casos presentó valores por encima de 0.90, lo que implica un buen ajuste por parte del modelo. Como se muestra en la Tabla 1.3, para la población de MES se observó que las muestras tratadas con vainillina presentaron valores iniciales (y_0) significativamente menores que el control sin recubrir (C). Además, los cubos de manzana con geraniol agregado en su recubrimiento presentaron una tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\max}$) significativamente ($p < 0.05$) menor en comparación con las muestras controles (C y GGF) (Tabla 1.3). En el caso de las muestras tratadas con preservantes naturales, no se pudo estimar el recuento final $y_{\max}$ con lo cual las curvas de MES se modelaron contemplando sólo la fase de crecimiento exponencial y no la estacionaria.

Considerando la reglamentación vigente, el CAA establece en el artículo 925 del Capítulo XI los criterios microbiológicos que deben cumplir los productos vegetales mínimamente procesados en referencia a microorganismos patógenos, tales como *E. coli* o

Salmonella spp. Sin embargo, existe una falta de reglamentación con respecto a la carga microbiológica aceptable para estos productos en cuanto a su microflora nativa. Es por ello que en este trabajo se utilizó como referencia la Norma Española, que especifica un límite máximo de 7.00 log UFC/g de microorganismos mesófilos en todas las etapas de procesado, distribución y comercialización de productos vegetales mínimamente procesados (BOE, 2001), con el fin de establecer un criterio para determinar el fin de la vida útil microbiológica del producto. En este sentido, cabe destacar que todas las muestras analizadas, es decir los cubos de manzana con y sin recubrimiento de gelano+fibra de manzana (con y sin el agregado de preservantes naturales), presentaron recuentos de MES por debajo del límite máximo adoptado (7.00 log UFC/g) durante todo el período de almacenamiento. De este modo, todas las muestras resultaron seguras para el consumo después de 12 días de almacenamiento a 5 °C, por lo que la calidad microbiológica de los cubos de manzana no resultó un factor limitante en la vida útil del producto.

La Figura 1.1 (B) muestra los resultados referidos a la evolución de mohos y levaduras (MyL) en cubos de manzana sometidos a los diferentes tratamientos durante el almacenamiento refrigerado. Se observa que los recuentos iniciales de MyL estuvieron en un rango de 1.80 - 2.30 log UFC/g; con un incremento sostenido durante los 12 días de almacenamiento, que varió entre 3.13 y 3.88 log UFC/g. Con respecto a la actividad antimicrobiana de los preservantes naturales utilizados, se observó que el crecimiento de MyL fue significativamente ($p < 0.05$) inhibido por los recubrimientos activos formulados con geraniol o vainillina (GGF+Ge y GGF+Vai, respectivamente), mostrando tasas de crecimiento máximo ($\mu_{\max}$) significativamente ($p < 0.05$) más bajas en comparación con las muestras controles (C y GGF) (Tabla 1.3). Al final del almacenamiento (día 12), los recuentos máximos ($y_{\max}$) de MyL en las muestras de GGF+Ge fueron significativamente ($p < 0.05$) más bajos que los observados para las muestras controles, C y GGF (presentando reducciones de 0.91 - 1.11 log) (Tabla 1.3).

El efecto antimicrobiano de los compuestos fenólicos dependía de la concentración utilizada. Así, a bajas concentraciones los fenoles afectan la actividad enzimática, especialmente a aquellas enzimas asociadas a la producción de energía, mientras que a altas concentraciones causan desnaturalización de proteínas. En este sentido, Fitzgerald *et al.* (2004) atribuyeron el efecto antimicrobiano de vainillina a su naturaleza fenólica y bajo peso molecular, afectando principalmente las funciones de la membrana celular, al disipar los gradientes iónicos e inhibir la respiración bacteriana (Fitzgerald *et al.*, 2004). Además,

informaron que el residuo aldehído de la vainillina juega un papel clave en su actividad antifúngica. Es sabido que los grupos aldehído son muy reactivos y pueden formar enlaces covalentes con el ADN y las proteínas, interfiriendo potencialmente con sus funciones normales (Feron *et al.*, 1991). En el caso de geraniol, también de estructura fenólica, su actividad antimicrobiana sobre levaduras se ha asociado con su capacidad de irrumpir en las membranas, alterando las propiedades de la bicapa lipídica, volviéndola más fluida y por lo tanto aumentando su permeabilidad. Además, otros autores han atribuido la actividad antimicrobiana de geraniol a los efectos combinados que ejerce sobre la membrana, como el aumento de la fluidez de la bicapa, la alteración del transporte de electrones, translocación de proteínas, y la fuga de iones. Esta fuga de iones altera el equilibrio osmótico de la célula, haciendo ineficientes a las proteínas asociadas a la membrana debido al aumento del desorden de la misma, lo que eventualmente conduce a la inhibición de la multiplicación o muerte celular (Dalleau *et al.*, 2008).

Comparando con los resultados obtenidos en la Primera Parte (donde el efecto antimicrobiano de vainillina y geraniol actuó en sinergismo con quitosano), ambos preservantes naturales mostraron efectos antimicrobianos significativos sobre la microflora nativa de cubos de manzana cuando fueron vehiculizados en recubrimientos de gelano, aunque las reducciones logradas fueron menores que al utilizar las formulaciones de quitosano. En esta Segunda Parte, geraniol mostró mayor efectividad antimicrobiana que vainillina al aplicarse sobre cubos de manzana.

Otros autores han estudiado la aplicación de estos preservantes naturales vehiculizados en recubrimientos comestibles. Por ejemplo, Takma y Korel (2017) evaluaron la aplicación de recubrimientos de alginato enriquecidos con vainillina sobre uvas, encontrando reducciones significativas sobre los recuentos de mohos y levaduras durante 35 días de almacenamiento a 4 °C. Respecto del uso del geraniol como antimicrobiano agregado en recubrimientos comestibles, Tomadoni *et al.* (2018) aplicaron gelano con 1.2 y 2.4 µl/ml de geraniol, demostrando el potencial antimicrobiano de este compuesto bioactivo frente a las bacterias mesófilas, psicrótrofas, y mohos y levaduras determinados en frutillas mínimamente procesadas almacenadas durante 7 días bajo refrigeración.

1.5.2 Parámetros de color

En la Tabla 1.4 se muestra el efecto de los recubrimientos de gelano, con y sin el enriquecimiento con preservantes naturales sobre los valores de luminosidad (L*) y ángulo

de tono (h°) de cubos de manzana almacenados durante 12 días a 5 °C. La evolución de los parámetros de color en el almacenamiento fue similar para todas las muestras. El tiempo no resultó un factor significativo, por lo tanto, en el análisis estadístico se evaluaron los valores promedios de todo el almacenamiento para cada tratamiento. Tanto los valores L^* como los de h° tendieron a disminuir en todas las muestras independientemente del tratamiento aplicado. Esta disminución en el ángulo de tono (h°) indica un oscurecimiento de los cubos de manzana. Adicionalmente, se observó que la aplicación del recubrimiento GGF redujo significativamente ($p < 0.05$) los valores de L^* , en comparación con el control fresco (C) en promedio durante todo el período de almacenamiento. Esta disminución del parámetro L^* puede explicarse por los cambios en las propiedades de reflexión de la superficie como resultado de recubrir la fruta. El enriquecimiento con geraniol (GGF+Ge) no provocó cambios significativos en los parámetros L^* y h° ($p > 0.05$) en comparación con GGF, pero ambos tratamientos mostraron valores significativamente más bajos que los correspondientes a la muestra control (C). Finalmente, mediante el enriquecimiento del recubrimiento con vainillina se logró una mejora significativa ($p < 0.05$) en los parámetros de color, dado que los valores de L^* y h° se mantuvieron sin mayores cambios en los cubos de manzana. Sumado a esto, las muestras recubiertas con GGF+Vai mostraron un menor pardeamiento (evaluado mediante un panel sensorial) durante todo el período de almacenamiento, en comparación con la muestra C. Contrariamente, los cubos de manzana tratados con recubrimiento GGF y GGF+Ge presentaron valores de h° más bajos con respecto a la muestra C en promedio durante todo el período de almacenamiento.

El efecto antipardeante del ácido ascórbico y sus derivados (aplicados al 0.5 - 4 %) ha sido ampliamente demostrado en varias frutas frescas cortadas, entre las que se encuentran incluidas las manzanas (Moreira *et al.*, 2015b). Por esta razón, para retrasar la aparición de pardeamiento en los cubos de manzana se utilizó una solución de inmersión de cloruro de calcio con ácido ascórbico como tratamiento común a todas las muestras (incluido el control). Además, es sabido que los recubrimientos actúan como una barrera al oxígeno que podría reducir los cambios de color superficial asociados con la actividad de la PPO en frutas frescas cortadas y de este modo, minimizar los cambios de color asociados (Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2014b). Sin embargo, la mejora que podría obtenerse al aplicar el recubrimiento de GGF sobre los atributos de color de los cubos de manzana no pudo apreciarse en este estudio, debido a que la solución antipardeamiento de ácido ascórbico se utilizó en todas las muestras por igual. De acuerdo con estos resultados, Moreira *et al.*

(2017) informaron que muestras de manzana mínimamente procesada tratadas con recubrimientos a base de pectina no presentaron diferencias de color con respecto a las muestras sin recubrir, cuando se utilizó una solución de ácido ascórbico como tratamiento común a todas las muestras.

Con el objetivo de retrasar los cambios de color atribuidos a reacciones de pardeamiento en trozos de manzana Red Delicious, Zambrano-Zaragoza *et al.* (2014b) formularon recubrimientos comestibles utilizando nanoemulsiones de tocoferol/mucílago que presentaban propiedades antioxidantes, logrando reducir la actividad de la PPO y el índice de pardeamiento al aplicarlos sobre las manzanas mínimamente procesadas. Además, Zambrano-Zaragoza *et al.* (2014a) también estudiaron nanorecubrimientos con α -tocoferol y goma xantana con gran potencial para preservar el color de manzanas, reduciendo la velocidad de cambio en L^* y el índice de pardeamiento. Respecto al uso de vainillina, Rojas-Grau *et al.* (2008) informaron mejoras en los atributos de calidad de manzanas Fuji mínimamente procesadas cuando utilizaron recubrimientos de alginato con el agregado de vainillina, que logró mantener los valores del parámetro L^* durante 2 semanas de almacenamiento.

Tabla 1.4. Efecto de los recubrimientos de gelano+fibra de manzana con y sin preservantes naturales sobre los parámetros de color (luminosidad L*, ángulo de tono h°) y firmeza de cubos de manzana almacenados durante 12 días a 5 °C.

		Tiempo de almacenamiento (días)				
Parámetro	Tratamiento	0	4	8	12	Promedio
L*	C	79.74 ± 0.94	77.83 ± 2.08	76.74 ± 2.18	78.94 ± 2.12	78.31 ± 2.15 ^a
	GGF	80.19 ± 2.02	73.98 ± 3.79	74.08 ± 4.67	72.61 ± 5.48	75.22 ± 5.00 ^b
	GGF+Ge	78.14 ± 1.29	74.92 ± 6.11	75.79 ± 2.35	73.29 ± 4.22	75.33 ± 4.19 ^b
	GGF+Vai	80.22 ± 1.37	78.06 ± 1.65	78.28 ± 2.25	75.85 ± 3.20	78.10 ± 3.44 ^a
h°	C	82.63 ± 0.75	77.51 ± 0.95	77.03 ± 1.24	78.57 ± 2.12	78.94 ± 2.59 ^b
	GGF	81.96 ± 0.60	77.68 ± 1.68	76.14 ± 1.48	76.63 ± 1.27	78.10 ± 3.04 ^c
	GGF+Ge	81.68 ± 1.79	77.39 ± 1.77	76.81 ± 1.47	76.06 ± 1.61	77.99 ± 2.73 ^c
	GGF+Vai	83.38 ± 0.57	80.04 ± 1.07	79.57 ± 1.83	79.78 ± 1.11	80.69 ± 1.97 ^a
Firmeza (N/cm²)	C	59.8 ± 5.8	63.2 ± 8.0	70.4 ± 5.5	68.6 ± 3.1	65.5 ± 7.0 ^b
	GGF	66.0 ± 7.5	62.1 ± 7.4	71.2 ± 5.9	70.7 ± 9.3	67.5 ± 9.2 ^{ab}
	GGF+Ge	56.6 ± 4.3	61.8 ± 10.8	72.1 ± 3.4	66.8 ± 4.1	64.3 ± 8.4 ^b
	GGF+Vai	62.0 ± 7.9	71.9 ± 3.3	73.8 ± 3.6	75.8 ± 3.6	70.2 ± 7.2 ^a

C: muestra sin recubrimiento; GGF: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana; GGF+Ge: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana+geraniol; GGF+Vai: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana+vainillina. Los resultados se muestran como valores medio ± la desviación estándar (n = 15). Letras diferentes entre valores promedio (representativos de todos los tiempos de muestreo) indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05) entre tratamientos.

1.5.3 Firmeza de cubos de manzana

La degradación de la textura es uno de los cambios más notables que ocurre en las frutas y hortalizas durante su almacenamiento prolongado y está estrechamente relacionado con los cambios metabólicos que se producen en los tejidos, así como también con su contenido de agua (Rojas-Grau *et al.*, 2008; Barrett *et al.*, 2010; Yousuf *et al.*, 2018). En la Tabla 1.4 se presentan los valores de firmeza de los cubos de manzana almacenados durante 12 días a 5 °C. De igual manera que lo detallado para los parámetros de color, el tiempo de almacenamiento no resultó un factor estadísticamente significativo en la firmeza, con lo cual las diferencias discutidas a continuación se basan en el análisis de los valores promedio de todos los tiempos para cada tratamiento. Como se describió en la metodología, los cubos de manzana con y sin recubrimiento se sometieron a un mismo tratamiento base con cloruro de calcio. En este sentido, el uso de cloruro de calcio para lograr el entrecruzamiento de los biopolímeros contribuye a minimizar el ablandamiento de los tejidos. Este efecto reafirmante se ha discutido ampliamente en la literatura; el Cl_2Ca reacciona con el ácido péctico presente en la pared celular para formar pectato de calcio, lo cual fortalece la unión molecular entre los componentes de la pared de la célula vegetal. Giacalone y Chiabrando (2018) hallaron que la inmersión en una solución que contenía 1 % de cloruro de calcio ayudó a mantener la firmeza de trozos de manzana de distintas variedades (Golden Delicious, Granny Smith y Scarlet Spur) sin diferencias con respecto a la fruta recién cortada luego de 5 días de almacenamiento a 4 °C. En manzana Golden Delicious mínimamente procesada, Moreira *et al.* (2015a) obtuvieron resultados similares cuando aplicaron un recubrimiento comestible de gelano enriquecido con fibra de manzana seguido por una inmersión en una solución de cloruro de calcio al 2 %. En este trabajo, la aplicación del recubrimiento de gelano y fibra de manzana no mostró mejoras en la firmeza de los cubos de manzana, en comparación con la muestra C sin recubrimiento. Al igual que lo mencionado para los atributos de color, donde la inmersión en solución de cloruro de calcio y ácido ascórbico común a todos los tratamientos enmascaró el potencial efecto de los recubrimientos sobre el desarrollo de pardeamiento, para el atributo de firmeza la inmersión en dicha solución base común a todos los tratamientos también podría haber enmascarado el potencial efecto de los recubrimientos sobre la textura del producto. Esta observación también se sustenta por el hecho de que se han informado mejoras en este parámetro en estudios donde la solución de inmersión control utilizada fue agua destilada, al comparar con la firmeza de manzana tratada con recubrimientos comestibles. Por

ejemplo, Espino-Díaz *et al.* (2016) observaron una retención de la firmeza en trozos de manzana al aplicar recubrimientos formulados con alginato de sodio, mientras que reportaron una disminución significativa del 40 % de la firmeza inicial para el control no recubierto, luego de 12 días de almacenamiento a 2 °C. Resultados similares fueron reportados por Saba y Sogvar (2016), al trabajar con manzana fresca cortada recubierta con soluciones de carboximetilcelulosa.

Respecto a la influencia de los compuestos activos adicionados al recubrimiento base, la incorporación de vainillina en la formulación tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la firmeza de la fruta en el almacenamiento. Se observó que los cubos de manzana recubiertos con GGF+Vai presentaron los valores de firmeza más altos durante el almacenamiento refrigerado (Tabla 1.4). El efecto inhibidor de la vainillina sobre el crecimiento microbiano descrito anteriormente, especialmente sobre mohos y levaduras, contribuye al mantenimiento de la firmeza y previene el daño en la textura causado por la actividad metabólica microbiana. De acuerdo con los resultados obtenidos, Rojas-Grau *et al.* (2007) informaron que la incorporación de vainillina en concentraciones de 3 y 6 % (m/m) en recubrimientos de alginato mantuvo la firmeza de manzana recién cortada, mientras que el uso de aceites esenciales de orégano y *lemongrass* tuvo efectos perjudiciales sobre este parámetro. Por el contrario, en este capítulo los cubos de manzana recubiertos con GGF+Ge presentaron valores de firmeza más bajos que la muestra control (C). Este efecto negativo de geraniol sobre la textura fue observado previamente por otros autores. Tomadoni *et al.* (2018) informaron una disminución en la firmeza de frutillas frescas cortadas luego de 7 días de almacenamiento, cuando aplicaron recubrimientos de gelano enriquecidos con geraniol. También, Raybaudi-Massilia *et al.* (2008) observaron una disminución en este atributo cuando recubrieron melón cortado con soluciones de alginato de sodio enriquecido con compuestos bioactivos. Estos autores además afirmaron que geraniol afectó la firmeza de los trozos de melón en mayor medida que el resto de los bioactivos estudiados. El ablandamiento de los tejidos provocado por geraniol en las frutas podría atribuirse a cambios estructurales en los tejidos celulares que afectan directamente la firmeza, o promueven la liberación de enzimas y sustratos, iniciada durante las operaciones preliminares en el procesamiento, tales como pelado y corte (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2008; Tomadoni *et al.*, 2018).

1.5.4 Propiedades antioxidantes

El potencial antioxidante de un tejido vegetal está determinado por el tipo y la cantidad de compuestos bioactivos presentes en el producto. El impacto de los recubrimientos comestibles de gelano+fibra de manzana, con y sin vainillina o geraniol sobre las propiedades antioxidantes de cubos de manzana almacenadas bajo refrigeración se muestra en la Tabla 1.5 Se observó un significativo efecto de correlación entre los valores del contenido de fenoles totales (CFT) y la capacidad antioxidante de las manzanas (con y sin recubrimiento) con un coeficiente de Pearson de 0.8.

FOR AUTHOR USE ONLY

Tabla 1.5. Efecto de los recubrimientos de gelano+fibra de manzana con y sin preservantes naturales sobre las propiedades antioxidantes de cubos de manzana almacenados durante 12 días a 5 °C.

Determinación	Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)			
		0	4	8	12
Contenido fenólico total (mg EAG/100 g)	C	106.3 ± 9.8 ^{Ba}	81.4 ± 2.1 ^{Bb}	74.8 ± 0.6 ^{Bb}	81.5 ± 8.3 ^{Bb}
	GGF	98.8 ± 2.0 ^{Ba}	83.1 ± 6.6 ^{Bc}	92.7 ± 5.8 ^{Ab}	94.3 ± 7.1 ^{Aab}
	GGF+Ge	130.9 ± 5.8 ^{Aa}	81.2 ± 10.7 ^{Bc}	87.4 ± 4.1 ^{Ab}	82.0 ± 4.0 ^{Bbc}
	GGF+Vai	126.3 ± 10.2 ^{Aa}	93.5 ± 15.7 ^{Ab}	92.9 ± 10.7 ^{Ab}	85.5 ± 2.3 ^{Bb}
Actividad antioxidante (mg ET/100 g)	C	234.1 ± 57.8 ^{BcCa}	151.8 ± 4.7 ^{Ac}	147.0 ± 16.4 ^{Bb}	125.9 ± 14.8 ^{ABd}
	GGF	210.6 ± 4.3 ^{Ca}	134.2 ± 4.8 ^{Bc}	192.7 ± 34.9 ^{Aa}	148.8 ± 15.8 ^{Ab}
	GGF+Ge	269.4 ± 20.3 ^{Aa}	136.3 ± 22.3 ^{ABc}	165.7 ± 8.4 ^{Bb}	143.9 ± 11.4 ^{ABc}
	GGF+Vai	230.4 ± 24.0 ^{Ba}	144.8 ± 37.9 ^{Ab}	154.6 ± 7.5 ^{Bb}	131.1 ± 1.0 ^{Bc}

C: muestra sin recubrimiento; GGF: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana; GGF+Ge: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana+geraniol; GGF+Vai: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana+vainillina. Los resultados se muestran como valores medio ± la desviación estándar (n = 15). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05) entre tratamientos. Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05) entre días de almacenamiento.

Respecto al contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), los valores iniciales en los cubos de manzana no recubiertos (C) fueron 106.3 mg de EAG/100g de producto, sin presentar diferencias significativas ($p > 0.05$) con las muestras recubiertas con GGF. Esto indicaría que la adición de fibra de manzana, a pesar de tratarse de un ingrediente procedente de un subproducto rico en compuestos fitoquímicos, no contribuiría significativamente al contenido de fenoles totales del producto. La adición de vainillina (GGF+Vai) y geraniol (GGF+Ge) aumentó significativamente ($p < 0.05$) el CFT de las muestras recubiertas con gelano y fibra de manzana (GGF), con valores 23 y 19 % más altos, respectivamente, inmediatamente después de la aplicación de los tratamientos (Tabla 1.5). Estos incrementos eran esperables, dado que ambos compuestos bioactivos presentan estructura fenólica. Luego de los primeros cuatro días de almacenamiento se observó una fuerte disminución general en el CFT, aunque los cubos tratados con GGF+Vai mostraron una retención significativamente mayor que el resto de las muestras. Durante el avance del almacenamiento (día 8 y 12), el CFT de los cubos de manzana con y sin recubrimientos no mostró diferencias significativas, lo que indica que ni el agregado de vainillina ni el de geraniol logró mejorar la retención del CFT de los cubos de manzana. De acuerdo con estos resultados, Tomadoni *et al.* (2016) reportaron un incremento significativo en los valores de CFT inmediatamente después de añadir vainillina (en concentraciones variables de entre 2.5 y 5 g/l) a jugo de frutillas. Sin embargo, en ese estudio los niveles de CFT tanto para los jugos tratados como para los no tratados se mantuvieron estables durante 10 días de almacenamiento refrigerado. Silveira *et al.* (2015) utilizaron dos soluciones de inmersión con concentraciones de 1 y 2 g/l de vainillina, respectivamente, para tratar trozos de melón mínimamente procesado. Estos autores informaron una disminución general del CFT durante los 10 días de almacenamiento, aunque las muestras tratadas con la mayor concentración de vainillina mantuvieron una concentración del CFT significativamente mayor que el control sin compuesto activo, e incluso que las muestras tratadas con la concentración menor. En otro estudio, Takma y Korel (2017) adicionaron vainillina (1 %) a recubrimientos de alginato y lo aplicaron sobre uvas. La adición del compuesto activo causó una mejora en la retención del CFT de las uvas almacenadas a 4 °C durante 35 días, en comparación con muestras no tratadas.

En la Tabla 1.5 también se muestran los resultados de los ensayos de capacidad antioxidante de los cubos de manzana, expresada como mg ET/100 g PF. Inicialmente, se observó que los cubos no recubiertos (C) presentaron una actividad antioxidante

equivalente a 234.1 mg ET/100 g PF. Al igual que para el CFT, la incorporación de fibra de manzana al recubrimiento base no afectó significativamente la actividad antirradicalaria en las muestras recién procesadas (día 0). Adicionalmente, sólo el enriquecimiento con geraniol provocó un incremento significativo ($p < 0.05$) en la actividad antioxidante de las muestras recubiertas en el día 0, en comparación con las muestras controles (C y GGF). Choi *et al.* (2000) informaron la marcada actividad antirradicalaria de geraniol en el ensayo de DPPH (87.7 %, 235.9 mg ET/ml). Además, la baja o nula actividad antioxidante que presenta la vainillina medida por el radical DPPH fue reportada en varios trabajos (Kumar *et al.*, 2002; Shyamala *et al.*, 2007; Tai *et al.*, 2011). En este sentido, la pobre eficiencia de la vainillina puede explicarse por la presencia de un solo grupo hidroxilo fenólico oxidable. Durante el almacenamiento, la actividad antioxidante de los cubos de manzana con y sin recubrimiento mostró una disminución similar, sin diferencias significativas en los valores finales. En relación a estos resultados, Tomadoni *et al.* (2016) informaron que la incorporación de vainillina (2.5 y 5 mg/ml) o geraniol (0.6 y 1.2 μ l/ml) a jugos de frutillas no aumentó la actividad antioxidante del producto en comparación con las muestras control (sin el agregado de compuestos bioactivos).

1.5.5 Evaluación sensorial

Los recubrimientos comestibles, como su nombre lo indica, son consumidos junto con los productos vegetales mínimamente procesados. Es por esto que tanto los recubrimientos como los compuestos bioactivos que por medio de ellos se incorporen a la formulación (sean antimicrobianos, antioxidantes, o compuestos nutraceuticos), no deben impactar negativamente sobre la calidad sensorial de los vegetales. El efecto de las diferentes formulaciones de gelano sobre los cubos de manzana durante los 12 días de almacenamiento a 5 °C se muestra en la Figura 1.2.

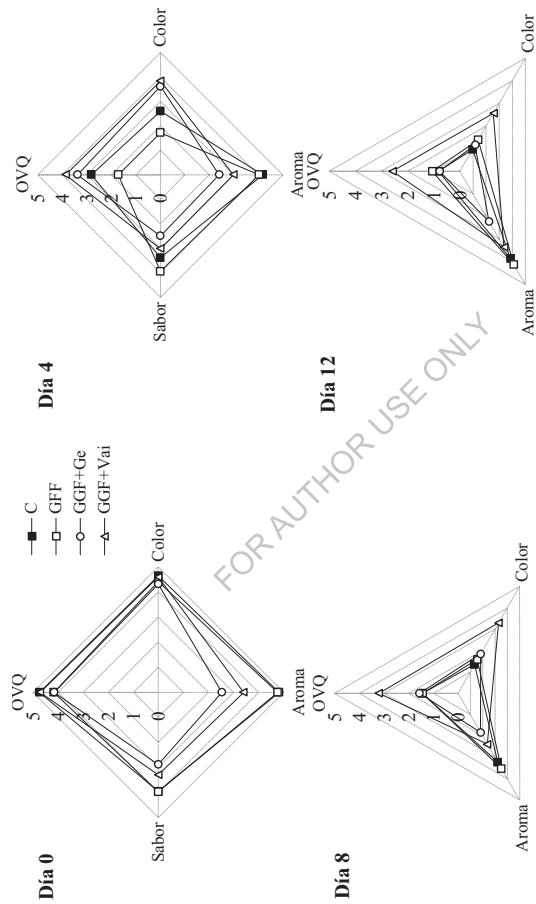


Figura 1.2. Impacto de recubrimientos activos de gelano+fibra de manzana con y sin preservantes naturales sobre los atributos sensoriales de cubos de manzana.
 C: muestra sin recubrimiento; GGF: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana; GGF+Ge: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana+geraniol; GGF+Vai: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana+vainillina. Los resultados se muestran como el valor medio de tres determinaciones independientes realizadas por duplicado.

Como puede observarse en la Figura 1.2, inicialmente (día 0), los cubos de manzana recubiertos con gelano y fibra de manzana (GGF) no fueron diferenciados por los panelistas en comparación con la muestra control no recubierta (C); es decir que no se observaron diferencias significativas entre estas muestras para ninguno de los atributos sensoriales evaluados. Respecto del enriquecimiento con los compuestos bioactivos, al igual que lo detallado en la Primera Parte tanto geraniol como vainillina fueron percibidos por los panelistas, en los atributos de aroma y sabor de los cubos de manzana. De cualquier manera, el sabor de todas las muestras resultó aceptable. Al día 4 de almacenamiento, se observó que los cubos tratados con los recubrimientos de gelano enriquecidos con ambos compuestos activos (vainillina y geraniol) obtuvieron puntajes más altos ($p < 0.05$) de OVQ (3.4 y 3.9, respectivamente) y color (3.6 y 3.8, respectivamente) que las muestras controles C y GGF (con valores de 2.8 y 1.7 para OVQ; 2.6 y 1.7 para color, respectivamente). Por otro lado, los puntajes de aroma correspondientes a los cubos de manzana recubiertos con GGF+Ge y GGF+Vai fueron significativamente ($p < 0.05$) más bajos que los obtenidos para C y GGF, lo que indicaría que los panelistas detectaron aromas extraños como consecuencia de los componentes aromáticos y volátiles de vainillina y geraniol, si bien la aceptabilidad general de estas muestras no se vio comprometida. Desde el día 8 hasta el final del almacenamiento, el atributo de sabor no fue evaluado, a fin de evitar someter a los panelistas a cualquier riesgo microbiológico. Desde los días 8 a 12 de almacenamiento, los cubos de manzana recubiertos con GGF+Vai obtuvieron las puntuaciones más altas ($p < 0.05$) para OVQ y color en comparación con el resto de las muestras. El aroma característico impartido por la vainillina continuó siendo percibido en gran medida por los panelistas. En contraste, al día 8 los puntajes obtenidos para las muestras C, GGF y GGF+Ge quedaron por debajo del límite de aceptabilidad (2.5 cm). Como se muestra en la Figura 2.2, al día 12 la mejora notable en la calidad sensorial de las muestras recubiertas con GGF+Vai se evidenció sobre los atributos de color y OVQ. En este sentido, se observó que este tratamiento fue el único efectivo en mantener los parámetros de color de los cubos de manzana, definidos por L^* y h° , así como también tuvo un efecto positivo sobre la firmeza de los cubos de manzana. Por lo tanto, la aplicación del recubrimiento GGF+Vai permitió que los cubos de manzana alcanzaran períodos de almacenamiento prolongados (12 días) con puntuaciones por encima del límite de aceptabilidad para todos los atributos sensoriales evaluados.

1.5.6 Efecto de recubrimientos activos de gelano enriquecidos con preservantes naturales sobre la evolución de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 inoculados en cubos de manzana

La Figura 1.3 muestra la evolución de *E. coli* O157:H7 FP605/03 (A) y *L. innocua* CIP 80.11 (B) inoculadas en cubos de manzana durante el almacenamiento refrigerado de las muestras. Se corroboró la ausencia de *Listeria* spp. y *E. coli* nativos en las muestras no inoculadas durante los 12 días de almacenamiento. Sangsuwan *et al.* (2008) estudiaron la evolución de *E. coli* en trozos de melón almacenados 8 días a 10 °C. Estos autores informaron una disminución significativa de más de 4.00 log UFC/g al octavo día en muestras sin recubrimiento, y lo atribuyeron a la pérdida del contenido de agua del melón. Por esta razón, en esta Segunda Parte la evolución de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 se evaluó tomando como muestra control los cubos de manzana inoculados y recubiertos con la formulación base de gelano y fibra de manzana, debido a que este polisacárido no presenta efectos antimicrobianos intrínsecos y, por el contrario, podría resguardar a los microorganismos frente a la posible deshidratación sufrida por la fruta durante el almacenamiento refrigerado. Con respecto al efecto de la fibra de manzana sobre la viabilidad de los microorganismos, Moreira *et al.* (2015a) informaron que independientemente del tipo del polisacárido base empleado (alginato de sodio, pectina o goma gelano), la adición de fibra de manzana (2 g/l) no mostró efectos antimicrobianos, al añadirse a las formulaciones empleadas para recubrir cubos de manzana.

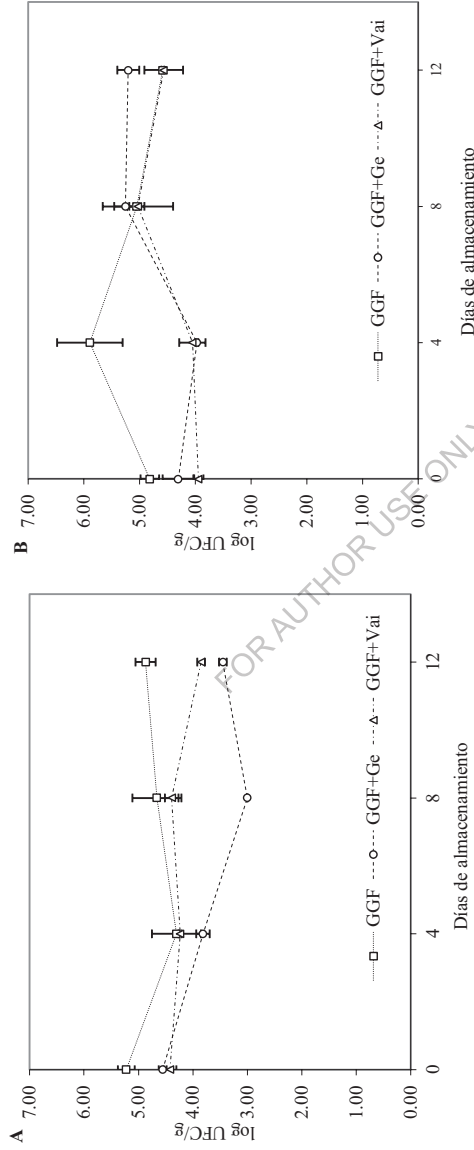


Figura 1.3. Evolución de *E. coli* O157:H7 FP605/03 (A) y *L. innocua* CIP 80.11 (B) en cubos de manzana recubiertos con gelano+fibra de manzana con y sin preservantes naturales durante 12 días de almacenamiento a 5 °C. GGF: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana; GGF+Ge: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana+geraniol; GGF+Vai: muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana+vainillina. Los resultados se muestran como el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras indican la desviación estándar.

En primer lugar, los resultados obtenidos muestran que *E. coli* O157:H7 FP605/03 no fue capaz de crecer en la muestra control recubierta con gelano+fibra de manzana (cubos de manzana recubiertos con GGF sin el agregado de compuestos bioactivos), aunque sí mantuvo los recuentos estables de durante todo el almacenamiento refrigerado. Este efecto bacteriostático puede deberse a que, como se explicó en la Primera Parte, *E. coli* O157:H7 FP605/03 se inoculó de manera artificial y por lo tanto no se encontraría adaptado a las condiciones de la matriz, sumado al hecho de que se trata de un microorganismo mesófilo, por lo que las bajas temperaturas no promueven su desarrollo. Con respecto al efecto de los tratamientos con preservantes naturales incorporados en el recubrimiento de gelano, se observó que tanto geraniol como vainillina ejercieron un significativo efecto ($p < 0.05$) bactericida inicial frente a *E. coli* O157:H7 FP605/03, reduciendo sus recuentos en aproximadamente 0.70 - 0.80 log UFC/g. Adicionalmente, geraniol mostró un efecto bacteriostático significativo ($p < 0.05$) desde el día 8 hasta el final del almacenamiento, presentando las muestras GGF+Ge recuentos entre 1.40 a 1.70 log UFC/g más bajos con respecto a las muestras recubiertas con GGF (Figura 1.3 A). Para el caso de *L. innocua* CIP 80.11 (Figura 1.3 B), se observó un crecimiento en las muestras de cubos de manzana recubiertos con GGF durante los primeros cuatro días de almacenamiento, de acuerdo con las características que presenta este microorganismo, que es psicrótrofo (Osimani y Clementi, 2016). Luego, los recuentos para la muestra control con fibra de manzana (GGF) se mantuvieron estables, sin mostrar aumentos significativos. Con respecto a las muestras tratadas con preservantes naturales, los recubrimientos de GGF+Ge y GGF+Vai inhibieron significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento de *L. innocua* CIP 80.11 durante los primeros 4 días de almacenamiento, logrando reducciones en los recuentos de hasta 1.90 log UFC/g. Sin embargo, desde el día 8 al 12 de almacenamiento, este efecto inhibitorio no se observó.

Se han desarrollado algunos estudios *in vivo* evaluando la efectividad de vainillina y geraniol para controlar el crecimiento de *E. coli* y *Listeria* spp. en frutas recién cortadas y en jugos de frutas. Entre ellos, Rojas-Grau *et al.* (2007) estudiaron el efecto de vainillina y otros compuestos bioactivos incorporados en recubrimientos comestibles de alginato y puré de manzana sobre la supervivencia de *L. innocua* inoculada en manzana Fuji mínimamente procesada. Al añadir vainillina a los recubrimientos en concentraciones de 3 y 6 g/kg, estos autores observaron reducciones significativas (de 3 ciclos logarítmicos) durante la primera semana de almacenamiento. Este efecto inhibitorio se mantuvo hasta el final del período de almacenamiento (21 días).

Por otro lado, los resultados que aquí se exponen son similares a los informados por Manu (2016), quien evaluó diferentes concentraciones de geraniol (0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 $\mu\text{l/ml}$) sobre jugo de una mezcla de *berries* inoculado con *S. enteritidis* o *E. coli* O157:H7 (concentración celular final de 5.08 log UFC/ml) almacenado a 4 y 12 °C. Estos autores informaron que concentraciones de 1.0 y 1.5 $\mu\text{l/ml}$ no permitieron el desarrollo de colonias de *S. enteritidis* o *E. coli* O157:H7 en medios de agar selectivo (desde la hora de almacenamiento y hasta las 24 h). Además, Tomadoni *et al.* (2016) evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de vainillina y geraniol sobre la supervivencia de *E. coli* O157:H7 inoculado en jugo de frutillas. Estos autores encontraron que concentraciones de 5 g/l de vainillina y 0.6 ml/l de geraniol fueron capaces de reducir significativamente los recuentos iniciales de *E. coli* (2 ciclos logarítmicos) en comparación con el jugo no tratado, logrando además dejar los recuentos por debajo del límite de detección desde el día 3 hasta el final del período de almacenamiento. En línea con estas investigaciones, Cassani *et al.* (2017) informaron que la aplicación combinada de vainillina (1.25 g/l) y ultrasonido (7.5 min, 40 kHz) sobre jugo de frutilla redujo significativamente la población de *E. coli* O157:H7 y de *L. innocua* inoculadas en el producto, dejando los recuentos en niveles no detectables luego de 7 días de almacenamiento refrigerado. El hecho de que en este capítulo no se haya alcanzado esa magnitud de reducción empleando geraniol y vainillina como compuestos antimicrobianos podría atribuirse a las diferencias en los sustratos vegetales (características intrínsecas de cada fruta como pH, acidez, sólidos solubles), a la estructura propia de la matriz alimentaria (jugo, fruta cortada fresca cortada), a los diferentes métodos de aplicación de los compuestos bioactivos (recubrimientos comestibles, aplicación directa en el jugo) y al menor contacto entre los microorganismos y los preservantes naturales.

1.6 Conclusiones

En este trabajo se evaluaron dos formulaciones diferentes con el objetivo de mejorar la calidad global y la seguridad de cubos de manzana listos para consumir. En primer lugar, los recubrimientos activos formulados con quitosano resultaron eficaces para el control microbiológico tanto de la microflora nativa como de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 cuando se aplicaron sobre cubos de manzana. El enriquecimiento con preservantes naturales (geraniol o vainillina), mostró un efecto sinérgico con quitosano

potenciando la efectividad de los recubrimientos. De este modo, los cubos de manzana recubiertos con Qui+Ge y Qui+Vai mostraron recuentos aún más bajos que los correspondientes a Qui, o incluso por debajo del límite de detección ($< 2.00 \log$) en la mayoría de las muestras. Sin embargo, pese a la mejora en términos de inocuidad alimentaria obtenida con la utilización de estas formulaciones, la calidad sensorial de los cubos de manzana se vio fuertemente afectada de forma negativa debido a un desarrollo casi inmediato de pardeamiento luego de la aplicación de los recubrimientos activos, que fue atribuido a la activación enzimática promovida por quitosano. Por estos motivos, se diseñó un nuevo experimento utilizando gelano como solución formadora de recubrimientos, cuya aplicación sobre manzana mínimamente procesada había sido evaluada en trabajos previos del grupo.

En el segundo diseño experimental los recubrimientos activos formulados con gelano+fibra de manzana y enriquecidos con preservantes naturales mostraron ventajas con respecto a la calidad global de los cubos de manzana, en comparación con los de quitosano. La aplicación del recubrimiento comestible de GGF+Ge retrasó el deterioro microbiológico de los cubos de manzana y, además, tuvo un significativo efecto bactericida, reduciendo los recuentos de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 inoculados durante los 12 días de almacenamiento. Por su parte, el uso del recubrimiento GGF+Vai inhibió el crecimiento de mohos y levaduras, mejoró la retención de firmeza de los cubos de manzana y logró mantener los atributos de color (valores de luminosidad y ángulo de tono) durante todo el periodo de almacenamiento, características de calidad fundamentales a considerar a la hora de diseñar un nuevo producto. Además, la incorporación de vainillina en el recubrimiento activo mejoró los atributos sensoriales como el OVQ y el color de los cubos de manzana, permitiendo de este modo una prolongación de su vida útil de al menos 4 días, con respecto al resto de las muestras. Si bien ambos recubrimientos funcionales (GGF+Ge y GGF+Vai) mejoraron los atributos de calidad y la seguridad de cubos de manzana, resulta importante destacar que la vainillina mostró el mayor potencial para ser utilizado tecnológicamente en el desarrollo de un producto comercial dado que, como se mencionó anteriormente, este compuesto permitió obtener mejoras significativas en la calidad sensorial de los cubos de manzana recubiertos, lo cual se tradujo en una prolongación de la vida útil.

Parte 2: Recubrimientos activos combinados con altas presiones y su impacto sobre compuestos fenólicos, calidad microbiológica y principales parámetros fisicoquímicos de cubos de manzana

2.1 Introducción

Como se mencionó previamente, las operaciones preliminares llevadas a cabo para obtener productos a base de manzana mínimamente procesada, como el pelado y corte, conducen al desarrollo de pardeamiento enzimático y podrían promover el crecimiento de patógenos causantes de brotes de ETA. Las tecnologías de procesamiento no térmico, como los recubrimientos activos y los antimicrobianos naturales, han demostrado su efectividad como herramientas para extender la vida útil y preservar las características nutricionales y funcionales de los productos derivados de frutas y verduras (Bohn *et al.*, 2015; Cassani *et al.*, 2018). En este sentido, se aplicó un recubrimiento activo formulado a base de goma gelano+fibra de manzana enriquecido con vainillina sobre cubos de manzana. La aplicación de este recubrimiento permitió mantener las características de textura, color, logró mejorar la calidad microbiológica, y mantuvo aceptables las características sensoriales, logrando una extensión de la vida útil del producto. Adicionalmente, se han desarrollado y se encuentran bajo estudio otras tecnologías novedosas de preservación no térmicas que utilizan métodos físicos para la inactivación microbiana y enzimática en productos vegetales, como el procesamiento a altas presiones (HPP, por sus siglas en inglés *High Pressure Processing*), campos eléctricos pulsados, ondas ultrasónicas, luz pulsada de alta intensidad, irradiación, luz ultravioleta, etc. (Sun, 2005; Fernández-Jalao *et al.*, 2019).

El procesamiento a altas presiones se utiliza para inactivar patógenos alimentarios a la vez que resguarda o intenta ocasionar cambios mínimos en los parámetros sensoriales y nutricionales, así como en las características antioxidantes de frutas y productos derivados (Keenan *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2016; Fernandez *et al.*, 2019). Por esta razón, en los últimos años la aplicación de HPP en el procesamiento de productos frutícolas ha mostrado un incremento. Además, esta tecnología es amigable con el medio

ambiente y presenta factibilidad tecnológica de utilización en la escala de producción industrial (Li *et al.*, 2017). El procesamiento a altas presiones consiste en la aplicación de presión (100 - 900 MPa) al alimento, pudiendo también emplearse en combinación con temperaturas (0 - 50 °C) en un tiempo (de pocos segundos a varios minutos) (Rastogi *et al.*, 2007). Particularmente en productos de manzana, el HPP ha sido aplicado principalmente en jugos con el objetivo de inactivar patógenos, mejorar atributos sensoriales y prevenir el desarrollo de hongos durante el almacenamiento (Bayindirli *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2017; Buerman *et al.*, 2020). Otros estudios demostraron que la aplicación de HPP provoca cambios en la matriz de alimentos vegetales, como la manzana mínimamente procesada y otros productos a base de manzana (jugos y purés), que pueden dar como resultado una mejor capacidad de extracción y bioaccesibilidad de compuestos bioactivos (Briones-Labarca *et al.*, 2011; Rodríguez-Roque *et al.*, 2015; Fernández-Jalao *et al.*, 2019). En este sentido, la concentración de compuestos bioactivos que se liberan de la matriz alimentaria en el tracto gastrointestinal y están disponibles para la absorción es más importante que la concentración potencial de los mismos en el producto. En relación con esto, es ampliamente aceptado que los modelos de digestión *in vitro* representan un sistema adecuado para simular las condiciones fisiológicas y estudiar la interacción de los compuestos bioactivos de la matriz alimentaria durante la digestión gastrointestinal humana (DGI) y para determinar su bioaccesibilidad (Cilla *et al.*, 2018). Estos métodos son rentables, reproducibles y, en general, rápidos, presentándolos como ventajosos para determinar los efectos de las matrices y del procesamiento de los alimentos en la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos, mostrando además resultados que se correlacionan con los obtenidos en los sistemas de digestión *in vivo* (Bouayed *et al.*, 2011).

Aunque es posible encontrar en la literatura algunos estudios acerca de la aplicación de HPP sobre manzana cortada, el efecto combinado del uso de recubrimientos activos (alginato+vainillina) y procesamiento a altas presiones aún no ha sido estudiado. Así, el objetivo de este capítulo fue evaluar la aplicación combinada de recubrimientos activos y HPP sobre cubos de manzana listos para consumir. Se analizó el efecto de la combinación de estas dos barreras sobre la supervivencia de *Escherichia coli* CECT 515 y *Listeria monocytogenes* CECT 4032 inoculadas, y sobre la microflora nativa de los cubos de manzana, estudiada mediante la población de bacterias aerobias mesófilas. Adicionalmente, se determinaron los principales parámetros fisicoquímicos, como el color,

la textura y la actividad enzimática y se monitoreó la evolución de los principales compuestos fenólicos durante una digestión gastrointestinal *in vitro*.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Biopolímero formador de recubrimientos y Compuesto bioactivo

Se prepararon recubrimientos a base de alginato de sodio (AS) y el compuesto bioactivo seleccionado fue vainillina (Vai), cuyas características fueron previamente detalladas.

2.2.2 Sustrato vegetal

Se trabajó con manzanas (*Malus domestica* var. Red Delicious) en estado de madurez comercial que fueron adquiridas en un mercado local de Madrid (España). Las frutas se almacenaron bajo refrigeración hasta su procesamiento.

2.2.3 Formulación y aplicación de los recubrimientos

La SFR de alginato de sodio (AS) se preparó con el agregado de glicerol a una concentración del 6 % (m/v) como agente plastificante. Una vez obtenida la SFR base, se incorporó a la misma fibra de manzana (F) en una concentración de 2 %. Por último, se añadió también vainillina (2.5 mg/ml) como compuesto bioactivo antimicrobiano. Para lograr el entrecruzamiento del polímero, por lo tanto, la formación del recubrimiento, se usó una solución de cloruro de calcio al 2 % (m/v) que contenía 1 % (m/v) de ácido ascórbico como agente antioxidante. De este modo se obtuvo la solución de inmersión ASFVai (alginato de sodio+fibra de manzana enriquecido con vainillina) y la solución de entrecruzamiento de cloruro de calcio y ácido ascórbico.

Las operaciones preliminares en las manzanas fueron selección, lavado, pelado y corte. Con el fin de obtener muestras recubiertas con alginato de sodio y fibra de manzana enriquecido con vainillina (ASFVai), los cubos de manzana recién cortados se sumergieron en la SFR de alginato durante 2 min. El exceso de solución se dejó escurrir durante 1 min, y luego los cubos se sumergieron nuevamente en la solución de Cl_2Ca durante 2 min. Como muestra control (C) se utilizaron cubos de manzana no recubiertos, que fueron sumergidos en la solución de cloruro de calcio y ácido ascórbico (sin la aplicación de recubrimiento) durante 2 min. Finalmente, las muestras se secaron durante 30 min a temperatura ambiente en una cabina de bioseguridad. Una parte de las muestras tratadas se

envasó (porciones de 50 g) para su posterior tratamiento con HPP en bolsas plásticas resistentes a altas presiones (BB4L, Cryovac, España) y se almacenaron a 4 °C y en oscuridad hasta el procesamiento a altas presiones. El resto de las muestras no destinadas a la aplicación de HPP fueron utilizadas para las determinaciones inmediatamente después de la aplicación de los recubrimientos.

2.2.4 *Procesamiento con altas presiones*

El procesamiento con altas presiones (HPP) se llevó a cabo en un equipo Iso-Lab (modelo FPG7100:9/2C, Inglaterra) en un recipiente de 1950 ml de capacidad y empleando agua como medio de transmisión/compresión. La unidad opera a una presión máxima de 800 MPa y a una temperatura máxima de 70 °C. La velocidad de compresión fue de 180 MPa/min y la descompresión fue instantánea. Debido a la compresión adiabática, la temperatura máxima en el recipiente fue de 35 °C a 400 MPa con un tiempo de retención de 5 min. Las variables de procesamiento establecidas para este estudio en 400 MPa/5 min/35 °C fueron seleccionadas en base a un estudio previo realizado sobre manzanas con cáscara de la variedad Golden Delicious, en el cual la aplicación de estas condiciones de tratamiento logró mantener los principales compuestos fenólicos (flavan-3-ols, ácidos hidroxicinámicos y dihidrochalconas) e incluso aumentaron la extracción de flavonoles (Fernández-Jalao *et al.*, 2019). Tanto la presión como el tiempo y la temperatura fueron monitoreados y registrados durante el proceso mediante *software*. La tecnología de HPP se aplicó en lotes de tres bolsas de 50 g por ciclo. Las muestras sometidas a HPP fueron codificadas como C-HPP y ASFVai-HPP.

2.2.5 *Efecto de los tratamientos combinados sobre la calidad microbiológica y la supervivencia de E. coli CECT 515 y L. monocytogenes CECT 4032*

- Microorganismos patógenos y preparación de inóculos

El efecto la aplicación de HPP sobre la inocuidad de los cubos de manzana se evaluó utilizando *Escherichia coli* CECT 515 y *Listeria monocytogenes* CECT 4032 como microorganismos patógenos. Previo a su utilización en el ensayo, los microorganismos se activaron y repicaron dos veces para obtener células en fase de crecimiento estacionaria.

- Inoculación de las muestras y aplicación de los recubrimientos activos

En este capítulo la inoculación se llevó a cabo por tratamientos de inmersión de los cubos de manzana durante 2 min en cultivos de *Escherichia coli* CECT 515 y *Listeria monocytogenes* CECT 4032 (con una carga aproximada de 7 - 8 log UFC/ml). Las muestras inoculadas se secaron en una cámara de bioseguridad durante 30 min. Luego, una porción de los cubos de manzana inoculados con cada microorganismo fue recubierto con alginato+fibra de manzana y vainillina (ASFVai), siguiendo la metodología empleada en la sección 2.5. La otra porción de las muestras se utilizó como muestras control sin recubrimiento (C). Las muestras destinadas a la aplicación de HPP se envasaron en lotes de 50 g en bolsas plásticas de material resistente a altas presiones (BB4L, Cryovac, España) para su posterior procesamiento.

- Análisis microbiológicos

Paralelamente al estudio del efecto sobre microorganismos patógenos, también se evaluó el efecto de la combinación de barreras sobre la microflora nativa de los cubos de manzana, analizando las bacterias aerobias mesófilas (MES) en cubos de manzana sin recubrir y sin HPP (C), y luego del tratamiento HPP en muestras con y sin recubrimiento activo (C-HPP, ASFVai-HPP). Para todas las poblaciones microbianas estudiadas (MES, *Escherichia coli* CECT 515 y *Listeria monocytogenes* CECT 4032), los recuentos de los cubos de manzana control sin HPP (C) se realizaron inmediatamente después del procesamiento (pelado, corte, inoculación en muestras con patógenos). En cambio, las muestras sometidas al tratamiento con HPP (C-HPP y ASFVai-HPP, tanto muestras sin inocular como las inoculadas con cada microorganismo patógeno) fueron almacenadas a 5 °C durante 24 h previamente a la enumeración. Esto se realizó con el objetivo de permitir que las células dañadas (pero que se hubieran mantenido viables) lleven adelante los procesos de reparación (si fueran capaces) antes de la enumeración, y no sobreestimar la efectividad del tratamiento. En condiciones favorables, la mayoría de las células estresadas se repara en un rango de 2 a 4 horas (Syed *et al.*, 2016). La enumeración de MES se realizó en el medio PCA (Cultimed). Las condiciones de incubación fueron 30 ± 2 °C durante 72 ± 2 h. La enumeración de *Escherichia coli* CECT 515 y *Listeria monocytogenes* CECT 4032 se realizó en MUG Plus Cromogenic Agar (Microkit) y ALOA® (Biomerieux), respectivamente. Las condiciones de incubación fueron 37 ± 2 °C durante 24 ± 2 h y 37 ± 2 °C durante 48 ± 2 h, respectivamente. Los recuentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como log UFC/g.

2.2.6 Determinación de color y firmeza

El color superficial de los cubos de manzana sometidos a los diferentes tratamientos se determinó utilizando un colorímetro Hunter Lab (modelo M25-9, EEUU), evaluando diez cubos de manzanas, correspondientes a dos contenedores para cada tratamiento ($n = 10$). La firmeza de las muestras, definida como la fuerza máxima requerida para penetrar en 1 cm un cubo de manzana, se determinó mediante una prueba de compresión (velocidad de 5 mm/s) utilizando un texturómetro marca TA.HDPlus (Stable Micro Systems, Inglaterra) equipado con una celda de carga de 30 kg y una sonda cilíndrica de 11 mm de diámetro (P/11). Para las determinaciones de textura se usaron diez cubos de manzanas, correspondientes a dos contenedores para cada tratamiento ($n = 10$). Los resultados del análisis de firmeza se expresaron en N/cm^2 .

2.2.7 Actividad enzimática de polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (POD)

- Extracción de enzimas

Para la evaluación de la actividad enzimática de los cubos de manzana con y sin recubrimiento, antes y después de la aplicación de HPP, las muestras fueron previamente liofilizadas en un equipo marca Telstar S.A. (modelo Lyoalfa, España). La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 4300 Pro UV/Visible) siguiendo la metodología propuesta por Marszałek *et al.* (2018), con ligeras modificaciones. Brevemente, los extractos enzimáticos se obtuvieron mezclando 1.5 g de producto liofilizado con 50 ml de *buffer* fosfato 0.05 M a pH 5.5 (con 1 % m/v de polivinilpirrolidona) y homogeneizando (Omnimixer ES-270) a 7500 rpm durante 4.5 min en un baño de hielo. Luego, la mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min a 5 °C. Los sobrenadantes se filtraron con gasa y se refrigeraron a 4 °C hasta el análisis.

- Actividad de PPO y POD

Para el ensayo de actividad de la PPO, se mezclaron 2.9 ml de catecol 0.07 M (*buffer* fosfato 0.1 M, pH 6.5) y 0.1 ml de extracto enzimático. Las mediciones se realizaron inmediatamente a 420 nm y a 25 °C, obteniendo el registro cada 12 segundos durante 10 min. La actividad de la POD se determinó mezclando 2.6 ml de tampón fosfato 0.1 M (pH 6.5), 0.1 ml de peróxido de hidrógeno al 1.5 % (v/v), 0.2 ml de parafenilendiamina al 1 % (m/v) y 0.1 ml de extracto enzimático. Las mediciones se realizaron a 485 nm y 25 °C,

cada 12 segundos durante 10 min. La actividad enzimática se calculó como la variación de absorbancia en un min por g de producto liofilizado. Los resultados se expresaron como actividad enzimática relativa (AER), definida como el porcentaje de actividad residual luego de HPP (C-HPP y ASFVai-HPP), en comparación con la muestra sin HPP, respectivamente (C y ASFVai). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.2.8 Digestión gastrointestinal *in vitro*

Los cubos de manzana fueron sometidos a una digestión gastrointestinal (DGI) *in vitro*, siguiendo la metodología propuesta por Minekus *et al.* (2014), con el objetivo de simular los cambios que experimentan los compuestos fenólicos presentes en el alimento en su pasaje por el sistema digestivo.

- Fase oral (FO)

El proceso de digestión comienza en la boca, cuando los alimentos son masticados luego de la ingesta. En esta fase la trituración alcanzada por medio de la masticación del alimento es fundamental, ya que reduce el tamaño de partícula y facilita el acceso de las enzimas digestivas a los nutrientes contenidos en la matriz. Para simular la masticación, 10 g de producto, 7 ml de jugo de saliva ($\text{pH } 7 \pm 0.2$) y 1 ml de solución de α -amilasa (1500 U/ml) se trituraron con un masticador manual durante 2 min a 37 °C en ausencia de luz. Esta fase fue detenida enfriando las muestras en un baño de hielo durante 10 min, para detener la actividad de la α -amilasa.

- Fase gástrica (FG)

Luego de la fase oral, las muestras de cada tratamiento se mezclaron con 15 ml de jugo gástrico ($\text{pH } 3 \pm 0.2$) y 3.2 ml de solución de pepsina (25067 U/ml). El pH se ajustó (3 ± 0.2) con HCl 6 M. Para simular las condiciones estomacales, el oxígeno fue barrido con nitrógeno gaseoso. En esta etapa, las muestras se mantuvieron durante 2 h en un baño termostatzado a 37 °C bajo agitación magnética y en oscuridad. Para finalizar esta etapa, se detuvo la actividad de la pepsina enfriando las muestras en un baño de hielo durante 10 min.

- Fase intestinal (FI)

Por último, a las muestras provenientes de la FG se les añadieron 22 ml de jugo intestinal ($\text{pH } 7 \pm 0.2$), 5 ml de sales biliares y 10 ml de solución pancreática (800 U/ml de

tripsina). El pH se ajustó a 7 ± 0.2 con NaOH 1 M y el oxígeno se excluyó con nitrógeno gaseoso como se explicó anteriormente. Las muestras de la FI se mantuvieron durante 2 h en un baño termostatzado a 37 °C bajo agitación magnética y en oscuridad. La actividad de la tripsina se detuvo enfriando las muestras en un baño de hielo durante 10 min.

Al final de cada etapa, se separó una alícuota y el pH se ajustó a 2 con el objetivo de asegurar la inactivación enzimática y estabilizar los compuestos fenólicos. Las muestras digeridas y separadas en cada etapa se almacenaron a -20 °C hasta su extracción y análisis.

2.2.9 *Análisis de compuestos fenólicos y propiedades antioxidantes*

- Extracción de compuestos antioxidantes

Las muestras correspondientes a muestras no digeridas (ND) fueron extraídas procesando 10 g de cubos de manzana con 12.5 ml de una solución acuosa de metanol (80:20 v/v) con un masticador manual (utilizado en la FO), durante 2 min. Luego, esta mezcla fue centrifugada a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes se separaron y el pellet fue sometido a una segunda extracción bajo las mismas condiciones. Los dos sobrenadantes se combinaron y concentraron utilizando un rotaevaporador equipado con un sistema de vacío a -40 °C hasta obtener un volumen final de aproximadamente 2 ml. Por último, los extractos fueron filtrados con una membrana de 0.45 µm antes de su utilización para los análisis.

Por otra parte, las alícuotas separadas en FO (15 ml), FG (25 ml) y FI (45 ml) fueron extraídas con 10, 15 y 20 ml de la solución acuosa de metanol (80:20 v/v), respectivamente, bajo agitación magnética durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, los extractos se centrifugaron durante 10 min a 12000 rpm y 4 °C, se separaron los sobrenadantes y se concentraron con un rotaevaporador bajo vacío a 40 °C hasta obtener un volumen final de aproximadamente 2 ml. En el último paso los extractos fueron filtrados con una membrana de 0.45 µm.

- Análisis de compuestos fenólicos por HPLC

La separación, identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de cubos de manzana se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución utilizando un HPLC Agilent serie 1100 (Agilent Technologies, Alemania) acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD) (G1315B). Para la separación de los compuestos se utilizó una columna de fase reversa de acero inoxidable C18 Hypersil ODS

(250 mm × 4.6 mm, 5 µm) (Teknokroma, España). La fase móvil consistió en ácido fórmico al 0.1 % (v/v) en agua Milli-Q (A) y acetonitrilo (B). La identificación y cuantificación de cada compuesto se realizó por comparación con curvas de calibración estándares de quercetina, quercetina-3-glucósido, quercetina-3-diglucósido e isorhamnetina-3-glucósido (de 0.4 a 550 µg/ml), ácido clorogénico (de 40 a 700 µg/ml), ácido p-cumarico (de 0.1 a 50 µg/ml), procianidina (de 0.3 a 33 µg/ml), catequina (de 0.5 a 7 µg/ml), epicatequina (de 0.8 a 200 µg/ml), epigallocatequina (de 10 a 1000 µg/ml), y floridzina (de 2 a 16 µg/ml). El monitoreo de los compuestos fenólicos se realizó a 280 nm para el caso de los flavan-3-ols y las dihidrochalconas, a 360 nm para la detección y cuantificación de flavonoides y a 320 nm para los ácidos hidroxicinámicos. Las muestras se corrieron por triplicado. Los resultados se expresaron en mg/100 g de producto fresco (PF).

- Contenido de fenoles totales por Folin-Ciocalteu

El contenido de fenoles totales (CFT) se cuantificó en cada etapa de la DGI de acuerdo con la metodología descrita por González-Peña *et al.* (2013). Brevemente, se mezclaron 0.2 ml de cada extracto apropiadamente diluido con 2 ml de reactivo Folin Ciocalteu (diluido con agua 1:4). La mezcla se agitó en vortex y se dejó reposar durante 5 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Luego, se añadieron 0.8 ml de solución saturada de Na₂CO₃ y la mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalizado el período de incubación, se colocaron 0.3 ml de cada muestra en un pocillo de microplaca por triplicado. La absorbancia se midió a 760 nm en un lector de microplacas espectrofotométrico (Asys UVM 340, Reino Unido). La cuantificación del CFT se realizó utilizando una curva estándar de ácido gálico. Los resultados se expresaron en mg EAG/100 g PF. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

- Capacidad antioxidante por DPPH

La capacidad antioxidante de las muestras se determinó utilizando el método de radical libre DPPH (Sigma-Aldrich, EEUU), de acuerdo con la metodología informada por González-Peña *et al.* (2013). Para esto, 0.01 ml de extracto de cada muestra diluida apropiadamente y 0.39 ml de radical DPPH (previamente ajustado a 0.7 con metanol, medido a 515 nm) se colocaron en un pocillo de microplaca (volumen final de 0.3 ml). La mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. La absorbancia de las muestras se midió a 515 nm con un lector de microplacas espectrofotométrico. Los

resultaron se compararon con una curva estándar de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox). La capacidad antioxidante se expresó como mg ET/100 g FP. Las mediciones se realizaron por cuadruplicado.

2.2.10 *Análisis estadístico*

Este estudio se realizó en base a un diseño completamente aleatorizado. Cada determinación se realizó al menos por duplicado en dos ensayos experimentales independientes. Los resultados informados se presentan como valores medios acompañados de sus desviaciones estándar. El ANOVA se realizó para estimar diferencias significativas entre tratamientos y las medias se compararon usando la prueba de LSD con un nivel de confianza del 95 %. El análisis de los datos se realizó con el software InfoStat (v2015) (Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina).

2.3 **Resultados y discusión**

2.3.1 *Efectos del tratamiento HPP sobre la calidad microbiológica de cubos de manzana y patógenos inoculados*

El procesamiento con altas presiones (HPP) es una tecnología utilizada en frutas y hortalizas para inactivar o controlar la proliferación microbiana a la vez que se mantienen las principales características de calidad de estos productos, a diferencia de lo que ocurre con el procesamiento térmico (Gopal, 2017). Esta tecnología ha sido aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés *Food and Drug Administration*), la Agencia de Salud Pública de Canadá (*Health Canada*) y otros agentes de regulación federales para su uso como tecnología para el control de patógenos en frutas listas para consumir y jugos, entre otras categorías de alimentos (carnes, frutos de mar y mariscos listos para consumir, salsas y ensaladas). Sin embargo, el sistema HACCP de la FDA establece que para que el procesamiento a altas presiones se considere efectivo, el mismo debe alcanzar una reducción de al menos 5 log en el recuento de microorganismos patógenos. Para algunos patógenos resistentes como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* O157:H7, el procesamiento a altas presiones aplicado como tratamiento individual no resulta efectivo en la medida estipulada por la reglamentación (Syed *et al.*, 2016), siendo necesario utilizar la tecnología de obstáculos para lograr la inactivación requerida.

Tabla 2.1. Efecto de los tratamientos sobre las poblaciones de bacterias aerobias mesófilas (MES), *E. coli* CECT 515 y *L. monocytogenes* CECT 4032 (log UFC/g) de cubos de manzana listos para consumir.

Tratamiento	Población microbiana (log UFC/g)		
	MES	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
C	2.37 ± 0.32	7.97 ± 0.07 ^a	7.24 ± 0.23
C-HPP	< 2.00*	6.02 ± 0.17 ^b	< 2.00*
ASFVai-HPP	< 2.00*	2.61 ± 0.28 ^c	< 2.00*

C: control sin recubrimiento; C-HPP: control sin recubiertos sin HPP; ASFVai: cubos de manzana recubiertos con alginato+fibra de manzana+vainillina con HPP. Los resultados se muestran como valores medio ± la desviación estándar. Para cada población microbiana, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

*Recuentos por debajo del límite de detección del método.

Como se muestra en la Tabla 2.1, la aplicación de HPP de manera individual o combinada con el uso de recubrimientos activos causó reducciones significativas ($p < 0.05$) en los recuentos para todas las poblaciones microbianas estudiadas. La población de MES cuantificada tanto en la muestra C-HPP, como en la muestra tratada con la combinación de barreras (ASFVai-HPP) se mostró por debajo del límite de detección del método (< 2.00 log). Con respecto a *L. monocytogenes* CECT 4032, los recuentos presentados inicialmente en C (7.24 log UFC/g) exhibieron reducciones superiores a los 5 log UFC/g luego del procesamiento con altas presiones, independientemente de la aplicación o no del recubrimiento activo. Por otro lado, *Escherichia coli* CECT 515 resultó el microorganismo más resistente. Aunque se obtuvo una reducción significativa ($p < 0.05$) en C-HPP (de aproximadamente 2.00 log) en los recuentos de este patógeno, en el caso de cubos de manzana con recubrimiento activo (ASFVai-HPP) se alcanzaron más de 5 reducciones logarítmicas debido al efecto sinérgico de la tecnología de obstáculos.

Dependiendo de la presión aplicada, los tratamientos con altas presiones actúan alterando la estructura celular y sus funciones fisiológicas, rompiendo las cadenas de ADN y la integridad de la membrana celular, inactivando enzimas, desnaturalizando proteínas irreversiblemente y alterando la selectividad de la membrana (Houška y Da Silva, 2017). De este modo, la aplicación de presión en niveles superiores a 300 MPa causa un daño irreversible en las células microbianas por diferentes mecanismos, entre ellos, la fuga de componentes intracelulares al medio circundante, conduciendo a la muerte celular (Gopal, 2017). Además del daño celular causado por el HPP, vainillina ejerce actividad antimicrobiana al alterar las funciones de la membrana, disipar los gradientes de iones e inhibir los procesos de respiración bacteriana (Fitzgerald *et al.*, 2004). Así, el daño celular

causado por la acción combinada de los recubrimientos activos con vainillina y HPP es el resultado de un efecto sinérgico, logrando reducciones mayores que las obtenidas con la aplicación individual de HPP. Ritz *et al.* (2001) aplicaron altas presiones (en el rango de los 200 a 400 MPa/10 min/20 °C) sobre un cultivo de *L. monocytogenes* (con una carga inicial de aproximadamente 8 log UFC/ml). Los autores informaron que por debajo de 300 MPa no se observaron reducciones significativas en el recuento del patógeno, pero cuando la presión se incrementó a 400 MPa, la inactivación fue completa. Esta inactivación podría estar asociada a daños en la superficie celular y la pérdida de integridad de la membrana en la mayoría de las células. En cuanto a las características fisiológicas de las células, la mayoría de ellas presentó una disminución en la actividad metabólica y en el potencial de membrana. Con respecto a los efectos de HPP sobre *Escherichia coli* CECT 515, además de la permeabilización de la membrana externa causada generalmente en bacterias gram negativas, otros componentes y sistemas celulares son especialmente sensibles a la presión en esta especie en particular, como los ribosomas y el plegamiento de proteínas y la disposición de proteínas mal plegadas. Por otro lado, se informó que la inactivación de bacterias por HPP es menos efectiva cuando se aplica en sistemas alimentarios, en comparación con la aplicación sobre agua o soluciones *buffer*. En este sentido, Torres *et al.* (2016) informaron que la aplicación de 400 MPa durante 3 min a 25 °C fue suficiente para reducir en 6.5 log el recuento inicial de *E. coli* O157:H7 inoculada en jugo de naranja. Con respecto al efecto sobre la microflora nativa, Fernandez *et al.* (2019) estudiaron la aplicación de 630 MPa durante 6 min a 20 °C sobre un *smoothy* de frutas y hortalizas, encontrando que luego del tratamiento HPP, tanto las bacterias aerobias mesófilas como las enterobacterias, los mohos y levaduras y las bacterias del ácido láctico se encontraron por debajo de límite de detección del método (< 1.00 log UFC/ml).

2.3.2 Firmeza y color de cubos de manzana tratados con HPP

La Figura 2.1 presenta los resultados obtenidos para los parámetros de firmeza y color de los cubos de manzana sometidos a diferentes tratamientos.

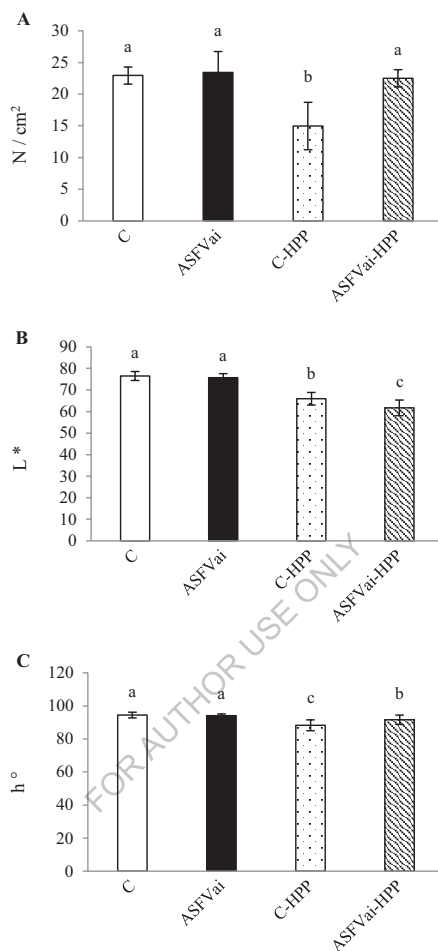


Figura 2.1. Firmeza (A), luminosidad (B) y ángulo de tono (C) de cubos de manzana antes y después del tratamiento HPP.

C: control no recubierto; ASFVai: cubos de manzana recubiertos con alginato+fibra de manzana+vainillina; C-HPP: control no recubierto, tratado con HPP; ASFVai: cubos de manzana recubiertos con alginato+fibra de manzana+vainillina con HPP. Los resultados se muestran como valores medio (n = 10). Las barras indican la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05) entre tratamientos.

Inicialmente, los cubos de manzana C y ASFVai no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para el atributo de firmeza. Luego de la aplicación de 400 MPa durante 5 min a 35 °C, la firmeza de C-HPP fue significativamente ($p < 0.05$) más baja que la de C (muestra control sin recubrimiento activo). Contrariamente, el parámetro de firmeza de los cubos de manzana ASFVai-HPP no se vio afectado por el procesamiento con altas presiones. El tratamiento con HPP conlleva a un colapso debido a la eliminación de la fase gaseosa en los poros de la matriz por efecto de la presión aplicada, dando como resultado un ablandamiento de los tejidos (Vatankhah y Ramaswamy, 2019). En el caso de muestras ASFVai-HPP, el recubrimiento activo podría haber llenado estos poros, manteniendo la integridad tisular inicial. Otros autores han estudiado el efecto del procesamiento a altas presiones sobre la textura de manzana mínimamente procesada. Vatankhah y Ramaswamy (2019) informaron mejoras en el parámetro de firmeza de cubos de manzana cuando éstos fueron tratados con 100 MPa durante 20 min en diferentes soluciones de impregnación de quitosano, en comparación con los cubos sometidos a un tratamiento de HPP convencional, e incluso cuando se comparó con la firmeza original de muestras frescas. Por el contrario, George *et al.* (2016) observaron una disminución en la firmeza de rodajas de manzana cuando las muestras se trataron a 50, 150, 250 o 350 MPa durante 10 min en una infusión de sacarosa y jarabe de kokum. Además, Xu *et al.* (2016) estudiaron el efecto de 300 y 400 MPa durante 5 y 10 min sobre la firmeza de manzana recién cortada, encontrando pérdidas del 36, 45, 45 y 41 % en muestras tratadas con 300 MPa/5 min, 300 MPa/10 min, 400 MPa/5 min y 400 MPa/10 min, respectivamente. En otra investigación, Perera *et al.* (2010) analizaron cubos de manzana de las variedades Granny Smith y Pink Lady tratados en jugo de ananá con 600 MPa durante 1 - 5 min a 22 °C. Sólo la textura de la variedad Granny Smith fue afectada por el procesamiento a altas presiones. Estos autores informaron que las muestras tratadas durante 1 min y sin jugo de ananá fueron las más deterioradas en este parámetro, mientras que la mayor retención de firmeza se observó en muestras tratadas sin jugo de ananá durante 5 min (el mayor tiempo estudiado).

Respecto a los atributos cromáticos, la aplicación del recubrimiento activo no afectó la luminosidad (L^*) de los cubos de manzana. Sin embargo, luego del tratamiento con HPP se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) en el valor L^* independientemente de la aplicación del recubrimiento (C-HPP y ASFVai-HPP). De manera similar, no se observaron diferencias ($p > 0.05$) entre C y ASFVai (sin HPP) en el parámetro h° . Además,

la aplicación de HPP redujo significativamente ($p < 0.05$) el parámetro h° de ambas muestras. Como se mencionó previamente, esta disminución observada en los valores de h° indica un oscurecimiento de los cubos de manzana. Este hecho podría estar relacionado con la actividad residual de las enzimas PPO y POD, responsables de la oxidación de los compuestos fenólicos a *o*-quinonas, lo que es detectado visualmente como pardeamiento. Notablemente, el parámetro h° en las muestras tratadas con la combinación de obstáculos (ASFVai-HPP) resultó menos afectado ($p < 0.05$) que el h° de las muestras tratadas con la aplicación individual de altas presiones (C-HPP). Se observa un efecto protector ejercido por la vainillina sobre los atributos de color, en donde se encontraron mejoras tanto en L^* como en h° cuando los cubos de manzana fueron tratados con recubrimiento de gelano+fibra de manzana y vainillina durante el almacenamiento refrigerado, en comparación con muestras no recubiertas e incluso al compararlos con muestras recubiertas con gelano+fibra de manzana y geraniol. De acuerdo los resultados aquí expuestos, Abid *et al.* (2014) informaron que el tratamiento con 350 y 450 MPa durante 10 min a temperatura ambiente redujo significativamente los parámetros L^* y h° de jugo de manzana, en comparación con la muestra control (no tratada). Contrariamente, Landl *et al.* (2010) observaron que la aplicación de 400 y 600 MPa durante 5 min a 20 °C no afectó significativamente ninguno de los parámetros cromáticos (L^* , a^* , b^*), cuando estudiaron un producto a base de puré de manzana.

2.3.3 Actividad enzimática de cubos de manzana

Uno de los problemas principales en la industria del procesamiento mínimo es el rápido deterioro del producto frutihortícola debido a la aparición de pardeamiento enzimático Persic *et al.* (2017). En este sentido, el procesamiento a altas presiones mejora ciertas características de calidad y garantiza la inocuidad de este tipo de productos durante su vida útil, sin embargo también podría propiciar el desarrollo de pardeamiento enzimático (Martínez-Hernández *et al.*, 2019). Así, la industria alimentaria combina el uso de HPP con otros métodos de preservación, con el objetivo de reducir o evitar la activación enzimática (Landl *et al.*, 2010). En este ensayo se evaluó el efecto de la aplicación combinada de recubrimientos activos y HPP sobre la actividad enzimática de los cubos de manzana. Los resultados indicaron una activación de la PPO y POD en el producto debido al tratamiento con HPP, independientemente de la presencia o no del recubrimiento activo (datos no mostrados). Las muestras C-HPP y ASFVai-HPP exhibieron un 103 % y 109.2 % de

actividad enzimática relativa (AER) en el caso de la POD. Adicionalmente, las muestras correspondientes a C-HPP y ASFVai-HPP también presentaron 104.7 % y 142.3 % de AER para la PPO. Estos resultados confirmaron el hecho de que los compuestos fenólicos de la manzana se oxidan principalmente por la acción de la polifenoloxidasas y, en menor medida, por la peroxidasa (Persic *et al.*, 2017). De manera llamativa, en este trabajo la activación de PPO en ASFVai-HPP fue mayor que en C-HPP. Como fue discutido previamente la aplicación de recubrimientos con vainillina sobre los cubos de manzana mejoró los atributos de color en el almacenamiento y también retrasó el desarrollo de pardeamiento enzimático, según los datos obtenidos de la evaluación sensorial. De este modo, la activación de la POD y la PPO se relaciona con los cambios de color discutidos en la sección anterior, dado que la disminución de los valores de h° se atribuyó principalmente a la activación de los mecanismos enzimáticos por HPP. En este sentido, la activación enzimática observada en las muestras C-HPP y ASFVai-HPP podría relacionarse a cambios en las interacciones entre los componentes del extracto así como a la liberación de enzimas unidas a la matriz como resultado de la aplicación de HPP (Huang *et al.*, 2013). Se han conducido varias investigaciones en el intento de disminuir o inactivar la actividad de las enzimas en productos a base de manzana sometidos a HPP, resultando en su mayoría efectivos cuando se emplearon temperaturas superiores a 50 °C (Bayindirli *et al.*, 2006; Buckow *et al.*, 2009; Valdramidis *et al.*, 2009). En el caso particular de los cubos de manzana, la temperatura de procesamiento debe ser baja para minimizar cambios indeseables en el sabor y la textura. Teniendo en cuenta este hecho, otros autores han estudiado la aplicación de altas presiones en combinación con otras tecnologías frías como el ultrasonido, el procesamiento del producto embebido en jugos de otras frutas, el uso de agentes antipardeamiento, ciclodextrinas, entre otros, logrando un menor desarrollo de pardeamiento enzimático (Abid *et al.*, 2014; George *et al.*, 2016; Martínez-Hernández *et al.*, 2019).

2.3.4 Análisis de compuestos fenólicos por HPLC

En este estudio, del total de los compuestos fenólicos identificados y cuantificados los ácidos hidroxycinámicos representaron el 29.5 %, los flavan-3-ols el 69.3 % y las dihidrochalconas el 1.2 %. Estos valores son consistentes con los informados por otros autores para manzana sin cáscara de cultivares rojos.

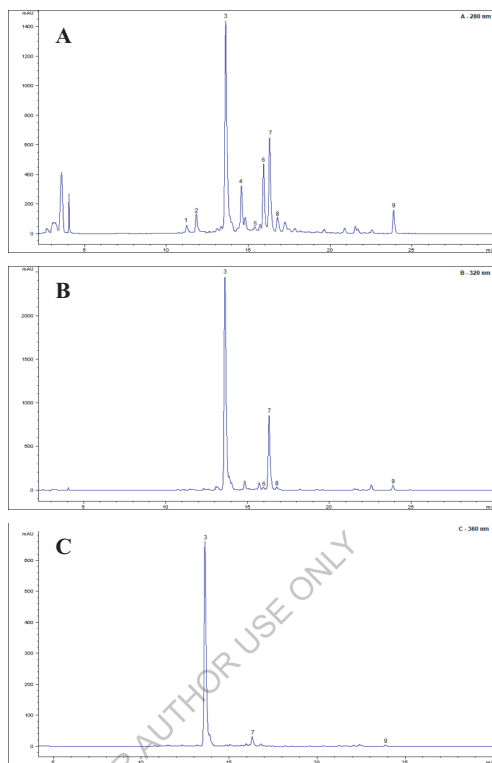


Figura 2.2. Cromatogramas obtenidos a partir de extractos de cubos de manzana en el ensayo por HPCL, registrados a 280 nm (A), 320 nm (B), 360 nm (C).

Picos: (1) procianidina B1, (2) epigallocatequina, (3) ácido clorogénico, (4) procianidina B2, (5) dímero I de epicatequina, (6) epicatequina, (7) ácido p-cumaroilquínico, (8) dímero II de epicatequina, (9) floridzina.

La Tabla 2.2 expone resultados obtenidos de la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos presentes en los cubos de manzana antes y después de la aplicación de HPP, así como también los cambios observados en estos componentes como resultado del proceso de DGI. Para la mayoría de los compuestos, el procesamiento de los cubos de manzana con altas presiones causó una disminución en la concentración de los compuestos bioactivos. En general, podría esperarse una liberación de compuestos fenólicos debido a la ruptura celular causada por la aplicación de HPP. Sin embargo, también es posible que esta descompartmentalización celular ponga en contacto las enzimas citoplasmáticas responsables de las reacciones de pardeamiento enzimático y sus respectivos sustratos fenólicos, resultando este efecto oxidativo mayor que la liberación de compuestos fenólicos unidos a las células de la matriz (He *et al.*, 2016). Contrariamente, la aplicación de las mismas condiciones de HPP ensayadas en el presente estudio (400 MPa/5 min/35 °C) sobre trozos de manzana Golden Delicious con cáscara mantuvo la concentración inicial de ácidos hidroxicinámicos, flavan-3-ols, y dihidrochalconas (Fernández-Jalao *et al.*, 2019). Estos resultados confirman que el efecto de la tecnología de HPP es altamente dependiente de características de la matriz vegetal, como por ejemplo de los diferentes cultivares de manzana.

Tabla 2.2. Identificación y cuantificación de los principales compuestos fenólicos (mg/100 g PF) de cubos de manzana listos para consumir.

Concentración (mg/100 g de producto fresco)						
Familia	Compuesto	Fase de la DGI	C	C-HPP	ASFVai	ASFVai-HPP
<i>Ácidos hidroxicinámicos</i>	Ácido clorogénico	ND	9.71 ± 0.46 ^{Aa}	4.12 ± 0.89 ^{ABc}	4.40 ± 1.72 ^{ABb}	2.21 ± 0.37 ^{Ac}
		FO	7.85 ± 1.66 ^{Ca}	1.57 ± 0.06 ^{Cc}	5.38 ± 0.20 ^{Ab}	1.60 ± 0.28 ^{Bc}
		FG	8.29 ± 1.66 ^{Ba}	3.17 ± 0.50 ^{Bbc}	3.48 ± 0.41 ^{Bb}	2.25 ± 0.54 ^{Ac}
		FI	3.56 ± 0.78 ^{Db}	0.41 ± 0.13 ^{De}	3.33 ± 0.48 ^{Ba}	0.01 ± 0.00 ^{Cd}
	Ácido p-cumaroilquínico	ND	0.80 ± 0.01 ^{Aa}	0.34 ± 0.01 ^{Bb}	0.32 ± 0.06 ^{Bb}	0.16 ± 0.01 ^{Ac}
		FO	0.65 ± 0.19 ^{Ba}	0.28 ± 0.03 ^{Cb}	0.33 ± 0.02 ^{ABb}	0.16 ± 0.01 ^{Ac}
		FG	0.62 ± 0.12 ^{Ba}	0.37 ± 0.01 ^{Ab}	0.43 ± 0.06 ^{Ab}	0.20 ± 0.03 ^{Ac}
		FI	0.35 ± 0.02 ^{Cb}	0.25 ± 0.02 ^{De}	0.40 ± 0.04 ^{Aa}	0.14 ± 0.04 ^{Ad}
	Procianidina B1	ND	1.14 ± 0.14 ^{Ca}	0.76 ± 0.15 ^{Cb}	0.51 ± 0.16 ^{Cc}	0.15 ± 0.05 ^{Cd}
		FO	1.05 ± 0.45 ^{Ca}	0.67 ± 0.10 ^{Cb}	0.58 ± 0.07 ^{Cb}	0.16 ± 0.04 ^{Cc}
		FG	7.09 ± 0.31 ^{Bb}	8.50 ± 0.11 ^{Ba}	6.46 ± 1.40 ^{Bc}	5.24 ± 0.69 ^{Bc}
		FI	11.54 ± 1.47 ^{Ab}	15.32 ± 0.42 ^{Aa}	16.07 ± 2.04 ^{Aa}	8.44 ± 1.04 ^{Ac}
<i>Flavan-3-ols</i>	Epigallocatequina	ND	10.25 ± 0.54 ^{Aa}	4.38 ± 0.86 ^{Bb}	5.46 ± 0.63 ^{Cb}	4.46 ± 1.11 ^{Bb}
		FO	10.20 ± 1.17 ^{Ab}	2.14 ± 0.47 ^{Cd}	13.96 ± 0.92 ^{Aa}	4.90 ± 0.37 ^{Bc}
		FG	10.91 ± 1.07 ^{Aa}	7.09 ± 1.15 ^{Ab}	10.87 ± 1.98 ^{Ba}	7.33 ± 1.09 ^{Ab}
		FI	7.20 ± 1.17 ^{Bb}	4.37 ± 0.78 ^{Bc}	11.24 ± 0.07 ^{Ba}	7.02 ± 0.72 ^{Ab}
	Procianidina B2	ND	5.52 ± 0.70 ^{Aa}	2.36 ± 0.37 ^{Cbc}	3.29 ± 1.47 ^{Ab}	1.50 ± 0.61 ^{ABc}
		FO	4.36 ± 0.55 ^{Ba}	1.27 ± 0.27 ^{Db}	3.50 ± 0.38 ^{Aa}	1.20 ± 0.48 ^{ABb}
		FG	4.48 ± 0.43 ^{Ba}	3.82 ± 0.51 ^{Ab}	3.70 ± 0.28 ^{Ab}	1.47 ± 0.15 ^{Ac}
		FI	3.14 ± 0.27 ^{Ca}	2.79 ± 0.76 ^{Ba}	3.11 ± 0.93 ^{Aa}	0.75 ± 0.07 ^{Bb}

Tabla 2.2 (cont.). Identificación y cuantificación de los principales compuestos fenólicos (mg/100 g PF) de cubos de manzana listos para consumir.

Familia	Compuesto	Fase de la DGI	Concentración (mg/100 g de producto fresco)			
			C	C-HPP	ASFVai	ASFVai-HPP
Flavan-3-ols	Epicatequina	ND	5.85 ± 0.43 ^{Aa}	2.27 ± 0.20 ^{Bbc}	2.72 ± 1.08 ^{ABb}	1.05 ± 0.33 ^{Ac}
		FO	4.09 ± 1.38 ^{Ba}	1.30 ± 0.19 ^{Cb}	3.40 ± 0.25 ^{Aa}	0.90 ± 0.33 ^{Ab}
		FG	4.31 ± 0.82 ^{Ba}	3.15 ± 0.66 ^{Ab}	3.21 ± 0.27 ^{ABb}	0.96 ± 0.27 ^{Ac}
		FI	2.26 ± 0.66 ^{Ca}	1.71 ± 0.21 ^{BCab}	2.15 ± 0.49 ^{Ba}	1.20 ± 0.01 ^{Ab}
	Dímero I de epicatequina	ND	0.24 ± 0.08 ^{Aa}	0.19 ± 0.05 ^{Aa}	0.25 ± 0.15 ^{Aa}	0.09 ± 0.04 ^{Aa}
		FO	0.23 ± 0.06 ^{Aa}	0.10 ± 0.02 ^{Bb}	0.10 ± 0.01 ^{ABb}	0.08 ± 0.03 ^{Ab}
		FG	0.19 ± 0.05 ^{ABa}	0.22 ± 0.05 ^{Aa}	0.05 ± 0.01 ^{Bb}	0.08 ± 0.02 ^{Ab}
		FI	0.13 ± 0.02 ^{Bb}	0.27 ± 0.03 ^{Aa}	0.16 ± 0.06 ^{ABb}	nd
	Dímero II de epicatequina	ND	1.64 ± 0.20 ^{Aa}	1.00 ± 0.20 ^{Bb}	0.70 ± 0.21 ^{Ab}	0.36 ± 0.10 ^{ABc}
		FO	1.42 ± 0.23 ^{Aa}	0.48 ± 0.11 ^{Cc}	0.75 ± 0.11 ^{Ab}	0.26 ± 0.13 ^{Bd}
		FG	1.54 ± 0.29 ^{ABa}	1.36 ± 0.12 ^{Ab}	0.31 ± 0.06 ^{Bc}	0.51 ± 0.14 ^{Ac}
		FI	0.35 ± 0.09 ^{Bc}	0.96 ± 0.14 ^{Ba}	0.71 ± 0.25 ^{Ab}	nd
Dihydrochalconas	Floridzina	ND	0.42 ± 0.00 ^{Aa}	0.13 ± 0.02 ^{Bc}	0.23 ± 0.11 ^{Bb}	0.06 ± 0.00 ^{Cc}
		FO	0.32 ± 0.05 ^{Ba}	0.11 ± 0.02 ^{Bc}	0.30 ± 0.02 ^{ABb}	0.09 ± 0.00 ^{Bc}
		FG	0.40 ± 0.04 ^{Aa}	0.17 ± 0.01 ^{Ab}	0.36 ± 0.05 ^{Aa}	0.11 ± 0.00 ^{Ac}
		FI	0.21 ± 0.04 ^{Ca}	0.16 ± 0.04 ^{ABb}	0.23 ± 0.05 ^{Ba}	0.07 ± 0.01 ^{Bc}

C: control sin recubrimiento; ASFVai: cubos de manzana recubiertos con alginato-fibra de manzana+vanilina; C-HPP: control no recubierto, tratado con HPP; ASFVai: cubos de manzana recubiertos con alginato+fibra de manzana+vanilina con HPP. ND: no digerido; FO: fase oral; FG: fase gástrica; FI: fase intestinal. Los resultados se muestran como el valor promedio de tres determinaciones ± la desviación estándar. Para cada compuesto, letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre fases para un mismo tratamiento. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos para la misma fase de la DGI.

nd: no detectado

En primer lugar, no se identificaron flavonoles en los cubos de manzana. Este grupo de compuestos está presente principalmente en la cáscara de manzana (Jakobek *et al.*, 2013), y como se informó en la metodología el producto fue sometido a una etapa de pelado previo a su procesamiento. Esto se debe a que aunque la pulpa de manzana contenga menos compuestos fenólicos en comparación con la cáscara, muchos consumidores prefieren la manzana pelada (Chen *et al.*, 2012). Con respecto a los ácidos hidroxicinámicos, los ácidos clorogénico y p-cumaroilquínico mostraron una concentración inicial significativamente menor ($p < 0.05$) en muestras ASFVai que en muestras sin recubrimiento activo (C). Esta diferencia que se observó dependiendo de la presencia o ausencia del recubrimiento activo podría explicarse por la metodología de recubrimiento empleada. En las muestras C, los cubos de manzana recién cortados fueron sumergidos inmediatamente en la solución de Cl_2Ca que contenía ácido ascórbico como agente antipardeante. En cambio, las muestras ASFVai se sumergieron primero en el recubrimiento de alginato y luego en la solución de cloruro de calcio y ácido ascórbico, para lograr el entrecruzamiento del biopolímero. En este sentido, Alarcón-Flores *et al.* (2015) también informaron una menor concentración de compuestos fenólicos totales en muestras de manzana recién cortada en comparación con muestras frescas sin procesar, y atribuyeron esta diferencia principalmente al contenido de ácido clorogénico. Con respecto al efecto de la aplicación de HPP sobre la concentración de ácidos hidroxicinámicos, tanto C-HPP como ASFVai-HPP presentaron concentraciones significativamente más bajas ($p < 0.05$) de ácido clorogénico y p-cumaroilquínico, en comparación con C y ASFVai.

La Tabla 2.2 muestra los cambios en la concentración de los principales compuestos fenólicos inducidos por la DGI. A través de la simulación de las etapas de la digestión (FO, FG y FI), los ácidos hidroxicinámicos presentaron una disminución en la concentración para todas las muestras. Sin embargo, en las muestras recubiertas (ASFVai) y en las muestras tratadas con la combinación de barreras (ASFVai-HPP), el ácido p-cumaroilquínico resistió el pasaje a través de las diferentes fases de digestión sin cambios significativos ($p < 0.05$) en su concentración. En la FG todas las muestras exhibieron los mayores valores de concentración de ácidos hidroxicinámicos. Las subsecuentes disminuciones observadas en muestras provenientes de la FI podrían ser causadas por reacciones de isomerización entre los ácidos neoclorogénico y clorogénico (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007). El ácido clorogénico, incluidos sus isómeros neoclorogénico y

criptoclorogénico, se recuperó casi por completo en la fase gástrica (84 - 109 %), aunque durante la fase intestinal los porcentajes de recuperación fueron más bajos (31.6 – 56.5 %).

Con respecto a los flavan-3-ols, en este trabajo se identificaron y cuantificaron seis compuestos principales en los cubos de manzana: procianidina B1, epigallocatequina, procianidina B2, epicatequina, dímero I de epicatequina y dímero II de epicatequina. La procianidina B1 fue el único compuesto que aumentó abruptamente su concentración a partir de la FG y en adelante. Por lo tanto, para C y ASFVai, la concentración de procianidina B1 aumentó aproximadamente 10 y 31 veces su concentración inicial desde ND (1.14 y 0.51 mg/100 g) a FI (11.54 y 16.07 mg/100 g), respectivamente. Por otra parte, las muestras tratadas con HPP mantuvieron este comportamiento y, adicionalmente, la concentración de procianidina B1 en C-HPP fue 1.3 veces mayor en comparación con C después de la FI, lo que indica una mayor capacidad de extracción debido a la aplicación de HPP. Este aumento de algunos flavonoides a lo largo de la DGI fue previamente informado por otros autores (Fernández-Jalao *et al.*, 2017; Herranz *et al.*, 2019; Thomas-Valdés *et al.*, 2019). La alta resistencia mostrada por estos compuestos a las condiciones simuladas de la DGI (pH, enzimas) y la hidrólisis de proteínas y carbohidratos unidos mejoran su extracción de la matriz alimentaria. Por otro lado, la concentración de procianidina B2 disminuyó significativamente ($p < 0.05$) a lo largo de las diferentes fases de la DGI para muestras C. Sin embargo, tanto C-HPP como ASFVai y ASFVai-HPP fueron capaces de mantener las concentraciones de procianidina B2 bastante estables. La epigallocatequina fue el compuesto identificado y cuantificado en mayor concentración en los cubos de manzana. Mientras que para las muestras C y C-HPP la epigallocatequina disminuyó a medida que la DGI avanzó, para ASFVai y ASFVai-HPP la concentración aumentó significativamente ($p < 0.05$). Por su parte, el tratamiento con HPP causó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la concentración de epicatequina tanto para C-HPP como para ASFVai-HPP. Esto podría estar relacionado con el hecho de que este compuesto es degradado por la PPO (Son *et al.*, 2001; Keenan *et al.*, 2011). Por último, la epicatequina y sus dímeros (I y II) disminuyeron a lo largo de las fases de la DGI para muestras C. Además, no se detectó ninguno de los dímeros de epicatequina en la fase FI en muestras ASFVai-HPP.

La floridzina fue el único compuesto de la familia de los dihidrochalconas identificado y cuantificado. Como sucedió para la mayoría de los compuestos, luego de la aplicación de HPP la concentración de floridzina fue significativamente menor. Las muestras no

recubiertas (C) disminuyeron su concentración de floridzina a través de la DGI. Para las muestras C-HPP y ASFVai, esta concentración se mantuvo sin cambios significativos ($p < 0.05$). Además, la muestra ASFVai-HPP presentó un aumento en la concentración de floridzina desde entre las etapas ND a FI, con la mayor concentración en la FG. Por último, a pesar de que la aplicación de altas presiones causó una reducción inicial (en muestras ND), el monitoreo a través de la DGI reveló que las muestras C-HPP y ASFVai-HPP presentaron mayor liberación de floridzina que C y ASFVai.

En la última fase de la digestión (FI), la procianidina B1 y la epigallocatequina fueron los compuestos fenólicos mayoritarios en los 4 tratamientos estudiados, presentando las muestras ASFVai las mayores concentraciones.

2.3.5 Compuestos fenólicos determinados por Folin-Ciocalteu

Los resultados obtenidos del monitoreo del CFT de los cubos de manzana antes y después de la aplicación de HPP y su evolución a través de las diferentes fases de la DGI se presentan en la Figura 2.3. La muestra no recubierta (C) presentó los valores de CFT más altos, aunque la aplicación de HPP redujo significativamente ($p < 0.05$) el CFT de la misma. Sin embargo, por medio del ensayo con el reactivo de Folin-Ciocalteu no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la concentración de compuestos fenólicos entre muestras ASFVai y ASFVai-HPP. Esta disimilitud con respecto a los resultados obtenidos en el análisis por HPLC podría ser atribuida al modo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual se basa en el principio de capacidad reductora. En este sentido, muchos compuestos no fenólicos podrían también estar implicados en esta reacción. Con respecto a la DGI, en general todos los tratamientos exhibieron un comportamiento similar, con un aumento significativo ($p < 0.05$) en el CFT durante la FG, lo que representa una liberación de compuestos con capacidad reductora.

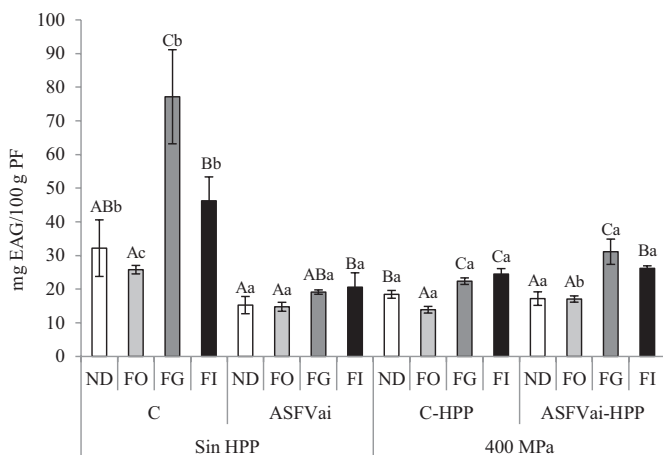


Figura 2.3. Contenido de fenoles totales en muestras de cubos de manzana sometidos a una digestión gastrointestinal, antes y después del tratamiento HPP.

C: control sin recubrimiento; ASFVai: cubos de manzana recubiertos con alginato+fibra de manzana+vainillina; C-HPP: control no recubierto, tratado con HPP; ASFVai: cubos de manzana recubiertos con alginato+fibra de manzana+vainillina con HPP. ND: no digerido; FO: fase oral; FG: fase gástrica; FI: fase intestinal. Los resultados se muestran como el valor medio de dos determinaciones independientes realizadas por cuadruplicado. Las barras indican la desviación estándar. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) dentro del mismo tratamiento entre las diferentes fases de la DGI. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la misma fase de la DGI entre tratamientos.

De acuerdo con los resultados aquí expuestos, Herranz *et al.* (2019) informaron que la aplicación de 400 MPa a 25 °C por 5 min sobre trozos de manzana causó una disminución significativa del 14 % en el contenido fenólico total. Además, He *et al.* (2016) encontraron una disminución del 28.5 % en el CFT inicial de jugo de manzana cuando sometieron el producto a un procesamiento con 250 MPa durante 10 min, en comparación con las muestras control para muestras sin digerir. En las fases posteriores de la digestión, las muestras de jugo de manzana tratadas con HPP mostraron resultados similares a los presentados en este capítulo, con un ligero aumento en la concentración de fenoles totales luego de la FG y una disminución en dicho contenido finalizada la FI. Adicionalmente, Tagliazucchi *et al.* (2010) informaron cierta degradación de los compuestos fenólicos presentes en uvas durante la incubación en las condiciones intestinales alcalinas cuando las frutas fueron sometidas a una digestión gastrointestinal *in vitro*. Contrariamente, Landl *et al.* (2010) aplicaron 600 y 400 MPa durante 5 min a 20 °C sobre un producto de puré de manzana de la variedad Granny Smith e informaron una pérdida del 25 % del contenido

fenólico total con la presión más alta aplicada (600 MPa), mientras que no observaron cambios significativos cuando aplicaron la más baja (400 MPa). Estas diferencias con respecto a los resultados expuestos en este capítulo podrían atribuirse a diferencias en la matriz alimentaria como consecuencia de los diferentes orígenes geográficos, variedades y procesamiento previo al que son sometidas las manzanas, así como también a las diferentes condiciones seleccionadas para el procesamiento con altas presiones (presión, temperatura, tiempo).

2.3.6 *Capacidad antioxidante de cubos de manzana*

Inicialmente, a pesar de la presencia del recubrimiento activo, las muestras tratadas con ASFVai presentaron actividad antioxidante más baja que las muestras control sin tratamiento C (Figura 2.4). Esto es consistente con el menor CFT informado para muestras ASFVai en el apartado anterior. Con respecto a la capacidad antioxidante de los cubos de manzana, el procesamiento con HPP causó un aumento inicial (ND) de la capacidad antioxidante en muestras ASFVai-HPP, mientras que no se observaron diferencias significativas entre muestras C y C-HPP. Adicionalmente, a través de la DGI tanto muestras C como C-HPP no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre fases. Por otro lado, ASFVai y ASFVai-HPP exhibieron un aumento significativo ($p < 0.05$) de la capacidad antioxidante en la fase FG. De cualquier manera, finalizada la fase FI ninguno de los tratamientos mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellos.

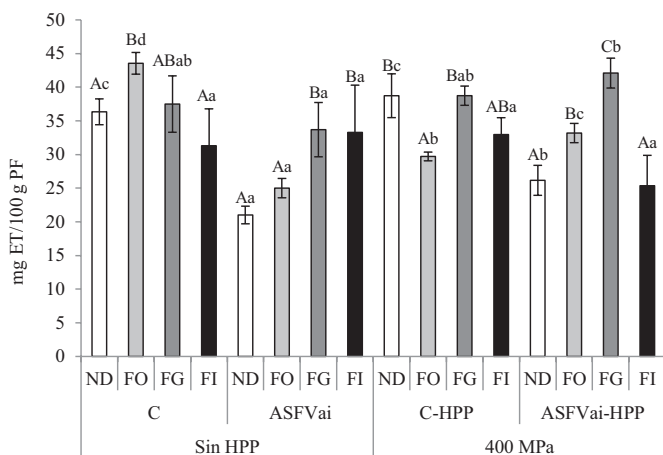


Figura 2.4. Capacidad antioxidante en muestras de cubos de manzana sometidos a una digestión gastrointestinal, antes y después del tratamiento HPP.

C: control sin recubrimiento; ASFVai: cubos de manzana recubiertos con alginato+fibra de manzana+vainillina; C-HPP: control no recubierto, tratado con HPP; ASFVai: cubos de manzana recubiertos con alginato+fibra de manzana+vainillina con HPP. ND: no digerido; FO: fase oral; FG: fase gástrica; FI: fase intestinal. Los resultados se muestran como el valor medio de dos determinaciones independientes realizadas por cuadruplicado. Las barras indican la desviación estándar. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) dentro del mismo tratamiento entre las diferentes fases de la DGI. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la misma fase de la DGI entre tratamientos.

De acuerdo con los resultados aquí presentados, Wootton-Beard *et al.* (2011) también observaron un ligero incremento en la capacidad antioxidante determinada por el ensayo DPPH luego de la etapa gástrica y una disminución luego de la fase intestinal, cuando sometieron un jugo de vegetales comercial a una DGI *in vitro*. Con respecto a la aplicación de altas presiones, Fernández-Jalao *et al.* (2019) estudiaron el efecto de HPP sobre manzanas de la variedad Golden Delicious procedentes de dos regiones diferentes de Europa. Estos autores no informaron diferencias en la capacidad antioxidante medida por el ensayo con DPPH entre las manzanas control y las tratadas con 400 MPa a 35 °C durante 5 min para manzanas de origen italiano, mientras que, para manzanas de origen español, el mismo tratamiento redujo significativamente la capacidad antioxidante. Estas diferencias indican que tanto la concentración de compuestos fenólicos como la capacidad

antioxidante de las manzanas varían según los cultivares y sus orígenes geográficos (Alarcón-Flores *et al.*, 2015; Mihailović *et al.*, 2018).

2.4 Conclusiones

En este trabajo se estudió la calidad microbiológica, así como también parámetros fisicoquímicos y la evolución de los principales compuestos bioactivos de cubos de manzana listos para consumir antes y después de la aplicación combinada de recubrimientos activos y altas presiones. En términos de inocuidad, la tecnología de obstáculos, representada por la combinación de HPP y el recubrimiento activo mostró un efecto sinérgico que logró más de 5.00 log UFC/g de reducción en los recuentos de *E. coli* CECT 515 y *L. monocytogenes* CECT 4032 inoculados en los cubos de manzana, lo que permite de este modo considerar el tratamiento como efectivo. Respecto a las características fisicoquímicas, la aplicación de recubrimientos activos de alginato+fibra de manzana enriquecidos con vainillina preservó el parámetro de firmeza de los cubos de manzana luego de la aplicación de HPP. Por otro lado, aunque el color de los cubos se vio afectado luego del procesamiento con HPP tanto en muestras con o sin recubrimiento activo, la aplicación de alginato enriquecido con vainillina preservó en mayor medida el parámetro h°. Luego de la aplicación de HPP, el análisis por HPLC reveló concentraciones menores en los principales compuestos fenólicos para todas las muestras, hecho relacionado con la activación enzimática (PPO y POD) por la aplicación de HPP. En general, la concentración de compuestos fenólicos mostró una disminución durante el desarrollo de las distintas etapas de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Considerando estos resultados, la aplicación combinada de recubrimientos de alginato+fibra de manzana y enriquecidos con vainillina sobre cubos de manzana sometidos a 400 MPa durante 5 min a 35 °C podría ser una alternativa para garantizar la inocuidad y preservar la mayor parte de los atributos de calidad global de los cubos de manzana listos para consumir. De todas maneras, resulta necesario que la investigación continúe ensayando otras variedades de manzana más adecuada y/o condiciones de HPP para alcanzar la inactivación enzimática y, lograr retener concentraciones mayores de compuestos bioactivos.

Parte 3: Recubrimientos de alginato en cubos de manzana como vehículo para lactobacilos y bifidobacterias probióticos: viabilidad probiótica y calidad global del producto funcional

3.1. Introducción

Como ha sido mencionado anteriormente, actualmente los consumidores se encuentran cada vez más interesados en el papel activo que tienen los alimentos en su bienestar y la prolongación de su vida, en relación con la prevención del inicio, promoción y desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (Granato *et al.*, 2010; Panghal *et al.*, 2018). En los últimos años, se ha dirigido especial atención al uso de alimentos funcionales como una estrategia importante para prevenir y ayudar a revertir los trastornos intestinales agudos y crónicos. Un enfoque posible es proponer la adición en alimentos de microorganismos vivos (probióticos), tanto en productos lácteos como no lácteos. Los probióticos generalmente se vehiculizan a través de leches fermentadas, productos lácteos o farmacéuticos (Tripathi y Giri, 2014). Sin embargo, el aumento de la población que presenta intolerancia a la lactosa y los nuevos estilos de vida (vegano y vegetariano) justifican un mayor interés por los alimentos probióticos no lácteos, incentivando la investigación de otras matrices como frutas (manzana, melón, pera, mamón, maracuyá y ensaladas de frutas) como portadores de bacterias y levaduras con características probióticas, con un especial enfoque en la viabilidad de los cultivos probióticos y en los atributos sensoriales del producto (Nikolaou *et al.*, 2019; Speranza *et al.*, 2018).

Además, es sabido que para ser efectivos los probióticos deben permanecer viables y estables durante el procesamiento del alimento y bajo las condiciones de almacenamiento a las que serán sometidos. Más aún, el sitio de acción de los microorganismos probióticos es el intestino, siendo la ingesta oral la vía más común para su administración (Cassani *et al.*, 2020). Sin embargo, en su pasaje hacia el intestino las bacterias se enfrentan a un entorno desfavorable, representado por el tracto gastrointestinal (con características de pH bajo, presencia de jugos digestivos). La matriz alimentaria, la exposición al pH ácido del estómago y la presencia de jugos digestivos (bilis, enzimas digestivas) representan un

desafío que estos microorganismos deben superar para llegar de manera segura al intestino (Quintana *et al.*, 2017), demostrando así la importancia de evaluar la estabilidad y la supervivencia de los probióticos utilizando fluidos digestivos simulados. En el caso particular de los productos probióticos formulados a base de frutas, esto resulta aún más complejo que para productos lácteos tradicionales debido principalmente al desafío que suponen algunas características intrínsecas de estos sustratos, como la alta concentración de ácidos orgánicos y las condiciones de pH bajo (Dias *et al.*, 2018; Furtado Martins *et al.*, 2013). Una estrategia sugerida para superar estos obstáculos, es agregar ingredientes alimenticios no digeribles conocidos como compuestos prebióticos, que sean capaces de ejercer un efecto protector aumentando la viabilidad de las bacterias que pasan por el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, beneficiar la salud humana (Romano *et al.*, 2014).

En un trabajo previo se formuló un alimento funcional no lácteo basado en el uso de recubrimientos comestibles de alginato como portadores de mezclas simbióticas, conformadas por la combinación de microorganismos probióticos y compuestos prebióticos, aplicados sobre arándanos frescos (Bambace *et al.*, 2019). Por medio de esta estrategia fue posible obtener un producto con características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales adecuadas, logrando además que el número de células probióticas viables se mantenga en un nivel potencialmente adecuado para ejercer efectos benéficos a la salud del consumidor. De este modo, en este trabajo se evaluó el nivel de supervivencia de los probióticos simulando el pasaje por una digestión gastrointestinal. Por lo tanto, se propuso evaluar la potencialidad de cubos de manzana tratados con recubrimientos comestibles de alginato como portadores de una mezcla de inulina y oligofructosa (compuestos prebióticos) y *L. rhamnosus* CECT 8361 o *B. lactis* CECT 8145, como un nuevo alimento funcional probiótico. Se estudió la evolución de las poblaciones de los probióticos durante 8 días de almacenamiento refrigerado y el efecto de los compuestos prebióticos sobre la supervivencia de los mismos. Adicionalmente, se llevó a cabo la simulación del proceso de digestión gastrointestinal, con el objetivo de conocer la carga de probióticos que sería capaz de alcanzar el intestino y ejercer efecto probiótico, así como la liberación de los compuestos fenólicos de los cubos de manzana en el proceso de digestión. También se evaluaron características de textura, color, y los atributos sensoriales de los cubos de manzana tratados con recubrimientos simbióticos. Por último, se estudiaron los potenciales efectos antagónicos de los probióticos sobre *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 inoculados en esta matriz alimentaria.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1 Biopolímero formador de recubrimientos y Microorganismos probióticos

Para la obtención de los recubrimientos comestibles de alginato de sodio (AS) se utilizó el compuesto cuyas características y proveedores se detallaron previamente.

Se evaluó la aplicación de 2 cepas probióticas *Lactocaseibacillus rhamnosus* CECT 8361 y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CECT 8145.

3.2.2 Compuestos prebióticos

Los compuestos prebióticos utilizados (inulina y oligofructosa) para el enriquecimiento de los recubrimientos activos se detallaron previamente.

3.2.3 Sustrato vegetal y formulación de los recubrimientos funcionales de alginato

Las manzanas (*Malus domestica* var. Red Delicious) en estado de madurez comercial fueron compradas en un mercado local y almacenadas a 5 °C hasta su procesamiento.

Tanto la formulación de la solución formadora de recubrimientos base de alginato de sodio (AS) como también la obtención del recubrimiento prebiótico de alginato (ASP) se llevaron a cabo según la metodología presentada previamente. Además, la obtención los microorganismos probióticos viables, así como su incorporación en los recubrimientos de alginato se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la sección previa, con una ligera modificación. Luego de la activación (48 h) y propagación (24 h) de los cultivos, las células probióticas se cosecharon por centrifugación (9000 rpm durante 15 minutos a 5 °C) y posteriormente se lavaron dos veces con una solución *buffer* fosfato utilizando las mismas condiciones de centrifugación. Siguiendo este protocolo, se prepararon las soluciones correspondientes a los siguientes tratamientos: ASP: alginato+prebióticos, ASR: alginato+*L. rhamnosus*, ASB: alginato+*B. lactis*, ASPR: alginato+prebióticos+*L. rhamnosus*, ASPB: alginato+prebióticos+*B. lactis*. Además de estas SFR, se preparó una solución de Cl_2Ca al 2 % (m/v) y ácido ascórbico al 1 % (m/v) para lograr el entrecruzamiento del polímetro y evitar el desarrollo de pardeamiento enzimático.

3.2.4 Aplicación de los recubrimientos sobre cubos de manzana

Previo a la aplicación de los recubrimientos, las manzanas se sometieron a un pretratamiento que incluyó operaciones de lavado, pelado y corte. Una vez obtenidos los

cubos de manzana, estos fueron tratados con las correspondientes soluciones de alginato. Además, se obtuvieron muestras control no recubiertas (C) sumergiendo los cubos de manzana en la solución antioxidante de cloruro de calcio y ácido ascórbico. El secado de los cubos se llevó a cabo en una cámara de bioseguridad utilizando aire a 25 °C, durante 30 min. Por último, se envasaron muestras de 50 g en recipientes de polipropileno de 200 ml de 0.4 mm de espesor (Cotnyl, Buenos Aires, Argentina) y se cubrieron con una película de poliolefina (PD 960, aire sellado Cryovac, Argentina) con una permeabilidad al O₂ de 7000 ml/m²d y permeabilidad al CO₂ de 20000 ml/m²d, sellándolas con una máquina de termosellado (HL, FS-300, Argentina). Una vez envasadas, las muestras se almacenaron a 5 °C durante 8 días. A cada tiempo de muestreo (día 0 inmediatamente después de los tratamientos y día 8), se retiraron tres recipientes de cada tratamiento y los mismos fueron utilizados para llevar adelante las determinaciones experimentales.



Figura 3.1. Procesamiento de cubos de manzana tratados con recubrimientos funcionales de alginato.

3.2.5 Evaluación de la microflora nativa de cubos de manzana

La microflora nativa se evaluó en muestras de manzana a los días 0 y 8 de almacenamiento mediante la enumeración de bacterias psicrótrofas (PSI) y población de mohos y levaduras (HyM). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, tomando muestras de tres recipientes por tratamiento y tiempo de muestreo. Los resultados se expresaron como log UFC/g.

3.2.6 Análisis de microestructura superficial por microscopía electrónica de barrido

Se realizaron análisis morfológicos de la superficie de los cubos de manzana mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés *Scanning Electronic*

Microscopy) utilizando un microscopio Jeol JSM-6460LV. El sistema usado fue un EDAX Genesis XM4 - Sys 60, equipado con analizador multicanal EDAX (mod EDAM IV), detector de zafiro Si(Li) y ventana de Be ultradelgada, y *software* EDAX Genesis versión 5.11. Debido a las condiciones de operación del equipo (alto vacío para generar y focalizar el haz de electrones con el cual se explora la muestra), las muestras fueron previamente liofilizadas (para retirar la humedad) y metalizadas con una capa homogénea de Au/Pd utilizando una metalizadora (Denton Vacuum Desk II). Este procedimiento tiene como finalidad hacer conductora la superficie de la muestra, evitar la carga eléctrica, minimizar el daño por radiación y aumentar la reflectividad electrónica. Se observaron muestras (correspondientes al día 0) de manzana sin recubrir, muestras de películas de alginato cargadas con probióticos y muestras de cubos de manzana recubiertos con alginato prebiótico+probióticos. Cada muestra se observó en diferentes áreas y con varios aumentos (150 - 7500x).

3.2.7 Digestión gastrointestinal *in vitro*

Con el objetivo de simular el pasaje tanto de los microorganismos probióticos como de los compuestos antioxidantes a través del proceso de digestión humano, se llevó adelante un ensayo *in vitro* de digestión gastrointestinal (DGI). La metodología fue adaptada de la indicada por Quintana *et al.* (2017) y Cassani *et al.* (2018). Este estudio contempló dos etapas de digestión: gástrica e intestinal.

- Fase gástrica (FG)

En primer lugar, se trituraron 3 g de muestra durante 1 minuto con un triturador manual. La muestra triturada se mezcló con jugo gástrico y solución de pepsina (3200 unidades/ml de pepsina porcina, Cl_2Ca 7.2 mM, NaCl 98 mM, 13.6 mM KCl, KH_2PO_4 0.82 mM, pH 2.5) en tubos de 50 ml. Luego, el pH se ajustó a 2 - 2.5 con HCl 1 M. La FG se simuló en un agitador orbital durante 1.5 h a 37 °C. Para concluir esta etapa y detener la actividad de la enzima responsable, el pH de la mezcla se ajustó a 6 - 6.5 con NaOH 0.1 M, preparando la muestra para la siguiente etapa.

- Fase intestinal (FI)

A continuación, se agregaron sales biliares y solución pancreática (0.1 % m/v de pancreatina, 0.15 % m/v de sales biliares bovinas, NaCl 22 mM, KCl 3.2 mM, NaHCO_3

7.6 mM, pH 8) y se incubó nuevamente a 37 °C durante 1.5 h con agitación magnética continua. Luego de la FI, las muestras fueron inmediatamente enfriadas en un baño de hielo para detener la acción de las enzimas actuantes.

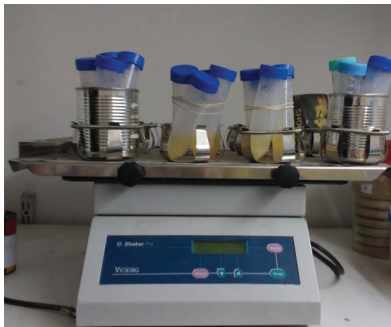


Figura 3.2. Sistema empleado para la digestión de muestras de manzana tratadas con recubrimientos funcionales de alginato.

Al final de cada etapa, se tomaron muestras para evaluar el efecto de la digestión sobre la supervivencia de probióticos y el comportamiento de los compuestos antioxidantes.

3.2.8 Monitoreo de la viabilidad de *L. rhamnosus* y *B. lactis* en cubos de manzana

La enumeración de cada microorganismo probiótico se realizó en los días 0 y 8 de almacenamiento para muestras frescas no digeridas (ND) y muestras tomadas luego de cada etapa de digestión (FG y FI), con el objetivo de cuantificar la población remanente de *L. rhamnosus* y *B. lactis* que sería capaz de superar este proceso y alcanzar el intestino delgado. Las determinaciones se realizaron por duplicado para cada contenedor muestreado y cada muestra digerida. Los resultados se expresaron como log UFC/g.

3.2.9 Análisis de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales se determinaron en las muestras de manzana (C, ASP, ASPR y ASPB) antes y después de cada etapa de la DGI, y también a los 0 y 8 días de almacenamiento refrigerado.

- Extracción de compuestos antioxidantes

Para obtener los extractos de muestras no digeridas (ND), una porción de 4 g de manzana se homogeneizó durante 2 minutos con 20 ml de etanol al 80 % (v/v). Luego, la mezcla se trató con ultrasonido a 40 kHz durante 30 minutos y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se separó y se filtró usando papel de filtro Whatman #1. Las muestras digeridas obtenidas de cada etapa de digestión (FG, FI) se utilizaron directamente (sin realizar una extracción química previa) para las determinaciones de antioxidantes.

- Contenido de fenoles totales (CFT)

El análisis de CFT se realizó de acuerdo a la metodología descrita previamente. Los resultados de CFT se expresaron como mg EAG/100 g PF en cada fase. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada fase y en cada experimento.

- Capacidad antioxidante determinada por DPPH

El potencial antioxidante se evaluó mediante el uso del radical DPPH (Sigma-Aldrich, Argentina). La capacidad antioxidante de muestras de manzana tratadas con diferentes recubrimientos y de cada etapa de digestión se expresó como mg ET/100 g PF. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado en cada experimento.

3.2.10 Determinación de color y firmeza

El color superficial de las muestras se registró siguiendo la metodología previamente descrita. De acuerdo con la metodología, las modificaciones del color fueron evaluadas mediante cambios en la luminosidad (L^*) y el ángulo de tono (h°), utilizando para el análisis quince cubos de manzanas, correspondientes a tres contenedores para cada tratamiento y por día de muestreo ($n = 15$).

Además, la firmeza de las frutas fue determinada con un penetrómetro. Se registró la fuerza máxima requerida para penetrar la fruta y se expresó como N/cm^2 . Las mediciones se realizaron sobre quince frutas, correspondientes a tres contenedores por tratamiento y día de muestreo ($n = 15$).

3.2.11 Análisis sensorial

Se realizó un análisis descriptivo cuantitativo de las muestras C, ASP, ASPR y ASPB con el objetivo de evaluar las características organolépticas de los cubos de manzana

tratados con recubrimientos funcionales. Este análisis se desarrolló con nueve panelistas del Grupo de Ingeniería de Alimentos de la UNMdP (edad entre 25 a 50 años) con experiencia en evaluación de la calidad sensorial de frutas y verduras. Los parámetros evaluados fueron:

- Calidad visual general (OVQ).
- Aroma extraño.
- Sabor extraño.

El análisis sensorial de las muestras se llevó a cabo a los 0 y 8 días de almacenamiento. El límite de aceptabilidad se estableció en el 50 % de la escala (2.5 cm).

3.2.12 Evaluación del potencial antagonico de probióticos frente a *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 en cubos de manzana

- Preparación de los inóculos

Los cultivos *stock* de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 se encontraban congelados a -20 °C. La reactivación de los microorganismos y la preparación de los inóculos se realizaron según la metodología previamente detallada.

- Inoculación de las muestras y aplicación de los recubrimientos de alginato sobre cubos de manzana

Los cubos de manzana recién obtenidos se inocularon mediante pulverización para obtener cargas de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 de aproximadamente 4 – 5 log UFC/g. Las muestras inoculadas se secaron en una cámara de bioseguridad durante 30 minutos y luego se recubrieron aplicando las soluciones de recubrimiento, siguiendo la metodología descrita anteriormente para manzanas no inoculadas, obteniendo de este modo las muestras control sin probióticos denominadas ASPEc y ASPLi, (correspondientes a la SFR de alginato enriquecido con compuestos prebióticos y *E. coli* O157:H7 FP605/03 o *L. innocua* CIP 80.11, respectivamente), y las muestras coinoculadas denominadas ASPREc y ASPBEc (correspondientes a la coinoculación de *E. coli* O157:H7 FP605/03 con *L. rhamnosus* y *B. lactis*, respectivamente) y ASPRLi y ASPBLi (correspondientes a la coinoculación de *L. innocua* CIP 80.11 con *L. rhamnosus* y *B. lactis*, respectivamente).

- Evolución de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 inoculados en cubos de manzana

La siembra y el recuento de ambos microorganismos se realizaron de acuerdo a la metodología informada previamente. Los resultados se expresaron en log UFC/g. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, tomando muestras de tres recipientes por tratamiento y tiempo de muestreo.

3.2.13 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron utilizando un diseño factorial completamente aleatorizado, y los resultados fueron obtenidos en dos ensayos experimentales independientes. El tratamiento de recubrimiento y la fase de digestión se usaron como factores para estudiar el impacto de la digestión gastrointestinal simulada sobre la viabilidad de los probióticos y la evolución de compuestos antioxidantes. El tratamiento de recubrimiento y el tiempo de almacenamiento fueron los factores seleccionados para evaluar el resto de las determinaciones (microflora nativa, color y textura, calidad sensorial y supervivencia de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11). Se realizó un ANOVA y se utilizó la prueba LSD con un nivel de confianza del 95 % para establecer diferencias significativas entre medias. Los resultados se presentaron como valores medios $\pm$ desviación estándar. El análisis de los datos se realizó con el software InfoStat (v2017) (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).

3.3 Resultados y discusión

Tomando el desafío que implica el desarrollo de productos funcionales probióticos no lácteos, en este capítulo se evaluó la potencialidad de un alimento formulado a partir de cubos de manzana recubiertos con alginato, adicionando en el recubrimiento probióticos comerciales (*L. rhamnosus* o *B. lactis*) y compuestos prebióticos (inulina/oligofructosa). Se describen a continuación los resultados obtenidos referidos a parámetros de calidad y seguridad, así como también la recuperación de los microorganismos probióticos luego de simular una DGI.

3.3.1 Calidad microbiológica de cubos de manzana tratados con recubrimientos funcionales de alginato

En este trabajo, se llevó a cabo la evaluación de la microflora nativa de los cubos de manzana con recubrimientos funcionales de alginato mediante el monitoreo de las poblaciones de mohos y levaduras (MyL) y bacterias psicrótrofas (PSI).

Como puede observarse en la Tabla 3.1, la población de PSI presentó recuentos iniciales (día 0) inferiores a 2.70 log UFC/g para todos los tratamientos. Estos recuentos se mantuvieron en niveles bajos en todas las muestras luego de 8 días de almacenamiento refrigerado, sin observarse diferencias ($p < 0.05$) como resultado del uso de recubrimientos funcionales formulados con la combinación de microorganismos probióticos y compuestos prebióticos, en comparación con las muestras control (C, ASP). En líneas generales, los recuentos de MyL se mantuvieron relativamente estables luego de 8 días de almacenamiento refrigerado. La adición de compuestos prebióticos no tuvo efecto sobre los recuentos finales de MyL (día 8), independientemente del tratamiento (muestras con y sin probióticos). Más aún, la incorporación de los microorganismos probióticos en los recubrimientos de alginato (ASR, ASB y ASPB) resultó en recuentos de MyL ligeramente inferiores luego de 8 días en comparación con la muestra control no recubierta (a excepción de las muestras tratadas con ASPR). El proceso de lavado al que fueron sometidos los probióticos en la obtención de las células para adicionar a los recubrimientos, permitió retirar gran parte de las maltodextrinas presentes en los cultivos liofilizados.

Tabla 3.1. Evolución de bacterias psicrótrofas (PSI) y de mohos y levaduras (MyL) en cubos de manzana tratados con recubrimientos de alginato durante 8 días de almacenamiento a 5 °C.

Tratamiento	PSI (log UFC/g)			MyL (log UFC/g)		
	Tiempo (días)			Tiempo (días)		
	0	8		0	8	
C	< 2.70	2.70 ± 0.00	a	4.07 ± 0.22	a,A	4.33 ± 0.89 a,A
ASP	< 2.70	3.01 ± 0.23	a	2.89 ± 0.12	bc,B	3.48 ± 0.00 b,A
ASR	< 2.70	2.70 ± 0.10	a	2.30 ± 0.10	c,B	3.00 ± 0.10 bc,A
ASPR	< 2.70	2.70 ± 0.00	a	3.29 ± 0.17	b,A	3.65 ± 0.07 ab,A
ASB	< 2.70	2.70 ± 0.00	a	3.32 ± 0.52	b,A	3.15 ± 0.21 bc,A
ASPB	< 2.70	2.77 ± 0.11	a	3.00 ± 0.49	bc,A	3.00 ± 0.10 bc,A

C: control sin recubrimiento; ASP: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos, ASR: cubos de manzana recubiertos con alginato+*L. rhamnosus*; ASPR: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos+*L. rhamnosus*; ASB: cubos de manzana recubiertos con alginato+*B. lactis*; ASPB: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos+*B. lactis*. Los resultados se muestran como valores medio ± la desviación estándar. Letras mayúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tiempos de almacenamiento para el mismo tratamiento. Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos a cada tiempo de almacenamiento.

En cuanto a la literatura disponible acerca del potencial efecto antagónico de los probióticos sobre la microflora nativa, Siroli *et al.* (2015) trataron rodajas de manzana con soluciones de *Lacticaseibacillus paracasei* M3B6 o *Lactiplantibacillus plantarum* CIT3, informando que sólo *L. paracasei* M3B6 ejerció un efecto sobre la población de MyL, presentando recuentos 1 ciclo logarítmico menores que el resto de las muestras luego de 16 días de almacenamiento a 6 °C. Además, estos autores también evaluaron el tratamiento de lechuga mínimamente procesada con soluciones de *L. plantarum* V7B3 y *L. casei* V4B4, informando reducciones sobre los recuentos de bacterias mesófilas durante 16 días de almacenamiento a 6 °C. El efecto limitado que presentaron los probióticos frente a la población de MyL podría atribuirse a las características que reúnen las frutas, donde se combina un pH bajo, alto contenido de azúcares y alta relación carbono/nitrógeno, condiciones frente a las cuales el crecimiento de mohos y levaduras es ventajoso respecto al de bacterias ácido lácticas (Patrignani *et al.*, 2013). De todos modos, cabe recordar que las propiedades antagónicas de los probióticos dependen de varios factores, entre los que se

encuentran la interacción con la matriz sobre la que se aplican, la carga de inóculo, el procesamiento al que son sometidas, las características propias de cada cepa probiótica, entre otros. Así, De Oliveira *et al.* (2014) informaron que el tratamiento de rodajas de melón en una solución cargada con *Lactocaseibacillus rhamnosus* HN001 permitió mantener los coliformes fecales por debajo de los límites establecidos por la legislación brasileña después de 5 días de almacenamiento a 15 °C, mientras que muestras sumergidas en una solución control sin probióticos no resultaron aptas para el consumo humano al evaluarlas al cuarto día de almacenamiento bajo las mismas condiciones, mostrando a *L. rhamnosus* HN001 como un agente de biocontrol efectivo para la preservación de melón mínimamente procesado.

3.3.2 Observación de la microestructura superficial mediante microscopía electrónica de barrido

En la Figura 3.3 se presentan los resultados de la exploración superficial de diferentes muestras mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

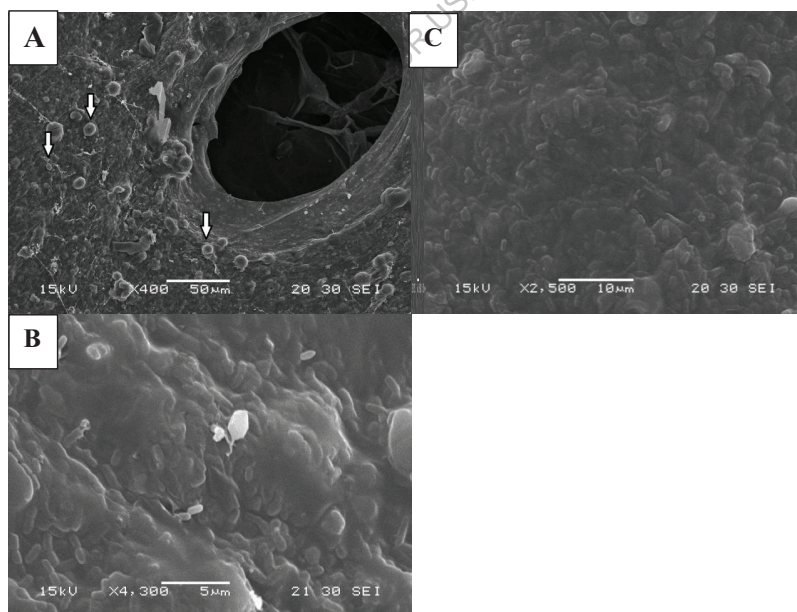


Figura 3.3. Micrografías electrónicas de muestras liofilizadas con y sin probióticos. A: superficie de un cubo de manzana control no recubierto (400x); B: superficie de un cubo de manzana

recubierto con alginato+prebióticos+*B. lactis* (2500x); C: superficie de un cubo de manzana recubierto con alginato+prebióticos+*L. rhamnosus* (4300x).

En la Figura 3.3 (A) se observan las imágenes obtenidas del análisis de SEM para muestras control. Puede observarse la presencia de esporas de hongos (señaladas por flechas) así como también el desarrollo temprano de hifas filamentosas, fácilmente observables con un aumento de 400x. Además, la imagen presenta un poro que da lugar al tejido interno de la manzana, donde puede visualizarse la estructura típica de panal de abejas correspondiente al ordenamiento interno de las células en la matriz vegetal. En este sentido, la porosidad natural revelada por SEM mostró los espacios intercelulares del tejido parenquimatoso de manzana, corroborando la capacidad de dicha estructura para permitir la adhesión del recubrimiento. En la Figura 3.3 (B) y (C) se presentan las imágenes correspondientes a la superficie de cubos de manzana tratados con recubrimientos de alginato prebiótico cargados con *B. lactis* y *L. rhamnosus*, respectivamente. Los probióticos presentaron un tamaño que osciló entre 0.5 μm de diámetro y 2.0 μm de longitud, que resultaron observables a partir de 1600x de aumento. Las micrografías revelaron la presencia de numerosas bacterias en forma de bastón adheridas tanto en la superficie como embebidas en el recubrimiento. En este sentido, la aplicación del recubrimiento comestible sobre los cubos de manzana no modificó los principales aspectos estructurales de la distribución de células probióticas mostrados por el recubrimiento en la Figura 3.3 (B). De este modo, la adición del recubrimiento de alginato dio como resultado la formación de una capa regular y suavizada que incluyó las células. En estas muestras, es notable la mejora obtenida en cuanto a la continuidad del recubrimiento de alginato como resultado del agregado de compuesto prebióticos, evidenciada por la presencia de poros de menor tamaño y textura más fina, mostrando una agregación más compacta con respecto a lo observado en la Figura 3.3 (B). Finalmente, se verifica la adherencia del recubrimiento sobre toda la superficie de las muestras de manera continua, sin observarse las características de la superficie de la manzana mostradas por la Figura 3.3 (A).

3.3.3 Viabilidad de probióticos en cubos de manzana en el almacenamiento refrigerado y durante la DGI

En este trabajo se adoptó como criterio una carga de 6.00 log UFC/g de producto, tomando como base el marco regulatorio argentino (artículo 1389 del Capítulo 17 del CAA) y varios trabajos de investigación (Romano *et al.*, 2014; Russo *et al.*, 2014; Russo *et al.*, 2015; da Costa *et al.*, 2017). Además, se intentó dar un paso más y evaluar el nivel de

microorganismos probióticos que efectivamente es capaz de superar de manera viable el proceso de digestión gastrointestinal, mediante un ensayo *in vitro*. La Figura 3.4 muestra la evolución de *L. rhamnosus* en las etapas de digestión gastrointestinal para cada tiempo evaluado. Inmediatamente después de la aplicación de recubrimientos probióticos (día 0) se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en los recuentos de *L. rhamnosus* causados por la etapa gástrica (FG). Además, la fase intestinal (FI) ocasionó una reducción adicional para los recuentos de *L. rhamnosus* independientemente de la presencia o ausencia de compuestos prebióticos. Luego de 8 días de almacenamiento, la FG nuevamente resultó en una reducción significativa ($p < 0.05$) de la viabilidad, sin embargo, la disminución posterior mostrada para la etapa FI no fue significativa. Con respecto a la evolución de las muestras ASR y ASPR no digeridas, no se observaron reducciones significativas en la viabilidad de los probióticos durante el almacenamiento. Por lo tanto, los cubos de manzana enriquecidos con prebióticos que inicialmente contenían 9.40 log UFC/g de *L. rhamnosus* mantuvieron este nivel de viabilidad transcurridos 8 días de almacenamiento refrigerado a 5 °C (Figura 3.4). De esta manera, al someter el producto a una digestión gastrointestinal *in vitro* se demostró la estabilidad y supervivencia de *L. rhamnosus* en una carga muy superior al límite considerado para ejercer su efecto probiótico.

Adicionalmente, la evolución de la población de *B. lactis* se presenta en la Figura 3.5. Para las muestras ASB y ASPB (Figura 3.5), los recuentos exhibieron una reducción significativa ($p < 0.05$) en la población de *B. lactis* después de la fase gástrica (1.00 - 1.20 log UFC/g). La etapa FI posterior no generó una pérdida significativa de viabilidad en comparación con la observada al final de la FG. La evolución de los recuentos de probióticos en la digestión gastrointestinal fue similar para los días 0 y 8.

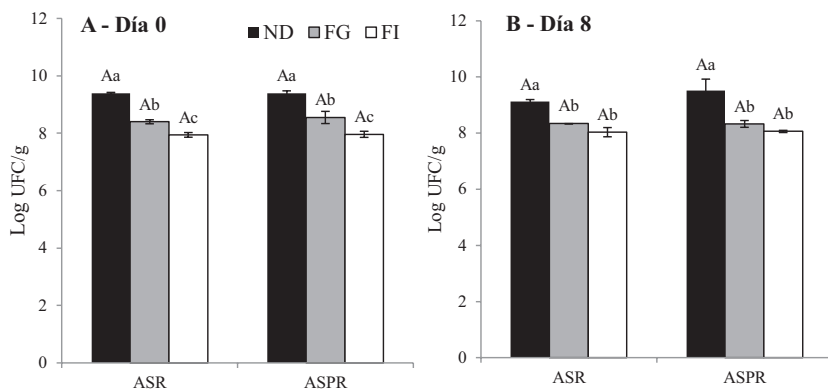


Figura 3.4. Evolución de *L. rhamnosus* en recubrimientos funcionales de alginato aplicados sobre cubos de manzana durante la digestión gastrointestinal en el día 0 (A) y luego de 8 días de almacenamiento refrigerado (B). ASR: alginato+*L. rhamnosus*; ASPR: alginato+prebióticos+*L. rhamnosus*. ND: no digerido; FG: fase gástrica; FI: fase intestinal. Los resultados se muestran como el valor medio de dos mediciones independientes realizadas por duplicado. Las barras indican la desviación estándar. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos para la misma fase de digestión a cada tiempo de muestreo. Letras diferentes minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre fases de digestión para el mismo tratamiento.

De manera similar a lo observado con *L. rhamnosus*, se logró una alta retención de viabilidad para *B. lactis* en muestras no digeridas (ASB y ASPB) sin cambios significativos después de 8 días de almacenamiento.

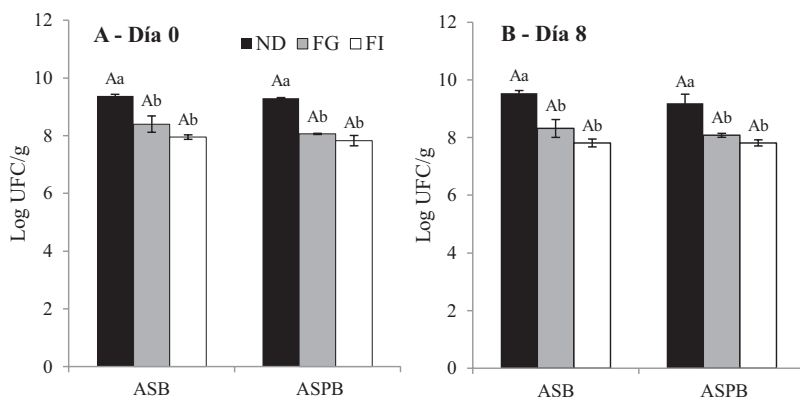


Figura 3.5. Evolución de *B. lactis* en recubrimientos funcionales de alginato aplicados sobre cubos de manzana durante la digestión gastrointestinal en el día 0 (A) y luego de 8 días de almacenamiento refrigerado (B). ASB: alginato+*B. lactis*; ASPB: alginato+prebióticos+*B. lactis*. ND: no digerido; FG: fase gástrica; FI: fase intestinal. Los resultados se muestran como el valor medio de dos mediciones independientes realizadas por duplicado. Las barras indican la desviación estándar. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos para la misma fase de digestión a cada tiempo de muestreo. Letras diferentes minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre fases de digestión para el mismo tratamiento.

De acuerdo con los resultados presentados previamente en las Figuras 3.4 y 3.5 no se observaron pérdidas en la viabilidad de los probióticos después de un período de almacenamiento de 8 días en los cubos de manzana tratados con recubrimientos de alginato, independientemente de la adición o no de la mezcla de inulina y oligofructosa en las soluciones de recubrimiento. En este sentido, no resultó evidente ningún efecto protector por parte de los compuestos prebióticos sobre la viabilidad de los probióticos durante el almacenamiento refrigerado. Al respecto, previamente se discutieron algunos trabajos de investigación disponibles sobre la aplicación de prebióticos y probióticos en frutas y jugos de fruta, confirmando una mejora en la retención de la viabilidad probiótica como resultado de la adición de compuestos prebióticos en ciertos productos como por ejemplo jugo de naranja, jugo de manzana y rodajas de manzana horneada (Krasaekoopt y Watcharapoka, 2014; Pimentel *et al.*, 2015; Tavera-Quiroz *et al.*, 2015). Es sabido que la viabilidad de los probióticos aplicados sobre productos alimenticios está influenciada por variables como la composición de los alimentos, las operaciones llevadas a cabo durante el procesamiento y ciertos parámetros microbiológicos, entre los cuales el nivel de inóculo

inicial resulta un factor clave (Tripathi y Giri, 2014). Con respecto a esto, al trabajar con manzana se consideró un período de almacenamiento más corto (8 días) ya que las operaciones de procesamiento mínimo (pelado y corte) a las que se somete esta matriz la dispone como un alimento más perecedero, limitando su vida útil con respecto a una fruta entera. El hecho de emplear un sustrato diferente (manzana pelada y cortada) para transportar los probióticos afecta la supervivencia de los mismos, al verse influenciados por la matriz portadora (Valero-Cases *et al.*, 2017). Adicionalmente, el nivel inicial de probióticos en los cubos de manzana fue de 9.00 log UFC/g, una dosis ampliamente superior a la utilizada en los arándanos recubiertos. Es posible que las diferencias mencionadas anteriormente dificulten entonces la observación del potencial efecto protector de los compuestos prebióticos sobre la viabilidad de los microorganismos probióticos.

La evaluación *in vitro* de los probióticos en los alimentos se lleva a cabo principalmente mediante la simulación del proceso de digestión gastrointestinal humana. Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos en este capítulo al someter cubos de manzana a dos etapas de digestión simulada (gástrica e intestinal) revelaron que la adición de prebióticos a los recubrimientos de alginato no afectó la retención de la viabilidad de *L. rhamnosus*. Esto significa que aunque los compuestos prebióticos podrían actuar como agentes protectores frente a otras situaciones de estrés, como la deshidratación, la liofilización, o el horneado (Tavera-Quiroz *et al.*, 2015), es posible que en este estudio la protección celular de *L. rhamnosus* y *B. lactis* a través del proceso de digestión esté más relacionada con la presencia de alginato de sodio que con la mezcla de inulina/oligofructosa. Esto fue sugerido por Soukoulis *et al.* (2014), quienes aplicaron dos formulaciones probióticas de alginato adicionado con *L. rhamnosus* GG sobre pan. En ese trabajo, un recubrimiento se formuló sólo con alginato de sodio y el otro se preparó con una mezcla de alginato y concentrado de proteína de suero. Curiosamente, los autores encontraron una mayor retención de la viabilidad de *L. rhamnosus* cuando éste fue vehiculizado en el recubrimiento formulado sólo con alginato, al someter a las muestras de pan a una digestión *in vitro*. Este resultado fue explicado por una complejación de iones de calcio con el biopolímero y la consecuente formación de geles durante la fase gástrica. De este modo, la formación de geles favorecida por el pH de esta fase y los iones de calcio presentes en la solución de pepsina adicionada formaría una masa protectora que encerraría a las células probióticas. Por otro lado, estos autores reportaron que, en el caso de muestras

recubiertas con alginato y proteína de suero, se producirían agregados de partículas autoensambladas debido a las interacciones entre alginato y proteínas de suero a través de fuerzas de atracción electrostática. Estos agregados resultarían en una protección menor para las bacterias probióticas frente a las condiciones gástricas. Resultados similares a los obtenidos con los cubos de manzana fueron informados por Valero-Cases *et al.* (2017), quienes trabajaron con *Lactiplantibacillus plantarum* (LP DSM20205) para fermentar jugos de tomate y de guayaba, sometiéndolos posteriormente a una digestión gastrointestinal. El nivel de inóculo inicial para ambos jugos fue de 6.00 log UFC/ml, sin embargo, luego del proceso de fermentación la carga probiótica aumentó a 8.73 log UFC/ml y 6.78 log UFC/ml para jugo de tomate y guayaba, respectivamente. Con respecto al efecto de la DGI sobre la viabilidad del probiótico, estos autores reportaron que luego de la fase gástrica el recuento de células viables en ambos jugos disminuyó significativamente en comparación con la concentración inicial, aunque estas reducciones resultaron menores a 1.00 log. Finalizada la digestión intestinal, *L. plantarum* presentó recuentos superiores para jugo de tomate (8.33 log UFC/ml y 5.78 log UFC/ml en jugo de tomate y guayaba, respectivamente), confirmando el rol fundamental que tiene la selección de una matriz alimentaria al momento de incluir probióticos en un alimento.

3.3.4 Evolución de compuestos bioactivos durante la digestión gastrointestinal in vitro

Durante la DGI además de evaluar la supervivencia de los microorganismos probióticos también se llevó a cabo el análisis de los compuestos bioactivos presentes en los cubos de manzana determinados a través del CFT y la capacidad antioxidante, inmediatamente después de la aplicación de los recubrimientos y luego de 8 días de almacenamiento a 5 °C. En la Figura 3.6 se muestran los resultados del impacto de los diferentes recubrimientos sobre la capacidad antioxidante de las muestras antes y después de atravesar el proceso de DGI.

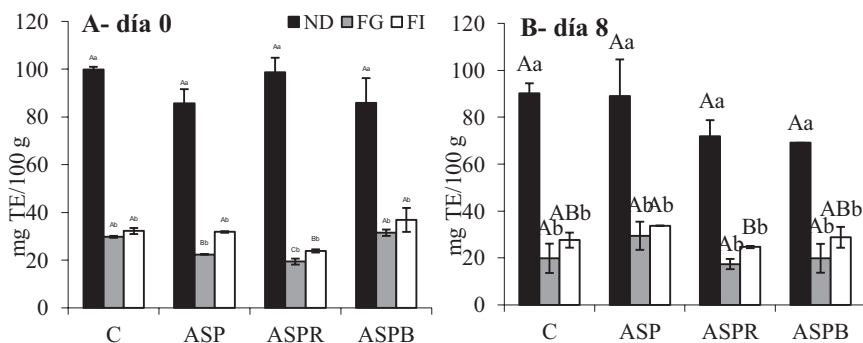


Figura 3.6 Evolución de la capacidad antioxidante de cubos de manzana durante la digestión gastrointestinal en el día 0 (A) y luego de 8 días de almacenamiento refrigerado a 5 °C (B). C: cubos de manzana sin recubrir; ASP: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos; ASPR: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos+*L. rhamnosus*; ASPB: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos+*B. lactis*. ND: no digerido; FG: fase gástrica; FI: fase intestinal. Los resultados se muestran como el valor medio de 2 mediciones independientes realizadas por triplicado. Las barras indican la desviación estándar. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos para la misma fase de digestión. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre fases de digestión para el mismo tratamiento.

De forma general, el efecto de las etapas de digestión sobre la capacidad antioxidante resultó similar para todas las muestras, independientemente del recubrimiento aplicado y el tiempo de muestreo. La mayor actividad antirradicalaria se observó para los extractos etanólicos preparados a partir de muestras no digeridas (ND), y esto resultó así a ambos tiempos de muestreo (0 y 8 días). Inmediatamente después de la aplicación de los recubrimientos (día 0), ninguno de los tratamientos mostró diferencias con respecto al potencial antioxidante de las manzanas recién cortadas (ND). Al finalizar la fase gástrica (FG), se observaron valores entre un 64 y 80 % menores en comparación con las muestras ND (cuya actividad, como se describe en la metodología, se evaluó a partir de muestras extraídas con etanol). Además, finalizada la etapa de digestión intestinal (FI) se observaron incrementos en los valores de capacidad antioxidante en todos los tratamientos con respecto a los obtenidos en la etapa anterior (FG). Por otro lado, la adición de compuestos prebióticos al recubrimiento de alginato (ASP) y su aplicación sobre los cubos de manzana ocasionó una reducción en los valores de capacidad antioxidante de un 25 % luego de la FG, al comparar con los valores de las muestras control sin recubrir en la misma etapa (día

0). Sin embargo, este efecto no se observó luego de la fase intestinal. Con respecto a las muestras tratadas con probióticos, el agregado de *L. rhamnosus* en los recubrimientos de alginato prebiótico (ASPR) resultó en muestras con valores de capacidad antioxidante ligeramente más bajos finalizado el proceso de DGI (día 0), mientras que en muestras que contenían *B. lactis* (ASPB) no se observaron diferencias significativas. Hacia el final del almacenamiento (Figura 3.6 B), tanto ASPR como ASPB no mostraron diferencias en comparación con los controles luego del proceso de DGI.

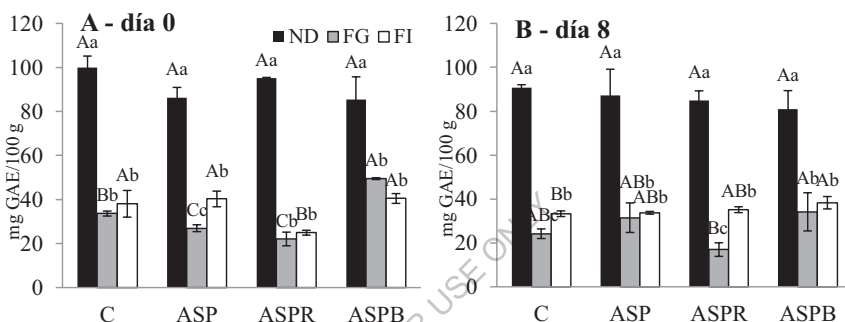


Figura 3.7. Evolución del contenido de fenoles totales en cubos de manzana durante la digestión gastrointestinal en el día 0 (A) y luego de 8 días de almacenamiento refrigerado a 5 °C (B). C: cubos de manzana sin recubrir; ASP: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos; ASPR: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos+*L. rhamnosus*; ASPB: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos+*B. lactis*. ND: no digerido; FG: fase gástrica; FI: fase intestinal. Los resultados se muestran como el valor medio de 2 mediciones independientes realizadas por triplicado. Las barras indican la desviación estándar. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos para la misma fase de digestión. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre fases de digestión para el mismo tratamiento.

Los resultados correspondientes al CFT de los cubos de manzana se presentan en la Figura 3.7. De manera similar a los resultados descriptos para la capacidad antioxidante, no se observaron diferencias ($p > 0.05$) significativas en el CFT entre tratamientos para cubos de manzana previo a la digestión (ND). Al igual que lo ocurrido con la capacidad antioxidante, los valores más altos de CFT fueron observados en las muestras obtenidas mediante extracción etanólica (ND), con valores en un rango de 77 a 100 mg de EAG/100 g al día 0 y de 73 a 90 mg de EAG/100 g luego de 8 días de almacenamiento. Luego de la primera fase de digestión (FG), los cubos de manzana mostraron valores de CFT que representaban entre el 20 y el 48 % de los valores observados para muestras ND. Con el

avance de la DGI, se registró un ligero aumento en el CFT liberados desde la fase gástrica a la intestinal, aunque este aumento no resultó significativo en todos los tratamientos. Además, las manzanas tratadas con recubrimiento de alginato prebiótico (ASP) mostraron luego de la FG valores ligeramente menores en comparación con el control no recubierto en el día 0. Con resultados similares a los obtenidos al evaluar la capacidad antioxidante, los cubos de manzana recubiertos con prebióticos y probióticos (ASPR y ASPB) no mostraron diferencias significativas en comparación con el control sin recubrimiento en los valores de CFT mostrados al final del proceso de DGI y luego de 8 días de almacenamiento refrigerado (Figura 3.7 B).

En la evaluación de los compuestos bioactivos la capacidad antioxidante (actividad antirradicalaria determinada mediante el ensayo de DPPH) estuvo altamente correlacionada con el contenido de fenoles totales de los cubos de manzana, tanto para muestras sometidas al proceso de digestión *in vitro* como para aquellas sin digerir (ND), presentando un coeficiente de correlación de Pearson de 0.98. Como se describió en los párrafos anteriores, inmediatamente después de la aplicación del recubrimiento (día 0), las propiedades antioxidantes de las manzanas recién cortadas (ND) no se vieron afectadas por la adición de compuestos prebióticos y microorganismos probióticos. En este sentido, los resultados aquí presentados son consistentes con los previamente descriptos, donde se informó un CFT similar (98.8 mg EAG/100g) para cubos de manzana tratados con un recubrimiento comestible de gelano enriquecido con fibra de manzana, sin diferencias con el control no recubierto. Este incremento mostrado generalmente luego de la fase intestinal (FI) podría atribuirse al tiempo de contacto adicional entre la muestra y los fluidos intestinales en esta etapa y/o al efecto de las enzimas digestivas implicadas, lo que mejoraría la liberación de compuestos bioactivos unidos a la matriz de la fruta. Con respecto a las diferencias mostradas entre los valores de estos parámetros entre muestras no digeridas y digeridas, cabe recordar que los compuestos bioactivos del extracto no digerido corresponden a muestras extraídas químicamente con etanol, como resultado de un proceso optimizado por el cual se intenta conocer el potencial total del alimento en su carácter antioxidante, no así su bioaccesibilidad. Sumado a esto, estudios recientes sugirieron que los antioxidantes no digeribles que permanecen unidos a la matriz alimentaria en su paso por el tracto digestivo son capaces de alcanzar el colon humano, donde podrían contribuir a generar un ambiente antioxidante, ejerciendo de este modo un efecto protector en el colon.

Por otro lado, las ligeras reducciones observadas al finalizar la fase gástrica en los valores de capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos entre los cubos de manzana tratados con el recubrimiento de alginato prebiótico (ASP) y las muestras no recubiertas (Figuras 3.6 A y 3.7 A) podrían atribuirse a asociaciones entre los compuestos fenólicos y la fibra naturalmente presente en la matriz alimentaria como también a los compuestos prebióticos agregados a la formulación de alginato. Estas asociaciones se dan por diferentes interacciones físicas como fuerzas hidrofóbicas y enlaces covalentes, que podrían afectar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos, repercutiendo sobre su potencial antioxidante, hecho que ha sido informado por otros autores (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2016; Cassani *et al.*, 2018). De manera remarcable, es importante notar que el tiempo de almacenamiento no afectó significativamente ($p > 0.05$) la composición y características antioxidantes de los cubos de manzana luego de la digestión gastrointestinal, sugiriendo que los compuestos antioxidantes aún permanecen bioaccesibles luego de 8 días a 5 °C.

En términos generales, en la literatura disponible sobre la aplicación de probióticos en frutas frescas mínimamente procesadas no se atribuyen efectos significativos sobre las propiedades antioxidantes debido a la adición de estos microorganismos. Por ejemplo, Zudaire *et al.* (2018) informaron que la adición de *L. rhamnosus* no influyó en la capacidad antioxidante ni en el contenido de fenoles totales de peras almacenadas durante 9 días a 4 °C. Resultados similares se han informado trabajando sobre el melón recién cortado (Russo *et al.*, 2015), rodajas de manzana (Röbke *et al.*, 2010) y ananá mínimamente procesado (Russo *et al.*, 2014). Contrariamente, algunos estudios demostraron que someter jugos de mora, granada y uva a procesos fermentativos utilizando microorganismos probióticos mejoró el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de estas bebidas (Mantzourani *et al.*, 2018). Estas mejoras podrían atribuirse a la degradación y transformación de fitoquímicos por los microorganismos probióticos empleados, modificando mediante su actividad metabólica el tipo y la cantidad de antioxidantes, pudiendo también influir en la bioaccesibilidad de los mismos (Valero-Cases *et al.*, 2017).

3.3.5 Color y textura de cubos de manzana tratados con recubrimientos funcionales de alginato

Como se puede observar en la Tabla 3.2, inmediatamente después de la aplicación de los recubrimientos no se observaron cambios significativos en el parámetro de luminosidad

(L*) de los cubos de manzana. Sin embargo, luego de 8 días de almacenamiento refrigerado las muestras recubiertas con alginato probiótico (ASPR, ASPB) presentaron valores menores ($p < 0.05$) que los controles (C, ASP). Al analizar la evolución de cada tratamiento en el tiempo, todos presentaron el mismo comportamiento, mostrando una disminución significativa ($p < 0.05$) en L* al día 8 de almacenamiento. A diferencia de lo observado para la luminosidad, el tratamiento de los cubos de manzana con distintos recubrimientos de alginato causó cambios significativos ($p < 0.05$) en el ángulo de tono (h°) al día 0. En este sentido, la muestra control no recubierta (C) presentó los valores de h° más bajos respecto a todos los tratamientos aplicados. Tanto ASPR como ASPB resultaron similares a ASP ($p > 0.05$). Al día 8 de almacenamiento, nuevamente el control no recubierto presentó los valores más bajos de h° ($p < 0.05$), seguidos por ASPR. De este modo, ASP y ASPB fueron las muestras que preservaron en mayor medida sus atributos de color. Esta disminución en el ángulo de tono implica el oscurecimiento de los cubos, hecho que podría estar asociado a reacciones de pardeamiento desencadenadas en la superficie de los cubos de manzana. En el almacenamiento refrigerado, todos los tratamientos presentaron una disminución significativa ($p < 0.05$) de h° , a excepción de las muestras recubiertas con alginato prebiótico sin la adición de probióticos (ASP). En este sentido, la mejora en la retención de los atributos de color reflejada por estas muestras podría deberse a la protección ejercida por la barrera semipermeable a gases y humedad que proporciona el recubrimiento, resultando una ventaja con respecto al control no recubierto. Adicionalmente, los cubos de manzana tratados con ASP no actuaron como portadores de probióticos y, de este modo, no fueron afectados por las reacciones resultantes del metabolismo de estas bacterias que podrían alterar las propiedades de color de los cubos de manzana, a diferencia de las muestras tratadas con ASPR y ASPB. Los cambios de color observados en este estudio fueron similares a los reportados por Pimentel *et al.* (2015) para jugo de manzana clarificado suplementado con *Lactocaseibacillus paracasei* ssp. *paracasei* y oligofructosa almacenados durante 28 días bajo condiciones de refrigeración. Estos autores atribuyeron el desarrollo del pardeamiento a reacciones oxidativas y no oxidativas de los polifenoles que dan como resultado productos de condensación coloreados y a las melanoidinas formadas por la reacción de Maillard.

Con respecto al parámetro de firmeza (Tabla 3.2), la aplicación inmediata de los recubrimientos formulados con probióticos o prebióticos presentó valores significativamente ($p < 0.05$) superiores con respecto a las muestras controles (C y ASP).

Luego de 8 días de almacenamiento a 5 °C, las muestras sin recubrir (C) presentaron valores de firmeza significativamente ($p < 0.05$) menores que las muestras con recubrimiento, independientemente de la formulación de alginato utilizada. En este sentido, la disminución de la firmeza generalmente está asociada con la pérdida de humedad, lo que conduce a una disminución de la turgencia del producto recién cortado (Kumar *et al.*, 2018). Como se discutió anteriormente, la aplicación de recubrimientos comestibles proporciona una barrera semipermeable que actúa reduciendo la respiración, la pérdida de humedad y la velocidad de la reacción de oxidación (Yousuf *et al.*, 2018). Al analizar la evolución de las muestras con el tiempo de almacenamiento, los cubos de manzana tratados con *L. rhamnosus* mostraron reducciones significativas ($p < 0.05$) en los valores de firmeza. Sin embargo, como resultado destacable se observó que las muestras recubiertas con alginato conteniendo *B. lactis* fueron capaces de mantener este parámetro sin diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto a sus valores iniciales. Al evaluar la firmeza de una ensalada de frutas, Furtado Martins *et al.* (2016) indicaron que la adición de *L. rhamnosus* no produjo cambios significativos en la textura de las frutas. Contrariamente, Rößle *et al.* (2010) observaron una pérdida significativa de firmeza de las manzanas recién cortadas enriquecidas con *Lactococcus lactis* *rhamnosus* GG en comparación con el control sin probiótico, luego del segundo día de almacenamiento.

Tabla 3.2. Efecto de los recubrimientos funcionales de alginato con y sin probióticos sobre los parámetros de color (luminosidad L*, ángulo de tono h°) y firmeza de cubos de manzana almacenados durante 8 días a 5 °C.

Parámetro	Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)	
		0	8
L*	C	79.74 ± 0.94 ^{ABa}	76.74 ± 2.18 ^{Ab}
	ASP	79.45 ± 1.51 ^{Ba}	76.82 ± 1.44 ^{Ab}
	ASPR	79.75 ± 0.58 ^{ABa}	70.76 ± 4.16 ^{Bb}
	ASPB	80.47 ± 0.93 ^{Aa}	73.88 ± 3.74 ^{Ab}
h°	C	82.63 ± 0.75 ^{Da}	77.03 ± 1.24 ^{Db}
	ASP	94.66 ± 1.56 ^{Aba}	93.49 ± 0.93 ^{Aa}
	ASPR	95.53 ± 1.01 ^{Aa}	83.07 ± 4.56 ^{Cb}
	ASPB	94.10 ± 1.85 ^{Ba}	88.16 ± 5.50 ^{Bb}
Firmeza (N/cm ²)	C	60.6 ± 5.4 ^{Bb}	70.2 ± 5.1 ^{Ca}
	ASP	70.4 ± 26.4 ^{Bb}	111.3 ± 18.5 ^{Aa}
	ASPR	108.1 ± 11.1 ^{Aa}	82.9 ± 12.5 ^{CBb}
	ASPB	105.3 ± 17.6 ^{Aa}	97.1 ± 14.4 ^{BAa}

C: control sin recubrimiento, ASP: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos, ASPR: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos+*B. lactis*, ASPB: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos+*B. lactis*. Los resultados se muestran como valores medio ± la desviación estándar (n = 15). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05) entre tratamientos. Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05) entre días de almacenamiento.

3.3.6 Impacto de los recubrimientos funcionales sobre la calidad sensorial de cubos de manzana

El efecto de los recubrimientos de alginato prebiótico y microorganismos probióticos sobre los parámetros de calidad visual general (OVQ), sabor y aroma de los cubos de manzana se evaluó mediante un análisis descriptivo cuantitativo, inmediatamente después de la aplicación de los tratamientos y luego de 8 días de almacenamiento a 5 °C. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.8.

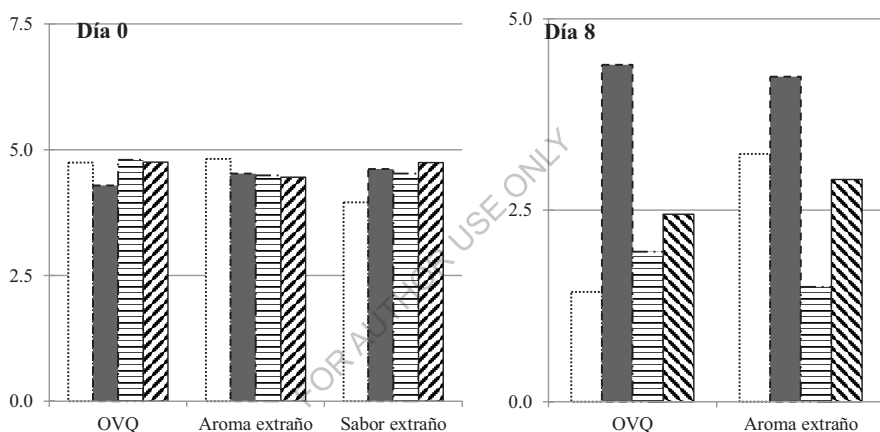


Figura 3.8 Evolución de los atributos sensoriales (OVQ: calidad visual general; sabor extraño; aroma extraño) de cubos de manzana tratados con recubrimientos funcionales de alginato con y sin el agregado de probióticos en el día 0 y luego de 8 días de almacenamiento a 5 °C. C: control sin recubrimiento, ASP: cubos de manzana recubiertos con alginato+probióticos, ASPR: cubos de manzana recubiertos con alginato+probióticos+*L. rhamnosus*, ASPB: cubos de manzana recubiertos con alginato+probióticos+*B. lactis*.

Inicialmente (día 0), la adición de las cepas probióticas en el recubrimiento de alginato prebiótico no influyó significativamente en ninguno de los atributos sensoriales evaluados en los cubos de manzana. Al final del período de almacenamiento (día 8), los microorganismos probióticos añadidos dieron como resultado puntuaciones más bajas para todos los atributos en comparación con el control recubierto sin probióticos (ASP). Por un lado, los panelistas detectaron aroma extraño y una apariencia visual general deteriorada en

cubos de manzana que contenían *L. rhamnosus* (ASPR) almacenados durante 8 días, con puntuaciones por debajo del límite de aceptabilidad establecido (2.5), al igual que la muestra control sin recubrir. Los cambios de aroma y sabor podrían ser causados por productos metabólicos de los probióticos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Rößle *et al.* (2010), quienes informaron el desarrollo de un aroma extraño relacionado con la presencia de ácido láctico en trozos de manzana que contenían *L. rhamnosus* GG. Los puntajes obtenidos para las muestras ASPB y ASP se mantuvieron por encima del límite de aceptabilidad, lo que indicaría que los cubos de manzana tratados con recubrimientos prebióticos y recubrimientos prebióticos con el agregado de *B. lactis* resultaron aceptables desde un punto de vista sensorial hasta el final del almacenamiento (Figura 3.8). Teniendo en cuenta los niveles de supervivencia de los microorganismos probióticos (superior a 9.00 log UFC/g) y la calidad microbiológica de los cubos de manzana (con recuentos de microflora nativa inferiores a 7.00 log UFC/g), puede considerarse a la calidad sensorial como el factor limitante de la vida útil de este producto funcional.



Figura 3.9. Muestras para evaluación sensorial de cubos de manzana tratados con mezclas simbióticas vehiculizadas en recubrimientos de alginato (día 0). De izquierda a derecha: ASPR, ASPB.

3.3.7 Efecto antagónico de recubrimientos funcionales con probióticos frente a *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 en cubos de manzana

Resulta interesante evaluar la efectividad antimicrobiana de los dos probióticos en estudio al ser aplicados sobre cubos de manzana. Los resultados obtenidos del potencial antagónico de los probióticos se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Evolución de *L. innocua* CIP 80.11 y *E. coli* O157:H7 FP605/03 inoculadas en forma individual y coinoculadas con *L. rhamnosus* o *B. lactis* en recubrimientos funcionales de alginato aplicados sobre cubos de manzana almacenados 8 días a 5 °C.

Días de almacenamiento	ASPLi	ASPRLi	ASPBLi
0	4.62 ± 0.10 ^{aA}	4.49 ± 0.16 ^a	4.51 ± 0.01 ^a
8	3.84 ± 0.02 ^B	< 2.00	< 2.00
	ASPEc	ASPREc	ASPBEC
0	4.65 ± 0.19 ^{aA}	4.52 ± 0.05 ^{aA}	4.63 ± 0.05 ^{aA}
8	3.85 ± 0.10 ^{aB}	2.56 ± 0.02 ^{cB}	2.96 ± 0.17 ^{bB}

ASPLi: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos+*L. innocua*; ASPEc: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos+*E. coli*; ASPRLi: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos+*L. rhamnosus*+*L. innocua*; ASPREc: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos+*L. rhamnosus*+*E. coli*. ASPBLi: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos+*B. lactis*+ *L. innocua*; ASPBEC: cubos de manzana recubiertos con alginato+prebióticos+*B. lactis*+ *E. coli*. Los resultados se muestran como el valor medio de dos mediciones independientes realizadas por duplicado ± la desviación estándar. Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos a cada tiempo de muestreo. Letras mayúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre días de almacenamiento para el mismo tratamiento.

*Debajo del límite de detección del método.

Como puede observarse, los cubos de manzana inoculados con *E. coli* O157:H7 FP605/03 y tratados con recubrimientos de alginato con y sin probióticos no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) inmediatamente después de la aplicación del recubrimiento (día 0). Sin embargo, luego de 8 días de almacenamiento a 5 °C la viabilidad de *E. coli* O157:H7 FP605/03 se vio significativamente ($p < 0.05$) afectada como resultado de la presencia de *L. rhamnosus* y *B. lactis* en los recubrimientos de alginato prebiótico. Estos resultados indican un efecto bactericida significativo ejercido por los probióticos frente a *E. coli* O157:H7 FP605/03, alcanzando reducciones de entre 1.85 y 0.90 log UFC/g en comparación con muestras sin probióticos luego de 8 días de almacenamiento. Por otro lado, al día 0 se obtuvieron resultados similares para las muestras inoculadas con *L. innocua* CIP 80.11 en el día 0. El análisis de los recuentos de *L. innocua* CIP 80.11 al día 8 de almacenamiento muestra un efecto bactericida por parte de los probióticos aún más pronunciado, presentando las muestras ASPRLi y ASPBLi recuentos al menos 1.82 log menores que el control (ASPLi). Finalmente, también se monitoreó el efecto de *E. coli* O157:H7 FP605/03 y *L. innocua* CIP 80.11 inoculados sobre la viabilidad de los probióticos a cada momento de muestreo, corroborando nuevamente que la presencia de

estos microorganismos no influyó en ningún caso sobre la supervivencia de *L. rhamnosus* y *B. lactis*.

La investigación disponible en este campo ha demostrado que la efectividad de los probióticos como agentes de biocontrol depende principalmente del tipo y características del microorganismo objetivo, de la matriz alimentaria (fruta entera o cortada, con o sin cáscara, características intrínsecas como pH, acidez, sólidos solubles), del método de inoculación del probiótico (vehiculado en recubrimientos, aplicado mediante técnicas como impregnación al vacío, previamente microencapsulado) y el nivel de inóculo del mismo (cargas bajas, medias o altas), así como las posibilidades de contacto entre el microorganismo evaluado y el probiótico. Los resultados obtenidos en este capítulo refuerzan el hecho de que tanto *L. rhamnosus* como *B. lactis* podrían proporcionar una alternativa válida al uso de antimicrobianos sintéticos.

4 Conclusiones

En este trabajo, se llevó adelante la aplicación de 2 microorganismos probióticos (*L. rhamnosus* y *B. lactis*) y una mezcla de compuestos prebióticos (inulina y oligofructosa) vehiculizados en recubrimientos de alginato sobre cubos de manzana, estudiando su impacto sobre las principales características de calidad fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del producto, durante 8 días de almacenamiento a 5 °C. En primer lugar, los resultados obtenidos confirmaron la factibilidad de incorporar *B. lactis* y *L. rhamnosus* a cubos de manzana, presentando estos probióticos alto grado de supervivencia, en niveles superiores a 9.00 log UFC/g finalizado el período de almacenamiento. Como resultado remarcable, se demostró que los probióticos estudiados fueron capaces de resistir las condiciones de una digestión gastrointestinal simulada de dos etapas, logrando retener ampliamente su viabilidad, por encima de los límites establecidos como necesarios para ejercer efecto probiótico. Estos resultados avalan el hecho de que *B. lactis* y *L. rhamnosus* incorporados en las manzanas listas para consumir podrían llegar al intestino delgado humano en cantidades suficientes para ejercer un efecto beneficioso para la salud. Además, la exploración de los cubos de manzana por microscopía electrónica de barrido reveló una adherencia continua de los recubrimientos sobre la superficie de la matriz, presentando además el *film* de alginato características mejoradas en cuanto a porosidad del mismo como resultado del agregado de los compuestos prebióticos, con numerosas células bacilares distribuidas de manera homogénea en la superficie. Mediante el análisis de la

evolución de compuestos bioactivos a través de la digestión *in vitro* se demostró que los polifenoles permanecieron bioaccesibles hasta el final del almacenamiento. El monitoreo de la microflora nativa evidenció que la presencia de microorganismos probióticos en los recubrimientos de alginato prebiótico mantuvo la aptitud microbiológica de los cubos de manzana. Con respecto a los atributos sensoriales del producto, los recubrimientos que incluyeron *B. lactis* en su formulación resultaron aptos sensorialmente hasta el final del almacenamiento, hecho que determinó a las características sensoriales como el factor limitante de la vida útil de los cubos de manzana. Por último, se demostró el efecto antagónico de los probióticos como característica destacable para el aseguramiento de la inocuidad del producto. Los análisis en general mostraron una marcada dependencia de las propiedades multifuncionales de *B. lactis* y *L. rhamnosus* con numerosos factores, tales como la matriz sobre la que se aplican, el nivel de inóculo inicial, las condiciones de almacenamiento, los microorganismos objetivo, entre otros. Teniendo en cuenta los resultados presentados aquí, se concluye que los cubos de manzana recubiertos con alginato enriquecido con mezclas de inulina y oligofructosa constituyen un vehículo eficaz para lactobacilos y bifidobacterias probióticos, presentando potencial para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales no lácteos.

Referencias

- ABADIAS, M., ALEGRE, I., USALL, J., TORRES, R., & VIÑAS, I. (2011). Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apple. *Postharvest Biology and Technology*, 59(3), 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.09.014>
- ABADIAS, M., Usall, J., ALEGRE, I., TORRES, R., & VIÑAS, I. (2009). Fate of *Escherichia coli* in apple and reduction of its growth using the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(9), 1526–1533. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3619>
- ABID, M., JABBAR, S., HU, B., HASHIM, M. M., WU, T., WU, Z., *et al.* (2014). Synergistic impact of sonication and high hydrostatic pressure on microbial and enzymatic inactivation of apple juice. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.039>
- ALARCÓN-FLORES, M. I., ROMERO-GONZÁLEZ, R., MARTÍNEZ VIDAL, J. L., & GARRIDO FRENICH, A. (2015). Evaluation of the Presence of Phenolic Compounds in Different Varieties of Apple by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 8(3), 696–709. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9931-6>
- ALEGRE, I., ABADIAS, M., ANGUERA, M., OLIVEIRA, M., & VIÑAS, I. (2010). Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples. *Food Microbiology*, 27(1), 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.08.005>
- ALI, H. M., EL-GIZAWY, A. M., EL-BASSIOUNY, R. E. I., & SALEH, M. A. (2015). Browning inhibition mechanisms by cysteine, ascorbic acid and citric acid, and identifying PPO-catechol-cysteine reaction products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3651–3659. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1437-0>
- AZEVEDO, A. N., BUARQUE, P. R., CRUZ, E. M. O., BLANK, A. F., ALVES, P. B., NUNES, M. L., *et al.* (2014). Response surface methodology for optimisation of edible chitosan coating formulations incorporating essential oil against several foodborne pathogenic bacteria. *Food Control*, 43, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.033>
- BARANYI, J., & ROBERTS, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial

- growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3–4), 277–294.
[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- BARRETT, D. M., BEAULIEU, J. C., & 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.
<https://doi.org/10.1080/10408391003626322>
- BAYINDIRLI, A., ALPAS, H., BOZOGLU, F., & HIZAL, M. (2006). Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. *Food Control*, 17(1), 52–58.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.09.002>
- BERMÚDEZ-SOTO, M. J., TOMÁS-BARBERÁN, F. A., & GARCÍA-CONESA, M. T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102(3), 865–874.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.025>
- BOHN, T., MCDUGALL, G. J., ALEGRIA, A., ALMINGER, M., ARRIGONI, E., AURA, A. M., *et al.* (2015). Mind the gap-deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites-a position paper focusing on carotenoids and polyphenols. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(7), 1307–1323. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400745>
- BONDONNO, N. P., BONDONNO, C. P., WARD, N. C., HODGSON, J. M., & CROFT, K. D. (2017). The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. *Trends in Food Science and Technology*, 69, 243–256.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.012>
- BOUAYED, J., HOFFMANN, L., & BOHN, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.052>
- BRIONES-LABARCA, V., VENEGAS-CUBILLOS, G., ORTIZ-PORTILLA, S., CHACANA-OJEDA, M., & MAUREIRA, H. (2011). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch

- contents in Granny Smith apple. *Food Chemistry*, 128(2), 520–529.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.074>
- BRITTO, D. DE, & ASSIS, O. B. G. (2012). Chemical, biochemical, and microbiological aspects of chitosan quaternary salt as active coating on sliced apples. *Food Science and Technology*, 32(3), 599–605. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612012005000089>
- BUCKOW, R., WEISS, U., & KNORR, D. (2009). Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure-temperature domains. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(4), 441–448.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.05.005>
- BUERMAN, E. C., WOROBO, R. W., & PADILLA-ZAKOUR, O. I. (2020). High pressure processing of spoilage fungi as affected by water activity in a diluted apple juice concentrate. *Food Control*, 107(May 2019), 106779.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106779>
- CASSANI, L., TOMADONI, B., PONCE, A., AGÜERO, M. V., & MOREIRA, M. R. (2017). Combined use of ultrasound and vanillin to improve quality parameters and safety of strawberry juice enriched with prebiotic fibers. *Food and Bioprocess Technology*, 10(8), 1454–1465. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1914-3>
- CASSANI, L., TOMADONI, B., VIACAVA, G., PONCE, A., & MOREIRA, M. R. (2016). Enhancing quality attributes of fiber-enriched strawberry juice by application of vanillin or geraniol. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 90–98.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.037>
- CASSANI, L., GERBINO, E., MOREIRA, M. DEL R., & GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. (2018). Influence of non-thermal processing and storage conditions on the release of health-related compounds after in vitro gastrointestinal digestion of fiber-enriched strawberry juices. *Journal of Functional Foods*, 40(November 2017), 128–136.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.005>
- CASSANI, L., GOMEZ-ZAVAGLIA, A., & SIMAL-GANDARA, J. (2020). Technological strategies ensuring the safe arrival of beneficial microorganisms to the gut: From food processing and storage to their passage through the gastrointestinal tract. *Food Research International*, 129(November 2019), 108852.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108852>

- CHEN, C. S., ZHANG, D., WANG, Y. Q., LI, P. M., & MA, F. W. (2012). Effects of fruit bagging on the contents of phenolic compounds in the peel and flesh of “Golden Delicious”, “Red Delicious”, and “Royal Gala” apples. *Scientia Horticulturae*, 142, 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.05.001>
- CHOI, H. S., SUN SONG, H., UKEDA, H., & SAWAMURA, M. (2000). Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4156–4161. <https://doi.org/10.1021/jf000227d>
- CILLA, A., BOSCH, L., BARBERÁ, R., & ALEGRÍA, A. (2018). Effect of processing on the bioaccessibility of bioactive compounds – A review focusing on carotenoids, minerals, ascorbic acid, tocopherols and polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.009>
- DA COSTA, G. M., DE CARVALHO SILVA, J. V., DIAS MINGOTTI, J., BARAO, C. E., JENSEN KLOSOSKI, S., & COLOMBO PIMENTEL, T. (2017). Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange juice. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.051>
- DALLEAU, S., CATEAU, E., BERGES, T., BERJEAUD, J. M., & IMBERT, C. (2008). In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(6), 572–576. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.028>
- DE ANCOS, B., GONZÁLEZ-PEÑA, D., COLINA-COCA, C., & SÁNCHEZ-MORENO, C. (2015). Uso de películas/recubrimientos comestibles en los productos de IV y V gama. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(1), 8–17.
- DE OLIVEIRA, P. M., LEITE JÚNIOR, B. R., MARTINS, M. L., MARTINS, E. M. F., & RAMOS, A. M. (2014). Minimally processed yellow melon enriched with probiotic bacteria. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(5), 2415–2426. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n5p2415>
- DHALL, R. K. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 435–450. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.541568>

- DIAS, C. O., DOS SANTOS OPUSKI DE ALMEIDA, J., PINTO, S. S., DE OLIVEIRA SANTANA, F. C., VERRUCK, S., MÜLLER, C. M. O., *et al.* (2018). Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product for probiotic delivery. *Food Bioscience*, 24(October 2017), 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.05.006>
- ESPINO-DÍAZ, M., MOLINA-CORRAL, F. J., SEPULVEDA, D. R., GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A., & OLIVAS, G. I. (2016). Alginate coatings containing high levels of isoleucine improve aromatic and standard quality in fresh-cut apple. *European Journal of Horticultural Science*, 81(3), 175–184.
- FERNÁNDEZ-JALAO, I., SÁNCHEZ-MORENO, C., & DE ANCOS, B. (2017). Influence of food matrix and high-pressure processing on onion flavonols and antioxidant activity during gastrointestinal digestion. *Journal of Food Engineering*, 213, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.015>
- FERNÁNDEZ-JALAO, I., SÁNCHEZ-MORENO, C., & DE ANCOS, B. (2019). Effect of high-pressure processing on flavonoids, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and antioxidant activity of apple ‘Golden Delicious’ from different geographical origin. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 51(January 2018), 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.002>
- FERON, V. J., TIL, H. P., DE VRIJER, F., WOUTERSEN, R. A., CASSEE, F. R., & VAN BLADEREN, P. J. (1991). Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259(3–4), 363–385. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90128-9](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90128-9)
- FITZGERALD, D. J., STRATFORD, M., GASSON, M. J., UECKERT, J., BOS, A., & NARBAD, A. (2004). Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 104–113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02275.x>
- FURTADO MARTINS, E. M., MOTA RAMOS, A., LOPES MARTINS, M., & DE CASTRO LEITE JUNIOR, B. R. (2016). Fruit salad as a new vehicle for probiotic bacteria. *Food Science and Technology (Campinas)*, 36(3), 540–548. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.03316>
- GEORGE, J. M., SENTHAMIZH SELVAN, T., & RASTOGI, N. K. (2016). High-

- pressure-assisted infusion of bioactive compounds in apple slices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.11.010>
- GIACALONE, G., & CHIABRANDO, V. (2018). Fresh-cut apple: Effect of CaCl₂ dips on firmness and quality. *Acta Horticulturae*, 1209, 95–101. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1209.14>
- GONZÁLEZ-PEÑA, D., COLINA-COCA, C., CHAR, C. D., CANO, M. P., DE ANCOS, B., & SÁNCHEZ-MORENO, C. (2013). Hyaluronidase inhibiting activity and radical scavenging potential of flavonols in processed onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4862–4872. <https://doi.org/10.1021/jf3054356>
- GOPAL, K. R. (2017). High Pressure Processing of Fruits and Vegetable Products: A Review. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 5(5), 680–692. <https://doi.org/10.18782/2320-7051.2930>
- HE, Z., TAO, Y., ZENG, M., ZHANG, S., TAO, G., QIN, F., *et al.* (2016). High pressure homogenization processing, thermal treatment and milk matrix affect in vitro bioaccessibility of phenolics in apple, grape and orange juice to different extents. *Food Chemistry*, 200, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.045>
- HERRANZ, B., FERNÁNDEZ-JALAO, I., DOLORES ÁLVAREZ, M., QUILES, A., SÁNCHEZ-MORENO, C., HERNANDO, I., *et al.* (2019). Phenolic compounds, microstructure and viscosity of onion and apple products subjected to in vitro gastrointestinal digestion. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 51(January 2018), 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.05.014>
- 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 and Emerging Technologies*, 18, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.01.001>
- HYUN, T. K., & JANG, K.-I. (2016). Apple as a source of dietary phytonutrients: an update on the potential health benefits of apple. *EXCLI Journal*, 15, 565–569.
- JAKOBEK, L., GARCÍA-VILLALBA, R., & TOMÁS-BARBERÁN, F. A. (2013). Polyphenolic characterisation of old local apple varieties from Southeastern European region. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(2), 199–211.

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.05.012>

- KALTSA, A., PAPALIAGA, D., PAPAIOANNOU, E., & KOTZEKIDOU, P. (2015). Characteristics of oleuropeinolytic strains of *Lactobacillus plantarum* group and influence on phenolic compounds in table olives elaborated under reduced salt conditions. *Food Microbiology*, 48, 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.10.016>
- KEENAN, D. F., BRUNTON, N., BUTLER, F., WOUTERS, R., & GORMLEY, R. (2011). Evaluation of thermal and high hydrostatic pressure processed apple purees enriched with prebiotic inclusions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(3), 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.04.003>
- KUMAR, P., SETHI, S., SHARMA, R. R., SINGH, S., & VARGHESE, E. (2018). Improving the shelf life of fresh-cut ‘Royal Delicious’ apple with edible coatings and anti-browning agents. *Journal of Food Science and Technology*, 55(9), 3767–3778.
- LANDL, A., ABADIAS, M., SÁRRAGA, C., VIÑAS, I., & PICOUET, P. A. (2010). Effect of high pressure processing on the quality of acidified Granny Smith apple purée product. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(4), 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.09.001>
- LI, L., ZHANG, M., ADHIKARI, B., & GAO, Z. (2017). Recent advances in pressure modification-based preservation technologies applied to fresh fruits and vegetables. *Food Reviews International*, 33(5), 538–559. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1196492>
- LIMBO, S., & PIERGIOVANNI, L. (2006). Shelf life of minimally processed potatoes: Part 1. Effects of high oxygen partial pressures in combination with ascorbic and citric acids on enzymatic browning. *Postharvest Biology and Technology* 9 (3) 254–264.
- MA, L., ZHANG, M., BHANDARI, B., & GAO, Z. (2017). Recent developments in novel shelf life extension technologies of fresh-cut fruits and vegetables. *Trends in Food Science and Technology*, 64, 23–38. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.005>
- MANTZOURANI, I., KAZAKOS, S., TERPOU, A., MALLOUCHOS, A., KIMBARIS, A., ALEXOPOULOS, A., *et al.* (2018). Assessment of volatile compounds evolution, antioxidant activity, and total phenolics content during cold storage of pomegranate beverage fermented by *Lactobacillus paracasei* K5. *Fermentation*, 4(4).

<https://doi.org/10.3390/fermentation4040095>

- MANU, D. K. (2016). Antimicrobial activity of cinnamaldehyde or geraniol alone or combined with high pressure processing to destroy escherichia coli O157:H7 and salmonella enterica in juices [Iowa State University Ames]. In *Graduate Theses and Dissertations*.
- MARSZALEK, K., WOŹNIAK, Ł., BARBA, F. J., SKĄPSKA, S., LORENZO, J. M., & ZAMBON, A. S. (2018). Enzymatic, physicochemical, nutritional and phytochemical profile changes of apple (Golden Delicious L.) juice under supercritical carbon dioxide and long-term cold storage. *Food Chemistry*, 268, 279–286. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.109>
- MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G. B., ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, M. H., & ARTÉS-HERNÁNDEZ, F. (2019). Browning Control Using Cyclodextrins in High Pressure–Treated Apple Juice. *Food and Bioprocess Technology*, 12(4), 694–703. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-2242-6>
- MIHAILOVIĆ, N. R., MIHAILOVIĆ, V. B., KREFT, S., ĆIRIĆ, A. R., JOKSOVIĆ, L. G., & ĐURĐEVIĆ, P. T. (2018). Analysis of phenolics in the peel and pulp of wild apples (*Malus sylvestris* (L.) Mill.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 67(January 2018), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.11.007>
- MINEKUS, M., ALMINGER, M., ALVITO, P., BALLANCE, S., BOHN, T., BOURLIEU, C., *et al.* (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- MOREIRA, M. R., TOMADONI, B., MARTÍN-BELLOSO, O., & FORTUNY, R. S. (2015). Preservation of fresh-cut apple quality attributes by pulsed light in combination with gellan gum-based prebiotic edible coatings. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1130–1137. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.002>
- MOREIRA, M. DEL R., PONCE, A. G., DEL VALLE, C. E., PEREYRAA, L., & ROURA, S. I. (2008). Mild heat shocks to extend the shelf life of minimally processed lettuce. *Journal of Applied Horticulture*, 10(2), 132–136. <https://doi.org/10.37855/jah.2008.v10i02.28>
- MOREIRA, M. R., ÁLVAREZ, M. V., MARTÍN-BELLOSO, O., & SOLIVA-

- FORTUNY, R. (2017). Effects of pulsed light treatments and pectin edible coatings on the quality of fresh-cut apples: a hurdle technology approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(1), 261–268. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7723>
- MOREIRA, M. R., CASSANI, L., MARTÍN-BELLOSO, O., & SOLIVA-FORTUNY, R. (2015). Effects of polysaccharide-based edible coatings enriched with dietary fiber on quality attributes of fresh-cut apples. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7795–7805. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1907-z>
- NIKOLAOU, A., TSAKIRIS, A., KANELAKI, M., BEZIRTZOGLU, E., AKRIDA-DEMERTZI, K., & KOURKOUTAS, Y. (2019). Wine production using free and immobilized kefir culture on natural supports. *Food Chemistry*, 272(February 2018), 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.015>
- OLIVEIRA, M., RODRIGUES, C. M., & TEIXEIRA, P. (2019). Microbiological quality of raw berries and their products: A focus on foodborne pathogens. *Heliyon*, 5(12). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02992>
- OSIMANI, A., & CLEMENTI, F. (2016). The occurrence of *Listeria monocytogenes* in mass catering: An overview in the European Union. *International Journal of Hospitality Management*, 57, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijhm.2016.05.005>
- PANGHAL, A., JANGHU, S., VIRKAR, K., GAT, Y., KUMAR, V., & CHHIKARA, N. (2018). Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. *Food Bioscience*, 21(December 2017), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.12.003>
- PATRIGNANI, F., TABANELLI, G., SIROLI, L., GARDINI, F., & LANCIOTTI, R. (2013). Combined effects of high pressure homogenization treatment and citral on microbiological quality of apricot juice. *International Journal of Food Microbiology*, 160(3), 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.021>
- PERSIC, M., MIKULIC-PETKOVSEK, M., SLATNAR, A., & VEBERIC, R. (2017). Chemical composition of apple fruit, juice and pomace and the correlation between phenolic content, enzymatic activity and browning. *LWT - Food Science and Technology*, 82, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.017>
- PIMENTEL, T. C., MADRONA, G. S., GARCIA, S., & PRUDENCIO, S. H. (2015). Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei*

- ssp. paracasei and oligofructose in different package type. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.009>
- QI, H., HU, W., JIANG, A., TIAN, M., & LI, Y. (2011). Extending shelf-life of Fresh-cut “Fuji” apples with chitosan-coatings. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(1), 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.11.001>
- QUINTANA, G., SIMÕES, M. G., HUGO, A., ALVES, P., FERREIRA, P., GERBINO, E., *et al.* (2017). Layer-by-layer encapsulation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* using block-copolymers of poly(acrylic acid) and pluronic for safe release in gastro-intestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 35, 408–417. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.007>
- RAMOS, B., MILLER, F. A., BRANDÃO, T. R. S., TEIXEIRA, P., & SILVA, C. L. M. (2013). Fresh fruits and vegetables - An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.002>
- RASTOGI, N. K., RAGHAVARAO, K. S. M. S., BALASUBRAMANIAM, V. M., NIRANJAN, K., & KNORR, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 69–112. <https://doi.org/10.1080/10408390600626420>
- RAYBAUDI-MASSILIA, R. M., MOSQUEDA-MELGAR, J., & MARTÍN-BELLOSO, O. (2008). Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. *International Journal of Food Microbiology*, 121(3), 313–327. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.010>
- RICO RODRÍGUEZ, F. (2013). Estudio de la aplicación de recubrimientos comestibles de quitosano y su combinación con aceites esenciales sobre la vida útil del mango (*mangifera indica* L.). In *Bdigital.Unal.Edu.Co*. Universidad Nacional de Colombia.
- ROJAS-GRAU, M. A., RAYBAUDI-MASSILIA, R. M., SOLIVA-FORTUNY, R. C., AVENA-BUSTILLOS, R. J., MCHUGH, T. H., & MARTIN-BELLOSO, O. (2007). Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.01.017>
- ROJAS-GRAU, M. A., TAPIA, M. S., & MARTIN-BELLOSO, O. (2008). Using

- polysaccharide-based edible coatings to maintain quality of fresh-cut Fuji apples. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.01.009>
- ROJAS-GRAU, M. A., SOLIVA-FORTUNY, R., & MARTIIN-BELLOSO, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.05.002>
- ROMANO, N., TAVERA-QUIROZ, M. J., BERTOLA, N., MOBILI, P., PINOTTI, A., & GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research Interna*, 64, 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.018>
- RÖBLE, C., AUTY, M. A. E., BRUNTON, N., GORMLEY, R. T., & BUTLER, F. (2010). Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1), 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.08.016>
- RUSSO, P., CHIARA, M. L. V., VERNILE, A., AMODIO, M. L., ARENA, M. P., CAPOZZI, V., *et al.* (2014). Fresh-cut pineapple as a new carrier of probiotic lactic acid bacteria. *BioMed Research International*, 2014, 1–9.
- RUSSO, P., PEÑA, N., DE CHIARA, M. L. V., AMODIO, M. L., COLELLI, G., & SPANO, G. (2015). Probiotic lactic acid bacteria for the production of multifunctional fresh-cut cantaloupe. *Food Research International*, 77, 762–772. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.033>
- SANGSUWAN, J., RATTANAPANONE, N., & RACHTANAPUN, P. (2008). Effect of chitosan/methyl cellulose films on microbial and quality characteristics of fresh-cut cantaloupe and pineapple. *Postharvest Biology and Technology*, 49(3), 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.02.014>
- SAPERS, G. M. (1992). Chitosan enhances control of enzymatic browning in apple and pear juice by filtration. *Journal of Food Science*, 57(5), 1192–1193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb11296.x>
- SHALINI, R., & GUPTA, D. K. (2010). Utilization of pomace from apple processing industries: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 47(4), 365–371.

<https://doi.org/10.1007/s13197-010-0061-x>

- SHYAMALA, B. N., MADHAVA NAIDU, M., SULOCHANAMMA, G., & SRINIVAS, P. (2007). Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7738–7743. <https://doi.org/10.1021/jf071349+>
- SILVEIRA, A. C., MOREIRA, G. C., ARTÉS, F., & AGUAYO, E. (2015). Vanillin and cinnamic acid in aqueous solutions or in active modified packaging preserve the quality of fresh-cut Cantaloupe melon. *Scientia Horticulturae*, 192, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.029>
- SIMÕES, A. D. N., TUDELA, J. A., ALLENDE, A., PUSCHMANN, R., & GIL, M. I. (2009). Edible coatings containing chitosan and moderate modified atmospheres maintain quality and enhance phytochemicals of carrot sticks. *Postharvest Biology and Technology*, 51(3), 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.08.012>
- SIROLI, L., PATRIGNANI, F., SERRAZANETTI, D. I., TABANELLI, G., MONTANARI, C., GARDINI, F., *et al.* (2015). Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. *Food Microbiology*, 47, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.008>
- SILVEIRA, A. C., MOREIRA, G. C., ARTÉS, F., & AGUAYO, E. (2015). Vanillin and cinnamic acid in aqueous solutions or in active modified packaging preserve the quality of fresh-cut Cantaloupe melon. *Scientia Horticulturae*, 192, 271–278.
- SON, S. M., MOON, K. D., & LEE, C. Y. (2001). Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. *Food Chemistry*, 73(1), 23–30. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00274-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00274-0)
- SOUKOULIS, C., YONEKURA, L., GAN, H. H., BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S., PARMENTER, C., & FISK, I. (2014). Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocolloids*, 39, 231–242. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.023>
- SPADARO, D., & DROBY, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science and Technology*, 47, 39–49.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>

- SPERANZA, B., CAMPANIELLO, D., BEVILACQUA, A., ALTIERI, C., SINIGAGLIA, M., & CORBO, M. R. (2018). Viability of *Lactobacillus plantarum* on fresh-cut chitosan and alginate-coated apple and melon pieces. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02538>
- SUN, X., NARCISO, J., WANG, Z., FERENC, C., BAI, J., & ZHOU, K. (2014). Effects of Chitosan-Essential Oil Coatings on Safety and Quality of Fresh Blueberries. *Journal of Food Science*, 79(5), 955–960. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12447>
- TAI, A., SAWANO, T., YAZAMA, F., & ITO, H. (2011). Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1810(2), 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.11.004>
- TAKMA, D.K., & KOREL, F. (2017). Impact of preharvest and postharvest alginate treatments enriched with vanillin on postharvest decay, biochemical properties, quality and sensory attributes of table grapes. *Food Chemistry*, 221, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.195>
- TAVERA-QUIROZ, M. J., ROMANO, N., MOBILI, P., PINOTTI, A., GOMEZ-ZAVAGLIA, A., & BERTOLA, N. (2015). Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of methylcellulose containing *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Functional Foods*, 16, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.024>
- THOMAS-VALDÉS, S., THEODULOZ, C., JIMÉNEZ-ASPEE, F., & SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. (2019). Effect of simulated gastrointestinal digestion on polyphenols and bioactivity of the native Chilean red strawberry (*Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis* f. *patagonica*). *Food Research International*, 123(April), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.039>
- TOMADONI, B., CASSANI, L., MOREIRA, M. R., & PONCE, A. (2015). Efficacy of vanillin and geraniol in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on strawberry juice. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 554–557. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.039>
- TOMADONI, B., CASSANI, L., PONCE, A., MOREIRA, M. R., & AGÜERO, M. V. (2016). Optimization of ultrasound, vanillin and pomegranate extract treatment for

- shelf-stable unpasteurized strawberry juice. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.024>
- TOMADONI, B., MOREIRA, M. R., PEREDA, M., & PONCE, A. G. (2018). Gellan-based coatings incorporated with natural antimicrobials in fresh-cut strawberries: Microbiological and sensory evaluation through refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology*, 97(July), 384–389. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.029>
- TORRES, E. F., GONZÁLEZ-M., G., KLOTZ, B., & RODRIGO, D. (2016). Effects of high hydrostatic pressure and temperature increase on *Escherichia coli* spp. and pectin methyl esterase inactivation in orange juice. *Food Science and Technology International*, 22(2), 173–180. <https://doi.org/10.1177/1082013215582107>
- TRIPATHI, M. K., & GIRI, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>
- VALDRAMIDIS, V. P., GRAHAM, W. D., BEATTIE, A., LINTON, M., MCKAY, A., FEARON, A. M., *et al.* (2009). Defining the stability interfaces of apple juice: Implications on the optimisation and design of High Hydrostatic Pressure treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(4), 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.02.006>
- VALERO-CASES, E., NUNCIO-JÁUREGUI, N., & FRUTOS, M. J. (2017). Influence of Fermentation with Different Lactic Acid Bacteria and in Vitro Digestion on the Biotransformation of Phenolic Compounds in Fermented Pomegranate Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(31), 6488–6496. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04854>
- VATANKHAH, H., & RAMASWAMY, H. S. (2019). High pressure impregnation (HPI) of apple cubes: Effect of pressure variables and carrier medium. *Food Research International*, 116(February 2018), 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.042>
- VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G., QUIRÓS-SAUCEDA, A., MERCADOD-MERCADOD, G., AYALA-ZAVALA, J. F., ASTIAZARÁN-GARCÍA, H., R
- VIACAVA, G. E., ROURA, S. I., & AGÜERO, M. V. (2015). Optimization of critical parameters during antioxidants extraction from butterhead lettuce to simultaneously

- enhance polyphenols and antioxidant activity. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 146, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.05.002>
- VINDEROLA, G., BURNS, P., & REINHEIMER, J. (2017). Probiotics in Nondairy Products. In *Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention* (Issue 3). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803968-7.00044-7>
- WOOTTON-BEARD, P. C., MORAN, A., & RYAN, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44(1), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.033>
- XIAO, Z., LUO, Y., LUO, Y., & WANG, Q. (2011). Combined effects of sodium chlorite dip treatment and chitosan coatings on the quality of fresh-cut d'Anjou pears. *Postharvest Biology and Technology*, 62(3), 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.07.007>
- XU, M. L., ZHU, S. M., & YU, Y. (2016). Effect of high pressure treatment on texture characteristics of fresh-cut apple. *2016 American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting, ASABE 2016*, 1–6. <https://doi.org/10.13031/aim.20162460035>
- YI, J., KEBEDE, B. T., HAI DANG, D. N., BUVÉ, C., GRAUWET, T., VAN LOEY, A., *et al.* (2017). Quality change during high pressure processing and thermal processing of cloudy apple juice. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.041>
- YOUSUF, B., QADRI, O. S., & SRIVASTAVA, A. K. (2018). Recent developments in shelf-life extension of fresh-cut fruits and vegetables by application of different edible coatings: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 89(October 2017), 198–209. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.051>
- ZAMBRANO-ZARAGOZA, M. L., MERCADO-SILVA, E., DEL REAL L., A., GUTIÉRREZ-CORTEZ, E., CORNEJO-VILLEGAS, M. A., & QUINTANAR-GUERRERO, D. (2014). The effect of nano-coatings with α -tocopherol and xanthan gum on shelf-life and browning index of fresh-cut “red Delicious” apples. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 22, 188–196.

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.09.008>

- ZAMBRANO-ZARAGOZA, MARIA L., GUTIÉRREZ-CORTEZ, E., DEL REAL, A., GONZÁLEZ-REZA, R. M., GALINDO-PÉREZ, M. J., & QUINTANAR-GUERRERO, D. (2014). Fresh-cut Red Delicious apples coating using tocopherol/mucilage nanoemulsion: Effect of coating on polyphenol oxidase and pectin methylesterase activities. *Food Research International*, 62, 974–983. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.011>
- ZHELYAZKOV, S., ZSIVANOVITS, G., BRASHLYANOVA, B., & MARUDOVA-ZSIVANOVITS, M. (2014). Shelf-life extension of fresh-cut apple cubes with chitosan coating. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20(3), 536–540.
- ZIA, K. M., TABASUM, S., KHAN, M. F., AKRAM, N., AKHTER, N., NOREEN, A., *et al.* (2018). Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1068–1087.
- ZUDAIRE, L., VIÑAS, I., PLAZA, L., IGLESIAS, M. B., ABADIAS, M., & AGUILÓ-AGUAYO, I. (2018). Evaluation of postharvest calcium treatment and biopreservation with *Lactobacillus rhamnosus* GG on the quality of fresh-cut ‘Conference’ pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(13), 4978–4987. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9031>

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

**More
Books!**



yes
I want morebooks!

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at
www.morebooks.shop

¡Compre sus libros rápido y directo en internet, en una de las librerías en línea con mayor crecimiento en el mundo! Producción que protege el medio ambiente a través de las tecnologías de impresión bajo demanda.

Compre sus libros online en
www.morebooks.shop



info@omniscryptum.com
www.omniscryptum.com

OMNIScriptum



FOR AUTHOR USE ONLY