



TESIS DOCTORAL

**TECNOLOGÍAS VERDES PARA EL CONTROL
DEL DETERIORO MICROBIANO, NUTRICIONAL
Y SENSORIAL EN JUGOS Y FRUTAS DE IV
GAMA**

AUTOR

ING. BÁRBARA MARÍA TOMADONI

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ALEJANDRA GRACIELA PONCE-FI UNMDP

CO-DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA VICTORIA AGÜERO-FIUBA

JURADO DE TESIS

DRA. NORA J. FRANCOIS-FIUBA

DRA. ANDREA GOMEZ-ZAVAGLIA-FCE UNLP

DR. ARIEL R. VICENTE- FCE UNLP

DRA. SONIA Z. VIÑA-FCAYF UNLP

LUGAR DE TRABAJO

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN INGENIERÍA EN ALIMENTOS-FI UNMDP

(EN EL MARCO DE UNA BECA INTERNA DOCTORAL CONICET)

**FACULTAD DE INGENIERÍA – UNIVERSIDAD DE BUENOS
AIRES**

BUENOS AIRES, NOVIEMBRE DE 2017

La presente Tesis Doctoral fue desarrollada en el período 2013-2017 en el Grupo de Investigación en Ingeniería en Alimentos (GIIA) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP). La formación académica se llevó a cabo en la Universidad de Buenos Aires (UBA), así como también en la UNMdP. Para la realización de la misma, fui beneficiada con una Beca Interna Doctoral otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), bajo la dirección de la Dra. Alejandra Ponce (Investigadora Independiente de CONICET- GIIA, Facultad de Ingeniería, UNMdP) y la co-dirección de la Dra. María del Rosario Moreira (Investigadora Independiente de CONICET- GIIA, Facultad de Ingeniería, UNMdP). Así mismo, esta Tesis Doctoral fue co-dirigida por la Dra. María Victoria Agüero (Investigadora Adjunta de CONICET- Laboratorio de Microbiología Industrial: Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería, UBA). Además, como participante de un Proyecto de Cooperación Bilateral Tipo II (CONICET-CSIC), dirigido por las Dras. Moreira y Fiszman (contraparte española) en 2016 realicé una estancia de investigación de 3 meses en el laboratorio de Propiedades Físicas y Sensoriales de Alimentos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA, CSIC, España). A partir de las investigaciones llevadas a cabo en el marco de la presente Tesis Doctoral, surgieron los siguientes trabajos presentados en congresos nacionales e internacionales, y publicados o en proceso de publicación en revistas científicas con referato:

1. Presentaciones en congresos nacionales e internacionales:

- ✓ Tomadoni, B., Ponce, A., Pereda, M., y Ansorena, M. R. (2017). Optimization of chitosan-based films with vanillin for food packaging application. *CYTAL 2017-XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Mar del Plata, Argentina. Del 18 al 20 de Septiembre de 2017.
- ✓ Tarrega, A., Tomadoni, B., Moreira, M., y Fiszman, S. (2017). How labelling and sensory properties affect expectations of satiety. A case-study with strawberry milkshakes. *Pangborn 2017- 12th Pangborn Sensory Science Symposium*. Providence, Rhode Island, USA. Del 20 al 24 de Agosto de 2017.
- ✓ Tomadoni, B., Ponce, A., Ansorena, M. R., y Pereda, M. (2017). Chitosan-based films with vanillin: optimization of formulation by response surface methodology.

- CAIQ 2017- IX Congreso Argentino de Ingeniería Química*. Bahía Blanca, Argentina. Del 6 al 9 de Agosto de 2017. Trabajo completo.
- ✓ Tomadoni, B., Pereda, M., Viacava, G. E., Moreira, M. R., y Ponce, A. (2016). Recubrimientos de gelano con agregado de compuestos naturales: control de la microflora nativa de frutilla cortada durante el almacenamiento refrigerado. *CICYTAC 2016- VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Córdoba, Argentina. Del 2 al 4 de Noviembre de 2016.
 - ✓ Tomadoni, B., Mosiewicki, M., Pereda, M., y Ponce, A. (2016). Effect of chitosan-based edible coatings with natural compounds on the microbial preservation of minimally processed strawberries. *SLAP 2016- XV Simposio Latinoamericano de Polímeros* junto con el *XIII Congreso Iberoamericano de Polímeros*. Riviera Maya, México. Del 23 al 27 de Octubre de 2016.
 - ✓ Tomadoni, B., Cassani, L., Moreira, M. R., y Ponce, A. (2015). Aplicación de ultrasonido a frutillas mínimamente procesadas: evolución de la microflora nativa durante el almacenamiento refrigerado. *JABTP 2015- VIII Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Postcosecha*. Balcarce, Argentina. Del 10 al 12 de Noviembre de 2015. Exposición oral.
 - ✓ Tomadoni, B., Cassani, L., Ponce, A., Moreira, M. R., Agüero, M. V. (2015). Tecnología de obstáculos para la preservación de jugo de frutilla: optimización mediante superficie de respuesta. *CYTAL 2015- XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Buenos Aires, Argentina. Del 3 al 5 de Noviembre de 2015.
 - ✓ Tomadoni, B., Moreira, M. R., Ansorena, R., Ponce, A. (2015). Production of kiwifruit juice and strawberry juice powders obtained by freeze-drying: impact on quality parameters. *Innovations in Food Packaging, Shelf Life and Food Safety*. Munich, Alemania. Del 15 al 17 de Septiembre de 2015.
 - ✓ Tomadoni, B., Cassani, L., Ponce, A., y Moreira, M. R. (2014). Ultrasound as non-thermal processing technology in strawberry juice: effect on native microflora and colour evolution during refrigerated storage. *CICYTAC 2014- V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Córdoba, Argentina. Del 17 al 19 de Noviembre de 2014.
 - ✓ Tomadoni, B., Cassani, L., Moreira, M. R., y Ponce, A. (2014). Application of vanillin and geraniol as non-thermal technologies in strawberry juice preservation.

Food Innova 2014. Concordia, Entre Ríos, Argentina. Del 20 al 23 de Octubre de 2014.

- ✓ Tomadoni, B., Moreira, M. R., Alvarez, M. V., y Ponce, A. (2014). Tecnologías no térmicas: calidad microbiológica y nutricional en jugo de kiwi tratado con extracto de granada y ultrasonido. *JABTP 2014- VII Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Postcosecha*. La Plata, Argentina. 28, 29 y 30 de Mayo de 2014.
- ✓ Tomadoni, B., Ponce A., y Moreira, M. R. (2013). Métodos físicos de preservación y su impacto sobre la calidad microbiológica de jugos de frutilla. *XIII Congreso Argentino de Microbiología junto con el II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental*. Ciudad de Buenos Aires 23, 24, 25 y 26 de Septiembre de 2013.
- ✓ Tomadoni, B., Moreira, M. R., y Ponce, A. (2013). Aplicación de tratamientos térmicos suaves y ultrasonido para el control microbiano en jugos de Kiwi. *CYTAL 2013- XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 23, 24 y 25 de Octubre de 2013.

2. Trabajos publicados en revistas internacionales con referato o enviados para su publicación:

- ✓ Tomadoni, B., Fiszman, S., Moreira, M. R., y Tarrega, A. (2017). The role of the dynamic sensory perception in the reformulation of shakes. Use of TDS for studying the effect of milk, fiber and flavor addition. *Journal of Food Science*. En prensa DOI: 10.1111/1750-3841.14008.
- ✓ Tomadoni, B., Cassani, L., Moreira, M. R., Ponce, A., y Agüero, M. V. (2017). Combination of ultrasound with natural antimicrobials to enhance quality parameters of strawberry juice: An optimization study. *Journal of Food Science and Technology*. JFST-D-17-00108R1. Aceptado con revisiones (20/11/2017).
- ✓ Tomadoni, B., Cassani, L., Viacava, G., Moreira, M. R., y Ponce, A. (2017). Effect of ultrasound and storage time on quality attributes of strawberry juice. *Journal of Food Process Engineering*, 40 (5), e12533. DOI: 10.1111/jfpe.12533.
- ✓ Tomadoni, B., Moreira, M. R., y Ponce, A. (2016). Anti-quorum sensing activity of natural compounds against *Chromobacterium violaceum*. *Ann Food Sci Nutr*; 1 (1), 43-48.

- ✓ Tomadoni, B., Cassani, L., Ponce, A., Moreira M. R., y 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. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.05.024
- ✓ Tomadoni, B., Viacava, G., Cassani, L., Moreira, M. R., y Ponce, A. (2016). Novel biopreservatives to enhance the safety and quality of strawberry juice. *Journal of Food Science and Technology*, 53 (1), 281-292. DOI: 10.1007/s13197-015-2068-9.
- ✓ 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. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.06.039.

La experiencia adquirida a lo largo de este doctorado me permitió colaborar con otros colegas y grupos de investigación. A partir de estos trabajos en colaboración surgieron las siguientes publicaciones, algunas de las cuales se encuentran actualmente en revisión:

- ✓ Tomadoni, B., Moreira M. R., Espinosa, J. P., y Ponce, A. (2017). Individual and combined effects of pomegranate extract and ultrasonic treatments on kiwifruit juice quality parameters. *Journal of Food Process Engineering*, 40 (1), e12339. DOI: 10.1111/jfpe.12339.
- ✓ Cassani, L., Tomadoni, B., Ponce, A., y 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. DOI: 10.1007/s11947-017-1914-3.
- ✓ Cassani, L., Tomadoni, B., Moreira, M. R., Ponce, A., y Agüero, M. V. (2017). Optimization of inulin:oligofructose proportion and non-thermal processing to enhance microbiological and sensorial properties of fiber-enriched strawberry juice. *LWT-Food Science and Technology*, 80, 446-455. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.03.016
- ✓ Goñi, M. G., Tomadoni, B., Roura, S. I., y Moreira, M. R. (2017). Lactic acid as potential substitute of acetic acid for dissolution of chitosan: preharvest application to Butterhead lettuce. *Journal of Food Science and Technology*, 54 (3), 620-626. DOI: 10.1007/s13197-016-2484-5
- ✓ Cassani, L., Tomadoni, B., Viacava, G., Ponce, A., y 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. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.04.037

- ✓ Goñi, M. G., Tomadoni, B., Audisio, M. C., Ibarguren, C., Roura, S. I., Moreira, M. R., y Ponce, A. G. (2016). Application of bacteriocins from *Enterococcus hirae* on Butterhead lettuce seeds inoculated with *Escherichia coli* O157:H7. *International Food Research Journal*, 23 (6), 2653-2660.
- ✓ Moreira, M. R., Tomadoni, B., Martín-Belloso, O., y Soliva-Fortuny, R. (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. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.07.002.
- ✓ Goñi, M. G., Tomadoni, B., Roura, S. I., y Moreira, M. R. (2014). Effect of preharvest application of chitosan and tea tree essential oil on postharvest evolution of lettuce native microflora and exogenous *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Safety*, 34 (4), 353-360. DOI: 10.1111/jfs.12135.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a las directoras de esta Tesis, la Dra. Alejandra Ponce, la Dra. María Victoria Agüero y la Dra. María del Rosario Moreira por guiarme a lo largo de estos años, por la confianza depositada en mí, dándome libertad y apoyándome constantemente.

A la Mg. María Elida Pirovani, la Dra. Silvia del Carmen Rodríguez y la Dra. Nora Judit Francois por el seguimiento de este trabajo.

A la Universidad de Buenos Aires por permitirme realizar mis estudios de doctorado, y a la Universidad Nacional de Mar del Plata por permitirme desarrollar las tareas de investigación del mismo en el GIIA.

A la UNMdP, la ANPCyT y al CONICET por el financiamiento de este trabajo.

A la Compañía Industrial Frutihortícola S.A. por facilitarnos la materia prima.

Al Instituto de Investigaciones de Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA) y en especial, a la Dra. Mariana Pereda por su colaboración en el desarrollo de recubrimientos comestibles.

A la Dra. Susana Fiszman y a la Dra. Amparo Tarrega por abrirme las puertas del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA, CSIC, España) y hacerme sentir como en casa. A Esmeralda, Yanina, Mónica, Johanna, Alejandra y Arantxa por los momentos compartidos durante la estancia.

Un especial agradecimiento a la Dra. María Victoria Agüero por su invaluable aporte y dedicación en la corrección del Capítulo 4, y a la Dra. Amparo Tarrega por sus correcciones y aportes al Capítulo 6.

A mis compañeras del GIIA por el constante apoyo y por los buenos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio en todos estos años. Especialmente: a Gaby G. por su dedicación desde mis inicios en el GIIA, siempre predispuesta a ayudar desinteresadamente; a Vicky A. por su ayuda en los estudios *in vitro* y el contacto con Compañía Industrial Frutihortícola S.A.; a Gaby V. por su importante aporte en la puesta a punto y medición de antioxidantes; y a Lucía, por las innumerables corridas compartidas pero principalmente, por su amistad.

A Jonathan, por su amor, contención y permanencia, pero sobre todo por su paciencia en este último tiempo.

Y por último, a mi familia, toda, pero en especial a mi hermana y a mis padres por su apoyo infinito y su eterna paciencia, por los valores y la educación que me han brindado. *¡Muchas gracias!*

RESUMEN

Tecnologías verdes para el control del deterioro microbiano, nutricional y sensorial en jugos de fruta y frutas de IV gama

Un consumo suficiente de frutas y hortalizas aporta importantes beneficios para la salud y previene enfermedades tales como cardiopatías, diabetes, obesidad y cáncer. Los consumidores de hoy en día eligen una alimentación más saludable, evitan el consumo de aditivos sintéticos y a su vez, buscan alimentos con excelente calidad sensorial. De esta manera, surgen productos mínimamente procesados como las frutas de IV gama y los jugos de fruta sin pasteurizar. Estos productos, altamente perecederos y susceptibles al deterioro, requieren del diseño de nuevas estrategias de preservación no térmicas de bajo impacto ambiental, que puedan cumplir con las demandas de los consumidores y a la vez, alargar la vida útil de estos productos, asegurando también su inocuidad. En particular, la presente Tesis se desarrollará empleando frutillas como sustrato (*Fragaria x ananassa*), una de las frutas finas de mayor importancia económica en nuestro país, y particularmente, uno de los cultivos predominantes del cinturón frutihortícola del partido de Gral. Pueyrredón (Buenos Aires, Argentina). De esta manera, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue *incrementar la seguridad microbiológica y la vida útil de jugo de frutilla y frutilla de IV gama mediante la aplicación de tecnologías verdes de bajo impacto ambiental*.

En el Capítulo 1 de esta Tesis se realizaron estudios *in vitro* para evaluar la actividad antimicrobiana de dos preservantes de origen natural, vainillina y geraniol, frente a cuatro cepas indicadoras de importancia en la industria de alimentos: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Pseudomonas aeruginosa*. Además, se evaluó la actividad anti *quorum sensing* de estos bioactivos mediante un ensayo frente a *Chromobacterium violaceum*. Los resultados obtenidos en este Capítulo demostraron el potencial de los compuestos bioactivos estudiados para su aplicación como biopreservantes *in vivo* con el fin de garantizar la inocuidad de jugos de fruta y frutas mínimamente procesadas.

En los Capítulos 2 y 3 se evaluaron diferentes tecnologías de preservación sobre jugo de frutilla. Por un lado, en el Capítulo 2 se aplicaron tres biopreservantes

(vainillina, geraniol y extracto de granada) en diferentes concentraciones; por otro lado, en el Capítulo 3 se evaluaron tratamientos de ultrasonido a 40 kHz. Los jugos de frutilla tratados se almacenaron bajo refrigeración a 5°C para evaluar la evolución de parámetros de calidad microbiológica, nutricional y sensorial a través del tiempo. Además, se llevó a cabo una inoculación con *E. coli* O157:H7, para evaluar la efectividad de los tratamientos propuestos sobre el control del patógeno durante el almacenamiento.

De esta manera, en el Capítulo 4 se propuso la evaluación de la aplicación combinada de ultrasonido con los biopreservantes estudiados en los capítulos previos, con el objetivo de potenciar su efecto antimicrobiano, reduciendo las concentraciones de cada agente y así, mejorar las propiedades sensoriales y nutricionales del jugo de frutilla. Se estudiaron dos combinaciones: ultrasonido + extracto de granada + vainillina (Combinación de barreras 1); y ultrasonido + extracto de granada + geraniol (Combinación de barreras 2). Cada una de las barreras, en cada combinación, fue evaluada en tres niveles o intensidades. Con el objetivo de hallar los niveles óptimos de cada barrera, se utilizó la Metodología de Superficie de Respuesta, combinando los niveles de las barreras de acuerdo a un diseño de Box-Behnken. De esta manera, para cada combinación propuesta se aplicaron 15 tratamientos diferentes sobre el jugo de frutilla. Luego de un almacenamiento refrigerado durante 14 días a 5°C, se evaluaron distintos parámetros de calidad microbiológica, nutricional y sensorial de los jugos. Se utilizó la función Deseabilidad para optimizar simultáneamente todos los parámetros. De esta manera, se halló un tratamiento óptimo para cada combinación estudiada: 7,5 min de tratamiento de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,9375 mg/mL de vainillina (OPT1); y 30 min de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,15 µL/mL de geraniol (OPT2). El enfoque estadístico utilizado fue muy útil para alcanzar un compromiso entre las diferentes respuestas estudiadas, reduciendo la carga microbiana, y a la vez, maximizando las propiedades nutricionales y minimizando el impacto en la calidad sensorial en el jugo de frutilla. La combinación de barreras permitió hallar dos tratamientos óptimos que lograron estabilizar microbiológicamente el jugo de frutilla sin pasteurizar por 14 días, aumentando incluso la capacidad antioxidante del producto, con una vida útil limitada fundamentalmente por sus atributos sensoriales.

En el Capítulo 5 de esta Tesis se evaluó la aplicación de diferentes tecnologías de preservación sobre la calidad microbiológica y sensorial de frutilla cortada. En primer lugar, se evaluaron diferentes recubrimientos basados en dos polisacáridos: gelano y quitosano. A estos recubrimientos se le incorporaron vainillina, geraniol y extracto de granada, para obtener diferentes recubrimientos compuestos. Por otro lado, se evaluaron tratamientos de ultrasonido a 40 kHz. Las frutillas cortadas y tratadas fueron almacenadas por 7 días bajo refrigeración (5°C) para evaluar la evolución de la microflora nativa y de los atributos sensoriales. Los tratamientos de preservación abordados en este Capítulo no lograron extender la vida útil del producto desde el punto de vista microbiológico y sensorial, y particularmente ninguno fue capaz de mejorar significativamente la textura, uno de los parámetros organolépticos claves en frutas y verduras mínimamente procesadas.

Finalmente, en el Capítulo 6, se trabajó en el desarrollo de una bebida con efecto saciante a base de frutilla. La obesidad y el sobrepeso continúan en alza en nuestro país, y una nueva estrategia para afrontar este problema consiste en el desarrollo de alimentos funcionales no sólo con bajo aporte calórico, sino que además presenten capacidad saciante. Para ello, se evaluó la incorporación de fibras solubles (inulina + oligofruktosa) y proteína de leche (leche en polvo descremada) sobre un batido de frutilla, con y sin agregado de saborizante. Por un lado, se estudió el impacto de las diferentes formulaciones sobre el perfil dinámico sensorial, mediante la evaluación del Predominio Temporal de Sensaciones con un panel de evaluadores entrenados. Por otro lado, se evaluó la aceptabilidad de los diferentes batidos y su expectativa de saciedad en un ensayo con 100 consumidores. Esta tarea se llevó a cabo en tres escenarios diferentes: condición esperada, donde los consumidores evaluaron únicamente las etiquetas de los batidos; condición ciega, donde probaron el producto en ciego sin información sobre su formulación; y condición informada, donde probaron el batido analizando en conjunto su etiqueta. Los resultados indicaron que la adición de fibras solubles podría ser una buena alternativa para el diseño de batidos de frutas y leche bajos en grasas y libres de azúcar, con capacidad saciante.

La presente Tesis Doctoral contribuyó a ampliar los conocimientos acerca del uso de tecnologías verdes para la conservación de jugos de frutilla no tratados térmicamente y frutillas mínimamente procesadas. Principalmente, la optimización de tecnologías

verdes combinadas propuestas en esta Tesis, permitió extender la vida útil del jugo de frutilla sin pasteurizar, mejorando la calidad global del producto.

SUMMARY

Green technologies for microbial, nutritional and sensory deterioration control in juice and minimally processed fruits

A sufficient consumption of fruits and vegetables brings important health benefits and prevents diseases such as heart disease, diabetes, obesity and cancer. Nowadays, consumers choose a healthier diet, avoiding the consumption of synthetic additives and looking for food products with excellent sensory quality. In this sense, products such as fresh-cut fruits and unpasteurized fruit juices have aroused. These products, highly perishable and susceptible to deterioration, require the design of new strategies for non-thermal preservation technologies with low environmental impact. These technologies should meet consumers' demands and at the same time, extend the shelf-life of these products, ensuring their safety. In particular, the investigations of this Thesis were carried out on strawberries (*Fragaria x ananassa*) as a subject of study, a fine fruit of great economic importance in Argentina, and in particular, one of the predominant crops in the horticultural production belt in Gral. Pueyrredón (Buenos Aires, Argentina). Therefore, the main objective of this Doctoral Thesis was *to increase the microbiological safety and the shelf-life of strawberry juice and fresh-cut strawberry by application of green technologies with low environmental impact.*

In vitro studies were carried out in Chapter 1 to evaluate the antimicrobial activity of two natural preservatives, vanillin and geraniol, against four important indicator strains in the food industry: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa*. In addition, the anti-*quorum sensing* activity of these bioactive agents was evaluated against *Chromobacterium violaceum*. The results obtained in this Chapter demonstrated the potential of these bioactive compounds as biopreservatives for their application *in vivo* in order to guarantee the safety of minimally processed fruits and fruit juices.

In Chapters 2 and 3, different preservation technologies were evaluated on unpasteurized strawberry juice. On the one hand, in Chapter 2, three biopreservatives (vanillin, geraniol and pomegranate extract) were applied in different concentrations; on the other hand, in Chapter 3, ultrasound treatments at 40 kHz were evaluated. The

treated strawberry juices were stored under refrigeration at 5°C to evaluate the evolution of microbiological, nutritional and sensory quality parameters over time. In addition, an inoculation with *E. coli* O157:H7 was carried out to evaluate the effectiveness of the proposed treatments on pathogen control during storage.

Consequently, the evaluation of combinations of ultrasound with biopreservatives was proposed in Chapter 4, with the aim of enhancing the antimicrobial effect, reducing the intensities of each technology and thus, improving the sensory and nutritional properties of the strawberry juice. Two combinations were studied: ultrasound + pomegranate extract + vanillin (Hurdle technology 1); and ultrasound + pomegranate extract + geraniol (Hurdle technology 2). Each of the hurdles, in each combination, was evaluated at three levels or intensities. In order to find the optimal levels of each hurdle technology, the Response Surface Methodology was used, combining the different levels of each hurdle according to a Box-Behnken design. In this way, for each proposed combination, 15 different treatments were applied on strawberry juice. After refrigerated storage for 14 days at 5°C, different parameters of microbiological, nutritional and sensory quality were evaluated. The Desirability function was used to simultaneously optimize all parameters. Thus, an optimal treatment for each combination was found: 7,5 min of ultrasound treatment + 360 µg/mL of pomegranate extract + 0,9375 mg/mL of vanillin (OPT1); and 30 min ultrasound + 360 µg/mL pomegranate extract + 0,15 µL/mL geraniol (OPT2). The statistical approach used was very useful to reach a compromise between the different responses studied, reducing the microbial load, and at the same time, maximizing the nutritional properties and minimizing the impact on sensory quality of strawberry juice. Hurdle technology allowed finding two optimal treatments that managed to microbiologically stabilize unpasteurized strawberry juice for 14 days, increasing the antioxidant capacity of the product, with a shelf-life mainly limited by its sensory attributes.

In Chapter 5 of this Thesis, the application of different preservation technologies was evaluated on the microbiological and sensory quality of fresh-cut strawberries. First, different edible coatings based on two polysaccharides were evaluated: gellan gum and chitosan. These coatings were incorporated with vanillin, geraniol and pomegranate extract, to obtain different composite coatings. On the other hand, ultrasound treatments at 40 kHz were evaluated. The fresh-cut treated strawberries were stored for 7 days under refrigeration (5°C) to evaluate the evolution of the native

microflora and the sensory attributes. The preservation treatments evaluated in this Chapter failed to extend the shelf-life of the product from a microbiological and sensory point of view, and particularly none was able to significantly improve the texture, one of the key organoleptic parameters in minimally processed fruits and vegetables.

Finally, in Chapter 6, the development of a strawberry shake with enhanced satiating effect was studied. Obesity and overweight continue to rise in Argentina, and a new strategy to address this problem is the development of functional foods, not only with low caloric intake, but also with satiety capacity. For this purpose, the incorporation of soluble fibers (inulin + oligofructose) and milk protein (skim milk powder) was evaluated on strawberry milkshakes, with and without flavor agent addition. On the one hand, the impact of the different formulations on the sensory dynamic profile was studied by evaluating the Temporal Dominance of Sensations with trained panelists. On the other hand, the acceptability of the different shakes and their expectation of satiety were evaluated in a trial with 100 consumers. This task was carried out in three different scenarios: expected condition, where consumers evaluated only the labels of the shakes; blind condition, where they tested the product without information on its formulation; and informed condition, where they tested each shake by simultaneously analyzing its corresponding label. The results indicated that the addition of soluble fibers could be a good alternative for the design of low-fat and sugar-free milk and fruit shakes with enhanced satiety capacity.

The present Doctoral Thesis contributed to broaden the knowledge on the use of green technologies for conservation of non-thermally treated strawberry juice and fresh-cut strawberries. Mainly, the optimization of hurdle green technologies proposed in this Thesis, allowed to extend the shelf-life of unpasteurized strawberry juice, improving the overall quality of the product.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. PRODUCTOS FRUTIHORTÍCOLAS	3
1.1. Frutas y hortalizas en la dieta	3
1.2. Tendencias en productos frutihortícolas	3
1.2.1. <i>Frutas de IV gama</i>	3
1.2.2. <i>Jugos de fruta sin pasteurizar</i>	4
1.3. Producción frutícola en Argentina	5
1.3.1. <i>Producción de frutillas en Argentina y en el Partido de Gral. Pueyrredón</i>	7
2. GENERALIDADES DE LA FRUTILLA (<i>Fragaria x ananassa</i>)	9
2.1. Taxonomía y origen	9
2.2. Características generales y variedades	10
2.3. Enfermedades y daños postcosecha	11
3. TECNOLOGÍAS EMERGENTES DE PRESERVACIÓN	12
3.1. Preservantes de origen natural	12
3.2. Películas y recubrimientos comestibles	15
3.3. Tecnologías físicas no térmicas	16
3.4. Tecnología de obstáculos	18
4. ALIMENTOS FUNCIONALES	19
4.1. Tendencias actuales	19
4.2. Definición de alimento funcional	20
4.3. Alimentos funcionales para combatir la obesidad	22
OBJETIVOS Y ESQUEMA DE TRABAJO	25
1. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
2. ESQUEMA DE TRABAJO	29
CAPÍTULO 1: Compuestos de origen natural con potencial uso en jugos y frutas de IV gama: estudios <i>in vitro</i>	31

RESUMEN DEL CAPÍTULO	33
1. INTRODUCCIÓN	35
2. MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.1. Preservantes de origen natural	39
2.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana	40
2.2.1. <i>Cepas y condiciones de cultivo</i>	40
2.2.2. <i>Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria: método de microdilución en caldo</i>	40
2.3. Ensayo cuantitativo de la inhibición de <i>quorum sensing</i>	41
2.3.1. <i>Cepas y condiciones de cultivo</i>	41
2.3.2. <i>Cuantificación de la producción de violaceína</i>	41
2.3.3. <i>Ensayo de viabilidad</i>	42
2.3.4. <i>Estimación de la Mínima Concentración Inhibitoria de Quorum Sensing</i>	42
2.4. Análisis estadístico	43
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
3.1. Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de los compuestos naturales	44
3.2. Actividad anti- <i>quorum sensing</i> de los compuestos naturales frente a <i>C. violaceum</i>	46
3.2.1. <i>Actividad inhibitoria de la vainillina sobre el quorum sensing</i>	47
3.2.2. <i>Actividad inhibitoria del geraniol sobre el quorum sensing</i>	48
3.2.3. <i>Determinación de la MCIQS de los compuestos naturales frente a C. violaceum</i>	50
4. CONCLUSIONES	51

CAPÍTULO 2: Aplicación de vainillina, geraniol y extracto de granada en jugo de frutilla sin pasteurizar **53**

RESUMEN DEL CAPÍTULO	55
1. INTRODUCCIÓN	57
2. MATERIALES Y MÉTODOS	59
2.1. Preservantes de origen natural	59
2.2. Caracterización del extracto de granada mediante HPLC	60
2.2.1. <i>Soluciones estándares</i>	60

2.2.2. Preparación de la muestra	60
2.2.3. Equipo	60
2.3. Procesamiento de materia prima y aplicación de los biopreservantes	61
2.4. Estudio de inoculación de jugo de frutilla con <i>Escherichia coli</i> O157:H7	61
2.4.1. Reactivación de <i>E. coli</i> O157:H7 y preparación del inóculo	61
2.4.2. Inoculación de muestras de jugo de frutilla	62
2.5. Análisis fisicoquímicos	62
2.5.1. Sólidos solubles totales	62
2.5.2. Acidez titulable	62
2.6. Evaluación instrumental del color	63
2.7. Análisis microbiológicos	63
2.8. Extracción de antioxidantes y compuestos polifenólicos	64
2.8.1. Actividad secuestrante del radical DPPH	64
2.8.2. Contenido de polifenoles totales	65
2.9. Análisis sensorial	66
2.10. Análisis estadístico	66
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
3.1. Efecto de los agentes naturales sobre parámetros fisicoquímicos de jugo de frutilla	67
3.1.1. Evolución de los sólidos solubles totales	67
3.1.2. Evolución de acidez titulable	68
3.2. Efecto de los agentes naturales sobre los parámetros de color de jugo de frutilla	69
3.3. Efecto de los agentes naturales sobre la microflora nativa de jugo de frutilla	71
3.3.1. Evolución de bacterias mesófilas	71
3.3.2. Evolución de hongos y levaduras	73
3.3.3. Evolución de bacterias psicrófilas	75
3.3.4. Vida útil desde el punto de vista microbiológico	76
3.4. Efecto de los agentes naturales sobre el control de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculado en jugo de frutilla	79
3.5. Efecto de los agentes naturales sobre propiedades antioxidantes de jugo de frutilla	80
3.5.1. Evolución de la capacidad antioxidante	81

3.5.2. <i>Evolución del contenido de polifenoles totales</i>	83
3.6. Efecto de los agentes naturales sobre las propiedades sensoriales de jugo de frutilla	84
4. CONCLUSIONES	87

CAPÍTULO 3: Aplicación de tratamientos de ultrasonido en jugo de frutilla sin pasteurizar **89**

RESUMEN DEL CAPÍTULO	91
1. INTRODUCCIÓN	93
2. MATERIALES Y MÉTODOS	95
2.1. Procesamiento de materia prima y aplicación de ultrasonido	95
2.2. Estudio de inoculación de jugo de frutilla con <i>Escherichia coli</i> O157:H7	96
2.3. Análisis fisicoquímicos	96
2.4. Evaluación instrumental del color	96
2.5. Análisis microbiológicos	96
2.6. Extracción de antioxidantes y compuestos polifenólicos	96
2.7. Análisis sensorial	97
2.8. Análisis estadístico	97
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	97
3.1. Efecto del tiempo de ultrasonido sobre las características fisicoquímicas de jugo de frutilla	97
3.2. Efecto del ultrasonido sobre los parámetros de color de jugo de frutilla	98
3.3. Efecto del ultrasonido en la microflora nativa de jugo de frutilla	99
3.3.1. <i>Evolución de bacterias mesófilas</i>	100
3.3.2. <i>Evolución de hongos y levaduras</i>	101
3.3.3. <i>Evolución de bacterias psicrófilas</i>	102
3.3.4. <i>Vida útil desde el punto de vista microbiológico</i>	103
3.4. Efecto del ultrasonido sobre el control de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculado en jugo de frutilla	105
3.5. Efecto del ultrasonido sobre propiedades antioxidantes de jugo de frutilla	106
3.5.1. <i>Evolución de la capacidad antioxidante</i>	106
3.5.3. <i>Evolución del contenido de polifenoles totales</i>	107

3.6. Efecto de ultrasonido sobre la calidad sensorial de jugo de frutilla	109
4. CONCLUSIONES	110

CAPÍTULO 4: Combinación de barreras en jugo de frutilla: optimización mediante superficie de respuesta **113**

RESUMEN DEL CAPÍTULO	115
1. INTRODUCCIÓN	117
2. MATERIALES Y MÉTODOS	119
2.1. Materia prima y preparación de muestras	119
2.2. Optimización de las combinaciones de barreras	119
2.2.1. <i>Tecnologías de preservación o barreras</i>	120
2.2.2. <i>Diseño experimental</i>	120
2.2.3. <i>Variables respuesta</i>	123
2.2.3.1. Análisis microbiológicos	123
2.2.3.2. Extracción de antioxidantes y compuestos polifenólicos	123
2.2.3.3. Retención de ácido ascórbico	124
2.2.3.4. Análisis sensorial	124
2.2.4. <i>Optimización simultánea y validación</i>	124
2.3. Efecto de los tratamientos óptimos sobre los parámetros de calidad de jugo de frutilla durante el almacenamiento refrigerado	126
2.4. Estudio de inoculación de jugo de frutilla con <i>Escherichia coli</i> O157:H7	126
2.5. Análisis estadístico	126
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	127
3.1. Modelado y optimización	127
3.1.1. <i>Combinación de barreras 1: US+EG+V</i>	127
3.1.1.1. Ajuste de los modelos y selección de variables respuesta a optimizar	127
3.1.1.2. Análisis de los modelos de las variables seleccionadas	130
3.1.1.3. Optimización simultánea y validación	142
3.1.2. <i>Combinación de barreras 2: US+EG+G</i>	145
3.1.2.1. Ajuste de los modelos y selección de variables respuesta a optimizar	145

3.1.2.2. Análisis de los modelos de las variables respuesta seleccionadas	148
3.1.2.3. Optimización simultánea y validación	159
3.2. Efecto de los tratamientos óptimos sobre parámetros de calidad de jugo de frutilla durante el almacenamiento	163
3.2.1. <i>Efecto de los tratamientos óptimos sobre la calidad microbiológica de jugo de frutilla durante el almacenamiento</i>	164
3.2.2. <i>Efecto de los tratamientos óptimos sobre la calidad nutricional de jugo de frutilla durante el almacenamiento</i>	166
3.2.3. <i>Efecto de los tratamientos óptimos sobre la calidad sensorial de jugo de frutilla durante el almacenamiento</i>	169
3.3. Efecto de los tratamientos óptimos sobre el control de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculado en jugo de frutilla	171
4. CONCLUSIONES	173

CAPÍTULO 5: Recubrimientos comestibles y tratamientos de ultrasonido en frutilla de IV gama **177**

RESUMEN DEL CAPÍTULO	179
1. INTRODUCCIÓN	181
2. MATERIALES Y MÉTODOS	184
2.1. Soluciones formadoras de películas	184
2.1.1. <i>Materiales</i>	184
2.1.1.1. Agentes formadores de películas	184
2.1.1.2. Preservantes de origen natural	184
2.1.1.3. Agente plastificante	185
2.1.2. <i>Preparación de las soluciones formadoras de películas</i>	185
2.1.2.1. Soluciones de gelano	185
2.1.2.2. Soluciones de quitosano	185
2.2. Procesamiento de materia prima y aplicación de tratamientos	186
2.2.1. <i>Aplicación de recubrimientos</i>	186
2.2.2. <i>Aplicación de ultrasonido</i>	186
2.2.3. <i>Condiciones de envasado y almacenamiento</i>	186
2.3. Análisis microbiológicos	187

2.4. Análisis sensorial	187
2.5. Análisis estadístico	188
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	188
3.1. Recubrimientos de gelano	188
<i>3.1.1. Efecto de recubrimientos de gelano sobre la microflora nativa de frutilla cortada</i>	<i>188</i>
3.1.1.1. Evolución de bacterias mesófilas	189
3.1.1.2. Evolución de hongos y levaduras	189
3.1.1.3. Evolución de bacterias psicrófilas	190
3.1.1.4. Vida útil desde el punto de vista microbiológico	191
<i>3.1.2. Efecto de recubrimientos de gelano sobre las propiedades sensoriales de frutilla cortada</i>	<i>192</i>
3.2. Recubrimientos de quitosano	195
<i>3.2.1. Efecto de recubrimientos de quitosano sobre la microflora nativa de frutilla cortada</i>	<i>195</i>
3.2.1.1. Evolución de bacterias mesófilas	195
3.2.1.2. Evolución de hongos y levaduras	196
3.2.1.3. Evolución de bacterias psicrófilas	197
3.2.1.4. Vida útil desde el punto de vista microbiológico	198
<i>3.2.2. Efecto de recubrimientos de quitosano sobre las propiedades sensoriales de frutilla cortada</i>	<i>201</i>
3.3. Tratamientos de ultrasonido	204
<i>3.3.1. Efecto de tratamientos de ultrasonido sobre la microflora nativa de frutilla cortada</i>	<i>204</i>
3.3.1.1. Evolución de bacterias mesófilas	204
3.3.1.2. Evolución de hongos y levaduras	205
3.3.1.3. Evolución de bacterias psicrófilas	206
3.3.1.4. Vida útil desde el punto de vista microbiológico	207
<i>3.3.2. Efecto de tratamientos de ultrasonido sobre las propiedades sensoriales de frutilla cortada</i>	<i>208</i>
4. CONCLUSIONES	210

<u>CAPÍTULO 6: Desarrollo de una bebida con efecto saciante basada en pulpa de frutilla: predominio temporal de sensaciones y estudio de expectativas</u>	<u>213</u>
RESUMEN DEL CAPÍTULO	215
1. INTRODUCCIÓN	217
2. MATERIALES Y MÉTODOS	220
2.1. Composición y preparación de las muestras	220
2.2. Predominio Temporal de Sensaciones	221
2.3. Estudio de expectativas	222
2.4. Análisis estadístico	224
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	224
3.1. Predominio Temporal de Sensaciones	224
3.2. Evaluación de los consumidores: aceptabilidad y expectativa de saciedad	228
3.2.1. <i>Condición esperada (E): Evaluación de las etiquetas</i>	228
3.2.2. <i>Condición ciega (C): Evaluación sensorial sin información y relación con el TDS</i>	230
3.2.3. <i>Condición informada (I): Evaluación sensorial en conjunto con las etiquetas</i>	232
4. CONCLUSIONES	233
<u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	<u>237</u>
<u>REFERENCIAS</u>	<u>245</u>
<u>ANEXOS</u>	<u>281</u>
ANEXO I: Abreviaturas	283
ANEXO II: Índice de Figuras	287
ANEXO III: Índice de Tablas	295

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. PRODUCTOS FRUTIHORTÍCOLAS

1.1. Frutas y hortalizas en la dieta

Las frutas y hortalizas son la fuente mayoritaria de nutrientes en nuestra dieta. Entre estos nutrientes se destacan compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, carotenoides, tocoferoles, ácido ascórbico y otras vitaminas y minerales con importantes beneficios para la salud humana. Es por ello que las recomendaciones para una dieta balanceada deben incluir el consumo diario de 4-5 porciones de frutas y hortalizas. Un consumo suficiente de productos frutihortícolas podría contribuir a la prevención de importantes enfermedades, como las cardiovasculares e incluso varios tipos de cáncer. Aumentando lo suficiente el consumo de frutas y verduras, se estima que cada año podrían salvarse alrededor de 1,7 millones de vidas (OMS, 2011).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), recomiendan una ingesta mínima de 5 porciones diarias de frutas y hortalizas (equivalente a 400 g) para la prevención de enfermedades crónicas como cardiopatías, cáncer, diabetes y obesidad. En Europa Occidental la ingesta diaria de frutas y verduras supera dicho mínimo recomendado; sin embargo, en países menos desarrollados, el consumo aún se encuentra por debajo de la mitad (OMS, 2011).

1.2. Tendencias en productos frutihortícolas

Con la creciente demanda de alimentos más sanos y nutritivos, hay una continua búsqueda de nuevos productos que puedan diferenciarse en el mercado. Es por esto que una de las más importantes áreas de investigación de la industria alimenticia trabaja en el desarrollo de productos saludables que conserven al máximo las características de un producto fresco (González-Aguilar y col., 2009).

1.2.1. Frutas de IV gama

En los últimos años ha habido un importante crecimiento en la demanda de productos convenientes, listos para consumir. Una respuesta a esta demanda son las frutas y hortalizas frescas cortadas (*fresh-cut*), también denominados productos

mínimamente procesados (MP) o productos de IV gama. De acuerdo con la Asociación Internacional de Productos Frescos Cortados (IFPA, *International Fresh-cut Produce Association*), los productos frescos cortados son definidos como “cualquier fruta o vegetal o combinación que haya sido alterada físicamente de su forma original, pero que permanezca en un estado fresco” (Qadri, Yousuf, Srivastava, y Yildiz, 2015). El término “IV gama” hace referencia a una clasificación de los alimentos de acuerdo al tipo de tratamiento que hayan recibido: frescos (I gama); tratados térmicamente, conservas o semiconservas (II gama); congelados (III gama); mínimamente procesados (IV gama); y productos tratados térmicamente, listos para consumir, comercializados bajo refrigeración o congelados (V gama).

A pesar de los conocidos beneficios del consumo de frutas y verduras frescas, la seguridad y la calidad de este tipo de productos es un tema de creciente interés, ya que han sido reconocidos como vehículos de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) (Harris y col., 2003; Ölmez, 2016). Debido a las operaciones unitarias preliminares involucradas en el pelado y reducción de tamaño de frutas MP, ocurren cambios físicos y fisiológicos en el producto, comprometiendo su calidad sensorial, nutricional y microbiológica. Entre estos cambios se pueden mencionar pérdidas de agua, pardeamiento enzimático, ablandamiento y aumento en la tasa respiratoria con producción de etileno. Estos fenómenos fisiológicos son los responsables de los cambios bioquímicos que conllevan a la degradación de propiedades sensoriales y pérdidas de nutrientes en las frutas recién cortadas. Además, la destrucción del tejido en operaciones tales como el pelado y cortado de los productos MP, expone al citoplasma celular y provee a los microorganismos con una fuente más rica en nutrientes comparada con el producto intacto (Barry-Ryan, Pacussi, y O’Beirne, 2000). La elevada actividad de agua también facilita el rápido crecimiento microbiano. Estas condiciones proporcionan un contexto ideal para la contaminación de los productos MP por un importante número de microorganismos patógenos y deteriorantes, que resulta en un rápido deterioro del producto fresco cortado en comparación con la fruta o vegetal entero. Este hecho justifica la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías tendientes a reducir el deterioro e incrementar la seguridad del producto.

1.2.2. Jugos de fruta sin pasteurizar

En los últimos años, los jugos de frutas se han vuelto muy populares ya que los consumidores los asocian a productos saludables, aportando numerosos beneficios al organismo, y por ello, es evidente su significativo crecimiento en el mercado. La pasteurización es una de las tecnologías de preservación más populares en la industria de alimentos y bebidas por su efectividad a la hora de eliminar microorganismos deteriorante y patógenos, e inactivar enzimas. Sin embargo, los tratamientos térmicos generalmente utilizados para la preservación de jugos de frutas (70–121°C por 30–120 s) suelen afectar seriamente la calidad del jugo, produciendo pérdidas nutricionales y cambios en el color, sabor y textura, reduciendo así la calidad del producto final. Es por esto que buscando satisfacer la demanda actual de los consumidores por alimentos convenientes con alta calidad sensorial y nutricional, surge el mercado de jugos de frutas no pasteurizados.

No obstante, los jugos de fruta que no son sometidos a un tratamiento térmico son altamente perecederos, susceptibles al deterioro debido a la actividad enzimática y a la exposición al oxígeno y a los microorganismos. A pesar de su bajo pH, se han registrado brotes con diferentes patógenos asociados al consumo de jugos sin pasteurizar (Danyluk, Schneider, Harris, y Worobo, 2012; Ingham, Schoeller, y Engel, 2006), incluyendo *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* O157:H7. En respuesta a esta problemática, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, *Food and Drug Administration*) ha establecido regulaciones para la manufactura de jugos indicando que su procesamiento deberá reducir la carga microbiana en 5 log (FDA, 2001), equivalente a una reducción alcanzada mediante la pasteurización (90–95°C por 4–10 s). De esta manera, surge un gran interés en el desarrollo de nuevas tecnologías no térmicas para el tratamiento de jugos de frutas no pasteurizados, que ofrezcan las ventajas de utilizar bajas temperaturas, bajo consumo de energía, alta retención de las propiedades nutricionales y sensoriales del producto y a su vez, que mejoren su calidad microbiológica y aseguren la inocuidad del producto.

1.3. Producción frutícola en Argentina

En general, el sector frutícola argentino ha demostrado operar de manera eficiente en cuanto a producción, logística, procesamiento y comercialización tanto para el mercado interno como externo (Idigoras, 2014). Los pilares que mejor posicionan a los

productos frutícolas argentinos en el contexto mundial son la sanidad, inocuidad y calidad. Por ello, es necesario tener un conocimiento preciso de las exigencias oficiales de los países compradores, tales como la Unión Europea y Estados Unidos, en cuanto a plagas, criterios microbiológicos y tolerancia de plaguicidas en frutos y sus productos derivados.

Otro punto de gran importancia del sector frutícola argentino es la importante cantidad de mano de obra requerida para las tareas relacionadas con el cultivo y la cosecha (350.000 personas en planta permanente), sin tener en cuenta aquella mano de obra empleada en los procesos de elaboración de productos tales como vino, jugos y aceite; y la participación de más de 20.000 productores (Idígoras, 2014). En muchas provincias estos cultivos son el sostén de las economías regionales.

Más de medio millón de hectáreas distribuidas a lo largo del territorio argentino son destinadas al cultivo de frutales. A partir de 2002, la producción de frutas en Argentina sufrió un gran impulso: en 1998 las exportaciones no superaban las 864.300 toneladas, mientras que en la actualidad las mismas aumentaron a casi el doble de dicho valor (Idígoras, 2014). En estos últimos años, la producción supera las 7 millones de toneladas anuales, repartidas principalmente en uva, cítricos (limón, lima, naranja, mandarina y pomelo), frutas de pepita (pera y manzana), frutas de carozo (damasco, ciruela y durazno) y frutas finas (Fig. 0.1); el resto de la producción pertenece a los olivos, frutos secos y cultivos tropicales (palta, banana y mango). Las frutas finas se clasifican en dos grandes grupos: *berries* (frutillas, arándanos, frambuesas, grosellas y moras o zarzamoras) y *cherries* (guindas y cerezas). Las frutillas, junto a las cerezas y los arándanos, son las frutas finas con mayor importancia económica para el país.



Fig. 0.1: Principales grupos frutícolas producidos en Argentina: ubicación geográfica. Fuente: MAGyP (2014).

1.3.1. Producción de frutillas en Argentina y en el Partido de Gral. Pueyrredón

La producción anual de frutillas de Argentina se encuentra en aproximadamente 40 mil toneladas, concentradas en un área de entre 1.000 y 1.500 ha (Fig. 0.2). La producción de esta especie en nuestro país está concentrada en tres provincias: Santa Fé (40%), Tucumán (30%) y Buenos Aires (15%). El resto de la producción de frutillas corresponde a otras zonas del país, principalmente en las provincias de Corrientes, Jujuy y Mendoza.

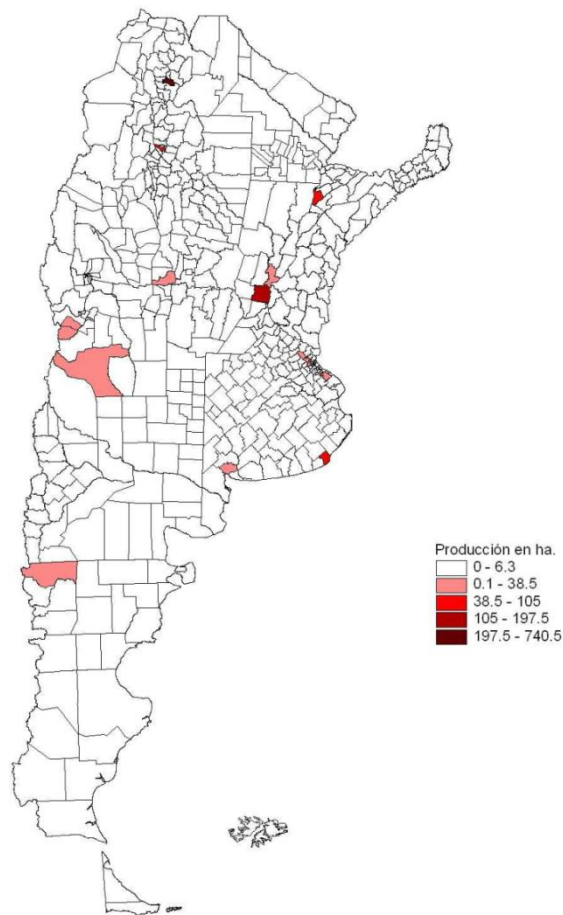


Fig. 0.2: Producción de frutilla en Argentina: distribución geográfica. Fuente: Senesi (2011).

Dentro de la provincia de Buenos Aires, el cinturón frutihortícola del Partido de General Pueyrredón es uno de los principales productores de frutilla. Este municipio se encuentra localizado en el sudeste de la provincia de Buenos Aires, a cuatrocientos kilómetros hacia el sur de Capital Federal. Se caracteriza por un clima de tipo templado oceánico y por suelos molisoles (pastizales), ricos en materia orgánica, que permiten el desarrollo de una intensiva actividad de producción frutihortícola. A aproximadamente diez kilómetros hacia el oeste del casco urbano de la ciudad de Mar del Plata, se concentra un importante número de pequeños establecimientos dedicados a la explotación frutihortícola. Su producción abastece a la ciudad y asimismo, abastece otras áreas de la provincia de Buenos Aires, del país, e incluso exportando según la demanda. En esta localización, además de la producción de frutillas, hay emprendimientos que orientan su producción al cultivo de otras frutas, como cerezas, frambuesas, arándanos y kiwis; y otros, a la producción de champiñones. Todos éstos se

presentan como cultivos no tradicionales del área y su aparición responde a la búsqueda de alternativas productivas rentables, en pocas hectáreas (Sanchez, 2005).

La región de Gral. Pueyrredón es reconocida como una zona productiva de frutilla de muy alta calidad, que se vende en fresco al mercado doméstico, al cual también se destinan diversos productos elaborados. Sin embargo, estos últimos tienen una fuerte presencia en los mercados de exportación, al cual se envían productos congelados, feteados, cubeteados, mermeladas y jaleas, entre otros.

2. GENERALIDADES DE LA FRUTILLA (*Fragaria x ananassa*)

2.1. Taxonomía y origen

La frutilla o fresa pertenece a la familia *Rosaceae*, subfamilia *Rosoideae*, género *Fragaria* (del latín: fragancia). La frutilla tal como la conocemos actualmente, es la especie *Fragaria x ananassa* (y sus cultivares emparentados), la especie más común de *Fragaria* cultivada mundialmente. La × en su nombre indica que se trata de un híbrido entre dos especies diferentes de frutillas: la *Fragaria virginiana*, proveniente del este de Estados Unidos, caracterizada por su fino sabor y pequeño tamaño; y la *Fragaria chiloensis*, originaria de Chile, conocida por su gran tamaño (Fig. 0.3). De esta manera se obtuvieron híbridos con mayores rendimientos, mejor tamaño de fruta, mayor sabor y aroma y una mejor calidad de conservación post-cosecha (Yommi, Borquez, Quipildor, González, y Kirschbaum, 2001).

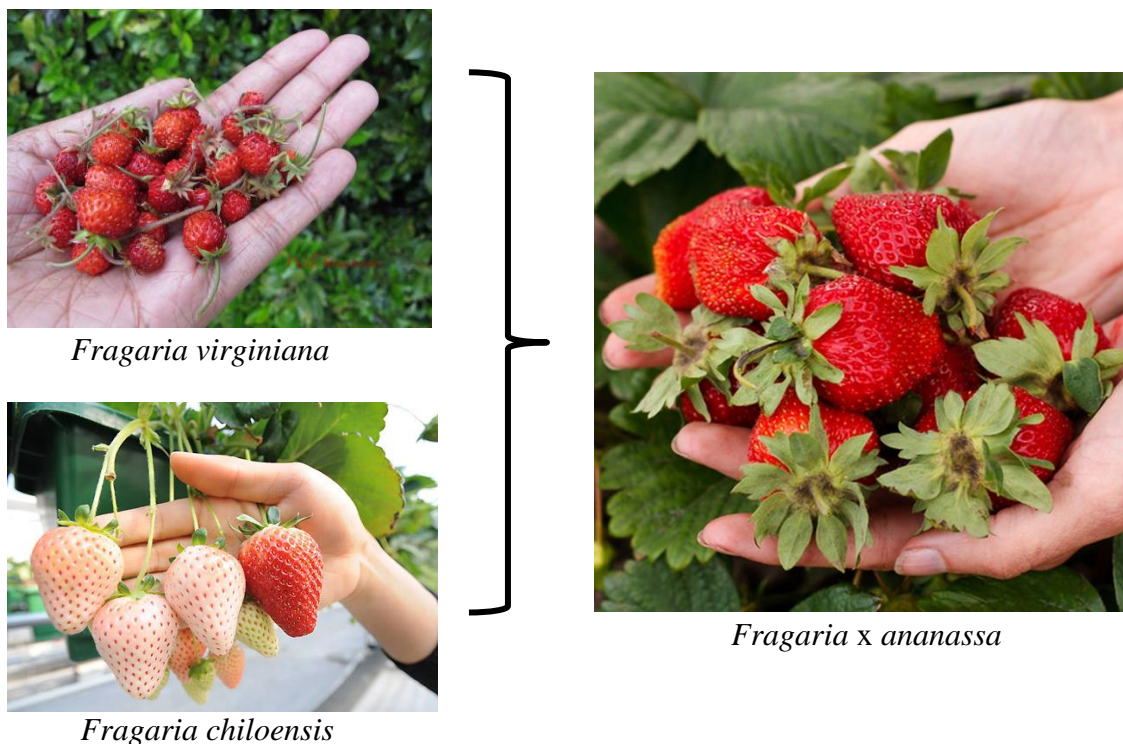


Fig. 0.3: Origen de *Fragaria x ananassa*

2.2. Características generales y variedades

Dentro de los productos frutihortícolas, las frutillas son una de las bayas más populares en el mundo; hay cerca de 20 especies y más de 600 variedades de frutillas que varían en color, sabor, tamaño y textura. La frutilla es una fruta muy nutritiva, con muchos beneficios para la salud humana, entre los que se destacan su gran contenido de compuestos antioxidantes y vitaminas. La composición nutricional de las frutillas depende del cultivar y de la variedad, del área, clima y método de cultivo, del momento de cosecha y de la madurez del fruto, entre otros factores (Hossain y col., 2016). La frutilla se consume en forma masiva, tanto fresca como procesada, principalmente en jugos y purés que se utilizan para consumo directo, así también como ingrediente de bebidas alcohólicas y analcohólicas, y en gran variedad de productos lácteos.

La frutilla se clasifica dentro de los frutos no climatéricos, es decir que no continúa su maduración una vez cosechados, determinándose el momento de cosecha en base al color superficial. *F. x ananassa* se adapta muy bien a climas húmedos y con temperaturas medias anuales entre los 15 y los 20°C, con mínimas no inferiores a los 5-6°C bajo cero y máximas absolutas mayores a 35°C. Tiene un requerimiento hídrico mínimo de 600 mm anuales (SINAVIMO, 2015).

La planta de frutilla puede o no responder al fotoperíodo (horas de luz del día). Las plantas que responden al fotoperíodo se denominan variedades de día corto y las que no responden, son las llamadas plantas de día neutro o reflorecientes. En las variedades de día corto, las altas temperaturas y los días largos (con más de 12 horas de luz), favorecen el crecimiento vegetativo; mientras que las bajas temperaturas y días cortos inducen la floración. A continuación se mencionan los principales cultivares comerciales de *F. x ananassa*:

- ✓ Variedades de día corto: Camarosa, Sabrina, Benicia, Ventana, Fortuna, Festival y Camino Real
- ✓ Variedades de día neutro: Fern, Selva, Seascape, Whitney, Diamante, Aromas, San Andreas, Sweet Ann, Fern, Portolas, Monterrey, Cristal y Albión

2.3. Enfermedades y daños postcosecha

La vida útil postcosecha de la frutilla destinada al consumo fresco es muy breve, debido al ablandamiento que se produce durante su maduración y a la elevada incidencia de hongos en el período de almacenamiento. La sensibilidad a daños físicos y podredumbres se acentúan con las altas temperaturas. Es por ello que surge la necesidad de refrigerar durante el transporte de los frutos perecederos y no cortar la cadena de frío hasta que el producto llegue al consumidor. Una parte importante de los daños postcosecha presentes en frutilla se pueden producir en el propio campo mientras la fruta espera para ser transportada a la cámara o en el mercado durante su comercialización (Alcantara-González, Cabrera-Sixto, García-Barrón, Martínez-Soto, y Ramírez-Robles, 1995).

El problema principal que afecta a la conservación de los frutos es la sensibilidad que presentan a enfermedades causadas por diferentes hongos. Estas enfermedades son la principal causa de pérdidas postcosecha en la frutilla. Durante la cosecha se debe tener la precaución de eliminar las frutas dañadas o con infecciones ya que éstas se propagan de las frutas enfermas a las sanas formando nidos de podredumbre. Se han encontrado diferentes hongos sobre frutillas (Fraire-Cordero, Yáñez-Morales, Nieto-Angel, y Vázquez-Gálvez, 2003), principalmente pertenecientes a diez géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Geotrichum*,

Mucor, *Penicillium* y *Rhizopus*. No cabe duda que la presencia de algunos hongos como *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* suele ser más abundante que otros.

3. TECNOLOGÍAS EMERGENTES DE PRESERVACIÓN

Como se mencionó anteriormente, en las últimas décadas ha aumentado la demanda de productos convenientes como frutas de IV gama y jugos de fruta sin pasteurizar, debido a su bajo aporte calórico y a su alta concentración en vitaminas y antioxidantes, que juegan un papel importante en la prevención de enfermedades coronarias, cáncer y diabetes, además de otros beneficios para la salud. En el pasado, las frutas frescas y sus jugos eran considerados como productos seguros por su bajo pH debido a la presencia natural de ácidos orgánicos, que generalmente prevendrían el crecimiento de bacterias patógenas (Parish, 2008). Sin embargo, como consecuencia de diversas fuentes de contaminación presentes durante las etapas de pre- y post-cosecha, las frutas frescas cortadas y los jugos de frutas sin pasteurizar pueden verse afectados por microorganismos deteriorantes y patógenos, acortando su vida útil e incrementando el riesgo de propagar enfermedades (Aneja, Dhiman, Aggarwal, y Aneja, 2014).

En las últimas décadas han sido reportados muchos brotes de enfermedades debidas al consumo de frutas de IV gama y jugos sin pasteurizar (Stearns, 2015). Así mismo, algunos patógenos tales como *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*, han demostrado una importante resistencia al medio ácido, y han sobrevivido en jugos de fruta por varios días, incluso en condiciones de refrigeración (Moon, Delaquis, Toivonen, y Stanich, 2006). De esta manera, han aumentado las investigaciones enfocadas a la búsqueda de nuevas tecnologías de preservación no térmicas y naturales, que respondan a la demanda de productos nutritivos con características sensoriales similares a las de un producto fresco, y que a su vez eviten el uso de preservantes químicos sintéticos.

3.1. Preservantes de origen natural

Entre las tecnologías de preservación emergentes, el uso de productos naturales está ganando interés y ha sido ampliamente estudiado en los últimos años. El objetivo de la aplicación de los biopreservantes (entre los que se destacan aceites esenciales,

fitoquímicos y extractos de frutas y vegetales) no es únicamente combatir la microflora deteriorante del producto, sino también garantizar la seguridad ante la eventual contaminación con un patógeno, y a su vez mejorar el aporte nutricional del alimento mediante el agregado de compuestos bioactivos con propiedades funcionales.

Algunos preservantes químicos son comúnmente utilizados para prevenir el deterioro de jugos de fruta, como el benzoato de sodio y el sorbato de potasio; en la preservación de frutas frescas cortadas también se utilizan compuestos químicos que pueden ser empleados en las etapas de pre- o post-cosecha, entre los que se destacan cloro líquido, hipoclorito y dióxido de cloro. Sin embargo, los consumidores cada vez rechazan más a aquellos productos alimenticios que contienen compuestos químicos, ya que los catalogan como productos artificiales. Incluso en algunos países europeos el uso de compuestos clorados está siendo prohibido debido a su toxicidad (Ölmez y Kretzschmar, 2009). Es por ello que la demanda de los consumidores por el uso de preservantes naturales hace que el control de alimentos con un enfoque biológico esté ganando gran interés. Diferentes extractos y fitoquímicos de plantas, frutas y vegetales han sido reconocidos como tratamientos eficaces frente a bacterias deteriorantes y patógenas en alimentos, con la ventaja adicional de poseer propiedades antioxidantes y beneficiosas para la salud humana.

Los antimicrobianos naturales pueden ser obtenidos de fuentes vegetales, animales o microbianas. La mayoría de estos antimicrobianos son reconocidos como seguros (GRAS, *Generally Recognized As Safe*). Particularmente, los compuestos o extractos bioactivos de origen vegetal tienen un gran potencial para ser aplicados en frutas y hortalizas frescas y mínimamente procesadas (Tajkarimi, Ibrahim, y Cliver, 2010). Entre ellos, se pueden mencionar hierbas, especias, aceites esenciales y extractos obtenidos a partir de diferentes partes de plantas.

Originalmente las hierbas y especias se incorporaban a los alimentos para modificar o mejorar su sabor y aroma, pudiendo además incrementar su vida útil debido a su poder antimicrobiano natural. Especies con significativa actividad antimicrobiana incluyen a la canela, el clavo de olor, la mostaza y la vainillina; entre las hierbas, la albahaca, el orégano, el romero, la salvia y el tomillo muestran la mayor acción antimicrobiana. Las hierbas y especias son ricas en compuestos polifenólicos, flavonoides, terpenoides y otros compuestos volátiles antimicrobianos (Gulluce y col., 2007). Se han identificado diversos compuestos antimicrobianos en los aceites

esenciales de hierbas y especias (Goodburn y Wallace, 2013), tales como el carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol), el cinemaldehído (3-fenilprop-2-enal), eugenol (4-alil-2-metoxifenol), y alcanfor (Weerakkody, Caffin, Turner, y Dykes, 2010).

Los extractos de frutas y vegetales, así como también algunos compuestos fitoquímicos tienen potencial como biopreservantes para ser aplicados en jugos y frutas mínimamente procesadas. Estos extractos suelen ser ricos en compuestos polifenólicos, tales como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos (Blasa, Gennari, Angelino, y Ninfali, 2010). Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas que tienen un rol clave en su defensa frente a microorganismos fitopatógenos y como respuesta a condiciones de estrés abiótico, tales como lluvias o radiación ultravioleta. La actividad antimicrobiana de los polifenoles presentes en frutas, hortalizas y plantas medicinales ha sido extensamente investigada frente a un amplio rango de microorganismos. En el campo de la preservación de frutas y hortalizas se ha utilizado resveratrol (Jiménez y col., 2005), extractos de semilla de uva (Xu y col., 2007), extracto de granada (Alvarez, Ponce, y Moreira, 2013), extracto de semilla y cáscara de naranja (Cruz-Valenzuela, Carrasco-Lugo, Vega-Vega, Gonzalez-Aguilar, y Ayala-Zavala, 2013), extracto de semilla de mango rico en ácido gálico (Vega-Vega y col., 2013), entre otros.

Los aceites esenciales (AE) son líquidos aromáticos obtenidos de diferentes partes de plantas (hojas, semillas, frutos, corteza y cáscara) (Burt, 2004). Los AE han demostrado actividad antimicrobiana frente a una gran variedad de microorganismos patógenos y deteriorantes (Dadalioglu y Evrendilek, 2004). Su actividad antimicrobiana depende de su composición, estructura y grupos funcionales de sus principales componentes activos. Usualmente, los compuestos con grupos fenólicos son los más efectivos (Dorman y Deans, 2000), si bien distintos estudios han reportado la efectividad de diferentes compuestos no-fenólicos frente a bacterias Gram positivas y negativas en aceites de orégano, clavo de olor, canela, ajo, romero y salvia, entre otros (Hayek, Gyawali, y Ibrahim, 2013).

Para que los compuestos naturales sean una efectiva herramienta para el control microbiano, se requieren más estudios para entender qué compuestos son efectivos frente a cada microorganismo patógeno y deteriorante, su efectividad *in vivo* frente a la microflora nativa de cada producto en cuestión, además de su aceptabilidad organoléptica y su efecto sobre la salud del consumidor.

3.2. Películas y recubrimientos comestibles

El desarrollo de recubrimientos o películas comestibles comenzó como una solución a la deshidratación, al pardeamiento enzimático y al deterioro en la textura de frutas y hortalizas, con un gran impacto en la vida útil del producto. Además de actuar como barrera parcial a la humedad, gases (tales como oxígeno, dióxido de carbono y sustancias volátiles) y microorganismos, y de mejorar la resistencia mecánica de frutas y hortalizas mínimamente procesadas (Franssen y Krochta, 2003; Tapia y col., 2008), los recubrimientos comestibles también suelen ser utilizados como portadores o “*carriers*” de una amplia variedad de aditivos alimenticios (Cagri, Ustunol, y Ryser, 2001; Franssen y Krochta, 2003; Rojas-Graü, Tapia, Rodríguez, Carmona, y Martín-Belloso, 2007; Rojas-Graü, Soliva-Fortuny, y Martín-Belloso, 2009).

La principal diferencia entre un recubrimiento comestible (RC) y una película comestible (PC) es que el RC se aplica en forma líquida sobre el alimento, usualmente por inmersión del producto en una solución formadora de film compuesta de la matriz estructural, y la PC se prepara primero como láminas sólidas, que son luego aplicadas como envoltorio del producto. Algunos estudios reconocen la importancia de evaluar la matriz del film preformado para poder cuantificar varios parámetros como las propiedades mecánicas, ópticas y antimicrobianas, dado que el envoltorio crea una atmósfera modificada, restringiendo la transferencia de gases y también funcionando como barrera a la transferencia de compuestos aromáticos (Falguera, Quintero, Jiménez, Muñoz, y Ibarz, 2011).

El uso de RC o PC en alimentos, especialmente en productos altamente perecederos como los frutihortícolas, está condicionado por diversas características como el costo, la disponibilidad, las propiedades funcionales, las propiedades mecánicas y ópticas, los efectos de barrera frente a gases, la resistencia estructural al agua y a microorganismos y su aceptabilidad sensorial. Estas características se ven influenciadas por parámetros tales como el tipo de material implementado en la matriz biopolimérica (composición y distribución del peso molecular), las condiciones bajo las cuales los films son preformados (tipo de solvente, pH, concentración, y temperatura) y el tipo y concentración de los aditivos incorporados (plastificantes, agentes entrecruzantes, antimicrobianos, antioxidantes o emulsificantes) (Rojas-Graü y col., 2009).

Los recubrimientos y películas comestibles se clasifican de acuerdo a su material estructural. Pueden estar formados por proteínas, lípidos, polisacáridos o mezclas de estos (formando films compuestos). Los hidrocoloides (proteínas y polisacáridos) son los biopolímeros más investigados en el desarrollo de RC y PC. Algunos de estos incluyen carboximetilcelulosa, caseína y sus derivados (Fabra, Jiménez, Atarés, Talens, y Chiralt, 2009; Ponce, Roura, del Valle, y Moreira, 2008), goma de algarrobo, goma guar, etil celulosa (Shrestha, Arcot, y Paterson, 2003), gelatina con glicerol, sorbitol y sacarosa como plastificantes (Sobral, Menegalli, Hubinger, y Roques, 2001), PC compuestas de gelatina-caseína entrecruzados con transglutaminasa (Chambi y Grosso, 2006), pectina (Maftoonazad, Ramaswamy, Moalemiyan, y Kushalappa, 2007), almidón de mandioca con compuestos antimicrobianos naturales (Souza y col., 2012), almidón de maíz pre-gelatinizado (Pagella, Spigno, y De Faveri, 2002), gluten de trigo (Tanada-Palmu y Grosso, 2005) y mezclas de alginato de sodio y pectina con la adición de CaCl_2 como entrecruzante (Altenhofen da Silva, Bierhalz, y Kieckbusch, 2009).

La optimización de la composición de RC es uno de los pasos más importantes en esta área de investigación, dado que se deben formular de acuerdo a las propiedades de la fruta o vegetal al cual serán aplicados (Rojas-Graü y col., 2009). Entonces, es muy importante caracterizar y evaluar los diferentes recubrimientos en cada producto, ya que cada uno tiene diferentes atributos de calidad para ser mantenidos o incluso mejorados durante el almacenamiento refrigerado (Oms-Oliu, Soliva-Fortuny, y Martín-Belloso, 2008).

3.3. Tecnologías físicas no térmicas

Los tratamientos de preservación no térmicos están recibiendo mucha atención debido a su potencial para mejorar la calidad y seguridad de los alimentos. Algunas de las tecnologías utilizadas incluyen las altas presiones, luz ultravioleta, pulsos de luz, pulsos eléctricos, ultrasonido e irradiación. Estas tecnologías tienen la habilidad de inactivar microorganismos y enzimas a temperatura ambiente (o cercana a la ambiente), evitando de esta manera los efectos negativos de la aplicación de altas temperaturas sobre el sabor, aroma, textura, color y valor nutritivo de los alimentos (Aneja y col., 2014).

La luz ultravioleta (UV) puede inducir daño en el ADN e indirectamente disparar los mecanismos de defensa de diferentes patógenos, lo cual lo convierte en un efectivo agente antimicrobiano. La ventaja de la luz UV es su bajo costo y la facilidad de uso del equipamiento necesario, pero puede inducir algunos efectos negativos en el producto (Bintsis, Litopoulou-Tzanetaki, y Robinson, 2000). La luz pulsada (LP) utiliza pulsos de luz cortos intensos para inactivar patógenos. Los pulsos son un espectro continuo (longitudes de onda de 200 a 1100 nm) rico en luz UV que perduran alrededor de 100 segundos. El mecanismo de inactivación microbiana por LP ocurre a través del efecto fotoquímico, que induce cambios estructurales en el ADN y provoca la aglutinación del contenido citoplasmático, terminando en la disrupción de las membranas celulares. Algunas de las ventajas de esta tecnología incluyen la rápida inactivación microbiana en tratamientos cortos, la ausencia de compuestos residuales y la gran flexibilidad para su aplicación en alimentos (Aguiló-Aguayo, Charles, Renard, Page, y Carlin, 2013).

El tratamiento de altas presiones (AP) consiste en someter al alimento a presiones en el rango de 3.000 a 8.000 bar, logrando la inactivación de microorganismos y enzimas sin la degradación de sabores, aromas y nutrientes asociada al tratamiento térmico tradicional (Palou y col., 2000). Para el procesamiento por AP se requiere un cilindro de acero conteniendo un medio líquido para transmitir la presión (usualmente agua) y la muestra, que puede protegerse utilizando un envase adecuado. La muestra debe mantenerse bajo presión por un periodo de tiempo considerable. De esta manera, esta tecnología suele presentar ciertos inconvenientes, afectando la integridad del producto. El aire confinado en la matriz alimenticia se encuentra sujeto a compresión y expansión durante la presurización y descompresión, destruyendo los tejidos (Barry-Ryan, 2015). Es por ello que esta tecnología no-térmica si bien sería factible para el tratamiento de productos líquidos como los jugos de fruta, no resulta adecuada para ciertos productos como frutas y hortalizas de IV gama.

El ultrasonido (US) consiste en el uso de ondas sonoras a frecuencias de 20 kHz o más. La aplicación de US es una tecnología no-térmica que contribuye a garantizar la seguridad microbiana y a prolongar la vida útil, especialmente en alimentos con características nutricionales, sensoriales y funcionales termosensibles (O'Donnell y col., 2010). Una ventaja importante del ultrasonido comparado con otras tecnologías no-térmicas es que las ondas de sonido son generalmente consideradas como seguras, no tóxicas y amigables con el medio ambiente (Barry-Ryan, 2015). El ultrasonido a bajas

frecuencias (20-200 kHz) tiene la habilidad de causar un fenómeno llamado cavitación, que podría utilizarse para inactivar microorganismos. La cavitación consiste en la formación de burbujas dentro de un líquido, que implotan, causando daño celular. El mecanismo por el cual se logra inhibir a los microorganismos se debe principalmente al adelgazamiento de las membranas celulares, al calentamiento localizado y a la producción de radicales libres (Chemat, Zill-e-Huma, y Khan, 2011).

3.4. Tecnología de obstáculos

La seguridad de los alimentos desde el punto de vista microbiológico se ha convertido en un punto de gran preocupación tanto para los consumidores, como para las industrias de alimentos y las agencias reguladoras en todo el mundo. Muchas técnicas de preservación de alimentos, tales como congelación, refrigeración, reducción de la actividad de agua, acidificación, pasteurización, y el uso de antimicrobianos químicos o biológicos han sido utilizadas para el control del crecimiento microbiano en alimentos (Negi, 2012). Sin embargo, algunas de estas tecnologías afectan negativamente las propiedades organolépticas de los alimentos, reduciendo la aceptabilidad del consumidor.

Hoy en día, los consumidores están más interesados en productos mínimamente procesados sin aditivos agregados, cuya inocuidad esté garantizada y con una vida útil extendida (Khan, Tango, Miskeen, Lee, y Oh, 2016). Desde el punto de vista microbiológico, la conservación de alimentos consiste en exponer a los microorganismos a un medio hostil, mediante uno o más factores, para prevenir o retrasar su crecimiento, disminuir su supervivencia o causar su muerte. Estos factores incluyen acidez, reducción de actividad de agua, presencia de preservantes, altas o bajas temperaturas, radiación UV, entre otros. Para resistir los efectos de estos factores de estrés, los microorganismos desarrollan diferentes mecanismos homeostáticos para mantener relativamente sin cambios los parámetros y las actividades fisiológicas, aun cuando el medio que rodea a la célula se haya modificado y sea diferente (Leistner y Gould, 2002). Para ser efectivos, los factores de conservación deben superar la resistencia microbiana homeostática. En este sentido, surge la preservación de alimentos mediante la combinación de distintos factores o barreras, conocida como tecnología de

obstáculos (también denominada tecnología de barreras, preservación combinada o métodos combinados).

La tecnología de obstáculos busca combinar diferentes métodos de preservación, para poder reducir los niveles empleados de cada barrera, minimizando su impacto en las características sensoriales y nutricionales del producto. Entonces, la tecnología de obstáculos tiene como objetivo mejorar la calidad global de los alimentos y reducir las altas intensidades de los tratamientos empleados (Leistner, 2000). Además, la tecnología de obstáculos ha demostrado efectos sinérgicos al utilizar varios mecanismos para la inhibición o inactivación de los microorganismos (Rahman, Khan, y Oh, 2016).

Algunas combinaciones de obstáculos han mostrado una eficaz reducción en la carga de microorganismos deteriorantes y patógenos en diferentes alimentos, tales como combinaciones de tratamientos de ultrasonido con UV y con diferentes aditivos (benzoato de sodio, sorbato de potasio, α - y β -pineno) aplicados sobre jugos de manzana y naranja (Gabriel, 2015), ácido cítrico combinado con irradiación gama y atmósfera modificada aplicado en chauchas (Gupta y col., 2012), agua electrolizada ligeramente ácida combinada con ultrasonido para inactivar *Bacillus cereus* en papa (Luo, Kim, Wang, y Oh, 2016). Sin embargo, se requieren más estudios para establecer las combinaciones apropiadas de diferentes barreras para mejorar las propiedades y calidad global de cada alimento en particular.

4. ALIMENTOS FUNCIONALES

4.1. Tendencias actuales

Actualmente, se observa una creciente tendencia en los consumidores a elegir alimentos que mejoren su salud y bienestar. Esta situación se puede ver reflejada en la oferta de productos cuyos rótulos destacan el contenido de ciertos componentes, tales como fibra dietética, productos integrales, ácidos grasos omega 3, y antioxidantes, que el consumidor común está aprendiendo a reconocer como compuestos que propician una buena salud.

De esta manera, la nueva nutrición se enfoca principalmente en la relación entre la alimentación y la promoción de salud. Es decir, que la nutrición actual se orienta a proveer alimentos que, además de proporcionar sus nutrientes inherentes, contienen

otros compuestos biológicamente activos que aportan un beneficio adicional a la salud y bienestar. Así surge el concepto de alimentos funcionales (AF), cuya elaboración no sólo contempla la calidad nutricional, tecnológica y sensorial, sino que también contienen naturalmente o se han incluido en ellos componentes bioactivos. Estos compuestos, en su mayoría, se encuentran presentes en los alimentos vegetales (fitoquímicos) y poseen estructuras químicas muy diversas, tales como carotenoides, isoflavonas, polifenoles, fitoestanoles, ácido linoleico conjugado, que ejercen una actividad biológica beneficiosa para la salud. Existe abundante evidencia científica que indica que el consumo de estos compuestos bioactivos en forma regular en la dieta disminuye el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, hiperlipidemias, neurodegeneración, entre otras enfermedades (Leal, 2016).

Los alimentos funcionales ofrecen a la industria la oportunidad de diferenciarse y responder a las necesidades del consumidor. En la sociedad actual, el peso corporal y el culto al cuerpo se han convertido en una preocupación generalizada, existiendo un deseo de mejorar la calidad de los productos alimenticios que se consumen regularmente en la dieta. En este contexto, la industria alimentaria tiene la posibilidad de ofrecer productos con un valor añadido de salud, funcionalidad y bienestar, que contribuyen a una mejor calidad de vida. Las tendencias de consumo de alimentos funcionales muestran que las principales categorías elegidas son la leche, el yogur, los cereales, las galletitas y los jugos. Los estudios que analizan tanto la oferta como la demanda de alimentos funcionales, pronostican un importante crecimiento para esta categoría en el corto plazo (Leal, 2016).

4.2. Definición de alimento funcional

El término “funcional” suele utilizarse para describir alimentos y bebidas que han sido enriquecidos con nutrientes o sustancias particulares que tienen el potencial de influir positivamente en la salud por encima de su valor nutricional básico. Este término fue utilizado por primera vez a principios de los años 80 en Japón, donde se comenzaron a comercializar alimentos especialmente formulados para cumplir con una determinada función en la salud. Estos alimentos se categorizaron como alimentos para usos específicos en la salud (FOSHU, *Foods for Specified Health Uses*), y desde allí se ha

extendido hacia el resto del mundo, dando inicio a una nueva era de la industria alimentaria: la era de los alimentos funcionales.

Desde entonces, organismos relacionados con la ciencia y la salud han elaborado diversas definiciones para poder definir a un alimento funcional. Entre ellas se destacan las siguientes:

“Un alimento puede ser considerado funcional si se ha demostrado suficientemente que beneficia (más allá de proporcionar una nutrición adecuada desde el punto de vista tradicional) a una o varias funciones relevantes del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar y/o reduce el riesgo de padecer una enfermedad” (ILSI, *International Life Science Institute*).

“Alimentos modificados o que contengan un ingrediente que demuestre una acción que incremente el bienestar del individuo o disminuya los riesgos de enfermedades, más allá de la función tradicional de los nutrientes que contiene” (Consejo de Nutrición y Alimentación de la Academia de Ciencias de los Estados Unidos).

“Un alimento puede ser considerado funcional si logra demostrar satisfactoriamente que posee efectos benéficos para la salud sobre una o más funciones del organismo -más allá de sus propiedades nutricionales habituales-, en forma relevante para la salud y el bienestar y/o que reduzca el riesgo de alguna enfermedad” (FUFOSE, *Functional Food Science in Europe*, ILSI, Europa).

“Un alimento funcional es similar en apariencia, o bien constituye, un alimento convencional que se consume como parte de una dieta habitual, y que ha demostrado tener efectos fisiológicos y/o disminuir el riesgo de enfermedades crónicas, más allá de sus funciones nutricionales básicas; es decir, contienen componentes bioactivos” (*Health Canada*).

En general, se puede decir que para que un alimento sea considerado funcional debe cumplir los siguientes requisitos:

- ✓ Ocasionar un beneficio en la salud del consumidor.
- ✓ Demostrar los beneficios saludables obtenidos de su consumo.
- ✓ Debe existir una cantidad mínima definida de ingesta diaria para alcanzar el beneficio esperado.
- ✓ Una ingesta superior a la necesaria para el efecto beneficioso no debe ocasionar ningún efecto dañino.

-
- ✓ Se debe consumir en la dieta habitual como cualquier alimento tradicional.
 - ✓ Debe indicar en su rotulación la presencia del ingrediente bioactivo y la cantidad en la cual se encuentra presente.
 - ✓ Debe existir una metodología analítica que permita identificar y cuantificar el agente bioactivo.
 - ✓ Poder demostrar las propiedades saludables del alimento funcional luego de su consumo a través de biomarcadores de efecto.

4.3. Alimentos funcionales para combatir la obesidad

La obesidad se define como un aumento de la grasa corporal en proporción a la altura del paciente. El diagnóstico se establece con la medición del Índice de Masa Corporal (IMC). Un IMC entre 25 y 29,9 kg/m² determina el diagnóstico de sobrepeso, mientras que un valor mayor o igual a 30 kg/m² se considera como obesidad. La obesidad aumenta el riesgo de padecer: diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, dislipoproteinemias, complicaciones quirúrgicas, complicaciones en embarazo y parto, alteraciones osteoarticulares, litiasis vesicular y disminuye la calidad de vida. Esta patología es la alteración nutricional más frecuente en el mundo desarrollado y actualmente también ha alcanzado proporciones significativas en los países en vías de desarrollo. Este exceso de grasa corporal representa un factor de riesgo que aumenta tanto la morbilidad como la mortalidad (Leal, 2016).

En la Argentina, en el año 2013 se realizó la Tercera Encuesta Nacional de Factores de Riesgo (ENFR). La Fig. 0.4 muestra la prevalencia de obesidad en la Argentina en las diferentes jurisdicciones, de acuerdo con las ENFR de los años 2005, 2009 y 2013. El sobrepeso y la obesidad continúan en alza. La evolución de la prevalencia de obesidad pasó del 14,6% en 2005 al 18,0% en 2009, y al 20,8% en 2013; mientras que el sobrepeso, con un comportamiento similar, evolucionó del 34,4% en 2005, al 37,1% en la última medición (Leal, 2016).

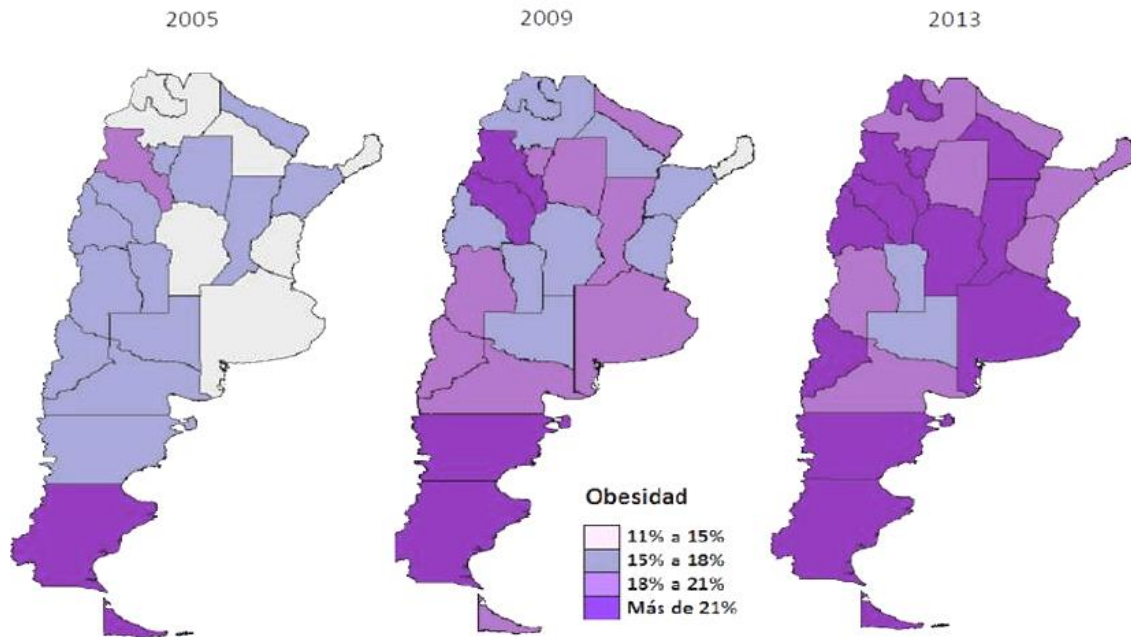


Fig. 0.4: Prevalencia de obesidad en Argentina en 2005, 2009 y 2013 según jurisdicción. Fuente: ENFR, Ministerio de Salud de la Nación Argentina.

Para combatir la obesidad, la industria alimentaria ha ofrecido, desde hace varias décadas, una amplia variedad de productos denominados “dietéticos” que en su inicio se fundamentaban principalmente en la sustitución de carbohidratos simples y grasas por edulcorantes no nutritivos y sustitutos de grasas. Actualmente, hay una creciente área de investigación que apunta al desarrollo de nuevos alimentos que puedan combatir a la obesidad, en los que se intenta incorporar una mayor variedad de ingredientes funcionales que además de disminuir el consumo calórico total, pretenden influir en el metabolismo energético así como en la sensación metabólica de saciedad. Por otro lado, la nueva reglamentación sobre el rotulado de alimentos y las declaraciones de salud, estimulará a la industria alimenticia a realizar mayores inversiones en investigación para comprobar la efectividad de los alimentos funcionales lanzados al mercado a diferentes niveles (bioquímico, molecular, genómico y psicológico). De esta forma, la garantía y la eficacia del uso de estos productos, corroborada científicamente, como herramienta preventiva y de tratamiento, contribuirá a reducir la incidencia de obesidad en la población general.

En la Tabla 0.1 se muestra un resumen de las posibles estrategias para la elaboración de alimentos funcionales.

Tabla 0.1: Estrategias para la elaboración de alimentos funcionales para combatir la obesidad y el sobrepeso. Fuente: Serrano y Sánchez González (2008).

A. Reducción de la densidad energética del alimento	Disminuyendo el contenido de grasas. Sustituyendo azúcares simples por edulcorantes sin valor energético. Incrementando el contenido de fibra. Incrementando el contenido de agua.
B. Modificación tecnológica-sensorial	Modificando la textura. Disminuyendo la densidad (incrementando el contenido de aire).
C. Modificación del contenido de macronutrientes para producir saciedad	Aumentando el contenido de proteínas.
D. Modificación del índice glicémico del alimento	Incorporando fibras o ingredientes que retrasen la absorción de hidratos de carbono en el intestino delgado.
E. Incorporación de ingredientes funcionales	Inhibiendo la sensación de apetito (bloqueando señales orexigénicas o potenciando señales anorexigénicas). Limitando la biodisponibilidad de nutrientes, utilizando inhibidores de la acción de enzimas digestivas. Estimulación del gasto energético (termogénesis). Haciendo modificaciones en la composición de la microbiota del colon.

Hoy en día en el mercado existe una amplia oferta de productos con bajo valor energético; sin embargo, la oferta de productos con ingredientes bioactivos que disminuyan el apetito, aumenten el gasto calórico y/o afecten a la distribución de grasa corporal, es baja y en algunos casos su efectividad es dudosa.

Es por ello que el desarrollo de alimentos funcionales que incrementen la saciedad es un gran desafío. En el contexto nacional y mundial, donde la prevalencia de sobrepeso y obesidad se encuentran en aumento, promover un mayor efecto saciante de los alimentos podría ayudar a las personas a controlar su ingesta calórica y por ende, su peso.

OBJETIVOS Y ESQUEMA DE TRABAJO

1. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se ha planteado en la Introducción General de esta Tesis, un consumo suficiente de frutas y hortalizas aporta importantes beneficios para la salud y previene enfermedades tales como cardiopatías, diabetes, obesidad y cáncer. Los consumidores de hoy en día eligen una alimentación más saludable, evitan el consumo de aditivos químicos sintéticos y a su vez, buscan alimentos con excelente calidad sensorial. De esta manera surgen productos mínimamente procesados como las frutas de IV gama y jugos de fruta sin pasteurizar. Estos productos requieren el diseño de nuevas estrategias de preservación no térmicas de bajo impacto ambiental, que puedan cumplir con las demandas de los consumidores y a la vez, alargar la vida útil de estos productos altamente perecederos, asegurando también su inocuidad. A su vez, el aumento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad, tanto a nivel nacional como mundial, marca una importante tendencia hacia el desarrollo de nuevos alimentos funcionales que permitan combatir esta enfermedad.

En base a los antecedentes planteados, se postulan las siguientes hipótesis de trabajo:

1. La aplicación postcosecha de bioactivos o agentes físicos no térmicos sobre frutas frescas cortadas y jugos de fruta son tecnologías de preservación amigables con el medio ambiente, que permiten controlar el desarrollo de mecanismos de deterioro microbianos.
2. La aplicación de varias tecnologías de obstáculos a niveles subletales resultan más efectivas en la protección de las frutas cortadas y jugos frente a patógenos y microorganismos de deterioro.
3. El modelado de la evolución de factores de preservación, permite maximizar los atributos de calidad y seleccionar las condiciones óptimas para la implementación de las tecnologías de obstáculos más adecuadas.
4. El desarrollo de nuevos alimentos funcionales proporciona un mayor valor agregado a las frutas, contribuyendo a una alimentación más saludable.

La propuesta presentada en esta Tesis, servirá para evaluar diferentes tecnologías verdes para la preservación de frutas de IV gama y sus jugos, buscando mejorar su

calidad sensorial, nutricional y microbiológica, además de garantizar su inocuidad. Por otro lado, la obtención de alimentos funcionales con efecto saciante basados en jugos de fruta significará un importante aporte en la salud del consumidor, adicionando un valor agregado al producto.

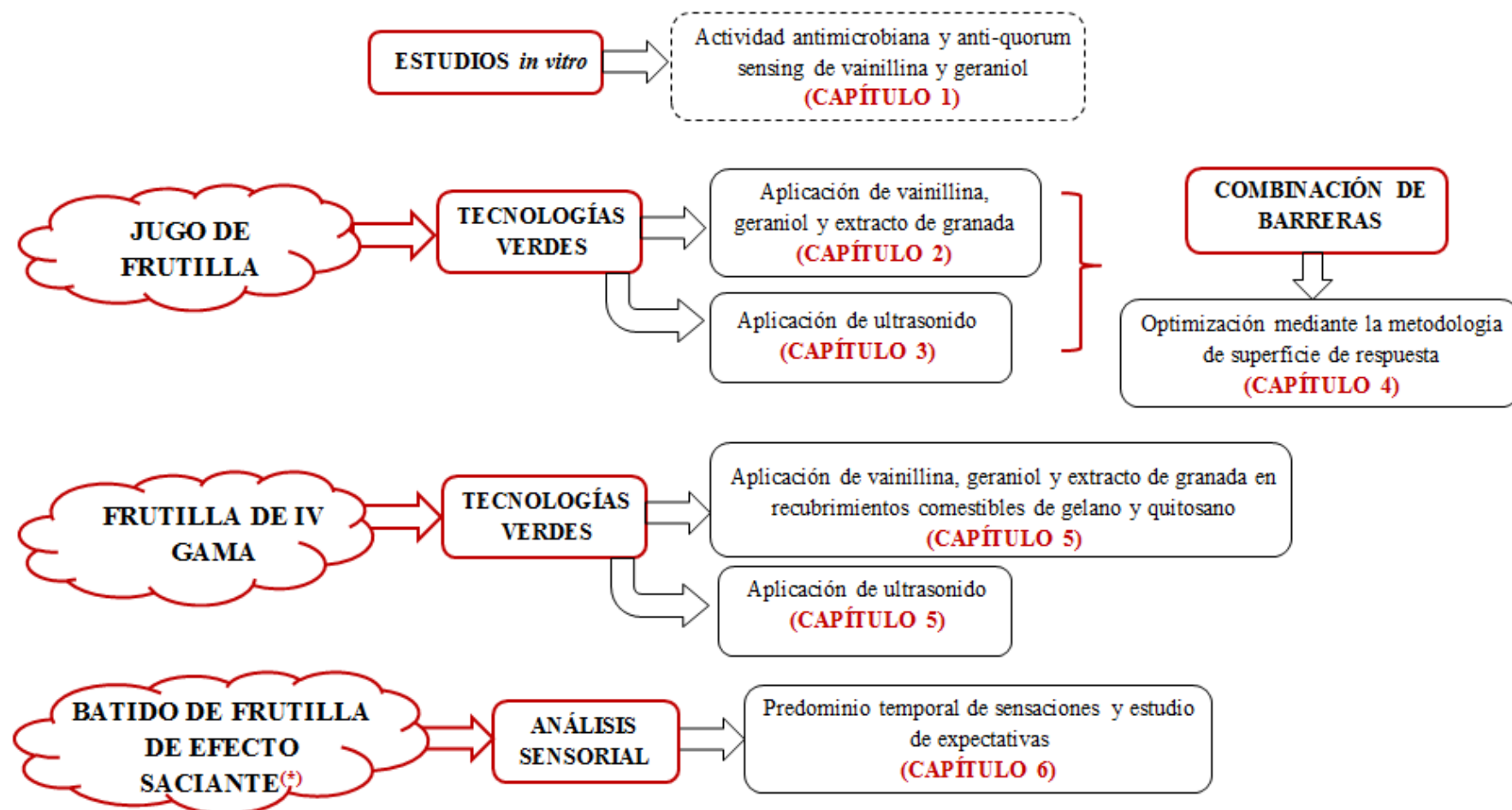
En particular, la presente Tesis se desarrollará empleando frutillas como sustrato (*Fragaria x ananassa*), una de las frutas finas con mayor importancia económica en nuestro país, y particularmente, uno de los cultivos predominantes del cinturón frutihortícola del partido de Gral. Pueyrredón (Buenos Aires, Argentina).

De esta manera, se propone el siguiente objetivo general y los siguientes objetivos específicos:

Incrementar la seguridad microbiológica y la vida útil de jugo de frutilla y frutilla de IV gama mediante la aplicación de tecnologías verdes de bajo impacto ambiental.

- ✓ *Objetivo específico 1:* Establecer el efecto antimicrobiano y antipatogénico *in vitro* de agentes químicos de origen natural.
- ✓ *Objetivo específico 2:* Establecer el efecto de diferentes tecnologías de preservación verdes (físicas y químicas) sobre la calidad de jugo de frutilla y frutilla mínimamente procesada durante el almacenamiento refrigerado.
- ✓ *Objetivo específico 3:* Optimizar la aplicación combinada de tecnologías de preservación y establecer su efecto sobre la calidad de jugo de frutilla durante el almacenamiento refrigerado.
- ✓ *Objetivo específico 4:* Desarrollar una bebida a base de frutilla con efecto saciante, enriquecida con fibras prebióticas y proteínas.

2. ESQUEMA DE TRABAJO



^(*) Los estudios realizados en el Capítulo 6 fueron llevados a cabo en una estancia de investigación en el IATA-CSIC (Valencia, España), en el marco del Proyecto de Cooperación Bilateral Tipo II (CONICET-CSIC) “Desarrollo de una bebida de efecto saciante basada en frutas suplementada con proteínas y fibras prebióticas”.

CAPÍTULO 1

Compuestos de origen natural con potencial uso en jugos y frutas de IV gama: estudios *in vitro*

RESUMEN DEL CAPÍTULO

En el presente Capítulo, se evaluaron las capacidades antimicrobianas y antipatogénicas de los agentes naturales vainillina (V) y geraniol (G) mediante diferentes estudios *in vitro*. En primer lugar, se evaluó la actividad antimicrobiana de dichos compuestos fitoquímicos. Para ello, se determinó la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) mediante el método de microdilución en caldo, utilizando como indicadores cuatro patógenos de relevancia en la industria alimenticia: dos bacterias Gram positivas (*Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) y dos bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* O157:H7 y *Pseudomonas aeruginosa*). Ambos bioactivos lograron inhibir el crecimiento de los patógenos seleccionados.

Por otro lado, se evaluó la actividad antipatogénica de V y G. Estos estudios se fundamentan en el potencial de V y G para inhibir la comunicación bacteriana llamada percepción del quorum o “*quorum sensing*” (QS). Así, en este Capítulo se determinó la actividad anti-QS de V y G utilizando la bacteria *Chromobacterium violaceum* como microorganismo sensor de este mecanismo, mediante la medición espectrofotométrica de su capacidad para producir un pigmento violeta llamado violaceína. Para cada biopreservante se estimó la Mínima Concentración Inhibitoria de QS (MCIQS) mediante regresión lineal. Los compuestos naturales en estudio, a concentraciones mucho menores a la MCI, redujeron significativamente la producción de violaceína sin inhibir el crecimiento del *C. violaceum*. Este resultado sugiere que estos compuestos podrían interferir con el sistema QS bacteriano y de esta manera prevenir la virulencia de las cepas. Las MCIQS halladas para V y G fueron entre 2,6 y 5,0 veces menores que sus respectivas MCI. Entonces, estos biopreservantes en concentraciones lo suficientemente bajas, podrían emplearse como una nueva estrategia para mejorar la seguridad de productos alimenticios sin la necesidad de inhibir el crecimiento microbiano. Esto permitiría reducir significativamente las concentraciones necesarias, y de esta manera se podría prevenir el desarrollo de cepas resistentes, resultando a su vez en un menor impacto sobre la calidad sensorial del producto final.

Los resultados obtenidos en este Capítulo sugieren que los compuestos bioactivos estudiados tienen potencial para ser aplicados como biopreservantes *in vivo* con el fin de garantizar la inocuidad de jugos de fruta y frutas mínimamente procesadas.

1. INTRODUCCIÓN

La evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos naturales en alimentos, requiere de estudios *in vitro* como primera etapa antes de evaluar su efecto en sistemas alimenticios reales. Si bien los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* usualmente difieren de los obtenidos en aplicaciones *in vivo*, es necesario realizar estudios preliminares para establecer los parámetros cuantitativos, previo a la aplicación de los agentes naturales en el producto alimenticio en cuestión.

Uno de los compuestos naturales que se estudiará en este Capítulo es la vainillina o vanilina ($C_8H_8O_3$, Fig. 1.1), que es el fitoquímico predominante en la vaina de vainilla (*Vanilla planifolia*) (0,3-3,0%), y representa un tercio del sabor y olor de los extractos de vainilla (Cid-Pérez y López-Malo, 2011). La vainillina es ampliamente utilizada como saborizante y aromatizante en la industria de alimentos, pero también se utiliza en la industria farmacéutica como estimulante gástrico, y en perfumería. Estructuralmente sus grupos funcionales incluyen el aldehído, éter y fenol. Como muchos otros compuestos fenólicos de bajo peso molecular, la vainillina muestra propiedades antioxidantes y antimicrobianas, y es por ello que presenta gran potencial como preservante de alimentos (Parthasarathy, Chempakam, y Zachariah, 2008).

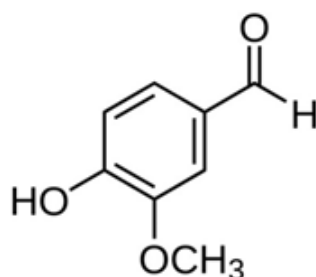


Fig. 1.1: Estructura química de la vainillina

Otro compuesto de origen natural con posible aplicación en la industria alimenticia es el geraniol, un alcohol monoterpenoide ($C_{10}H_{18}O$, Fig. 1.2). El geraniol es un constituyente común de varios aceites esenciales (geranio, citronela, limón y rosas, entre otros), emitido por las flores de muchas especies y presente en tejidos vegetales de muchas hierbas (Chen y Viljoen, 2010). El geraniol es comúnmente empleado en la industria de cosmética y perfumería. En soluciones ácidas se transforma en α -terpineol

(un terpeno cíclico) y cuando se oxida se convierte en citral o geranial. Hay mucha evidencia respecto de las capacidades antioxidantes, antimicrobianas y antitumorales del geraniol (Ahmad y col., 2011; Kim y col., 2011; Madankumar y col., 2013; Nazer, Kobilinsky, Tholozan, y Dubois-Brissonnet, 2005; Tiwari y Kakkar, 2009; Yegin, Perez-Lewis, Zhang, Akbulut, y Taylor, 2016).

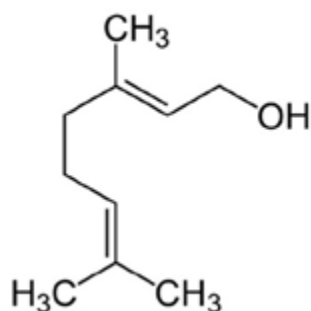


Fig. 1.2: Estructura química del geraniol

Una de las metodologías más utilizadas para la cuantificación de la actividad antimicrobiana de compuestos bioactivos es la determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) y la Mínima Concentración Bactericida (MCB), siendo la MCI el índice más utilizado. La MCI presenta varias definiciones, entre ellas se encuentran: “la mínima concentración de antimicrobiano capaz de mantener o reducir la viabilidad del inóculo”, “la mínima concentración requerida para inhibir por completo el crecimiento del microorganismo luego de 48 h de incubación”, “la menor concentración requerida para inhibir el crecimiento visible del microorganismo” o “la menor concentración capaz de reducir significativamente (> 90%) la viabilidad del inóculo” (Tajkarimi y col., 2010). Por otro lado, la MCB se define como “la mínima concentración de antimicrobiano capaz de matar al menos el 99,9% del inóculo inicial” o “la mínima concentración a la cual no se observa crecimiento microbiano luego de realizar un subcultivo en caldo de cultivo” (Tajkarimi y col., 2010).

El método de determinación de la MCI es el más utilizado por los investigadores, aunque muchos también utilizan la MCB como una medida del poder antimicrobiano del agente en estudio. Ponce y col. (2003) evaluaron la actividad antimicrobiana de diferentes aceites esenciales (aceite esencial de eucalipto, menta, limón, romero, orégano y lavanda, entre otros) frente a microflora nativa de acelga, a través de la determinación de su MCI y su MCB. La actividad antimicrobiana de compuestos

naturales tales como el timol, carvacrol, eugenol, ácido cinámico y diacetilo ha sido cuantificada mediante la determinación de la MCI frente a *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli* (Olasupo, Fitzgerald, Gasson, y Narbad, 2003) y frente a *Enterobacter sakazakii* (Lee y Jin, 2008). Diferentes aceites esenciales (entre ellos, aceite esencial de clavo de olor, canela, lemongrass y citronella) fueron evaluados como agentes antimicrobianos frente a bacterias patógenas (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, y *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica) y frente a microorganismos deteriorantes de alimentos (*Brochothrix thermosphacta* y *Pseudomonas fluorescens*), a través de las determinaciones de MCI y MCB (Mith y col., 2014). Los estudios acerca de las propiedades antimicrobianas de la vainillina y el geraniol son limitados y poco se conoce acerca de sus efectos en productos alimenticios.

Por otro lado, las sustancias antimicrobianas suelen utilizarse indebidamente, con el posible riesgo de aparición y propagación de microorganismos resistentes. Este fenómeno es un problema importante en la salud pública a nivel mundial que genera una creciente preocupación. La resistencia y potencial virulencia de las bacterias podría estar relacionada con su habilidad para detectar y responder a la densidad poblacional. Esta habilidad se denomina “comunicación célula a célula” o “percepción del quórum”, en inglés “*quorum sensing*” (QS), que es un mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad celular de la población. Las células involucradas producen y excretan sustancias, llamadas autoinductores, que sirven de señal química para inducir la expresión genética colectiva, es decir, es una forma de comunicación celular (Alvarez, Moreira, y Ponce, 2012). En general, se han identificado a acil-homoserina lactonas (AHL) como inductores en las bacterias Gram negativas y oligopéptidos en el caso de bacterias Gram positivas. Los mecanismos de QS permiten a las bacterias regular una serie de actividades fisiológicas. Estos procesos incluyen simbiosis, virulencia, competencia, conjugación, producción de antibióticos, motilidad, esporulación y formación de películas o *biofilms* (Nazzaro, Fratianni, y Coppola, 2013).

En los últimos años, la inhibición del QS ha sido un área de investigación de creciente interés debido a sus posibles aplicaciones en medicina, industria y biotecnología. El mecanismo de QS ha sido ampliamente estudiado para explicar la patogenicidad bacteriana y además se ha descubierto que el deterioro bacteriano de algunos productos alimenticios está influenciado por fenotipos regulados por este

mismo sistema. En este sentido, la inhibición de la comunicación celular o QS constituye una buena estrategia para prevenir o reducir las reacciones de deterioro en un alimento y la patogenicidad bacteriana.

La utilización de *Chromobacterium violaceum* como cepa indicadora de la detección del quórum en bioensayos ha sido de gran importancia. *C. violaceum* es una bacteria Gram negativa anaerobia facultativa con forma de cocobacilo. Forma parte de la flora normal del agua y suelo de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, y sintetiza un pigmento característico color violeta denominado violaceína. La producción de este pigmento está regulada por un sistema QS usando el autoinductor N-hexanoilo-homoserina lactona (C6-HSL, Fig. 1.3). El mecanismo de QS en bacterias Gram negativas como el *C. violaceum*, consiste en sintetizadores de autoinductores de tipo LuxI, que producen la molécula señal AHL, y receptores de estos compuestos del tipo LuxR (Stauff y Bassler, 2011). En este mecanismo, los homólogos de LuxI (una familia de proteínas que tienen una cadena de 190-230 aminoácidos) son los encargados de la síntesis del autoinductor, que al alcanzar una concentración umbral en el medio son receptados dentro de las células por las proteínas tipo LuxR. Tras la formación de complejos LuxR-autoinductor se activa la transcripción de determinados genes dando como respuesta fenotípica la producción del pigmento violaceína. Es por ello que *C. violaceum* ha sido utilizado como bacteria modelo para la búsqueda de productos naturales con propiedades anti-QS (Choo, Rukayadi, y Hwang, 2006). Cualquier alteración en la habilidad del *C. violaceum* de producir el pigmento ante la presencia de los compuestos en estudio puede ser cuantificada fácilmente mediante espectrofotometría.

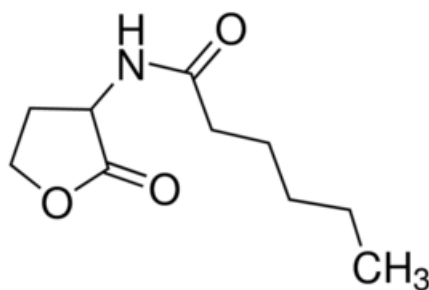


Fig. 1.3: Estructura química de la N-hexanoilo-homoserina lactona

Existen algunos estudios publicados que demuestran la potencialidad de varios extractos de origen vegetal (aceites esenciales, extractos de plantas medicinales,

extracto de ajo, vainilla, entre otros) así como también de compuestos fitoquímicos (ácidos fenólicos y compuestos que integran el grupo de los flavonoides) como inhibidores del mecanismo de comunicación celular en bacterias (Choo y col., 2006; Nazzaro y col., 2013). El uso de productos naturales para inhibir el sistema QS bacteriano podría limitar el deterioro de los alimentos y mejorar su seguridad reduciendo la capacidad de expresar genes de virulencia en el intestino y evitando la formación de *biofilms* (Nazzaro y col., 2013). En particular, la interrupción del sistema QS bacteriano mediante el uso de vainillina y geraniol, aunque apenas estudiado, podría ser una herramienta para controlar el deterioro y la patogénesis microbiana en alimentos.

En relación a lo expuesto, los objetivos de este Capítulo fueron: (a) evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de vainillina y geraniol frente a patógenos de interés en alimentos, tales como *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; y (b) investigar los efectos de dichos compuestos sobre la actividad inhibitoria de QS frente a *C. violaceum*, cuantificando la capacidad de la bacteria de producir el pigmento violaceína.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preservantes de origen natural

Los agentes naturales utilizados en el presente Capítulo se detallan a continuación:

- ✓ *Vainillina*: Marca Sigma Aldrich (St Lois MO, EEUU) (pureza $\geq 97\%$ según CG); su peso molecular es 152,15 g/mol; su punto de fusión es 81-83°C. Este producto es soluble en etanol (50 mg/mL), produciendo una solución clara, incolora. También es soluble en agua (10 mg/mL) y glicerol (50 mg/mL) a temperatura ambiente.
- ✓ *Geraniol*: Marca Sigma Aldrich (St Lois MO, EEUU) (pureza $\geq 97\%$ según CG); su peso molecular es 154,25 g/mol; su índice de refracción (20°C) es 1,469–1,478; su densidad (20°C) es 0,879 g/mL; y su punto de ebullición, 229–230°C.

2.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana

2.2.1. Cepas y condiciones de cultivo

Los microorganismos indicadores utilizados en los ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro* fueron: *Listeria monocytogenes* provista por CERELA (Centro de Referencia de Lactobacilos, Tucuman, Argentina) y *Staphylococcus aureus* ATCC (*American Type Culture Collection*) 25923 como bacterias Gram positivas; y *Escherichia coli* O157H:7 ATCC 43895 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como bacterias Gram negativas. Antes de cada ensayo, se realizaron dos repiques sucesivos partiendo de cultivos stock mantenidos a 4°C, colocando 100 µL de cada cultivo en 9,9 mL de caldo Cerebro-Corazón (CCC; Britania, Argentina) e incubando durante 24 h a 37°C.

2.2.2. Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria: método de microdilución en caldo

La determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) de los compuestos naturales seleccionados se llevó a cabo mediante el método de microdilución en caldo, de acuerdo al método estandarizado por el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2003) con algunas modificaciones. Para cada cepa, se preparó un cultivo con densidad óptica (DO) de 0,1 medida a 600 nm (aproximadamente 10^8 UFC/mL) que luego fue diluido en agua peptonada (0,1% p/v) en una relación 1:10, para ser utilizado como inóculo en los ensayos. Estos se llevaron a cabo en microplacas estériles de 96 pocillos. En cada pozo se colocaron 195 µL de caldo Mueller Hinton (MH; Britania, Argentina) enriquecido con los bioactivos en diferentes concentraciones y 5 µL de inóculo con el objetivo de lograr una concentración inicial de aproximadamente $5 \cdot 10^5$ UFC/mL.

Para la disolución de los biopreservantes se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO; Biopack, Buenos Aires, Argentina). La vainillina fue utilizada en un rango de concentraciones desde 0,2 hasta 4,0 mg/mL y el geraniol desde 0,2 hasta 2,4 µL/mL. Se realizaron controles de crecimiento de cada microorganismo en caldo MH y en caldo MH adicionado con DMSO. Como controles negativos se utilizaron el caldo MH, caldo MH con agregado de DMSO y caldo MH con agregado de los bioactivos en diferentes concentraciones, para corroborar su esterilidad. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Se consideró a la MCI como la mínima concentración del bioactivo para la cual no se evidenció crecimiento visible del microorganismo luego de 24 h de incubación a 37°C.

2.3. Ensayo cuantitativo de la inhibición de *quorum sensing*

2.3.1. Cepas y condiciones de cultivo

Para determinar la actividad inhibitoria de QS se utilizó la cepa de *C. violaceum* ATCC 12472 (Malbrán, Buenos Aires, Argentina). Esta cepa produce y responde a AHL, tales como C6-AHL y C4-AHL, lo cual la convierte en un excelente microorganismo para la búsqueda de actividad anti-QS (Adonizio, Downum, Bennett, y Mathee, 2006; Truchado, López-Gálvez, Gil, Tomás-Barberán, y Allende, 2009). Este sistema monitor bacteriológico genera una respuesta fenotípica mediante la producción del pigmento violaceína, inducido por la presencia de AHL. La bacteria fue cultivada aeróbicamente en caldo Luria-Bertani (LB: 1% p/v de triptona, 0,5% p/v de extracto de levadura y 1% p/v de NaCl) e incubada a 30°C en dos intervalos sucesivos de 24 h.

2.3.2. Cuantificación de la producción de violaceína

Para cuantificar la actividad anti-QS de los agentes naturales seleccionados, se llevaron a cabo ensayos de incubación de *C. violaceum*, midiendo su producción de violaceína. Inicialmente, la bacteria fue incubada a 30°C por 18-24 h. Luego, se inocularon tubos de ensayo (10 mL) con caldo LB estéril y con caldo LB adicionado con los agentes naturales en diferentes concentraciones (0,0625-0,7500 mg/mL para vainillina; 0,025-0,250 µL/mL para geraniol) hasta una DO final en cada tubo de 0,1 medida a 600 nm (equivalente a aproximadamente 10⁸ UFC/mL). Los compuestos naturales fueron previamente disueltos en DMSO. Una vez inoculados, los tubos de ensayo fueron incubados a 30°C por 48 h.

La cuantificación de la producción de violaceína se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Alvarez y col. (2014) donde 1 mL de cultivo de cada tubo de ensayo fue centrifugado a 13.000 rpm durante 15 min para precipitar la violaceína insoluble. Luego, el sobrenadante fue descartado y el pellet remanente fue solubilizado en 1 mL de DMSO. Se realizó una segunda centrifugación a 13.000 rpm durante 15 min para remover las células remanentes. Luego, se midió la absorbancia de cada sobrenadante a 585 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu Corp., Kyoto,

Japón). Finalmente, el porcentaje de inhibición de la producción de violaceína (%IPV) fue calculado de acuerdo a la Ec. 1.1, considerado como 100% de producción del pigmento a la cantidad producida por la muestra control (sin agregado del agente bioactivo).

$$\%IPV = \frac{DO_{control} - DO_{muestra}}{DO_{control}} 100\% \quad (Ec. 1.1)$$

donde,

$DO_{control}$ es la densidad óptica del control medida a 585 nm,

$DO_{muestra}$ es la densidad óptica de la muestra a 585 nm.

Los controles utilizados en este estudio fueron caldo LB sin bioactivos, y caldo LB adicionado con DMSO 1% (v/v).

2.3.3. Ensayo de viabilidad

La inhibición de la producción de violaceína (IPV) de la cepa indicadora *C. Violaceum* podría ser resultado del aplacamiento de las señales de QS o de la inhibición del crecimiento microbiano (Alvarez, Moreira, y Ponce, 2012). Luego, para determinar si efectivamente la IPV se debe a la actividad anti-QS de los compuestos, es necesario determinar la viabilidad del *C. Violaceum* para descartar la inhibición del crecimiento microbiano. Para ello, se prepararon los tubos de ensayo inoculados con *C. violaceum* con los bioactivos en estudio a diferentes concentraciones, tal como fue detallado en la sección 2.3.2 del presente Capítulo. Una vez cumplidas las 48 h de incubación a 30°C, se realizaron diluciones seriadas (1:10) en agua peptonada estéril (0,1% p/v) de cada solución inoculada, sembrando las diluciones apropiadas en agar LB (preparado adicionando 1,5% p/v de agar bacteriológico al caldo LB). Las placas se incubaron durante 48 h a 30°C para luego proceder al recuento de las colonias. Los recuentos microbianos se expresaron como log UFC/mL. Este ensayo se realizó por triplicado en tres corridas experimentales independientes.

2.3.4. Estimación de la Mínima Concentración Inhibitoria de Quorum Sensing

Una vez que la inhibición de la producción de violaceína fue medida a diferentes concentraciones para cada bioactivo natural, se estimó la mínima concentración inhibitoria de QS (MCIQS). De acuerdo a Alvarez y col. (2014), la MCIQS se define como la concentración efectiva de bioactivo a la cual se reduce en un 50% la actividad QS. Luego, se modeló el %IPV en función de la concentración de bioactivo utilizando la siguiente ecuación:

$$\log(y) = \beta_0 + \beta_1 \log(x) \quad (\text{Ec. 1.2})$$

donde,

y es %IPV,

x es la concentración de los compuestos naturales,

β_0 es la constante del modelo,

β_1 es el coeficiente lineal.

2.4. Análisis estadístico

Los estudios *in vitro* se realizaron mediante un diseño completamente aleatorizado, de tres corridas experimentales independientes. Los datos obtenidos se analizaron con el software libre R Project v.2.12.2 (R Development Core Team, 2011). Los resultados se informaron como la media de cada determinación acompañada por su error estándar (Kuehl, 2001). Se realizó el análisis de varianza de un factor (ANOVA) y se estimó la significancia estadística de las diferencias entre tratamientos mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, considerando significativamente diferentes aquellos valores con $p < 0,05$.

Las estimaciones de la MCIQS para cada agente natural se desarrollaron por regresión lineal (Montgomery, Peck, y Vining, 2006) utilizando el software libre R Project v.2.12.2 (R Development Core Team, 2011). Previamente se realizó la transformación logarítmica de los datos de producción de violaceína para las diferentes concentraciones de bioactivo, de acuerdo a la ecuación propuesta (Ec. 1.2).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Actividad antimicrobiana *in vitro* de los compuestos naturales

La capacidad antimicrobiana de vainillina (V) y geraniol (G) fue cuantificada utilizando como parámetro a la MCI. Para llevar a cabo los estudios *in vitro* se seleccionaron como cepas indicadoras cuatro patógenos de relevancia en la industria de alimentos teniendo en cuenta la futura aplicación de dichos agentes naturales en jugos de fruta y frutas de IV gama.

Una de las bacterias Gram positivas seleccionadas fue *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* es un bacilo no esporulado, aerobio o anaerobio facultativo, capaz de proliferar en un amplio rango de temperaturas (1-45°C). Este microorganismo se encuentra presente en el medio ambiente; puede ser aislado del suelo, agua, vegetación, heces del ganado, entre otros (Heaton y Jones, 2008); y suele estar asociado con frutas y vegetales frescos o mínimamente procesados (Abadias, Usall, Anguera, Solsona, y Viñas, 2008). Es uno de los patógenos causantes de infecciones alimentarias más violentas, con una de las tasas de mortalidad más altas dentro de las toxicoinfecciones alimentarias.

La otra bacteria Gram positiva seleccionada para el ensayo *in vitro* fue *Staphylococcus aureus*, que es una bacteria anaerobia facultativa, inmóvil y no esporulada. *S. aureus* es un agente patógeno ubicuo, ampliamente distribuido por todo el mundo, común en la piel y en la mucosa nasal de los humanos y animales, que puede provocar intoxicación alimentaria. Por lo tanto, suele ser utilizado para monitorear las condiciones higiénicas en la producción de bebidas y alimentos para garantizarle al consumidor la inocuidad del producto.

Además, fueron elegidas dos bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* O157:H7 y *Pseudomona aeruginosa*. *E. coli* es una enterobacteria anaerobia facultativa que se encuentra generalmente en los intestinos de animales, aunque se la puede encontrar en una amplia variedad de ambientes. La *E. coli* O157:H7 es una cepa patogénica, también conocida como *E. coli* enterohemorrágica o EHEC, que ha sido asociada a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), incluyendo algunas inducidas por frutas y jugos de fruta contaminados (Outbreak Data Base, 2011). *E. coli* O157:H7 fue confirmado como agente epidemiológico en jugos por primera vez en 1991, luego de un brote en sidra de manzana (Besser y col., 1993).

Finalmente, *Pseudomonas* es un grupo de bacterias Gram negativas, móviles, aerobias, presentes en el suelo. La importancia de este grupo de bacterias en agricultura y tecnología de alimentos se debe a una serie de factores entre los que destacan: su actividad como patógenos oportunistas de animales, su actividad como patógenos en vegetales y su actividad como agentes alterantes de alimentos. Desde el punto de vista humano, el principal patógeno dentro del grupo de *Pseudomonas* es *P. aeruginosa*, y por ello se seleccionó como bacteria indicadora.

Los valores de MCI encontrados en los estudios *in vitro* se muestran en la Tabla 1.1. La vainillina mostró el mismo nivel de efectividad frente a todas las bacterias evaluadas (con valores de MCI entre 2,5 y 3,0 mg/mL). Sin embargo, el geraniol mostró menor efectividad contra *P. aeruginosa* (MCI > 2,4 µL/mL), que contra *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *E. coli* (0,5-0,6 µL/mL). Las bacterias Gram negativas, suelen ser ligeramente menos susceptibles a los antimicrobianos que las Gram positivas, debido a que sus membranas celulares presentan lipopolisacáridos (Burt, 2004). Los resultados hallados para ambos compuestos, muestran su alta efectividad como agentes antimicrobianos inclusive frente a bacterias Gram negativas como *E. coli*.

Tabla 1.1: Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) de vainillina y geraniol frente a patógenos de relevancia en la industria de alimentos

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Vainillina	2,5 mg/mL	3,0 mg/mL	2,5 mg/mL	3,0 mg/mL
Geraniol	0,5 µL/mL	0,6 µL/mL	0,6 µL/mL	> 2,4 µL/mL

Vasantha Rupasinghe y col. (2006) estudiaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de vainillina frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*, entre otros patógenos de importancia en alimentos, y encontraron que para la mayoría de los microorganismos evaluados los valores de MCI se hallaban entre 6 y 18 mM de vainillina (entre 0,9 y 2,7 mg/mL), en concordancia con los resultados presentados en este Capítulo. Cava-Roda y col. (2012) evaluaron la actividad antimicrobiana de vainillina *in vitro* frente a *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 hallando valores de MCI de 3,0 y 2,8 mg/mL, respectivamente a pH 7; mientras que las MCI halladas a pH 6 fueron menores (2,8 y 2,4 mg/mL, respectivamente). Fitzgerald y col. (2004) investigaron el modo de acción de la vainillina frente a *E. coli*, *Lactobacillus plantarum* y *Listeria innocua* mediante estudios *in vitro*, y concluyeron que la actividad antimicrobiana de la vainillina reside principalmente en su habilidad para afectar perjudicialmente la integridad de la

membrana citoplasmática, provocando la pérdida de gradiente de iones, la pérdida de homeóstasis del pH e inhibición de la actividad respiratoria. Estos autores encontraron además, que la actividad antimicrobiana de este compuesto es dependiente del tiempo de exposición, concentración y el microorganismo target.

En concordancia con los resultados aquí presentados, Scortichini y Rossi (1991) estudiaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de geraniol frente a siete cepas de *Erwinia amylovora*, y todas las cepas evaluadas a una concentración de 10^5 UFC/mL fueron inhibidas por el geraniol en un rango de concentraciones de 0,6 a 1,5 $\mu\text{L/mL}$, luego de 24 h. Raybaudi-Massila y col. (2006) evaluaron la actividad antimicrobiana de diferentes compuestos naturales *in vitro* frente a *E. coli*, *L. innocua* y *Salmonella* Enteritidis, encontrando valores de MCI de 1,0 $\mu\text{L/mL}$ para el geraniol; mientras que Kim y col. (1995) encontraron valores de MCI frente a *Salmonella* Typhimurium y *L. monocytogenes* de 0,5 y 1,0 $\mu\text{L/mL}$ de geraniol, respectivamente. La actividad antimicrobiana *in vitro* del geraniol ha sido asociada, como en el caso de la vainillina, a su habilidad para introducirse en las membranas celulares, donde altera sus propiedades, haciéndola más fluida y aumentando su permeabilidad general (Bard, Albrecht, Gupta, Guynn, y Stillwell, 1988). Este incremento en la permeabilidad provoca la pérdida de potasio y otros iones, alterando la homeostasis celular microbiana.

3.2. Actividad anti-*quorum sensing* de los compuestos naturales frente a *C. violaceum*

Cuando se utiliza la bacteria biosensora *C. violaceum*, la reducción de la producción de violaceína es indicativa de un efecto inhibitorio del mecanismo de QS por parte de los agentes bioactivos ensayados. La inhibición de la producción de violaceína del *C. violaceum* puede deberse a dos causas: (1) su inhibición celular; y (2) la inhibición de su sistema QS. En este caso el objetivo no es la eliminación del patógeno mediante su muerte celular, sino que se apunta a una estrategia menos agresiva: la inhibición de su virulencia. Es por ello que las concentraciones seleccionadas para evaluar la actividad anti-QS de vainillina y geraniol son significativamente menores respecto a aquellas utilizadas en la determinación de la MCI, teniendo en cuenta que el objetivo aquí no es inhibir el crecimiento del patógeno sino interrumpir su sistema de comunicación celular.

En primer lugar, se verificó que el solvente empleado (DMSO) no inhibiera el crecimiento de *C. violaceum* ni afectara su producción de violaceína. Los resultados de dicho ensayo se presentan en la Tabla 1.2, que indican que el DMSO no afectó significativamente a la producción de violaceína del *C. violaceum* ni a su crecimiento celular.

Tabla 1.2: Efecto del solvente DMSO sobre la inhibición de la producción de violaceína del *Chromobacterium violaceum* y su viabilidad

	Inhibición de la producción de violaceína (%IPV)	Biomasa de <i>C. violaceum</i> (log UFC/mL)
<i>Control</i>	0 ^a	8,81 ± 0,07 ^a
<i>Control + DMSO 1%</i>	1,16 ± 0,60 ^a	8,83 ± 0,11 ^a

Los datos se expresan como los valores medios ± error estándar.

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre los controles ($p < 0,05$).

3.2.1. Actividad inhibitoria de la vainillina sobre el quorum sensing

La Fig. 1.4 muestra la inhibición de la producción de violaceína del *C. violaceum* expuesto a diferentes concentraciones de vainillina. Para evaluar si la inhibición de la producción de violaceína (%IPV) fue causada por la inhibición del mecanismo de QS o por reducción del crecimiento microbiano, se determinó también la biomasa de *C. violaceum*. Como se puede observar en la Fig. 1.4, se encontró una relación inversa entre la producción del pigmento y la concentración de vainillina aplicada, es decir, a mayor concentración de este antimicrobiano, menor producción del pigmento. De hecho, las menores concentraciones de vainillina evaluadas (0,0625, 0,1250 y 0,3125 mg/mL) no lograron inhibir la producción de violaceína. Sin embargo, a partir de una concentración de 0,5000 mg/mL de vainillina, se puede observar una disminución significativa en la producción de violaceína con respecto al control, con una IPV de 27,76%, 57,43% y 99,92% para las concentraciones de V de 0,5000, 0,6250 y 0,7500 mg/mL, respectivamente. Con respecto a la viabilidad celular del *C. violaceum*, ésta sólo se vio afectada por la mayor concentración de vainillina evaluada (0,7500 mg/mL), que produjo un efecto significativo sobre el crecimiento bacteriano, reduciendo los recuentos en aproximadamente 1 log UFC/mL comparado con el control, llegando a un recuento de 7,99 log luego de 48 h de incubación.

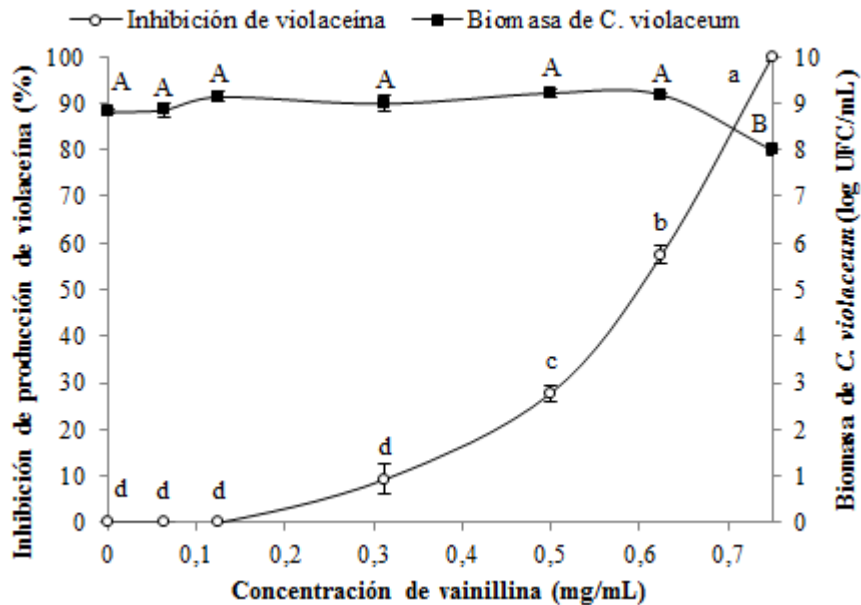


Fig. 1.4: Efecto de la concentración de vainillina sobre la inhibición de la producción de violaceína de *C. violaceum* y sobre su crecimiento. Las barras indican los errores estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas en la inhibición de la producción de violaceína ($p < 0,05$). Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas en la biomasa de *C. violaceum* ($p < 0,05$).

Hasta el momento, no hay estudios donde la vainillina haya sido evaluada como posible inhibidor de QS (IQS) frente a *C. violaceum*. Sin embargo, en concordancia con los resultados aquí hallados, la vainillina ha sido reconocida como potencial IQS frente a *Aeromonas hydrophila*, donde se logró inhibir la formación de *biofilms* (regulada por el sistema QS) sin afectar su crecimiento celular (Kappachery, Paul, Yoon, y Kweon, 2010). Además, Ponnusamy, Paul, y Kweon (2009) también estudiaron la actividad anti-QS de la vainillina frente a *A. hydrophila*, y encontraron que aplicada a una concentración de 0,25 mg/mL inhibió el 46,3% de la formación de *biofilms* del patógeno. Estos resultados demuestran que la vainillina podría ser un bioactivo prometedor para ser explorado como compuesto IQS.

3.2.2. Actividad inhibitoria del geraniol sobre el quorum sensing

De manera similar al comportamiento previamente presentado para la vainillina, el geraniol mostró una inhibición significativa de la producción de violaceína (Fig. 1.5) comparada con la muestra control. El geraniol se evaluó en concentraciones desde 0 (control) hasta 0,250 $\mu\text{L/mL}$. Las dos menores concentraciones de geraniol evaluadas (0,025 y 0,050 $\mu\text{L/mL}$) no inhibieron significativamente la producción de violaceína

con respecto al control. Se hallaron %IPV significativos de 8,08%, 29,02%, 50,78% y 98,95% para concentraciones de geraniol de 0,100, 0,150, 0,200, y 0,250 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente. Con respecto al efecto del geraniol sobre la viabilidad del *C. violaceum* (Fig. 1.5), el comportamiento observado también fue similar al encontrado para vainillina. Sólo la mayor concentración estudiada (0,250 $\mu\text{L/mL}$) afectó significativamente la biomasa del *C. violaceum*, con una reducción de aproximadamente 2 log UFC/mL comparado con el control, alcanzando un recuento de 6,70 log luego de 48 h de incubación. Por otro lado, para concentraciones de geraniol de 0,100, 0,150, y 0,200 $\mu\text{L/mL}$, la inhibición de la producción del pigmento no afectó el crecimiento del *C. violaceum*, y por ello, solamente podría ser atribuida al bloqueo del mecanismo QS.

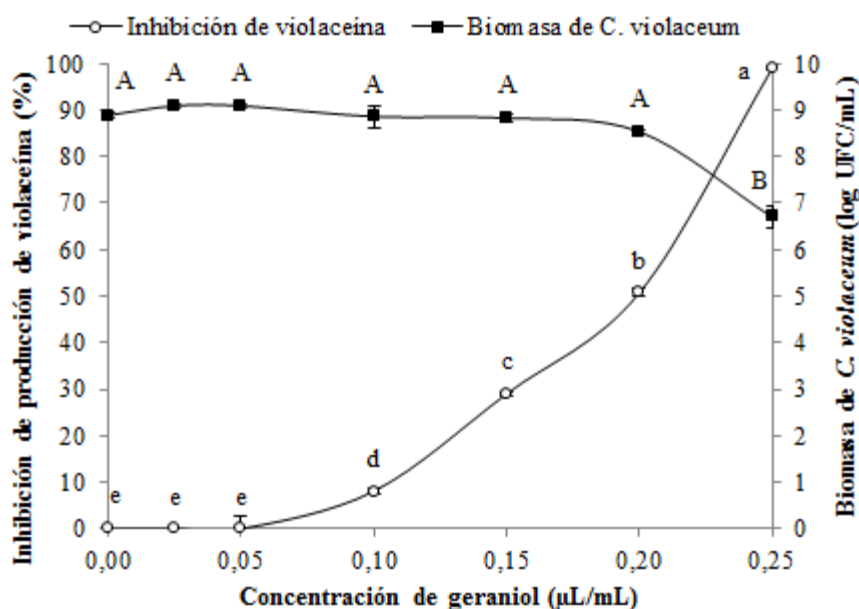


Fig. 1.5: Efecto de la concentración de geraniol sobre la inhibición de la producción de violaceína de *C. violaceum* y sobre su crecimiento. Las barras representan los errores estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas en la inhibición de la producción de violaceína ($p < 0,05$). Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas en la biomasa de *C. violaceum* ($p < 0,05$).

Al momento, la actividad anti-QS del geraniol no ha sido estudiada; sin embargo, otros fitoquímicos alimenticios han demostrado actuar como IQS no sólo porque presentan una estructura química similar a las de las señales de QS (N-hexanoil-homoserina lactona, Fig. 1.3) sino también por su habilidad para degradar a los receptores de dichas señales (LuxR/LasR) (Nazzaro y col., 2013). Esto podría explicar la actividad anti-QS encontrada para ambos compuestos estudiados, vainillina y

geraniol, frente a *C. violaceum*, aunque deberían realizarse estudios más profundos para entender por completo su mecanismo de acción como IQS.

3.2.3. Determinación de la MCIQS de los compuestos naturales frente a *C. violaceum*

Como parte del análisis de la actividad anti-QS de los compuestos bioactivos se determinó la Mínima Concentración Inhibitoria del *Quórum Sensing* (MCIQS) definida como la concentración de bioactivo que es capaz de reducir en un 50% la actividad de percepción del quórum. La obtención de los valores MCIQS permite cuantificar la actividad inhibitoria del QS ejercida por los compuestos bioactivos frente a *C. violaceum* y así, poder comparar su efectividad.

A partir de los datos experimentales, ilustrados en las Figs. 1.4 y 1.5, pudieron hallarse valores estimados de MCIQS para cada biopreservante. Para esto, se utilizaron modelos de regresión lineal luego de realizar una transformación logarítmica de los datos de acuerdo con la ecuación propuesta (Ec. 1.2, ver inciso 2.3.4). La MCIQS, el R^2 ajustado y los coeficientes de la regresión lineal para cada agente antimicrobiano se muestran en la Tabla 1.3. Para cada bioactivo evaluado, la MCIQS fue menor que la concentración de bioactivo que redujo significativamente la biomasa de *C. violaceum* con respecto al control. Cada antimicrobiano mostró bajas MCIQS, demostrando su alta capacidad anti-QS a bajas concentraciones.

Tabla 1.3: Mínima Concentración Inhibitoria de *Quorum Sensing* (MCIQS) y parámetros de regresión lineal para cada compuesto natural frente a *Chromobacterium violaceum*

	R^2 ajustado	β_0	β_1	MCIQS
<i>Vainillina</i>	0,959	2,38 ± 0,13	3,08 ± 0,39	0,60 ± 0,02 mg/mL
<i>Geraniol</i>	0,982	3,62 ± 0,16	2,69 ± 0,20	0,19 ± 0,01 µL/mL

Las MCIQS y sus correspondientes coeficientes de regresión lineal (β_0 y β_1) se expresan como los valores medios ± error estándar.

Se puede observar que las concentraciones de bioactivo necesarias para inhibir la actividad anti-QS fueron entre 2,6 y 5,0 veces menores que aquellas necesarias para inhibir el crecimiento de los patógenos (Tabla 1.1). Esto significa que combatir a los microorganismos deteriorantes y patógenos de alimentos mediante la inhibición de su sistema QS representaría una buena estrategia desde el punto de vista económico ya que de esta manera se reducirían significativamente las cantidades de bioactivos necesarias. Además, desde el punto de vista sensorial, la reducción de las concentraciones

empleadas de los antimicrobianos naturales disminuiría el impacto negativo sobre las características sensoriales del producto. Finalmente, como se ha mencionado previamente, la principal ventaja de la inhibición del QS es que se mantiene el nicho ecológico del producto, es decir, no se busca la inhibición de los microorganismos mediante la muerte celular, sino que se permite su crecimiento y por el contrario, lo que se busca es inhibir su patogenicidad o en el caso de microorganismos deteriorantes, inhibir aquellos mecanismos de deterioro que también se encuentran regulados por el sistema QS. De esta manera se evita la formación de cepas resistentes y además, la microflora nativa del producto permanece intacta, funcionando como competencia ante el crecimiento de patógenos en el caso de una posible contaminación.

4. CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en los estudios *in vitro* realizados son prometedores. La vainillina y el geraniol mostraron actividad antimicrobiana significativa frente a los patógenos evaluados, tanto Gram positivos como negativos. Ambos compuestos naturales son productos generalmente reconocidos como seguros (GRAS), con lo cual podrían ser utilizados en la industria alimenticia en reemplazo de sanitizantes y preservantes sintéticos, actualmente cuestionados por los consumidores.

Los resultados presentados en el ensayo de anti-QS reflejan el potencial de la vainillina y el geraniol para actuar como IQS a bajas concentraciones (entre 2,6 y 5,0 veces menores que la MCI), considerando que fueron capaces de interrumpir la comunicación intercelular, inhibiendo la producción de violaceína del *C. violaceum* sin afectar su crecimiento. Es de gran relevancia lograr un mejor entendimiento del potencial de fitoquímicos para inhibir la actividad QS en el campo de investigación que apunta a identificar y desarrollar nuevos compuestos capaces de prevenir infecciones bacterianas en humanos.

Debido a que muchos patógenos de gran incidencia en alimentos utilizan el sistema de QS para regular su virulencia, aquellas estrategias diseñadas para interferir con ese sistema de señalización microbiano probablemente tendrán una gran aplicabilidad para el control biológico de enfermedades causadas por microorganismos. Por consiguiente, los agentes naturales evaluados en este Capítulo resultan buenos

candidatos para el desarrollo de compuestos anti-QS con potencial aplicación para el control de enfermedades bacterianas reguladas por el sistema QS.

A partir de los resultados presentados en este Capítulo, surge el siguiente paso que es analizar la aplicación de los compuestos naturales en una matriz alimentaria, con el fin de determinar su efectividad como agentes antimicrobianos *in vivo*, inhibiendo no sólo la microflora nativa y deteriorante del producto, sino también ensayando su efectividad frente a patógenos ante una posible contaminación. Es importante, además de estudiar la actividad antimicrobiana de los bioactivos, evaluar los efectos de su incorporación sobre la retención de las propiedades sensoriales y nutricionales del producto en cuestión.

Con respecto a su actividad antipatogénica, si bien hasta aquí se han obtenido resultados de actividad *in vitro* frente a un microorganismo modelo, podrían plantearse futuras investigaciones que incluyan la utilización de estos bioactivos frente a diferentes patógenos y aplicados en diferentes sustratos alimentarios a fin de estudiar cómo afecta la presencia de los compuestos al mecanismo de señalización de bacterias patógenas y deteriorantes presentes en el alimento.

CAPÍTULO 2

Aplicación de vainillina, geraniol y extracto de granada en jugo de frutilla sin pasteurizar

RESUMEN DEL CAPÍTULO

En el presente Capítulo, los compuestos naturales vainillina (V), geraniol (G) y extracto de granada (EG) fueron estudiados como biopreservantes aplicados en jugo de frutilla sin pasteurizar. El jugo de frutilla fue tratado con cada uno de los agentes naturales en dos concentraciones: vainillina en 2,5 y 5,0 mg/mL; geraniol en 0,6 y 1,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$; y extracto de granada en 180 y 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Inmediatamente después de ser tratados, los jugos fueron almacenados en condiciones de refrigeración (5°C) para llevar a cabo estudios microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales durante su almacenamiento. Además, un segundo lote de jugos fue inoculado con *Escherichia coli* O157:H7 (aproximadamente 10^5 UFC/mL) inmediatamente antes de ser tratados con los biopreservantes, simulando una contaminación accidental con el patógeno.

Los compuestos naturales evaluados en este Capítulo no tuvieron efectos significativos sobre los valores de sólidos solubles totales ni sobre la acidez total del jugo de frutilla, con respecto al control durante el almacenamiento refrigerado. Los tratamientos utilizando V y G en ambas concentraciones fueron altamente efectivos en reducir la microflora nativa del jugo de frutilla (reduciendo las poblaciones en más de 3 ciclos logarítmicos en comparación con la muestra control), extendiendo la vida útil del producto desde el punto de vista microbiológico. Asimismo, ambos antimicrobianos mejoraron la seguridad del producto al reducir significativamente los recuentos de *E. coli* O157:H7 en los jugos inoculados. El EG aplicado en su concentración más elevada mostró importantes reducciones sobre los recuentos de bacterias mesófilas y psicrófilas, pero no tuvo efectos significativos sobre las poblaciones de hongos y levaduras ni sobre el patógeno inoculado. Por otro lado, el jugo tratado con vainillina mostró un incremento significativo en el contenido de polifenoles comparado con el jugo sin tratar. La aplicación de V y G sobre el jugo de frutilla tuvo efectos negativos sobre su calidad sensorial, mientras que el EG no tuvo un impacto significativo sobre los atributos organolépticos evaluados. Los resultados de esta investigación indican el potencial uso de la vainillina, el geraniol y el extracto de granada como alternativas a los preservantes sintéticos.

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, los consumidores cuestionan cada vez más aquellos productos alimenticios que contienen compuestos químicos, ya que los catalogan como productos artificiales. De esta manera, el uso de productos naturales está ganando interés y ha sido ampliamente estudiado en los últimos años, buscando reemplazar preservantes químicos como el benzoato de sodio y el sorbato de potasio, comúnmente utilizados para prevenir el deterioro de jugos de fruta.

Diferentes extractos y compuestos fitoquímicos provenientes de plantas, frutas y vegetales han sido reconocidos como tratamientos eficaces contra bacterias deteriorantes de alimentos y patógenas, con la ventaja adicional de poseer propiedades antioxidantes y beneficiosas para la salud humana. En particular, en este Capítulo se estudiarán los efectos de la aplicación de tres agentes naturales en jugo de frutilla sin pasteurizar: vainillina (V), geraniol (G) y extracto de granada (EG). Las características generales de la vainillina y el geraniol fueron presentadas en el Capítulo 1 de la presente Tesis, donde se estudió la actividad antimicrobiana y anti-QS *in vitro* de ambos compuestos. El extracto de granada ha sido investigado previamente en el Grupo de Investigación en Ingeniería en Alimentos (GIIA, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata). Su actividad antimicrobiana y anti-QS fue estudiada *in vitro* por Alvarez y col. (2012).

La granada (*Punica granatum* L.) pertenece a la familia de las *Lythraceae* y es originaria de Asia Occidental y la zona Mediterránea de Europa. Existen estudios que han demostrado la eficacia antimicrobiana de varios extractos de granada y también compuestos puros obtenidos a partir de diferentes partes de la planta. Se ha demostrado la efectividad de estos extractos para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y deteriorantes de los alimentos, además de presentar actividad antifúngica y antiviral (Dahham, Ali, Tabassum, y Khan, 2010; Howell y D'Souza, 2013; Pagliarulo y col., 2016; Su, Sangster, y D'Souza, 2010). Los fitoquímicos presentes en los extractos de granada, tales como compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y alcaloides, son los responsables de sus propiedades biológicas. Luego, el uso de extractos de granada o compuestos puros como biopreservantes en alimentos es una alternativa natural muy

prometedora. Los principales compuestos bioactivos presentes en extractos de granada son punicalaginas, ácido elágico y derivados (Fig. 2.1) (Qu y col., 2012).

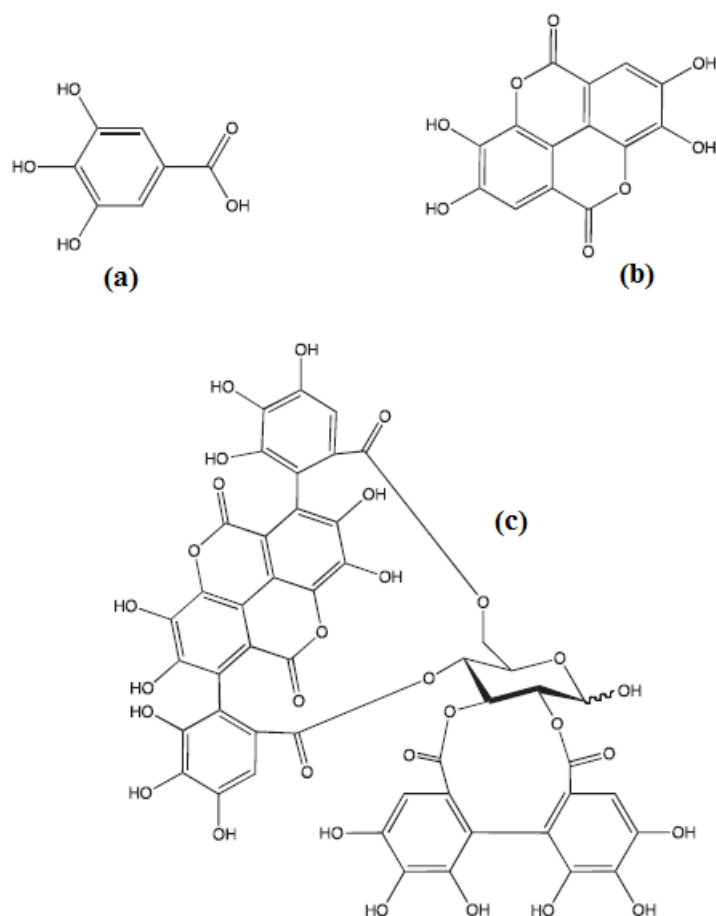


Fig. 2.1: Estructuras químicas de los principales compuestos presentes en el extracto de granada: (a) ácido gálico, (b) ácido elágico, (c) punicalaginas A y B.

La actividad antimicrobiana de estos compuestos naturales ha sido demostrada en el pasado mediante estudios *in vitro* (Alvarez y col., 2012; Fitzgerald y col., 2004; Kim y col., 1995; Raybaudi-massilia y Mosqueda-melgar, 2006; Vasantha Rupasinghe y col., 2006). Pocos estudios se han realizado donde estos agentes naturales se apliquen *in vivo* en jugos de fruta. Se han encontrado algunas investigaciones donde vainillina y geraniol se han aplicado *in vivo* para inhibir el control de bacterias patógenas o microorganismos deteriorantes inoculados en jugos de fruta (Fitzgerald, Stratford, Gasson, y Narbad, 2004; Moon y col., 2006; Raybaudi-massilia y Mosqueda-melgar, 2006). Sin embargo, no se han encontrado estudios *in vivo*, donde estos agentes naturales se apliquen a jugos

de fruta evaluando integralmente sus parámetros de calidad (microbiológica, nutricional y sensorial) y su estabilidad en el almacenamiento.

De esta forma, en este Capítulo, se propone analizar el tratamiento de jugo de frutilla con vainillina, geraniol y extracto de granada en diferentes concentraciones, y su posterior almacenamiento a 5°C. Durante el almacenamiento refrigerado se evaluaron la evolución de parámetros fisicoquímicos, microflora nativa, propiedades antioxidantes y organolépticas de los jugos. Además, se llevó a cabo una inoculación con *E. coli* O157:H7 para evaluar la efectividad de estos antimicrobianos en mejorar la seguridad del jugo de frutilla sin pasteurizar.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preservantes de origen natural

Los agentes naturales utilizados en el presente Capítulo se detallan a continuación:

- ✓ *Vainillina*: Marca Sigma Aldrich (St Lois MO, EEUU) (pureza $\geq 97\%$ según CG). Sus características fueron detalladas en el Capítulo 1 (inciso 2.1).
- ✓ *Geraniol*: Marca Sigma Aldrich (St Lois MO, EEUU) (pureza $\geq 97\%$ según CG). Sus características fueron detalladas en el Capítulo 1 (inciso 2.1).
- ✓ *Extracto de granada*: Extracto seco obtenido a partir de la *Punica granatum* L., marca PureBulk (EEUU). A diferencia de la vainillina y el geraniol, el extracto de granada no es un compuesto puro, sino que se trata de una mezcla de sustancias. El perfil de compuestos presentes en el extracto, y en consecuencia, su actividad antioxidante y antimicrobiana, dependerá de varios factores. Entre ellos se encuentran la parte de la planta utilizada (cáscara, fruto o semilla), el solvente utilizado en la extracción (agua, etanol, metanol, acetona, cloroformo, entre otros) y las condiciones de extracción. Luego, es necesaria una caracterización del EG utilizado para cuantificar los principales compuestos presentes en el mismo. Dicha caracterización se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), que se detalla a continuación en la sección 2.2 del presente Capítulo.

2.2. Caracterización del extracto de granada mediante HPLC

Para poder cuantificar los principales compuestos fenólicos presentes en el extracto de granada empleado en esta Tesis Doctoral, se realizó un análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Los resultados se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Principales compuestos fenólicos presentes en el extracto de granada

Componente	Concentración (mg/g de extracto)
Ácido elágico	345 ± 7
Ácido gálico	184 ± 4
Punicalagina A	98 ± 2
Punicalagina B	47 ± 1
Ácido caféico	19,0 ± 0,4
Ácido cumárico	ND

Los datos se muestran como los valores medios ± desviaciones estándar.

ND: no detectado.

2.2.1. Soluciones estándares

Los estándares de ácido cafeico, ácido gálico, ácido cumárico, ácido elágico y punicalaginas A y B fueron comprados en Sigma Aldrich. Se prepararon soluciones stock de cada estándar en una mezcla metanol:agua 50:50 (v/v).

2.2.2. Preparación de la muestra

Se preparó una solución de extracto de granada 1:100 usando una mezcla metanol:agua 50:50 (v/v). Luego, se realizó una dilución 1:10 para poder realizar el análisis.

2.2.3. Equipo

El Sistema HPLC consistió en un HPLC HP 1100 con una bomba cuaternaria. La separación cromatográfica de los compuestos se llevó a cabo utilizando una columna Varian C18 (4,6 mm ID × 250 mm, 5 μm) con una temperatura de horno de 30°C. La fase móvil consistió en una mezcla metanol:agua, con un flujo de 1 mL/min y un gradiente de elución de 10% hasta 90% de metanol. El volumen de inyección fue de 20

µL, y la detección UV fue establecida en un rango de longitudes de onda de 210-380 nm.

2.3. Procesamiento de materia prima y aplicación de los biopreservantes

Para los ensayos *in vivo* se utilizaron frutillas (*Fragaria x ananassa*, cv Aromas) provistas por Compañía Industrial Frutihortícola S.A., ubicada en Sierra de los Padres, Mar del Plata, Argentina. Las frutillas se lavaron por inmersión en agua corriente durante 2 min, sus pedúnculos fueron removidos y se prepararon los jugos en un extractor de jugo comercial (Moulinex).

Cada uno de los agentes naturales fue aplicado directamente sobre el jugo de frutilla en dos concentraciones: 2,5 mg/mL y 5,0 mg/mL de vainillina (V1 y V2, respectivamente); 0,6 µL/mL y 1,2 µL/mL de geraniol (G1 y G2, respectivamente); y 180 µg/mL y 360 µg/mL de extracto de granada (EG1 y EG2, respectivamente). Las concentraciones evaluadas de vainillina y geraniol fueron seleccionadas de acuerdo a los estudios previos *in vitro* presentados en el Capítulo 1. Las concentraciones de extracto de granada fueron elegidas de acuerdo a los estudios *in vitro* realizados por Alvarez y col. (2012). El jugo de frutilla sin aplicación de biopreservantes (sin tratamiento) fue utilizado como muestra control.

Una vez aplicados los tratamientos, los jugos fueron envasados en frascos de polipropileno y se almacenaron a 5°C para evaluar la evolución de las poblaciones microbianas nativas, la capacidad antioxidante, el contenido de fenoles totales, sólidos solubles totales, acidez total y los atributos sensoriales.

2.4. Estudio de inoculación de jugo de frutilla con *Escherichia coli* O157:H7

En otra serie de ensayos se trabajó con jugo de frutilla inoculado con *E. coli* O157:H7 para evaluar la efectividad de los diferentes agentes naturales sobre el control del crecimiento del patógeno durante el almacenamiento refrigerado.

2.4.1. Reactivación de *E. coli* O157:H7 y preparación del inóculo

Para la inoculación del jugo de frutilla se utilizó *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, a partir de un cultivo stock de *E. coli* O157:H7 mantenido a 4°C. Antes de cada ensayo, se realizaron dos repiques consecutivos colocando 0,1 mL del cultivo en 9,9 mL de

caldo cerebro-corazón (CCC, Britania, Argentina) e incubando durante 24 h a 37°C. El inóculo o suspensión bacteriana se preparó añadiendo 10 mL del cultivo fresco de *E. coli* O157:H7 a 90 mL de agua peptonada (1 g/L) estéril.

2.4.2. Inoculación de muestras de jugo de frutilla

Las muestras de jugo de frutilla se inocularon con *E. coli* O157:H7 inmediatamente antes de la aplicación de los tratamientos con los biopreservantes, simulando una manipulación inadecuada de las frutillas durante la post-cosecha o una contaminación pre-cosecha en el campo. Para esto, se tomaron 100 µL de la suspensión previamente realizada y se agregaron a 9,9 mL de jugo de frutilla para llegar a una concentración final del patógeno de aproximadamente 5 log UFC/mL.

2.5. Análisis fisicoquímicos

2.5.1. Sólidos solubles totales

Los grados Brix (°Bx) son una medida de los sólidos solubles presentes en jugos y pulpa de frutas. Se expresan como porcentaje de sacarosa a 20°C. Los sólidos solubles totales (SST) se midieron por triplicado usando un refractómetro Atago (Abbe 1T74T, Tokio, Japón).

2.5.2. Acidez titulable

Para la determinación de la acidez total (AT), un volumen conocido de cada muestra se colocó en un erlenmeyer con agua destilada. Esta solución se tituló contra NaOH estandarizado 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador del punto final (pH 8,2 ± 0,1). El volumen gastado de NaOH fue convertido a gramos de ácido cítrico cada 100 mL de jugo (%AT) basado en el método de Sadler y Murphy (2010), y la acidez titulable se calculó usando la Ec. 2.1. La AT se midió por triplicado.

$$\% AT = \frac{V_{0,1N} \cdot 0,064}{V_M} 100\% \quad (\text{Ec. 2.1})$$

donde,

V es el volumen gastado de NaOH en la titulación

V_M es el volumen de la muestra de jugo de frutilla.

2.6. Evaluación instrumental del color

La determinación del color se llevó a cabo mediante un colorímetro LoviBond RT500 (Neu-Isenburg, Alemania) con un área circular de 8 mm de diámetro, calibrado con un blanco estándar ($Y = 93,2$, $x = 0,3133$, $y = 0,3192$). El color de las muestras fue determinado midiendo las coordenadas de cromaticidad L^* , a^* y b^* de la escala CIE-Lab (CIE, 1977). Luego, se calculó el ángulo Hue (h°) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$h^\circ = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (\text{Ec. 2.2})$$

Para cada tratamiento y cada tiempo de almacenamiento se realizaron tres mediciones.

2.7. Análisis microbiológicos

Los recuentos de bacterias mesófilas, hongos y levaduras, y bacterias psicrófilas en los jugos de frutilla sin inocular se evaluaron a los días 0, 3, 7 y 14 de almacenamiento para estudiar el impacto de los agentes naturales sobre la microflora nativa del jugo. Por otro lado, a los mismos tiempos de almacenamiento también se evaluaron los recuentos de *E. coli* en los jugos inoculados para determinar el efecto de los diferentes tratamientos sobre el control del crecimiento del patógeno. Aquellas muestras que al día 14 no mostraron recuentos superiores a 10^7 UFC/mL (límite máximo de recuento de bacterias mesófilas totales permitido por las regulaciones españolas para determinar el fin de la vida útil microbiológica de productos frutihortícolas mínimamente procesados) (BOE, 2001), fueron almacenadas durante otra semana, para evaluar si la actividad antimicrobiana de los agentes naturales se mantenía efectiva incluso a los 21 días de almacenamiento.

En las muestras sin inocular, la microflora nativa se evaluó de la siguiente manera: se tomó una alícuota de 10 mL de jugo de cada tratamiento a cada tiempo de almacenamiento refrigerado. Se realizaron diluciones seriadas (1:10) de cada muestra en agua peptonada (0,1% p/v) y se sembraron en superficie por duplicado. La enumeración de las poblaciones microbianas se llevó a cabo de acuerdo a Ponce y col. (2008) usando los siguientes medios y condiciones de cultivo: las bacterias aeróbicas mesófilas (MES) se sembraron en agar PCA (*Plate Count Agar*) incubado a 35°C por 48 h; hongos y

levaduras (HYL) en YGC (*Yeast-Glucose-Chloramphenicol*) incubando a 25°C por 5 d; y las bacterias psicrófilas (PSI) en PCA incubando a 7°C por 7 d.

En las muestras inoculadas, los recuentos de *E. coli* fueron realizados de la siguiente manera: una alícuota de 0,1 mL de cada muestra fue sembrada en superficie en placas de agar EMB (*Eosin Methylene Blue*) y las colonias fueron contadas luego de 24-48 h de incubación a 37°C. El agar EMB es un medio selectivo que permite la caracterización de colonias típicas de *E. coli*. Se contaron únicamente aquellas colonias con centro oscuro y con brillo metálico. Se seleccionaron colonias características de *E. coli* al azar, y se confirmaron utilizando el medio cromogénico Chromobrit.

Todos los medios fueron comprados en Britania, Buenos Aires, Argentina. Los recuentos microbianos se realizaron por duplicado y se expresaron como log UFC/mL.

2.8. Extracción de antioxidantes y compuestos polifenólicos

La capacidad antioxidante y el contenido de compuestos polifenólicos fueron evaluados en los días 0, 3, 7, 10 y 15 de almacenamiento para estudiar el impacto de los preservantes naturales sobre la calidad nutricional del jugo de frutilla. Para ello se realizó una extracción donde 2 mL de jugo de frutilla de cada tratamiento fueron homogeneizados con 10 mL de solución de etanol (80% v/v) en un vortex. El homogenato se centrifugó a 8.000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue recolectado y filtrado usando papel de filtro Whatman #1. El extracto etanólico se mantuvo a -20°C para ser utilizado en las determinaciones de contenido de polifenoles totales (CPT) y capacidad antioxidante por el método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

2.8.1. Actividad secuestrante del radical DPPH

Existen muchos métodos para medir la capacidad antioxidante de una especie o sustancia. Un método muy usado se basa en la estabilidad del radical DPPH, la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado. Esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 520 nm. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie

radical (R[•]) se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto, pérdida de la absorbancia.

La actividad antioxidante se midió utilizando la metodología de DPPH propuesta por Viacava y Roura (2015). Para las determinaciones se utilizó una solución etanólica de DPPH (100 µM). Para determinar la absorbancia inicial de la solución de DPPH, 0,1 mL de etanol fueron mezclados con 3,9 mL de DPPH (100 µM). A continuación, 0,1 mL de extracto de cada muestra se agregaron a 3,9 mL de la solución de DPPH (100 µM). La mezcla se agitó inmediatamente y se dejó reposar a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego de 60 min, se midió la absorbancia a 517 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible (1601 PC UV-visible, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón).

La actividad antioxidante se midió por duplicado y se expresó como porcentaje de inhibición, lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{Inhibición} = \% I = \frac{A_0 - A_M}{A_0} 100\% \quad (\text{Ec. 2.3})$$

donde,

A_0 es la absorbancia inicial de la solución de DPPH (0,1 mL de etanol + 3,9 mL de DPPH 100 µM) medida a 517 nm luego de 60 min en oscuridad,

A_M es la absorbancia de la muestra (0,1 mL de extracto de la muestra + 3,9 mL de DPPH 100 µM) medida a 517 nm luego de 60 min en oscuridad.

2.8.2. Contenido de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales (CPT) se determinó mediante espectrofotometría utilizando el método del reactivo Folin–Ciocalteu (RFC) de acuerdo a la metodología propuesta por Viacava y Roura (2015) con modificaciones. Los extractos apropiadamente diluidos fueron agregados a 1000 µL de RFC (diluido 1:10). Luego de 3 min de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 800 µL de una solución Na₂CO₃ 7,5% p/v, y la mezcla reactiva fue incubada por 2 h a la misma temperatura. La absorbancia se midió a 765 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible (1601 PC UV-visible, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) y el CPT se calculó

utilizando ácido gálico como estándar. Los resultados del CPT se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 mL de jugo y fueron medidos por duplicado.

2.9. Análisis sensorial

Se llevó a cabo un análisis sensorial descriptivo cuantitativo (QDA, *Quantitative Descriptive Analysis*) de acuerdo a Carbonell y col. (2007). Diez panelistas entrenados evaluaron el jugo de frutilla preparado en el mismo día del ensayo ($t = 0$ d) y también el jugo almacenado por 7 días a 5°C. Las muestras se rotularon con códigos numéricos de 3 dígitos y se entregaron aleatoriamente a los panelistas.

Se proporcionó agua para eliminar el gusto residual entre muestras. Los atributos sensoriales evaluados fueron: *color*, *olor a vainilla*, *olor cítrico*, *olor extraño*, *sabor dulce*, *sabor ácido* y *sabor amargo*. Para evaluar cada atributo se utilizó una línea de 5 cm sin divisiones, con términos en sus extremos relacionados con las intensidades mínimas y máximas. Las definiciones de cada atributo sensorial evaluado, junto con los términos de las intensidades mínima y máxima, y los valores de referencia (jugo de frutilla fresco sin tratar) se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2: Descripción de los atributos sensoriales seleccionados, término de las intensidades mínima y máxima y valores consensuados para la muestra de referencia

Atributo	Descripción	Mínimo (0)	Máximo (5)	Ref.
Apariencia				
<i>Color</i>	Intensidad del color	Rojo característico	Rojo oscuro	0
Olor				
<i>Vainilla</i>	Intensidad de aroma a vainilla	Baja	Alta	0
<i>Cítrico</i>	Intensidad de aromas cítricos	Baja	Alta	0
<i>Extraño</i>	Intensidad de olores a fermentación y otros olores no característicos	Baja	Alta	0
Sabor				
<i>Dulce</i>	Intensidad de sabor dulce	Baja	Alta	1
<i>Ácido</i>	Intensidad de sabor ácido	Baja	Alta	1
<i>Amargo</i>	Intensidad de sabor amargo	Baja	Alta	0

Ref.: Referencia: jugo de frutilla fresco sin tratamiento.

2.10. Análisis estadístico

Los ensayos de aplicación de agentes naturales en jugo de frutilla se realizaron mediante un diseño completamente aleatorizado, de tres corridas experimentales independientes. Los datos obtenidos se analizaron con el software libre R Project v.2.12.2 (R Development Core Team, 2011). Los resultados se informaron como la media de cada determinación acompañada por su error estándar (Kuehl, 2001). Se realizó el análisis de varianza de un factor (ANOVA) y se estimó la significancia estadística de las diferencias entre tratamientos mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, considerando significativamente diferentes aquellos valores con $p < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Efecto de los agentes naturales sobre parámetros fisicoquímicos de jugo de frutilla

3.1.1. Evolución de los sólidos solubles totales

Un parámetro de calidad importante en jugos de fruta es el contenido de sólidos solubles totales (SST), medido en °Bx, que está constituido principalmente por azúcares como sacarosa, fructosa y glucosa, pero también tiene en cuenta en menor medida a otros compuestos sólidos presentes en el jugo como ácidos y sales. En la Tabla 2.3 se muestra la evolución de los SST en jugo de frutilla tratado con los biopreservantes y sin tratar durante el almacenamiento. Los valores hallados fueron similares a aquellos encontrados por Bermejo-Prada y Otero (2016) trabajando con jugo de frutilla, donde los SST medios fueron de 8,89 °Bx; y por Garzón y Wrolstad (2002), quienes hallaron valores entre 8,05 y 8,25 °Bx para jugo de frutilla.

Los resultados del ANOVA indicaron que los tratamientos aplicados no tuvieron un efecto significativo sobre los °Bx medidos, y a su vez, el tiempo de almacenamiento tampoco afectó significativamente a dicho parámetro. Resultados similares fueron encontrados por Leite y col. (2016), quienes evaluaron la aplicación de aceite esencial de *Cymbopogon citratus* sobre jugo de ananá. El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* contiene geraniol en aproximadamente un 3%, si bien su componente mayoritario es el geranial (40%) (Matasyoh, Wagara, Nakavuma, y Kiburai, 2011). Estos autores evaluaron los sólidos solubles totales de los jugos tratados con 1,25 y 2,50

$\mu\text{L}/\text{mL}$ de AE, y no hallaron diferencias significativas con el jugo sin tratar. Otros autores también evaluaron diferentes compuestos naturales para la preservación de jugos de fruta, sin encontrar cambios significativos en los sólidos solubles totales (de Sousa Guedes y col., 2016; Donsì, Annunziata, Sessa, y Ferrari, 2011; Kapoor, Singh, y Singh, 2008).

Tabla 2.3: Evolución de sólidos solubles totales ($^{\circ}\text{Bx}$) en jugo de frutilla tratado con agentes naturales durante el almacenamiento refrigerado a 5°C

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)				
	0	3	7	10	14
<i>Control</i>	$8,50 \pm 0,16^{\text{aA}}$	$8,55 \pm 0,03^{\text{aA}}$	$8,55 \pm 0,10^{\text{aA}}$	$8,25 \pm 0,08^{\text{aA}}$	$7,92 \pm 0,19^{\text{aA}}$
<i>V1</i>	$8,25 \pm 0,14^{\text{aA}}$	$8,35 \pm 0,11^{\text{aA}}$	$8,39 \pm 0,03^{\text{aA}}$	$7,94 \pm 0,13^{\text{aA}}$	$8,17 \pm 0,12^{\text{aA}}$
<i>V2</i>	$8,34 \pm 0,14^{\text{aA}}$	$8,51 \pm 0,11^{\text{aA}}$	$8,47 \pm 0,03^{\text{aA}}$	$8,14 \pm 0,07^{\text{aA}}$	$8,25 \pm 0,06^{\text{aA}}$
<i>G1</i>	$8,39 \pm 0,15^{\text{aA}}$	$8,25 \pm 0,06^{\text{aA}}$	$8,51 \pm 0,03^{\text{aA}}$	$7,99 \pm 0,08^{\text{aA}}$	$8,00 \pm 0,08^{\text{aA}}$
<i>G2</i>	$8,28 \pm 0,03^{\text{aA}}$	$8,10 \pm 0,06^{\text{aA}}$	$8,17 \pm 0,10^{\text{aA}}$	$7,97 \pm 0,10^{\text{aA}}$	$7,98 \pm 0,10^{\text{aA}}$
<i>EG1</i>	$8,00 \pm 0,11^{\text{aA}}$	$8,25 \pm 0,16^{\text{aA}}$	$8,13 \pm 0,20^{\text{aA}}$	$8,10 \pm 0,06^{\text{aA}}$	$7,90 \pm 0,08^{\text{aA}}$
<i>EG2</i>	$7,98 \pm 0,08^{\text{aA}}$	$8,13 \pm 0,08^{\text{aA}}$	$8,18 \pm 0,08^{\text{aA}}$	$8,10 \pm 0,07^{\text{aA}}$	$7,99 \pm 0,10^{\text{aA}}$

Los datos se expresan como valores medios \pm errores estándar. Valores con diferentes letras minúsculas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos. Valores con diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al tiempo de almacenamiento. *V1*: 2,5 mg/mL de vainillina; *V2*: 5,0 mg/mL de vainillina; *G1*: 0,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de geraniol; *G2*: 1,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de geraniol; *EG1*: 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto de granada; *EG2*: 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto de granada.

3.1.2. Evolución de acidez titulable

La medida de acidez total (AT) en jugos y bebidas también es requerida por todos los productores como un indicador clave de calidad. El porcentaje de acidez se define como la cantidad de ácido predominante en las frutas. Los ácidos que se encuentran más comúnmente son cítrico, málico, ascórbico, oxálico, tartárico y acético. El ácido predominante en el caso de la frutilla es el cítrico, y es por esto que se expresa a la AT como porcentaje de ácido cítrico en el jugo.

Los resultados de AT para jugos de frutilla tratados con los biopreservantes y sin tratar durante el almacenamiento se muestran en la Tabla 2.4. Los valores de AT hallados fueron similares a aquellos encontrados por Bermejo-Prada y Otero (2016) trabajando con jugo de frutilla, donde los valores de acidez titulable promedio en las muestras control fueron de 0,69% AT, y a los resultados presentados por Tiwari y col. (2008), donde la AT en el jugo de frutilla previo a los tratamientos fue de 0,73%. Al igual que para el caso de los SST, la aplicación de los agentes evaluados en este

Capítulo no indujo ningún cambio significativo sobre la acidez titulable del jugo de frutilla comparado con la muestra control durante el almacenamiento. En concordancia con los resultados aquí presentados, Kapoor y col. (2008) evaluaron aceite esencial y oleorresinas de *Cinnamomum tamala* sobre jugo de ananá, encontrando que el agregado de los compuestos naturales no afectó significativamente la acidez de los jugos comparados con el control; resultados similares fueron hallados por de Sousa y col. (2016) evaluando aceites esenciales de *Mentha* en jugos de guava, mango y ananá.

Tabla 2.4: Evolución de acidez titulable (%AT) en jugo de frutilla tratado con agentes naturales durante el almacenamiento refrigerado a 5°C

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)				
	0	3	7	10	14
Control	0,780 ± 0,013 ^{aA}	0,806 ± 0,013 ^{aA}	0,877 ± 0,006 ^{aA}	0,806 ± 0,005 ^{aA}	0,797 ± 0,010 ^{aA}
V1	0,747 ± 0,094 ^{aA}	0,783 ± 0,073 ^{aA}	0,883 ± 0,021 ^{aA}	0,783 ± 0,042 ^{aA}	0,765 ± 0,010 ^{aA}
V2	0,742 ± 0,055 ^{aA}	0,781 ± 0,066 ^{aA}	0,883 ± 0,010 ^{aA}	0,769 ± 0,005 ^{aA}	0,779 ± 0,026 ^{aA}
G1	0,772 ± 0,033 ^{aA}	0,777 ± 0,035 ^{aA}	0,818 ± 0,042 ^{aA}	0,764 ± 0,026 ^{aA}	0,723 ± 0,047 ^{aA}
G2	0,756 ± 0,016 ^{aA}	0,763 ± 0,038 ^{aA}	0,802 ± 0,016 ^{aA}	0,781 ± 0,031 ^{aA}	0,812 ± 0,010 ^{aA}
EG1	0,710 ± 0,006 ^{aA}	0,749 ± 0,006 ^{aA}	0,809 ± 0,013 ^{aA}	0,749 ± 0,013 ^{aA}	0,740 ± 0,012 ^{aA}
EG2	0,746 ± 0,019 ^{aA}	0,764 ± 0,006 ^{aA}	0,812 ± 0,013 ^{aA}	0,774 ± 0,019 ^{aA}	0,765 ± 0,013 ^{aA}

Los datos se expresan como valores medios ± errores estándar. Valores con diferentes letras minúsculas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos. Valores con diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al tiempo de almacenamiento. V1: 2,5 mg/mL de vainillina; V2: 5,0 mg/mL de vainillina; G1: 0,6 µL/mL de geraniol; G2: 1,2 µL/mL de geraniol; EG1: 180 µg/mL de extracto de granada; EG2: 360 µg/mL de extracto de granada.

3.2. Efecto de los agentes naturales sobre los parámetros de color de jugo de frutilla

El color es un atributo de calidad importante en jugos, ya que puede condicionar la aceptabilidad del consumidor. El efecto de los biopreservantes sobre el color, fue evaluado mediante mediciones instrumentales con un colorímetro, a través de los parámetros de luminosidad (L^*) y ángulo hue (h°). La evolución de dichos parámetros a través del almacenamiento refrigerado se muestra en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5: Evolución de los parámetros de color de luminosidad (L^*) y ángulo hue (h°) en jugo de frutilla tratado con agentes naturales durante el almacenamiento refrigerado a 5°C

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)				
	0	3	7	10	14
L^*					
<i>Control</i>	41,16 ± 1,30 ^{aA}	23,73 ± 1,68 ^{aB}	18,31 ± 0,58 ^{abC}	16,11 ± 0,79 ^{bc}	18,36 ± 0,26 ^{bc}
<i>V1</i>	34,70 ± 1,37 ^{ba}	20,84 ± 1,56 ^{abB}	16,11 ± 0,37 ^{bcC}	14,70 ± 0,22 ^{bcC}	16,71 ± 0,18 ^{cC}
<i>V2</i>	35,50 ± 1,51 ^{ba}	19,76 ± 0,71 ^{abB}	15,97 ± 0,09 ^{cd}	13,19 ± 0,19 ^{cd}	17,04 ± 0,31 ^{bcB}
<i>G1</i>	27,13 ± 0,28 ^{ca}	19,86 ± 0,23 ^{abB}	18,54 ± 0,14 ^{aD}	14,74 ± 0,08 ^{bcD}	18,24 ± 0,15 ^{bc}
<i>G2</i>	26,41 ± 0,64 ^{ca}	20,15 ± 0,38 ^{abB}	19,02 ± 0,26 ^{aB}	15,78 ± 0,32 ^{bc}	20,34 ± 0,09 ^{aB}
<i>EG1</i>	29,56 ± 0,74 ^{ca}	16,61 ± 0,68 ^{abB}	18,34 ± 0,63 ^{aB}	18,02 ± 0,16 ^{aB}	18,72 ± 0,23 ^{abB}
<i>EG2</i>	31,34 ± 1,40 ^{bcA}	19,13 ± 1,29 ^{abB}	18,25 ± 0,55 ^{abB}	17,83 ± 0,22 ^{aB}	20,58 ± 0,23 ^{aB}
h°					
<i>Control</i>	40,30 ± 0,38 ^{aA}	35,33 ± 0,50 ^{cb}	35,81 ± 0,62 ^{abcB}	36,19 ± 0,40 ^{abcB}	38,64 ± 0,16 ^{ba}
<i>V1</i>	32,26 ± 1,48 ^{cb}	35,62 ± 0,67 ^{bcA}	33,52 ± 0,34 ^{cdAB}	33,14 ± 0,14 ^{cdAB}	35,03 ± 0,21 ^{caB}
<i>V2</i>	32,20 ± 0,80 ^{cb}	35,33 ± 1,27 ^{ca}	33,15 ± 0,34 ^{dAB}	32,49 ± 0,37 ^{dAB}	34,77 ± 0,22 ^{caB}
<i>G1</i>	36,44 ± 0,43 ^{bc}	40,38 ± 0,24 ^{abA}	36,78 ± 0,20 ^{abB}	36,27 ± 0,15 ^{abc}	38,82 ± 0,12 ^{bb}
<i>G2</i>	39,00 ± 0,56 ^{abAB}	41,33 ± 0,37 ^{aA}	38,07 ± 0,73 ^{aAB}	37,72 ± 0,58 ^{aB}	40,67 ± 0,71 ^{aA}
<i>EG1</i>	38,45 ± 0,46 ^{abA}	37,35 ± 0,46 ^{abcA}	35,17 ± 0,53 ^{bcdB}	39,12 ± 0,10 ^{bcdB}	38,52 ± 0,26 ^{ba}
<i>EG2</i>	37,99 ± 0,29 ^{abA}	38,83 ± 2,21 ^{abcA}	34,41 ± 0,71 ^{cdA}	38,21 ± 0,48 ^{bcdA}	38,42 ± 0,21 ^{ba}

Los datos se expresan como valores medios \pm errores estándar. Valores con diferentes letras minúsculas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos. Valores con diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al tiempo de almacenamiento. **V1:** 2,5 mg/mL de vainillina; **V2:** 5,0 mg/mL de vainillina; **G1:** 0,6 μ L/mL de geraniol; **G2:** 1,2 μ L/mL de geraniol; **EG1:** 180 μ g/mL de extracto de granada; **EG2:** 360 μ g/mL de extracto de granada.

Al día 0, los tratamientos con agentes naturales disminuyeron el parámetro L^* de manera estadísticamente significativa con respecto al control. El ángulo hue fue significativamente menor en los jugos tratados con V1, V2 y G1, donde las muestras tratadas con vainillina se vieron más afectadas que las tratadas con geraniol. En cambio, las muestras tratadas con G2, EG1 y EG2 mostraron valores de h° sin cambios estadísticamente significativos con respecto al control.

A lo largo del almacenamiento se puede observar, tanto en las muestras tratadas como en el control, una disminución en los valores de L^* con el tiempo. Si bien los tratamientos provocaron una disminución en los valores iniciales de luminosidad, durante el almacenamiento sufrieron un deterioro más paulatino que la muestra control, alcanzando al día 14 valores muy similares a los de la muestra sin tratar. Las muestras de jugo tratadas con G2 y EG2 incluso alcanzaron valores de L^* significativamente superiores a los de la muestra control al día 14. Sin embargo, ningún tratamiento logró

mantener los parámetros de color del jugo fresco sin tratar. Los valores del ángulo hue se mantuvieron más estables durante el almacenamiento, tanto en las muestras tratadas como en el control.

Los efectos producidos por los tratamientos con preservantes naturales y por el tiempo de almacenamiento sobre los parámetros de color del jugo, si bien pueden ser estadísticamente significativos mediante una evaluación del color instrumental, podrían no representar cambios visualmente evidentes para el consumidor mediante una evaluación sensorial. Es por ello que el color de los jugos también fue evaluado de manera cuantitativa a través de un panel organoléptico (cuyos resultados se presentan en la sección 3.6 del presente Capítulo).

3.3. Efecto de los agentes naturales sobre la microflora nativa de jugo de frutilla

Para evaluar el efecto de los agentes naturales sobre la microflora nativa del jugo de frutilla, se analizaron los recuentos de diferentes poblaciones microbianas a lo largo del almacenamiento: bacterias mesófilas totales, hongos y levaduras y bacterias psicrófilas totales.

3.3.1. Evolución de bacterias mesófilas

Las bacterias mesófilas dan un estimativo de las poblaciones viables totales, son indicativo de los microorganismos endógenos y dan una estimación del nivel de contaminación del producto (Ponce y col., 2008). Si bien no contribuyen directamente al estudio de la calidad sanitaria de los alimentos (HPA, 2009), las bacterias mesófilas pueden utilizarse para evaluar la calidad microbiológica del producto en cuestión y ser relacionados directamente con la vida útil del mismo. La evolución de las bacterias mesófilas de las diferentes muestras de jugo de frutilla se muestran en la Fig. 2.2.

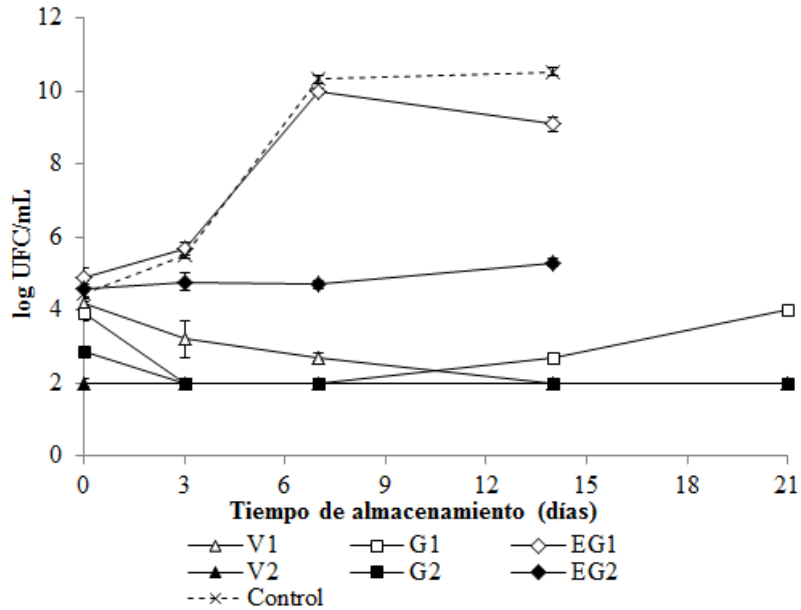


Fig. 2.2: Evolución de bacterias mesófilas en jugo de frutilla tratado con agentes naturales durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. V1: 2,5 mg/mL de vainillina; V2: 5,0 mg/mL de vainillina; G1: 0,6 µL/mL de geraniol; G2: 1,2 µL/mL de geraniol; EG1: 180 µg/mL de extracto de granada; EG2: 360 µg/mL de extracto de granada.

El recuento inicial (día 0) de bacterias mesófilas en el jugo de frutilla sin tratar fue de 4,45 log UFC/mL. Al día 0, el tratamiento de vainillina V1 no redujo significativamente las bacterias mesófilas del producto. En cambio, sí se observaron reducciones significativas ($p < 0,05$) en aquellas muestras tratadas con V2, con recuentos de mesófilas por debajo del límite de detección ($< 2,00$ log). En los jugos tratados con geraniol, los resultados observados fueron similares a los de la V: la menor concentración estudiada (G1) no logró una reducción significativa en mesófilas al día 0, mientras que la concentración más elevada (G2) redujo los recuentos hasta valores de 2,85 log. Los tratamientos con extracto de granada (EG1 y EG2) tampoco produjeron reducciones significativas sobre las bacterias mesófilas comparadas con el control.

A lo largo del almacenamiento, las bacterias mesófilas en el jugo sin tratar aumentaron, llegando a recuentos de 10,53 log al día 14. Ambos tratamientos con vainillina redujeron significativamente los recuentos de MES respecto al control. Al día 3, el jugo tratado con V1 tuvo recuentos de 3,20 log (significativamente menores que los recuentos del día 0) y el jugo tratado con V2 mantuvo los recuentos debajo del límite de detección hasta el final del almacenamiento. Los tratamientos con geraniol resultaron muy efectivos en la inhibición de los recuentos de bacterias mesófilas, manteniendo en

la muestra G1 los recuentos por debajo del límite de detección hasta el día 7, mostrando un leve incremento hacia el final del almacenamiento alcanzando recuentos de 4,00 log al día 21. La muestra tratada con G2 mostró una inhibición más importante de las MES con recuentos menores a los 2,00 log incluso a día 21. El extracto de granada aplicado en su menor concentración (EG1) mostró recuentos similares al control hasta el día 14, donde se observó una disminución en MES de aproximadamente 1,40 log. La muestra EG2 mostró un efecto bacteriostático, manteniendo en todo el almacenamiento los recuentos de MES entre 4,58 y 5,30 log.

3.3.2. Evolución de hongos y levaduras

La Fig. 2.3 muestra la evolución de las poblaciones de hongos y levaduras durante el almacenamiento para las diferentes muestras de jugo de frutilla. El deterioro de alimentos causado por hongos y levaduras y la ocurrencia de sus micotoxinas constituye un potencial riesgo para la salud. Además, las levaduras producen diferentes metabolitos como ácidos, alcoholes y ésteres, los cuales podrían afectar el olor y sabor del producto dependiendo de las concentraciones producidas (Ragaert y col., 2006). Por lo tanto, el potencial desarrollo de hongos y levaduras tiene un impacto directo no sólo en la seguridad del producto, sino también en su calidad sensorial, y consecuentemente en la aceptabilidad del producto por parte de los consumidores.

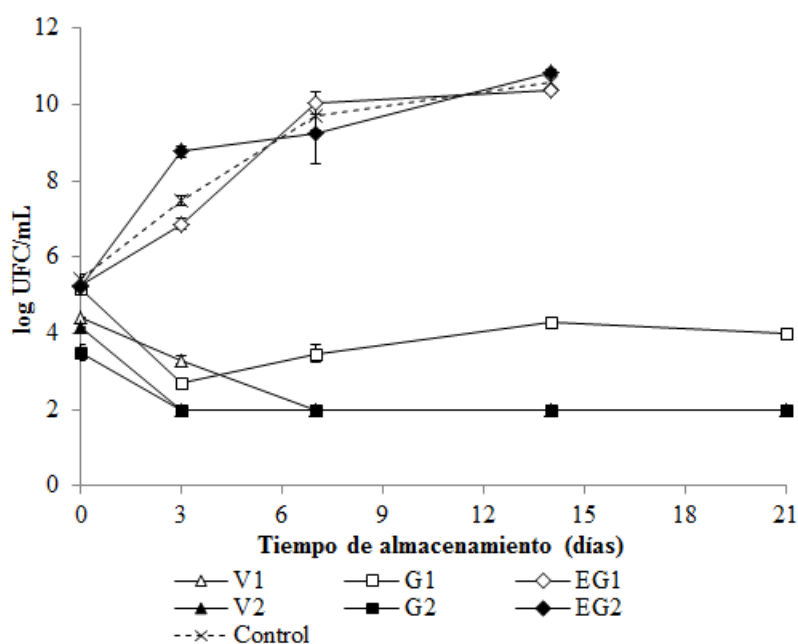


Fig. 2.3: Evolución de hongos y levaduras en jugo de frutilla tratado con agentes naturales durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. V1: 2,5 mg/mL de vainillina; V2: 5,0 mg/mL de vainillina; G1: 0,6 µL/mL de geraniol; G2: 1,2 µL/mL de geraniol; EG1: 180 µg/mL de extracto de granada; EG2: 360 µg/mL de extracto de granada.

La población inicial de hongos y levaduras en el jugo de frutilla fresco fue de 5,40 log UFC/mL. Los jugos tratados con V1 y V2 mostraron diferencias significativas en los recuentos iniciales de HYL comparados con el control (con recuentos de 4,40 y 4,15 log, respectivamente). Por otro lado, el jugo tratado con G1 no mostró efectos al día 0, mientras que el jugo tratado con G2 redujo significativamente los recuentos de HYL comparado con el control, con valores de 3,49 log. Los tratamientos EG1 y EG2 no fueron efectivos en reducir los recuentos iniciales de HYL en el jugo.

Los recuentos de HYL en el jugo sin tratar se incrementaron a lo largo del almacenamiento refrigerado hasta los 10,56 log al día 14. Los jugos tratados con V1 y V2 mostraron una fuerte actividad antifúngica, manteniendo los recuentos de HYL por debajo del límite de detección hasta el final del almacenamiento (21 días). El jugo tratado con G1 redujo los recuentos de HYL hasta 2,70 log al día 3, aumentando luego hasta aproximadamente 4,00 log hacia el día 21. La muestra tratada con G2 fue más efectiva, manteniéndose por debajo de los 2,00 log hasta el final del almacenamiento. En cambio, los tratamientos con extracto de granada no lograron reducir los recuentos de HYL durante el almacenamiento refrigerado, ya que sus recuentos fueron similares a los encontrados para el jugo control a través del tiempo (Fig. 2.3).

3.3.3. Evolución de bacterias psicrófilas

Finalmente, los recuentos de bacterias psicrófilas se muestran en la Fig. 2.4. Las bacterias psicrófilas representan un importante grupo de microorganismos, ya que a las temperaturas de refrigeración recomendadas para el almacenamiento del producto en estudio, estos microorganismos pueden convertirse en la población microbiana predominante presente en el producto (Ponce y col., 2003).

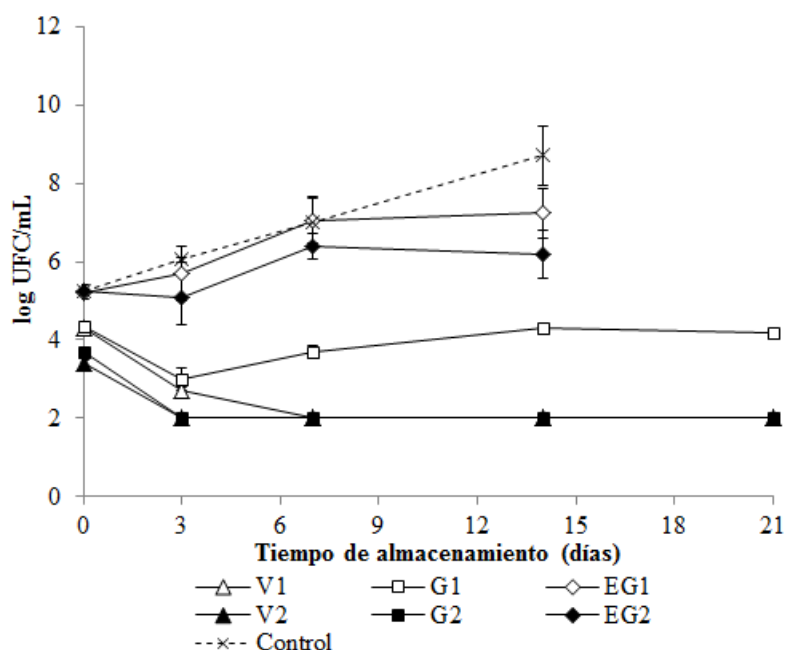


Fig. 2.4: Evolución de bacterias psicrófilas en jugo de frutilla tratado con agentes naturales durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. V1: 2,5 mg/mL de vainillina; V2: 5,0 mg/mL de vainillina; G1: 0,6 µL/mL de geraniol; G2: 1,2 µL/mL de geraniol; EG1: 180 µg/mL de extracto de granada; EG2: 360 µg/mL de extracto de granada.

Los recuentos iniciales de bacterias psicrófilas en el jugo de frutilla fresco fueron de 5,23 log UFC/mL. Al día 0, los jugos tratados con V1 y V2 presentaron reducciones significativas en la población de bacterias psicrófilas con respecto a la muestra sin tratar (reducciones de 0,93 y 1,83 log, respectivamente). El efecto de los tratamientos con geraniol fue muy similar al observado para la vainillina, con reducciones de 0,90 log en la muestra tratada con G1 y reducciones de 1,53 log en el jugo tratado con G2. En cambio, los tratamientos EG1 y EG2 no fueron efectivos para reducir la carga inicial de microorganismos psicrófilos.

A lo largo del almacenamiento, como se observó en las demás poblaciones estudiadas, el control presentó un crecimiento, llegando a recuentos de PSI de 8,70 log UFC/mL al día 14. Los jugos tratados con vainillina fueron muy efectivos en la inhibición de PSI, manteniendo los recuentos por debajo del límite de detección hasta el día 21 inclusive. El geraniol mostró un efecto similar al observado en HYL: en su concentración más baja (G1) redujo los recuentos al día 3 hasta 3,00 log, para luego incrementar hasta los 4,20-4,30 log en la última semana de almacenamiento. El jugo tratado con EG1 no presentó diferencias significativas con el control, hasta el día 14, donde logró reducir los recuentos de PSI en 1,47 log con respecto al control. El tratamiento EG2 mostró reducciones más importantes, alcanzando 6,19 log a día 14.

3.3.4. Vida útil desde el punto de vista microbiológico

El Código Alimentario Argentino (CAA) ha incorporado en el 2012 en su Artículo 925 bis dentro del Capítulo XI, las normas microbiológicas a las que deben ajustarse las frutas y hortalizas mínimamente procesadas. En dicho artículo, se definen criterios microbiológicos para ciertos microorganismos patógenos como *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7. Sin embargo, no incluye límites microbiológicos para indicadores de calidad general, tal como el recuento total de aerobios mesófilos. Es por ello que en la presente Tesis Doctoral se utilizará como criterio para definir la vida útil microbiológica a aquel establecido por la regulación europea. De acuerdo con la reglamentación española, para procesamiento higiénico, distribución y comercialización de frutas y hortalizas mínimamente procesadas, el límite máximo permitido de bacterias mesófilas totales hasta la fecha de vencimiento es de 10^7 UFC/g (BOE, 2001). Este límite es similar a aquel establecido por la Norma Francesa, que considera como criterio para determinar el fin de la vida útil de las hortalizas cortadas, un valor máximo para bacterias mesófilas de $5 \cdot 10^7$ UFC/g (7,7 log) (Corbo, Del Nobile, y Sinigaglia, 2006; Lucera, Şimşek, Conte, y Del Nobile, 2012).

Considerando un valor de 10^7 UFC/mL como el límite máximo permitido para las poblaciones estudiadas presentes en el jugo (Mosqueda-Melgar, Raybaudi-Massilia, y Martín-Belloso, 2012), se puede observar que la vida útil estuvo definida principalmente por el crecimiento de hongos y levaduras ya que esta es la flora predominante en el producto. El jugo de frutilla sin tratamiento presentó un incremento

importante de su carga microbiológica durante los primeros días de almacenamiento, resultando altamente perecedero, con una vida útil de aproximadamente 3 días (Figs. 2.2-2.4). Los tratamientos con vainillina y geraniol fueron altamente efectivos en el control de la microflora nativa del producto, mostrando tanto efectos bactericidas sobre mesófilas y psicrófilas, como también un significativo poder fungicida. De esta manera, los tratamientos de vainillina y geraniol lograron extender la vida útil microbiológica en más de 21 días (Figs. 2.2-2.4).

De acuerdo con los resultados aquí presentados, otros autores también han reportado el poder antimicrobiano de la vainillina. Fitzgerald y col. (2003) estudiaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de la vainillina frente a tres levaduras asociadas al deterioro de alimentos, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Zygosaccharomyces rouxii*, sugiriendo que el grupo aldehído juega un papel clave en la actividad antifúngica de este compuesto. En otro estudio, Fitzgerald y col. (2004) evaluaron el efecto *in vivo* de vainillina en jugo de manzana inoculado con *S. cerevisiae* y *C. parapsilosis*, encontrando que concentraciones de 20 mM (3,0 mg/mL) lograron inhibir el crecimiento de los microorganismos inoculados. Cerrutti y col. (1997) estudiaron el efecto de vainillina también en una concentración de 3,0 mg/mL sobre puré de frutilla, encontrando significativas reducciones en bacterias mesófilas aerobias y en hongos y levaduras.

Muchos estudios han indicado a la membrana celular como el target principal de compuestos bioactivos. Compuestos fenólicos, como la vainillina, son conocidos por alterar la funcionalidad de las membranas (Lanciotti y col., 2004; Ultee, Bennik, y Moezelaar, 2002). La ruptura de la membrana también ha sido observada en terpenos, como el geraniol, tanto en bacterias como en hongos (Cox y col., 2000; Helander, von Wright, y Mattila-Sandholm, 1997). La hidrofobicidad de estas moléculas afecta su solubilidad en la membrana celular, y su bioactividad, en primera instancia, depende de su coeficiente de partición (Lambert, Skandamis, Coote, y Nychas, 2001; Lanciotti y col., 2004). El carácter lipofílico de los monoterpénos favorece su partición desde una fase acuosa hacia la membrana celular, con una consecuente expansión e incremento en su fluidez, llevando a la inhibición de las enzimas que se encuentran incrustadas en la membrana. Otros estudios utilizando microorganismos procariotas y eucariotas, sugieren que la acción inhibitoria de los compuestos fenólicos se debe a la presencia del grupo hidroxilo (Aziz, Farag, Mousa, y Abo-Zaid, 1998; Dorman y Deans, 2000; Ultee

y col., 2002), que reacciona con los sitios activos de estas enzimas a través de la formación de enlaces hidrógeno (Aziz y col., 1998) o bien actúa como *carrier* de cationes monovalentes a través de la membrana (Dorman y Deans, 2000).

Por otro lado, el extracto de granada aplicado en su concentración más alta, fue efectivo reduciendo los recuentos de bacterias mesófilas y psicrófilas, alcanzando recuentos por debajo del límite máximo de 10^7 UFC/mL al día 14 de almacenamiento refrigerado (Figs. 2.2-2.4). Este efecto antimicrobiano podría ser atribuido a los compuestos bioactivos presentes en el extracto (Tabla 2.1, Fig. 2.1), principalmente, ácido elágico, ácido gálico y punicalaginas. Como otros compuestos fenólicos, el ácido elágico puede interactuar con la bicapa fosfolipídica de la membrana celular, causando un incremento en la permeabilidad, la fuga de constituyentes intracelulares vitales, y también discapacidad de los sistemas enzimáticos bacterianos (Ponce, Valle, y Roura, 2004). Compuestos fenólicos, especialmente las punicalaginas también presentes en el extracto de granada, poseen demostrada actividad antimicrobiana (Glazer y col., 2012). Por otro lado, los resultados presentados en esta Tesis indican que el extracto de granada no fue efectivo sobre las poblaciones de hongos y levaduras, reduciendo la vida útil del producto a 3 días de almacenamiento. Estos resultados difieren de aquellos encontrados en investigaciones por Tehranifar y col. (2011), donde extractos de granada obtenidos de semillas, piel y hojas probaron ser efectivos para inhibir el crecimiento de *Penicillium italicum*, *Rhizopus stolonifer* y *Botrytis cinérea*, si bien estos resultados fueron realizados *in vitro*. La concentración más baja de EG, en nuestro caso, no mostró reducciones en hongos y levaduras ni en bacterias mesófilas y psicrófilas, y por lo tanto, no fue capaz de extender la vida útil del producto. La baja efectividad del EG frente a las poblaciones nativas del jugo de frutilla, principalmente frente a HYL, podría estar relacionada a que su principal componente antimicrobiano (el ácido elágico) también se encuentra presente en las frutillas de manera natural. De hecho, en un estudio realizado por Williner y col. (2003) compararon el contenido de ácido elágico de frutillas, con el de otras frutas de interés económico, encontrando un contenido de 0,50 mg/g de peso seco en las frutillas, muy superior al contenido en mandarinas, peras, manzanas, bananas y duraznos (entre 0,02 y 0,07 mg/g de peso seco). Esto podría provocar una adaptación o resistencia de la microflora nativa hacia la actividad de este compuesto, reduciendo la efectividad del extracto de granada en este caso, al ser aplicado *in vivo* en jugo de frutilla.

3.4. Efecto de los agentes naturales sobre el control de *E. coli* O157:H7 inoculado en jugo de frutilla

A pesar de su bajo pH, se han registrado brotes con diferentes patógenos asociados al consumo de jugos de fruta sin pasteurizar (Danyluk y col., 2012; Ingham y col., 2006), incluyendo enfermedades causadas por *Escherichia coli* O157:H7. Es por ello que además de evaluar la efectividad de los agentes naturales frente a la microflora nativa de jugo de frutilla, se realizó un estudio inoculando con *E. coli* O157:H7, para poder evaluar su eficacia como agentes antimicrobianos frente a la supervivencia del patógeno.

La Tabla 2.6 muestra la supervivencia de *E. coli* O157:H7 inoculado en jugos de frutilla tratados con vainillina, geraniol y extracto de granada. El recuento inicial de *E. coli* en el jugo sin tratar alcanzó los 5,38 log. El tratamiento V1 no logró reducir significativamente la carga inicial del patógeno inoculado en el jugo de frutilla. Sin embargo, sí se observaron reducciones significativas ($p < 0,05$) en los recuentos de *E. coli* O157:H7 en las muestras tratadas con V2, G1 y G2 comparados con la muestra control, con recuentos de 3,10, 3,00 y 3,20 log respectivamente, inmediatamente después de aplicados estos biopreservantes ($t = 0$ d). En concordancia con los resultados aquí presentados, varios autores probaron el poder antimicrobiano de estos biopreservantes frente a diversos microorganismos patógenos inoculados en jugos de frutas. Moon y col. (2006) aplicaron 0,60% p/v (6,0 mg/mL) de vainillina en jugo de manzana, y encontraron reducciones similares en *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 luego de 24 h de almacenamiento a 4 ó 15°C. Asimismo, estos investigadores indicaron que el efecto antimicrobiano de la vainillina se ve incrementado por el bajo pH del producto. Además, Raybaudi-Massilia y col. (2006) encontraron reducciones en *Salmonella enteritidis*, *E. coli*, y *L. innocua* inoculados en jugos de pera y manzana, tratados con concentraciones de 2,0 µL/mL de geraniol.

Por otro lado, la población inicial de *E. coli* en las muestras tratadas con EG1 y EG2 no mostró diferencias significativas comparada con la muestra control (ver Tabla 2.6), indicando que la aplicación de estos tratamientos no logró reducciones inmediatas sobre los recuentos del patógeno. Contrario a estos resultados, varios trabajos reportan que las granadas y las punicalaginas inhiben significativamente el crecimiento de *E. coli* patogénico y *Pseudomonas aeruginosa* (Reddy, Gupta, Jacob, Khan, y Ferreira, 2007).

Sin embargo, estos estudios fueron realizados *in vitro*, y por lo tanto, sus resultados son poco comparables con los aquí presentados.

Tabla 2.6: Supervivencia de *E. coli* O157:H7 (log UFC/mL) inoculado en jugo de frutilla tratado con agentes naturales durante el almacenamiento refrigerado a 5°C

Tratamientos	Tiempo de almacenamiento (días)				
	0	3	7	14	21
Control	5,38 ± 0,30 ^{aA}	5,00 ± 0,10 ^{aA}	4,48 ± 0,10 ^{aB}	3,65 ± 0,30 ^{aC}	---
V1	4,89 ± 0,19 ^{aA}	2,40 ± 0,05 ^{bB}	< 2,00 ^{bC}	< 2,00 ^{cC}	< 2,00 ^{aC}
V2	3,10 ± 0,05 ^{bA}	< 2,00 ^{cB}	< 2,00 ^{bB}	< 2,00 ^{cB}	< 2,00 ^{aB}
G1	3,20 ± 0,10 ^{bA}	< 2,00 ^{cB}	< 2,00 ^{bB}	< 2,00 ^{cB}	< 2,00 ^{aB}
G2	3,00 ± 0,10 ^{bA}	< 2,00 ^{cB}	< 2,00 ^{bB}	< 2,00 ^{cB}	< 2,00 ^{aB}
EG1	5,28 ± 0,10 ^{aA}	5,00 ± 0,13 ^{aA}	4,49 ± 0,03 ^{aB}	3,50 ± 0,20 ^{aC}	---
EG2	5,08 ± 0,10 ^{aA}	5,00 ± 0,04 ^{aA}	4,66 ± 0,24 ^{aB}	2,80 ± 0,20 ^{bC}	---

Los datos se expresan como valores medios ± errores estándar. Valores con diferentes letras minúsculas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos. Valores con diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al tiempo de almacenamiento. V1: 2,5 mg/mL de vainillina; V2: 5,0 mg/mL de vainillina; G1: 0,6 µL/mL de geraniol; G2: 1,2 µL/mL de geraniol; EG1: 180 µg/mL de extracto de granada; EG2: 360 µg/mL de extracto de granada.

A lo largo del almacenamiento, todas las muestras, incluso el control, mostraron una significativa reducción en los recuentos de *E. coli*. Estas reducciones a lo largo del almacenamiento observadas en el jugo de frutilla sin tratar podrían atribuirse a distintos factores, tales como el efecto de la baja temperatura de almacenamiento (5°C), el bajo pH del jugo de frutilla y al biocontrol ejercido por la microflora nativa del producto. Las reducciones de *E. coli* en el tiempo fueron superiores en las muestras tratadas con vainillina y geraniol en ambas concentraciones; y al día 14 la muestra EG2 mostró reducciones significativas con respecto al control. Las reducciones observadas a través del tiempo en las muestras tratadas se deben a la sumatoria de los efectos previamente mencionados para el control y al efecto de los antimicrobianos aplicados al jugo.

3.5. Efecto de los agentes naturales sobre propiedades antioxidantes de jugo de frutilla

Como el contenido de antioxidantes es una propiedad importante en frutas y vegetales, resulta de gran interés evaluar los cambios en la capacidad antioxidante del jugo de frutilla durante el almacenamiento refrigerado. En esta Tesis, la capacidad antioxidante se cuantificó mediante el ensayo de actividad secuestrante del radical

DPPH, que mide la capacidad de los antioxidantes de donar un hidrógeno para estabilizar el radical libre DPPH, que forma difenilpicrilhidrazina (Shon, Kim, y Sung, 2003).

Las propiedades antioxidantes de los alimentos dependen de su contenido de una mezcla de compuestos con diferentes mecanismos de acción. La frutilla es una fuente muy rica en compuestos antioxidantes incluyendo vitaminas C, E, β -caroteno, melatonina y compuestos fenólicos (Stürtz, Cerezo, Cantos-Villar, y Garcia-Parrilla, 2011). Entre estos, los compuestos polifenólicos son uno de los principales grupos de fitoquímicos presentes en la frutilla que influyen fuertemente sobre su calidad, contribuyendo además a sus atributos sensoriales y a sus propiedades beneficiosas para la salud (Buendía y col., 2010).

3.5.1. Evolución de la capacidad antioxidante

En la Fig. 2.5 se muestra la capacidad antioxidante expresada como porcentaje de inhibición del radical DPPH. La inhibición del radical DPPH en el jugo de frutilla fresco (jugo sin tratar al día 0) resultó ser de 61,40%. Inicialmente, los tratamientos con vainillina y con geraniol no tuvieron efectos sobre la capacidad antioxidante a ninguna de las concentraciones evaluadas, sin diferencias significativas con el jugo sin tratar. Por otro lado, las muestras de jugo tratadas con extracto de granada en ambas concentraciones mostraron un incremento significativo en la capacidad antioxidante, con una inhibición del radical de 67,99% y 68,37% en las muestras tratadas con EG1 y EG2, respectivamente.

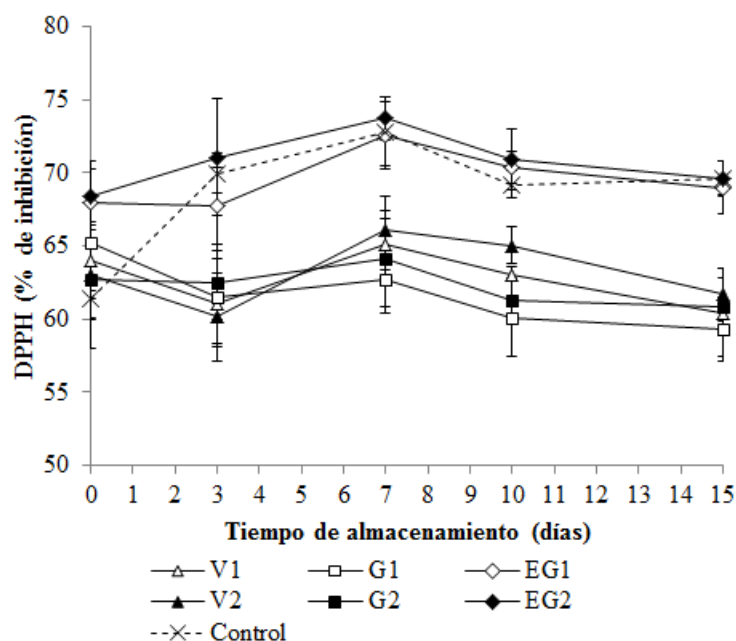


Fig. 2.5: Efecto de la aplicación de agentes naturales sobre la capacidad antioxidante (actividad secuestrante del radical DPPH) del jugo de frutilla durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican los errores estándar. V1: 2,5 mg/mL de vainillina; V2: 5,0 mg/mL de vainillina; G1: 0,6 μ L/mL de geraniol; G2: 1,2 μ L/mL de geraniol; EG1: 180 μ g/mL de extracto de granada; EG2: 360 μ g/mL de extracto de granada.

A lo largo del almacenamiento las muestras tratadas con los distintos biopreservantes mantuvieron los valores de inhibición del radical DPPH relativamente constantes con pequeñas fluctuaciones pero sin diferencias significativas a través del tiempo. Las muestras tratadas con V1, V2, G1 y G2 presentaron valores promedios de inhibición de 62,75%, 63,23%, 61,78% y 62,30%, respectivamente; mientras que los jugos tratados con EG1 y EG2 mostraron valores promedios de inhibición de 69,53% y 70,75%, respectivamente, significativamente mayores a los observados para los demás tratamientos.

El pH ácido propio de las muestras de jugo de frutilla pudo provocar una disminución significativa en la capacidad antioxidante de la vainillina. Bortolomeazzi y col. (2007) estudiaron la capacidad antioxidante de diferentes fenoles, incluyendo la vainillina, en tres medios a diferente pH (10, 7 y 3). Estos autores informaron que la capacidad antioxidante de la vainillina fue significativamente mayor a pH 7, probablemente debido a que el pKa de este compuesto es cercano a 7, y luego, a este valor de pH el ion fenolato se encuentra más activo como donante de electrones que en su forma no ionizada. En los ensayos realizados a pH 3 (pH similar al del jugo de

frutilla), estos autores observaron un descenso significativo en la capacidad antioxidante de la vainillina, lo que puede justificar los resultados aquí hallados. Con respecto al geraniol, en medios ácidos como el jugo de frutilla, éste compuesto reacciona y se transforma en α -terpineol (Baxter, Laurie, y McHale, 1978). En un estudio reciente, Bicas y col. (2011), evaluaron la capacidad antioxidante de diferentes saborizantes y aromatizantes de origen natural, y encontraron que el α -terpineol muestra una muy baja capacidad secuestrante comparado con antioxidantes convencionales. El débil rendimiento en el método DPPH se debe probablemente al bajo número de enlaces conjugados en los terpenos capaces de atrapar los radicales libres (Bicas y col., 2011). Asimismo, Villaño y col. (2007) evaluaron la habilidad secuestrante del radical libre DPPH de diferentes compuestos polifenólicos y concluyeron que la mayor capacidad antioxidante se encuentra en aquellos fenoles con mayor número de grupos hidroxilos disponibles. Estructuras similares a las del ácido gálico parecen tener una importante eficacia secuestrante frente al radical DPPH^{*} (Villaño y col., 2007). Esto justifica el mayor porcentaje de inhibición del DPPH encontrado en los jugos tratados con extracto de granada sobre aquellos tratados con vainillina y geraniol.

3.5.2. Evolución del contenido de polifenoles totales

La Fig. 2.6 muestra la evolución del contenido de polifenoles totales (CPT) durante el almacenamiento refrigerado. El CPT inicial en el jugo de frutilla sin tratar fue de 119,5 mg de EAG/100 mL de jugo. Los jugos tratados con vainillina mostraron un incremento significativo en CPT al día 0, con diferencias significativas entre V1 y V2 (269,6 y 368,7 mg de EAG/100 mL de jugo, respectivamente). Este incremento fue esperado ya que la vainillina es un compuesto fenólico. El CPT en aquellos jugos tratados con geraniol y con extracto de granada no presentó diferencias significativas con el control.

A partir del día 7, la muestra sin tratar presentó un aumento en el CPT con un valor de 172,7 mg de EAG/100 mL de jugo, que se mantuvo sin cambios significativos hasta el final del almacenamiento. Las muestras V1 y V2 también mantuvieron sus valores de CPT prácticamente constantes en todo el almacenamiento, con valores promedios de 263,5 y 337,0 mg de EAG/100 mL de jugo, respectivamente. Con respecto a las muestras tratadas con G1 y G2, sus CPT se mantuvieron constantes hasta

el día 10 de almacenamiento, con valores promedio de 134,48 y 130,95 mg de EAG/100 mL de jugo, respectivamente. Sin embargo, al día 15 se observó un incremento significativo en ambas muestras con valores de 309,3 y 252,3 mg de EAG/100 mL en los jugos tratados con G1 y G2, respectivamente. Finalmente, las muestras tratadas con EG1 y EG2 presentaron el mismo comportamiento que la muestra sin tratar: a partir del día 7 mostraron un incremento significativo en su CPT con valores de 166,9 y 163,7 mg de EAG/100 mL de jugo, respectivamente, manteniéndose sin cambios significativos hasta el final del almacenamiento.

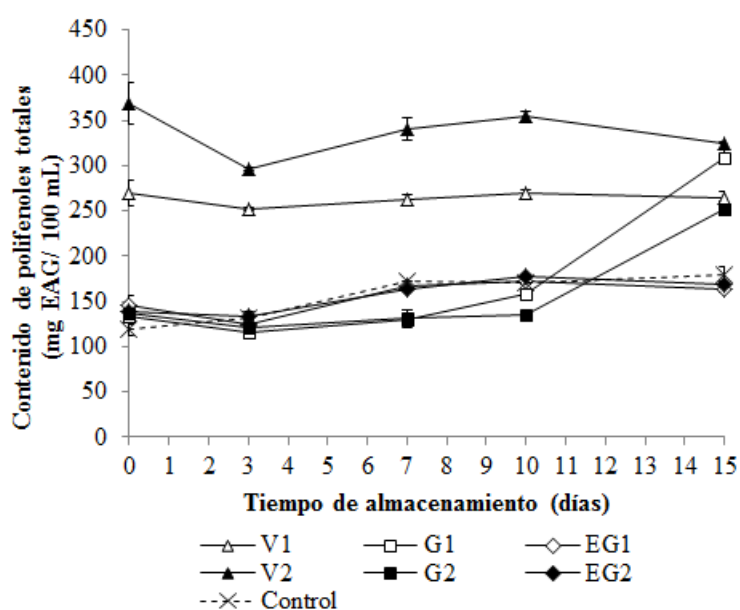


Fig. 2.6: Efecto de la aplicación de agentes naturales sobre el contenido de polifenoles totales del jugo de frutilla durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican los errores estándar. V1: 2,5 mg/mL de vainillina; V2: 5,0 mg/mL de vainillina; G1: 0,6 µL/mL de geraniol; G2: 1,2 µL/mL de geraniol; EG1: 180 µg/mL de extracto de granada; EG2: 360 µg/mL de extracto de granada.

3.6. Efecto de los agentes naturales sobre las propiedades sensoriales de jugo de frutilla

Una amplia variedad de compuestos naturales han sido probados como poderosos agentes antimicrobianos; sin embargo, sus constituyentes volátiles aromáticos pueden afectar las características sensoriales del producto alimenticio en cuestión. Siendo el aroma de los jugos de fruta una de las características claves de su *marketing*, es necesario considerar el impacto sensorial generado por la aplicación de los antimicrobianos naturales como biopreservantes en jugos de fruta (Ayala-Zavala, Del-

Toro-Sanchez, Alvarez-Parrilla, y Gonzalez-Aguilar, 2008). Por este motivo, se llevó a cabo una evaluación sensorial en los jugos tratados con los diferentes biopreservantes, y sus resultados se muestran en la Fig. 2.7.

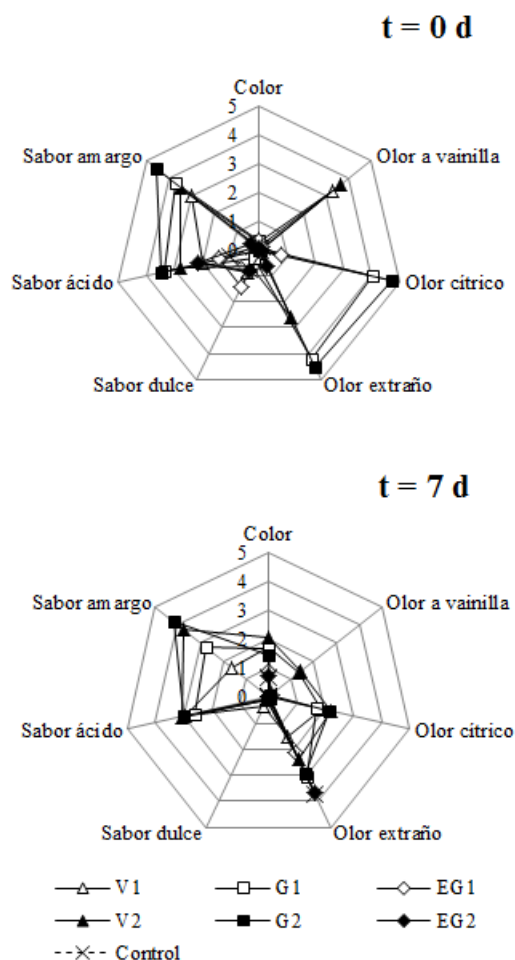


Fig. 2.7: Efecto de los agentes naturales sobre las características sensoriales del jugo de frutilla almacenado a 5°C. No se evaluaron el sabor dulce, ácido y amargo a los 7 días de almacenamiento en las muestras control, EG1 y EG2 debido a su alta carga microbiana. V1: 2,5 mg/mL de vainillina; V2: 5,0 mg/mL de vainillina; G1: 0,6 µL/mL de geraniol; G2: 1,2 µL/mL de geraniol; EG1: 180 µg/mL de extracto de granada; EG2: 360 µg/mL de extracto de granada.

Al día 0, no se encontraron diferencias significativas en el color de los jugos de frutilla tratados y sin tratar, concluyendo que la incorporación de los agentes naturales elegidos no tuvo efecto inicial sobre la apariencia del producto. Como se había anticipado previamente en la sección 3.2 del presente Capítulo, las diferencias estadísticamente significativas observadas en los parámetros de color medidos en forma instrumental, no fueron percibidas visualmente por los panelistas en el análisis sensorial. Por el contrario, los atributos de olor sí fueron significativamente afectados

por la incorporación de vainillina y geraniol, con puntajes significativamente ($p < 0,05$) superiores en comparación con las muestras tratadas con extracto de granada y las muestras sin tratar. Los panelistas percibieron *olor a vainilla* en las muestras V1 y V2, con valores medios de 3,2 y 3,6, respectivamente. Sin embargo, este olor no fue percibido como olor no característico (*olor extraño*), indicando la compatibilidad de la vainillina con los jugos de frutilla. Por otro lado, el *olor cítrico* en las muestras G1 y G2 (con puntajes de 4,0 y 4,7, respectivamente) fue percibido como *olor extraño* por los panelistas, con valores de 4,2 y 4,5, respectivamente. El jugo de frutilla tratado con extracto de granada en ambas concentraciones ensayadas, mostró puntajes similares al control en cada uno de los atributos sensoriales evaluados, sin diferencias significativas ($p < 0,05$). Con respecto a los atributos de sabor, al día 0 no se encontraron diferencias significativas en el *sabor dulce* entre las muestras tratadas y sin tratar. Por el contrario, la *acidez* y el *amargor* fueron significativamente diferentes en aquellas muestras tratadas con V y G, donde la incorporación de los antimicrobianos afectó negativamente el sabor del jugo de frutilla, con puntajes significativamente más altos comparados con las muestras EG1, EG2 y el control.

En concordancia con estos resultados, Ferrante y col. (2007) encontraron un descenso significativo en la aceptabilidad de jugo de naranja al incorporarle vainillina. Estos autores determinaron que incluso concentraciones de 1,0 mg/mL de vainillina afectaban significativamente la aceptabilidad, aunque los aromas impartidos fueron considerados agradables y compatibles con el jugo. Char y col. (2010) evaluaron la adición de vainillina y geraniol en jugo de naranja, encontrando que estos bioactivos en concentraciones de 1.100 ppm y 25 ppm, respectivamente, afectaban negativamente las características organolépticas del jugo.

El tiempo de almacenamiento mostró un efecto importante en detrimento de las características sensoriales evaluadas (*color*, *olor a vainilla*, *olor cítrico*, *olor extraño*) dado que se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos en los días 0 y 7, indicando que los panelistas percibieron cambios a través del tiempo de almacenamiento. Al día 7, los panelistas percibieron un incremento en el *olor extraño* en las muestras control, EG1 y EG2. Esto podría atribuirse a la fermentación producida en dichas muestras, dada la alta carga microbiana presente al día 7. Por otro lado, el *olor a vainilla* en las muestras V1 y V2, y el *olor cítrico* en G1 y G2 disminuyó con respecto a aquellos valores evaluados en el día 0.

4. CONCLUSIONES

Los sólidos solubles totales y la acidez total del jugo de frutilla no se vieron afectados significativamente por la incorporación de los biopreservantes en estudio.

Con respecto a la calidad microbiológica del producto, los tratamientos con vainillina y geraniol en ambas concentraciones evaluadas, extendieron la vida útil del jugo de frutilla en comparación con el jugo sin tratar. Además, se logró una reducción significativa de la cepa de *E. coli* O157:H7 inoculada en jugo de frutilla tratado con V y G, mejorando así la seguridad del producto frente a una posible contaminación. El extracto de granada aplicado en su concentración más alta fue efectivo en inhibir o disminuir el crecimiento de bacterias mesófilas y psicrófilas a lo largo del almacenamiento. Sin embargo, no tuvo efectos en la reducción de hongos y levaduras ni en la reducción del *E. coli* inoculado.

El contenido de polifenoles totales fue incrementado en las muestras tratadas con vainillina, indicando un mayor valor nutricional del producto. Las muestras tratadas con extracto de granada mostraron una capacidad antioxidante significativamente mayor a aquellas tratadas con V o G.

Los resultados de esta investigación indican el potencial uso de la vainillina, el geraniol y el extracto de granada como alternativas a los preservantes sintéticos. Por un lado, la vainillina y el geraniol lograron significativas reducciones de la microflora nativa del jugo de frutilla y del patógeno inoculado en el producto. Sin embargo, debido a su fuerte aroma y sabor, se deberían añadir menores cantidades de estos biopreservantes, de manera tal de no afectar las propiedades sensoriales del producto final. Por el contrario, si bien el extracto de granada mantuvo las características sensoriales similares a las del jugo de frutilla fresco, se debería estudiar su efecto a mayores concentraciones para aumentar su poder antimicrobiano y lograr una extensión de la vida útil del producto. Para optimizar los índices de calidad y a la vez lograr un producto seguro desde el punto de vista microbiano, se propone, en el avance de esta Tesis, evaluar la aplicación de estos antimicrobianos en combinación o con otras barreras no térmicas, en lo que se denomina “tecnología de obstáculos”.

CAPÍTULO 3

**Aplicación de tratamientos de ultrasonido en jugo de frutilla
sin pasteurizar**

RESUMEN DEL CAPÍTULO

El objetivo de este Capítulo fue evaluar el efecto de tratamientos de ultrasonido a 40 kHz durante 10 y 30 min sobre parámetros sensoriales, microbiológicos y nutricionales en jugo de frutilla durante su almacenamiento refrigerado a 5°C. Además, un segundo lote de jugos fue inoculado con *Escherichia coli* O157:H7 (aproximadamente 10^5 UFC/mL) inmediatamente antes de ser tratados con ultrasonido, simulando una contaminación accidental con el patógeno.

No hubo diferencias significativas en los sólidos solubles totales ni en la acidez total de las muestras tratadas con respecto al control, y ninguno de los dos parámetros mostró cambios durante el tiempo de almacenamiento. Los tratamientos de ultrasonido no lograron reducir significativamente los recuentos iniciales de las poblaciones microbianas estudiadas. Sin embargo, estos tratamientos sí mostraron una disminución significativa en la tasa de crecimiento de las distintas poblaciones a través del almacenamiento. Con respecto al patógeno inoculado, el tratamiento de ultrasonido no fue efectivo sobre la inhibición del crecimiento de *E. coli*, en ninguno de los dos tiempos estudiados. En cambio, el ultrasonido sí fue efectivo en mejorar las propiedades antioxidantes del jugo, con un incremento significativo en la capacidad antioxidante con respecto al control durante todo el almacenamiento. Las propiedades sensoriales evaluadas mostraron que la aplicación de ultrasonido por 10 y 30 min, no impartió olores extraños en el jugo de frutilla ni afectó su color, pero aumentó levemente la intensidad percibida de los sabores ácido y dulce.

De esta forma, se propone la evaluación de la aplicación combinada de ultrasonido con los biopreservantes estudiados en el Capítulo anterior, con el objetivo de potenciar su efecto antimicrobiano, reduciendo las concentraciones de cada agente y así, mejorar las propiedades sensoriales y nutricionales del jugo de frutilla.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las tecnologías más empleadas en la preservación de jugos es el tratamiento térmico. En general, en jugos y pulpas de fruta se utilizan tratamientos térmicos de 70–121°C durante 30–120 s (Cao y col., 2011). Sin embargo, esta tecnología de preservación puede producir efectos negativos sobre el producto final, afectando seriamente su calidad, perdiendo componentes nutricionales y alterando significativamente su color, sabor y textura (Patras, Brunton, Da Pieve, y Butler, 2009). De esta manera, con el creciente interés por alimentos nutritivos y con características similares al producto fresco, surge el desarrollo de productos tales como los jugos de fruta sin pasteurizar (Lin y Zhao, 2007).

Sin embargo, los jugos de fruta frescos son altamente perecederos, y si no reciben un tratamiento adecuado, pueden degradarse rápidamente mediante deterioro enzimático, microbiano, químico y físico, reduciendo considerablemente la vida útil del producto (Bates, Morris, y Crandall, 2001). Es por ello que nuevas tecnologías no-térmicas son requeridas para la estabilización de jugos de frutas. Junto con la radiación UV-C (Gouma, Gayán, Raso, Condón, y Álvarez, 2015; Kaya, Yıldız, y Ünlütürk, 2015), los pulsos eléctricos (Vallverdú-Queralt y col., 2013), y las altas presiones (Błaszczak, Amarowicz, y Górecki, 2017), la eficacia del procesado de jugos de fruta por ultrasonido está siendo investigada continuamente (Cruz-Cansino y col., 2016; Ferrario, Alzamora, y Guerrero, 2015; Khandpur y Gogate, 2015b; Režek Jambrak y col., 2017).

El ultrasonido (US), también denominado sonicación, es una tecnología no térmica que ha sido efectiva en la inactivación de microorganismos y enzimas relacionados con la degradación de jugos de fruta, permitiendo el procesado de alimentos termo-sensibles como el jugo de frutilla (Rawson y col., 2011). El tratamiento por ultrasonido se fundamenta en la formación de ondas de presión propagadas a través de un medio con una frecuencia superior o igual a los 20 kHz (Butz y Tauscher, 2002). Los tratamientos de ultrasonido resultan en la formación de microburbujas en el sistema alimenticio, que eventualmente implosionan en un proceso denominado cavitación. Este fenómeno puede causar la inactivación de microorganismos (Patil, Bourke, Kelly, Frías, y Cullen, 2009).

Durante la cavitación, las burbujas aumentan su área superficial, facilitando la difusión del gas, haciendo que la burbuja se expanda. Cuando la energía ultrasónica suministrada no es suficiente para retener la fase gaseosa en la burbuja, se produce una rápida condensación produciendo choques violentos entre moléculas y creando zonas de elevada presión y temperatura. Este fenómeno ha encontrado diversas aplicaciones en la industria de alimentos, tales como extracción, emulsificación, homogenización y preservación (Pingret, Fabiano-Tixier, y Chemat, 2013). En particular, el efecto antimicrobiano de la sonicación se debe principalmente al estrechamiento de las membranas celulares y a los aumentos de temperatura y presión localizadas, y también a la producción de radicales libres durante la aplicación de ultrasonidos (Piyasena, Mohareb, y McKellar, 2003).

Si bien los efectos físicos de la cavitación acústica han sido ampliamente estudiados, el efecto del ultrasonido en la composición y preservación de los alimentos no lo ha sido tan exhaustivamente. Dependiendo del proceso y la matriz del alimento, los efectos de la cavitación acústica pueden ser beneficiosos o perjudiciales (Fig. 3.1).

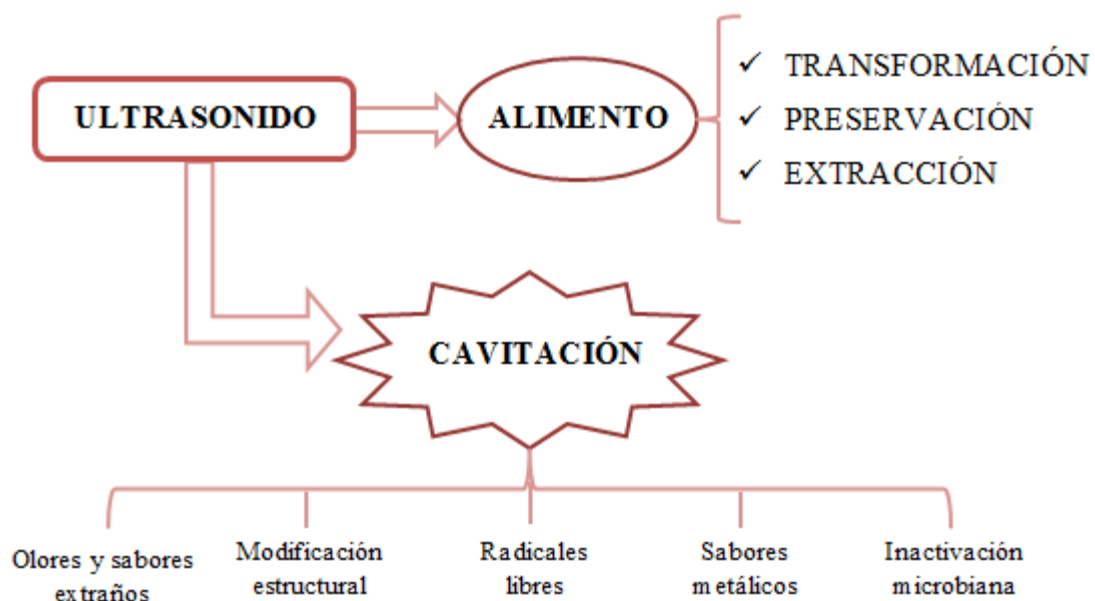


Fig. 3.1: Aplicación de ultrasonido en alimentos y efectos bioquímicos generados por el fenómeno de la cavitación. Adaptado de Pingret y col. (2013).

Algunos autores han reportado algunos impactos negativos en la calidad del jugo debido al procesado con ultrasonido, como un leve deterioro de la calidad sensorial en jugo de naranja con agregado de calcio (Gómez-López, Orsolani, Martínez-Yépez, y

Tapia, 2010) y formación de aromas extraños en jugo de mora (Wong, Vaillant, y Perez, 2010). Sin embargo, de acuerdo a una reciente reseña publicada por O'Donnell, Tiwari, Bourke y Cullen (2010) los jugos de fruta tratados con ultrasonido sufren efectos mínimos en la calidad del producto final. Por este motivo, esta tecnología ha sido estudiada para varias aplicaciones en la industria de alimentos.

Tratamientos de ultrasonido en diferentes jugos de fruta han probado ser efectivos en la inactivación de microorganismos y en incrementar el contenido de compuestos antioxidantes (Santhirasegaram, Razali, y Somasundram, 2013); sin embargo, es importante determinar si estos efectos se mantienen durante el almacenamiento. De esta manera, el objetivo de este Capítulo fue determinar los efectos de tratamientos de ultrasonido sobre parámetros de calidad microbiológica, nutricional y sensorial del jugo de frutilla durante el almacenamiento refrigerado. Además, se estudió el efecto del ultrasonido sobre la supervivencia de *E. coli* O157:H7 inoculado en el jugo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Procesamiento de materia prima y aplicación de ultrasonido

Se utilizaron frutillas (*Fragaria x ananassa*, cv Aromas) provistas por Compañía Industrial Frutihortícola S.A., ubicada en Sierra de los Padres, Mar del Plata, Argentina. Las frutillas se procesaron tal como se describió en el Capítulo 2 (inciso 2.3).

Los tratamientos de ultrasonido se realizaron a una frecuencia de 40 kHz, usando un baño ultrasónico (TestLab, Argentina). Este baño consiste en un contenedor rectangular de dimensiones 290 x 150 x 150 mm, con una capacidad máxima de 6,5 L. Los transductores transmiten las ondas de ultrasonido con una potencia de 180 W desde abajo hacia arriba. La temperatura del baño ultrasónico fue monitoreada a $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

El nivel de los jugos en los recipientes fue de 2 cm por debajo de la superficie de agua en el baño ultrasónico. Los tiempos de procesado fueron de 10 y 30 min (US10min y US30min, respectivamente). El jugo de frutilla sin tratamiento de ultrasonido fue utilizado como muestra control.

Una vez aplicados los tratamientos, los jugos fueron envasados en frascos de polipropileno y se almacenaron a 5°C por 15 días para evaluar la evolución de diferentes parámetros de calidad microbiológica, nutricional y sensorial.

2.2. Estudio de inoculación de jugo de frutilla con *Escherichia coli* O157:H7

En otra serie de ensayos se trabajó con jugo de frutilla inoculado con *E. coli* O157:H7 para evaluar la efectividad de los diferentes tiempos de ultrasonido sobre el control del crecimiento del patógeno durante el almacenamiento refrigerado. La reactivación del patógeno y la preparación del inóculo se realizaron mediante la metodología detallada en el Capítulo 2 (incisos 2.4.1 y 2.4.2).

2.3. Análisis fisicoquímicos

Los sólidos solubles totales (SST) y la acidez total (AT) de los jugos de frutilla tratados con ultrasonido y sin tratar, se determinaron de acuerdo a las metodologías descritas en el Capítulo 2 (incisos 2.5.1 y 2.5.2, respectivamente).

2.4. Evaluación instrumental del color

El color se determinó de manera instrumental de acuerdo a la metodología descrita en el Capítulo 2 (inciso 2.6).

2.5. Análisis microbiológicos

A lo largo del almacenamiento refrigerado, se llevaron a cabo recuentos de bacterias mesófilas, hongos y levaduras, y bacterias psicrófilas en los jugos de frutilla sin inocular para estudiar el impacto del tiempo de tratamiento de ultrasonido sobre la microflora nativa del producto. Además, se determinaron los recuentos de *E. coli* en los jugos de frutilla inoculados. La microflora nativa y los recuentos de *E. coli* se evaluaron siguiendo las metodologías explicadas detalladamente en el Capítulo 2 (inciso 2.7).

2.6. Extracción de antioxidantes y compuestos polifenólicos

La capacidad antioxidante y el contenido de compuestos polifenólicos fueron evaluados en los días 0, 3, 7, 10 y 15 de almacenamiento para estudiar el impacto del tiempo de tratamiento de ultrasonido sobre la calidad nutricional del jugo de frutilla. La extracción de compuestos antioxidantes se realizó como fue descrita en el inciso 2.8 del Capítulo 2. La determinación de la capacidad antioxidante de los jugos por el

método DPPH y el contenido de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu se llevaron a cabo como se indica en el Capítulo 2 (incisos 2.8.1 y 2.8.2, respectivamente).

2.7. Análisis sensorial

Se llevó a cabo un análisis sensorial descriptivo cuantitativo de acuerdo a Carbonell y col. (2007), al igual que se detalló en el Capítulo 2 (inciso 2.9). Los atributos sensoriales evaluados en este caso fueron: *color*, *olor extraño*, *sabor dulce* y *sabor ácido*.

Las definiciones de cada atributo sensorial evaluado, junto con los términos de las intensidades mínima y máxima, y los valores de referencia (jugo de frutilla fresco sin tratamiento) se muestran en el Capítulo 2 (Tabla 2.2).

2.8. Análisis estadístico

Los ensayos de ultrasonido en jugo de frutilla se realizaron mediante un diseño completamente aleatorizado, de tres corridas experimentales independientes. Los datos obtenidos se analizaron con el software libre R v.2.12.2 (R Development Core Team, 2011). Los resultados se informaron como la media de cada determinación acompañada por su error estándar (Kuehl, 2001). Se realizó el análisis de variancia de un factor (ANOVA) y se estimó la significancia estadística de las diferencias entre tratamientos mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, considerando significativamente diferentes aquellos valores con $p < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Efecto del tiempo de ultrasonido sobre las características fisicoquímicas de jugo de frutilla

En la Tabla 3.1 se resumen los resultados acerca de los efectos de ultrasonido sobre los °Brix y la acidez total de jugo de frutilla. Los valores de SST y AT hallados fueron similares a aquellos registrados por Tiwari y col. (2009) trabajando con jugo de

frutilla, donde los SST y la acidez titulable en el jugo sin tratar fueron de 9,82 °Bx y 0,75% AT, respectivamente.

Tabla 3.1: Evolución del contenido de sólidos solubles totales (SST) y la acidez total (AT) en jugo de frutilla tratado con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)				
	0	3	7	10	13
SST (°Bx)					
Control	10,06 ± 0,06 ^{aA}	10,30 ± 0,12 ^{aA}	10,38 ± 0,22 ^{aA}	10,13 ± 0,22 ^{aA}	9,83 ± 0,17 ^{aA}
US10min	10,25 ± 0,05 ^{aA}	10,38 ± 0,07 ^{aA}	10,40 ± 0,06 ^{aA}	10,38 ± 0,22 ^{aA}	9,75 ± 0,25 ^{aA}
US30min	10,25 ± 0,05 ^{aAB}	10,58 ± 0,08 ^{aA}	10,53 ± 0,16 ^{aA}	10,20 ± 0,12 ^{aBC}	9,85 ± 0,15 ^{aC}
AT (%)					
Control	1,13 ± 0,01 ^{aA}	1,08 ± 0,03 ^{Aa}	1,04 ± 0,02 ^{aA}	1,12 ± 0,01 ^{aA}	1,11 ± 0,02 ^{aA}
US10min	1,08 ± 0,01 ^{aA}	1,05 ± 0,06 ^{aA}	1,04 ± 0,04 ^{aA}	1,08 ± 0,04 ^{aA}	1,19 ± 0,04 ^{aA}
US30min	1,07 ± 0,02 ^{aA}	1,05 ± 0,03 ^{aA}	1,05 ± 0,03 ^{aA}	1,15 ± 0,02 ^{aA}	1,11 ± 0,03 ^{aA}

Los datos se expresan como valores medios ± errores estándar. Valores con diferentes letras minúsculas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos. Valores con diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al tiempo de almacenamiento. US10min: tratamiento de ultrasonido por 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido por 30 min.

El ANOVA indicó que los tratamientos de ultrasonido durante 10 y 30 min no indujeron cambios significativos en los parámetros fisicoquímicos medidos comparados con el control. Santhirasegaram y col. (2013) encontraron resultados similares aplicando 15, 30 y 60 min de tratamientos de ultrasonido a una frecuencia de 40 kHz en jugo de mango. Estos autores tampoco hallaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de sólidos solubles totales ni en acidez total de las muestras de jugo sonicadas en comparación con aquellas sin tratar. Los mismos resultados fueron registrados por Adekunte, Tiwari, Cullen, Scannell, y O'Donnell (2010), quienes aplicaron un tratamiento de ultrasonido de 10 min a jugo de tomate, encontrando que este tratamiento no afectó al contenido de SST, al pH ni a la acidez total del producto comparado con el control. Además, estos parámetros se mantuvieron estables a lo largo del almacenamiento, sin cambios significativos.

3.2. Efecto del ultrasonido sobre los parámetros de color de jugo de frutilla

Los parámetros de color (L^* y h°) se muestran en la Tabla 3.2. De acuerdo con Cruz-Cansino y col. (2015), la cavitación podría inducir cambios en el color debido a la aceleración de reacciones químicas, al incremento en la tasa de difusión, a la dispersión,

la formación de agregados y la ruptura de partículas. Sin embargo, como puede observarse en la Tabla 3.2, al día 0, las muestras ultrasonizadas no mostraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros de color con respecto al control. Los parámetros de color en el jugo de frutilla fresco y sin tratar fueron similares a aquellos encontrados por Rwabahizi y Wrolstad (1988), donde los valores hallados de L^* y h° en jugo de frutilla fueron 50,9 y 25,55, respectivamente.

Tabla 3.2: Evolución de los parámetros de color de luminosidad (L^*) y ángulo hue (h°) en jugo de frutilla tratado con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)				
	0	3	7	10	13
L^*					
Control	44,69 ± 1,09 ^{aA}	30,98 ± 0,32 ^{aB}	29,69 ± 0,20 ^{aC}	28,00 ± 0,29 ^{aD}	26,09 ± 0,07 ^{aE}
US10min	46,12 ± 0,67 ^{aA}	27,87 ± 0,84 ^{bB}	29,30 ± 0,80 ^{aB}	27,98 ± 0,29 ^{aB}	27,16 ± 0,19 ^{aB}
US30min	44,56 ± 1,11 ^{aA}	26,69 ± 0,11 ^{bB}	28,19 ± 0,35 ^{aB}	26,44 ± 0,19 ^{bB}	27,06 ± 0,79 ^{aB}
h°					
Control	24,22 ± 0,30 ^{aA}	20,64 ± 0,18 ^{bC}	21,88 ± 0,15 ^{aB}	21,63 ± 0,20 ^{abB}	20,88 ± 0,19 ^{aC}
US10min	24,53 ± 0,18 ^{aA}	21,45 ± 0,22 ^{bB}	21,31 ± 0,34 ^{aB}	20,95 ± 0,39 ^{bB}	20,74 ± 0,50 ^{aB}
US30min	24,02 ± 0,60 ^{aA}	22,59 ± 0,35 ^{aB}	22,14 ± 0,23 ^{aB}	22,21 ± 0,20 ^{aB}	21,37 ± 0,15 ^{aB}

Los datos se expresan como valores medios ± errores estándar. Valores con diferentes letras minúsculas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos. Valores con diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al tiempo de almacenamiento. US10min: tratamiento de ultrasonido por 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido por 30 min.

Al día 3, se puede observar una pequeña disminución del valor L^* en las muestras sonicadas con respecto al control. Como se explicó en el Capítulo 2, las diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de color medidos de forma instrumental no siempre se corresponden con cambios evidentes en el color determinado a través de un ensayo sensorial.

Con respecto a la evolución en el tiempo, todas las muestras mostraron una importante disminución en ambos parámetros L^* y h° , principalmente en la luminosidad, luego de 3 días de almacenamiento, manteniéndose sin cambios significativos por el resto del período (Tabla 3.2).

3.3. Efecto del ultrasonido en la microflora nativa de jugo de frutilla

El jugo de frutilla con su alto contenido de nutrientes es un medio atractivo para el crecimiento microbiano y un excelente vehículo para patógenos alimenticios (Al-Jedah y Robinson, 2002). Las Figs. 3.2-3.4 muestran la evolución de las diferentes poblaciones estudiadas que constituyen la microflora nativa (bacterias mesófilas totales, hongos y levaduras, y bacterias psicrófilas totales) del jugo de frutilla durante el almacenamiento refrigerado.

3.3.1. Evolución de bacterias mesófilas

Como se explicó anteriormente en el Capítulo 2, las bacterias mesófilas dan un estimativo de las poblaciones viables totales, y pueden utilizarse para evaluar la calidad microbiológica del producto en cuestión y ser relacionados directamente con la vida útil del mismo. La evolución de las bacterias mesófilas en jugo de frutilla tratado con ultrasonido se muestra en la Fig. 3.2.

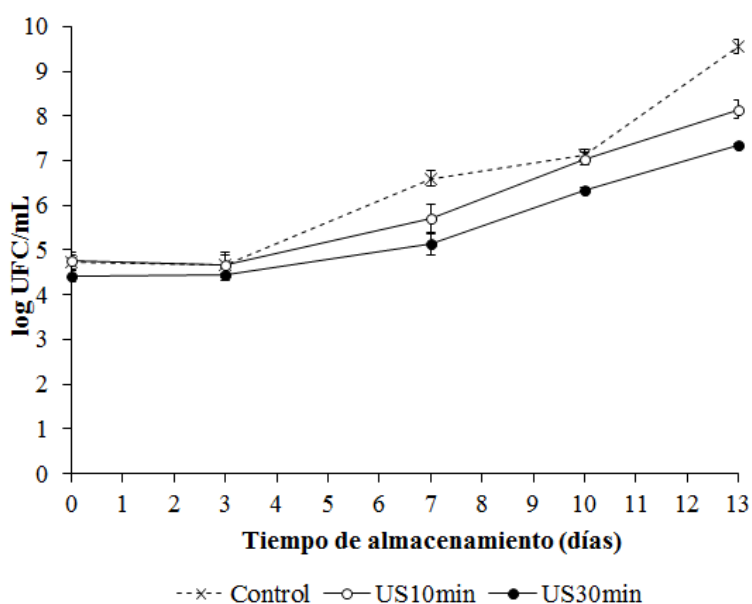


Fig. 3.2: Evolución de bacterias mesófilas en jugo de frutilla tratado con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. US10min: tratamiento de ultrasonido de 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido de 30 min.

Los recuentos iniciales de bacterias mesófilas totales en el control fueron de 4,72 log UFC/mL. Como puede observarse en la Fig. 3.2, el tratamiento de ultrasonido, ya sea durante 10 ó 30 min, no fue capaz de reducir el recuento inicial de MES. Al día 3 de almacenamiento, no se registraron incrementos de mesófilas en la muestra control con

respecto al día 0, y los recuentos de los jugos expuestos a ambos tratamientos se mantuvieron sin diferencias significativas con respecto al jugo sin tratar (con un valor promedio de 4,60 log).

A partir del día 7, se comenzaron a observar diferencias significativas de los recuentos correspondientes a las muestras tratadas con US con respecto al control. Si bien dichos tratamientos no lograron disminuir la carga inicial de bacterias mesófilas, se puede observar una disminución significativa de la tasa de crecimiento de esta población. El control alcanzó recuentos de 6,60 log, mientras que los tratamientos US10min y US30min llegaron a valores de 5,70 y 5,13 log, respectivamente. Al final del almacenamiento, las diferencias fueron más pronunciadas: los recuentos de MES en el control fueron de 9,55 log, mientras que en las muestras tratadas por 10 y 30 min de US, los recuentos fueron de 8,15 y 7,36, respectivamente.

3.3.2. Evolución de hongos y levaduras

Las poblaciones de hongos y levaduras son de gran importancia en productos ácidos como los jugos de fruta, y suelen determinar su vida útil. El potencial desarrollo de HYL, no sólo tiene un impacto en la seguridad del producto, sino también en su calidad sensorial. En la Fig. 3.3, se muestra la evolución de las poblaciones de hongos y levaduras durante el almacenamiento para las diferentes muestras de jugo de frutilla tratadas con US.

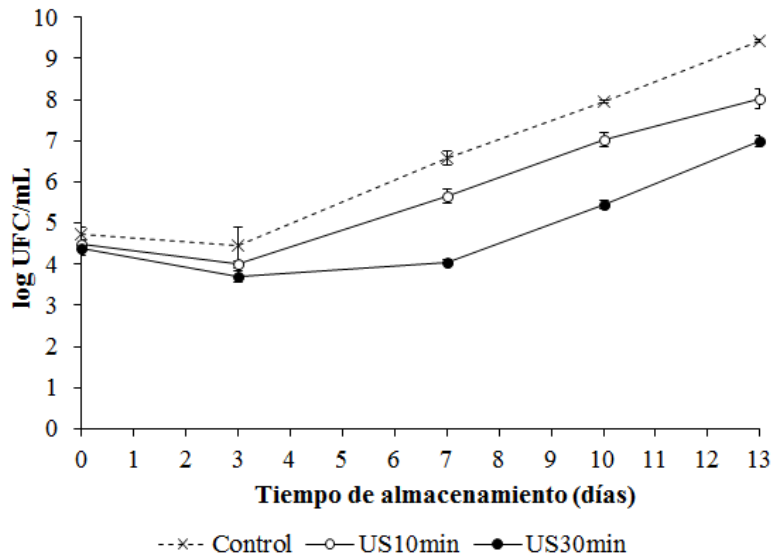


Fig. 3.3: Evolución de hongos y levaduras en jugo de frutilla tratado con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. US10min: tratamiento de ultrasonido de 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido de 30 min.

El recuento inicial de HYL en el jugo sin tratar fue de 4,73 log, sin diferencias significativas con los jugos tratados por ultrasonido. Al igual que en MES, al día 3, no se vieron efectos significativos en los recuentos de HYL de las muestras tratadas, ni tampoco un cambio significativo con respecto al día 0.

En este caso, al día 7, se evidencia un incremento importante en los recuentos correspondientes a las muestras control y US10min, con recuentos de 6,58 y 5,67 log, respectivamente, indicando una disminución en la tasa de crecimiento de HYL en las muestras tratadas con US por 10 min. Las muestras tratadas por 30 min mantuvieron los recuentos de HYL durante la primer semana de almacenamiento, con valores similares a los iniciales (4,05 log). Durante la última semana de almacenamiento, se observó un incremento en HYL en el control, US10min y US30min, llegando al día 13 a valores de 9,42, 8,02 y 7,00 log, respectivamente.

3.3.3. Evolución de bacterias psicrófilas

Los recuentos de bacterias psicrófilas se muestran en la Fig. 3.4.

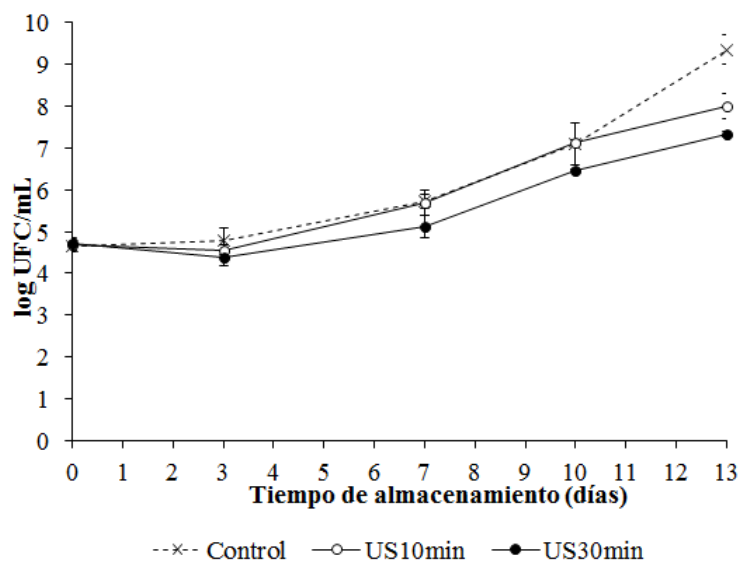


Fig. 3.4: Evolución de bacterias psicrófilas en jugo de frutilla tratado con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. US10min: tratamiento de ultrasonido de 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido de 30 min.

Al día 0, los recuentos de psicrófilas en la muestra control fueron de 4,64 log UFC/mL. Al igual que en las otras poblaciones nativas estudiadas, los tratamientos de US no fueron efectivos para disminuir los recuentos iniciales de PSI. Como en los casos anteriores, al día 3 tampoco se vieron efectos significativos de los tratamientos, ni cambios significativos con respecto a los recuentos iniciales. En particular, en el caso de las bacterias psicrófilas, al día 7 tampoco se observaron efectos significativos de los tratamientos, pero sí se evidenció un crecimiento con respecto al día 0, con recuentos en promedio de 5,51 log.

Al día 10, la muestra control alcanzó valores de 7,09 log, y se observó una disminución significativa en los valores de recuentos correspondientes a la muestra tratada por 30 min, con una reducción de 0,64 log con respecto al control. A diferencia de lo observado en las otras poblaciones, la muestra tratada por 10 min, sólo mostró reducciones significativas con respecto al control al día 13, con recuentos de 7,99 log (1,36 log menores que en la muestra sin tratar). Las reducciones observadas en la muestra tratada por 30 min fueron mayores, con recuentos de PSI de 7,32 log.

3.3.4. Vida útil desde el punto de vista microbiológico

Si bien los tratamientos de ultrasonido aplicados no mostraron un efecto inicial sobre la microflora nativa, la tasa de crecimiento de todas las poblaciones estudiadas disminuyó en las muestras tratadas con respecto a las sin tratar. Además, la disminución en la tasa de crecimiento fue mayor en las muestras US30min que en US10min, lo que indica que mayores tiempos de ultrasonido producen decrementos significativamente mayores en la tasa de crecimiento de la microflora nativa de jugo de frutilla.

Al día 10, las muestras tratadas con US por 10 min, llegaron a valores de 7,05, 7,04 y 7,11 log en MES, HYL y PSI, respectivamente, justo sobre el límite máximo de microorganismos (a la fecha de caducidad) en alimentos mínimamente procesados (BOE, 2001). Considerando un valor de 10^7 UFC/mL como el límite máximo permitido para las poblaciones estudiadas presentes en el jugo (Mosqueda-Melgar y col., 2012), se puede observar que la muestra sin tratar no estaría comercialmente aceptable hacia el día 10, mientras que las muestras tratadas con ultrasonido por 30 min todavía estarían seguras para el consumo. Estos resultados avalan el uso de ultrasonido para mejorar la vida útil desde el punto de vista microbiológico del jugo de frutilla como alternativa al tratamiento térmico.

Varios autores han reportado el efecto antimicrobiano del ultrasonido sobre la microflora nativa de jugos de fruta, aunque la mayoría de estos estudios no evalúan el comportamiento a lo largo del almacenamiento. Por ejemplo, Santhirasegaram y col. (2013) encontraron reducciones en coliformes totales, bacterias aerobias totales y hongos y levaduras en jugo de mango luego de aplicar tratamientos de US en un baño ultrasónico a 40 kHz por 15, 30 y 60 min. Abid y col. (2013) también hallaron reducciones en las bacterias aerobias totales y en hongos y levaduras de jugo de manzana al aplicar tratamientos de US a 25 kHz por 30, 60 y 90 min. Estos estudios fueron realizados inmediatamente luego de la aplicación de los tratamientos. En este Capítulo en cambio, los tratamientos no mostraron un efecto inmediato, pero sí lograron reducciones significativas en la tasa de crecimiento microbiano a lo largo del almacenamiento. El efecto antimicrobiano ejercido por el ultrasonido puede ser justificado a través del fenómeno físico de la cavitación (Vercet, Sánchez, Burgos, Montañés, y Lopez Buesa, 2002). La cavitación que ocurre al aplicar el tratamiento de US, puede romper moléculas o partículas a través de diferentes mecanismos que pueden ocurrir individualmente o en combinación: efectos térmicos producidos por la implosión de burbujas, microflujos y ondas producidas por estrés mecánico, y producción de

radicales libres. Sin embargo, la producción de radicales ha sido considerada como el mecanismo más probable que explique la inactivación de microorganismos. Mañas y Pagan (2005) notaron el efecto inhibitorio de los tratamientos de ultrasonido sobre el crecimiento microbiano, atribuyendo este efecto a la cavitación del agua y la generación de radicales. Es sabido que los iones hidrógeno (H^+), los radicales libres (O_2^{\cdot} , OH^{\cdot} , HOO^{\cdot}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se forman durante la sonólisis de las moléculas de agua (Pétrier, Combet, y Mason, 2007) presentes en las muestras de jugo. Esos radicales producen daño oxidativo debido a su alta reactividad, dañando las paredes celulares de los microorganismos e interrumpiendo la actividad enzimática de la mitocondria, permitiendo la inactivación microbiana.

3.4. Efecto del ultrasonido sobre el control de *E. coli* O157:H7 inoculado en jugo de frutilla

Además de evaluar el efecto del ultrasonido como tecnología no térmica frente a la microflora nativa del jugo de frutilla, es importante estudiar su potencial para inhibir el crecimiento de un patógeno indicador como *E. coli* O157:H7, que ha sido identificado como agente causal de brotes de enfermedades transmitidas por jugos de fruta sin pasteurizar (Vojdani, Beuchat, y Tauxe, 2008). La Tabla 3.3 muestra el efecto de los tratamientos de ultrasonido sobre la supervivencia de *E. coli* O157:H7 inoculado en jugo de frutilla a través del almacenamiento refrigerado.

Tabla 3.3: Supervivencia de *E. coli* O157:H7 (log UFC/mL) inoculado en jugo de frutilla tratado con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)			
	0	3	7	14
Control	5,38 ± 0,30 ^{aA}	5,00 ± 0,10 ^{aA}	4,48 ± 0,10 ^{aB}	3,65 ± 0,30 ^{aC}
US10min	5,12 ± 0,05 ^{abA}	5,42 ± 0,08 ^{aA}	4,86 ± 0,25 ^{aA}	3,80 ± 0,20 ^{aB}
US30min	4,49 ± 0,10 ^{bb}	5,48 ± 0,14 ^{aA}	4,70 ± 0,24 ^{aB}	3,62 ± 0,20 ^{aC}

Los datos se expresan como valores medios ± errores estándar. Valores con diferentes letras minúsculas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos. Valores con diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al tiempo de almacenamiento. US10min: tratamiento de ultrasonido por 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido por 30 min.

El recuento inicial de *E. coli* en el jugo de frutilla sin tratar fue de 5,38 log UFC/mL. El tratamiento de ultrasonido durante 10 min no logró reducir significativamente la carga del patógeno inoculado en el jugo de frutilla. Sin embargo, sí se observaron reducciones significativas ($p < 0,05$) en los recuentos de *E. coli* O157:H7 en el jugo tratado con US por 30 min inmediatamente después de aplicado el tratamiento, comparado con la muestra control. Char y col. (2010) estudiaron tratamientos de US a 20 kHz por 5, 10, 15 y 20 min sobre la inhibición de *E. coli* y *S. cerevisiae* en jugo de naranja y de manzana. Estos autores encontraron una relación lineal entre la inactivación de los patógenos y el tiempo de ultrasonido aplicado, con reducciones de aproximadamente 2 log en *E. coli* en jugo de naranja tratado por 20 min. Estos estudios se realizaron inmediatamente luego de aplicar los tratamientos, sin realizar un seguimiento de las muestras en el tiempo de almacenamiento.

Al día 3, los recuentos de *E. coli* en ambas muestras tratadas fueron similares a los del control, sin diferencias significativas entre ellos. Al día 7 y al día 14, tampoco se hallaron diferencias en los recuentos del patógeno inoculado en las muestras tratadas y el control. Como puede observarse en la Tabla 3.3, el crecimiento del patógeno se vio significativamente afectado por el tiempo de almacenamiento, encontrándose reducciones significativas ($p < 0,05$) de *E. coli* para todos los tratamientos, incluido el control. Estas reducciones podrían atribuirse a distintos factores, tal como se explicó en el Capítulo 2, principalmente al efecto de la baja temperatura de almacenamiento (5°C), el bajo pH del jugo de frutilla y al biocontrol ejercido por la microflora nativa del producto.

3.5. Efecto del ultrasonido sobre propiedades antioxidantes de jugo de frutilla

Como se indicó en el Capítulo 2, las propiedades antioxidantes del jugo de frutilla se evaluaron a través de su capacidad antioxidante (medida como su actividad secuestrante del radical DPPH) y del contenido de polifenoles totales (CPT), uno de los principales grupos de fitoquímicos presentes en la frutilla.

3.5.1. Evolución de la capacidad antioxidante

En la Fig. 3.5 se muestra el efecto de los tratamientos de ultrasonido sobre la capacidad antioxidante del jugo de frutilla. Al día 0, los jugos tratados con ultrasonido

mostraron mayor capacidad secuestrante del radical DPPH comparado con el control. A partir del día 3 y hasta el final del almacenamiento no se mostraron cambios en la actividad antioxidante de la muestra control (70,66% de inhibición). Por otro lado, hacia el final del almacenamiento las muestras tratadas con ultrasonido mostraron mayores valores de actividad secuestrante del radical DPPH respecto al control.

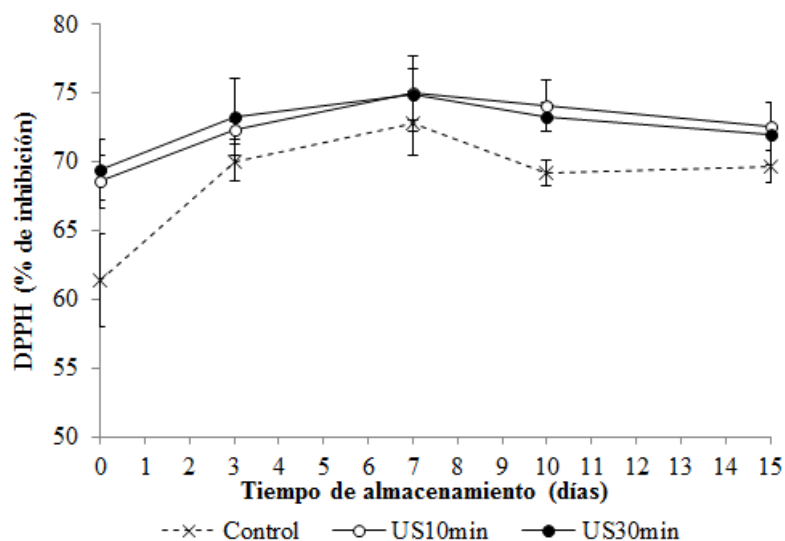


Fig. 3.5: Evolución de la capacidad antioxidante en jugo de frutilla tratado con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5 °C. Las barras indican errores estándar. US10min: tratamiento de ultrasonido por 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido por 30 min.

Otros autores encontraron incrementos en la capacidad secuestrante de DPPH en jugos tratados con US, inmediatamente luego del tratamiento (Aadil, Zeng, Han, y Sun, 2013; Abid y col., 2013) e incluso durante el almacenamiento (Khandpur y Gogate, 2015a). El incremento en la capacidad antioxidante puede ser explicado por el efecto del ultrasonido en la extracción de compuestos bioactivos y moléculas antioxidantes (Vilkhu, Mawson, Simons, y Bates, 2008). La aplicación de ultrasonido mejora el rendimiento de extracción de compuestos bioactivos (Vilkhu y col., 2008). Este efecto positivo del ultrasonido sobre la capacidad antioxidante se atribuye también a la remoción efectiva del oxígeno ocluido del jugo (Knorr, Zenker, Heinz, y Lee, 2004).

3.5.3. Evolución del contenido de polifenoles totales

Los resultados con respecto a los efectos del ultrasonido en el contenido de polifenoles totales (CPT) en jugo de frutilla se muestran en la Fig. 3.6. El CPT inicial

medido para la muestra sin tratar (119,5 mg EAG/100 mL de jugo) fue significativamente menor con respecto a resultados hallados en estudios realizados por otros autores (Heinonen, Meyer, y Frankel, 1998; Protegente y col., 2002). Las diferencias en la concentración total de polifenoles en frutas y vegetales pueden fluctuar de acuerdo a la variedad, a la etapa de desarrollo, las condiciones medioambientales, el tratamiento de las muestras, el proceso de extracción y el método de cuantificación.

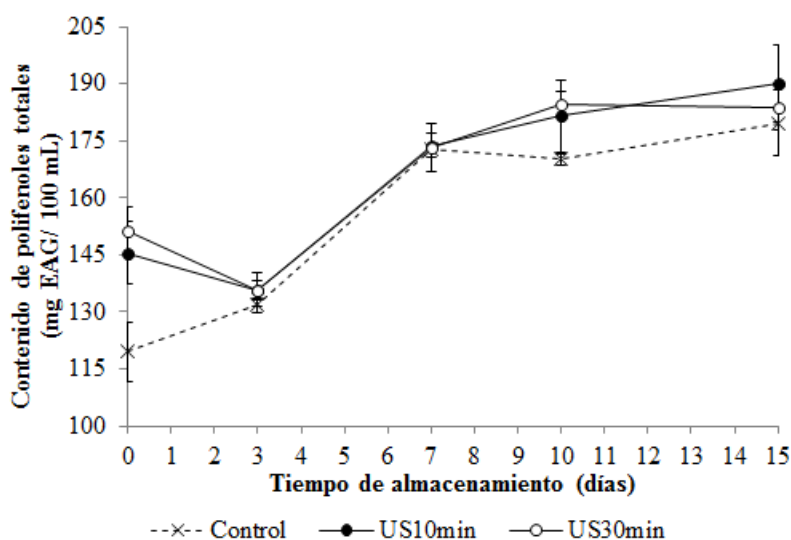


Fig. 3.6: Evolución del contenido de polifenoles totales de jugo de frutilla tratado con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5 °C. Las barras indican errores estándar. US10min: tratamiento de ultrasonido por 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido por 30 min.

Al día 0, ambas muestras ultrasonificadas exhibieron mayor CPT comparadas con el control. Resultados similares fueron encontrados por Lieu y Le (2010) para procesamiento de jugo de uva, Cruz-Cansino y col. (2015) para jugo de pera, y Santhirasegaram y col. (2013) para jugo de mango, que presentaron un contenido de compuestos fenólicos más alto luego de la sonicación. Los compuestos fenólicos se encuentran en forma soluble en las vacuolas o enlazados a la pectina, celulosa, hemicelulosa y trazas de lignina de la pared celular (Escarpa y González, 2001). El incremento de CPT en las muestras sonicadas puede ser explicado por la liberación de estos compuestos de la pared celular a través del colapso por la cavitación en los alrededores de partículas coloidales (Cheng, Soh, Liew, y Teh, 2007). Asimismo, el incremento en los compuestos fenólicos debido a los tratamientos de ultrasonido también puede ser explicado por la adición de radicales hidroxilos al anillo aromático de los compuestos fenólicos durante la sonicación (Bhat, Kamaruddin, Min-Tze, y Karim, 2011). Los radicales hidroxilos generados

sonoquímicamente llevan a la hidroxilación del anillo aromático de los compuestos fenólicos en las posiciones orto-, meta- y para-. Esta reacción ha sido sugerida como la razón del incremento en las propiedades de moléculas antioxidantes que pueden ser extraídas desde los alimentos (Ashokkumar y col., 2008).

Con el avance del almacenamiento, cada muestra incluyendo el control tuvo un incremento en estos compuestos. En concordancia con estos resultados, Cruz-Cansino y col. (2015) estudiaron los efectos del ultrasonido en jugo de pera y también encontraron que la muestra control mostraba un incremento en el CPT durante el almacenamiento. Los cambios que causan la senescencia y la descomposición de la estructura celular y por lo tanto, la liberación de ácidos fenólicos y aminoácidos libres, pueden contribuir al incremento en polifenoles totales (Puttongsiri y Haruenkit, 2010).

3.6. Efecto de ultrasonido sobre la calidad sensorial de jugo de frutilla

Las características sensoriales de un alimento son de suma importancia ya que contribuyen significativamente a la aceptación o al rechazo del producto por parte del consumidor. Es por ello que se realizó una evaluación sensorial inmediatamente después de la aplicación de los tratamientos, de forma tal de estudiar el efecto del ultrasonido sobre las características organolépticas del jugo de frutilla comparado con el control. Estos resultados se muestran en la Fig. 3.7.

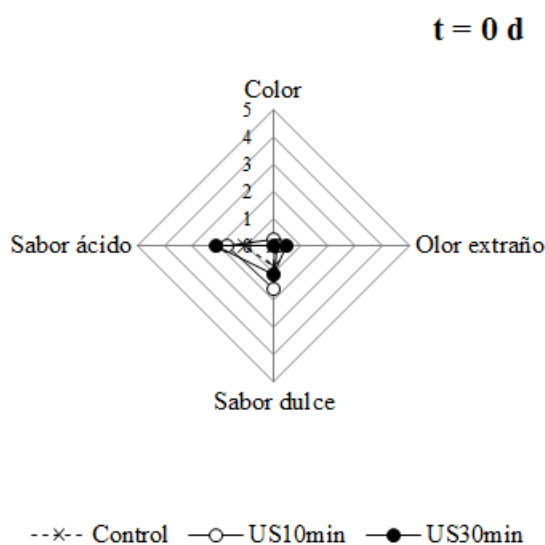


Fig. 3.7: Efecto de los tratamientos de ultrasonido sobre la calidad sensorial de jugo de frutilla. US10min: tratamiento de ultrasonido por 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido por 30 min.

La aplicación de tratamientos de ultrasonido durante 10 y 30 min no afectó el *color* del jugo de frutilla, con un puntaje promedio de 0,09, indicando un color rojo característico. Nuevamente, pequeñas diferencias (estadísticamente significativas) en el color medido de manera instrumental no siempre se correlacionan con la percepción real de este atributo. No se percibió *olor extraño* en las muestras tratadas, con un puntaje promedio de 0,2, demostrando que la aplicación de ultrasonido no impartió olores no característicos al jugo.

Con respecto a los atributos de sabor evaluados (*ácido* y *dulce*), ambos fueron significativamente afectados por los tratamientos aplicados. En este sentido, mayor puntaje de acidez fue observado para las muestras US10min y US30min, comparado con el control, con valores de *sabor ácido* de 1,7 y 2,1, respectivamente. Por otro lado, la muestra tratada con ultrasonido por 30 min obtuvo mayor puntaje en el atributo de *dulzor* que su respectivo control, con un valor promedio de 1,6. El aumento en el sabor dulce puede ser atribuido a la ruptura de las células debido al tratamiento de ultrasonido que extrae azúcares de los espacios intracelulares hacia el líquido (Abid y col., 2014).

Los resultados aquí presentes confirman que es posible la utilización de ultrasonido en lugar de un tratamiento térmico para producir jugo de frutilla con propiedades sensoriales similares a las del producto fresco.

Al día 7, las muestras se evaluaron únicamente en cuanto a *color* y *olor extraño*, debido a su alta carga microbiana. El atributo de *color* aumentó significativamente con respecto al día 0, sin diferencias entre las muestras tratadas y el control, con un puntaje promedio de 0,8. La presencia de olores de fermentación causados por la alta carga microbiana impartió un fuerte *olor extraño* en todas las muestras, que aumentó significativamente con respecto a su valor inicial. Los tratamientos de US por 10 y 30 min afectaron en menor medida este atributo, con puntajes de 3,1 y 2,7, respectivamente, mientras que el control obtuvo un puntaje significativamente más alto de 3,7.

4. CONCLUSIONES

Los tratamientos de ultrasonido no afectaron de manera significativa a los sólidos solubles totales ni a la acidez total de los jugos de frutilla.

Inmediatamente después de aplicados los tratamientos, no se observaron reducciones en los recuentos de microflora nativa estudiados. Sin embargo, a través del almacenamiento refrigerado, sí se observó una reducción significativa en los recuentos microbianos de las muestras sonicadas con respecto a los recuentos de la muestra sin tratar, lo que implica una mayor vida útil del producto. Los tratamientos de ultrasonido extendieron la vida útil desde el punto de vista microbiológico, desde 7 días para el control hasta más de 10 días para las muestras tratadas con US por 30 min. El control del patógeno inoculado mediante tratamientos de ultrasonido no fue efectivo, con recuentos similares de *E. coli* O157:H7 en las muestras tratadas y el control a lo largo del almacenamiento.

Los tratamientos de ultrasonido aumentaron la capacidad antioxidante de los jugos de frutilla comparado con la muestra control. Este resultado significa que el ultrasonido mejora las propiedades nutricionales de los productos de frutilla. El CPT al día 0, fue significativamente superior en las muestras sonicadas que en la muestra sin tratar; sin embargo, a lo largo del almacenamiento el contenido de polifenoles fue similar al del control, y en todas las muestras se observó un aumento en función del tiempo.

Las propiedades sensoriales evaluadas mostraron que la aplicación de ultrasonido por 10 y 30 min, no impartió olores extraños en el jugo de frutilla ni afectó su color, pero aumentó levemente la intensidad percibida de los sabores ácido y dulce.

Los jugos de fruta sin pasteurizar pueden ser la mejor opción para aquellos consumidores que prefieren alimentos con propiedades beneficiosas para la salud y características sensoriales similares a las del producto fresco. De esta manera, se puede decir que las tecnologías no térmicas pueden ser de gran interés para la industria alimenticia con una aplicación comercial prometedora. En este sentido, el ultrasonido podría ser una alternativa viable al tratamiento térmico tradicional utilizado comúnmente en el procesamiento de jugos de fruta, mostrando buenos resultados en varios parámetros de calidad como índices de color y actividad antioxidante, disminuyendo la tasa de crecimiento de la microflora nativa del producto. Sin embargo, su poder antimicrobiano no fue suficiente para inhibir el crecimiento de un patógeno de relevancia alimentaria como *E. coli* O157:H7. Luego, en el siguiente Capítulo se evaluará la combinación de ultrasonido con los diferentes compuestos naturales evaluados en el Capítulo 2. Mediante la aplicación de barreras combinadas se podría lograr una mayor inhibición de la microflora nativa del producto aplicando cada

tratamiento en menor intensidad y así lograr extender la vida útil del producto con el mínimo impacto sobre las propiedades sensoriales y nutricionales, y a su vez, mejorar la inocuidad del producto.

CAPÍTULO 4

**Combinación de barreras en jugo de frutilla: optimización
mediante superficie de respuesta**

RESUMEN DEL CAPÍTULO

El principal objetivo del presente Capítulo fue evaluar los efectos de tratamientos de ultrasonido combinados con los biopreservantes estudiados en los Capítulos 1 y 2, evaluados en diferentes intensidades sobre parámetros de calidad de jugo de frutilla. De acuerdo a los resultados obtenidos *in vivo* en los Capítulos 2 y 3, se propusieron dos combinaciones de tres barreras. Estas combinaciones fueron: ultrasonido + extracto de granada + vainillina (Combinación de barreras 1); y ultrasonido + extracto de granada + geraniol (Combinación de barreras 2). Cada una de las barreras, en cada combinación, fue evaluada en tres niveles o intensidades. Los tratamientos de ultrasonido se aplicaron a 40 kHz durante 0, 15 y 30 min; el extracto de granada se aplicó en concentraciones de 0, 180 y 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$; la vainillina, en concentraciones de 0, 0,625 y 1,250 mg/mL ; y el geraniol, a 0, 0,15 y 0,30 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

A fin de hallar los niveles óptimos de cada barrera, se utilizó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), combinando los niveles de las barreras de acuerdo a un diseño de Box-Behnken. De esta manera, para cada combinación propuesta se aplicaron 15 tratamientos diferentes sobre jugo de frutilla. Luego de un almacenamiento refrigerado durante 14 días a 5°C, se evaluaron distintos parámetros de calidad microbiológica, nutricional y sensorial de los jugos. Se utilizó la función Deseabilidad (D) para optimizar simultáneamente a todos los parámetros. De esta manera, se halló un tratamiento óptimo para cada combinación estudiada: 7,5 min de tratamiento de ultrasonido + 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto de granada + 0,9375 mg/mL de vainillina (OPT1); y 30 min de ultrasonido + 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto de granada + 0,15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de geraniol (OPT2). Los modelos obtenidos para cada superficie predijeron los valores de las variables respuesta en dichas condiciones, que fueron validados experimentalmente.

Además, se analizó la estabilidad de los jugos tratados bajo las condiciones óptimas durante el almacenamiento, comparándolos con una muestra de jugo sin tratar. Los tratamientos óptimos lograron reducir significativamente los recuentos de microflora nativa con respecto a la muestra control. El tratamiento OPT1 logró mantener los valores de las cargas microbianas iniciales hasta el día 3 e incluso disminuir los recuentos de las poblaciones estudiadas a partir del día 7; en cambio, el tratamiento OPT2 tuvo un efecto más bien bacteriostático y fungistático, manteniendo la

carga microbiana similar a la inicial durante todo el almacenamiento. A su vez, ambos tratamientos lograron mejorar los parámetros nutricionales, aumentando la capacidad antioxidante del jugo de frutilla, además de incrementar el CPT y la retención de AA en las muestras tratadas con OPT1 y OPT2, respectivamente. Inicialmente (t = 0 d) no hubo diferencias en la *apariencia visual general* (AVG) de las muestras comparado con el control, ni tampoco en el *sabor dulce*. El puntaje de *sabor ácido* fue mayor en las muestras tratadas, y el *olor* de los jugos también fue significativamente afectado por los diferentes tratamientos. A lo largo del almacenamiento las muestras se deterioraron, mostrando un descenso significativo en los puntajes medios de AVG. Este detrimento en la apariencia fue menor en las muestras tratadas con OPT1 y OPT2 que en las muestras sin tratar. Finalmente, un segundo lote de jugos fue preparado e inoculado con *Escherichia coli* O157:H7, para luego ser tratado con las combinaciones de barreras aplicadas en los niveles hallados mediante MSR. Los tratamientos óptimos no lograron una disminución significativa del patógeno al día 0, aunque sí lograron reducciones con respecto al control a lo largo del almacenamiento.

1. INTRODUCCIÓN

La tecnología de obstáculos involucra el uso de varias técnicas de preservación combinadas. Tal como se detalló en la Introducción General de la presente Tesis, una de las ventajas de su uso es la reducción de la intensidad de cada barrera, respecto de un tratamiento individual, para así poder evitar o minimizar la pérdida de valor nutricional y sensorial, manteniendo la estabilidad y seguridad del producto desde el punto de vista microbiológico.

Los biopreservantes estudiados en el Capítulo 2 de esta Tesis, han demostrado efectos positivos sobre la calidad de jugo de frutilla, si bien ninguno de los agentes naturales evaluados logró por sí mismo mejorar, con respecto a un control, los parámetros de calidad microbiológicos, nutricionales y sensoriales de manera simultánea. En este sentido, la vainillina y el geraniol demostraron ser excelentes agentes antimicrobianos, disminuyendo los recuentos de bacterias mesófilas y psicrófilas, y hongos y levaduras, además de inhibir el crecimiento de *E. coli* inoculado. Sin embargo, estos biopreservantes impartieron un fuerte olor y sabor en los jugos, alterando sus características sensoriales. Con respecto al extracto de granada, la capacidad antioxidante del jugo se incrementó y logró mantener sus características sensoriales similares a las del control, mientras que el efecto sobre los recuentos de la microflora nativa fue mucho menor que en el caso de la vainillina y el geraniol, y no se encontraron diferencias significativas en las poblaciones de hongos y levaduras, ni en el crecimiento del patógeno inoculado.

El ultrasonido como tratamiento físico no térmico logró disminuir la tasa de crecimiento de las poblaciones microbianas estudiadas, incrementando su capacidad antioxidante sin afectar la calidad sensorial del jugo de frutilla, como se detalló en el Capítulo 3. Varios estudios han demostrado los efectos de tratamientos de ultrasonido (40 kHz) combinados con diferentes preservantes químicos (Brilhante São José y Dantas Vanetti, 2012; Chen y Zhu, 2011). En estos estudios, la combinación de tratamientos químicos como dióxido de cloro con US resultó en una reducción mayor de las poblaciones microbianas presentes en frutas y vegetales. Gogate y Kabadi (2009) concluyeron que cuando se aplica ultrasonido en combinación con tratamientos químicos, estos pueden aumentar su eficiencia como agentes preservantes.

En cuanto a la combinación de tratamientos de ultrasonido con agentes preservantes de origen natural, los resultados hallados son similares. Millan-Sango y col. (2015) estudiaron el efecto del ultrasonido combinado con aceite esencial de orégano en hojas de lechuga, encontrando un efecto sinérgico de estos tratamientos frente a la población de *E. coli*. En jugos de naranja y granada, Sánchez-Rubio y col. (2016) evaluaron el efecto de aceite esencial de canela combinado con termo-sonicación sobre la inactivación de *L. monocytogenes*; mientras que Utkun y col. (2012) evaluaron la combinación de US con diferentes constituyentes de aceites esenciales naturales sobre la inactivación de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en jugo de naranja. En estos estudios, se evidencia el potencial de la combinación de ultrasonido con diferentes agentes químicos de origen natural en la preservación de diferentes alimentos; sin embargo, en ninguno de ellos se ha evaluado la optimización de los niveles de cada barrera sobre la calidad del producto en forma global (microbiológica, nutricional y sensorial).

A la hora de evaluar la combinación de dos o más tecnologías de preservación o barreras, la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) es una herramienta estadística de gran utilidad, ya que permite obtener un modelo describiendo la funcionalidad entre los niveles de dichas barreras o factores y la variable respuesta, con la ventaja de reducir el número necesario de experimentos (Chen, Chen, y Lin, 2004). Este modelo cuadrático obtenido mediante MSR tiene en cuenta no sólo los efectos simples de cada factor, sino también las interacciones entre ellos. De esta manera, obteniendo el modelo matemático se pueden optimizar los niveles de las barreras para hallar un máximo (o un mínimo, según corresponda) en cada respuesta estudiada.

El problema que suele presentarse cuando se desea optimizar más de una variable respuesta de manera simultánea, es que la optimización independiente de cada una de ellas puede conducir a resultados contrapuestos, es decir, la mejora de una respuesta puede tener un efecto contrario en la otra. Por ejemplo, un incremento en la concentración de vainillina puede reducir la microflora nativa en jugo de frutilla pero podría tener un impacto negativo en las características sensoriales del producto. Para estas situaciones, se ha desarrollado una herramienta matemática, la función Deseabilidad, que permite hallar una solución de compromiso para estos casos y optimizar simultáneamente varias respuestas (Derringer, 1994).

En los primeros Capítulos de esta Tesis se presentaron los resultados de la aplicación individual de tratamientos de biopreservantes (vainillina, geraniol y extracto de granada) por una parte y de ultrasonido por otra. Teniendo en cuenta los resultados encontrados y considerando las ventajas que ofrece la tecnología de obstáculos, en el presente Capítulo se proponen dos combinaciones de barreras para ser aplicadas sobre jugo de frutilla: ultrasonido + extracto de granada + vainillina (Combinación de barreras 1); y ultrasonido + extracto de granada + geraniol (Combinación de barreras 2). Los objetivos particulares de este Capítulo fueron: (a) estudiar el efecto de las barreras combinadas propuestas, evaluadas en diferentes niveles, sobre parámetros de calidad de jugo de frutilla; (b) encontrar los niveles óptimos de estas combinaciones usando MSR junto con la función Deseabilidad para mejorar simultáneamente la calidad microbiológica, nutricional y sensorial del jugo de frutilla; y (c) evaluar el efecto de los tratamientos óptimos hallados sobre los parámetros de calidad y sobre el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 inoculado en el jugo a lo largo del almacenamiento refrigerado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia prima y preparación de muestras

Los estudios se realizaron utilizando frutillas (*Fragaria x ananassa*, cv Aromas) provistas por la Compañía Industrial Frutihortícola S.A., ubicada en Sierra de los Padres, Mar del Plata, Argentina. Las frutillas se procesaron tal como se describió en el Capítulo 2 (inciso 2.3).

2.2. Optimización de las combinaciones de barreras

Para estudiar el efecto de la combinación de barreras o tecnología de obstáculos sobre jugo de frutilla, se propusieron dos combinaciones de tratamientos de preservación no térmicos. Luego de analizar, en los Capítulos precedentes, los efectos individuales de los biopreservantes y del ultrasonido sobre los diferentes parámetros de calidad del jugo de frutilla, las combinaciones propuestas fueron las siguientes:

-
- ✓ Combinación de barreras 1: ultrasonido (x_1 , min) + extracto de granada (x_2 , $\mu\text{g/mL}$) + vainillina (x_3 , mg/mL)
 - ✓ Combinación de barreras 2: ultrasonido (x_1 , min) + extracto de granada (x_2 , $\mu\text{g/mL}$) + geraniol (x_3 , $\mu\text{L/mL}$)

2.2.1. Tecnologías de preservación o barreras

Los biopreservantes utilizados en el presente Capítulo se detallan a continuación:

- ✓ *Vainillina*: Marca Sigma Aldrich (St Lois MO, EEUU) (pureza $\geq 97\%$ según CG). Sus características fueron detalladas en el Capítulo 1 (inciso 2.1).
- ✓ *Geraniol*: Marca Sigma Aldrich (St Lois MO, EEUU) (pureza $\geq 97\%$ según CG). Sus características fueron detalladas en el Capítulo 1 (inciso 2.1).
- ✓ *Extracto de granada*: Extracto seco obtenido a partir de la *Punica granatum* L., marca PureBulk (EEUU). Los principales compuestos presentes en el extracto fueron medidos mediante HPLC, y se detallan en el Capítulo 2 (inciso 2.2, Tabla 2.1).

La aplicación de tratamientos de ultrasonido se evaluó a una frecuencia de 40 kHz, utilizando un baño ultrasónico (TestLab, Argentina), cuyas características se describieron en el Capítulo 3 (inciso 2.1).

Cada una de estas barreras se evaluó en tres niveles diferentes y se combinaron de acuerdo a lo sugerido por el diseño experimental seleccionado (ver sección 2.2.2, del presente Capítulo).

2.2.2. Diseño experimental

Los niveles de cada variable independiente o barrera se optimizaron a fin de mejorar las variables respuesta bajo estudio, es decir, con el objetivo de minimizar la carga microbiana del jugo de frutilla, maximizar su calidad nutricional y minimizar el impacto sobre las propiedades sensoriales. Esto se llevó a cabo mediante una Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) con un diseño de Box-Behnken (BB), que permite reducir el número de muestras necesarias. El número total de tratamientos experimentales combinando las variables independientes en diferentes niveles se calcula de la siguiente manera (Aslan y Cebeci, 2007):

$$N = k^2 + k + C_p \quad (\text{Ec. 4.1})$$

donde,

k es el número de variables independientes,

C_p es el número de repeticiones en el punto central.

Cada variable independiente o barrera fue ensayada en tres niveles: bajo (-1), medio (0) y alto (+1). Para desarrollar la ecuación de regresión, los factores fueron codificados de acuerdo a la Ec. 4.2.

$$X_i = \frac{x_i - x_{0,i}}{\Delta x_i} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

donde,

x_i es el valor natural de la variable independiente

X_i es el valor codificado de la variable independiente x_i

$x_{0,i}$ es el valor natural de la variable independiente x_i en el punto central y

Δx_i es el valor del cambio.

Para un diseño de BB de 3 variables independientes, cada una de ellas evaluada en 3 niveles y con 3 repeticiones en el punto central, se necesita un total de 15 tratamientos. Las matrices con el diseño experimental de cada combinación de barreras se detallan en las Tablas 4.1 y 4.2.

Tabla 4.1: Matriz del diseño experimental de Box-Behnken para la Combinación de barreras 1

Tratamiento	Variables independientes			Variables independientes codificadas		
	x_1 US (min)	x_2 EG ($\mu\text{g/mL}$)	x_3 V (mg/mL)	X_1	X_2	X_3
1	0	180	0	-1	0	-1
2	0	180	1,250	-1	0	1
3	30	180	0	1	0	-1
4	30	180	1,250	1	0	1
5	15	0	0	0	-1	-1
6	15	360	0	0	1	-1
7	15	0	1,250	0	-1	1
8	15	360	1,250	0	1	1
9	0	0	0,625	-1	-1	0
10	30	0	0,625	1	-1	0
11	0	360	0,625	-1	1	0
12	30	360	0,625	1	1	0
13	15	180	0,625	0	0	0
14	15	180	0,625	0	0	0
15	15	180	0,625	0	0	0

US: ultrasonido; EG: extracto de granada; V: vainillina.

Tabla 4.2: Matriz del diseño experimental de Box-Behnken para la Combinación de barreras 2

Tratamiento	Variables independientes			Variables independientes codificadas		
	x_1 US (min)	x_2 EG ($\mu\text{g/mL}$)	x_3 G ($\mu\text{L/mL}$)	X_1	X_2	X_3
1	0	180	0	-1	0	-1
2	0	180	0,30	-1	0	1
3	30	180	0	1	0	-1
4	30	180	0,30	1	0	1
5	15	0	0	0	-1	-1
6	15	360	0	0	1	-1
7	15	0	0,30	0	-1	1
8	15	360	0,30	0	1	1
9	0	0	0,15	-1	-1	0
10	30	0	0,15	1	-1	0
11	0	360	0,15	-1	1	0
12	30	360	0,15	1	1	0
13	15	180	0,15	0	0	0
14	15	180	0,15	0	0	0
15	15	180	0,15	0	0	0

US: ultrasonido; EG: extracto de granada; G: geraniol.

Cada uno de los tratamientos combinados descritos en las Tablas 4.1 y 4.2, fue aplicado al jugo de frutilla, comenzando por la incorporación de los biopreservantes en sus correspondientes concentraciones y finalizando con el tratamiento de ultrasonido durante el tiempo definido según el diseño de BB. Se incorporó al diseño un lote de muestras sin tratar como control. Los jugos de frutilla fueron envasados en frascos

estériles de polipropileno y almacenados a 5°C. Luego de 14 días de almacenamiento, se midieron las variables respuesta para cada tratamiento, y se ajustó cada respuesta a un modelo polinómico de segundo orden según la Ec. 4.3, mediante el método de regresión por mínimos cuadrados.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Ec. 4.3})$$

donde,

Y es la respuesta predicha por el modelo,

β_0 es la constante del modelo,

β_i es el coeficiente lineal,

β_{ii} es el coeficiente cuadrático,

β_{ij} es el coeficiente para el efecto de interacción,

X_i es el valor codificado adimensional de x_i (variable independiente).

2.2.3. Variables respuesta

2.2.3.1. Análisis microbiológicos

Se llevaron a cabo recuentos de bacterias mesófilas, hongos y levaduras, y bacterias psicrófilas en los jugos de frutilla para estudiar el impacto de la combinación de barreras sobre la microflora nativa del producto. Los recuentos de estas poblaciones se evaluaron siguiendo las metodologías explicadas detalladamente en el Capítulo 2 (inciso 2.7).

2.2.3.2. Extracción de antioxidantes y compuestos polifenólicos

La extracción de compuestos antioxidantes se realizó como fue descrita en el inciso 2.8 del Capítulo 2. La determinación de la capacidad antioxidante de los jugos por el método DPPH y el contenido de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu se llevaron a cabo como se indica en el Capítulo 2 (incisos 2.8.1 y 2.8.2, respectivamente).

2.2.3.3. Retención de ácido ascórbico

Además de la evaluación de la capacidad antioxidante del jugo, se decidió incorporar otro parámetro de calidad nutricional, midiendo el contenido de vitamina C, una de las principales vitaminas presentes en frutilla. El contenido de ácido ascórbico (AA) fue determinado mediante un ensayo de titulación, descrito por Goyeneche y col. (2015). Para la determinación de AA, 20 mL de jugo de frutilla de cada tratamiento se homogeneizaron con 40 mL de una solución de ácido oxálico al 2% p/v (Mallinckrodt, EEUU). La mezcla resultante se filtró a través de fibra de vidrio. Luego, una alícuota de 10 mL del filtrado fue titulada con 2,6-dicloroindofenol (Anedra SA, Argentina). Las determinaciones de AA en jugo de frutilla se realizaron por triplicado. El contenido de AA se reportó como porcentaje de retención en función del contenido de AA inicial en el jugo de frutilla inmediatamente antes de aplicar los tratamientos correspondientes (AA₀).

2.2.3.4. Análisis sensorial

Se llevó a cabo un análisis sensorial descriptivo cuantitativo de acuerdo a Carbonell y col. (2007), al igual que se detalló en el Capítulo 2 (inciso 2.9). Las definiciones de cada atributo sensorial evaluado, junto con los términos de las intensidades mínima y máxima, y los valores de referencia (jugo de frutilla fresco sin tratamiento) se muestran en el Capítulo 2 (Tabla 2.2). En este caso en lugar de evaluar el atributo *color*, se incorporó la *Apariencia Visual General* (AVG), evaluada desde 0 = *apariencia general pobre* a 5 = *apariencia general excelente*.

2.2.4. Optimización simultánea y validación

La optimización simultánea se llevó a cabo mediante la función Deseabilidad (D). El método general consiste en primera instancia en convertir cada respuesta (y_n) en una función de deseabilidad individual (d_n). El rango de la escala de deseabilidad varía entre 0 y 1. Si la respuesta se encuentra en su objetivo o *target*, entonces, $d_n = 1$; en cambio, si la respuesta está fuera de una región aceptable, $d_n = 0$. Cada respuesta se estandarizó en funciones de deseabilidad del tipo:

$$d_n = h_n(y_n) \quad (\text{Ec. 4.4})$$

donde,

n es el número total de respuestas.

Derringer y Suich (1980) utilizaron la siguiente función de deseabilidad modificada:

$$d_n = \left\{ \begin{array}{ll} 0 & \text{if } y_n \leq y_n^{\min} \\ \left(\frac{y_n - y_n^{\min}}{y_n^{\max} - y_n^{\min}} \right)^r & \text{if } y_n^{\min} \leq y_n \leq y_n^{\max} \\ 1 & \text{if } y_n \geq y_n^{\max} \end{array} \right\} \quad (\text{Ec. 4.5})$$

donde,

y_n^{\min} es el mínimo valor aceptable para y_n ,

y_n^{\max} es el máximo valor considerado deseable, y

r es una constante positiva.

Si $r = 1$, la función d_n aumenta linealmente a medida que y_n aumenta; si $r > 1$, la función d_n aumenta más rápidamente hacia y_n^{\max} ; y si $r < 1$, la función d_n aumenta más lentamente hacia y_n^{\max} .

Luego, las funciones de deseabilidad individuales de las respuestas consideradas son combinadas para obtener la función de Deseabilidad global (D), que se define como el promedio geométrico de las funciones individuales (Ec. 4.6).

$$D = (d_1, d_2, \dots, d_n)^{1/n} \quad (\text{Ec. 4.6})$$

donde,

$$0 \leq D \leq 1$$

Un valor alto de D indica las mejores y más deseadas funciones del sistema, la cual se considera la solución óptima. Los valores óptimos de los factores son determinados a partir de los valores de las funciones de deseabilidad individuales que maximizan la función D.

Un nuevo set de experimentos utilizando las condiciones de operación óptimas obtenidas con la función D fue llevado a cabo con el fin de determinar la confiabilidad de las optimizaciones simultáneas en predecir los niveles óptimos de las variables respuesta. Los valores experimentales y predichos de cada variable respuesta optimizada fueron comparados para determinar la validez de los modelos obtenidos.

2.3. Efecto de los tratamientos óptimos sobre los parámetros de calidad de jugo de frutilla durante el almacenamiento refrigerado

En un nuevo experimento, se prepararon muestras de jugo de frutilla según indica la sección 2.1 del presente Capítulo. Sobre dichos jugos, se aplicaron los tratamientos óptimos resultantes de la optimización simultánea (sección 2.2.4) de las combinaciones de barreras 1 y 2. Los jugos se almacenaron durante 14 días a 5°C junto con un jugo sin tratamiento (control). A los 0, 3, 7, 11 y 14 días de almacenamiento se evaluaron los tratamientos óptimos sobre los parámetros de calidad microbiológicos y nutricionales optimizados. Además, en los días 0, 7 y 14 de almacenamiento se llevó a cabo un análisis sensorial descriptivo cuantitativo del jugo de frutilla tratado con los niveles óptimos de cada barrera y del jugo sin tratar.

2.4. Estudio de inoculación de jugo de frutilla con *Escherichia coli* O157:H7

Se evaluó la efectividad de los tratamientos óptimos hallados para inactivar una eventual contaminación con *Escherichia coli* O157:H7, un patógeno de gran preocupación en la industria alimentaria. Para este estudio, un segundo lote de jugos se inoculó con el patógeno. Una vez inoculados, se aplicaron los tratamientos óptimos y se utilizó como control un jugo de frutilla inoculado sin tratar. La reactivación del patógeno y la preparación del inóculo se realizaron mediante la metodología detallada en el Capítulo 2 (incisos 2.4.1 y 2.4.2, respectivamente); los recuentos de *E. coli* se evaluaron siguiendo la metodología explicada en el Capítulo 2 (inciso 2.7).

2.5. Análisis estadístico

Los datos para la MSR y para la optimización simultánea fueron analizados con el software STATISTICA (versión 7.0, StatSoft Inc., Tulsa, EE.UU, 2004). El análisis

estadístico fue llevado a cabo utilizando el análisis de varianza (ANOVA), el cual permitió establecer la significancia global de cada modelo mediante la prueba estadística de Fisher, y la determinación del coeficiente R^2 . El test de Falta de Ajuste fue llevado a cabo para cada modelo con un nivel de confianza del 95% y el test t de Student permitió seleccionar los términos significativos de los modelos con un nivel de confianza del 95% (Kuehl, 2001).

Los ensayos de los tratamientos óptimos sobre jugo de frutilla durante el almacenamiento, referidos tanto a la evaluación de los parámetros de calidad como a la respuesta ante la inoculación con *E. coli*, se analizaron con el software libre R v.2.12.2 (R Development Core Team, 2011). Los resultados se informaron como la media de cada determinación acompañada por su error estándar (Kuehl, 2001). Se realizó el ANOVA y se estimó la significancia estadística de las diferencias entre los tratamientos mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, considerando significativamente diferentes aquellos valores con $p < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Modelado y optimización

3.1.1. Combinación de barreras 1: US+EG+V

3.1.1.1. Ajuste de los modelos y selección de variables respuesta a optimizar

La Tabla 4.3 muestra los valores de todas las variables respuesta obtenidos en el jugo fresco sin tratar (control, día 0), así como también los valores obtenidos para estas variables luego de 14 días de almacenamiento refrigerado tanto en la muestra control como en las muestras tratadas bajo las diferentes condiciones experimentales.

Los parámetros de calidad del control se vieron afectados fuertemente por el tiempo de almacenamiento, mostrando un crecimiento en las poblaciones microbianas estudiadas, un incremento en el CPT, una disminución del contenido de AA a menos de la mitad, y un importante aumento en el *olor extraño* percibido por los panelistas. Como se puede observar de los valores experimentales mostrados en la Tabla 4.3, los recuentos de microflora nativa presentaron una alta dependencia con las variables evaluadas, encontrando por ejemplo, que los tratamientos 1, 3, 5 y 6 mostraron

recuentos similares a los encontrados en la muestra control al día 14. Estos mismos tratamientos presentaron bajo CPT y altos puntajes de *olor extraño* comparados con el control. Los parámetros de calidad nutricional evaluados también mostraron dependencia con las barreras estudiadas: las muestras 3, 5 y 6 presentaron mayor contenido de AA (con porcentajes de retención superiores al 54%), mientras que los tratamientos 10-15 mostraron mayor capacidad antioxidante (con porcentajes de inhibición del radical DPPH superiores al 72%).

Tabla 4.3: Valores iniciales para todas las respuestas del jugo de frutilla fresco y valores medios de la muestra sin tratar y las muestras tratadas luego de 14 días de almacenamiento a 5°C

Tiempo (días)	Tratamiento	Respuestas experimentales								
		MES (log UFC/mL)	HYL (log UFC/mL)	PSI (log UFC/mL)	DPPH (%)	CPT (EAG/100mL)	AA (%)	AVG	Olor a vainilla	Olor extraño
0	<i>Control</i>	4,38	4,54	3,59	60,90	115,19	100,0	0,00	0,00	0,00
14	<i>Control</i>	6,82	8,20	6,65	60,00	146,88	47,31	2,07	0,05	3,90
	<i>1</i>	3,70	8,11	6,59	62,10	136,32	44,64	3,22	0,03	3,65
	<i>2</i>	2,30	2,50	2,70	65,29	255,12	41,11	3,27	0,53	0,57
	<i>3</i>	4,37	8,46	6,41	67,22	126,90	57,20	3,12	0,28	3,33
	<i>4</i>	2,00	2,65	2,70	58,52	253,18	27,30	3,23	0,30	0,37
	<i>5</i>	3,98	8,51	5,01	63,57	138,96	54,62	3,30	0,05	3,58
	<i>6</i>	4,46	8,53	6,81	69,59	165,72	54,17	3,57	0,05	3,55
	<i>7</i>	2,00	2,80	2,70	61,75	220,36	40,46	3,47	0,43	0,37
	<i>8</i>	2,60	2,50	2,70	70,89	255,55	39,72	3,02	1,63	1,13
	<i>9</i>	2,30	2,65	2,70	64,05	208,80	38,36	3,13	0,37	0,33
	<i>10</i>	2,70	2,74	2,70	78,45	236,98	41,83	3,17	0,50	0,67
	<i>11</i>	2,30	2,65	2,70	72,99	262,44	42,51	3,85	0,80	0,85
	<i>12</i>	2,00	2,95	2,70	74,36	344,79	36,18	3,23	0,53	0,50
	<i>13</i>	2,00	2,50	2,70	82,99	245,67	34,05	3,17	1,65	0,38
	<i>14</i>	2,00	2,85	2,70	80,03	266,43	38,40	3,33	0,23	0,43
	<i>15</i>	2,00	2,85	2,70	81,99	295,37	36,34	3,17	0,40	0,27

La Tabla 4.4 muestra los parámetros asociados al ajuste de los modelos de todas las variables medidas. El ANOVA indicó que todos los parámetros de calidad microbiológica y nutricional medidos mostraron buen ajuste, con valores p menores a 0,05 y coeficientes de R^2 ajustado mayores a 0,74. En cambio, con respecto a los atributos medidos de calidad sensorial, sólo el *olor extraño* presentó buen ajuste. Luego se procedió a realizar una selección de variables para la optimización simultánea. Se seleccionaron 2 parámetros de calidad microbiológica, 2 parámetros de calidad nutricional y 1 parámetro de calidad sensorial, teniendo en cuenta en cada caso los mejores ajustes, reduciendo las variables respuesta medidas de 9 a 5: HYL, PSI, DPPH, AA y *olor extraño*.

Tabla 4.4: Parámetros estadísticos asociadas a los modelos cuadráticos ajustados

Variables respuesta	Valor p	R^2 ajustado
Calidad microbiológica		
<i>MES</i>	0,0013**	0,938
<i>HYL</i>	< 0,001***	0,996
<i>PSI</i>	< 0,001***	0,957
Calidad nutricional		
<i>DPPH</i>	0,018*	0,813
<i>CPT</i>	0,038*	0,741
<i>AA</i>	< 0,001***	0,962
Calidad sensorial		
<i>AVG</i>	0,307	0,288
<i>Olor a vainilla</i>	0,684	-0,217
<i>Olor extraño</i>	< 0,001***	0,991

*Significativo con $p < 0,05$

**Significativo con $p < 0,01$

***Significativo con $p < 0,001$

3.1.1.2. Análisis de los modelos de las variables seleccionadas

Una vez seleccionadas las variables respuesta a optimizar simultáneamente, se procedió con el análisis de cada modelo. En la

Tabla 4.5 se muestran los coeficientes estimados, junto con sus errores estándar, el valor t y el valor p para cada variable respuesta seleccionada.

Tabla 4.5: Parámetros estadísticos del análisis de MSR de las variables respuesta seleccionadas para optimizar en la Combinación de barreras 1

Respuesta	Término									
	Intercepto	X_1	X_1^2	X_2	X_2^2	X_3	X_3^2	X_1*X_2	X_1*X_3	X_2*X_3
HYL										
<i>Coefficiente</i>	2,733	0,112	-0,069	-0,009	0,084	-2,895	2,767	0,053	-0,051	-0,079
<i>EE</i>	0,092	0,056	0,083	0,056	0,083	0,056	0,083	0,079	0,079	0,079
<i>valor-t</i>	29,783	1,987	-0,836	-0,162	1,015	-51,518	33,458	0,670	-0,639	-0,995
<i>valor-p</i>	< 0,001***	0,104	0,441	0,878	0,357	< 0,001***	< 0,001***	0,533	0,551	0,366
PSI										
<i>Coefficiente</i>	2,700	-0,022	0,148	0,226	-0,148	-1,753	1,753	0,000	0,044	-0,452
<i>EE</i>	0,198	0,121	0,178	0,121	0,178	0,121	0,178	0,171	0,171	0,171
<i>valor-t</i>	13,640	-0,183	0,831	1,863	-0,831	-14,466	9,827	0,000	0,259	-2,635
<i>valor-p</i>	< 0,001***	0,862	0,444	0,121	0,444	< 0,001***	< 0,001***	1,000	0,806	0,046*
DPPH										
<i>Coefficiente</i>	81,672	1,765	-6,188	2,500	-3,018	-0,752	-12,202	-3,256	-2,973	0,782
<i>EE</i>	1,981	1,213	1,785	1,213	1,785	1,213	1,785	1,715	1,715	1,715
<i>valor-t</i>	41,232	1,455	-3,466	2,061	-1,690	-0,620	-6,834	-1,898	-1,733	0,456
<i>valor-p</i>	< 0,001***	0,205	0,018*	0,094	0,152	0,563	0,001***	0,116	0,144	0,668
AA										
<i>Coefficiente</i>	36,263	-0,515	-0,611	-0,335	4,068	-7,756	6,910	-2,450	-6,591	-0,071
<i>EE</i>	0,921	0,564	0,830	0,564	0,830	0,564	0,830	0,798	0,798	0,798
<i>valor-t</i>	39,368	-0,913	-0,736	-0,595	4,900	-13,749	8,323	-3,071	-8,263	-0,089
<i>valor-p</i>	< 0,001***	0,403	0,495	0,578	0,004**	< 0,001***	< 0,001***	0,028**	< 0,001***	0,933
Olor extraño										
<i>Coefficiente</i>	0,358	-0,068	0,026	0,135	0,203	-1,459	1,593	-0,171	0,031	0,196
<i>EE</i>	0,076	0,046	0,068	0,046	0,068	0,046	0,068	0,066	0,066	0,066
<i>valor-t</i>	4,737	-1,462	0,382	2,924	2,979	-31,507	23,361	-2,608	0,477	2,990
<i>valor-p</i>	0,005**	0,204	0,718	0,033*	0,031*	< 0,001***	< 0,001***	0,048*	0,653	0,030*

EE: error estándar; *Significativo con $p < 0,05$; **Significativo con $p < 0,01$; ***Significativo con $p < 0,001$.

Teniendo en cuenta la significancia de cada término, se puede expresar la ecuación polinomial de cada variable respuesta de manera simplificada solamente con aquellos coeficientes cuyo valor p resultó menor a 0,05. Los modelos reducidos se muestran en las Ecs. 4.7-4.11.

$$Y_1 = 2,733 - 2,895X_3 + 2,767X_3^2 \quad (\text{Ec. 4.7})$$

$$Y_2 = 2,700 - 1,753X_3 + 1,753X_3^2 - 0,452X_2X_3 \quad (\text{Ec. 4.8})$$

$$Y_3 = 81,672 - 6,188X_1^2 - 12,202X_3^2 \quad (\text{Ec. 4.9})$$

$$Y_4 = 36,2626 + 4,0685X_2^2 - 7,7556X_3 + 6,9104X_3^2 - 2,4502X_1X_2 - 6,5913X_1X_3 \quad (\text{Ec. 4.10})$$

$$Y_5 = 0,358 + 0,135X_2 + 0,203X_2^2 - 1,459X_3 + 1,593X_3^2 - 0,171X_1X_2 + 0,196X_2X_3 \quad (\text{Ec. 4.11})$$

donde,

Y_1 es el recuento de HYL (log UFC/mL),

Y_2 es el recuento de PSI (log UFC/mL),

Y_3 es la capacidad secuestrante del radical DPPH (% de inhibición),

Y_4 es el contenido de AA (% retención),

Y_5 es el puntaje de *olor extraño*,

X_1 la variable codificada para el tiempo de ultrasonido,

X_2 es la variable codificada para la concentración de extracto de granada, y

X_3 es la variable codificada para la concentración de vainillina.

A continuación, se analizará la influencia de las barreras combinadas estudiadas sobre la calidad microbiológica, nutricional y sensorial de jugo de frutilla al día 14 de almacenamiento refrigerado teniendo en cuenta los modelos obtenidos para cada variable seleccionada.

Parámetros de calidad microbiológica. La concentración de vainillina resultó ser la variable con mayor impacto sobre la calidad microbiológica de jugo de frutilla a los 14 días de almacenamiento. De hecho, tal como puede observarse en las Ecs. 4.7 y 4.8, tanto el término lineal como el cuadrático de este factor afectan significativamente a los recuentos de HYL y PSI. Para ambas poblaciones, se observa una mayor efectividad en la acción antimicrobiana (recuentos menores) a medida que se incrementa la

concentración de vainillina. Sin embargo, a partir de cierto valor, el aumento en la concentración del biopreservante no produce mejoras adicionales y se vuelve menos efectivo para reducir los recuentos de estas poblaciones microbianas. Este comportamiento también puede observarse claramente en la Fig. 4.1, como representación gráfica de los mencionados modelos.

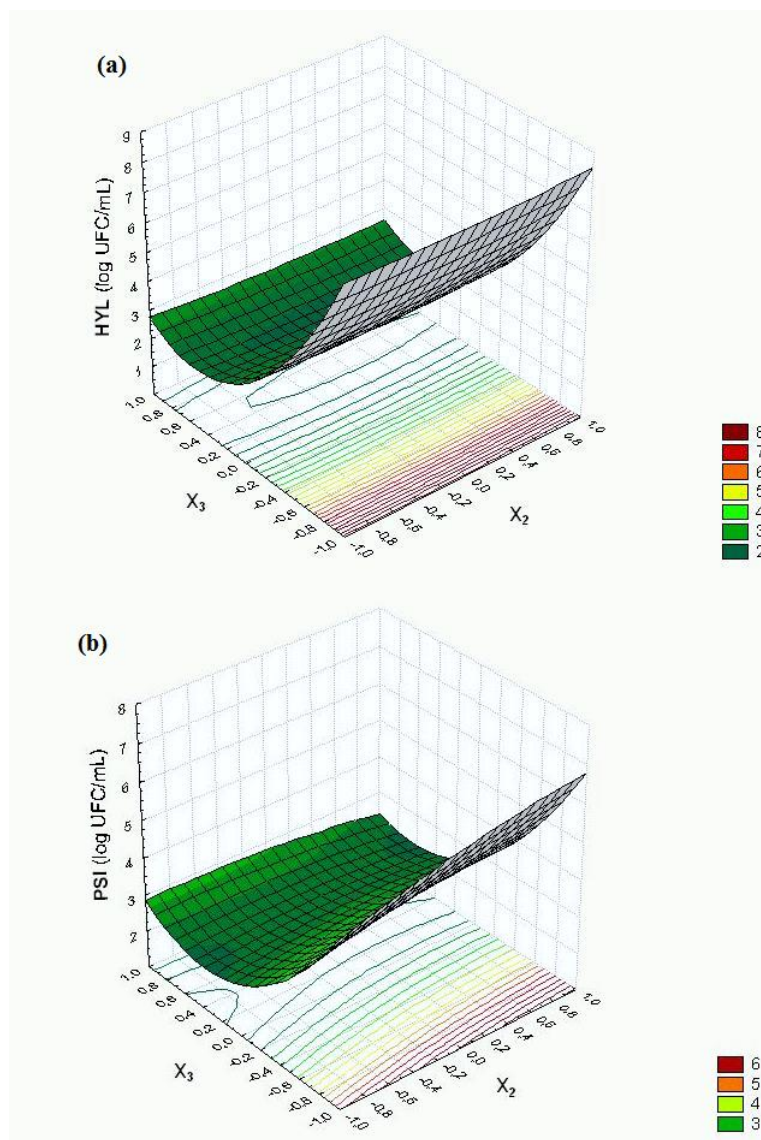


Fig. 4.1: Superficies de respuesta de los parámetros de calidad microbiológica en jugo de frutilla almacenado 14 d a 5°C. Variación de: (a) hongos y levaduras y (b) bacterias psicrófilas con la concentración de extracto de granada y la concentración de vainillina, con un tiempo de tratamiento de ultrasonido de 15 min. X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de vainillina.

Con respecto a la concentración de extracto de granada, sus términos lineal y cuadrático resultaron no significativos en los modelos. Sin embargo, la interacción entre

las concentraciones de extracto de granada y de vainillina fue significativa sobre la población de bacterias psicrófilas. Esta interacción indica que dependiendo del nivel de V, aumentos en la concentración de EG podrían provocar aumentos o disminuciones sobre el control del crecimiento de PSI. Como puede verse en la Fig. 4.1.b, a concentraciones elevadas de V, un aumento en la concentración de EG produce un aumento en la capacidad antimicrobiana del sistema (disminuyen los recuentos de PSI); sin embargo, a concentraciones bajas de V, mayores incrementos en la concentración de EG tienen un efecto contrario sobre el crecimiento de PSI.

El efecto antimicrobiano de la vainillina fue estudiado *in vitro* e *in vivo* en jugo de frutilla en los Capítulos 1 y 2 de la presente Tesis, mostrando una alta eficacia inhibiendo el crecimiento tanto de hongos y levaduras como de bacterias mesófilas y psicrófilas. El extracto de granada, también estudiado en el Capítulo 2, demostró un poder bacteriostático frente a mesófilas y psicrófilas. Este efecto antimicrobiano suele estar atribuido a los compuestos fenólicos, debido a la presencia de grupos hidroxilos, que reaccionan con los sitios activos de enzimas oxidorreductasas o bien actuando como *carrier* de cationes monovalentes a través de la membrana (Fitzgerald y col., 2004).

El análisis canónico de las superficies de respuesta indicó que el recuento mínimo de HYL resulta de la combinación $X_1 = -1$ (0 min de US), $X_2 = 1$ (360 $\mu\text{g/mL}$ de EG) y $X_3 = 0,5$ (0,9375 mg/mL de V). El modelo predijo que el mínimo recuento de HYL a los 14 días de almacenamiento de jugo de frutilla tratado bajo estas condiciones debería ser de 1,80 log UFC/mL, mientras que las predicciones para PSI, DPPH, retención de AA y *olor extraño* son de 2,26 log UFC/mL, 74,91% de inhibición, 43,46% y 0,71, respectivamente.

Las condiciones óptimas para el recuento mínimo de PSI obtenidas mediante el análisis de MSR fueron: $X_1 = 0$ (15 min de US), $X_2 = 1$ (360 $\mu\text{g/mL}$ de EG) y $X_3 = 0,5$ (0,9375 mg/mL de V). El modelo predijo un recuento mínimo de PSI de 2,01 log UFC/mL a los 14 días de almacenamiento de jugo de frutilla tratado bajo estas condiciones; mientras que el resto de las variables respuesta calculadas con el modelo completo correspondiente a cada una adquieren un valor de: recuento de HYL de 2,11 log UFC/mL, inhibición del radical DPPH de 78,12%, retención de AA de 37,81% y un puntaje de *olor extraño* de 0,46.

Parámetros de calidad nutricional. Los atributos asociados a la calidad nutricional del jugo de frutilla (porcentaje de inhibición del radical DPPH y porcentaje de retención de AA) presentaron comportamiento diferente frente a las variables independientes bajo estudio. Así, mientras que la capacidad antioxidante fue afectada por el tratamiento de US y la concentración de vainillina, la retención de AA fue afectada además por la concentración del extracto de granada (Ecs. 4.9 y 4.10, respectivamente).

En el caso de la capacidad antioxidante, la misma se vio afectada tanto por el tiempo de ultrasonido como por la concentración de vainillina, presentando una dependencia no lineal con ambas variables, lo cual se observa claramente en la Fig. 4.2.a. El aumento en el tiempo de aplicación de ultrasonido produce un aumento en la capacidad antioxidante de las muestras hasta cierto punto. El incremento de la capacidad antioxidante en las muestras sonicadas fue observado previamente en el Capítulo 3, y puede ser explicado por la liberación de compuestos antioxidantes de las paredes celulares a través del colapso producido por la cavitación (Cheng y col., 2007), y también por la remoción efectiva del oxígeno ocluido del jugo (Knorr y col., 2004). Es sabido que la actividad de los antioxidantes en sistemas biológicos y alimenticios depende en mayor medida de su grado de hidroxilación (Soria y Villamiel, 2010). Si bien el ultrasonido podría favorecer la hidroxilación, y por lo tanto, la capacidad antioxidante de algunos compuestos (Ashokkumar y col., 2008), la formación de radicales durante la sonicación también es considerada como una desventaja para la preservación de la bioactividad de los componentes de un alimento, tales como fenoles (Wan y col., 2005), y esto podría explicar la pérdida de efectividad en el tratamiento a tiempos de ultrasonido más altos.

De manera similar, el aumento en la concentración de vainillina provoca una mejora en la capacidad antioxidante de las muestras al día 14, hasta determinado valor a partir del cual posteriores aumentos no se reflejan en una mejora en esta respuesta.

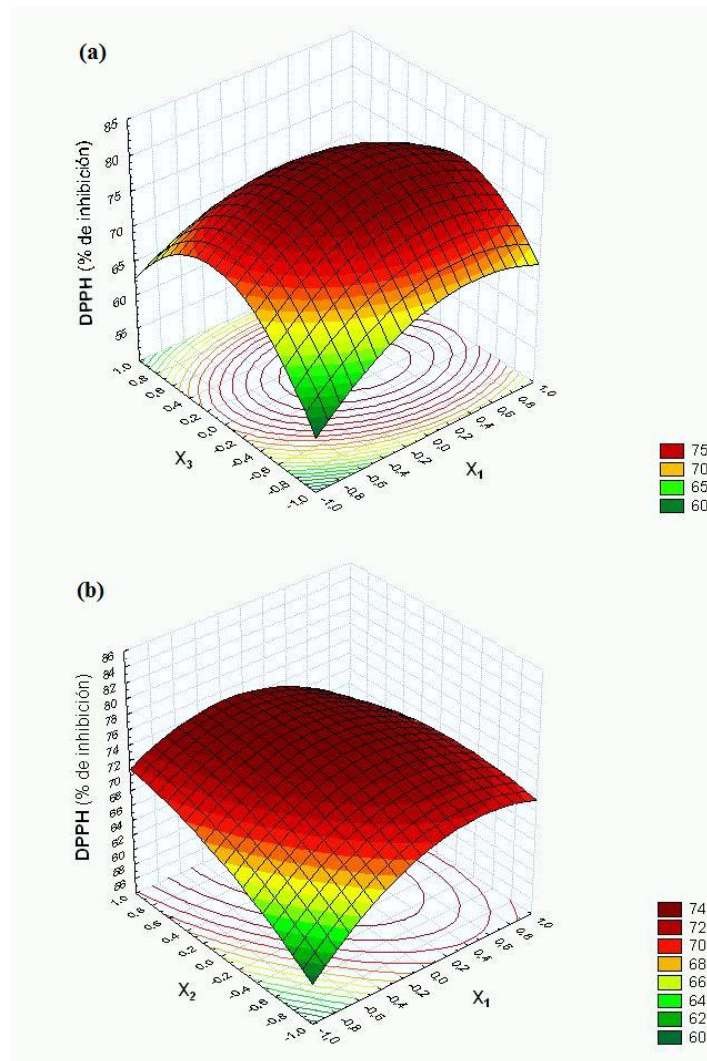


Fig. 4.2: Superficies de respuesta de la capacidad antioxidante de jugo de frutilla almacenado 14 d a 5°C. Variación con: (a) el tiempo de ultrasonido y la concentración de vainillina; y (b) el tiempo de ultrasonido y la concentración de extracto de granada. Las variables restantes se encuentran constantes en el nivel medio. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de vainillina.

Es interesante observar que la concentración de extracto de granada, particularmente su componente lineal en el modelo presentó una significancia ($p = 0,094$) cercana al límite considerado en esta Tesis por lo que es posible detectar un efecto (menos significativo que el ejercido por el tiempo de ultrasonido o por la concentración de vainillina) de esta variable sobre la capacidad antioxidante. En este caso, el aumento en la concentración de extracto de granada genera una mejora en la capacidad antioxidante de las muestras, lo cual también es fácilmente observable en la Fig. 4.2.b. El incremento de la capacidad antioxidante por aumento en la concentración de extracto de granada podría asociarse a la presencia de compuestos polifenólicos del

extracto, especialmente aquellos que poseen un mayor número de grupos hidroxilos, (Villaño y col., 2007).

El análisis canónico del modelo ajustado para DPPH indicó que la máxima capacidad antioxidante resulta de la combinación $X_1 = 0$ (15 min de US), $X_2 = 0,5$ (270 $\mu\text{g/mL}$ de EG) y $X_3 = 0$ (0,625 mg/mL de V). Para estas condiciones, el modelo predijo para el jugo de frutilla una inhibición de radical DPPH del 82,17% a los 14 días de almacenamiento, mientras que los valores predichos de HYL, PSI, retención de AA y *olor extraño* serían 2,75 log UFC/mL, 2,78 log UFC/mL, 37,11% y 0,48, respectivamente, obtenidos con los modelos de cada respuesta, en las condiciones mencionadas.

Con respecto a la retención de AA, el tiempo de ultrasonido y la concentración de ambos biopreservantes resultaron significativos en el modelo. Particularmente, la dependencia de la retención de AA con la concentración de EG y V fue cuadrática en ambos casos, como se ve en la Ec. 4.10. Como se puede observar en las Figs. 4.3.a y 4.3.b, el efecto del tiempo de ultrasonido sobre la retención de AA fue complejo, dado que su interacción con las otras dos variables independientes fue significativa. De esta manera, el efecto de incrementos en el tiempo de US fue en algunos casos beneficioso para la retención de AA y en otros casos resultó perjudicial, dependiendo del nivel de las concentraciones de bioactivos utilizadas en cada caso.

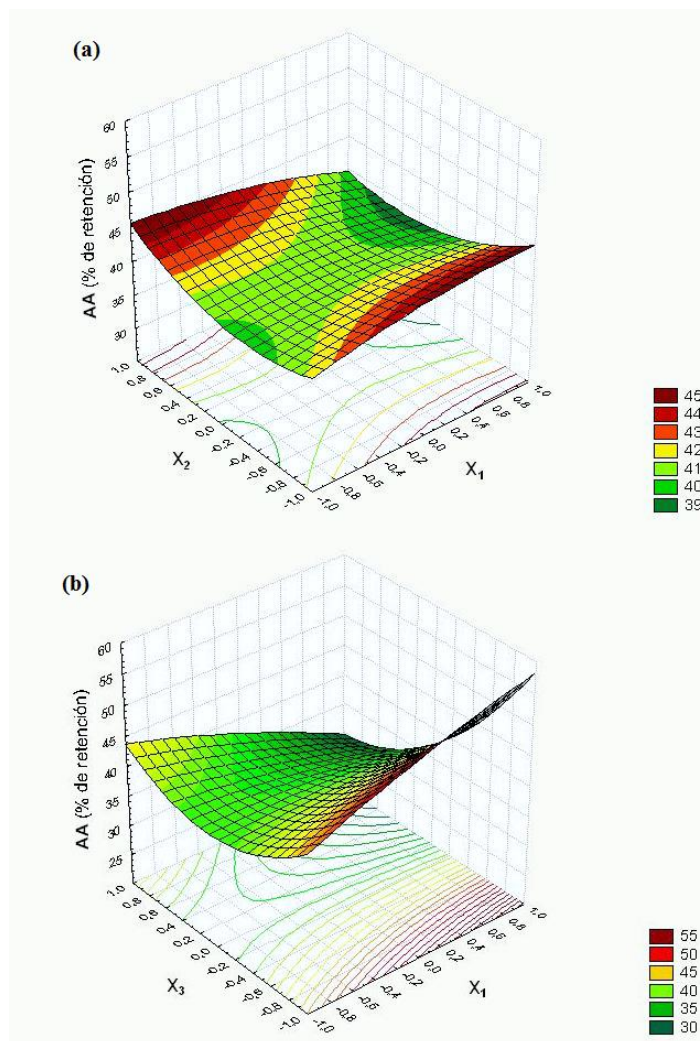


Fig. 4.3: Superficies de respuesta para la retención de ácido ascórbico (AA) de jugo de frutilla. Variación con: (a) el tiempo de ultrasonido y la concentración de extracto de granada; y (b) el tiempo de ultrasonido y la concentración de vainillina. Las variables restantes se encuentran constantes en el nivel medio. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de vainillina. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de vainillina.

El efecto de tratamientos de ultrasonido sobre el contenido de ácido ascórbico en jugos de fruta ha sido muy estudiado, si bien los resultados encontrados varían mucho de acuerdo al sustrato, a la forma de aplicación del tratamiento y a los parámetros del mismo (principalmente tiempo de aplicación, frecuencia y potencia) (Aguilar, Garvín, Ibarz, y Augusto, 2017). Por ejemplo, Santhirasegaram y col. (2013) estudiaron el efecto de tratamientos de US sobre jugo de mango, utilizando un baño ultrasónico a 40 kHz por 15, 30 y 60 min. Estos autores encontraron disminuciones en el contenido de AA de los jugos de entre 13 y 28% provocadas por el tratamiento de sonicación. Esta degradación del AA fue atribuida a la formación de radicales libres, asociados a

procesos oxidativos. Estos resultados coinciden con los encontrados por Tiwari y col. (2008) sobre jugo de frutilla, aplicando tratamientos de US a 20 kHz durante 2-10 min, donde encontraron reducciones en el contenido de AA de hasta 11%. Por el contrario, otros autores han hallado incrementos en el contenido de ácido ascórbico de jugos luego de aplicar tratamientos de ultrasonido. Entre ellos, se han observado incrementos de entre el 14 y el 28% en AA en jugo de uva tratado en un baño ultrasónico a 28 kHz por 30, 60 y 90 min. Resultados similares fueron hallados en jugos de manzana, lima y uva (Abid y col., 2013; Bhat y col., 2011; Cheng y col., 2007). Este incremento en vitamina C podría ser atribuido a la remoción de oxígeno atrapado gracias a la cavitación. Entonces, no es posible generalizar acerca de los efectos de tratamientos de ultrasonido sobre la retención de ácido ascórbico en jugos de fruta, sino que cada caso en particular debe ser estudiado y optimizado. Además, los estudios previamente mencionados han evaluado el impacto de los tratamientos de ultrasonido inmediatamente luego de su aplicación ($t = 0$ d), sin evaluar el efecto durante el almacenamiento, como es analizado en esta Tesis.

Las condiciones de tratamiento para obtener la máxima retención de AA a través del análisis de MSR fueron: $X_1 = 1$ (30 min de US), $X_2 = -1$ (0 $\mu\text{g/mL}$ de EG) y $X_3 = -1$ (0 mg/mL de V). Bajo estas condiciones, el modelo predice una retención de AA de 63,18% a los 14 días de almacenamiento de jugo de frutilla; mientras que para las demás variables respuesta, cada modelo predice: recuentos de HYL y PSI de 8,45 y 5,46 log UFC/mL, respectivamente; inhibición del radical DPPH de 67,29%; y un puntaje de *olor extraño* de 3,77.

Parámetros de calidad sensorial. Las tres barreras estudiadas tuvieron un impacto significativo sobre el *olor extraño* de las muestras. La dependencia de *olor extraño* con ambos bioactivos fue cuadrática. Incrementos en la concentración de EG o de V resultaron beneficiosos para las muestras, presentando menores puntajes de *olor extraño* a los 14 días de almacenamiento. Esto puede deberse al poder antimicrobiano de los agentes biopreservantes: un menor deterioro microbiano trae como consecuencia una menor producción de olores extraños en el producto. Sin embargo, a partir de determinados valores de concentración, este efecto se invierte, provocando aumentos en el puntaje de *olor extraño* al incrementar la concentración de biopreservante, posiblemente porque se supera el límite de detección por parte de los panelistas,

comenzando a percibir el aroma de los propios agentes naturales como no característico o extraño. Este comportamiento detectado para los dos bioactivos resultó más importante para la vainillina, tal como se puede observar en los valores de los coeficientes, como así también en su nivel de significancia (Tabla 4.5). Así mismo, esta tendencia se puede observar en las Figs. 4.4.a y 4.4.b, donde se evidencia el mayor impacto de la concentración de vainillina. Este efecto se observó también en el Capítulo 2, al evaluar individualmente los biopreservantes sobre la calidad del jugo de frutilla. El efecto antimicrobiano de V inhibe o retarda el deterioro del producto, disminuyendo la producción de olores extraños; si bien a altas concentraciones puede provocar un aumento de los mismos debido a sus propias características aromáticas.

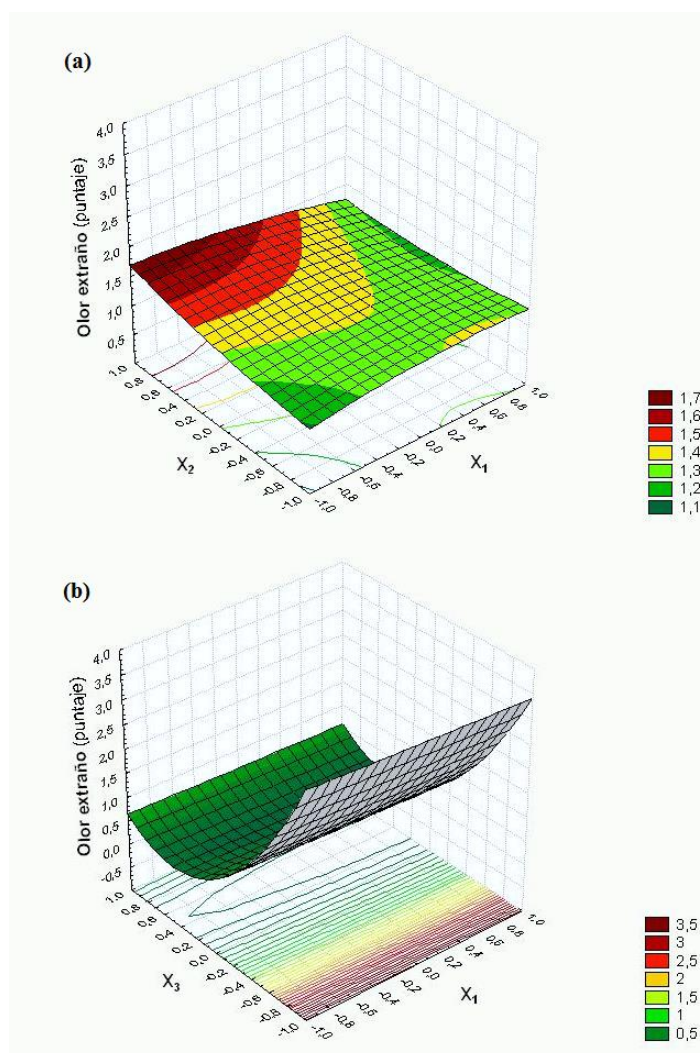


Fig. 4.4: Superficies de respuesta para la calidad sensorial de jugo de frutilla almacenado 14 d a 5°C. Variación de olor extraño con: (a) el tiempo de ultrasonido y la concentración de extracto de granada; y (c) la concentración de extracto de granada y la concentración de vainillina. Las variables restantes se encuentran constantes en el nivel medio. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de vainillina.

En cuanto al tiempo de ultrasonido, su efecto sobre el *olor extraño* ocurre a través de su interacción con la concentración de EG, que resultó significativa en el modelo. En este sentido, a bajas concentraciones de EG el tiempo de ultrasonido produce un leve incremento en el *olor extraño* de las muestras a los 14 días de almacenamiento, que podría ser propio del tratamiento; mientras que a altas concentraciones de EG, el *olor extraño* disminuye con el tiempo de US, posiblemente debido a que el poder antimicrobiano del EG se ve incrementado por el tratamiento de sonicación.

Las condiciones óptimas para minimizar el *olor extraño* a los 14 días de almacenamiento, obtenidas a partir del análisis canónico fueron $X_1 = -1$ (0 min de US), $X_2 = -1$ (0 $\mu\text{g/mL}$ de EG), $X_3 = 0,75$ (1,09375 mg/mL de V). El modelo ajustado para

esta variable predijo que el puntaje para *olor extraño* de jugo de frutilla tratado bajo estas condiciones es de 0, mientras que el resto de las respuestas calculadas con los modelos particulares bajo las condiciones previamente establecidas adquirieron valores predichos de: recuentos de HYL y PSI de 2,18 y 2,47 log UFC/mL, respectivamente, 59,16% de inhibición del radical DPPH, y 41,19% de retención de AA.

3.1.1.3. Optimización simultánea y validación

De las optimizaciones individuales realizadas para cada respuesta, cuyos resultados se detallaron en la sección previa, surge la evidencia de que los niveles de las variables independientes encontrados en cada caso fueron diferentes y en ocasiones completamente contrapuestos. Por ejemplo, al maximizar la retención de ácido ascórbico para obtener un producto con alta calidad nutricional, el tratamiento óptimo encontrado carece de vainillina ($X_3 = -1$), resultando en una alta carga microbiana (con recuentos de HYL y PSI de 8,45 y 5,46 log UFC/mL, respectivamente). De esta manera, es necesario optimizar todas las respuestas de manera simultánea para alcanzar una solución de compromiso que permita obtener un jugo de frutilla seguro desde el punto de vista microbiológico con alta calidad nutricional y sensorial durante el almacenamiento. Tal como se detalló en la sección de Materiales y Métodos del presente Capítulo, esto fue posible mediante la combinación de todos los modelos en uno único, caracterizado como Deseabilidad, y la posterior maximización de esta función.

La Fig. 4.5 muestra los efectos combinados de las tres tecnologías de preservación estudiadas sobre la función Deseabilidad (D). La maximización de esta nueva variable indicó que los niveles óptimos resultaron en $X_1 = -0,5$ (7,5 min de tiempo de ultrasonido), $X_2 = 1$ (360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto de granada), y $X_3 = 0,5$ (0,9375 mg/mL de vainillina) (OPT1), con un valor de deseabilidad de 0,811. Para estas condiciones, las variables respuesta fueron calculadas teóricamente (con los coeficientes de la Tabla 4.5), resultando en: recuentos de HYL y PSI de 1,93 y 2,15 log UFC/mL, respectivamente; 78,06% de inhibición del radical DPPH, 40,79% de retención de AA, y un puntaje de *olor extraño* de 0,58. Estos resultados evidencian la ventaja de utilizar la optimización simultánea, resultando en un compromiso entre todas las variables estudiadas.

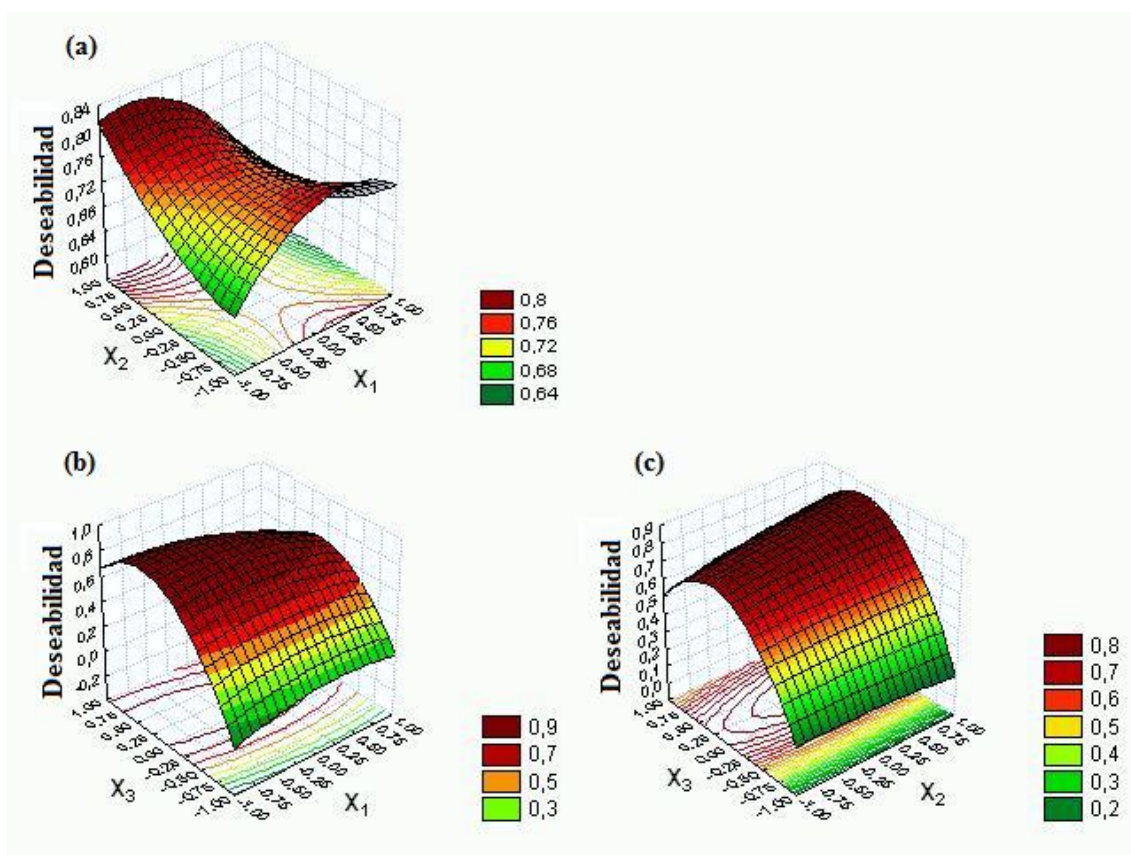


Fig. 4.5: Superficies de respuesta de la función Deseabilidad. Variación con: (a) la concentración de extracto de granada y el tiempo de ultrasonido; (b) la concentración de vainillina y el tiempo de ultrasonido; y (c) las concentraciones de vainillina y extracto de granada. Las variables restantes se encuentran constantes en el nivel medio. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de vainillina.

Para evaluar la confiabilidad de los modelos en predecir las respuestas, se llevó a cabo una validación experimental evaluando los parámetros de calidad seleccionados sobre el jugo tratado con el óptimo 1 (OPT1) a los 14 días de almacenamiento. La Tabla 4.6 muestra los resultados experimentales de dicha validación, junto con las variables respuesta en el jugo control a día 0 y a día 14.

Tabla 4.6: Resultados de la validación del tratamiento óptimo 1

Tiempo (días)	Muestra	Respuestas experimentales				
		<i>HYL</i> (log UFC/mL)	<i>PSI</i> (log UFC/mL)	<i>DPPH</i> (% de inhibición)	<i>AA</i> (% de retención)	<i>Olor extraño</i>
0	<i>Control</i>	5,40 ± 0,12	5,38 ± 0,15	64,39 ± 0,64	100	0,19 ± 0,13
14	<i>Control</i>	8,33 ± 0,11	8,30 ± 0,12	58,20 ± 2,24	39,70 ± 2,10	4,65 ± 0,12
	<i>OPT1</i>	2,48 ± 0,28	3,48 ± 0,20	59,27 ± 3,81	35,35 ± 3,14	2,50 ± 0,44

Los datos se expresan como el valor medio ± error estándar. OPT1: tratamiento óptimo 1 (7,5 min de tratamiento de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,9375 mg/mL de vainillina).

Cabe destacar que los valores predichos de PSI y *olor extraño* fueron menores que aquellos obtenidos en la validación. Estos resultados pueden deberse a que las frutillas empleadas en la validación presentaron mayores recuentos microbianos iniciales, que crecieron durante el almacenamiento alcanzando mayores valores al día 14. Estos recuentos superiores también pudieron ocasionar el mayor puntaje de *olor extraño* en la validación. A pesar de esto, es importante destacar que los valores de PSI se encuentran dentro del rango de aceptabilidad y son significativamente menores que en la muestra control. Por otro lado, los valores predichos de DPPH resultaron levemente superiores que los obtenidos durante la validación. A pesar de esto, los errores relativos entre los valores predichos por el modelo y los hallados experimentalmente estuvieron en el orden del 10% para casi todas las respuestas.

3.1.2. Combinación de barreras 2: US+EG+G

3.1.2.1. Ajuste de los modelos y selección de variables respuesta a optimizar

La Tabla 4.7 muestra los valores de todas las variables respuesta obtenidos para el jugo fresco sin tratar (control, día 0), así como también los valores obtenidos para estas variables luego de 14 días de almacenamiento refrigerado tanto para la muestra control como para las muestras tratadas bajo las diferentes condiciones experimentales.

Tabla 4.7: Valores iniciales para todas las respuestas del jugo de frutilla fresco y valores medios de la muestra sin tratar y las muestras tratadas luego de 14 días de almacenamiento a 5°C

Tiempo (días)	Tratamiento	Respuestas experimentales								
		MES (log UFC/mL)	HYL (log UFC/mL)	PSI (log UFC/mL)	DPPH (%)	CPT (EAG/100mL)	AA (%)	AVG	Olor cítrico	Olor extraño
0	Control	3,58	4,37	4,23	60,93	99,90	100,0	0,00	0,00	0,00
14	Control	6,69	8,13	6,65	53,05	130,31	31,72	2,57	0,57	4,37
	1	3,61	8,17	6,65	67,17	141,66	31,85	2,73	0,10	3,57
	2	3,60	2,00	5,18	63,35	142,59	38,33	3,80	2,57	1,60
	3	3,66	8,29	6,81	68,24	147,24	35,03	0,87	0,23	4,43
	4	3,67	2,65	2,70	55,79	133,73	28,42	3,37	1,93	1,33
	5	3,77	8,26	6,55	65,28	138,18	42,89	1,27	0,23	4,10
	6	3,63	8,16	6,57	70,02	151,62	28,75	2,83	0,20	4,37
	7	3,60	2,65	2,70	53,51	99,45	24,28	3,43	1,93	1,53
	8	3,60	2,65	2,70	63,24	142,60	32,58	3,53	2,00	1,33
	9	3,69	3,00	4,36	58,25	135,72	34,50	3,23	1,30	1,53
	10	3,61	3,04	2,70	56,11	114,45	28,11	3,93	1,90	1,50
	11	3,69	3,10	4,98	66,20	135,99	28,11	3,57	2,17	1,23
	12	3,69	2,85	2,70	64,28	177,45	31,06	3,97	2,07	1,80
	13	3,61	3,50	2,70	68,20	130,50	28,88	3,37	1,77	1,07
	14	3,57	3,15	2,70	64,39	137,63	24,45	3,43	1,83	1,17
	15	3,64	2,92	2,70	66,67	142,10	28,11	3,37	2,27	1,57

Como se observó en la Combinación de barreras 1, los parámetros de calidad del control se vieron afectados fuertemente por el tiempo de almacenamiento, evidenciado por un crecimiento en las poblaciones microbianas estudiadas, un incremento en el CPT, y un importante aumento en el *olor extraño* percibido por los panelistas. Como se puede observar de los valores experimentales mostrados en la Tabla 4.7, los recuentos de microflora nativa presentaron una alta dependencia con las variables evaluadas, encontrando por ejemplo, que los tratamientos 1, 3, 5 y 6 mostraron recuentos similares a los de la muestra control al día 14. Estos mismos tratamientos presentaron altos puntajes de *olor extraño* comparados con el control. Los parámetros de calidad nutricional evaluados también mostraron dependencia con las barreras estudiadas: las muestras 1, 3, 6 y 13 presentaron mayor capacidad antioxidante (con porcentajes de inhibición del radical DPPH superiores al 67%), mientras que las muestras 3, 6 y 12 presentaron alto contenido de polifenoles comparado con el control.

La Tabla 4.8 muestra los parámetros asociados al ajuste de los modelos de todas las variables medidas. El ANOVA indicó que los parámetros de calidad MES, AA y AVG no mostraron buen ajuste, con valores p superiores a 0,05 y coeficientes de R^2 ajustado menores a 0,70. Luego, para la optimización simultánea se seleccionaron aquellas variables respuesta que mostraron buen ajuste con ($p < 0,05$). De esta manera se seleccionaron 2 parámetros de calidad microbiológica, 2 parámetros de calidad nutricional y 2 parámetros de calidad sensorial, reduciendo las variables respuesta medidas a las siguientes 6: HYL, PSI, DPPH, CPT, *olor cítrico* y *olor extraño*.

Tabla 4.8: Parámetros estadísticos asociadas a los modelos cuadráticos ajustados

Variabes respuesta	Valor <i>p</i>	R² ajustado
Calidad microbiológica		
<i>MES</i>	0,809	-0,436
<i>HYL</i>	< 0,001***	0,989
<i>PSI</i>	0,0012**	0,939
Calidad nutricional		
<i>DPPH</i>	0,0017**	0,930
<i>CPT</i>	0,0229*	0,793
<i>AA</i>	0,0594	0,684
Calidad sensorial		
<i>AVG</i>	0,112	0,575
<i>Olor cítrico</i>	0,007**	0,878
<i>Olor extraño</i>	< 0,001***	0,978

*Significativo con $p < 0,05$

**Significativo con $p < 0,01$

***Significativo con $p < 0,001$

3.1.2.2. Análisis de los modelos de las variables respuesta seleccionadas

Una vez seleccionadas las variables respuesta a optimizar simultáneamente, se procedió con el análisis de cada modelo. En la Tabla 4.9 se presentan los coeficientes estimados, junto con sus errores estándar, y los valores t y p para cada variable respuesta.

Tabla 4.9: Parámetros estadísticos del análisis de MSR de las variables respuesta seleccionadas en la Combinación de barreras 2

Respuesta	Término									
	Intercepto	X_1	X_1^2	X_2	X_2^2	X_3	X_3^2	X_1*X_2	X_1*X_3	X_2*X_3
<i>HYL</i>										
<i>Coficiente</i>	3,191	0,070	-0,175	-0,024	-0,018	-2,866	2,259	-0,073	0,133	0,026
<i>EE</i>	0,152	0,093	0,137	0,093	0,137	0,093	0,137	0,132	0,132	0,132
<i>valor-t</i>	20,987	0,747	-1,276	-0,255	-0,134	-30,780	16,486	-0,555	1,009	0,194
<i>valor-p</i>	< 0,001***	0,489	0,258	0,809	0,899	< 0,001***	< 0,001***	0,603	0,359	0,854
<i>PSI</i>										
<i>Coficiente</i>	2,700	-0,782	0,844	0,080	0,140	-1,661	1,790	-0,155	-0,661	-0,004
<i>EE</i>	0,251	0,154	0,226	0,154	0,226	0,154	0,226	0,218	0,218	0,218
<i>valor-t</i>	10,748	-5,084	3,728	0,517	0,617	-10,798	7,903	-0,711	-3,037	-0,019
<i>valor-p</i>	< 0,001***	0,0038**	0,0136*	0,628	0,564	< 0,001***	< 0,001***	0,509	0,029*	0,986
<i>DPPH</i>										
<i>Coficiente</i>	66,417	-1,319	-2,291	3,824	-2,914	-4,349	-0,490	0,054	-2,157	1,248
<i>EE</i>	0,779	0,477	0,702	0,478	0,702	0,477	0,702	0,674	0,674	0,674
<i>valor-t</i>	85,316	-2,767	-3,264	8,020	-4,153	-9,124	-0,699	0,079	-3,199	1,851
<i>valor-p</i>	< 0,001***	0,040*	0,022*	< 0,001***	0,009**	< 0,001***	0,516	0,940	0,024*	0,123
<i>CPT</i>										
<i>Coficiente</i>	136,745	2,114	6,252	14,981	-2,093	-7,540	-1,690	15,681	-3,610	7,430
<i>EE</i>	4,455	2,728	4,015	2,728	4,015	2,728	4,015	3,858	3,858	3,858
<i>valor-t</i>	30,698	0,775	1,557	5,492	-0,521	-2,764	-0,421	4,065	-0,936	1,926
<i>valor-p</i>	< 0,001***	0,473	0,180	0,003**	0,625	0,040*	0,691	0,010**	0,392	0,112

Tabla 4.9 (cont.). Parámetros estadísticos del análisis de MSR de las variables respuesta seleccionadas en la Combinación de barreras 2

Respuesta	Término									
	Intercepto	X_1	X_1^2	X_2	X_2^2	X_3	X_3^2	X_1*X_2	X_1*X_3	X_2*X_3
Olor cítrico										
Coefficiente	1,956	0,000	0,010	0,133	-0,107	0,958	-0,757	-0,175	-0,192	0,025
EE	0,174	0,106	0,157	0,106	0,157	0,106	0,157	0,151	0,151	0,151
valor-t	11,253	0,000	0,062	1,253	-0,683	9,006	-4,832	-1,163	-1,274	0,166
valor-p	< 0,001***	1,000	0,953	0,266	0,525	< 0,001***	0,005*	0,297	0,259	0,875
Olor extraño										
Coefficiente	1,267	0,142	0,075	0,008	0,175	-1,333	1,392	0,150	-0,283	-0,117
EE	0,109	0,067	0,098	0,067	0,098	0,067	0,098	0,094	0,094	0,094
valor-t	11,672	2,132	0,767	0,125	1,789	-20,063	14,226	1,596	-3,015	-1,241
valor-p	< 0,001***	0,086	0,478	0,905	0,134	< 0,001***	< 0,001***	0,171	0,030*	0,270

EE: error estándar; *Significativo con $p < 0,05$; **Significativo con $p < 0,01$; ***Significativo con $p < 0,001$.

Teniendo en cuenta la significancia de cada término, la ecuación polinomial de cada variable respuesta se expresó de manera simplificada como se muestra en las Ecs. 4.12-4.17.

$$Y_1 = 3,1910 - 2,8659X_3 + 2,2594X_3^2 \quad (\text{Ec. 4.12})$$

$$Y_2 = 2,7000 - 0,7820X_1 - 1,6610X_3 - 0,6606X_1X_3 + 0,8441X_1^2 + 1,7896X_3^2 \quad (\text{Ec. 4.13})$$

$$Y_3 = 66,4171 - 1,3191X_1 + 3,8235X_2 - 4,3494X_3 - 2,1569X_1X_3 - 2,2906X_1^2 - 2,9144X_2^2 \quad (\text{Ec. 4.14})$$

$$Y_4 = 136,7453 + 14,9813X_2 - 7,5403X_3 + 15,6810X_1X_2 \quad (\text{Ec. 4.15})$$

$$Y_5 = 1,9556 + 0,9583X_3 - 0,7569X_3^2 \quad (\text{Ec. 4.16})$$

$$Y_6 = 1,2667 - 1,3333X_3 - 0,2833X_1X_3 + 1,3917X_3^2 \quad (\text{Ec. 4.17})$$

donde,

Y_1 es el recuento de HYL (log UFC/mL),

Y_2 es el recuento de PSI (log UFC/mL),

Y_3 es la capacidad secuestrante de DPPH (% de inhibición),

Y_4 es el CPT (mg EAG/100 mL),

Y_5 es el *olor cítrico*,

Y_6 es el *olor extraño*,

X_1 es la variable codificada para el tiempo de ultrasonido,

X_2 es la variable codificada para la concentración de extracto de granada, y

X_3 es la variable codificada para la concentración de geraniol.

A continuación, se analizará la influencia de las barreras combinadas estudiadas sobre la calidad microbiológica, nutricional y sensorial de jugo de frutilla al día 14 de almacenamiento refrigerado teniendo en cuenta los modelos obtenidos para cada variable seleccionada.

Parámetros de calidad microbiológica. La concentración de geraniol resultó ser la variable con mayor impacto sobre la calidad microbiológica de jugo de frutilla a los 14 días de almacenamiento, mostrando un efecto similar al observado para la vainillina en la Combinación de barreras 1. Tanto el término lineal como el cuadrático de la concentración de G resultaron significativos en los modelos de HYL y PSI, como se puede observar en las Ecs. 4.12 y 4.13, respectivamente. Para ambas poblaciones, a

mayor concentración de geraniol, mayor fue la reducción de recuentos microbianos. Sin embargo, la actividad antimicrobiana del geraniol disminuyó su efectividad a medida que su concentración aumentaba. Este comportamiento también puede observarse en la Fig. 4.6, como representación gráfica de los mencionados modelos.

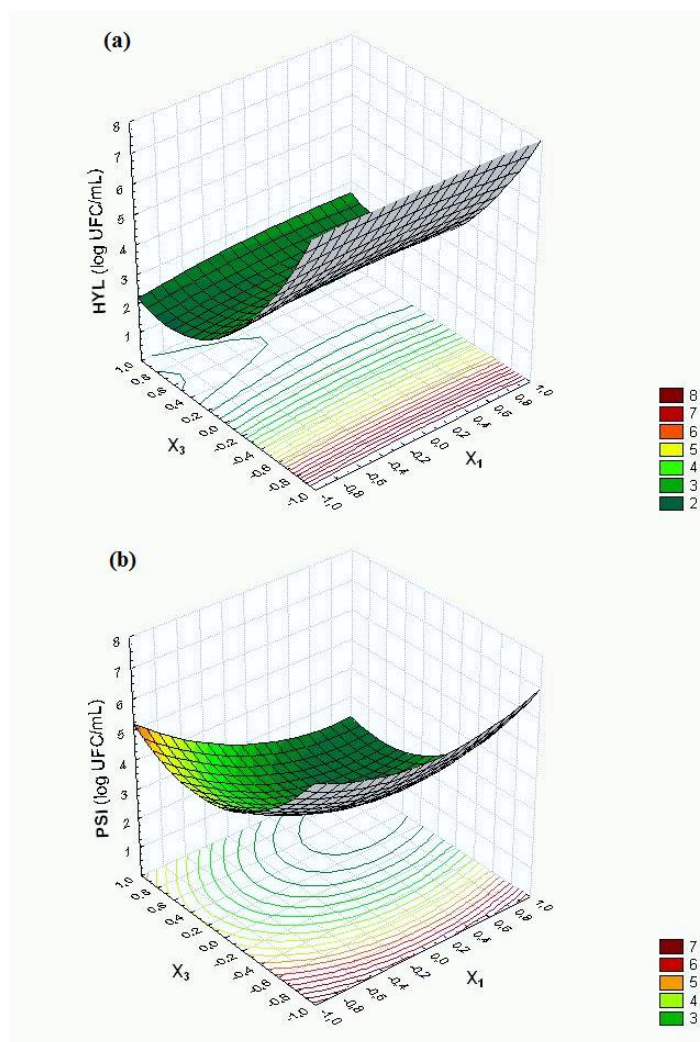


Fig. 4.6: Superficies de respuesta para los parámetros de calidad microbiológica de jugo de frutilla almacenado 14 d a 5°C. Variación de: (a) hongos y levaduras, y (b) bacterias psicrófilas con el tiempo de ultrasonido y la concentración de geraniol, con una concentración de extracto de granada de 180 $\mu\text{g/mL}$. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_3 = concentración de geraniol.

La eficacia del geraniol como antimicrobiano natural fue demostrada *in vitro* e *in vivo* en los Capítulos 1 y 2 de la presente Tesis, atribuida principalmente a su habilidad de ingresar en las membranas donde altera las propiedades de la bicapa fosfolipídica. Esto hace que la membrana se vuelva más fluida, lo cual incrementa su permeabilidad general, provocando la pérdida de iones, la ineficacia de las proteínas de la membrana y

finalmente, la inhibición del crecimiento o muerte celular (Dalleau, Cateau, Berges, Berjeaud, y Imbert, 2008).

Si bien el tiempo de ultrasonido no resultó significativo en el modelo de HYL, sí lo fue para el caso de las bacterias psicrófilas, mostrando un comportamiento no lineal. El efecto del ultrasonido sobre la inhibición del crecimiento de microorganismos fue analizado en el Capítulo 3 y atribuido principalmente a la generación de radicales durante la sonólisis de la molécula de agua, inducida por el fenómeno de cavitación (Mañas y Pagán, 2005). Estos radicales producen daños oxidativos debido a su alta reactividad, provocando la inactivación microbiana. La interacción entre el ultrasonido y el geraniol también fue significativa en el modelo de PSI, como puede observarse en la Fig. 4.6.b: a mayores tiempos de ultrasonido el efecto antimicrobiano del geraniol se ve incrementado. Este fenómeno puede deberse a la intensa presión generada durante los tratamientos de ultrasonido que contribuye a la penetración de los preservantes químicos a través de la membrana celular y el proceso de cavitación puede asistir en la disgregación de los microorganismos, lo que culmina en una eficiencia incrementada del tratamiento de preservación (Gogate y Kabadi, 2009). Varios estudios han demostrado estos efectos al aplicar ultrasonido a 40 kHz combinado con diferentes químicos (Brilhante São José y Dantas Vanetti, 2012; Chen y Zhu, 2011). En estos estudios, el tratamiento de ultrasonido también incrementó la eficiencia del agente preservante en reducir las poblaciones microbianas presentes en frutas y verduras.

El análisis canónico de las superficies de respuesta indicó que el recuento mínimo de HYL resulta de la combinación $X_1 = -1$ (0 min de US), $X_2 = -1$ (0 $\mu\text{g/mL}$ de EG) y $X_3 = 0,75$ (0,2625 $\mu\text{L/mL}$ de G). El modelo predijo que el mínimo recuento de HYL a los 14 días de almacenamiento de jugo de frutilla tratado bajo estas condiciones debería ser de 1,88 log UFC/mL, mientras que los valores predichos de PSI, DPPH, CPT, *olor cítrico* y *olor extraño* son 4,49 log UFC/mL, 55,91% de inhibición, 130,02 mg EAG/100 mL, 1,97 y 1,60, respectivamente.

Las condiciones para obtener el mínimo recuento de PSI obtenidas mediante el análisis de MSR fueron: $X_1 = 0,75$ (26,25 min de US), $X_2 = 0,25$ (225 $\mu\text{g/mL}$ de EG) y $X_3 = 0,75$ (0,2625 $\mu\text{L/mL}$ de G). Bajo estas condiciones, el modelo predice un recuento de PSI a los 14 días de almacenamiento de jugo de frutilla de 1,98 log UFC/mL; mientras que el resto de las variables respuesta calculadas con los modelos correspondientes son: recuento de HYL de 2,33 log CFU/mL, inhibición del radical

DPPH de 60,41%, CPT de 141,16 mg GAE/100 mL, y puntajes de *olor cítrico* y de *olor extraño* de 2,14 y 1,06, respectivamente.

Parámetros de calidad nutricional. A pesar de que la inhibición del radical DPPH y el contenido de polifenoles totales son medidas que usualmente se correlacionan entre sí, en este caso presentaron comportamientos diferentes ante las barreras aplicadas sobre jugo de frutilla.

Con respecto al modelo de DPPH, todos los factores estudiados resultaron significativos. El tiempo de ultrasonido presentó una relación no lineal con la inhibición del DPPH, tanto el término lineal como el cuadrático resultaron significativos, como se observa en la Ec. 4.14. La concentración de extracto de granada también presentó una relación no lineal con la inhibición de DPPH, como puede observarse en la Fig. 4.7.a. Este comportamiento se observa también en la Ec. 4.14, donde ambos términos lineal y cuadrático del extracto de granada afectaron significativamente al DPPH. La actividad secuestrante del radical DPPH aumentó con la concentración de EG, pero a medida que esta se incrementa, el efecto se ve disminuido. Por otro lado, el geraniol tuvo un efecto negativo en el DPPH, ya observado en el Capítulo 2. Este efecto es menos importante que el del extracto de granada, como puede verse al comparar las Figs. 4.7.a y 4.7.b. Es importante destacar, que en este caso la interacción entre el tiempo de ultrasonido y la concentración de geraniol también resultó significativa: a mayores tiempos de ultrasonido, el efecto negativo del geraniol sobre la capacidad secuestrante del DPPH es más pronunciado.

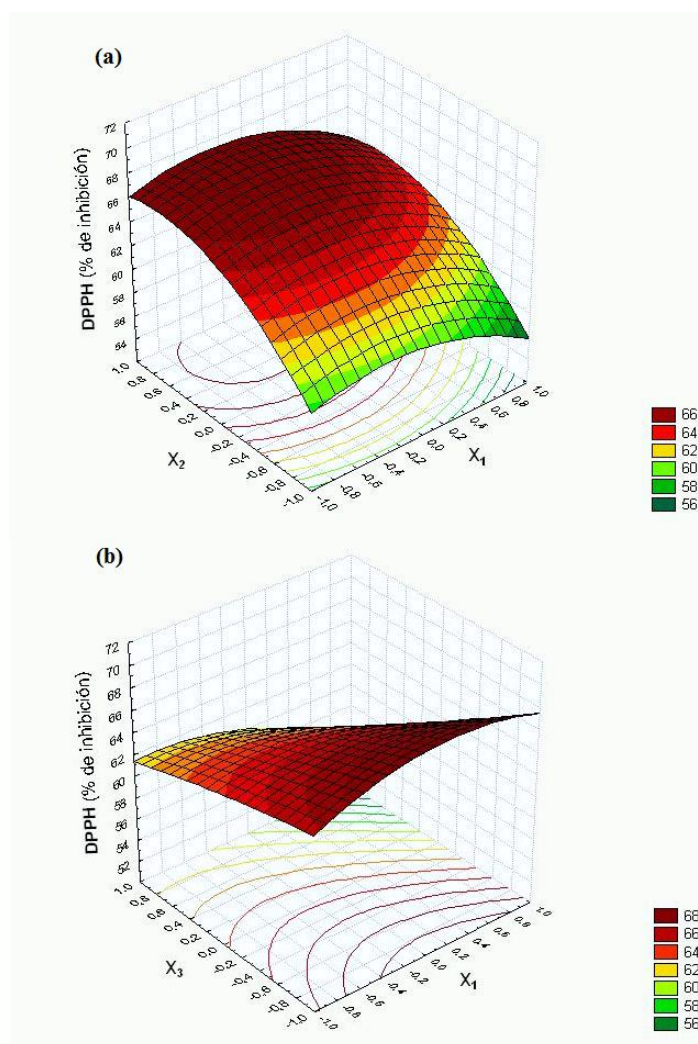


Fig. 4.7: Superficies de respuesta de la capacidad antioxidante de jugo de frutilla almacenado 14 d a 5°C. Variación con: (a) el tiempo de ultrasonido y la concentración de extracto de granada; y (b) el tiempo de ultrasonido y la concentración de geraniol. Las variables restantes se encuentran constantes en el nivel medio. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de geraniol.

Las condiciones óptimas para maximizar la actividad secuestrante de DPPH obtenidas del análisis canónico fueron: $X_1 = 0,25$ (18,75 min de US), $X_2 = 0,5$ (270 $\mu\text{g/mL}$ de EG), $X_3 = -1$ (0 $\mu\text{L/mL}$ de G). El modelo evaluado en dichas condiciones predice para el jugo de frutilla almacenado por 14 días, un porcentaje de inhibición de DPPH de 70,91%, mientras que el resto de las variables respuesta calculadas con sus correspondientes modelos evaluados bajo estas condiciones son: recuentos de HYL y PSI de 8,25 y 6,23 log UFC/mL, respectivamente; un CPT de 149,63 mg EAG/100mL; y puntajes de *olor cítrico* y *olor extraño* de 0,29 y 4,23, respectivamente.

En el caso del CPT, se observó una dependencia lineal con la concentración de los bioactivos, al igual que en DPPH; sin embargo, en este caso, los términos

cuadráticos no resultaron significativos. El extracto de granada tuvo un efecto positivo sobre el CPT y su interacción con el tiempo de US también fue significativa en el modelo. Esto significa que el CPT incrementa a medida que aumenta la concentración de EG, y este comportamiento es más pronunciado cuando se aplican mayores tiempos de procesado de ultrasonido (Fig. 4.8.a). Con respecto al geraniol, este compuesto mostró un efecto negativo sobre el CPT, aunque este efecto no fue tan importante como el del EG, como puede verse en las Figs. 4.8.a y 4.8.b. El geraniol podría estar actuando a nivel celular, interactuando con componentes de la pared, volviéndola más permeable. Esto podría ocasionar la liberación de compuestos, e incluso enzimas tales como la polifenoloxidasas (PPO), disminuyendo de esta manera el CPT.

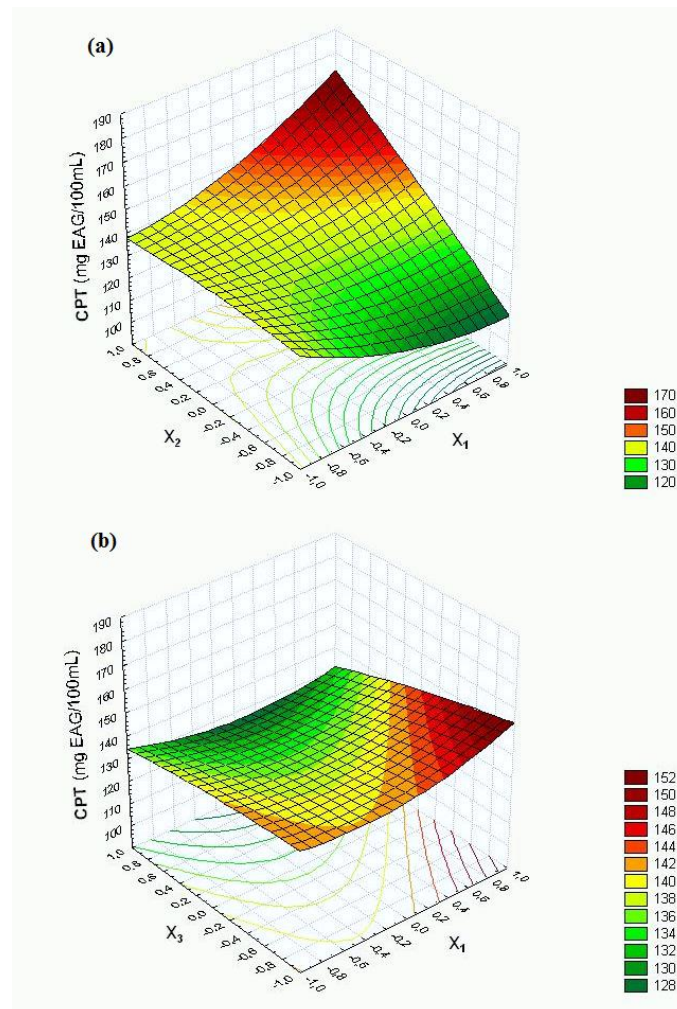


Fig. 4.8: Superficies de respuesta del contenido de polifenoles totales de jugo de frutilla almacenado 14 d a 5°C. Variación con: (a) el tiempo de ultrasonido y la concentración de extracto de granada; y (b) el tiempo de ultrasonido y la concentración de geraniol. Las variables restantes se encuentran constantes en el nivel medio. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de geraniol.

El análisis canónico indicó que el máximo CPT obtenido por la MSR resulta de $X_1 = 1$ (30 min de US), $X_2 = 1$ (360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EG), $X_3 = -1$ (0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de G). El modelo evaluado en dichas condiciones predice un valor de CPT a los 14 días de almacenamiento del jugo de frutilla es de 175,71 mg EAG/100 mL, mientras que los modelos de las restantes variables respuesta evaluados en esas condiciones predicen valores de 7,94 log UFC/mL de HYL, 6,94 log UFC/mL de PSI, 68,54% inhibición de DPPH, 0,27 y 4,94 de *olor cítrico* y *olor extraño*, respectivamente.

El extracto de granada, el geraniol y el ultrasonido tuvieron efectos diferentes sobre la inhibición del DPPH y sobre el CPT, encontrándose para cada respuesta condiciones óptimas levemente diferentes. A pesar del hecho de que el CPT también puede relacionarse con la capacidad antioxidante de la muestra, no todos los compuestos fenólicos exhiben actividad antioxidante a través del método DPPH. Cada compuesto fenólico presenta diferentes propiedades antioxidantes, las cuales dependen principalmente de su estructura química y de la posición de los grupos hidroxilos (Pokorný, 2003). Además, la actividad secuestrante del radical DPPH no se debe únicamente a compuestos fenólicos, sino también a otros antioxidantes que pueden estar presentes en el extracto (Ju y Howard, 2003).

Parámetros de calidad sensorial. Ambos atributos sensoriales seleccionados (*olor cítrico* y *olor extraño*) fueron significativamente afectados por la concentración de geraniol, cuyo término lineal y cuadrático fue significativo en ambos modelos (Ecs. 4.16 y 4.17). Sin embargo, para estos atributos el efecto fue inverso (observable a través de los signos de los coeficientes involucrados en los modelos). Por un lado, el *olor cítrico* incrementó su intensidad a medida que aumentaba la concentración de geraniol, y este incremento fue no lineal, como se observa claramente en la Fig. 4.9.a. Este resultado se asocia al olor característico propio del bioactivo, que aporta sabor y aroma cítricos, percibidos por los panelistas. Por otro lado, en el caso de *olor extraño*, se produjo una disminución en la intensidad de este atributo a medida que se incrementa la concentración de geraniol, también en forma no lineal (Fig. 4.9.b), pero hasta determinado valor a partir del cual los panelistas empiezan a percibir un olor no característico en el producto, aumentando los valores de los puntajes asociados a este atributo. Este resultado podría estar asociado con la actividad antimicrobiana del geraniol, dado que el crecimiento microbiano causa el deterioro del jugo de frutilla (la

causa principal de *olor extraño*). Sin embargo, cuando la concentración de geraniol se incrementa por encima de cierto valor, su propio olor cítrico (que es considerado por los panelistas como un olor no característico), incrementa el puntaje de *olor extraño*.

El término de interacción entre el tiempo de ultrasonido y la concentración de geraniol también afectó de forma significativa el puntaje de *olor extraño*, mostrando que a bajas concentraciones de G, un aumento en el tiempo de US incrementa la intensidad de este atributo. En cambio, a altas concentraciones de geraniol, un aumento en el tiempo de ultrasonido produjo una disminución del *olor extraño* en las muestras. Estos efectos, si bien resultaron significativos, fueron despreciables frente al efecto neto del geraniol, como se puede observar en los valores absolutos de los coeficientes del modelo (Ec. 4.17).

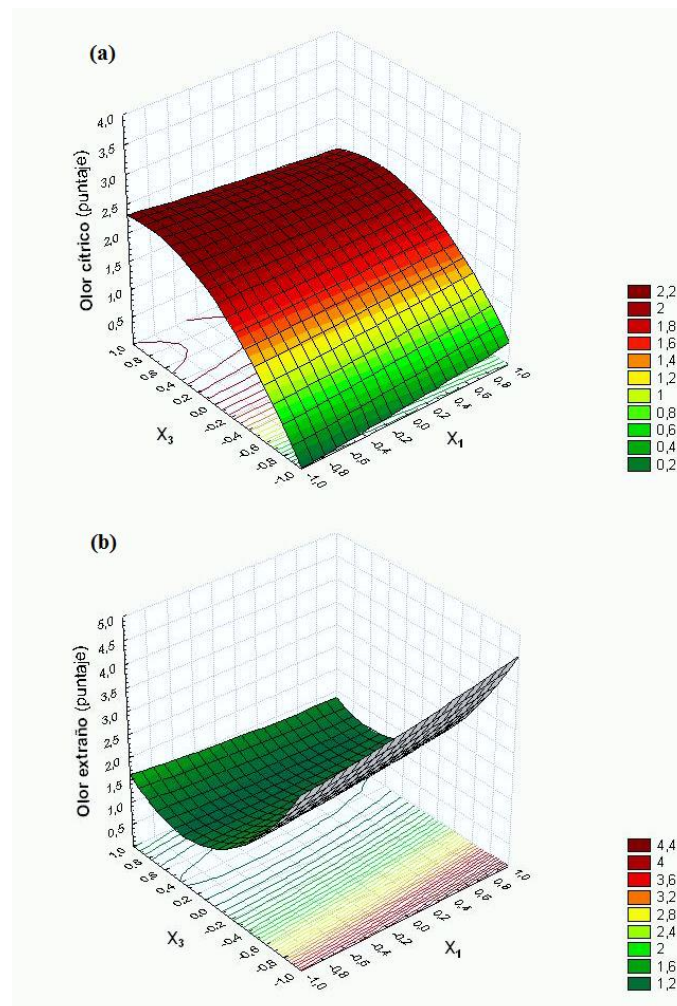


Fig. 4.9: Superficies de respuesta para los parámetros de calidad sensorial de jugo de frutilla almacenado 14 d a 5°C. Variación de: (a) olor cítrico y (b) olor extraño con el tiempo de ultrasonido y la concentración de geraniol, con una concentración de extracto de granada de 180 µg/mL. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_3 = concentración de geraniol.

De acuerdo al análisis canónico de MSR, el mínimo puntaje de *olor cítrico* resulta de $X_1 = -1$ (0 min de US), $X_2 = -0,25$ (135 $\mu\text{g/mL}$ de EG), $X_3 = -1$ (0 $\mu\text{L/mL}$ de G). El modelo predijo que bajo esas condiciones el puntaje de *olor cítrico* para jugo de frutilla a los 14 días de almacenamiento debería ser 0, mientras que los modelos de HYL, PSI, DPPH, CPT y *olor extraño* predicen valores de 8,20 log UFC/mL, 7,07 log UFC/mL, 66,34%, 145,02 mg EAG/100 mL, y 3,66, respectivamente.

Las condiciones óptimas para minimizar el *olor extraño* obtenidas a partir del análisis canónico fueron $X_1 = -0,25$ (11,25 min de US), $X_2 = 0,25$ (360 $\mu\text{g/mL}$ de EG), $X_3 = 0,5$ (0,225 $\mu\text{L/mL}$ de G). El modelo predijo que bajo estas condiciones el puntaje de *olor extraño* del jugo de frutilla a los 14 días de almacenamiento es de 0,94, mientras que el resto de las respuestas calculadas con sus respectivos modelos predicen valores de recuentos de HYL y PSI de 2,28 y 2,69 log UFC/mL, respectivamente, 65,50% de inhibición del radical DPPH, CPT de 136,43 mg EAG/100 mL, y un puntaje de *olor cítrico* de 2,31.

3.1.2.3. Optimización simultánea y validación

Al igual que en la Combinación de barreras 1, las optimizaciones individuales realizadas para cada respuesta, muestran que los niveles de las variables independientes encontrados en cada caso son diferentes y en ocasiones completamente contrapuestos. Por ejemplo, al mejorar la calidad nutricional maximizando la inhibición de DPPH y el CPT, el tratamiento óptimo encontrado para ambas respuestas carece de geraniol ($X_3 = -1$), resultando en una alta carga microbiana (con recuentos de HYL de 8,19 y 7,94 log UFC/mL, respectivamente). Un resultado similar se obtuvo al optimizar individualmente al *olor cítrico*, lo que llevó a un tratamiento óptimo sin geraniol y recuentos microbianos de 8,32 y 7,12 log UFC/mL de HYL y PSI, respectivamente, superando el límite establecido de 10^7 UFC/mL (BOE, 2001), en ambos casos. Luego, es imperativo optimizar simultáneamente todas las respuestas estudiadas para así obtener un jugo de frutilla seguro desde el punto de vista microbiológico con alta calidad nutricional y sensorial durante el almacenamiento. Nuevamente, esto será posible mediante la combinación de todos los modelos en la función Deseabilidad, y su posterior maximización.

La Fig. 4.10 muestra los efectos combinados de las tres tecnologías de preservación estudiadas sobre la función Deseabilidad (D). La maximización de esta nueva variable indicó que los niveles óptimos resultaron en $X_1 = 1$ (30 min de tiempo de ultrasonido), $X_2 = 1$ (360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto de granada), y $X_3 = 0$ (0,15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de geraniol) (OPT2), con un valor de deseabilidad de 0,699. En este punto, las respuestas investigadas fueron calculadas teóricamente (con los coeficientes de la Tabla 4.9) como: recuentos de HYL y PSI de 2,97 y 2,83 log UFC/mL, respectivamente; 63,77% de inhibición del radical DPPH, 173,68 mg EAG/100mL de jugo, y puntajes de *olor cítrico* y *olor extraño* de 1,82 y 1,82, respectivamente. Estos resultados evidencian la ventaja de utilizar la optimización simultánea, resultando en un compromiso entre todas las variables estudiadas.

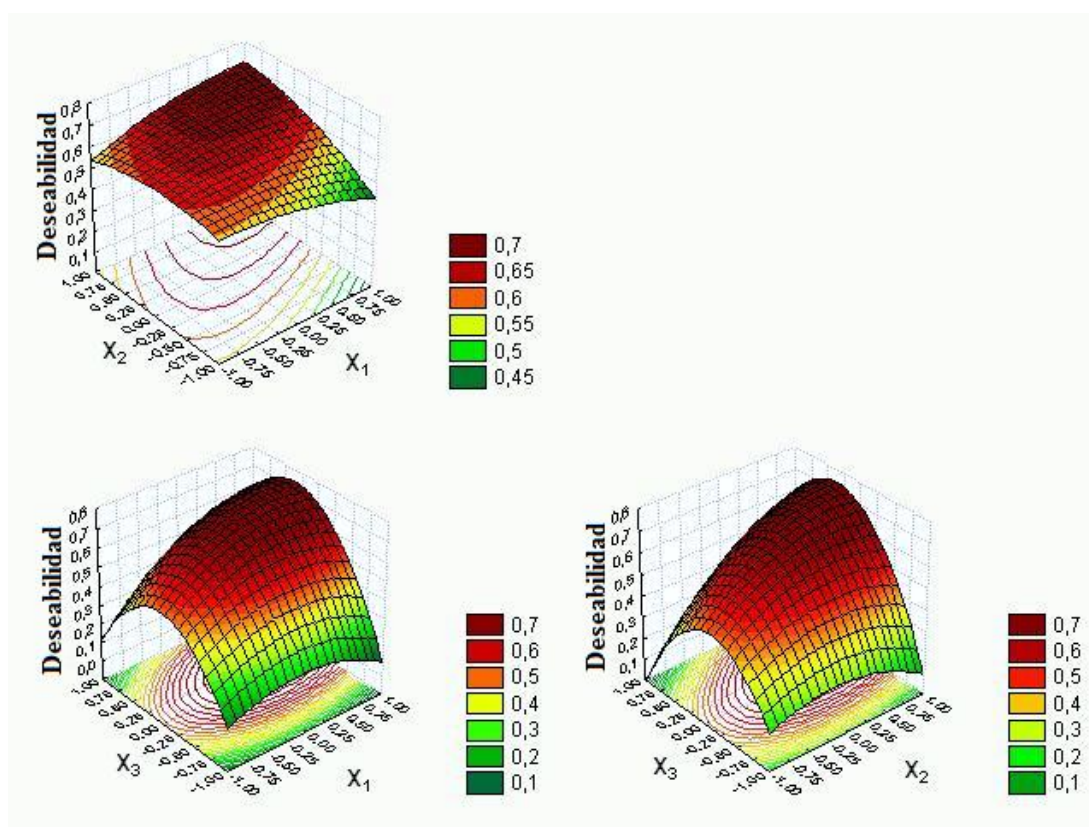


Fig. 4.10: Superficies de respuesta de la función Deseabilidad. Variación con: (a) el tiempo de ultrasonido y la concentración de extracto de granada, (b) el tiempo de ultrasonido y la concentración de geraniol y (c) la concentración de geraniol y la concentración de extracto de granada sobre la función deseabilidad. Las variables restantes se encuentran constantes en el nivel medio. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de geraniol.

Para poder evaluar la confiabilidad de los modelos en predecir las respuestas óptimas, se realizó una serie de experimentos para validar los niveles óptimos predichos

por la optimización simultánea. La Tabla 4.10 muestra las variables respuesta del jugo de frutilla tratado en estas condiciones óptimas. Las respuestas para el jugo sin tratar al día 0 (control fresco) y al final del almacenamiento refrigerado (día 14) también se muestran en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10: Resultados de la validación del tratamiento óptimo 2

Tiempo (días)	Muestra	Respuestas experimentales					
		<i>HYL</i> (log UFC/mL)	<i>PSI</i> (log UFC/mL)	<i>DPPH</i> (% de inhibición)	<i>CPT</i> (mg EAG/100mL)	<i>Olor cítrico</i>	<i>Olor extraño</i>
0	<i>Control</i>	5,40 ± 0,12	5,38 ± 0,15	64,39 ± 0,64	130,54 ± 4,61	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,13
14	<i>Control</i>	8,33 ± 0,11	8,30 ± 0,12	58,20 ± 2,24	276,71 ± 6,61	0,00 ± 0,00	4,65 ± 0,12
	<i>OPT2</i>	4,69 ± 0,11	4,60 ± 0,10	74,45 ± 2,78	313,45 ± 23,29	2,07 ± 0,20	2,53 ± 0,26

Los datos se muestran como el valor medio ± error estándar. OPT2: tratamiento óptimo 2 (30 min de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,15 µL/mL de geraniol).

Los puntajes encontrados para *olor cítrico* y *olor extraño* en la validación estuvieron en concordancia con los valores predichos por el modelo. Sin embargo, cabe destacar que los valores predichos para HYL, PSI, DPPH, CPT fueron menores que aquellos obtenidos en la validación. Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que las muestras de frutilla utilizadas en la validación presentaron una carga microbiana inicial mayor, que creció durante el almacenamiento alcanzando valores más elevados al día 14. Con respecto a la capacidad antioxidante y al CPT, hay una notable variabilidad en la concentración de compuestos fenólicos presentes en frutilla, incluso en muestras de la misma variedad y mismo día de cosecha (Hossain y col., 2016), y se puede observar en la Tabla 4.10 que las frutillas utilizadas en la validación tenían una mayor concentración de compuestos antioxidantes, que resultó en un mayor porcentaje de inhibición de DPPH y un mayor CPT al día 14. En ambos casos (Tabla 4.7 y Tabla 4.10) se puede observar que el CPT se incrementa a través del almacenamiento en la muestra sin tratar. Este fenómeno fue previamente observado por Puttongsiri y Haruenkit (2010) cuando estudiaban cambios en CPT, actividad antioxidante y ácido ascórbico en jugo de mandarina a través de su almacenamiento a diferentes temperaturas. Estos autores concluyeron que estos compuestos se incrementan durante su almacenamiento debido a cambios que causan la senescencia y descomposición de la estructura celular y entonces, provocan la liberación de ácidos fenólicos y aminoácidos libres.

A pesar de que las frutillas utilizadas en la validación tuvieran diferente composición y carga microbiana inicial que aquellas en el experimento de MSR, las conclusiones generales no cambiaron. El tratamiento óptimo redujo significativamente ambos HYL y PSI comparado con el control al día 14 (reducciones de 3,64 y 3,70 log, respectivamente). Además, el tratamiento óptimo logró incrementos similares en la capacidad antioxidante y el CPT comparado con el control al día 14 (16,25% y 13,28%, respectivamente) que aquellos predichos por la optimización simultánea (10,72 y 33,28%, respectivamente).

3.2. Efecto de los tratamientos óptimos sobre parámetros de calidad de jugo de frutilla durante el almacenamiento

3.2.1. Efecto de los tratamientos óptimos sobre la calidad microbiológica de jugo de frutilla durante el almacenamiento

El efecto de los tratamientos óptimos sobre la microflora nativa de jugo de frutilla se muestra en la Fig. 4.11. A lo largo del almacenamiento refrigerado las muestras mostraron un comportamiento similar en ambas poblaciones estudiadas. Las poblaciones iniciales de HYL y PSI en el control fueron de 5,40 y 5,38 log UFC/mL, respectivamente, e incrementaron a través del tiempo hasta alcanzar recuentos de 8,33 y 8,30 log UFC/mL a los 14 días de almacenamiento.

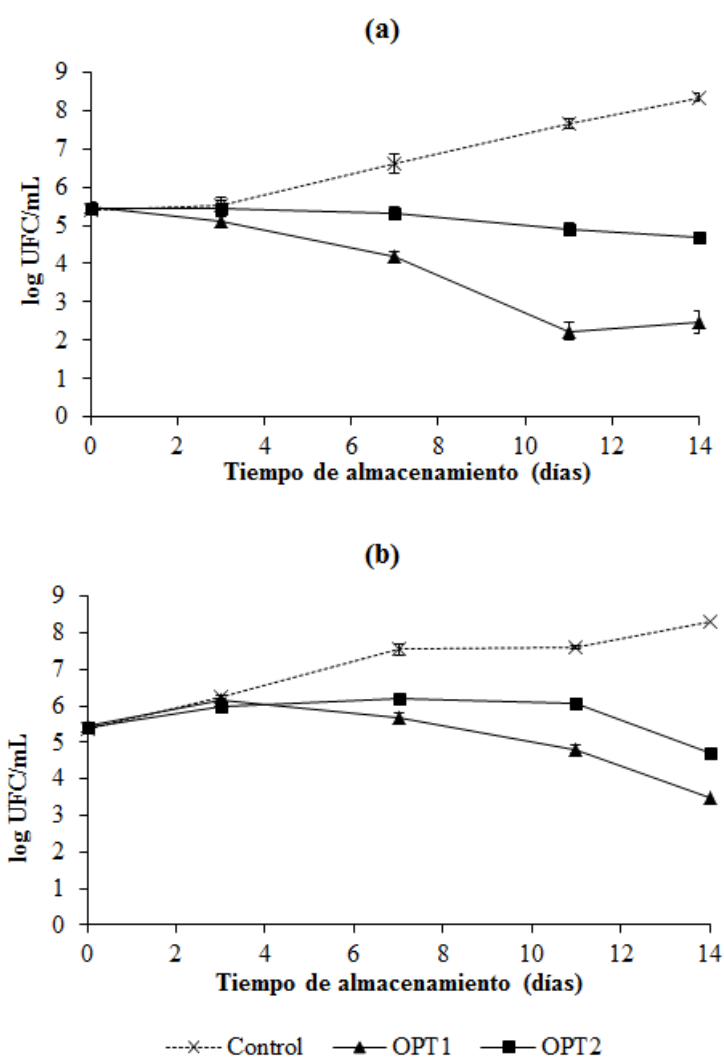


Fig. 4.11: Evolución de microflora nativa en jugo de frutilla tratado con los tratamientos óptimos durante el almacenamiento refrigerado a 5°C: (a) hongos y levaduras; (b) bacterias psicrófilas. Las barras indican errores estándar. OPT1: tratamiento óptimo 1 (7,5 min de tratamiento de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,9375 mg/mL de vainillina); OPT2: tratamiento óptimo 2 (30 min de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,15 µL/mL de geraniol).

Hasta el día 3, no se observaron diferencias significativas entre el control y los óptimos 1 y 2; sin embargo, a partir del séptimo día de almacenamiento se comienzan a observar los efectos de los tratamientos sobre la calidad microbiológica del jugo. Por un lado, el OPT1 mostró un importante descenso a través del tiempo en los recuentos de hongos y levaduras, como así también en los recuentos de bacterias psicrófilas. El tratamiento OPT1 incrementó su efectividad antimicrobiana a lo largo del almacenamiento, llegando a reducir las poblaciones hasta valores de 2,48 log en HYL, y 3,48 log en PSI al día 14 (reducciones de aproximadamente 3 y 2 log, respectivamente, con respecto a los valores iniciales). El OPT2 también logró reducciones significativas con respecto al control a través del tiempo, aunque su efectividad fue menor que la del OPT1, con recuentos al día 14 de 4,69 y 4,70 log en HYL y PSI, respectivamente (reducciones menores a 1 ciclo logarítmico con respecto a los valores iniciales, mostrando un efecto más fungistático y bacteriostático a través del tiempo).

Considerando 10^7 UFC/mL como el límite máximo permitido para todas las poblaciones al momento de expiración del producto (BOE, 2001), los tratamientos óptimos desde el punto de vista microbiológico pudieron extender la vida útil del jugo de frutilla sin pasteurizar (> 14 d) comparado con el control sin tratar (< 7 d).

La combinación de las diferentes barreras aplicadas logró ser muy efectiva, si bien no mostró efectos inmediatos a la aplicación ($t = 0$ d), sí logró en el caso del OPT1 una importante reducción de las poblaciones microbianas estudiadas a lo largo del almacenamiento, y en el caso del OPT2, mantener la carga microbiana durante más de 7 días para alcanzar una reducción hacia el final de la segunda semana de almacenamiento. De las 3 barreras seleccionadas en la Combinación 1 y 2, las concentraciones de vainillina y de geraniol fueron las de mayor impacto sobre la calidad microbiológica del jugo de frutilla, respectivamente, de acuerdo al análisis de los modelos previamente realizado. Si bien los tiempos de ultrasonido hallados para cada tratamiento óptimo fueron diferentes y algunas interacciones resultaron significativas en los modelos correspondientes, la concentración de V y G podría ser la más influyente sobre los resultados microbiológicos encontrados, donde se observa que el tratamiento OPT1 fue más efectivo en inhibir el crecimiento de la microflora nativa de jugo de frutilla que el OPT2.

3.2.2. Efecto de los tratamientos óptimos sobre la calidad nutricional de jugo de frutilla durante el almacenamiento

La Fig. 4.12 muestra la evolución de la capacidad secuestrante de radical DPPH (% de inhibición), el contenido de polifenoles totales (CPT) y la retención de ácido ascórbico (AA) a través del almacenamiento.

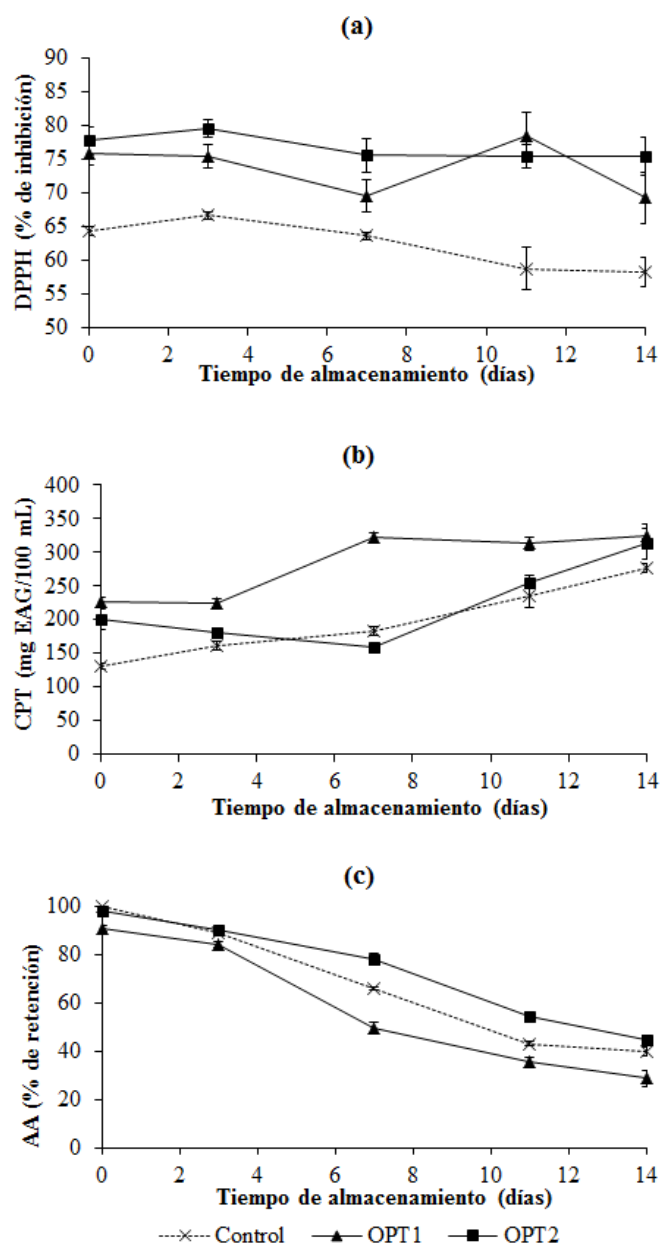


Fig. 4.12: Evolución de parámetros de calidad nutricional en jugo de frutilla tratado con los tratamientos óptimos durante el almacenamiento refrigerado a 5°C: (a) inhibición del radical DPPH; (b) contenido de polifenoles totales; (c) retención de ácido ascórbico. Las barras indican errores estándar. OPT1: tratamiento óptimo 1 (7,5 min de tratamiento de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,9375 mg/mL de vainillina); OPT2: tratamiento óptimo 2 (30 min de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,15 µL/mL de geraniol).

El valor inicial de inhibición de DPPH en la muestra sin tratar fue de 64,39%. Al día 0, los jugos de frutilla tratados con OPT1 y OPT2 mostraron un incremento significativo con respecto al control, con valores de 75,91% y 77,74% de inhibición de DPPH, respectivamente. A lo largo del almacenamiento, el porcentaje de inhibición de DPPH en la muestra control se mantuvo relativamente constante, con una leve disminución hacia el final del almacenamiento llegando a un valor de 58,20% al día 14. Las muestras tratadas con OPT1 y OPT2 también mantuvieron sus valores de DPPH durante el almacenamiento, con una inhibición del DPPH al día 14 de 69,27% y 75,45%, respectivamente. En este caso, basados en los resultados hallados en los Capítulos 2 y 3, y en el análisis de los modelos de las diferentes combinaciones de barreras, la concentración de extracto de granada y el tiempo de ultrasonido fueron las tecnologías de preservación de mayor impacto sobre la capacidad antioxidante del jugo de frutilla. La concentración de extracto de granada en ambos tratamientos resultó de 360 µg/mL, sin embargo el tiempo de US hallado fue diferente en cada caso: 7,5 min en OPT1 y 30 min en OPT2. Este resultado podría justificar el aumento de la inhibición del radical DPPH en los jugos tratados con respecto al control, y particularmente, el aumento de la capacidad antioxidante del OPT2 con respecto al OPT1. Es importante destacar, que en el Capítulo 2, la vainillina empleada en altas concentraciones (2,5 y 5,0 mg/mL) provocó una disminución en la inhibición de DPPH con respecto al control durante el almacenamiento. Los efectos negativos de emplear altas concentraciones de V sobre el DPPH del jugo de frutilla almacenado se volvieron a corroborar mediante el modelo descripto previamente en este Capítulo (ver Ec. 4.9). A través de la optimización simultánea se logró mediante la combinación de barreras, un tratamiento que inhiba el crecimiento microbiano y a la vez que incremente la capacidad antioxidante del producto. Cabe destacar que el geraniol también demostró un efecto negativo sobre la inhibición de DPPH, sin embargo los niveles óptimos hallados mediante MSR, permitieron reducir la concentración de geraniol hasta un valor de 0,15 µL/mL, que al ser combinado con altos tiempos de US y concentración de EG, logró un significativo aumento en la capacidad antioxidante del jugo comparado con el control.

Con respecto al CPT, su valor inicial en la muestra sin tratar fue de 130,54 mg EAG/100 mL, aumentando a lo largo del tiempo de almacenamiento hasta valores medios de 276,71 mg EAG/100 mL al día 14. Este comportamiento, previamente observado en los Capítulos 2 y 3 de la presente Tesis, podría ser atribuido a los cambios

que causan la senescencia y la descomposición de la estructura celular y por lo tanto, la liberación de ácido fenólicos libres y aminoácidos libres, contribuyendo al incremento en polifenoles totales (Puttongsiri y Haruenkit, 2010). A día 0, los tratamientos (OPT1 y OPT2) mostraron un aumento significativo en el CPT de los jugos de frutilla con respecto al control, con valores de CPT de 227,22 y 199,96 mg EAG/100 mL, respectivamente. Durante el almacenamiento, el OPT1 mostró un CPT significativamente superior al control, alcanzando al día 7 un valor de 321,91 mg EAG/100 mL, que se mantuvo relativamente constante hasta el día 14 (325,59 mg EAG/100 mL). Esto era de esperarse, debido al contenido de vainillina en el OPT1, que por ser este un compuesto fenólico implicó un aumento en el CPT del jugo. A partir del día 7, se observó un significativo incremento en el CPT del jugo tratado con OPT2 con respecto al tiempo. La interacción del geraniol con las membranas celulares también podría implicar la liberación de compuestos fenólicos, alcanzando al día 14 valores de CPT 313,45 mg EAG/100 mL, respectivamente, sin diferencias con el OPT1.

Con respecto al AA, el jugo de frutilla fresco sin tratar presentó un contenido de 45,21 mg de AA/100 mL. A lo largo del almacenamiento, se observó una disminución en el contenido de AA, alcanzando al día 14 una retención de aproximadamente el 40%. Con respecto a los tratamientos, inmediatamente después de la aplicación de los óptimos (día 0), se observó una disminución significativa del contenido de AA en la muestra OPT1 con respecto al control, con un 90,43% de retención de AA, mientras que el jugo tratado con OPT2 obtuvo una retención de AA del 97,95%. Al día 3 se observó una disminución de la retención de ascórbico en el jugo sin tratar, llegando al 89,03%, sin diferencias con OPT2, que mostró una retención del 89,73%; en cambio, el OPT1 fue significativamente menor con un valor de 83,84%. A partir del día 7, se observan diferencias significativas entre las muestras tratadas con los óptimos y el control. Por un lado, el OPT1 presentó una retención de ascórbico del 49,55%, significativamente inferior al control (65,73%). El OPT2 en cambio, logró una retención superior al jugo sin tratar (78,05%). Hacia el final del almacenamiento (día 14), el control y la muestra tratada con OPT2 tuvieron una retención de entre el 40 y el 45%, sin diferencias significativas; mientras que el OPT1 alcanzó un valor de 28,53%. La retención de AA fue una de las variables respuesta a maximizar en la Combinación de barreras 1; sin embargo, el tratamiento OPT1 obtenido no logró aumentar la retención de ácido ascórbico con respecto al control. Esto se debe a que dicho tratamiento es una solución

de compromiso teniendo en cuenta la calidad integral del producto. Teniendo en cuenta únicamente la optimización individual de AA, como se mencionó anteriormente en el análisis de los modelos individuales, la retención de AA a día 14 hubiera sido del 63%.

Los radicales DPPH son secuestrados por antioxidantes presentes en las muestras. En los jugos de frutas, la actividad secuestrante del radical está dada principalmente por los compuestos polifenólicos y la vitamina C (Aadil y col., 2013; Khandpur y Gogate, 2015a). De esta manera, el aumento del CPT a través del almacenamiento se contrarresta con la pérdida de ácido ascórbico, provocando la estabilidad de la actividad antioxidante en el tiempo.

3.2.3. Efecto de los tratamientos óptimos sobre la calidad sensorial de jugo de frutilla durante el almacenamiento

Los resultados de la evaluación sensorial de los jugos de frutilla tratados con los parámetros óptimos hallados por MSR se muestran en la Fig. 4.13. Al día 0, no se encontraron diferencias significativas en la *Apariencia Visual General* (AVG) de las muestras tratadas con respecto al control, con un valor de 5 (excelente), concluyendo que la aplicación de ninguno de los tratamientos de barrera óptimos tuvo efectos iniciales en la apariencia del producto. Contrario a este resultado, los atributos evaluados de olor fueron significativamente afectados ($p < 0,05$) por ambos tratamientos, ya que se obtuvieron puntajes superiores en comparación con la muestra sin tratar. En este sentido, la muestra tratada con OPT1, obtuvo un puntaje medio de *olor a vainilla* de 1,16, y de *olor extraño* de 0,73; mientras que la muestra tratada con OPT2 obtuvo puntajes de 2,84 y 2,36 en los atributos de *olor cítrico* y *olor extraño*, respectivamente. Los tratamientos de extracto de granada y de ultrasonido, evaluados individualmente en los Capítulos 2 y 3, no mostraron inducir olores extraños en el jugo de frutilla. Luego, la vainillina y el geraniol podrían ser los principales factores afectando la calidad sensorial del jugo de frutilla en OPT1 y OPT2, respectivamente (ver Capítulo 2, inciso 3.6). Con respecto a los atributos de sabor, no hubo diferencias significativas entre el control y los jugos tratados en los puntajes de *sabor dulce*. El *sabor ácido* fue levemente afectado por los tratamientos, con puntajes superiores para las muestras tratadas con OPT1 y OPT2, respecto al control. No hubo diferencias significativas en el *sabor amargo* entre la muestra control y la tratada con OPT1,

mientras que el tratamiento OPT2 aumentó significativamente la percepción del amargor.

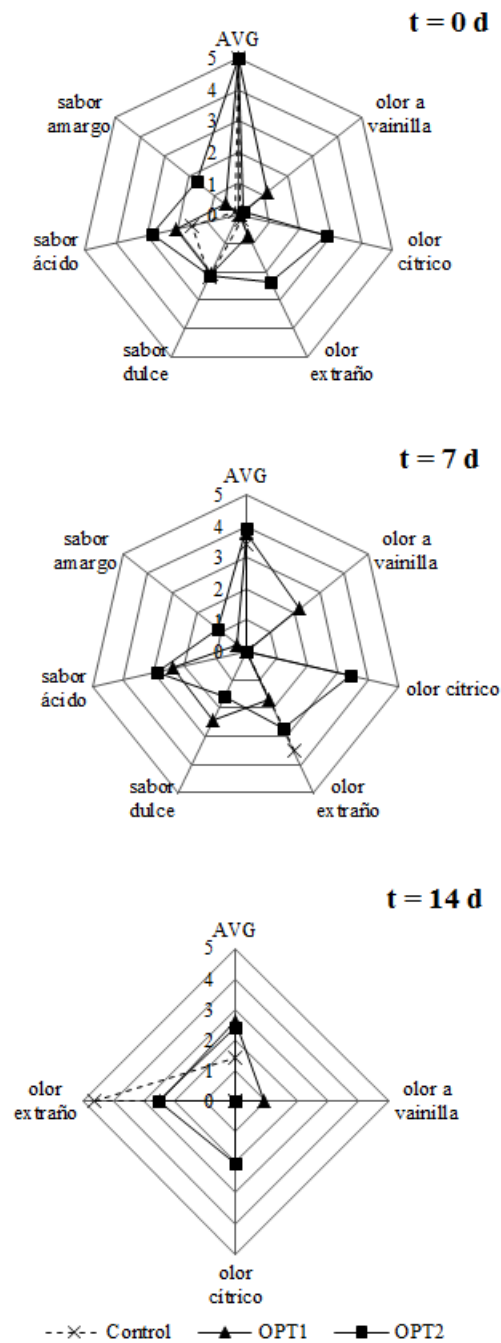


Fig. 4.13: Efecto de los tratamientos óptimos sobre las características sensoriales de jugo de frutilla almacenado a 5°C. OPT1: tratamiento óptimo 1 (7,5 min de tratamiento de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,9375 mg/mL de vainillina); OPT2: tratamiento óptimo 2 (30 min de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,15 µL/mL de geraniol).

Al día 7, las muestras presentaron valores de AVG superiores al día 0, pero sin diferencias significativas entre los jugos tratados y el control. El *olor extraño* aumentó

significativamente en la muestra control comparado con las muestras tratadas, obteniendo un valor de 3,53, posiblemente por el crecimiento microbiano. El *olor a vainilla* en la muestra OPT1 y el *olor cítrico* en OPT2 se vieron incrementados con respecto al día 0. Debido a la importante carga microbiana en la muestra control, al día 7 no se llevaron a cabo las evaluaciones de atributos de sabor en el jugo sin tratar. En las muestras tratadas, los atributos *sabor dulce*, *ácido* y *amargo* obtuvieron puntajes similares a los hallados al día 0.

El tiempo de almacenamiento mostró un efecto importante en los atributos de AVG y *olor extraño*, ya que se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos en los días 0, 7 y 14, indicando que los cambios durante el almacenamiento fueron percibidos por los panelistas. La muestra sin tratar obtuvo valores de AVG que disminuyeron desde 5 (día 0) hasta 0,42 (día 14), mientras que los tratamientos OPT1 y OPT2 llegaron a valores de 1,60 y 1,40, respectivamente. El detrimento en la apariencia visual de las muestras tratadas y sin tratar, puede deberse al deterioro enzimático de los jugos, que puede provocar cambios en la textura de la pulpa y en la fluidez de los mismos. Adicionalmente, el crecimiento microbiano en la muestra control durante el almacenamiento podría ser un factor importante en el descenso del puntaje de AVG en el jugo sin tratar. El *olor extraño* en la muestra sin tratar incrementó desde 0,19 hasta 4,75 al final del almacenamiento, mientras que la muestra OPT1 llegó a un puntaje de 2,50 y OPT2 a un valor medio de 2,53. Dados los altos puntajes obtenidos en los atributos de AVG y de *olor extraño* en todas las muestras, los atributos de sabor no fueron evaluados al día 14.

3.3. Efecto de los tratamientos óptimos sobre el control de *E. coli* O157:H7 inoculado en jugo de frutilla

Para poder evaluar la efectividad de los tratamientos óptimos propuestos sobre la inactivación de *E. coli* O157:H7 en jugo de frutilla, un lote de muestras fue inoculado con el patógeno previo a la aplicación de los tratamientos correspondientes. La Tabla 4.11 muestra el efecto de los tratamientos óptimos sobre la supervivencia de *E. coli* a través del almacenamiento refrigerado a 5°C.

A lo largo del almacenamiento se observaron reducciones significativas ($p < 0,05$) en los recuentos del patógeno inoculado en las muestras sin tratar, reduciendo sus

recuentos en 1,85 log durante 14 días. Estas reducciones de *E. coli* a través del tiempo pueden deberse a la suma de varios efectos tales como la temperatura de refrigeración (5°C), el pH del jugo de frutilla y la microflora competitiva. A pesar de la acidez inherente de los jugos de fruta, que es letal para la mayoría de las especies bacterianas que pueden contaminar dichos productos, han ocurrido varios brotes de infecciones causados por *Escherichia coli* O157:H7 debido al consumo de jugos de fruta sin pasteurizar (Miller y Keller, 2005). En los brotes epidemiológicos involucrando jugos de fruta, *E. coli* O157:H7 y otras cepas de *E. coli* enterotoxigénicas fueron identificados como los agentes causantes más comunes, seguidos de *Salmonella* spp. (Vojdani y col., 2008).

Tabla 4.11: Supervivencia de *E. coli* O157:H7 (log UFC/mL) inoculado en jugo de frutilla tratado con los tratamientos óptimos durante el almacenamiento refrigerado a 5°C

Tratamientos	Tiempo de almacenamiento (días)				
	0	3	7	11	14
Control	4,84 ± 0,03 ^{abA}	4,59 ± 0,04 ^{aA}	4,00 ± 0,04 ^{aB}	3,47 ± 0,07 ^{aC}	2,99 ± 0,16 ^{aD}
OPT1	5,04 ± 0,09 ^{aA}	4,19 ± 0,08 ^{bB}	2,95 ± 0,09 ^{cC}	< 2,00 ^{cD}	< 2,00 ^{bD}
OPT2	4,65 ± 0,05 ^{bA}	4,18 ± 0,06 ^{bB}	3,22 ± 0,04 ^{bC}	2,40 ± 0,16 ^{bD}	< 2,00 ^{bE}

Los datos se expresan como valores medios ± errores estándar. Valores con diferentes letras minúsculas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos. Valores con diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al tiempo de almacenamiento. OPT1: tratamiento óptimo 1 (7,5 min de tratamiento de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,9375 mg/mL de vainillina); OPT2: tratamiento óptimo 2 (30 min de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,15 µL/mL de geraniol).

Inmediatamente después de la aplicación de los tratamientos (día 0), no hubo un efecto inicial significativo de las combinaciones óptimas sobre los recuentos de *E. coli* observados comparados con el control. Sin embargo, las muestras tratadas mostraron una reducción de los recuentos del patógeno a través del tiempo de almacenamiento, incluso mayor a la observada para el jugo sin tratar, alcanzando valores por debajo del límite de detección (< 2,00 log) a los 11 días en el caso de OPT1 y a los 14 días en el caso de OPT2. En las muestras tratadas, además de estos factores, la disminución de *E. coli* fue mayor debido al efecto propio de los tratamientos combinados de biopreservantes y ultrasonido. En este caso, además de los factores presentes mencionados en el jugo sin tratar (bajo pH, temperatura de refrigeración y microflora

competitiva), la disminución de *E. coli* fue mayor debido al efecto propio de los tratamientos combinados de biopreservantes y ultrasonido.

Comparando con los valores de MCI hallados *in vitro* en el Capítulo 1 frente a *E. coli* (2,5 mg/mL de V y 0,6 µL/mL de G), la concentración de V hallada en el tratamiento OPT1 fue de 3/8 de MCI, mientras que la de geraniol hallada en el OPT2 fue de 1/4 de MCI. Es decir, combinando barreras, se lograron tratamientos óptimos con concentraciones de V y G menores a la MCI, que si bien no mostraron un efecto inicial sobre el *E. coli* inoculado en jugo de frutilla, sí pudieron disminuir sus recuentos a lo largo del almacenamiento con respecto al control.

4. CONCLUSIONES

Este Capítulo se centró en la optimización de dos combinaciones de barreras, previamente estudiadas de manera individual en los Capítulos 2 y 3. Para esto se propusieron dos combinaciones de barreras diferentes, Combinación de barreras 1: US+EG+V; Combinación de barreras 2: US+EG+G, evaluando cada tecnología de preservación en diferentes intensidades. La metodología de superficie de respuesta permitió ajustar modelos para diferentes parámetros de calidad de jugo de frutilla en función de estas variables para optimizar así los niveles necesarios de cada barrera en cada una de las combinaciones propuestas.

En general, en la Combinación de barreras 1 se observó que la concentración de vainillina fue el principal factor afectando la inhibición de la microflora nativa estudiada del jugo de frutilla. Por otro lado, la capacidad antioxidante, medida como la capacidad secuestrante del radical DPPH fue afectada principalmente por el tratamiento de ultrasonido y por la vainillina, si bien el extracto de granada también logró afectar la capacidad antioxidante del jugo, aunque en menor medida que los otros factores. El extracto de granada también fue significativo en la retención de ácido ascórbico, mientras que la vainillina produjo un efecto contrario. La interacción entre US y EG, y entre US y V disminuyó la retención de AA en el jugo.

En la Combinación de barreras 2, el geraniol afectó significativamente los recuentos microbianos reduciendo tanto bacterias psicrófilas como hongos y levaduras; sin embargo, su fuerte aroma y sabor, afectaron la calidad sensorial del jugo. Por otro

lado, la capacidad antioxidante fue influenciada principalmente por el extracto de granada, que debido a su composición, logró mejorar la inhibición de DPPH y el contenido de polifenoles totales. El tratamiento de US resultó significativo en la reducción de bacterias psicrófilas y en el incremento de la capacidad secuestrante de DPPH. Además la interacción entre US y geraniol, y la interacción entre US y extracto de granada resultaron significativas en reducir las bacterias PSI y en aumentar el CPT, respectivamente; implicando que los tratamientos de ultrasonido mejoran la eficacia de los componentes naturales en estas respuestas diferentes.

Estos resultados mostraron la necesidad de combinar las diferentes barreras propuestas para hallar un tratamiento óptimo que permitiera al mismo tiempo mejorar la calidad desde el punto de vista microbiológico, nutricional y sensorial. De esta manera, la MSR junto con la función Deseabilidad permitió encontrar los niveles óptimos de cada barrera en las dos combinaciones propuestas para mejorar la calidad global de jugo de frutilla. Estos tratamientos óptimos fueron: 7,5 minutos de tratamiento de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,9375 mg/mL de vainillina (OPT1) y 30 min de tratamiento de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,15 µL/mL de geraniol (OPT2). Este enfoque estadístico fue muy útil para alcanzar un compromiso entre las diferentes respuestas estudiadas, reduciendo la carga microbiana, y a la vez, maximizando las propiedades nutricionales y minimizando el impacto en la calidad sensorial en el jugo de frutilla.

Una vez hallados los tratamientos óptimos, éstos fueron aplicados en jugo de frutilla para evaluar su estabilidad durante el almacenamiento refrigerado. En el caso del jugo tratado con OPT1, su carga microbiana disminuyó luego de la primera semana de almacenamiento, alcanzando recuentos significativamente inferiores a los de la muestra control. El tratamiento OPT2 logró un efecto más bacteriostático y fungistático, manteniendo los recuentos en HYL y PSI similares a los iniciales. Con respecto a las características nutricionales, el tratamiento OPT1 logró un aumento significativo en la inhibición del radical DPPH y en el contenido de polifenoles totales con respecto al control; sin embargo, su retención de AA se vio afectada por el tratamiento, con valores significativamente menores a los de la muestra sin tratar. El tratamiento OPT2 en cambio, aumentó la capacidad secuestrante de DPPH de la muestra incluso en mayor medida que el OPT1, y también logró un aumento en la retención de ácido ascórbico con respecto al control. El CPT en la muestra de jugo tratada con OPT2 fue similar al de

la muestra control durante todo el almacenamiento. Gracias a la combinación de barreras y a la optimización simultánea mediante la función deseabilidad, las concentraciones de vainillina y de geraniol pudieron ser disminuidas de manera tal que afectaran las características sensoriales del producto en el menor grado posible. Sin embargo, al día 14 de almacenamiento la *apariencia visual general* del producto se vio deteriorada incluso en las muestras tratadas (aunque en menor medida que en el control) probablemente debido a la actividad enzimática del jugo de frutilla.

Los resultados presentados en este Capítulo, demuestran la utilidad de la metodología de superficie de respuesta como una herramienta estadística poderosa para la optimización de diferentes combinaciones de barreras. Por otro lado, la aplicación de la función Deseabilidad fue necesaria para la optimización simultánea de las variables respuesta seleccionadas, que optimizadas individualmente llevarían a resultados muchas veces contrapuestos.

Desde el punto de vista microbiológico, y considerando 10^7 UFC/mL como el límite máximo permitido para todas las poblaciones al momento de expiración del producto, la muestra control tuvo una vida útil menor a los 7 días, mientras que los jugos tratados tanto con OPT1 como con OPT2 tuvieron recuentos por debajo de dicho límite incluso al día 14 de almacenamiento, evidenciando una significativa prolongación de la vida útil microbiológica. Obteniendo un producto estable desde el punto de vista microbiológico, su calidad sensorial se vuelve primordial para determinar la vida útil del producto y su posible aceptabilidad. En cuanto a la inhibición del *E. coli* inoculado, los recuentos del patógeno no fueron detectados (< 2 log) en las muestras tratadas con las combinaciones óptimas a día 14.

La combinación de barreras permitió hallar dos tratamientos óptimos que lograron estabilizar microbiológicamente el jugo de frutilla sin pasteurizar por 14 días, aumentando incluso la capacidad antioxidante del producto, con una vida útil limitada fundamentalmente por sus atributos sensoriales.

CAPÍTULO 5

Recubrimientos comestibles y tratamientos de ultrasonido en frutilla de IV gama

RESUMEN DEL CAPÍTULO

En el presente Capítulo se evaluó la aplicación de diferentes tecnologías de preservación sobre la calidad microbiológica y sensorial de frutilla cortada. En primer lugar, se evaluaron diferentes recubrimientos de gelano (Gel) y de quitosano (Quit). A estos recubrimientos se le incorporaron los biopreservantes estudiados previamente en los Capítulos 1 y 2 de esta Tesis, para obtener diferentes recubrimientos compuestos. A los recubrimientos de gelano se adicionaron 1,2 y 2,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de geraniol (Gel+G1 y Gel+G2, respectivamente), y 360 y 720 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto de granada (Gel+EG1 y Gel+EG2, respectivamente). A los recubrimientos de quitosano se adicionaron 5 y 10 mg/mL de vainillina (Quit+V1 y Quit+V2, respectivamente), y 1,2 y 2,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de geraniol (Quit+G1 y Quit+G2, respectivamente). Por otro lado, se evaluaron tratamientos de ultrasonido a 40 kHz durante 10 y 30 min. Las frutillas cortadas y tratadas fueron almacenadas durante 7 días bajo refrigeración (5°C) para evaluar la evolución de bacterias mesófilas, hongos y levaduras y bacterias psicrófilas. Además, inmediatamente luego de aplicados los tratamientos (día 0) y a los 7 días de almacenamiento, se realizó una evaluación sensorial de las muestras.

Los recubrimientos de gelano sin agregado de biopreservantes no tuvieron efectos significativos sobre el control de la microflora de frutilla cortada. La incorporación de extracto de granada en los recubrimientos de gelano tampoco produjo una disminución de los recuentos microbianos del producto. En cambio, la incorporación de geraniol en ambas concentraciones evaluadas redujo significativamente los recuentos de bacterias mesófilas, psicrófilas y hongos y levaduras, comparado con la muestra control. Por otro lado, los recubrimientos de quitosano con y sin biopreservantes fueron efectivos reduciendo la carga inicial de la microflora nativa presente en las frutillas cortadas. A lo largo del almacenamiento no se observó una disminución de las bacterias mesófilas, pero sí se redujeron las psicrófilas y los hongos y levaduras con respecto al control. El agregado de los biopreservantes, en este caso, no mostró una mejora significativa sobre el poder antimicrobiano de los recubrimientos de Quit. Finalmente, los tratamientos de ultrasonido evaluados sobre frutilla cortada mostraron una leve, pero significativa, inhibición de la microflora nativa del producto. Sin embargo, la vida útil del producto desde el punto de vista microbiológico no se logró extender, ya que hacia el final del almacenamiento los

recuentos de HYL en las muestras tratadas superaban el límite establecido de 7 log UFC/g. En todos los casos, la textura de las frutillas se vio afectada con el tiempo de almacenamiento, y los tratamientos evaluados no fueron capaces de mejorar este atributo, limitando así la vida útil del producto.

Una de las alternativas para seguir investigando sería la evaluación de otros parámetros tales como la formulación de los recubrimientos, o la frecuencia y potencia del ultrasonido, o nuevas tecnologías (simples y combinadas) con el fin de extender la vida útil de frutillas de IV gama.

1. INTRODUCCIÓN

Los productos de IV gama o mínimamente procesados (MP) surgen como una alternativa para brindarle al consumidor un producto conveniente, con características sensoriales similares a las del producto fresco. Sin embargo, debido a las operaciones unitarias tales como el pelado y el corte, las frutas y hortalizas de IV gama son altamente perecederas, susceptibles a deterioro físico, enzimático y microbiológico, poniendo en riesgo las características organolépticas del producto y la salud del consumidor.

Actualmente, se investigan diferentes tecnologías para la preservación de frutas y verduras de IV gama. Entre ellas, el uso de recubrimientos comestibles (RC) es una potencial alternativa para extender la vida útil de los productos MP (Alvarez y col., 2013). Los RC forman una barrera semipermeable a los gases y vapores y pueden mantener o mejorar la calidad, seguridad y estabilidad de los productos recubiertos. Diferentes recubrimientos comestibles han sido aplicados en productos de IV gama (Azarakhsh, Osman, Ghazali, Tan, y Mohd Adzahan, 2013; Rossi Marquez y col., 2017; Sanchís y col., 2016) con buenos resultados en sus características de calidad.

Los RC más utilizados en el área de alimentos son aquellos cuyas matrices se basan en polisacáridos y proteínas. En particular, en este Capítulo se evaluaron RC sobre frutilla cortada basados en dos polisacáridos: goma gellan y quitosano. La goma gellan o gelano (Gel), está formada por un polisacárido de elevado peso molecular. Este polisacárido de origen microbiano, es producido por la fermentación de un hidrato de carbono en cultivo puro de cepas de *Sphingomonas elodea* (anteriormente conocida como *Pseudomonas elodea*), purificada por recuperación con alcohol isopropílico, desecada y triturada. La unidad repetitiva de este polisacárido consiste en un tetrasacárido formado por dos residuos de D-glucosa, unidos a los residuos de L-ramnosa y ácido D-glucurónico (Fig. 5.1); estas unidades tetrasacáridas se encuentran unidas entre sí por enlaces glicosídicos $\alpha(1-3)$ para formar el polisacárido en cuestión. El gelano es soluble en agua, e insoluble en etanol; posee propiedades coloidales y gelificantes únicas, que le otorgan buena capacidad para formar películas y recubrimientos.

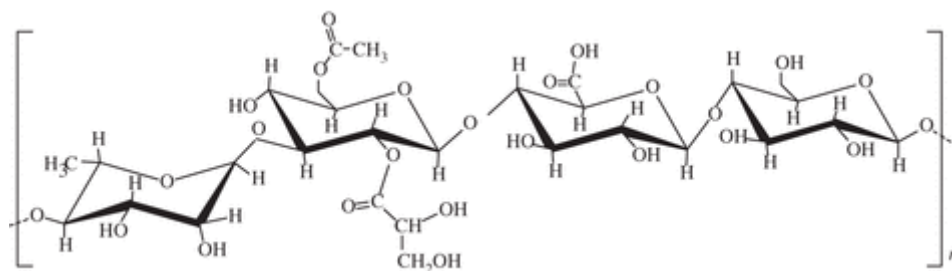


Fig. 5.1: Estructura química del gelano

También, entre los polisacáridos, el quitosano (Quit) y sus derivados han demostrado poseer gran cantidad de aplicaciones enfocadas a sistemas de películas y recubrimientos activos para alimentos. El Quit tiene un vasto potencial en aplicaciones en la industria alimenticia debido a sus particulares propiedades fisicoquímicas, tales como su biodegradabilidad, biocompatibilidad y especialmente sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas (Khokhlova, Gallyamov, y Khokhlov, 2012). Comercialmente, el quitosano se produce mediante la desacetilación de la quitina, elemento estructural presente en el exoesqueleto de los crustáceos (cangrejos, gambas, langostas, entre otros), así como también presente en insectos y en las paredes celulares de hongos. La quitina es un biopolímero lineal, formado por cadenas de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces $\beta(1-4)$, altamente insoluble en agua, que se disuelve en ácidos concentrados y presenta baja reactividad (Mármol y col., 2011). El quitosano es la forma N-desacetilada de la quitina (Fig. 5.2), y posee mejores propiedades de reactividad y solubilidad. Se ha descrito como un polímero catiónico lineal, biodegradable, de alto peso molecular, de fácil aplicación y ambientalmente amigable. Se disuelve fácilmente en soluciones diluidas de la mayoría de ácidos orgánicos, tales como ácido fórmico, acético, cítrico y láctico, y también en ácidos minerales diluidos, a excepción del ácido sulfúrico. Su grado de desacetilación (GD) varía desde un 60% hasta un 100% y su peso molecular (PM) varía de 50 hasta 2000 kDa, atribuyéndose esta heterogeneidad a la falta de control durante su producción (Mármol y col., 2011).

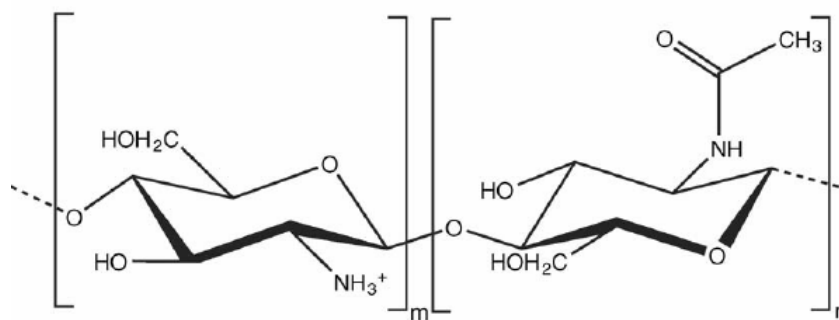


Fig. 5.2: Estructura química del quitosano

Los recubrimientos comestibles también son útiles como soporte o “*carriers*” de diferentes aditivos alimenticios, tales como agentes antipardeamiento, antioxidantes, antimicrobianos, colorantes y saborizantes (Alvarez y col., 2013; Guerreiro, Gago, Faleiro, Miguel, y Antunes, 2015; Oms-Oliu y col., 2008; Rojas-Graü y col., 2007; Rojas-Graü y col., 2009). Se han reportado diferentes estudios donde se han aplicado agentes antimicrobianos en variedad de RC para extender la vida útil de frutas de IV gama. Por ejemplo, Brasil y col. (2012) evaluaron la incorporación de cinamaldehído en películas de quitosano y pectina aplicadas sobre papaya; Salinas-Roca y col. (2016) evaluaron el agregado de ácido málico en películas de alginato en mango, combinado a su vez con pulsos de luz. La incorporación de aceites esenciales en RC de alginato de sodio redujeron el crecimiento microbiano en piñas de IV gama (Nima Azarakhsh, Osman, Ghazali, Tan, y Mohd Adzahan, 2014) y en manzanas cortadas (Rojas-Graü y col., 2007).

Otra tecnología de preservación amigable con el medio ambiente y compatible con las demandas de los consumidores de hoy en día, es el uso de ultrasonido. Los estudios sobre aplicación de ultrasonido en la ciencia y tecnología de alimentos han aumentado en los últimos años, principalmente debido a sus efectos prometedores sobre el procesado y la preservación de alimentos (Brilhante São José y Dantas Vanetti, 2012; Chemat y col., 2011; do Rosário y col., 2017; Ertugay y Başlar, 2014; Freitas y col., 2014). En la preservación de alimentos, el ultrasonido de alta intensidad a bajas frecuencias de entre 20 y 100 kHz, puede facilitar la inactivación de microorganismos (Freitas y col., 2014). Como se explicó en el Capítulo 3, esta inactivación es consecuencia de la cavitación, que implica la formación, el crecimiento y colapso de burbujas, generando energía química y mecánica localizada (Gogate y Kabadı, 2009). La cavitación, además de producir radicales libres por disociación de vapores atrapados

en las burbujas, genera un “*hot spot*” localizado, de alta presión y alta temperatura. Durante este fenómeno también se generan turbulencias y una microcirculación de líquidos de manera localizada. El ultrasonido a diferencia de otras tecnologías utilizadas en la industria alimentaria, tiene la ventaja de que las ondas de sonido se consideran seguras, no tóxicas y amigables con el medio ambiente (Feng y Yang, 2010). Sin embargo, hay resultados contradictorios publicados ya que algunos autores concuerdan en que el tratamiento con ultrasonido tiene baja efectividad antimicrobiana y sólo en condiciones especiales constituye una alternativa útil para los procesos de desinfección (Bilek y Turantaş, 2013).

De esta manera los objetivos planteados en este Capítulo fueron evaluar la aplicación de (a) recubrimientos de gelano y quitosano incorporados con preservantes de origen natural incorporados en las soluciones formadoras de films, y (b) distintos tiempos de ultrasonido sobre la calidad microbiológica y sensorial de frutilla cortada durante el almacenamiento refrigerado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Soluciones formadoras de películas

2.1.1. Materiales

2.1.1.1. Agentes formadores de películas

- ✓ *Gelano*: Goma gellan de grado alimenticio, marca Kelcogel® (CPKelco, Chicago IL, EEUU).
- ✓ *Quitosano*: Marca ACOFAR (Argentina). Peso molecular medio, grado de deacetilación (GD) del 98%.

2.1.1.2. Preservantes de origen natural

- ✓ *Vainillina*: Marca Sigma Aldrich (St Lois MO, EEUU) (pureza $\geq 97\%$ según CG). Sus características fueron detalladas en el Capítulo 1 (inciso 2.1).
- ✓ *Geraniol*: Marca Sigma Aldrich (St Lois MO, EEUU) (pureza $\geq 97\%$ según CG). Sus características fueron detalladas en el Capítulo 1 (inciso 2.1).

- ✓ *Extracto de granada*: Extracto seco obtenido a partir de la *Punica granatum* L., marca PureBulk (EEUU). Los principales compuestos presentes en el extracto fueron medidos mediante HPLC, y se detallan en el Capítulo 2 (inciso 2.2, Tabla 2.1).

2.1.1.3. *Agente plastificante*

- ✓ *Glicerol*: Marca Biopack (Buenos Aires, Argentina).

2.1.2. *Preparación de las soluciones formadoras de películas*

Para la selección de las concentraciones añadidas de los biopreservantes a cada matriz formadora de películas, se realizaron ensayos previos evaluando la solubilidad y estabilidad de vainillina, geraniol y extracto de granada en las soluciones formadoras de películas de gelano y quitosano.

2.1.2.1. *Soluciones de gelano*

Las soluciones formadoras de recubrimientos de gelano se prepararon de acuerdo a Moreira y col. (2015) Se disolvió la goma gellan en agua destilada (0,5% p/v) bajo agitación magnética a 70°C. Se incorporó glicerol (Gli) como plastificante en una concentración de 0,56% (p/v). Esta solución sin agregado de biopreservantes se utilizó como control (recubrimiento Gel). Las soluciones con bioactivos se prepararon incorporando geraniol en dos concentraciones diferentes: 1,2 y 2,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (recubrimientos Gel+G1 y Gel+G2, respectivamente). La dispersión del G en la solución de gelano se logró mediante el uso de un Ultra-Turrax (Ika T25, EEUU) a 14.000 rpm durante 15 min. El extracto de granada se adicionó en concentraciones de 360 y 720 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (obteniendo los recubrimientos Gel+EG1 y Gel+EG2, respectivamente) directamente sobre las soluciones de gelano previamente preparadas.

2.1.2.2. *Soluciones de quitosano*

Las soluciones formadoras de recubrimientos de quitosano (Quit) fueron preparadas de acuerdo a Pereda y col. (2009). Para ello, se disolvió quitosano (2% p/v) en una solución de ácido acético (1% v/v), a la cual se adicionó glicerol (Gli) como

plastificante, alcanzando una relación Gli/Quit de 0,28 (equivalente a 0,56% p/v). Esta solución sin agregado de biopreservantes se utilizó como control (recubrimiento Quit). Para las soluciones compuestas, se agregó vainillina en concentraciones de 5 y 10 mg/mL (Quit+V1 y Quit+V2, respectivamente), y geraniol en concentraciones de 1,2 y 2,4 $\mu\text{L/mL}$ (recubrimientos Quit+G1 y Quit+G2, respectivamente). La vainillina se disolvió previamente en etanol antes de su incorporación en la solución de Quit. Por otra parte, el geraniol fue aplicado directamente a la solución de Quit, y se formaron soluciones estables mediante el uso de un Ultra-Turrax (Ika T25, EEUU) a 14.000 rpm durante 15 min.

2.2. Procesamiento de materia prima y aplicación de tratamientos

Se utilizaron frutillas (*Fragaria x ananassa*, cv Aromas) provistas por la Compañía Industrial Frutihortícola S.A., ubicada en Sierra de los Padres, Mar del Plata, Argentina. Las frutillas se lavaron por inmersión en agua corriente durante 2 min, sus pedúnculos fueron removidos y se cortaron en mitades a lo largo para luego proceder con la aplicación de los tratamientos correspondientes.

2.2.1. Aplicación de recubrimientos

El tratamiento de las frutillas cortadas se realizó por inmersión en las diferentes soluciones formadoras de películas (ver sección 2.1.2) durante 2 min, permitiendo luego el escurrimiento del líquido remanente.

2.2.2. Aplicación de ultrasonido

Las frutillas cortadas fueron tratadas en un baño ultrasónico (180 W, TestLab) a 40 kHz, durante 10 y 30 min (US10min y US30min, respectivamente).

2.2.3. Condiciones de envasado y almacenamiento

Una vez aplicados los tratamientos, 50 g de frutillas de cada tratamiento fueron dispuestas en bandejas estériles de polipropileno de dimensiones 152,5 mm x 112 mm x 47 mm (Celpack S.A., Argentina) y envasadas en bolsas de polietileno de 25,4 μm de espesor (con tasas de transmisión de O_2 , CO_2 y vapor de agua de $3,08 \times 10^{-4}$, $2,05 \times 10^{-3}$ y $2,05 \times 10^{-6} \text{ mmol}^3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respectivamente, a $P = 101325 \text{ Pa}$, $T = 25^\circ\text{C}$). Luego, las bolsas

se sellaron utilizando una selladora manual (HL, FS-300, Argentina) y se almacenaron a 5°C. Se analizaron dos bandejas por cada tratamiento inmediatamente después de su aplicación (día 0) y a los 2, 5 y 7 días de almacenamiento para evaluar el impacto en la calidad microbiológica y sensorial del producto.

2.3. Análisis microbiológicos

El impacto de los diferentes tratamientos sobre la microflora nativa de las frutillas mínimamente procesadas se llevó a cabo a través del análisis en los recuentos de bacterias mesófilas, hongos y levaduras, y bacterias psicrófilas, durante el almacenamiento refrigerado de las muestras. Los análisis microbiológicos se realizaron de la siguiente manera: 10 g de frutillas cortadas pertenecientes a cada tratamiento fueron macerados con 90 mL de agua peptonada (0,1% p/v). Se realizaron diluciones seriadas (1:10) de cada muestra en agua peptonada (0,1% p/v) y se sembraron en superficie en cada uno de los medios de cultivos correspondientes. Las siembras de cada muestra se realizaron por duplicado. Los recuentos de las poblaciones microbianas se llevaron a cabo siguiendo las metodologías detalladas en el Capítulo 2 (inciso 2.7).

2.4. Análisis sensorial

Se llevó a cabo un análisis sensorial descriptivo cuantitativo de acuerdo a Carbonell y col. (2007), de igual forma a la previamente detallada en el Capítulo 2 (inciso 2.9). Los atributos sensoriales evaluados en este caso fueron: *Apariencia Visual General (AVG)*, *brillo*, *olor característico*, *olor extraño*, *sabor dulce*, *sabor ácido* y *textura*. Las definiciones de cada atributo, junto con los términos correspondientes a las intensidades mínima y máxima, y los valores de referencia (frutilla cortada sin tratar) se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1: Descripción de los atributos sensoriales seleccionados, términos mínimo y máximo y valores consensuados para la muestra de referencia

Atributo	Descripción	Mínimo (0)	Máximo (5)	Ref.
Apariencia				
<i>AVG</i>	Apariencia visual general	Pobre	Excelente	5
<i>Brillo</i>	Intensidad de brillo	Baja	Alta	5
Olor				
<i>Olor característico</i>	Intensidad de aroma a frutilla	Baja	Alta	5
<i>Olor extraño</i>	Intensidad de olores a fermentación y otros olores no característicos	Baja	Alta	0
Sabor				
<i>Dulce</i>	Intensidad de sabor dulce	Baja	Alta	3
<i>Ácido</i>	Intensidad de sabor ácido	Baja	Alta	2
Textura				
<i>Textura</i>	Firmeza	Muy blando	Normal	5

Ref.: Referencia: frutilla cortada fresca sin tratamiento

2.5. Análisis estadístico

Los ensayos de aplicación de agentes naturales en recubrimientos comestibles y de aplicación de tratamientos de ultrasonido sobre frutilla cortada se realizaron mediante un diseño completamente aleatorizado, de tres corridas experimentales independientes. Los datos obtenidos se analizaron con el software libre R Project v.2.12.2 (R Development Core Team, 2011). Los resultados se informaron como la media de cada determinación acompañada por su error estándar (Kuehl, 2001). Se realizó el análisis de varianza de un factor (ANOVA) y se estimó la significancia estadística de las diferencias entre tratamientos mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, considerando significativamente diferentes aquellos valores con $p < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Recubrimientos de gelano

3.1.1. Efecto de recubrimientos de gelano sobre la microflora nativa de frutilla cortada

3.1.1.1. Evolución de bacterias mesófilas

En la Fig. 5.3 se observa la evolución de las bacterias mesófilas en las frutillas cortadas tratadas con los diferentes recubrimientos de gelano. La muestra control (sin recubrimiento) presentó un recuento inicial de MES de 4,81 log UFC/g, mostrando un incremento significativo a lo largo del almacenamiento hasta alcanzar los 7,40 log al día 7. El recubrimiento de gelano sin biopreservantes presentó recuentos similares al control durante el almacenamiento, al igual que los tratamientos con extracto de granada (Gel+EG1 y Gel+EG2). En cambio, los recubrimientos con geraniol Gel+G1 y Gel+G2 ejercieron un efecto bacteriostático manteniendo los recuentos de MES entre 4,35 y 5,16 log en todo el período de almacenamiento.

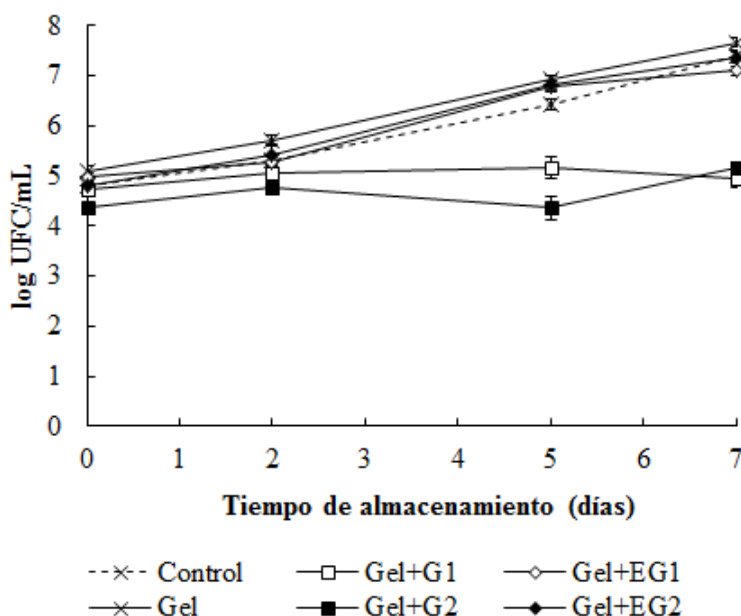


Fig. 5.3: Evolución de bacterias mesófilas en frutilla cortada con recubrimientos de gelano durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. Gel: recubrimiento de gelano (0,5% p/v); G1: 1,2 µL/mL de geraniol; G2: 2,4 µL/mL de geraniol; EG1: 360 µg/mL de extracto de granada; EG2: 720 µg/mL de extracto de granada.

3.1.1.2. Evolución de hongos y levaduras

El crecimiento de hongos y levaduras en frutillas cortadas tratadas con recubrimientos de gelano se presenta en la Fig. 5.4. La tendencia observada en la evolución de HYL fue similar a la descrita en MES. Durante el almacenamiento, las muestras de frutillas sin tratar mostraron un crecimiento de HYL, con valores iniciales

de 4,87 log, alcanzando los 6,62 log UFC/g al día 7. Los recubrimientos Gel, Gel+EG1 y Gel+EG2, no mostraron efectos significativos sobre los recuentos de HYL tanto al día 0 como durante el resto del almacenamiento, con recuentos similares a los hallados para el control. El recubrimiento Gel+G1 no produjo una disminución inicial de los recuentos de hongos y levaduras, pero sí un efecto bacteriostático durante el almacenamiento, manteniendo hasta el día 5 recuentos de 4,74 log. Al día 7, si bien se observó un crecimiento en dichos recuentos a 5,82 log, este valor fue significativamente menor que el de la muestra control. El efecto de Gel+G2 fue aún mayor, con una reducción inicial de 0,71 log con respecto al control, y un efecto fungistático en todo el almacenamiento (manteniendo los recuentos de HYL entre 4,06 y 4,43 log UFC/g).

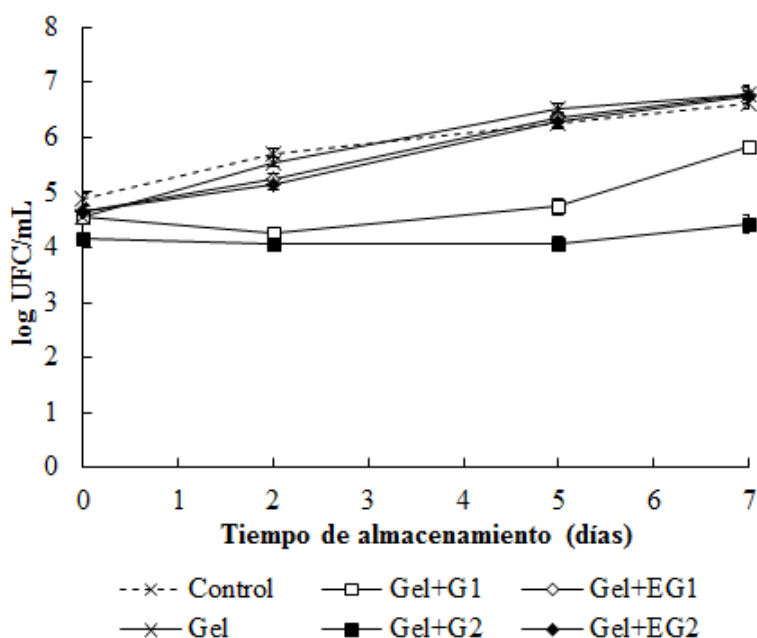


Fig. 5.4: Evolución de hongos y levaduras en frutilla cortada con recubrimientos de gelano durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. Gel: recubrimiento de gelano (0,5% p/v); G1: 1,2 µL/mL de geraniol; G2: 2,4 µL/mL de geraniol; EG1: 360 µg/mL de extracto de granada; EG2: 720 µg/mL de extracto de granada.

3.1.1.3. Evolución de bacterias psicrófilas

La Fig. 5.5 muestra el efecto de los diferentes recubrimientos de gelano sobre las bacterias psicrófilas en frutilla cortada a través del almacenamiento refrigerado. Las frutillas cortadas sin tratar, mostraron un crecimiento de PSI en el almacenamiento similar al observado en las otras poblaciones microbianas estudiadas, aumentando desde

4,38 log UFC/g (día 0), hasta 7,37 log (día 7). Al igual que en HYL y en MES, los recubrimientos Gel, Gel+EG1 y Gel+EG2 no mostraron efectos en la reducción de bacterias psicrófilas, ni a tiempo 0, ni a lo largo del almacenamiento. Las frutillas tratadas con Gel+G1 no mostraron una reducción inicial en PSI, pero los recuentos se mantuvieron constantes hasta el día 2 (4,40 log). En cambio, el tratamiento con Gel+G2 sí logró reducir los recuentos iniciales a 3,66 log UFC/g, manteniéndolos también constantes hasta el día 2. Durante el almacenamiento, las muestras tratadas con recubrimientos con geraniol a las dos concentraciones ensayadas mostraron un incremento en los recuentos, si bien dicha tasa de crecimiento fue menor que en la muestra control (alcanzando al día 7 recuentos de 5,44-5,71 log UFC/g).

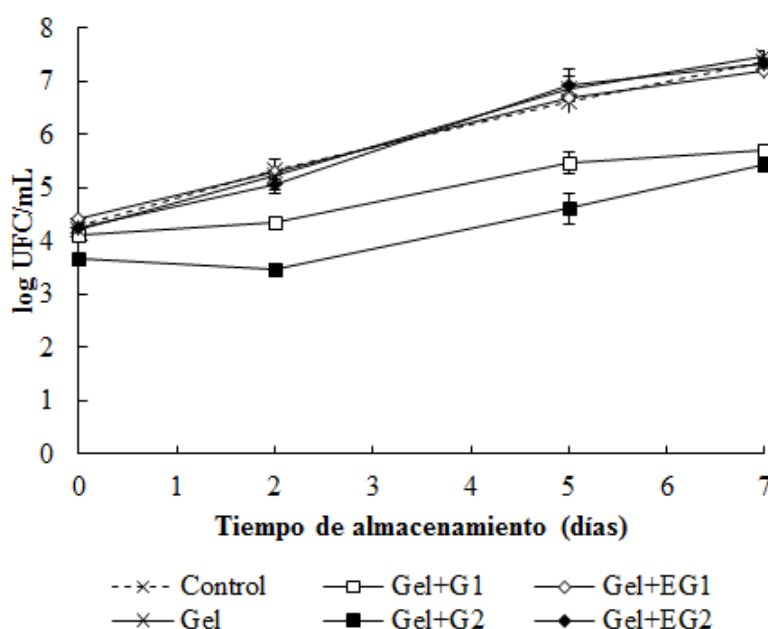


Fig. 5.5: Evolución de bacterias psicrófilas en frutilla cortada con recubrimientos de gelano durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. Gel: recubrimiento de gelano (0,5% p/v); G1: 1,2 µL/mL de geraniol; G2: 2,4 µL/mL de geraniol; EG1: 360 µg/mL de extracto de granada; EG2: 720 µg/mL de extracto de granada.

3.1.1.4. Vida útil desde el punto de vista microbiológico

El recubrimiento de goma gelano sin agregado de bioactivos no fue capaz de aumentar el lapso de vida útil del producto, sin reducciones sobre ninguna de las poblaciones estudiadas. La incorporación de extracto de granada en las dos concentraciones estudiadas tampoco tuvo efectos sobre la microflora nativa. Con

respecto al geraniol, la vida útil del producto se pudo incrementar, reduciendo tanto el crecimiento de bacterias mesófilas y psicrófilas como también los recuentos de hongos y levaduras.

En diversos estudios se ha evaluado el uso de recubrimientos de gelano sobre diferentes frutas cortadas. Particularmente, Azarakhsh y col. (2013) estudiaron la incorporación de limoneno (un terpeno cíclico, componente principal de aceites esenciales cítricos) en recubrimientos de gelano sobre la calidad microbiológica y sensorial de ananá cortado durante el almacenamiento. En concordancia con los resultados aquí presentados, estos autores observaron un crecimiento de la microflora nativa del ananá cortado durante el almacenamiento refrigerado, sin encontrar diferencias significativas entre los recuentos de las frutas sin recubrir y aquellas recubiertas con gelano sin bioactivos añadidos. Sin embargo, Azarakhsh y col. (2013) encontraron que los recubrimientos de gelano con limoneno incorporado en concentraciones de 0,3 y 0,5% v/v lograron reducir significativamente los recuentos de bacterias mesófilas en comparación con ananá cortado sin recubrir.

Por otro lado, Raybaudi-Massilia y col. (2008) estudiaron la evolución de la microflora nativa de melón fresco cortado con recubrimientos de alginato compuestos con diferentes bioactivos. En dicho estudio, los recubrimientos de alginato sin biopreservantes añadidos sí lograron una reducción significativa de la microflora nativa del melón cortado (bacterias mesófilas, psicrófilas y hongos y levaduras), aumentando la vida útil desde el punto de vista microbiológico desde aproximadamente 4 días para el control sin recubrimiento, hasta casi 10 días en las muestras recubiertas con alginato. Estos autores evaluaron la incorporación de varios compuestos naturales en los recubrimientos, y en particular, observaron una importante actividad antimicrobiana en aquellos recubrimientos de alginato compuestos con geraniol en una concentración de 0,5% v/v (equivalente a 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), logrando extender la vida útil microbiológica del producto en más de 21 días (Raybaudi-Massilia y col., 2008).

3.1.2. Efecto de recubrimientos de gelano sobre las propiedades sensoriales de frutilla cortada

Los recubrimientos comestibles se consumen junto con el producto. Luego, la calidad sensorial, en especial los atributos de aroma y sabor son esenciales para determinar el éxito de los RC en el mercado. Un aroma o sabor desagradable, y una

aparición poco atractiva suelen afectar la aceptabilidad del consumidor (Lin y Zhao, 2007; Rojas-Graü y col., 2009).

Los puntajes obtenidos en el análisis sensorial de las frutillas cortadas con recubrimientos de gelano se observa en la Fig. 5.6. Inicialmente ($t = 0$ d) no hubo diferencias entre las muestras tratadas y el control en los atributos sensoriales evaluados, excepto en *olor extraño*, donde las frutillas tratadas con recubrimientos de gelano compuestos con geraniol obtuvieron puntajes significativamente más elevados que el resto de las muestras. Esto podría deberse al fuerte aroma propio del geraniol. En este sentido, Azarakhsh y col. (2013) también observaron un detrimento en las características sensoriales de ananá cortado con recubrimientos de gelano al añadir limoneno, en comparación con aquellos recubrimientos sin bioactivo.

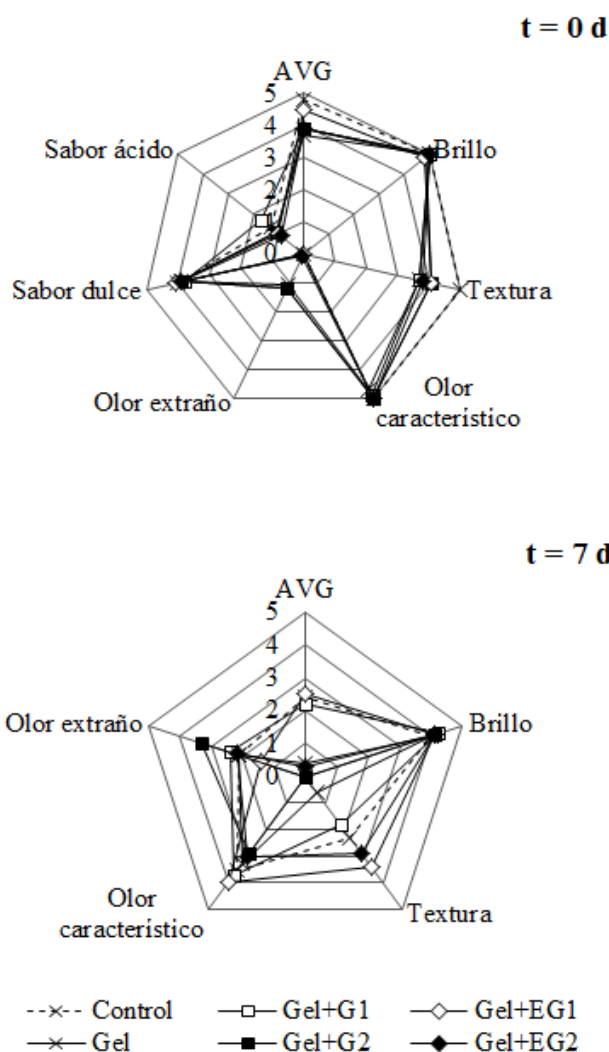


Fig. 5.6: Efecto de los recubrimientos de gelano sobre las características sensoriales de frutilla cortada almacenada a 5°C. No se evaluaron el sabor dulce y ácido a los 7 días de almacenamiento debido a su alta carga microbiana. Gel: recubrimiento de gelano (0,5% p/v); G1: 1,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de geraniol; G2: 2,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de geraniol; EG1: 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto de granada; EG2: 720 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto de granada.

Al día 7 de almacenamiento, se puede observar un importante detrimento en las características sensoriales de las frutillas cortadas, tanto en el control como en las tratadas. No se evaluaron atributos de sabor debido a la importante carga microbiana del producto. Los parámetros más afectados en el tiempo fueron la AVG, la *textura* y el *olor extraño* de las frutillas. Todas las muestras mostraron un descenso en los puntajes medios de *apariencia visual*, donde las muestras tratadas con Gel+G1 y Gel+G2 mostraron los menores puntajes. Esto se debe principalmente a la pérdida de firmeza observada en las muestras (Fig. 5.6). El aumento de *olor extraño* en las muestras a día 7, podría relacionarse con los mayores recuentos microbianos encontrados. Raybaudi-Massila y col. (2008) también encontraron una disminución en la firmeza de melón

cortado a través del tiempo de almacenamiento, atribuyéndolo al procesado de la fruta, que durante el corte produce daños a nivel celular liberando enzimas y sustratos, tales como pectinmetilesterasa. Reacciones enzimáticas también pueden ocasionar deterioro en otros atributos sensoriales, tales como producción de olores y sabores extraños (Varoquaux y Wiley, 1994).

Como se puede observar en la Fig. 5.6, las muestras recubiertas con gelano y geraniol mostraron una mayor pérdida de firmeza con respecto al control. En concordancia con estos resultados, Raybaudi-Massila y col. (2008) también observaron que aquellos recubrimientos compuestos con bioactivos en altas concentraciones (entre ellos, alginato con 0,5% de geraniol) disminuyeron la firmeza del melón cortado a lo largo del almacenamiento. Este resultado puede ser consecuencia de la acción del geraniol sobre el tejido celular de la fruta, que posiblemente provoque cambios estructurales que afecten directamente a la firmeza, o incluso aumente la liberación de enzimas y sustratos que también favorezcan el ablandamiento del fruto (Raybaudi-Massila y col., 2008).

3.2. Recubrimientos de quitosano

3.2.1. Efecto de recubrimientos de quitosano sobre la microflora nativa de frutilla cortada

3.2.1.1. Evolución de bacterias mesófilas

La evolución de bacterias mesófilas en frutilla cortada tratada con recubrimientos de quitosano con agregado de biopreservantes se muestra en la Fig. 5.7. Los recuentos de MES iniciales en la muestra control fueron de 4,85 log UFC/g, mostrando un incremento significativo a través del almacenamiento. Los recubrimientos de quitosano lograron reducir los recuentos iniciales de MES, siendo más efectivos aquellos que contenían la mayor concentración de V y G (Quit+V2 y Quit+G2). Como se puede observar, a lo largo del almacenamiento los recuentos de MES en las muestras tratadas también se incrementaron, concluyendo que ningún tratamiento fue efectivo con respecto al control.

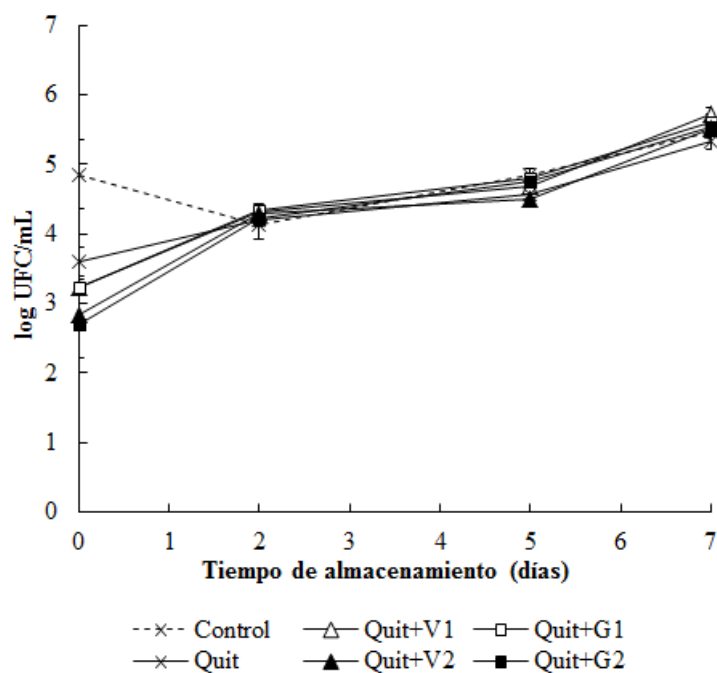


Fig. 5.7: Evolución de bacterias mesófilas en frutilla cortada con recubrimientos de quitosano durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. Quit: recubrimiento de quitosano (2% p/v); V1: 5 mg/mL de vainillina; V2: 10 mg/mL de vainillina; G1: 1,2 µL/mL de geraniol; G2: 2,4 µL/mL de geraniol.

3.2.1.2. Evolución de hongos y levaduras

La evolución de los recuentos de HYL en frutilla cortada con recubrimientos de quitosano se muestra en la Fig. 5.8. Al igual que en MES, el control mostró un crecimiento a través del tiempo de almacenamiento, comenzando en 4,28 log UFC/g y alcanzando los 6,40 log al día 7. Al día 0, todos los recubrimientos de quitosano (incluso sin biopreservantes) fueron eficientes en reducir los recuentos de HYL con respecto al control, sin diferencias significativas entre ellos, con un valor medio de 2,22 log. A lo largo del almacenamiento, las muestras tratadas también mostraron un crecimiento en los recuentos de HYL, alcanzando valores significativamente más bajos que la muestra control.

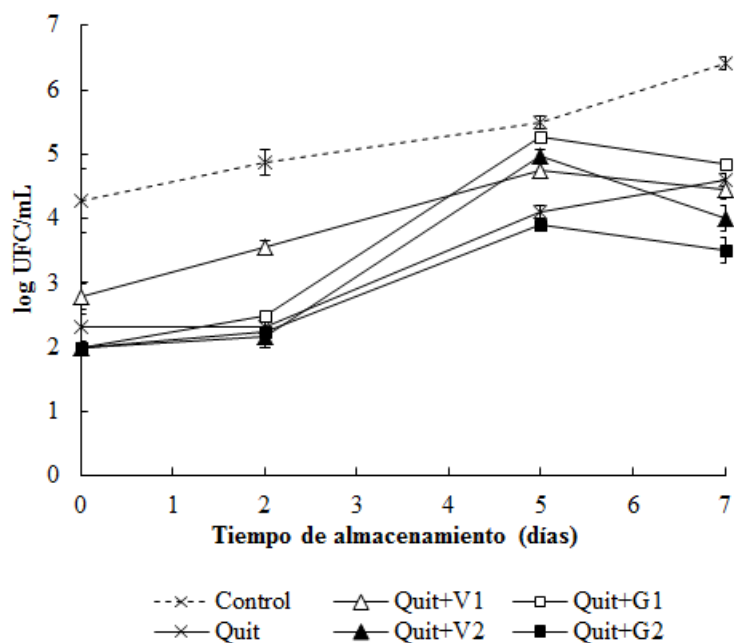


Fig. 5.8: Evolución de hongos y levaduras en frutilla cortada con recubrimientos de quitosano durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. Quit: recubrimiento de quitosano (2% p/v); V1: 5 mg/mL de vainillina; V2: 10 mg/mL de vainillina; G1: 1,2 µL/mL de geraniol; G2: 2,4 µL/mL de geraniol.

Con respecto al agregado de biopreservantes, la incorporación de la menor concentración de vainillina a la película de quitosano (Quit+V1) mostró menor efectividad en la reducción de HYL, siendo los recuentos superiores a los hallados en la muestra Quit en los días 2 y 5 de almacenamiento. Hacia el final del almacenamiento, las muestras que presentaban los tratamientos de las películas Quit+V2 y Quit+G2, fueron las más efectivas, con recuentos medios de 4,00 y 3,50 log UFC/g, respectivamente; mientras que el resto de las muestras recubiertas mostraron recuentos similares, entre 4,45 y 4,85 log UFC/g, significativamente menores a los hallados en la muestra control.

3.2.1.3. Evolución de bacterias psicrófilas

En cuanto a las bacterias psicrófilas, los recuentos en el control partieron de 3,94 log, y mostraron un incremento a lo largo del almacenamiento refrigerado, tal como se observa en la Fig. 5.9. Los recubrimientos de quitosano con y sin biopreservantes mostraron ser efectivos en la inhibición de PSI al día 0, con una disminución inicial de aproximadamente 1 log UFC/g con respecto al control. Sin embargo, a lo largo del

almacenamiento los recuentos de PSI en todas las muestras tratadas incrementaron sus valores con el tiempo, alcanzando a día 7 recuentos de entre 4,50 y 5,09 log.

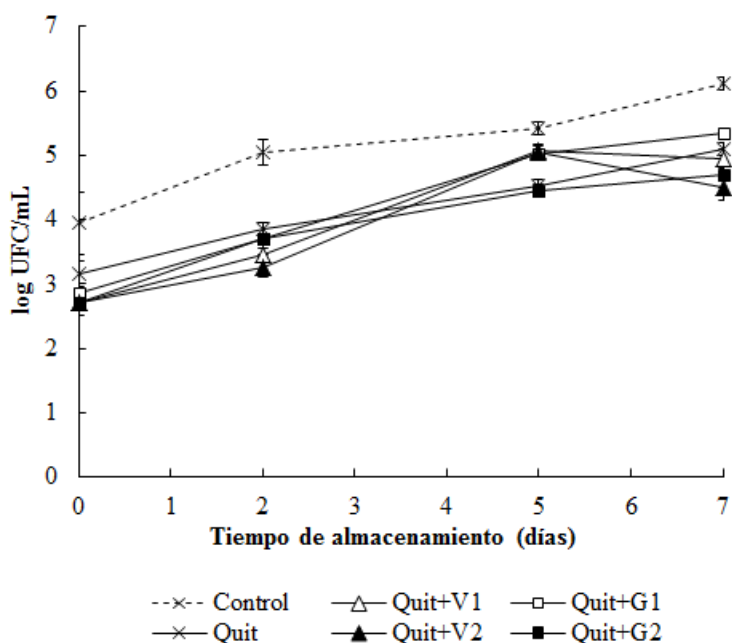


Fig. 5.9: Evolución de bacterias psicrófilas en frutilla cortada con recubrimientos de quitosano durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. Quit: recubrimiento de quitosano (2% p/v); V1: 5 mg/mL de vainillina; V2: 10 mg/mL de vainillina; G1: 1,2 µL/mL de geraniol; G2: 2,4 µL/mL de geraniol.

3.2.1.4. Vida útil desde el punto de vista microbiológico

Los recubrimientos de quitosano mostraron efectividad para la inhibición inicial de todas las poblaciones microbianas estudiadas en la presente Tesis, mostrando un significativo efecto antimicrobiano inicial del recubrimiento de Quit con y sin biopreservantes. A lo largo del almacenamiento se observó un crecimiento en las poblaciones de HYL y PSI en todas las muestras, aunque las frutillas tratadas mostraron recuentos significativamente menores a los del control. Sin embargo, ninguno de los recubrimientos de Quit pudo reducir los recuentos de MES durante el almacenamiento refrigerado, y por lo tanto, no fueron capaces de extender la vida útil del producto desde el punto de vista microbiológico con respecto al control.

La actividad antimicrobiana del quitosano ha sido ampliamente estudiada, y diferentes mecanismos de acción han sido propuestos para justificar su efectividad. Varios autores concluyeron que la actividad antimicrobiana del quitosano podría estar

relacionada con las interacciones electrostáticas entre sus cargas positivas y los fosfolípidos cargados negativamente presentes en la membrana plasmática de las células microbianas. La carga catiónica del quitosano se debe a la protonación del grupo amino en la posición C2, causado por la desacetilación de la quitina a quitosano. Luego, el grado de desacetilación influye en el número de cargas positivas eventualmente presentes en la molécula de Quit: quitosano con alto GD tiene numerosas cargas positivas (Romanazzi y Feliziani, 2016).

La actividad antifúngica del quitosano ha sido reportada frente a los principales patógenos presentes en frutas postcosecha, tales como *B. cinerea* (Chien y Chou, 2006; El-Ghaouth, Smilanick, y Wilson, 2000; Liu, Tian, Meng, y Xu, 2007), *R. stolonifer* (Bautista-Baños, Bosquez-Molina, y Barrera-Necha, 2014), *Penicillium citrinum* (Xing, Xu, Che, Li, y Li, 2011), *P. digitatum* (Chien y Chou, 2006), *P. italicum* (Chien y Chou, 2006), *P. expansum* (El-Ghaouth y col., 2000; Liu y col., 2007; Yu, Li, y Zheng, 2007), *M. fructicola* (Yang, Zhang, Bassett, y Meng, 2012), *A. kikuchiana* (Meng, Yang, Kennedy, y Tian, 2010), *P. piricola* (Meng y col., 2010), y *Aspergillus niger* (Xiao-Fang, Xiao-Qiang, Sheng, Ting-Pu, y Zhong-Xing, 2008).

Cuando el quitosano se enfrenta a la célula fúngica, primero se une a la membrana y la cubre; y en segunda instancia, luego de que se alcance una concentración umbral dada, el quitosano causa la permeabilización de la membrana y la liberación del contenido de la célula (Palma-Guerrero y col., 2010). En la aplicación de quitosano, el mecanismo homeostático de las células fúngicas sufre un cambio drástico, porque el quitosano forma canales en la membrana, permitiendo el libre paso del Ca^{2+} , que causa inestabilidades, pudiendo provocar incluso la muerte celular (Palma-Guerrero y col., 2009).

Además de su habilidad para permeabilizar la membrana, muchos estudios han demostrado mediante visualización con fluorescencia que el quitosano puede penetrar las células microbianas. Una vez dentro de la célula, el quitosano cargado positivamente puede unirse a otros targets intracelulares, tales como ADN y ARN, que están cargados negativamente (Xiao-Fang, Xiao-Qiang, Sheng, Ting-Pu, y Zhong-Xing, 2008; Xu y col., 2007). Muchos estudios han descripto cambios morfológicos en las hifas de hongos y en sus estructuras reproductivas inducidos por el quitosano (Li, Sun, Bi, Ge, y Wang, 2009; Sánchez-Domínguez y col., 2011).

Otro mecanismo propuesto para explicar el poder antimicrobiano ejercido por el quitosano ha sido su efecto sobre la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, *phenylalanine ammonia lyase*). La PAL es una enzima clave en el mecanismo de síntesis de fenoles (Cheng y Breen, 1991); y la acumulación de fenoles que actúan como fitoalexinas (compuestos antimicrobianos que se acumulan en algunas plantas en altas concentraciones, después de infecciones bacterianas o fúngicas) es considerada la principal respuesta inducible de la PAL frente a estreses bióticos y abióticos en plantas (Bhattacharya, Sood, y Citovsky, 2010). Se ha demostrado que la aplicación de quitosano ha incrementado la actividad de la PAL en diferentes frutas, tales como uvas (Meng, Li, Liu, y Tian, 2008; Meng y Tian, 2009; Meng, Qin, y Tian, 2010), cerezas (Dang y col., 2010), y frutillas (Landi, Feliziani, y Romanazzi, 2014; Romanazzi, Nigro, y Ippolito, 2000), mejorando así el mecanismo de defensa de las frutas.

Con respecto al agregado de biopreservantes, se esperaba un efecto antimicrobiano mejorado de los recubrimientos compuestos de Quit con V y G, con respecto a los recubrimientos de quitosano simples. Sin embargo, los resultados presentados en este Capítulo demostraron que el poder antimicrobiano de los recubrimientos de Quit no fue incrementado significativamente por el agregado de vainillina ni de geraniol hasta el día 7 de almacenamiento, donde se observa una leve mejora en los recuentos de HYL y de PSI en las frutillas tratadas con los recubrimientos compuestos. Entre los días 2 y 5 de almacenamiento incluso se encontraron recuentos superiores de HYL en la muestra Quit+V1 comparado con Quit. El grupo aldehído de la vainillina podría reaccionar con los grupos amino del quitosano para formar bases Schiff (Fig. 5.10) (Jagadish, Divyashree, Viswanath, Srinivas, y Raj, 2012; Marin y col., 2013; Peng y col., 2010; Sashikala y Syed Shafi, 2014).

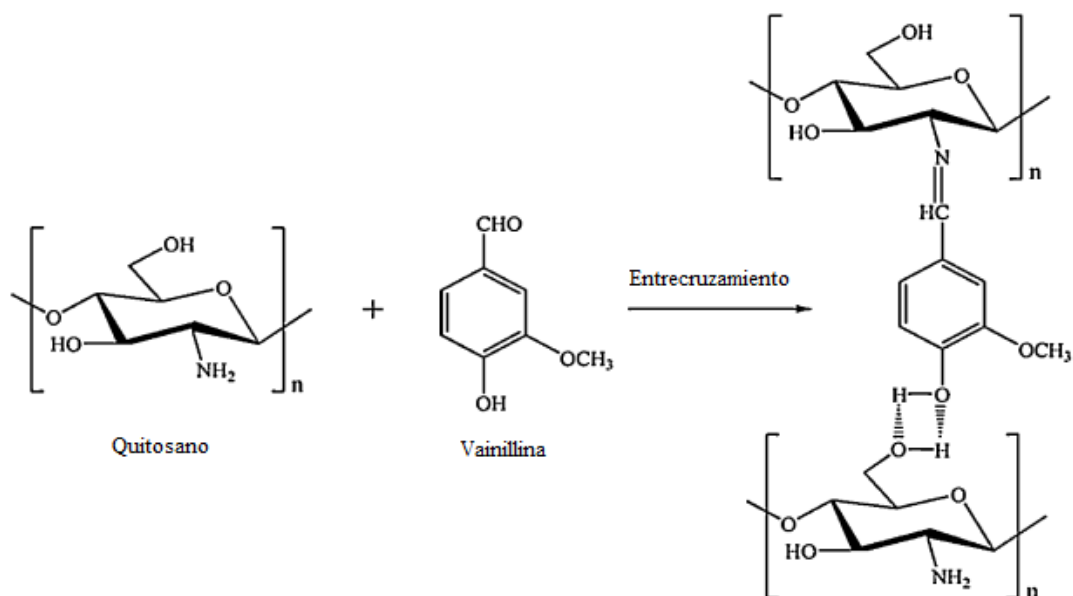


Fig. 5.10: Modificación química del quitosano con vainillina mediante la formación de un enlace aldimina. Adaptada de Zhang y col. (2015).

Peng y col. (2010) sintetizaron microesferas de quitosano con vainillina para la liberación controlada de resveratrol. Los autores mencionaron que la formación de estas microesferas se llevó a cabo mediante el entrecruzamiento químico entre el quitosano y la vainillina. Sin embargo, como puede observarse en la Fig. 5.10, la formación de la base Schiff no cuenta como entrecruzamiento covalente, ya que los grupos hidroxilos del compuesto fenólico no forman enlaces covalentes con el esqueleto de quitosano.

Marin y col. (2012) investigaron esta reacción con más detalle. Estos autores observaron la formación de un gel fuerte al entrecruzar el quitosano con vainillina y lo atribuyeron a la formación de puentes de H en lugar de a un entrecruzamiento covalente (Marin y col., 2013). En condiciones ácidas, los enlaces aldimina son reversibles, pudiendo recuperar al aldehído original (Marin y col., 2012).

Esto podría explicar la disminución del poder antimicrobiano en los recubrimientos de quitosano compuestos con V, debido la formación del enlace aldimina y luego, la reversibilidad de dicha reacción, con la liberación del aldehído podría justificar el incremento en la capacidad antimicrobiana hacia el final del almacenamiento.

3.2.2. Efecto de recubrimientos de quitosano sobre las propiedades sensoriales de frutilla cortada

Los resultados obtenidos de la evaluación sensorial de las frutillas cortadas tratadas con recubrimientos de quitosano se muestran en la Fig. 5.11. Como puede observarse, inicialmente los atributos de *AVG*, *brillo*, *textura* y *olor característico* no fueron significativamente afectados por los recubrimientos de quitosano ni por los recubrimientos de quitosano con biopreservantes añadidos. Con respecto al *olor extraño*, el quitosano no afectó significativamente este parámetro con respecto al control. En cambio, las muestras recubiertas con quitosano compuesto con biopreservantes, mostraron un significativo aumento en los puntajes de *olor extraño* en el siguiente orden: Quit+V1 < Quit+V2 < Quit+G1 < Quit+G2. El aumento en el *olor extraño* percibido por los panelistas podría deberse al aroma característico de la vainillina y el geraniol, siendo las muestras con mayor puntaje aquellas tratadas con las películas con la concentración de biocativo más alta. Los resultados en este caso fueron coincidentes con lo observado en jugo de frutilla en el Capítulo 2 de esta Tesis, donde el aroma de la vainillina resultó menos extraño que el del geraniol.

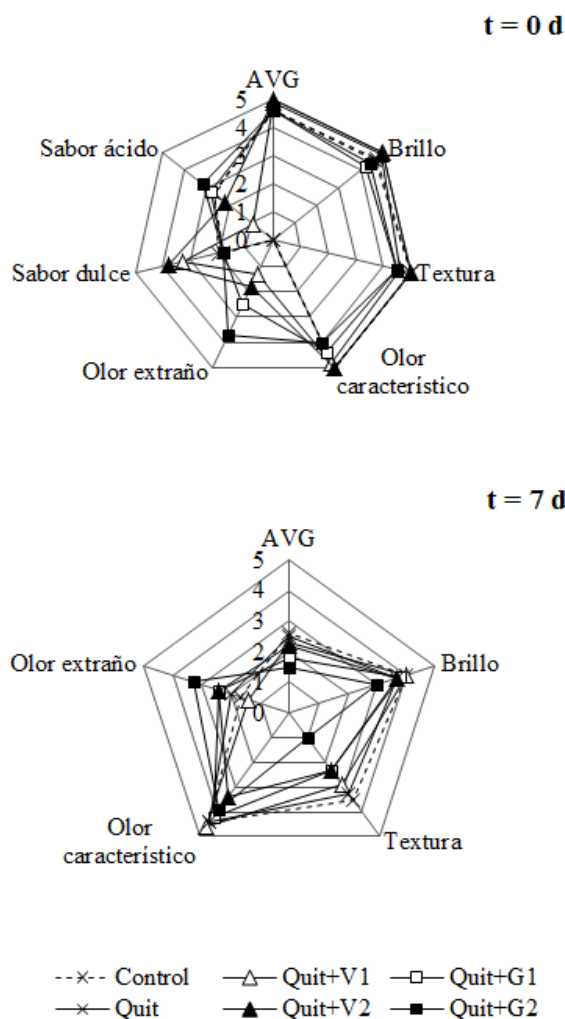


Fig. 5.11: Efecto de los recubrimientos de quitosano sobre las características sensoriales de frutilla cortada almacenada a 5°C. No se evaluaron el sabor dulce ni ácido a los 7 días de almacenamiento debido a su alta carga microbiana. Quit: recubrimiento de quitosano (2% p/v); V1: 5 mg/mL de vainillina; V2: 10 mg/mL de vainillina; G1: 1,2 µL/mL de geraniol; G2: 2,4 µL/mL de geraniol.

Con respecto a los atributos de sabor, al día 0 las muestras Quit+V1 y Quit+V2 obtuvieron puntajes de *sabor dulce* significativamente superiores al resto de las muestras, y puntajes de *sabor ácido* significativamente más bajos. El recubrimiento de quitosano con geraniol en la mayor concentración evaluada resultó en un *sabor ácido* significativamente más intenso que la muestra control.

La *apariencia visual general* de las frutillas cortadas y la *textura* fueron los atributos sensoriales más afectados por el tiempo de almacenamiento. Al día 7 de almacenamiento los puntajes de *textura* en todas las muestras fueron significativamente menores que al día 0, mostrando un ablandamiento del producto con el transcurso del tiempo bajo refrigeración. La firmeza es uno de los principales atributos que determina

la calidad de la fruta postcosecha (Barrett, Beaulieu, y Shewfelt, 2010). El ablandamiento de la fruta es un proceso bioquímico normalmente atribuido al deterioro en la composición de la pared celular, que involucra la hidrólisis de la pectina a través de enzimas tales como la poligalacturonasa (PG) y la pectinmetilesterasa (PME) (Atkinson y col., 2012). Los recubrimientos de Quit y Quit+V1 obtuvieron puntajes de *textura* al día 7 similares a los del control; en cambio, las muestras tratadas con Quit+V2, Quit+G1 y Quit+G2 mostraron puntajes significativamente menores, mostrando un mayor ablandamiento. Como se detalló en la sección 3.1.2. del presente Capítulo, altas concentraciones de bioactivos pueden afectar la textura de la fruta cortada, disminuyendo la firmeza a través del almacenamiento como consecuencia de la acción de los compuestos añadidos sobre el tejido celular de la fruta (Raybaudi-Massilia y col., 2008).

Hernández-Muñoz y col. (2008) estudiaron el efecto de recubrimientos de quitosano sobre la firmeza de frutillas almacenadas a 10°C por 6 días. Estos autores reportaron una significativa mejora en la textura del fruto con respecto al control, aunque las muestras tratadas también mostraron un detrimento de la firmeza a lo largo del tiempo de almacenamiento. Sin embargo, estos autores trabajaron sobre frutilla entera. En esta Tesis, el trabajo realizado fue sobre frutillas cortadas, un producto mínimamente procesado que habiendo pasado por una operación de corte, sufre una serie de cambios bioquímicos, tales como liberación de enzimas y pérdida de agua que favorecen el ablandamiento del tejido. En otro estudio, Jongsri y col. (2016) estudiaron el efecto de recubrimientos de quitosano de diferentes pesos moleculares sobre melón cortado. Estos autores encontraron una disminución en la firmeza del melón cortado a lo largo del almacenamiento, sin diferencias significativas entre las muestras tratadas con los diferentes recubrimientos y las muestras control, sin recubrir.

3.3. Tratamientos de ultrasonido

3.3.1. Efecto de tratamientos de ultrasonido sobre la microflora nativa de frutilla cortada

3.3.1.1. Evolución de bacterias mesófilas

La frutilla cortada sin tratar presentó recuentos iniciales de MES de 4,81 log UFC/g, mostrando un crecimiento significativo a lo largo del almacenamiento como

puede observarse en la Fig. 5.12. Al día 7 de almacenamiento, los recuentos alcanzaron valores de 8,20 log. Por otro lado, al día 0, el tratamiento de ultrasonido de 10 min no mostró diferencias significativas con respecto a la muestra control; en cambio, el tratamiento de mayor duración, logró disminuir la microflora en 0,83 log. A lo largo del almacenamiento, las muestras tratadas mediante ultrasonido también mostraron un crecimiento en las bacterias mesófilas. Por un lado, el tratamiento US10min mantuvo su recuento inicial hasta el día 2 para alcanzar al final del almacenamiento valores de recuentos similares al encontrado para el control. Con respecto al tratamiento de ultrasonido de mayor duración (US30min), los resultados indicaron una mayor efectividad con una diferencia significativa respecto de la muestra control a lo largo de todo el almacenamiento.

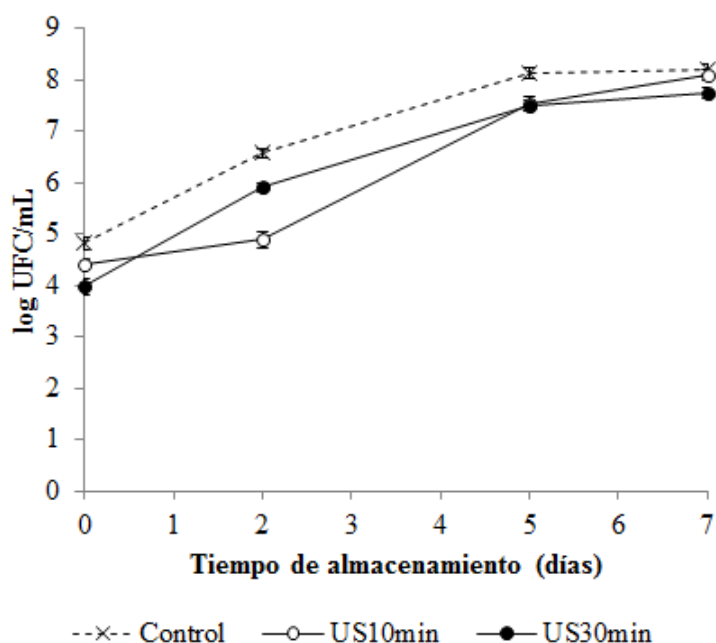


Fig. 5.12: Evolución de bacterias mesófilas en frutilla cortada tratada con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. US10min: tratamiento de ultrasonido de 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido de 30 min.

3.3.1.2. Evolución de hongos y levaduras

La evolución de hongos y levaduras mostró un comportamiento similar al hallado en MES (Fig. 5.13). Los recuentos iniciales de HYL en la muestra control fueron de 4,76 log UFC/g, con un incremento significativo a los 7 días de almacenamiento, alcanzando valores de 8,41 log. El tratamiento de US por 10 min logró una reducción

inicial de HYL de 0,53 log; sin embargo, este valor se incrementó paulatinamente durante el almacenamiento, alcanzando recuentos al día 7 de 8,04 log. El tratamiento US30min inicialmente produjo reducciones en HYL de aproximadamente 1 log, mostrando un incremento a través del tiempo hasta alcanzar valores de 7,62 log al día 7, resultando significativamente menor al recuento hallado en el control.

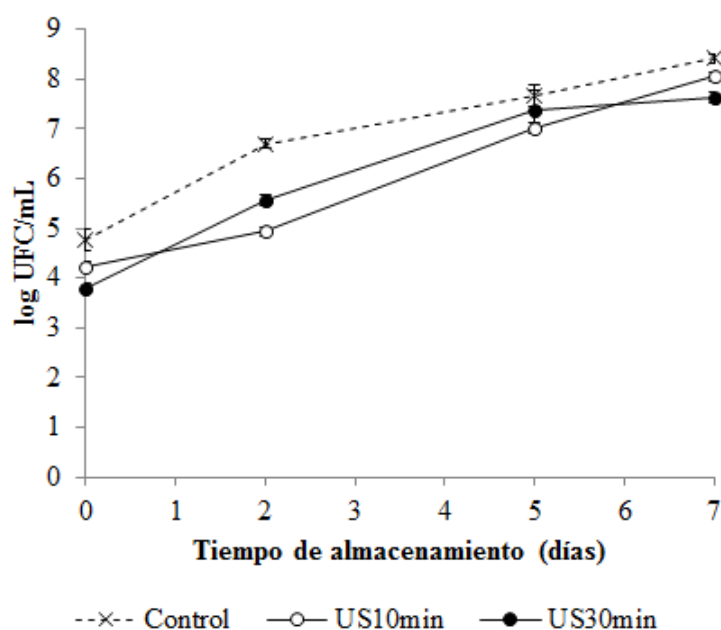


Fig. 5.13: Evolución de hongos y levaduras en frutilla cortada tratada con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. US10min: tratamiento de ultrasonido de 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido de 30 min.

3.3.1.3. Evolución de bacterias psicrófilas

La evolución de las bacterias psicrófilas en frutilla cortada tratada con ultrasonido se observa en la Fig. 5.14. Al igual que en las otras poblaciones estudiadas, la muestra control mostró un crecimiento en los recuentos de PSI a lo largo del almacenamiento, con valores iniciales de 4,29 log UFC/g hasta los 6,55 log. Inicialmente el tratamiento más corto de ultrasonido (US10min) no mostró un efecto sobre la inhibición de las bacterias psicrófilas; sin embargo, como puede observarse en la Fig. 5.14, el crecimiento de PSI en la muestra tratada con US por 10 min fue menor que en la muestra control. El tratamiento de US por 30 min logró una inhibición de las bacterias psicrófilas a tiempo 0, con recuentos de 2,70 log UFC/g. A través del almacenamiento los recuentos en la muestra US30min también incrementaron, llegando a valores de 5,70

log al día 7, siendo estos valores significativamente menores a los hallados para el control.

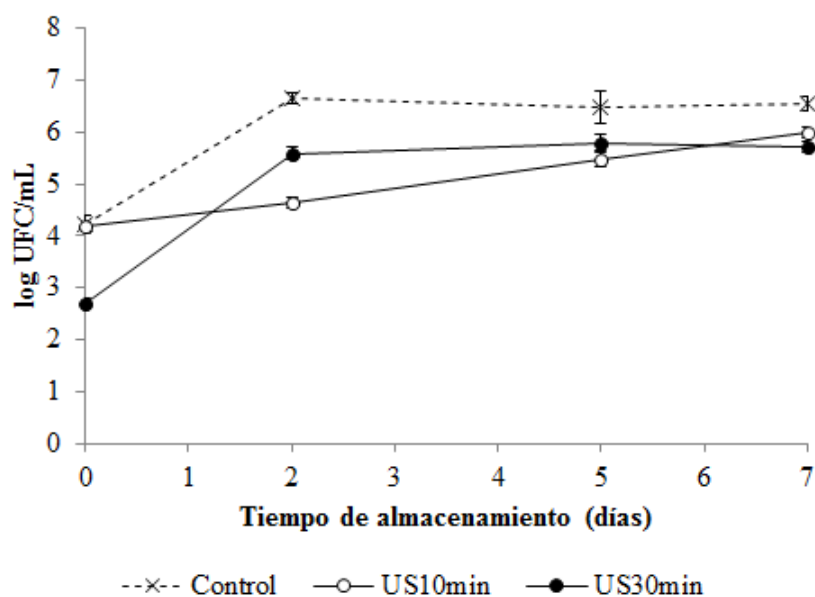


Fig. 5.14: Evolución de bacterias psicrófilas en frutilla cortada tratada con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. US10min: tratamiento de ultrasonido de 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido de 30 min.

3.3.1.4. Vida útil desde el punto de vista microbiológico

La frutilla es una fruta altamente perecedera y su vida útil usualmente es acotada debido al crecimiento microbiano (Wszelaki y Mitcham, 2003). Los tratamientos de ultrasonido evaluados en este Capítulo lograron reducir la microflora nativa de las frutillas cortadas con respecto al control, aunque los recuentos microbianos aumentaron a través del almacenamiento en todas las muestras.

En concordancia con estos resultados, Cao y col. (2010) estudiaron el efecto de tratamientos de ultrasonido a 25, 28, 40 y 59 kHz por 10 min sobre la calidad de frutillas enteras almacenadas a 5°C por 8 días. Estos autores observaron un aumento en los recuentos de bacterias mesófilas y de hongos y levaduras presentes en las frutillas a través del tiempo de almacenamiento. Cao y col. (2010) también observaron que el recuento de microorganismos en las frutillas disminuyó significativamente con todos los tratamientos de ultrasonido al día 0 comparado con la muestra control. Durante el almacenamiento, los recuentos microbianos en frutillas tratadas a 40 ó 59 kHz fueron significativamente más bajos que en las demás muestras, mientras que los recuentos en

las muestras tratadas a 25 y a 28 kHz no mostraron diferencias significativas con el control. El tratamiento de ultrasonido a 40 kHz fue el más efectivo en reducir el deterioro microbiano.

Es conocido que el US causa efectos citolíticos y es efectivo en la inactivación de microorganismos debido a los fenómenos que ocurren durante la cavitación, pero la tasa de ruptura celular depende de las condiciones experimentales y del tipo de microorganismo (Piyasena y col., 2003).

3.3.2. Efecto de tratamientos de ultrasonido sobre las propiedades sensoriales de frutilla cortada

Los puntajes obtenidos durante la evaluación sensorial de las frutillas cortadas tratadas con ultrasonido se observa en la Fig. 5.15. Al día 0, los tratamientos de ultrasonido no mostraron efectos significativos en ninguno de los atributos sensoriales evaluados. Todas las muestras mostraron excelente *apariencia visual*, alta intensidad de *brillo* y *olor característico*, y *textura* normal. Además, los tratamientos de ultrasonido no aportaron *olor extraño* al producto.

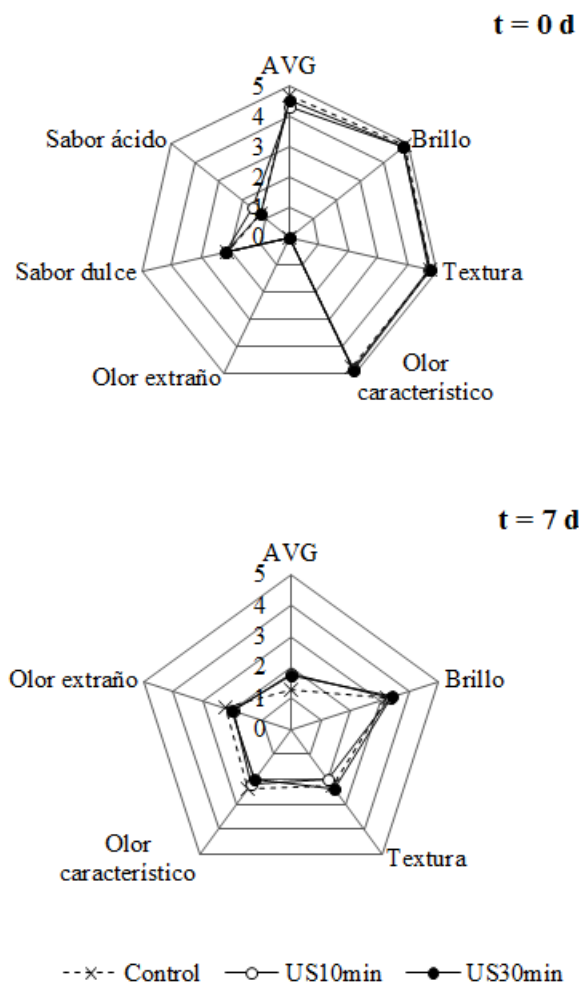


Fig. 5.15: Efecto de los tratamientos de ultrasonido sobre las características sensoriales de frutilla cortada almacenada a 5°C. No se evaluaron el sabor dulce ni ácido a los 7 días de almacenamiento debido a su alta carga microbiana. US10min: tratamiento de ultrasonido de 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido de 30 min.

Como se observó previamente, el tiempo de almacenamiento afectó significativamente las características sensoriales de la frutilla cortada, observándose un detrimento importante en la *apariencia visual* y en la *textura*. El olor extraño de todas las muestras aumentó significativamente con respecto al día 0, probablemente debido al aumento de la carga microbiana, acompañado de una disminución en la intensidad del *olor característico*. Al igual que al día 0, al día 7 de almacenamiento tampoco se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control.

La textura es un atributo de calidad crítico en la aceptabilidad de frutas y verduras por parte del consumidor. En particular, la frutilla es una fruta tierna que sufre una rápida pérdida de firmeza durante su maduración, este factor contribuye en gran medida a su corta vida postcosecha y a la susceptibilidad frente a una contaminación por hongos

y levaduras (Hernández-Muñoz y col., 2008). La textura de las frutas es una propiedad afectada por la turgencia celular y por la estructura y composición de los polisacáridos presentes en la pared celular. Las bases bioquímicas del ablandamiento en frutilla no están claras (Hernández-Muñoz y col., 2008). El ablandamiento de frutillas ha sido asociado a la degradación de la lámina central de las células del parénquima cortical, resultando en un incremento dramático de la solubilización de la pectina, con pequeños cambios en el peso molecular de la misma y con pequeñas disminuciones en el contenido de hemicelulosas (Heng Koh y Melton, 2002). Las actividades de enzimas tales como la poligalacturonasa (PG) y la pectinmetilesterasa (PME) también han sido asociadas al ablandamiento del tejido (Cao y col., 2010; Vicente, Costa, Martínez, Chaves, y Civello, 2005).

Cao y col. (2010) midieron en forma instrumental la firmeza de frutillas enteras tratadas con ultrasonido por 10 min a diferentes frecuencias. Estos autores encontraron que luego de 8 días de almacenamiento la firmeza del fruto disminuyó entre un 27,8 y un 34,2% con respecto al día 0, sin diferencias significativas entre los tratamientos a 25, 28 y 59 kHz con respecto al control. Las frutillas tratadas a 40 kHz mostraron una mejora en la firmeza, con una disminución del 23,2% con respecto al valor inicial (Cao y col., 2010). Si bien en este Capítulo también se trabajó con una frecuencia de 40 kHz, la textura se midió de manera sensorial. Al igual que en el color, diferencias aparentemente significativas en una medida instrumental pueden no resultar evidentes para el consumidor. Otro factor a tener en cuenta, es que en este Capítulo se estudiaron los efectos de ultrasonido sobre fruta cortada, un producto altamente susceptible al deterioro y con una vida útil más corta que el fruto entero.

4. CONCLUSIONES

En este Capítulo se evaluaron diferentes tratamientos de preservación sobre frutillas cortadas: recubrimientos de gelano y quitosano compuestos con biopreservantes y tratamientos de ultrasonido.

En primer lugar, los recubrimientos de gelano sin agregado de biopreservantes no tuvieron efectos significativos en el control de la microflora de frutilla cortada. La incorporación de extracto de granada en los recubrimientos de gelano tampoco logró

una disminución significativa de la microflora nativa de frutillas cortadas. Por otro lado, la incorporación de geraniol en ambas concentraciones evaluadas redujo significativamente los recuentos de bacterias mesófilas, psicrófilas y hongos y levaduras, comparado con las muestra control. Sin embargo, el análisis sensorial mostró una importante disminución de la firmeza en todas las muestras, e incluso un detrimento mayor en aquellas tratadas con recubrimientos de gelano con geraniol.

Por otro lado, los recubrimientos de quitosano fueron efectivos en la reducción inicial de la microflora nativa de las frutillas cortadas, incluso sin biopreservantes añadidos. A lo largo del almacenamiento no se logró una disminución en los recuentos de bacterias mesófilas, pero sí se redujeron los valores de psicrófilas y de hongos y levaduras con respecto al control. El agregado de los biopreservantes, en este caso, no mostró una mejora significativa del poder antimicrobiano de los recubrimientos de quitosano *per se*. Nuevamente la vida útil del producto estuvo muy marcada por sus características sensoriales, particularmente la textura, observándose una fuerte disminución de la firmeza con el tiempo de almacenamiento. En este sentido, los recubrimientos evaluados no pudieron prolongar la vida útil del producto.

Finalmente, los tratamientos de ultrasonido evaluados sobre frutilla cortada mostraron una leve, pero significativa, inhibición de la microflora nativa del producto. Sin embargo, la vida útil del producto desde el punto de vista microbiológico no se logró aumentar, ya que hacia el final del almacenamiento los recuentos de HYL en las muestras tratadas superaban el límite establecido por el BOE (BOE, 2001) de 7 log UFC/g. En este caso la textura también se vio afectada con el tiempo de almacenamiento, sin diferencias significativas entre los tratamientos y el control.

Es importante destacar, que las frutas y verduras mínimamente procesadas son productos altamente perecederos y susceptibles al deterioro microbiano y enzimático, que repercute de forma directa sobre sus características sensoriales. El estudio de la actividad de enzimas tales como la PAL, PG y PME en frutillas mínimamente procesadas, aunque no fue abordado en la presente Tesis, resulta de gran importancia en este tipo de productos. Los tratamientos de preservación abordados en este Capítulo no lograron extender la vida útil del producto desde el punto de vista microbiológico y sensorial, y particularmente ninguno fue capaz de mejorar significativamente la textura, uno de los parámetros organolépticos claves en frutas y verduras MP. Por lo tanto, sería conveniente evaluar otros parámetros tales como la formulación de los recubrimientos,

o la frecuencia y potencia del ultrasonido, o nuevas tecnologías (simples y combinadas) para lograr extender la vida útil de frutillas de IV gama.

CAPÍTULO 6

Desarrollo de una bebida con efecto saciante basada en pulpa de frutilla: predominio temporal de sensaciones y estudio de expectativas

RESUMEN DEL CAPÍTULO

Diseñar alimentos con capacidad saciante no es una tarea sencilla. Hay que tener en cuenta varios factores al reformular un alimento o bebida. Los componentes, no sólo los macronutrientes sino también los ingredientes minoritarios como agentes saborizantes, podrían interactuar y afectar tanto la expectativa de saciedad del producto como su aceptabilidad. En el presente Capítulo, se desarrolló un batido a base de pulpa de frutilla; para su formulación, se evaluó la incorporación de fibras solubles (inulina + oligofruktosa) y proteína de leche (leche en polvo descremada), con y sin agregado de saborizante de frutilla. De esta manera se obtuvieron 6 batidos: formulación control (CON); control con saborizante (CON+sab); formulación con agregado de fibras (FIB); FIB con saborizante (FIB+sab); formulación con agregado de proteínas (PRO); y PRO con saborizante (PRO+sab). Por un lado, se estudió el impacto de las diferentes formulaciones sobre el perfil dinámico sensorial, mediante la evaluación del Predominio Temporal de Sensaciones (TDS, *Temporal Dominance of Sensations*) con un panel de 16 evaluadores entrenados. El TDS, a diferencia de un análisis descriptivo cuantitativo, evalúa atributos sensoriales a través del tiempo de consumo. Esta técnica no busca puntuar las intensidades de cada atributo sensorial, sino determinar la sensación que predomina en cada momento del tiempo de consumo del alimento o bebida. De esta manera, en cada momento el evaluador determina qué atributo percibe como dominante, hallando un perfil dinámico de las sensaciones predominantes del producto en cuestión. Por otro lado, se evaluó la aceptabilidad de los diferentes batidos y su expectativa de saciedad en un ensayo con consumidores ($n = 100$). Esta tarea se llevó a cabo en 3 escenarios diferentes: condición esperada (E), donde los consumidores evaluaron únicamente las etiquetas de los batidos; condición ciega (C), donde probaron el producto en ciego, sin información sobre su formulación; y condición informada (I), donde probaron el batido analizando en conjunto su etiqueta. Las etiquetas de los batidos llevaban diferentes declaraciones de acuerdo a su formulación: “fuente de fibra”, “fuente de proteína” y “sin saborizantes añadidos”, según correspondiera.

La ocurrencia y duración de atributos sensoriales claves (*sabor dulce, sabor ácido, sabor natural a frutilla, sabor a caramelo de frutilla, sabor a leche, consistencia espesa*) extraídos de las curvas de TDS, fueron analizadas y relacionadas con la composición de los batidos. Las curvas halladas en la TDS mostraron efectos tanto del

agregado de macronutrientes (fibras y proteínas) como de ingredientes minoritarios (saborizante). El análisis de las etiquetas en la condición E, indicó que las declaraciones acerca de fibra y proteína aumentaban la expectativa de saciedad y los consumidores las asociaban a productos más saludables. La aceptabilidad de los batidos, en cambio, no se vio afectada por la información de las etiquetas. Cuando los consumidores probaron los batidos, la expectativa de saciedad fue superior en las muestras con adición de proteína y de saborizante, probablemente debido al incremento en la consistencia espesa y en la intensidad de sabor, respectivamente. Sin embargo, su aceptabilidad fue significativamente más baja. Los puntajes de aceptabilidad resultaron superiores en aquellas muestras con fibras solubles, lo que prueba que la inulina y la oligofructosa imparten cambios positivos en las propiedades organolépticas de los batidos de frutilla.

Los patrones distintivos hallados en los diferentes perfiles de TDS fueron relacionados también con los resultados obtenidos en la condición ciega, donde los consumidores no contaban con información acerca de la composición del producto. De dicho análisis se concluyó que los consumidores podrían preferir muestras con perfiles sensoriales más complejos, donde se puede apreciar un mayor número de atributos sensoriales; y que la complejidad en el perfil sensorial dinámico podría impartir además un mayor efecto de saciedad. La comparación entre los tres escenarios evaluados (condiciones E, C e I) reveló la importancia de las características sensoriales con respecto a las señales de saciedad, ya que el incremento en la expectativa de saciedad alcanzado por ciertas declaraciones en la etiqueta solo permaneció en la condición informada si las características del producto también confirmaban dichas expectativas de saciedad.

1. INTRODUCCIÓN

En este Capítulo, se trabajó en el desarrollo de un producto con capacidad saciante a base de pulpa de frutilla, en el marco del Proyecto de Cooperación Bilateral Tipo II (CONICET-CSIC), dirigido por la Dra. Moreira y la Dra. Fiszman (contraparte española). Todos los estudios referidos al presente Capítulo fueron realizados en una estancia de investigación en el laboratorio de Propiedades Físicas y Sensoriales de Alimentos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC, Valencia, España).

Como se ha mencionado en la Introducción General de la presente Tesis, la obesidad y el sobrepeso continúan en alza en nuestro país y en el mundo, y una nueva estrategia para afrontar este problema consiste en el desarrollo de productos no sólo con bajo aporte calórico, sino que además presenten capacidad saciante (Marcano, Varela, Cunha, y Fiszman, 2015). La saciedad, definida por de Graaf (2011), es un sentimiento subjetivo de reducción en la motivación por comer, influida por varios factores, tales como la composición del alimento, sus parámetros sensoriales, y el interés del consumidor hacia el producto en cuestión.

Con respecto a la composición de macronutrientes, varios autores han demostrado que los alimentos con alto contenido de proteínas pueden mejorar la saciedad (Chungchunlam, Henare, Ganesh, y Moughan, 2017; Morell y Fiszman, 2017). También se ha demostrado que las proteínas contribuyen más que los carbohidratos o las grasas a la saciedad a corto plazo (Anderson, Tecimer, Shah, y Zafar, 2004). Por otro lado, no se ha alcanzado un consenso con respecto a los efectos de saciedad impartidos por los carbohidratos; sin embargo, las fibras podrían constituir una excepción, ya que alimentos ricos en fibra son normalmente reconocidos como más llenadores o saciantes que aquellos con bajo contenido (Anderson y col., 2009). Actualmente, el agregado de fibra a bebidas se ha convertido en un procedimiento habitual gracias a la aparición de nuevas fibras solubles y a los beneficios que el agregado de estos ingredientes puede ocasionar sobre la salud del consumidor (Viscione, 2013). En particular, las fibras solubles tales como inulina y oligofructosa, están siendo cada vez más utilizadas en el desarrollo de nuevos productos alimenticios. Ambas inulina y oligofructosa son ingredientes funcionales que ofrecen una combinación única de propiedades

nutricionales e importantes beneficios tecnológicos. En la formulación de alimentos, la inulina y la oligofructosa pueden mejorar significativamente las características organolépticas del producto (Franck, 2002), y han sido demostrados como efectivos compuestos prebióticos (Kolida, Tuohy, y Gibson, 2002).

La reformulación de alimentos ya existentes podría ser una de las formas más efectivas para obtener productos saludables con un incremento en la capacidad saciante. La reformulación de alimentos puede ser definida como un cambio en la composición de productos existentes removiendo, reduciendo, incrementando o agregando ciertos componentes alimenticios manteniendo sus características sensoriales originales. Es simple de decir, pero difícil de llevar a cabo ya que la mayoría de estas modificaciones normalmente afectan el perfil sensorial del producto reformulado. En general, los investigadores buscan que la aceptabilidad de los productos reformulados no disminuya comparada con aquella del producto original (Ünal y Akalin, 2013).

Las técnicas de análisis para hallar el perfil sensorial de un producto, tal como el análisis descriptivo cuantitativo (QDA), y aquellas que evalúan una característica sensorial a través del tiempo, como el análisis de tiempo-intensidad (TI, *Time-Intensity*), son herramientas tradicionales para la evaluación sensorial de un producto con panelistas entrenados. Por un lado, las técnicas para hallar un perfil sensorial proveen una evaluación estática de varios atributos en la misma cata, mientras que el análisis de TI se enfoca en un solo atributo durante la prueba y provee la evolución de su intensidad a través del tiempo. El predominio temporal de sensaciones (TDS, *Temporal Dominance of Sensations*) llena el hueco entre estas dos técnicas, ofreciendo un modo de evaluar simultáneamente varios atributos de forma dinámica a través del tiempo. Dado que discriminar dominancias es mucho más sencillo que puntuar intensidades, la evaluación de TDS es una tarea factible para consumidores no entrenados (Schlich, 2017). Esta metodología permite evaluar las percepciones sensoriales durante el período de consumo de un alimento o bebida; involucra la selección y continua actualización del atributo percibido como dominante; y provee una secuencia de datos para caracterizar diferentes productos (Castura y Li, 2016). Esta técnica no evalúa las intensidades de los atributos sensoriales, sino que estudia el perfil dinámico de las sensaciones predominantes.

La calidad sensorial del producto es crucial para su aceptación, pero otras características no sensoriales tales como su rótulo, envase, marca o precio también

pueden influir fuertemente en la aceptabilidad del consumidor. Consecuentemente, conocer cómo los consumidores perciben la información de la etiqueta o rótulo puede ser especialmente relevante para entender su respuesta ante nuevos productos saludables (Tarancón, Sanz, Fiszman, y Tárrega, 2014). Por ejemplo, Ares, Giménez, y Deliza (2010) investigaron la influencia del tipo de ingrediente funcional, su marca, el precio, y la presencia o no de declaraciones de salud, en la percepción de los consumidores sobre la elección de yogures funcionales, encontrando una dependencia de estos factores con la elección de compra. Entonces, tanto la respuesta hedónica como la predisposición actitudinal del consumidor hacia el producto, podrían ser alteradas por las declaraciones en el rótulo, junto con las experiencias sensoriales (Tuorila, Andersson, Martikainen, y Salovaara, 1998; Vidigal, Minim, Carvalho, Milagres, y Gonçalves, 2011).

La metodología de expectativas es un enfoque realista que toma en consideración cuánto les gustan a los consumidores las características sensoriales de un producto y los prejuicios que tienen acerca de ciertas características del mismo (Torres-Moreno, Tarrega, Torrescasana, y Blanch, 2012). Antes de que los consumidores prueben un producto en particular, usualmente tienen una idea o concepto previo de lo que esas características sensoriales podrían ser (expectativas sensoriales) y de cuánto les gustaría o disgustaría (expectativas hedónicas). Por lo tanto, las expectativas se podrían definir como una creencia previa acerca de un producto (Torres-Moreno y col., 2012; Beatriz Villegas, Carbonell, y Costell, 2008). Estas expectativas son creadas por las experiencias previas de los consumidores con el producto en cuestión, o por la opinión que tienen acerca de su envase y rótulo, características nutricionales y composición (Varela, Ares, Giménez, y Gámbaro, 2010).

En particular, en este Capítulo se estudió la reformulación de batidos a base de pulpa de frutilla, enriquecidos con fibras solubles y proteínas, para obtener una bebida con efecto saciante. Además, se evaluó el efecto de la incorporación de un agente saborizante. La adición de fibras y proteínas se ha estudiado en una gran variedad de productos; sin embargo, el efecto de la adición de estos componentes sobre la percepción dinámica de sensaciones ha sido muy poco investigado. En este contexto, los principales objetivos del presente Capítulo fueron estudiar: (a) cómo el enriquecimiento con fibras solubles y proteínas afecta el perfil dinámico de percepción de batidos de frutilla; (b) cómo el agregado de un agente saborizante afecta estos perfiles; (c) cómo afectan las declaraciones en la etiqueta del alimento a la aceptabilidad y a la expectativa

de saciedad del mismo, mediante un estudio de expectativas; y (d) la relación entre los cambios en la formulación, la percepción dinámica de sensaciones, la aceptabilidad y la expectativa de saciedad del producto.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Composición y preparación de las muestras

Se prepararon tres lotes de batidos de frutilla: una formulación control (CON), una formulación enriquecida con fibras (FIB), y una formulación enriquecida en proteína (PRO). La muestra CON se preparó con dos partes de pulpa natural de frutilla provista por Fruselva (Barcelona, España) y una parte de agua mineral (Bezoya, Segovia España) (v/v); leche en polvo descremada (6% p/v, La Asturiana, España) y 0,2% p/v de edulcorante comercial (ciclamato de sodio con sacarina de sodio, Hacendado, España).

Las formulaciones para los batidos FIB y PRO, se realizaron teniendo en cuenta el Capítulo V del CAA (normas para la rotulación y publicidad de los alimentos) y a la reglamentación europea (Reglamento N° 1924/2006 del parlamento europeo y del consejo: relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables de los alimentos). Según el CAA, para poder declarar a un alimento como “*Fuente de fibra*”, el mismo debe contener un mínimo de 3 g cada 100 g en productos sólidos ó 1,5 g cada 100 mL en el caso de alimentos líquidos. En la reglamentación europea, en cambio, no se hace distinción entre alimentos líquidos y sólidos, y solamente podrá declararse que un alimento es “*Fuente de fibra*”, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto contiene como mínimo 3 g de fibra por 100 g. En el caso de las proteínas, según el CAA, para poder declarar que un alimento es “*Fuente de proteína*”, el mismo debe asegurar un mínimo del 10% de la Dosis Diaria Recomendada (DDR) de referencia por 100 g (en el caso de alimentos sólidos) o un mínimo de 5% de la DDR de referencia por 100 mL (en el caso de alimentos líquidos). Esto se alcanzaría con aproximadamente 4 g de proteína cada 100 mL de batido. Por otro lado, según la reglamentación europea, solamente podrá declararse que un alimento es “*Fuente de proteínas*”, si las proteínas aportan como mínimo el 12% del valor energético del alimento. Teniendo en cuenta que se desea

desarrollar un producto con capacidad saciante, y para cumplir tanto con el CAA como con la reglamentación europea, se decidió trabajar de manera conservadora con 3 g de fibra cada 100 mL de batido para las muestras FIB y 6 g de proteína cada 100 mL de batido para las muestras PRO.

Luego, para preparar la muestra FIB, se añadieron 3 g de fibras solubles cada 100 mL de muestra CON. La fibra agregada consistió en una mezcla de fibras solubles inulina y oligofructosa (Sensus, Roosendaal, The Netherlands) en una proporción 5+3, de acuerdo a estudios previos llevados a cabo por Cassani y col. (2017). Para la formulación de la muestra PRO, se incrementó la cantidad de leche en polvo descremada de 6% a 18% (p/v) para alcanzar 6 g de proteína cada 100 mL de batido.

Finalmente, las tres muestras de batidos, CON, FIB y PRO, se dividieron en dos partes: una sin saborizante añadido y otra con 0,5% v/v de saborizante de frutilla (10569A, Lucta, Barcelona, España), obteniéndose así las muestras CON+sab, FIB+sab y PRO+sab, respectivamente.

2.2. Predominio Temporal de Sensaciones

Tres sesiones preliminares fueron llevadas a cabo para entrenar a un panel de 16 asesores con experiencia previa en evaluaciones sensoriales descriptivas, de acuerdo con la metodología propuesta por Agudelo y col. (2015). El panel fue conformado por 14 mujeres y 2 hombres. En la primera sesión, los participantes tuvieron que mencionar todas las sensaciones que sintieron en boca mientras probaban las seis muestras de batidos de frutilla (CON, FIB, PRO, CON+sab, FIB+sab, y PRO+sab). Los descriptores obtenidos fueron atributos relacionados con sabor y textura. Se generaron 16 atributos diferentes, 8 de sabor y 8 de textura.

En una segunda sesión, los atributos mencionados más frecuentemente fueron seleccionados y sus definiciones y el protocolo para detectarlos fue desarrollado hasta llegar a un consenso entre los panelistas (ver Tabla 6.1). Los seis atributos elegidos fueron: *sabor dulce*, *sabor ácido*, *sabor natural a frutilla*, *sabor a caramelo de frutilla*, *sabor a leche*, *consistencia espesa*.

Tabla 6.1: Atributos seleccionados para el TDS y sus definiciones consensuadas por los panelistas

Atributo	Descripción
<i>Sabor ácido</i>	Gusto básico de acidez
<i>Sabor dulce</i>	Gusto básico de dulzor
<i>Sabor natural a frutilla</i>	Sabor natural encontrado en frutillas
<i>Sabor a caramelo de frutilla</i>	Sabor artificial a frutilla, como aquel encontrado en caramelos
<i>Sabor a leche</i>	Sabor encontrado en leche
<i>Consistencia espesa</i>	Consistencia semi-sólida, pesada

En la tercera sesión, los participantes se familiarizaron con el concepto de sensación predominante y con la aparición secuencial de distintas sensaciones durante el consumo de un alimento. También se realizó una sesión simulada TDS con varias muestras de batidos de frutilla, para que los participantes se acostumbraran al programa de computación y a la metodología de evaluación.

A continuación, se llevaron a cabo dos sesiones formales de TDS de las seis muestras en diferentes días. Las muestras se presentaron codificadas con números aleatorios de 3 cifras, en orden aleatorio. Se les indicó a los panelistas que colocaran toda la muestra en sus bocas, siempre la misma cantidad (un sorbo de 15 mL) y simultáneamente que comenzaran el software pulsando el botón “Start”. Inmediatamente, los panelistas mostraron qué atributo de la lista percibieron como dominante pulsando dicho atributo en la pantalla. Cada vez que los panelistas sintieron un cambio en la percepción, pulsaron el botón correspondiente al nuevo atributo dominante. Se explicó a los panelistas que no era necesario utilizar todos los atributos de la lista, que podían seleccionar un atributo varias veces, y que sólo un atributo podía ser seleccionado a la vez. La evaluación continuó hasta que los panelistas tragaron la muestra completamente y no percibieron más sensaciones, punto en el cual pulsaron el botón “Stop”. El tiempo de consumo individual fue calculado como la media de los valores de consumo de las dos replicas para cada muestra, para cada panelista. La recolección de los datos fue llevada a cabo utilizando el sistema del software Fizz® (Biosystemes, Courtenon, Francia).

2.3. Estudio de expectativas

Para el estudio de expectativas, los batidos de frutilla fueron evaluados en 3 condiciones: esperada (E), ciega (C) e informada (I). En el estudio de expectativas

participaron 100 consumidores (69 mujeres y 31 hombres, de edades comprendidas entre 18 y 66 años).

En la primera parte, los participantes evaluaron únicamente la imagen de las etiquetas de los productos (condición E). Cada etiqueta contuvo diferente información de acuerdo a la composición de la muestra. En las etiquetas de las muestras FIB y FIB+sab, se colocó la declaración “*Fuente de fibra*”; mientras que en PRO y PRO+sab se declaró “*Fuente de proteína*”. Además, las muestras CON, FIB y PRO llevaron la declaración “*Sin saborizantes añadidos*”. Las etiquetas se presentaron en orden aleatorio, codificadas con números aleatorios de 3 dígitos. Se pidió a los consumidores que observaran atentamente las etiquetas e indicaran cuánto les gustaría ese batido, y cuán saciante y saludable consideraban al producto. La aceptabilidad se evaluó mediante una escala hedónica de 9 puntos, desde 1 (“*Me disgustaría muchísimo*”) hasta 9 (“*Me gustaría muchísimo*”); la estimación de cuán saludable encontraban cada batido, se llevó a cabo en una escala de 7 puntos, desde 1 (“*No me parece nada saludable*”) hasta 7 (“*Me parece muy saludable*”). La percepción de saciedad fue evaluada con una escala de 7 puntos, desde 1 (“*Me saciaría muy poco*”) hasta 7 (“*Me saciaría muchísimo*”), previo a la consigna: “*Imagina que vas a tomar un vaso entero de este batido. Indica en la escala que tan saciante te resultaría.*”.

En la segunda parte del estudio, se presentaron las seis muestras sin ninguna información (condición C) y se pidió a los consumidores que probaran cada muestra y evaluaran su aceptabilidad y percepción de saciedad, usando las mismas escalas que se utilizaron en la evaluación de las etiquetas. Finalmente, se presentaron las muestras junto con las imágenes de las etiquetas (condición I) y se les pidió a los consumidores nuevamente que probaran la muestra, miraran atentamente la etiqueta correspondiente e indicaran cuánto les gustaba y qué tan saciante les resultaba cada batido, utilizando las mismas escalas que en la condición en ciego.

Las evaluaciones fueron llevadas a cabo en un cuarto estandarizado según las normas (ISO, 2007) y las muestras se sirvieron en vasos de plástico blancos (de 30 mL de capacidad). Las etiquetas y las muestras se identificaron con números aleatorios de 3 dígitos y se presentaron de a una, siguiendo un diseño balanceado. Entre cada muestra, se proporcionó agua mineral a los consumidores para enjuagar sus bocas. La adquisición de datos se llevó a cabo con el software Compusense Five® y Compusense Cloud® (Compusense Inc., Guelph, Ont., Canada).

2.4. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos correspondientes a la evaluación del TDS, para cada participante y cada corrida, se recolectaron los atributos dominantes elegidos y los tiempos a los cuáles comenzó y terminó cada dominancia. Como la duración de la evaluación de TDS (hasta que se terminó de tragar la muestra y no se percibieron más sensaciones) fue diferente para cada participante (comprendida entre 15 y 40 s), los datos se normalizaron ajustándolos de acuerdo al tiempo de consumición de cada uno. Finalmente, las curvas de TDS se computaron de acuerdo al método descrito por Pineau y col. (2009), mediante el software Fizz v.2.4.5 (Biosystems, Counernon, France).

En el estudio de expectativas, se realizó un ANOVA sobre la aceptabilidad y la expectativa de saciedad teniendo en cuenta el tipo de formulación (CON, FIB y PRO), la adición (o no) del agente saborizante (sab), y su interacción, como factores fijos, y los consumidores como factor aleatorio, en cada condición evaluada (E, C e I). Se utilizó el test de Tukey para analizar las diferencias significativas entre muestras. Para estos análisis se utilizó el software XLStat 2016 (Addinsoft, Francia).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Predominio Temporal de Sensaciones

La Fig. 6.1 muestra las curvas de TDS correspondientes a las 6 muestras de batidos. Brevemente, las dos líneas dibujadas en los gráficos de TDS muestran el “nivel de probabilidad” (la proporción de selección que un atributo puede obtener al azar) y el “nivel de significancia” (el valor mínimo que debe tomar la proporción de selección para ser considerada significativa).



Fig. 6.1: Curvas de TDS para los diferentes batidos de frutilla. CON: formulación control; FIB: formulación enriquecida en fibra; PRO: formulación enriquecida en proteína; sab: saborizante artificial a frutilla.

Muestra control (CON). Principalmente, dos sensaciones resultaron predominantes a lo largo del tiempo de evaluación del batido CON. Las curvas de TDS muestran que el *sabor ácido* fue la sensación predominante al principio y al final de la evaluación, y además excediendo el nivel de probabilidad durante todo el período. La otra sensación significativa fue el *sabor natural a frutilla*, que también predominó durante casi todo el tiempo de la evaluación, alternándose con el *sabor ácido*, especialmente al final de la primera mitad del tiempo. Los atributos de *sabor dulce*, *consistencia espesa* y *sabor a*

caramelo de frutilla presentaron una leve ocurrencia, por encima del nivel de probabilidad entre el 60 y 70% del tiempo de consumo.

Muestra enriquecida con fibras (FIB). En esta muestra, el *sabor ácido* y el *sabor natural a frutilla* también dominaron el tiempo de evaluación, aunque con una tasa de dominancia más baja que en la muestra CON. La adición de fibras solubles podría atenuar la percepción de estos dos atributos. La tasa de dominancia del *sabor a leche* estuvo por encima del nivel de probabilidad durante casi todo el tiempo de evaluación y la *consistencia espesa* también presentó valores por encima del nivel de probabilidad, especialmente entre el 20 y 40% del período de evaluación. Villegas, Tárrega, Carbonell, y Costell (2010) estudiaron bebidas de vainilla y encontraron que diferentes niveles de inulina podían variar las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del producto; así, los consumidores percibieron diferencias sensoriales, principalmente en el *sabor dulce* y la *consistencia espesa* de las bebidas. En el presente caso, fue evidente que la adición de fibras solubles modificó los perfiles de percepción: el *sabor a leche* incrementó su tasa de dominancia excediendo el nivel de probabilidad atribuible a una sensación de *consistencia espesa* más dominante. En este sentido, la inulina ha demostrado mejorar considerablemente los atributos de textura (cremosidad, sensación en boca y suavidad) al ser aplicada en yogures reducidos en grasa (Kip, Meyer, y Jellema, 2006; Modzelewska-Kapitula y Klebukowska, 2009). De acuerdo con Alimi y col. (2013), niveles de inulina de 5 g por 100 g pueden contribuir a una textura más cremosa y crear una sensación en boca que puede reforzar la pérdida de cuerpo producida al reducir el contenido de azúcares o grasas.

Muestra enriquecida en proteína (PRO). Esta muestra presentó un perfil temporal completamente diferente a aquellos descriptos para las muestras CON y FIB. La sensación de *sabor a leche* fue significativamente dominante a través de todo el período de evaluación, mientras que la *consistencia espesa* dominó el principio y el medio, y se encontró por encima del nivel de probabilidad durante todo el período. El agregado de leche en polvo descremada para el enriquecimiento de proteína lógicamente contribuyó a un aumento de la viscosidad y por supuesto, al *sabor a leche*, que predominó sobre el resto de los atributos de sabor, tales como *ácido* o *sabor natural a frutilla*. El *sabor dulce* fue el único atributo que también presentó valores de dominancia sobre el nivel de

probabilidad (aunque por debajo del nivel de significancia) en varios períodos de la evaluación. Como en el caso del agregado de fibras solubles en la muestra FIB, el agregado de leche en polvo en la muestra PRO cambió el perfil temporal de sensaciones. En este punto es importante recordar que en el método TDS no es importante la intensidad a la cual se perciben las diferentes sensaciones, sino cuál sensación predomina en cada momento.

Muestra control con saborizante (CON+sab). La incorporación de un agente saborizante en la formulación control (muestra CON+sab) indujo algunos cambios en su perfil sensorial. El *sabor natural a frutilla* dejó de ser significativamente dominante, aunque su valor de dominancia excedió el nivel de probabilidad, así como también el *sabor a caramelo de frutilla*, implicando que los consumidores seleccionaron alternativamente uno u otro. Con respecto al *sabor ácido*, este atributo continuó siendo dominante en menor medida al principio del período de evaluación, pero con una mayor dominancia hacia el final. Por lo tanto, la adición de un agente saborizante tuvo un significativo impacto a través del consumo del batido, con menos notas ácidas al principio de la evaluación, y con la aparición de un *sabor a caramelo de frutilla*, que enmascaró el *sabor natural a frutilla*, resultando en un perfil más complejo. La ocurrencia de los atributos de *sabor dulce*, *sabor a leche*, y *consistencia espesa* no cambió debido a la incorporación de saborizante.

Muestra enriquecida en fibra con saborizante (FIB+sab). La adición de saborizante a la muestra FIB también atenuó la dominancia del *sabor ácido* en todo el tiempo de evaluación, como en el caso de la muestra CON. El *sabor a caramelo de frutilla* presentó mayor dominancia, superando el nivel de probabilidad en casi todo el período de evaluación, e incluso alcanzando un valor significativo de dominancia alrededor del primer tercio y la mitad del período de consumo. Las sensaciones de *sabor dulce*, *consistencia espesa*, y *sabor a leche* también superaron el nivel de probabilidad en varios puntos del tiempo de evaluación, con valores de dominancia superiores a los encontrados en la muestra FIB, que nuevamente demuestra que la incorporación de saborizante podría producir un perfil dinámico de sensaciones más complejo. En este caso, la adición de ambas fibras solubles y saborizante resultaron en una completa

disminución del *sabor natural a frutilla*, que permaneció por debajo del nivel de probabilidad en todo el período.

Muestra enriquecida en proteína con saborizante (PRO+sab). La adición de saborizante a la muestra PRO introdujo cambios interesantes en el perfil sensorial temporal. La muestra PRO+sab presentó una dominancia de la *consistencia espesa* al principio de la evaluación y en el período central, permaneciendo sobre el nivel de probabilidad hasta el 70% del tiempo de evaluación, mientras que el *sabor a leche* perdió predominancia y fue significativamente dominante únicamente al final de la evaluación (desde el 80% del tiempo hasta el final). El *sabor dulce* fue una nueva sensación dominante, percibida de manera significativa desde el 15% del tiempo hasta la mitad del período, y nuevamente desde el 65% hasta el final de la evaluación. El *sabor ácido* permaneció por debajo del nivel de probabilidad en todo el período de evaluación (al igual que la muestra PRO) y ambos sabores de frutilla (*natural* y *a caramelo*) tuvieron muy bajos valores de dominancia, enmascarados probablemente por el agregado de leche en polvo.

3.2. Evaluación de los consumidores: aceptabilidad y expectativa de saciedad

En el diseño de alimentos con capacidad saciante, es crucial identificar aquellas características del producto que generan una creencia anticipada de que va a ser saciante. Las expectativas de saciedad que los consumidores perciben cuando compran o comen un producto son influenciadas por muchos factores, tales como las características sensoriales, la información nutricional y los intereses y experiencias previas del consumidor. En esta parte del Capítulo se evaluará el impacto de las etiquetas y de las características sensoriales del producto sobre la aceptabilidad y la expectativa de saciedad.

3.2.1. Condición esperada (E): Evaluación de las etiquetas

En primera instancia, los consumidores evaluaron únicamente las etiquetas de los diferentes batidos (condición E) en términos de aceptabilidad y expectativa de saciedad. Además, se les pidió que evaluaran qué tan saludable les resultaba el producto de acuerdo a la información del rótulo.

La Tabla 6.2 muestra los puntajes medios obtenidos en la evaluación de las etiquetas de los diferentes batidos. Los resultados mostraron que la información proporcionada en la etiqueta afectó tanto la expectativa de saciedad como la percepción de saludable, pero no así la aceptabilidad del producto. Esto indica que los consumidores no asociaron la incorporación de fibras ni de proteínas con un detrimento de las propiedades sensoriales del batido. La declaración “sin saborizantes añadidos” tampoco afectó significativamente la aceptabilidad del producto.

Tabla 6.2: Puntajes medios de aceptabilidad, expectativa de saciedad y percepción de saludable obtenidos para las diferentes formulaciones en la condición E

Muestra	Aceptabilidad	Expectativa de saciedad	Saludable
CON	6,4 ^a	4,0 ^b	6,8 ^b
FIB	6,4 ^a	4,2 ^a	7,0 ^a
PRO	6,4 ^a	4,2 ^a	6,9 ^{ab}
CON+sab	6,4 ^a	4,0 ^b	6,5 ^c
FIB+sab	6,3 ^a	4,2 ^a	6,9 ^{ab}
PRO+sab	6,3 ^a	4,3 ^a	6,7 ^b

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre formulaciones.

CON: formulación control; FIB: formulación enriquecida en fibra; PRO: formulación enriquecida en proteína; sab: saborizante artificial a frutilla.

Por otro lado, sí se observaron diferencias significativas entre las etiquetas de los batidos en cuanto a la expectativa de saciedad y a cuán saludable les resultaba el producto. Con respecto a la expectativa de saciedad, se observó un leve aumento en aquellas muestras cuyas etiquetas mostraban las declaraciones referidas al agregado de fibras y proteínas, con o sin saborizante, con respecto al control. Con respecto a qué tan saludable les resultaría el batido, todas las muestras obtuvieron puntajes medios comprendidos entre 6,5 y 7,0, considerando a los 6 productos entre “bastante saludables” y “muy saludables”. El CON fue considerado significativamente más saludable que el CON+sab y las muestras FIB, PRO y FIB+sab obtuvieron los mayores puntajes. Esto indica que el consumidor asocia al agregado de fibras y proteínas con un mayor beneficio para la salud (en mayor medida en el caso de las fibras), y por el contrario, al agregado de saborizante, con un detrimento de esta característica.

Se ha observado que consumidores motivados pueden traducir un beneficio para la salud en un aumento en la aceptabilidad de un nuevo producto, o incluso si la aceptabilidad se mantiene constante, como en este caso, la intención de compra puede aumentar si cierto beneficio para la salud es esperado (Tuorila y col., 1998). En este

sentido, la adición de fibras y proteínas en batidos de fruta pareciera ser aceptada por el consumidor, sin cambios en la aceptabilidad con respecto al control, pero considerados significativamente más saludables. Luego, podrían constituir una opción viable para el desarrollo de batidos con capacidad saciante.

3.2.2. Condición ciega (C): Evaluación sensorial sin información y relación con el TDS

El siguiente paso en el estudio de expectativas consistió en la prueba en ciego, donde los consumidores evaluaron la aceptabilidad y expectativa de saciedad de los 6 batidos probando los mismos sin recibir información acerca de su contenido. La Tabla 6.3 muestra los resultados de esta evaluación.

Tabla 6.3: Puntajes medios de aceptabilidad y expectativa de saciedad obtenidos para las diferentes formulaciones en la condición C

Muestra	Aceptabilidad	Expectativa de saciedad
CON	4,7 ^c	3,6 ^c
FIB	5,4 ^{ab}	3,8 ^{bc}
PRO	3,8 ^d	4,0 ^b
CON+sab	5,2 ^{abc}	3,8 ^{bc}
FIB+sab	5,7 ^a	4,1 ^{ab}
PRO+sab	4,9 ^{bc}	4,3 ^a

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre formulaciones.

CON: formulación control; FIB: formulación enriquecida en fibra;

PRO: formulación enriquecida en proteína; sab: saborizante artificial a frutilla.

El tipo de formulación afectó significativamente la aceptabilidad de los batidos. En las muestras sin agregado de saborizante, los puntajes de aceptabilidad mostraron el siguiente orden: FIB > CON > PRO; con una aceptabilidad significativamente superior para la muestra FIB, y significativamente menor para la muestra PRO, comparadas con el control (CON). La misma tendencia se encontró para los puntajes de aceptabilidad en las muestras con saborizante: FIB+sab > CON+sab > PRO+sab. En este caso, no hubo diferencias significativas entre CON+sab y PRO+sab, mostrando un efecto de la adición de saborizante, que logró incrementar la aceptabilidad de la muestra PRO.

Los mayores puntajes de aceptabilidad correspondieron a las muestras FIB y FIB+sab, donde la adición de las fibras solubles, inulina y oligofructosa, aumentó los puntajes de aceptabilidad con respecto a la muestra CON. En concordancia con estos

resultados, en una reseña, Nair y col. (2010) indicaron que en estudios con consumidores, el agregado de inulina en bajas concentraciones a yogurt sin azúcar logró un aumento en la preferencia con respecto al yogur sin agregado de fibra, debido a su leve incremento en el sabor dulce y a su apariencia más cremosa. Además, fructooligosacáridos han demostrado enmascarar el gusto residual provocado por endulzantes artificiales tales como aspartamo y acesulfame K, así como también han mejorado el perfil de sabores global (Weidmann y Jager, 1997). Ambas fibras, inulina y oligofructosa, son compatibles para su agregado a gran variedad de bebidas, y son una elección frecuente para la fortificación de alimentos con fibras (Viscione, 2013).

Comparando esta tendencia con el análisis expuesto para TDS, podemos concluir que los consumidores muestran una preferencia hacia un punto intermedio entre la dominancia de los atributos *ácido/sabor natural a frutilla y sabor a leche/espeso*. La muestra FIB mostró una menor dominancia en el primer par de atributos mencionado y una mayor dominancia en el segundo, comparado con CON. Con respecto a la incorporación de saborizante en los batidos, analizando las curvas del análisis de TDS (Fig. 6.1), se observa que la adición de saborizante en las muestras CON y PRO disminuyó la dominancia de los previamente mencionados pares de atributos dominantes previamente mencionados (*ácido/sabor natural a frutilla y sabor a leche/espeso*, respectivamente), indicando que los consumidores prefieren muestras con perfiles sensoriales más complejos, donde un mayor número de sabores pueda ser apreciado. La adición del saborizante fue capaz de aumentar significativamente la aceptabilidad de la muestra PRO, sin diferencias significativas entre PRO+sab y CON.

El tipo de formulación también afectó significativamente la expectativa de saciedad. Ambas muestras con proteína (con y sin agregado de saborizante) aumentaron la expectativa de saciedad con respecto a la muestra control. Muchos estudios demostraron que las proteínas de leche incrementan la saciedad; por ejemplo, Veldhorst y col. (2009) realizaron un estudio en ciego con 25 adultos sanos y encontraron que un desayuno con 25% de energía proveniente de caseína resultó más saciante que un desayuno con un 10%. Se ha reportado un efecto de saciedad luego del consumo de productos lácteos, tales como leche descremada (Dove y col., 2009), leche chocolatada (Harper, James, Flint, y Astrup, 2007), queso con alto contenido en proteínas (Potier y col., 2009), y yogurt con bajo contenido en grasa (Tsuchiya, Almiron-Roig, Lluch, Guyonnet, y Drewnowski, 2006).

La incorporación del agente saborizante también incrementó la expectativa de saciedad de las muestras. La capacidad saciante de la muestra FIB no fue significativamente diferente con respecto al control; no obstante, la incorporación del saborizante aumentó la expectativa de saciedad en la muestra FIB+sab. La complejidad en el perfil dinámico sensorial ejercido por la incorporación de un saborizante a las muestras podría haber impartido una mayor capacidad saciante en las muestras FIB+sab.

3.2.3. Condición informada (I): Evaluación sensorial en conjunto con las etiquetas

El último paso en el estudio de expectativas es la evaluación de las muestras en conjunto con su etiqueta (condición I). Los resultados obtenidos en la condición informada para aceptabilidad y expectativa de saciedad de los batidos se muestran en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4: Puntajes medios de aceptabilidad y expectativa de saciedad obtenidos para las diferentes formulaciones en la condición I

Muestra	Aceptabilidad	Expectativa de saciedad
CON	4,7 ^b	3,7 ^d
FIB	5,4 ^a	4,0 ^{bcd}
PRO	4,1 ^c	4,2 ^{ab}
CON+sab	5,2 ^{ab}	3,8 ^{cd}
FIB+sab	5,6 ^a	4,1 ^{bc}
PRO+sab	5,2 ^{ab}	4,5 ^a

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre formulaciones.

CON: formulación control; FIB: formulación enriquecida en fibra; PRO: formulación enriquecida en proteína; sab: saborizante artificial a frutilla.

Las tendencias halladas en la aceptabilidad de las muestras sin saborizante bajo la condición I no cambiaron con respecto a las halladas en ciego. La muestra con agregado de fibras mantuvo un puntaje superior al de la muestra control, mientras que el agregado de proteína produjo una disminución en la aceptabilidad del producto. El tipo de formulación en los batidos con saborizante no mostró diferencias significativas en la aceptabilidad, mostrando un aumento en la muestra PRO+sab en comparación con la aceptabilidad obtenida en esta muestra durante la prueba en ciego.

Cuando el producto es elegido y luego probado, las características sensoriales y hedónicas esperadas son comparadas con las reales, lo cual conlleva a una confirmación o desconfirmación de esas expectativas. Esto puede, subsecuentemente, llevar a que el consumidor repita el consumo o que rechace el producto (Villegas y col., 2008). De acuerdo a Tuorila, Cardello, y Lesher (1994), las expectativas hedónicas y la información inmediata sobre un producto (etiqueta) se combinan para determinar la aceptabilidad real y entonces, posiblemente, afecten las decisiones de los consumidores. Estudios previos han demostrado que el efecto de las expectativas creadas por la información nutricional sobre las respuestas de los consumidores puede diferir de acuerdo a múltiples factores tales como el producto en sí, cómo se entrega la información al consumidor o de qué manera se incluye esta información en la etiqueta. Vidigal y col. (2011) estudiaron las expectativas de consumidores sobre cuatro jugos de frutas y encontraron que a pesar de que las declaraciones de salud influyeron positivamente en la aceptabilidad de los jugos, si el producto no resulta agradable para los consumidores, la información acerca de los beneficios para la salud no es significativamente suficiente para mejorar la aceptabilidad sensorial del producto.

Con respecto a la expectativa de saciedad, las muestras con fibras y con proteínas mostraron un pequeño incremento con respecto a los valores obtenidos en la condición C. A diferencia de los valores esperados en la condición E, sólo las muestras PRO, PRO+sab y FIB+sab mostraron una saciedad significativamente superior a la esperada en el CON. Es decir, el incremento en la expectativa de saciedad alcanzado por ciertas declaraciones en la etiqueta solo permaneció en la condición informada si las características del producto también confirmaban dichas expectativas de saciedad.

4. CONCLUSIONES

La evaluación de TDS mostró que la incorporación de inulina y oligofruktosa significativamente cambió el predominio de sensaciones percibidas durante el consumo de batidos de frutilla. El aumento en el contenido de proteína, indujo cambios drásticos en el perfil de sensaciones predominantes. Además, la adición de un agente saborizante resultó en un perfil más complejo, que enmascaró los tonos ácidos del batido de frutilla,

y disminuyó la dominancia del *sabor natural a frutilla* y el *sabor a leche*, mientras que aumentó la dominancia del *sabor dulce* y *sabor a caramelo de frutilla*.

El análisis de la valoración de las etiquetas por los consumidores, mostró que las declaraciones acerca del contenido de fibra y proteína en el producto no cambiaron la expectativa de aceptabilidad; sin embargo, aumentaron la expectativa de saciedad y los consumidores las asociaron a productos más saludables.

Cuando los consumidores evaluaron los batidos, se observó que el enriquecimiento con proteína resultó en un incremento significativo de la expectativa de saciedad del batido comparado con la formulación control; sin embargo, su aceptabilidad fue significativamente más baja. En este sentido, la incorporación de un agente saborizante pudo mejorar el puntaje de aceptabilidad de la muestra PRO. Los puntajes de aceptabilidad resultaron superiores en aquellas muestras con fibras solubles, lo que prueba que la inulina y la oligofructosa imparten cambios positivos en las propiedades organolépticas de los batidos de frutilla. Con respecto a la expectativa de saciedad de la formulación enriquecida con fibras, no se encontraron cambios significativos con respecto al control. Sin embargo, al incorporar el agente saborizante, la muestra enriquecida en fibra mejoró su capacidad saciante comparado con el control.

Los patrones distintivos hallados en los diferentes perfiles sensoriales fueron relacionados también con los puntajes obtenidos de aceptabilidad y de expectativa de saciedad en la condición ciega, donde los consumidores no contaban con información acerca de la composición del producto. Relacionando estos resultados con las curvas halladas en el TDS, se llegó a la conclusión de que los consumidores prefieren muestras con perfiles sensoriales más complejos, donde se puede apreciar un mayor número de atributos sensoriales; y además, la complejidad en el perfil sensorial dinámico podría impartir una mayor sensación de saciedad de los batidos de frutas.

La comparación entre los tres escenarios evaluados (condiciones E, C e I) reveló la importancia de las características sensoriales con respecto a las señales de saciedad, ya que el incremento en la expectativa de saciedad alcanzado por ciertas declaraciones en la etiqueta solo permaneció en la condición informada si las características del producto también confirmaban dichas expectativas de saciedad.

Diseñar alimentos con capacidad saciante no es una tarea sencilla. Varios factores se deben tener en cuenta a la hora de reformular un alimento o bebida. La composición no sólo de los macronutrientes, pero también de los ingredientes minoritarios, tales

como saborizantes, puede interactuar y eventualmente afectar la capacidad saciante de un producto alimenticio, así como también su aceptabilidad. En general, la adición de fibras solubles podría ser una buena alternativa para el diseño de batidos de frutas y leche bajos en grasas y libres de azúcar, con capacidad saciante.

CONCLUSIONES GENERALES

El desarrollo de las investigaciones, cuyos resultados se presentaron en los capítulos anteriores, permitió dar cumplimiento a los objetivos específicos planteados en la presente Tesis Doctoral.

En el transcurso de esta Tesis se llevaron a cabo los estudios *in vitro* de biopreservantes con potencial aplicación en jugos de fruta y frutas de IV gama. A partir de los resultados obtenidos, se concluye que:

- ✓ La vainillina y el geraniol mostraron actividad antimicrobiana significativa frente a patógenos Gram positivos y negativos de importancia en la industria de alimentos, tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157H:7 y *Pseudomona aeruginosa*.
- ✓ La vainillina y el geraniol mostraron potencial para actuar como inhibidores de la actividad *quorum sensing* a bajas concentraciones (entre 2,6 y 5,0 veces menores que la MCI), considerando que fueron capaces de interrumpir la comunicación bacteriana, inhibiendo la producción de violaceína del *C. violaceum* sin afectar su crecimiento.

La aplicación *in vivo* de los diferentes agentes preservantes naturales y de tratamientos de ultrasonido sobre jugo de frutilla, permitió llegar a las siguientes conclusiones:

- ✓ La vainillina y el geraniol demostraron ser excelentes agentes antimicrobianos, disminuyendo los recuentos de bacterias mesófilas y psicrófilas, hongos y levaduras, además de inhibir el crecimiento de *E. coli* inoculado en jugo de frutilla. Además, la vainillina incrementó el contenido de polifenoles totales en el jugo con respecto al control. Sin embargo, estos biopreservantes impartieron un fuerte olor y sabor en los jugos, alterando sus características sensoriales.
- ✓ El extracto de granada incrementó la capacidad antioxidante del jugo de frutilla y logró mantener sus características sensoriales similares a las del control. Por otro lado, el efecto del EG sobre los recuentos de la microflora nativa fue menos significativo que en el caso de la vainillina y el geraniol, y no se encontraron diferencias significativas en los recuentos de las poblaciones de hongos y levaduras, ni en el crecimiento del patógeno inoculado, entre la muestra tratada con granada y la muestra control.

-
- ✓ El ultrasonido como tratamiento físico no térmico no logró disminuir la carga microbiana inicial, pero sí la tasa de crecimiento de las poblaciones microbianas estudiadas, aunque en menor medida que V y G. Además, el ultrasonido incrementó la capacidad antioxidante sin afectar la calidad sensorial del jugo de frutilla.

Con estos resultados, se prosiguió con la combinación de barreras sobre jugo de frutilla, concluyendo que:

- ✓ La metodología de superficie de respuesta junto con la función Deseabilidad permitió determinar los niveles óptimos de cada barrera en las dos combinaciones propuestas para mejorar la calidad global de jugo de frutilla. Estos tratamientos óptimos fueron: 7,5 minutos de tratamiento de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,9375 mg/mL de vainillina (OPT1) y 30 min de tratamiento de ultrasonido + 360 µg /mL de extracto de granada + 0,15 µL/mL de geraniol (OPT2).
- ✓ Los jugos de frutilla tratados con OPT1 y OPT2 tuvieron recuentos por debajo del límite microbiológico incluso al día 14 de almacenamiento, evidenciando una significativa prolongación de la vida útil desde el punto de vista microbiológico con respecto al control. En cuanto a la inhibición del *E. coli* inoculado, los recuentos del patógeno no fueron detectados (< 2 log) en las muestras tratadas con las combinaciones óptimas a día 14.
- ✓ El enfoque estadístico utilizado fue muy útil para alcanzar un compromiso entre las diferentes respuestas estudiadas, reduciendo la carga microbiana, y a la vez, maximizando las propiedades nutricionales y minimizando el impacto en la calidad sensorial del jugo de frutilla.
- ✓ La combinación de barreras permitió hallar dos tratamientos óptimos que lograron estabilizar microbiológicamente el jugo de frutilla sin pasteurizar por 14 días, aumentando incluso la capacidad antioxidante del producto, con una vida útil limitada fundamentalmente por sus atributos sensoriales.

Otra tecnología de preservación estudiada en esta Tesis fue la aplicación de recubrimientos comestibles (basados en gelano y quitosano) en frutilla cortada con y sin

el agregado de biopreservantes. También fue evaluado en forma paralela el tratamiento de ultrasonido. De los resultados obtenidos, se concluye que:

- ✓ Los recubrimientos de gelano sin agregado de biopreservantes no tuvieron efectos significativos en el control de la microflora de frutilla cortada. La incorporación de extracto de granada en los recubrimientos de gelano tampoco logró una disminución de los recuentos de la microflora nativa de frutillas cortadas; por otro lado, la incorporación de geraniol en ambas concentraciones evaluadas redujo significativamente los recuentos de bacterias mesófilas, psicrófilas y hongos y levaduras, comparado con las muestra control.
- ✓ Los recubrimientos de quitosano fueron efectivos en la reducción inicial de la microflora nativa de las frutillas cortadas, incluso sin biopreservantes añadidos. A lo largo del almacenamiento no se logró una disminución del número de bacterias mesófilas, pero sí se redujeron las psicrófilas y los hongos y levaduras con respecto al control. El agregado de los biopreservantes, en este caso, no mostró una mejora significativa del poder antimicrobiano de los recubrimientos de quitosano *per se*.
- ✓ Los tratamientos de ultrasonido evaluados sobre frutilla cortada mostraron una leve, pero significativa, inhibición de la microflora nativa del producto. Sin embargo, la vida útil del producto desde el punto de vista microbiológico no se logró extender, ya que hacia el final del almacenamiento los recuentos de HYL en las muestras tratadas superaban el límite establecido de 7 log UFC/g.
- ✓ En todos los casos, la textura de las frutillas cortadas se vio afectada con el tiempo de almacenamiento, y los tratamientos evaluados no lograron mejorar este atributo, limitando así la vida útil del producto.

Finalmente, se trabajó en el desarrollo de una bebida con efecto saciante basada en pulpa de frutilla con agregado de fibras solubles y proteína, llegando a las siguientes conclusiones:

- ✓ El análisis de la valoración de las etiquetas por los consumidores, mostró que las declaraciones acerca del contenido de fibra y proteína en el producto no cambiaron la expectativa de aceptabilidad; sin embargo, aumentaron la expectativa de saciedad y los consumidores las asociaban a productos más saludables.

-
- ✓ El enriquecimiento con proteína resultó en un incremento significativo de la expectativa de saciedad del batido comparado con la formulación control; sin embargo, su aceptabilidad fue significativamente más baja. En este sentido, la incorporación de un agente saborizante pudo mejorar el puntaje de aceptabilidad de la muestra enriquecida en proteína.
 - ✓ El enriquecimiento con fibras solubles resultó en un aumento en los puntajes de aceptabilidad de los batidos, sin cambios significativos en la expectativa de saciedad con respecto al control. Sin embargo, al incorporar el agente saborizante, la muestra enriquecida en fibra mejoró su capacidad saciante comparado con el control.
 - ✓ Los consumidores podrían preferir muestras con perfiles sensoriales más complejos, donde se puede apreciar un mayor número de atributos sensoriales; y además, la complejidad en el perfil sensorial dinámico podría impartir una mayor sensación de saciedad de los batidos de frutas.
 - ✓ La adición de fibras solubles podría ser una buena alternativa para el diseño de batidos de frutas y leche bajos en grasas y libres de azúcar, con capacidad saciante.

En forma general, se puede concluir que el desarrollo de la presente Tesis Doctoral contribuyó a ampliar los conocimientos en referencia al uso de tecnologías emergentes de preservación para la conservación de jugos de frutilla sin pasteurizar y frutillas mínimamente procesadas. Particularmente, este trabajo proveyó valiosa información acerca de la implementación de tratamientos combinados sobre jugo de frutilla sin pasteurizar, su optimización mediante el uso de herramientas matemáticas y su impacto sobre la calidad microbiológica, nutricional y organoléptica del producto. Además, se investigaron nuevas técnicas de análisis sensorial para el desarrollo de una bebida funcional.

Como proyección de este trabajo, se espera continuar esta línea de investigación para avanzar en la definición de los siguientes aspectos, no dilucidados hasta el momento. Con el objeto de obtener un producto de aplicación industrial, es necesario abordar investigaciones futuras que incluyan la aplicación de estas tecnologías en sistema continuo y que involucren mayores volúmenes de procesamiento. En cuanto a la frutilla cortada, otros recubrimientos se podrían evaluar con la incorporación de

diferentes aditivos para lograr una mejora significativa en las propiedades organolépticas del producto. Al mismo tiempo, es necesaria la combinación con otras tecnologías emergentes, tales como luz pulsada, luz UV y pulsos eléctricos, a modo de lograr una extensión mayor de la vida útil. Se evidencia la necesidad de estudiar otros factores de calidad importantes en productos frutícolas, tanto en jugos como en frutas de IV gama, como son el estudio de la actividad enzimática de enzimas como la polifenoloxidasa, pectinmetilesterasa y poligalacturonasa, y la evaluación de los tratamientos sobre otros microorganismos de relevancia en frutas como *Rhizopus*, *Penicillium* y *Botrytis*.

REFERENCIAS

- Aadil, R. M., Zeng, X. A., Han, Z., y Sun, D. W. (2013). Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, *141*(3), 3201–3206. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.008>
- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., y Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, *123*(1–2), 121–129. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013>
- Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M. M., Hu, B., Lei, S., ... Zeng, X. (2013). Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*(5), 1182–1187. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.02.010>
- Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M. M., Hu, B., Lei, S., y Zeng, X. (2014). Sonication enhances polyphenolic compounds, sugars, carotenoids and mineral elements of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, *21*(1), 93–97. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.06.002>
- Adekunte, A. O., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Scannell, A. G. M., y O'Donnell, C. P. (2010). Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, *122*(3), 500–507. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.026>
- Adonizio, A. L., Downum, K., Bennett, B. C., y Mathee, K. (2006). Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *Journal of Ethnopharmacology*, *105*(3), 427–435. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2005.11.025>
- Agudelo, A., Varela, P., y Fiszman, S. (2015). Methods for a deeper understanding of the sensory perception of fruit fillings. *Food Hydrocolloids*, *46*, 160–171. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.024>
- Aguilar, K., Garvín, A., Ibarz, A., y Augusto, P. E. D. (2017). Ascorbic acid stability in fruit juices during thermosonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, *37*, 375–381. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.029>
- Aguiló-Aguayo, I., Charles, F., Renard, C. M. G. C., Page, D., y Carlin, F. (2013). Pulsed light effects on surface decontamination, physical qualities and nutritional composition of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *86*, 29–36. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.011>
- Ahmad, S. T., Arjumand, W., Seth, A., Nafees, S., Rashid, S., Ali, N., y Sultana, S. (2011). Preclinical renal cancer chemopreventive efficacy of geraniol by

-
- modulation of multiple molecular pathways. *Toxicology*, 290(1), 69–81.
<http://doi.org/10.1016/j.tox.2011.08.020>
- Alcantara-González, M. L., Cabrera-Sixto, M., García-Barrón, S., Martínez-Soto, G., y Ramírez-Robles, J. (1995). Harvest and Postharvest Technologies for Fresh Fruits and Vegetables: Proceedings of the International Conference. En *Strawberry quality in relation to postharvest handling* (pp. 198–205).
- Alimi, M., Mizani, M., Naderi, G., y Shokoohi, S. (2013). Effect of inulin formulation on the microstructure and viscoelastic properties of low-fat mayonnaise containing modified starch. *Journal of Applied Polymer Science*, 130(2), 801–809.
<http://doi.org/10.1002/app.39159>
- Al-Jedah, J. H., y Robinson, R. K. (2002). Nutritional Value and Microbiological Safety of Fresh Fruit Juices sold through Retail Outlets in Qatar. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(2), 79–81. <http://doi.org/10.3923/pjn.2002.79.81>
- Altenhofen da Silva, M., Bierhalz, A. C. K., y Kieckbusch, T. G. (2009). Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*, 77(4), 736–742.
<http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.02.014>
- Alvarez, M. V., Moreira, M. R., y Ponce, A. (2012). Anti-quorum sensing and antimicrobial activity of natural agents with potential use in food. *Journal of Food Safety*, 32(3), 379–387. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2012.00390.x>
- Alvarez, M. V., Ortega-Ramirez, L. A., Gutierrez-Pacheco, M. M., Bernal-Mercado, A. T., Rodriguez-Garcia, I., Gonzalez-Aguilar, G. A., ... Ayala-Zavala, J. F. (2014). Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–7.
<http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00699>
- Alvarez, M. V., Ponce, A. G., y Moreira, M. R. (2013). Antimicrobial efficiency of chitosan coating enriched with bioactive compounds to improve the safety of fresh cut broccoli. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 78–87.
<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.06.021>
- Anderson, G. H., Tecimer, S. N., Shah, D., y Zafar, T. A. (2004). Protein source, quantity, and time of consumption determine the effect of proteins on short-term food intake in young men. *The Journal of Nutrition*, 134(11), 3011–3015.
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis Jr, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., ...

- Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, 67(4), 188–205. <http://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x>
- Aneja, K. R., Dhiman, R., Aggarwal, N. K., y Aneja, A. (2014). Emerging preservation techniques for controlling spoilage and pathogenic microorganisms in fruit juices. *International Journal of Microbiology*, 2014, 758942. <http://doi.org/10.1155/2014/758942>
- Ares, G., Giménez, A., y Deliza, R. (2010). Influence of three non-sensory factors on consumer choice of functional yogurts over regular ones. *Food Quality and Preference*, 21(4), 361–367. <http://doi.org/10.1016/j.foodqual.2009.09.002>
- Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilkh, K., y Versteeg, C. (2008). Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 155–160. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.05.005>
- Aslan, N., y Cebeci, Y. (2007). Application of Box–Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals. *Fuel*, 86(1), 90–97. <http://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.06.010>
- Atkinson, R. G., Sutherland, P. W., Johnston, S. L., Gunaseelan, K., Hallett, I. C., Mitra, D., ... Schaffer, R. J. (2012). Down-regulation of POLYGALACTURONASE1 alters firmness, tensile strength and water loss in apple (*Malus x domestica*) fruit. *BMC Plant Biology*, 12, 129. <http://doi.org/10.1186/1471-2229-12-129>
- Ayala-Zavala, J. F., Del-Toro-Sanchez, L., Alvarez-Parrilla, E., y Gonzalez-Aguilar, G. A. (2008). High relative humidity in-package of fresh-cut fruits and vegetables: advantage or disadvantage considering microbiological problems and antimicrobial delivering systems? *Journal of Food Science*, 73(4), 41-7. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00705.x>
- Azaraksh, N., Osman, A., Ghazali, H. M., Tan, C. P., y Mohd Adzahan, N. (2013). Effect of limonene incorporation into gellan-based edible coating on the changes in microbiological and sensory characteristics of fresh-cut pineapple during cold storage. *Acta Horticulturae*, 1012, 999–1004
- Azaraksh, N., Osman, A., Ghazali, H. M., Tan, C. P., y Mohd Adzahan, N. (2014). Lemongrass essential oil incorporated into alginate-based edible coating for shelf-life extension and quality retention of fresh-cut pineapple. *Postharvest Biology and Technology*, 88, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.09.004>

-
- Aziz, N. H., Farag, S. E., Mousa, L. A., y Abo-Zaid, M. A. (1998). Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*, 93(374), 43–54.
- Bard, M., Albrecht, M. R., Gupta, N., Guynn, C. J., y Stillwell, W. (1988). Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. *Lipids*, 23(6), 534–538. <http://doi.org/10.1007/BF02535593>
- Barrett, D. M., Beaulieu, J. C., y 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. <http://doi.org/10.1080/10408391003626322>
- Barry-Ryan, C. (2015). Physical and chemical methods for food preservation using natural antimicrobials. En T. M. Taylor (Ed.), *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality* (pp. 211–228). Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1016/B978-1-78242-034-7.00010-4>
- Barry-Ryan, C., Pacussi, J. M., y O’Beirne, D. (2000). Quality of Shredded Carrots as Affected by Packaging Film and Storage Temperature. *Journal of Food Science*, 65(4), 726–730. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16080.x>
- Bates, R. P., Morris, J. R., y Crandall, P. G. (2001). *Principles and Practices of Small and Medium Scale Fruit Juice Processing*. Roma.
- Bautista-Baños, S., Bosquez-Molina, E., y Barrera-Necha, L. L. (2014). Chapter 1 – *Rhizopus stolonifer* (Soft Rot). En S. Bautista-Baños (Ed.), *Postharvest Decay. Control Strategies* (pp. 1–44). Walthman, MA: Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00001-6>
- Baxter, R. L., Laurie, W. A., y McHale, D. (1978). Transformations of monoterpenoids in aqueous acids: The reactions of linalool, geraniol, nerol and their acetates in aqueous citric acid. *Tetrahedron*, 34(14), 2195–2199. [http://doi.org/10.1016/0040-4020\(78\)89026-7](http://doi.org/10.1016/0040-4020(78)89026-7)
- Bermejo-Prada, A., y Otero, L. (2016). Effect of hyperbaric storage at room temperature on color degradation of strawberry juice. *Journal of Food Engineering*, 169, 141–148. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.08.030>
- Besser, R. E., Lett, S. M., Weber, J. T., Michael, P., Barrett, T. J., Wells, J. G., y Griffin, P. M. (1993). An Outbreak of Diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome From *Escherichia coli* O157:H7 in Fresh-Pressed Apple Cider. *Journal of the*

- American Medical Association*, 269(17), 2217-2220.
- Bhat, R., Kamaruddin, N. S. B. C., Min-Tze, L., y Karim, A. A. (2011). Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(6), 1295–1300. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.04.002>
- Bhattacharya, A., Sood, P., y Citovsky, V. (2010). The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular Plant Pathology*, 11(5). <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x>
- Bicas, J. L., Neri-Numa, I. A., Ruiz, A. L. T. G., De Carvalho, J. E., y Pastore, G. M. (2011). Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. *Food and Chemical Toxicology*, 49(7), 1610–1615. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.012>
- Bilek, S. E., y Turantaş, F. (2013). Decontamination efficiency of high power ultrasound in the fruit and vegetable industry, a review. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 155–162. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.028>
- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E., y Robinson, R. K. (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(6), 637–645. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000501\)80:6<637::AID-JSFA603>3.0.CO;2-1](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000501)80:6<637::AID-JSFA603>3.0.CO;2-1)
- Blasa, M., Gennari, L., Angelino, D., y Ninfali, P. (2010). Chapter 3 – Fruit and Vegetable Antioxidants in Health. En *Bioactive Foods in Promoting Health* (pp. 37–58). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374628-3.00003-7>
- Błaszczak, W., Amarowicz, R., y Górecki, A. R. (2017). Antioxidant capacity, phenolic composition and microbial stability of aronia juice subjected to high hydrostatic pressure processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 39, 141–147. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.12.005>
- BOE. (2001). Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. *Boletín Oficial Del Estado*, 11, 1435–1441.
- Bortolomeazzi, R., Sebastianutto, N., Toniolo, R., y Pizzariello, A. (2007). Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin

-
- bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chemistry*, 100(4), 1481–1489. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.039>
- Brasil, I. M., Gomes, C., Puerta-Gomez, A., Castell-Perez, M. E., y Moreira, R. G. (2012). Polysaccharide-based multilayered antimicrobial edible coating enhances quality of fresh-cut papaya. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 39–45. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.005>
- Brilhante São José, J. F., y Dantas Vanetti, M. C. (2012). Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. *Food Control*, 24(1), 95–99. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.008>
- Buendia, B., Gil, M. I., Tudela, J. A., Gady, A. L., Medina, J. J., Soria, C., ... Tomas-Barberan, F. A. (2010). HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3916–3926. <http://doi.org/10.1021/jf9030597>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Butz, P., y Tauscher, B. (2002). Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International*, 35(2), 279–284. [http://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00197-1](http://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00197-1)
- Cagri, A., Ustunol, Z., y Ryser, E. T. (2001). Antimicrobial, Mechanical, and Moisture Barrier Properties of Low pH Whey Protein-based Edible Films Containing p-Aminobenzoic or Sorbic Acids. *Journal of Food Science*, 66(6), 865–870. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15188.x>
- Cao, S., Hu, Z., Pang, B., Wang, H., Xie, H., y Wu, F. (2010). Effect of ultrasound treatment on fruit decay and quality maintenance in strawberry after harvest. *Food Control*, 21(4), 529–532. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.08.002>
- Cao, X., Zhang, Y., Zhang, F., Wang, Y., Yi, J., y Liao, X. (2011). Effects of high hydrostatic pressure on enzymes, phenolic compounds, anthocyanins, polymeric color and color of strawberry pulps. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(5), 877–885. <http://doi.org/10.1002/jsfa.4260>
- Carbonell, L., Izquierdo, L., y Carbonell, I. (2007). Sensory analysis of Spanish mandarin juices. Selection of attributes and panel performance. *Food Quality and*

- Preference*, 18(2), 329–341. <http://doi.org/10.1016/j.foodqual.2006.02.008>
- Cassani, L., Tomadoni, B., Moreira, M. R., Ponce, A., y Agüero, M. V. (2017). Optimization of inulin: Oligofructose proportion and non-thermal processing to enhance microbiological and sensory properties of fiber-enriched strawberry juice. *LWT - Food Science and Technology*, 80, 446–455. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.016>
- Castura, J. C., y Li, M. (2016). Using TDS dyads and other dominance sequences to characterize products and investigate liking changes. *Food Quality and Preference*, 47, 109–121. <http://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.06.019>
- Cava-Roda, R. M., Taboada-Rodríguez, A., Valverde-Franco, M. T., y Marín-Iniesta, F. (2012). Antimicrobial Activity of Vanillin and Mixtures with Cinnamon and Clove Essential Oils in Controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Milk. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 2120–2131. <http://doi.org/10.1007/s11947-010-0484-4>
- Cerrutti, P., Alzamora, S. M., y Vidales, S. L. (1997). Vanillin as an Antimicrobial for Producing Shelf-stable Strawberry Puree. *Journal of Food Science*, 62(3), 608–610. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04442.x>
- Chambi, H., y Grosso, C. (2006). Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*, 39(4), 458–466. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.09.009>
- Char, C. D., Guerrero, S. N., y Alzamora, S. M. (2010). Mild thermal process combined with vanillin plus citral to help shorten the inactivation time for *Listeria innocua* in orange juice. *Food and Bioprocess Technology*, 3(5), 752–761. <http://doi.org/10.1007/s11947-008-0155-x>
- Char, C. D., Mitilinaki, E., Guerrero, S. N., y Alzamora, S. M. (2010). Use of High-Intensity Ultrasound and UV-C Light to Inactivate Some Microorganisms in Fruit Juices. *Food and Bioprocess Technology*, 3(6), 797–803. <http://doi.org/10.1007/s11947-009-0307-7>
- Chemat, F., Zill-e-Huma, y Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Chen, M.-J., Chen, K.-N., y Lin, C.-W. (2004). Sequential Quadratic Programming for Development of a New Probiotic Dairy Tofu with Glucono- δ -Lactone. *Journal of*

-
- Food Science*, 69(7), 344–350. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13640.x>
- Chen, W., y Viljoen, A. M. (2010). Geraniol - A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany*, 76(4), 643–651. <http://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.008>
- Chen, Z., y Zhu, C. (2011). Combined effects of aqueous chlorine dioxide and ultrasonic treatments on postharvest storage quality of plum fruit (*Prunus salicina* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 61(2), 117–123. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.03.006>
- Cheng, G. W., y Breen, P. J. (1991). Activity of Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) and Concentrations of Anthocyanins and Phenolics in Developing Strawberry Fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(5), 865–869. <http://doi.org/10.1111/j.2042-7166.2011.01124.x>
- Cheng, L. H., Soh, C. Y., Liew, S. C., y Teh, F. F. (2007). Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. *Food Chemistry*, 104(4), 1396–1401. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.001>
- Chien, P.-J., y Chou, C.-C. (2006). Antifungal activity of chitosan and its application to control post-harvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (*Citrus tankan* Hayata). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(12), 1964–1969. <http://doi.org/10.1002/jsfa.2570>
- Choo, J. H., Rukayadi, Y., y Hwang, J.-K. (2006). Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Letters in Applied Microbiology*, 42(6), 637–41. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01928.x>
- Chungchunlam, S. M. S., Henare, S. J., Ganesh, S., y Moughan, P. J. (2017). Effects of whey protein and its two major protein components on satiety and food intake in normal-weight women. *Physiology & Behavior*, 175, 113–118. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.044>
- Cid-Pérez, T. S., y López-Malo, A. (2011). Extractos de Vainilla: una mezcla de componenetes quimicos de aroma y sabor. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5(1), 51-63.
- CLSI. (2003). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved standard* (6ta ed.). Wayne, PA, EEUU.
- Corbo, M. R., Del Nobile, M. A., y Sinigaglia, M. (2006). A novel approach for calculating shelf life of minimally processed vegetables. *International Journal of*

- Food Microbiology*, 106(1), 69–73.
<http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.012>
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., y Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 170–175. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x>
- Cruz-Cansino, N. del S., Ramírez-Moreno, E., León-Rivera, J. E., Delgado-Olivares, L., Alanís-García, E., Ariza-Ortega, J. A., ... Jaramillo-Bustos, D. P. (2015). Shelf life, physicochemical, microbiological and antioxidant properties of purple cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice after thermoultrasound treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 277–286. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.05.040>
- Cruz-Cansino, N. del S., Reyes-Hernández, I., Delgado-Olivares, L., Jaramillo-Bustos, D. P., Ariza-Ortega, J. A., y Ramírez-Moreno, E. (2016). Effect of ultrasound on survival and growth of *Escherichia coli* in cactus pear juice during storage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 431–437. <http://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.014>
- Cruz-Valenzuela, M. R., Carrasco-Lugo, D. K., Vega-Vega, V., Gonzalez-Aguilar, G. A., y Ayala-Zavala, J. F. (2013). Fresh-cut orange treated with its own seed by-products presented higher antioxidant capacity and lower microbial growth. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation*, 3(1), 13–27. <http://doi.org/10.1504/IJPTI.2013.051987>
- Dadalioglu, I., y Evrendilek, G. A. (2004). Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8255–8260. <http://doi.org/10.1021/jf049033e>
- Dahham, S. S., Ali, N., Tabassum, H., y Khan, M. (2010). Studies on Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.). *Journal of Environmental Sciences*, 9(3), 273–281. <http://doi.org/10.3412/jsb.21.609>
- Dalleau, S., Cateau, E., Berges, T., Berjeaud, J.-M., y Imbert, C. (2008). *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(6), 572–576. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.028>
- Dang, Q. F., Yan, J. Q., Li, Y., Cheng, X. J., Liu, C. S., y Chen, X. G. (2010). Chitosan

-
- Acetate as an Active Coating Material and Its Effects on the Storing of *Prunus avium* L. *Journal of Food Science*, 75(2), 125–131. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01483.x>
- Danyluk, M. D., Schneider, K. R., Harris, L. J., y Worobo, R. W. (2012). Outbreaks of Foodborne Disease Associated with Fruit and Vegetable Juices, 1922–2010. *EDIS Publication FSHN12-04*. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FS/FS18800.pdf>
- de Graaf, C. (2011). Trustworthy satiety claims are good for science and society. Comment on “Satiety. No way to slim”. *Appetite*, 57(3), 778–783. <http://doi.org/10.1016/j.appet.2011.05.312>
- de Sousa Guedes, J. P., da Costa Medeiros, J. A., de Souza E Silva, R. S., de Sousa, J. M. B., da Conceição, M. L., y de Souza, E. L. (2016). The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 183–192. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.005>
- Derringer, G. C. (1994). A Balancing Act: Optimizing a Product’s Properties. *Quality Progress*, 27(6), 51–58.
- Derringer, G., y Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12, 214–219.
- do Rosário, D. K. A., da Silva Mutz, Y., Peixoto, J. M. C., Oliveira, S. B. S., de Carvalho, R. V., Carneiro, J. C. S., ... Bernardes, P. C. (2017). Ultrasound improves chemical reduction of natural contaminant microbiota and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* on strawberries. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 23–29. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.009>
- Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., y Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1908–1914. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.003>
- Dorman, H. J., y Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
- Dove, E. R., Hodgson, J. M., Puddey, I. B., Beilin, L. J., Lee, Y. P., y Mori, T. A. (2009). Skim milk compared with a fruit drink acutely reduces appetite and energy

- intake in overweight men and women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(1), 70–75. <http://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27411>
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L., y Wilson, C. L. (2000). Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 19(1), 103–110. [http://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00076-4](http://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00076-4)
- Ertugay, M. F., y Başlar, M. (2014). The effect of ultrasonic treatments on cloudy quality-related quality parameters in apple juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26, 226–231. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.06.013>
- Escarpa, A., y González, M. (2001). Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427(1), 119–127. [http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01188-0](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01188-0)
- Fabra, M. J., Jiménez, A., Atarés, L., Talens, P., y Chiralt, A. (2009). Effect of fatty acids and beeswax addition on properties of sodium caseinate dispersions and films. *Biomacromolecules*, 10(6), 1500–1507. <http://doi.org/10.1021/bm900098p>
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., y Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology*, 22(6), 292–303. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.02.004>
- FDA. (2001). Hazard Analysis and Critical Control Point (HAACP); Procedures for the Safe and Sanitary Processing and Importing of Juice. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 120 – Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) Systems, 1–66.
- Feng, H., y Yang, W. (2010). Ultrasonic Processing. En H. Q. Zhang, G. V. Barbosa-Cánovas, V. M. Balasubramaniam, C. P. Dunne, D. F. Farkas, y J. T. C. Yuan (Eds.), *Nonthermal Processing Technologies for Food*. Oxford, Reino Unido: Wiley-Blackwell. <http://doi.org/10.1002/9780470958360.ch10>
- Ferrante, S., Guerrero, S., y Alzamora, S. M. (2007). Combined Use of Ultrasound and Natural Antimicrobials To Inactivate *Listeria monocytogenes* in Orange Juice, 70(8), 1850–1856.
- Ferrario, M., Alzamora, S. M., y Guerrero, S. (2015). Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound. *Food Microbiology*, 46, 635–642. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.017>

-
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M. ., Gasson, M. J., y Narbad, A. (2004). The Potential Application of Vanillin in Preventing Yeast Spoilage of Soft Drinks and Fruit Juices. *Journal of Food Protection*, 67(2), 391–395.
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Gasson, M. J., Ueckert, J., Bos, A., y Narbad, A. (2004). Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*, 97(1), 104–13. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02275.x>
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M., y Narbad, A. (2003). Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 113–122.
- Fraire-Cordero, M. L., Yáñez-Morales, M. J., Nieto-Angel, D., y Vázquez-Gálvez, G. (2003). Hongos Patógenos en Fruto de Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en Postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 285–291.
- Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *The British Journal of Nutrition*, 87(2), 287–291. <http://doi.org/10.1079/BJNBJN/2002550>
- Franssen, L. R., y Krochta, J. M. (2003). 12 – Edible coatings containing natural antimicrobials for processed foods. En *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods* (pp. 250–262). <http://doi.org/10.1533/9781855737037.250>
- Freitas, J., De Andrade, N. J., Mota, A., Dantas, M. C., Stringheta, P. C., y Paes, J. B. (2014). Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. *Food Control*, 45, 36–50. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.015>
- Gabriel, A. A. (2015). Combinations of selected physical and chemical hurdles to inactivate *Escherichia coli* O157: H7 in apple and orange juices. *Food Control*, 50, 722–728. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.017>
- Garzon, G. a., y Wrolstad, R. E. (2002). Comparison of the Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins in. *Food of Food Science*, 67(4), 1288–1299. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10277.x>
- Glazer, I., Masaphy, S., Marciano, P., Bar-Ilan, I., Holland, D., Kerem, Z., y Amir, R. (2012). Partial identification of antifungal compounds from *Punica granatum* peel extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(19), 4841–4848. <http://doi.org/10.1021/jf300330y>
- Gogate, P. R., y Kabadi, A. M. (2009). A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1),

- 60–72. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.006>
- Gómez-López, V. M., Orsolani, L., Martínez-Yépez, A., y Tapia, M. S. (2010). Microbiological and sensory quality of sonicated calcium-added orange juice. *LWT - Food Science and Technology*, 43(5), 808–813. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.008>
- González-Aguilar, G. A., Valenzuela-Soto, E., Lizardi-Mendoza, J., Goycoolea, F., Martínez-Téllez, M. A., Villegas-Ochoa, M. A., ... Ayala-Zavala, J. F. (2009). Effect of chitosan coating in preventing deterioration and preserving the quality of fresh-cut papaya “Maradol”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(1), 15–23. <http://doi.org/10.1002/jsfa.3405>
- Goodburn, C., y Wallace, C. A. (2013). The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review. *Food Control*, 32(2), 418–427. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.012>
- Gouma, M., Gayán, E., Raso, J., Condón, S., y Álvarez, I. (2015). Inactivation of spoilage yeasts in apple juice by UV–C light and in combination with mild heat. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 146–155. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.008>
- Goyeneche, R., Roura, S., Ponce, A., Vega-Gálvez, A., Quispe-Fuentes, I., Uribe, E., y Di Scala, K. (2015). Chemical characterization and antioxidant capacity of red radish (*Raphanus sativus* L.) leaves and roots. *Journal of Functional Foods*, 16, 256–264. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.049>
- Guerreiro, A. C., Gago, C. M. L., Faleiro, M. L., Miguel, M. G. C., y Antunes, M. D. C. (2015). The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 226–233. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.09.002>
- Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., ... Ozkan, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*, 103(4), 1449–1456. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.061>
- Gupta, S., Chatterjee, S., Vaishnav, J., Kumar, V., Variyar, P. S., y Sharma, A. (2012). Hurdle technology for shelf stable minimally processed French beans (*Phaseolus vulgaris*): A response surface methodology approach. *LWT - Food Science and Technology*, 48(2), 182–189. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.010>

-
- Harper, A., James, A., Flint, A., y Astrup, A. (2007). Increased satiety after intake of a chocolate milk drink compared with a carbonated beverage, but no difference in subsequent *ad libitum* lunch intake. *The British Journal of Nutrition*, 97(3), 579–583. <http://doi.org/10.1017/S0007114507339846>
- Harris, L. J., Farber, J. N., Beuchat, L. R., Parish, M. E., Suslow, T. V., Garrett, E. H., y Busta, F. F. (2003). Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 78–141. <http://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00031.x>
- Hayek, S. A., Gyawali, R., y Ibrahim, S. A. (2013). Antimicrobial Natural Products. *Formatex*, 910–921.
- Heaton, J. C., y Jones, K. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 104(3), 613–26. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03587.x>
- Heinonen, I. M., Meyer, A. S., y Frankel, E. N. (1998). Antioxidant Activity of Berry Phenolics on Human Low-Density Lipoprotein and Liposome Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4107–4112. <http://doi.org/10.1021/jf980181c>
- Helander, I. M., von Wright, A., y Mattila-Sandholm, T.-M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 8(5), 146–150. [http://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01030-3](http://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01030-3)
- Heng Koh, T., y Melton, L. D. (2002). Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. *Postharvest Biology and Technology*, 26(1), 23–33. [http://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00003-0](http://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00003-0)
- Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Del Valle, V., Velez, D., y Gavara, R. (2008). Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria × ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 110(2), 428–435. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.020>
- Hossain, A., Begum, P., Salma Zannat, M., Hafizur Rahman, M., Ahsan, M., y Islam, S. N. (2016). Nutrient composition of strawberry genotypes cultivated in a horticulture farm. *Food Chemistry*, 199, 648–652. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.056>

- Howell, A. B., y D'Souza, H. D. (2013). The pomegranate: effects on bacteria and viruses that influence human health effects on human bacteria bacteria that affect the human body. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 606212.
- HPA. (2009). *Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods*. Londres: Health Protection Agency.
- Idigoras, G. (2014). Producción y procesamiento de productos frutihortícolas. *Ministerio de Agricultura, Ganadería Y Pesca de La Nación. Plan Nacional de Ciencia, Tecnología E Innovación Productiva. Argentina Innovadora 2020*.
- Ingham, S. C., Schoeller, E. L., y Engel, R. A. (2006). Pathogen reduction in unpasteurized apple cider: adding cranberry juice to enhance the lethality of warm hold and freeze-thaw steps. *Journal of Food Protection*, 69(2), 293–298.
- ISO. (2007). General guidance for the design of test rooms. En *Standard no. 8589:2007*. Geneva: International Organization for Standardization.
- Jagadish, R. S., Divyashree, K. N., Viswanath, P., Srinivas, P., y Raj, B. (2012). Preparation of N-vanillyl chitosan and 4-hydroxybenzyl chitosan and their physico-mechanical, optical, barrier, and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 110–116. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.024>
- Jiménez, J. B., Orea, J. M., Montero, C., González Ureña, Á., Navas, E., Slowing, K., ... De Martinis, D. (2005). Resveratrol treatment controls microbial flora, prolongs shelf life, and preserves nutritional quality of fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1526–1530. <http://doi.org/10.1021/jf048426a>
- Jongsri, P., Wangsomboondee, T., y Rojsitthisak, P. (2016). Effect of molecular weights of chitosan coating on postharvest quality and physicochemical characteristics of mango fruit. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 28–36. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.038>
- Ju, Z. Y., y Howard, L. R. (2003). Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5207–5213.
- Kapoor, I. P. S., Singh, B., y Singh, G. (2008). Essential oil and oleoresins of cinnamomum tamala (tejpat) as natural food preservatives for pineapple fruit juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32(5), 719–728. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2008.00200.x>

-
- Kappachery, S., Paul, D., Yoon, J., y Kweon, J. H. (2010). Vanillin, a potential agent to prevent biofouling of reverse osmosis membrane. *Biofouling*, 26(6), 667–72. <http://doi.org/10.1080/08927014.2010.506573>
- Kaya, Z., Yıldız, S., y Ünlütürk, S. (2015). Effect of UV-C irradiation and heat treatment on the shelf life stability of a lemon–melon juice blend: multivariate statistical approach. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 29, 230–239. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.03.005>
- Khan, I., Tango, C. N., Miskeen, S., Lee, B. H., y Oh, D.-H. (2016). Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety-A review. *Food Control*, 73, 1426–1444. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.010>
- Khandpur, P., y Gogate, P. R. (2015a). Effect of novel ultrasound based processing on the nutrition quality of different fruit and vegetable juices. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 125–136. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.05.008>
- Khandpur, P., y Gogate, P. R. (2015b). Understanding the effect of novel approaches based on ultrasound on sensory profile of orange juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 87–95. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.05.001>
- Khokhlova, M. A., Gallyamov, M. O., y Khokhlov, A. R. (2012). Chitosan nanostructures deposited from solutions in carbonic acid on a model substrate as resolved by AFM. *Colloid and Polymer Science*, 290(15), 1471–1480. <http://doi.org/10.1007/s00396-012-2673-3>
- Kim, J., Marshall, M. R., y Wei, C. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(11), 2839–2845. article. <http://doi.org/10.1021/jf00059a013>
- Kim, S.-H., Bae, H. C., Park, E.-J., Lee, C. R., Kim, B.-J., Lee, S., ... Jeon, J.-H. (2011). Geraniol inhibits prostate cancer growth by targeting cell cycle and apoptosis pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407(1), 129–134. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.124>
- Kip, P., Meyer, D., y Jellema, R. H. (2006). Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. *International Dairy Journal*, 16(9), 1098–1103. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.011>
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., y Lee, D. U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 15(5), 261–266. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.12.001>

- Kolida, S., Tuohy, K., y Gibson, G. R. (2002). Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *The British Journal of Nutrition*, 87(2), S193–S197. <http://doi.org/10.1079/BJNBJN/2002537>
- Kuehl, R. (2001). *Diseño de experimentos* (2da ed.). Thompson Learning Intl.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., y Nychas, G.-J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–462. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E., y Gardini, F. (2004). Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science and Technology*, 15(3–4), 201–208. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.004>
- Landi, L., Feliziani, E., y Romanazzi, G. (2014). Expression of Defense Genes in Strawberry Fruits Treated with Different Resistance Inducers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(14), 3047–3056. <http://doi.org/10.1021/jf404423x>
- Leal, M. (2016). *Estudio panorámico de vigilancia tecnológica e inteligencia competitiva: alimentos funcionales* (1ra Ed.). Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.
- Lee, S. Y., y Jin, H. H. (2008). Inhibitory activity of natural antimicrobial compounds alone or in combination with nisin against *Enterobacter sakazakii*. *Letters in Applied Microbiology*, 47(4), 315–321. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02432.x>
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1–3), 181–186. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00161-6](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00161-6)
- Leistner, L., y Gould, G. W. (2002). The Hurdle Concept. In *Hurdle Technologies: Combination Treatments for Food Stability, Safety and Quality* (pp. 17–28). inbook, Boston, MA: Springer EEUU. http://doi.org/10.1007/978-1-4615-0743-7_2
- Leite, C. J. B., de Sousa, J. P., da Costa Medeiros, J. A., da Conceição, M. L., dos Santos Falcão-Silva, V., y de Souza, E. L. (2016). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella Enteritidis* by *Cymbopogon citratus* D.C.

-
- Stapf. Essential Oil in Pineapple Juice. *Journal of Food Protection*, 79(2), 213–219. article. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-245>
- Li, Y., Sun, X., Bi, Y., Ge, Y., y Wang, Y. (2009). Antifungal Activity of Chitosan on *Fusarium sulphureum* in Relation to Dry Rot of Potato Tuber. *Agricultural Sciences in China*, 8(5), 597–604. [http://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60251-5](http://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60251-5)
- Lieu, L. N., y Le, V. V. M. (2010). Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(1), 273–279. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.05.002>
- Lin, D., y Zhao, Y. (2007). Innovations in the Development and Application of Edible Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6(3), 60–75. <http://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2007.00018.x>
- Liu, J., Tian, S., Meng, X., y Xu, Y. (2007). Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44(3), 300–306. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.12.019>
- Lucera, A., Şimşek, F., Conte, A., y Del Nobile, M. A. (2012). Minimally processed butternut squash shelf life. *Journal of Food Engineering*, 113(2), 322–328. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.05.026>
- Luo, K., Kim, S. Y., Wang, J., y Oh, D.-H. (2016). A combined hurdle approach of slightly acidic electrolyzed water simultaneous with ultrasound to inactivate *Bacillus cereus* on potato. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 615–621. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.016>
- Madankumar, A., Jayakumar, S., Gokuladhas, K., Rajan, B., Raghunandhakumar, S., Asokkumar, S., y Devaki, T. (2013). Geraniol modulates tongue and hepatic phase I and phase II conjugation activities and may contribute directly to the chemopreventive activity against experimental oral carcinogenesis. *European Journal of Pharmacology*, 705(1), 148–155. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.02.048>
- Maftoonazad, N., Ramaswamy, H. S., Moalemiyan, M., y Kushalappa, A. C. (2007). Effect of pectin-based edible emulsion coating on changes in quality of avocado exposed to *Lasiodiplodia theobromae* infection. *Carbohydrate Polymers*, 68(2), 341–349. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.11.020>

- MAGyP. (2014). Argentina: Sector frutícola. *Dirección Nacional de Relaciones Agroalimentarias Internacionales. Subsecretaría de Coordinación Política. Secretaría de Coordinación Político-Institucional Y Emergencia Agropecuaria.*
- Mañas, P., y Pagán, R. (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1387–1399. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02561.x>
- Marcano, J., Varela, P., Cunha, L. M., y Fiszman, S. (2015). Relating dynamic perception of reformulated cheese pies to consumers' expectations of satiating ability. *Food Research International*, 78, 369–377. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.005>
- Marin, L., Simionescu, B., y Barboiu, M. (2012). Imino-chitosan biodynamers. *Chemical Communications (Cambridge, Inglaterra)*, 48(70), 8778–8780. <http://doi.org/10.1039/c2cc34337a>
- Marin, L., Stoica, I., Mares, M., Dinu, V., Simionescu, B. C., y Barboiu, M. (2013). Antifungal vanillin–imino-chitosan biodynamic films. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(27), 3353. <http://doi.org/10.1039/c3tb20558d>
- Mármol, Z., Páez, G., Rinc, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C., y Gutiérrez, E. (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*, (1), 53–58.
- Matasyoh, J. C., Wagara, I. N., Nakavuma, J. L., y Kiburai, A. M. (2011). Chemical composition of *Cymbopogon citratus* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus* species. *African Journal of Food Science*, 5, 138–142.
- Meng, X., Li, B., Liu, J., y Tian, S. (2008). Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry*, 106(2), 501–508. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.012>
- Meng, X., y Tian, S. (2009). Effects of preharvest application of antagonistic yeast combined with chitosan on decay and quality of harvested table grape fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(11), 1838–1842. <http://doi.org/10.1002/jsfa.3659>
- Meng, X., Yang, L., Kennedy, J. F., y Tian, S. (2010). Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydrate Polymers*, 81(1), 70–75.

<http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.057>

- Meng, X.-H., Qin, G.-Z., y Tian, S.-P. (2010). Influences of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* combined with postharvest chitosan coating on postharvest diseases and quality of table grapes in storage. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 596–601. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.10.007>
- Millan-Sango, D., McElhatton, A., y Valdramidis, V. P. (2015). Determination of the efficacy of ultrasound in combination with essential oil of oregano for the decontamination of *Escherichia coli* on inoculated lettuce leaves. *Food Research International*, 67, 145–154. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.001>
- Miller, A., y Keller, S. (2005). Microbiological Safety of Fresh Citrus and Apple Juices. En *Microbiology of Fruits and Vegetables* (pp. 211–230). CHAP, CRC Press. <http://doi.org/doi:10.1201/9781420038934.ch9>
- Mith, H., Duré, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G., y Clinquart, A. (2014, July). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science & Nutrition*. Oxford, Reino Unido. <http://doi.org/10.1002/fsn3.116>
- Modzelewska-Kapitula, M., y Klebukowska, L. (2009). Investigation of the potential for using inulin HPX as a fat replacer in yoghurt production. *International Journal of Dairy Technology*, 62(2), 209–214. <http://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00481.x>
- Montgomery, D. C., Peck, E. A., y Vining, G. G. (2006). Regresión lineal simple. In *Introducción al análisis de regresión lineal* (3ra ed., pp. 13–60). Mexico D.F.: Compañía Editorial Continental.
- Moon, K.-D., Delaquis, P., Toivonen, P., y Stanich, K. (2006). Effect of vanillin on the fate of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in a model apple juice medium and in apple juice. *Food Microbiology*, 23(2), 169–174. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2005.02.005>
- Moreira, M. R., Tomadoni, B., Martín-belloso, O., Fortuny, R. S., Soliva-fortuny, R., y Moreira, M. R. (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. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.002>
- Morell, P., y Fiszman, S. (2017). Revisiting the role of protein-induced satiation and

- satiety. *Food Hydrocolloids*, 68, 199–210.
<http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.003>
- Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R. M., y Martín-Belloso, O. (2012). Microbiological shelf life and sensory evaluation of fruit juices treated by high-intensity pulsed electric fields and antimicrobials. *Food and Bioprocess Processing*, 90(2), 205–214. <http://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.03.004>
- Nair, K. K., Kharb, S., y Thompkinson, D. K. (2010). Inulin Dietary Fiber with Functional and Health Attributes—A Review. *Food Reviews International*, 26(2), 189–203. article. <http://doi.org/10.1080/87559121003590664>
- Nazer, A. I., Kobilinsky, A., Tholozan, J.-L., y Dubois-Brissonnet, F. (2005). Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? *Food Microbiology*, 22(5), 391–398. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2004.10.003>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., y Coppola, R. (2013). Quorum sensing and phytochemicals. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12607–12619. <http://doi.org/10.3390/ijms140612607>
- Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 7–17. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006>
- O'Donnell, C. P., Tiwari, B. K. K., Bourke, P., Cullen, P. J. J., O'Donnell, C. P., Tiwari, B. K. K., ... Cullen, P. J. J. (2010). Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 358–367. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.007>
- Olasupo, N. A., Fitzgerald, D. J., Gasson, M. J., y Narbad, A. (2003). Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology*, 37(6), 448–451. <http://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01427.x>
- Ölmez, H. (2016). Chapter 9 – Foodborne pathogenic bacteria in fresh-cut vegetables and fruits. *Food Hygiene and Toxicology in Ready to Eat Foods*, 151–166. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-801916-0.00009-1>
- Ölmez, H., y Kretzschmar, U. (2009). Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT - Food Science and Technology*, 42(3), 686–693.

<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.001>

- OMS. (2011). Consumir más frutas y verduras salvaría 1,7 millones de vidas al año. *Organización Mundial de la Salud*. Disponible en: http://www.paho.org/arg/index.php?option=com_contentyview=articleid=762yItemid=234
- Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., y Martín-Belloso, O. (2008). Using polysaccharide-based edible coatings to enhance quality and antioxidant properties of fresh-cut melon. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 1862–1870. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.01.007>
- Outbreak Data Base. (2011). Jaquith Strawberry Farm Strawberries. Disponible en: <http://www.outbreakdatabase.com/details/jaquith-strawberry-farm-strawberries-2011/?outbreak=berries>
- Pagella, C., Spigno, G., y De Faveri, D. M. (2002). Characterization of Starch Based Edible Coatings. *Food and Bioproducts Processing*, 80(3), 193–198. <http://doi.org/10.1205/096030802760309214>
- Pagliarulo, C., De Vito, V., Picariello, G., Colicchio, R., Pastore, G., Salvatore, P., y Volpe, M. G. (2016). Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Food Chemistry*, 190, 824–831. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.028>
- Palma-Guerrero, J., Huang, I.-C., Jansson, H.-B., Salinas, J., Lopez-Llorca, L. V., y Read, N. D. (2009). Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner. *Fungal Genetics and Biology*, 46(8), 585–594. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.02.010>
- Palma-Guerrero, J., Lopez-Jimenez, J. A., Pérez-Berná, A. J., Huang, I.-C., Jansson, H.-B., Salinas, J., ... Lopez-Llorca, L. V. (2010). Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Molecular Microbiology*, 75(4), 1021–1032. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07039.x>
- Palou, E., Hernández-Salgado, C., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G., y Welti-Chanes, J. (2000). High pressure-processed guacamole. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(1), 69–75. [http://doi.org/10.1016/S1466-8564\(99\)00002-8](http://doi.org/10.1016/S1466-8564(99)00002-8)
- Parish, M. E. (2008). Public Health and Nonpasteurized Fruit Juices, *Critical Reviews in*

- Microbiology*, 23(2), 109-119. <http://doi.org/10.3109/10408419709115132>
- Parthasarathy, V. A., Chempakam, B., y Zachariah, J. T. (2008). *Ginger. Chemistry of Spices*. Wallingford, Reino Unido: CABI Pub. <http://doi.org/10.1079/9781845934057.0000>
- Patil, S., Bourke, P., Kelly, B., Frías, J. M., y Cullen, P. J. (2009). The effects of acid adaptation on *Escherichia coli* inactivation using power ultrasound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 486–490. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.06.005>
- Patras, A., Brunton, N. P., Da Pieve, S., y Butler, F. (2009). Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(3), 308–313. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.12.004>
- Peng, H., Xiong, H., Li, J., Xie, M., Liu, Y., Bai, C., y Chen, L. (2010). Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. *Food Chemistry*, 121(1), 23–28. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.085>
- Pereda, M., Aranguren, M. I., y Marcovich, N. E. (2009). Water vapor absorption and permeability of films based on chitosan and sodium caseinate. *Journal of Applied Polymer Science*, 111(6), 2777–2784. <http://doi.org/10.1002/app.29347>
- Pétrier, C., Combet, E., y Mason, T. (2007). Oxygen-induced concurrent ultrasonic degradation of volatile and non-volatile aromatic compounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(2), 117–121. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2006.04.007>
- Pineau, N., Schlich, P., Cordelle, S., Mathonnière, C., Issanchou, S., Imbert, A., ... Köster, E. (2009). Temporal Dominance of Sensations: Construction of the TDS curves and comparison with time-intensity. *Food Quality and Preference*, 20(6), 450–455. <http://doi.org/10.1016/j.foodqual.2009.04.005>
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.-S., y Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*, 31(2), 593–606. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.039>
- Piyasena, P., Mohareb, E., y McKellar, R. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 207–216. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00075-8](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00075-8)
- Pokorný, J. (2003). 3 – Natural antioxidants. En *Food Preservation Techniques* (pp. 31–

-
- 48). <http://doi.org/10.1533/9781855737143.1.31>
- Ponce, A. G., Agüero, M. V., Roura, S. I., Del Valle, C. E., y Moreira, M. R. (2008). Dynamics of indigenous microbial populations of butter head lettuce grown in mulch and on bare soil. *Journal of Food Science*, 73(6), 257-63.
- Ponce, A. G., Fritz, R., del Valle, C., y Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Science and Technology*, 36(7), 679–684. [http://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00088-4](http://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4)
- Ponce, A. G., Roura, S. I., del Valle, C. E., y Moreira, M. R. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. *Postharvest Biology and Technology*, 49(2), 294–300. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.02.013>
- Ponce, A. G., Valle, C., y Roura, S. I. (2004). Shelf Life of Leafy Vegetables Treated with Natural Essential Oils. *Journal of Food Science*, 69(2), 50-56. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb15515.x>
- Ponnusamy, K., Paul, D., y Kweon, J. H. (2009). Inhibition of Quorum Sensing Mechanism, 26(8).
- Potier, M., Fromentin, G., Calvez, J., Benamouzig, R., Martin-Rouas, C., Pichon, L., ... Marsset-Baglieri, A. (2009). A high-protein, moderate-energy, regular cheesy snack is energetically compensated in human subjects. *The British Journal of Nutrition*, 102(4), 625–631. <http://doi.org/10.1017/S0007114509236026>
- Proteggente, A. R., Pannala, A. S., Paganga, G., Van Buren, L., Wagner, E., Wiseman, S., ... Rice-Evans, C. A. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research*, 36(2), 217–233.
- Puttongsiri, T., y Haruenkit, R. (2010). Changes in ascorbic acid, total polyphenol, phenolic acids and antioxidant activity in juice extracted from coated kiew wan tangerine during storage at 4, 12 and 20°C. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 44(2), 280–289.
- Qadri, O. S., Yousuf, B., Srivastava, A. K., y Yildiz, F. (2015). Fresh-cut fruits and vegetables: Critical factors influencing microbiology and novel approaches to prevent microbial risks—A review. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1), 1121606. <http://doi.org/10.1080/23311932.2015.1121606>
- Qu, W., Breksa III, A. P., Pan, Z., Ma, H., Breksa, A. P., Pan, Z., y Ma, H. (2012).

- Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. *Food Chemistry*, 132(3), 1585–1591. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.106>
- R Development Core Team. (2011). R project. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Ragaert, P., Devlieghere, F., Loos, S., Dewulf, J., Van Langenhove, H., y Debevere, J. (2006). Metabolite production of yeasts on a strawberry-agar during storage at 7°C in air and low oxygen atmosphere. *Food Microbiology*, 23(2), 154–161. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2005.02.002>
- Rahman, S., Khan, I., y Oh, D.-H. (2016). Electrolyzed Water as a Novel Sanitizer in the Food Industry: Current Trends and Future Perspectives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(3), 471–490. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12200>
- Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B. K., Noci, F., Koutchma, T., y Brunton, N. (2011). Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*, 44(7), 1875–1887. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.053>
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., y Martín-Belloso, O. (2006). Antimicrobial Activity of Essential Oils on *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in Fruit Juices, *Journal of Food Protection*, 69(7), 1579–1586.
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., y 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. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.010>
- Reddy, M. K., Gupta, S. K., Jacob, M. R., Khan, S. I., y Ferreira, D. (2007). Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L. *Planta Med*, 53(5), 461–467. <http://doi.org/10.1055/s-2007-967167>
- Režek Jambrak, A., Šimunek, M., Evačić, S., Markov, K., Smoljanić, G., y Frece, J. (2017). Influence of high power ultrasound on selected moulds, yeasts and *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple, cranberry and blueberry juice and nectar. *Ultrasonics*. Artículo en prensa. <http://doi.org/10.1016/j.ultras.2017.02.011>

-
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., y Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 20(10), 438–447. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.05.002>
- Rojas-Graü, M. A., Tapia, M. S., Rodríguez, F. J., Carmona, A. J., y Martín-Belloso, O. (2007). Alginate and gellan-based edible coatings as carriers of antibrowning agents applied on fresh-cut Fuji apples. *Food Hydrocolloids*, 21(1), 118–127. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.03.001>
- Romanazzi, G., y Feliziani, E. (2016). Use of Chitosan to Control Postharvest Decay of Temperate Fruit: Effectiveness and Mechanisms of Action. En S. Bautista-Baños, G. Romanazzi, y A. Jiménez-Aparicio (Eds.), *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities* (pp. 155–177). Cambridge, MA, EEUU: Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802735-6/00006-9>
- Romanazzi, G., Nigro, F., y Ippolito, A. (2000). Effetto di trattamenti pre e postraccolta con chitosano sui marciumi della fragola in conservazione. *Frutticoltura*, 5, 71-75.
- Rossi Marquez, G., Di Pierro, P., Mariniello, L., Esposito, M., Giosafatto, C. V. L., y Porta, R. (2017). Fresh-cut fruit and vegetable coatings by transglutaminase-crosslinked whey protein/pectin edible films. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 124–130. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.017>
- Rwabahizi, S., y Wrolstad, R. E. (1988). Effects of Mold Contamination and Ultrafiltration on the Color Stability of Strawberry Juice and Concentrate. *Journal of Food Science*, 53(3), 857–861. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb08971.x>
- Sadler, G. D., y Murphy, P. A. (2010). pH and Titratable Acidity. En *Food Analysis* (pp. 219–238). inbook, Boston, MA: Springer EEUU. http://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1_13
- Salinas-Roca, B., Soliva-Fortuny, R., Welte-Chanes, J., y Martín-Belloso, O. (2016). Combined effect of pulsed light, edible coating and malic acid dipping to improve fresh-cut mango safety and quality. *Food Control*, 66, 190–197. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.005>
- Sanchez, R. M. (2005). Agentes productivos y producciones no tradicionales en el municipio de Gral. Pueyrredón (Argentina). Disponible en: <http://www.ubiobio.cl/miweb/webfile/media/222/Espacio/2005/Magdalena%20Sanchez.pdf>

- Sánchez-Domínguez, D., Ríos, M. Y., Castillo-Ocampo, P., Zavala-Padilla, G., Ramos-García, M., y Bautista-Baños, S. (2011). Cytological and biochemical changes induced by chitosan in the pathosystem *Alternaria alternata*–tomato. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(3), 250–255. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.01.003>
- Sánchez-Rubio, M., Taboada-Rodríguez, A., Cava-Roda, R., López-Gómez, A., y Marín-Iniesta, F. (2016). Combined use of thermo-ultrasound and cinnamon leaf essential oil to inactivate *Saccharomyces cerevisiae* in natural orange and pomegranate juices. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 140–146. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.005>
- Sanchís, E., González, S., Ghidelli, C., Sheth, C. C., Mateos, M., Palou, L., y Pérez-Gago, M. B. (2016). Browning inhibition and microbial control in fresh-cut persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Rojo Brillante) by apple pectin-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 112, 186–193. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.024>
- Santhirasegaram, V., Razali, Z., y Somasundram, C. (2013). Effects of thermal treatment and sonication on quality attributes of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1276–1282. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.02.005>
- Sashikala, S., y Syed Shafi, S. (2014). Synthesis and Characterization of Multifunctional Chiral Schiff Base Derivatives. *Der Pharmacia Lettre*, 6(2), 90–97.
- Schlich, P. (2017). Temporal Dominance of Sensations (TDS): a new deal for temporal sensory analysis. *Current Opinion in Food Science*, 15, 38–42. <http://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.05.003>
- Scortichini, M., y Rossi, M. P. (1991). *In vitro* susceptibility of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* to geraniol and citronellol. *Journal of Applied Bacteriology*, 71(2), 113–118. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02964.x>
- Senesi, S. (2011). Plan de Competitividad Conglomerado Fruta Fina, provincia de Tucumán. *Programa de Competitividad Norte Grande*, 1–78.
- Serrano, J. C., y Sánchez González, I. (2008). Tendencias en alimentos funcionales contra la obesidad: Ingredientes funcionales, alimentos tecnológicamente modificados y dietas completas. *Revista Española de Nutrición Comunitaria*,

-
- 14(3), 193–200.
- Shon, M.-Y., Kim, T.-H., y Sung, N.-J. (2003). Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (Phellinus of Hymenochaetaceae) extracts. *Food Chemistry*, 82(4), 593–597. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00015-3](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00015-3)
- Shrestha, A. K., Arcot, J., y Paterson, J. L. (2003). Edible coating materials—their properties and use in the fortification of rice with folic acid. *Food Research International*, 36(9), 921–928. [http://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00101-7](http://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00101-7)
- SINAVIMO. (2015). *Fragaria ananassa*. *Sistema Nacional Argentino de Vigilancia Y Monitoreo de Plagas*. Disponible en: <http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/fragaria-ananassa>
- Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Hubinger, M. D., y Roques, M. A. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15(4), 423–432. [http://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00061-3](http://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00061-3)
- Soria, A. C., y Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science y Technology*, 21(7), 323–331. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>
- Souza, A. C., Benze, R., Ferrão, E. S., Ditchfield, C., Coelho, A. C. V., y Tadini, C. C. (2012). Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 110–117. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.018>
- Stauff, D. L., y Bassler, B. L. (2011). Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor. *Journal of Bacteriology*, 193(15), 3871–3878. <http://doi.org/10.1128/JB.05125-11>
- Stearns, D. (2015). A Decade History of *E. coli* Outbreaks Linked to Unpasteurized Apple Juice. *Food Poison Journal*. Disponible en: <http://www.foodpoisonjournal.com/foodborne-illness-outbreaks/a-history-of-e-coli-outbreaks-linked-to-unpasteurized-apple-juice/>
- Stürtz, M., Cerezo, A. B., Cantos-Villar, E., y Garcia-Parrilla, M. C. (2011). Determination of the melatonin content of different varieties of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and strawberries (*Fragaria ananassa*). *Food Chemistry*, 127(3), 1329–1334. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.093>

- Su, X., Sangster, M. Y., y D'Souza, D. H. (2010). *In Vitro* Effects of Pomegranate Juice and Pomegranate Polyphenols on Foodborne Viral Surrogates. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(12), 1473–1479. <http://doi.org/10.1089/fpd.2010.0583>
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., y Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>
- Tanada-Palmu, P. S., y Grosso, C. R. F. (2005). Effect of edible wheat gluten-based films and coatings on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Postharvest Biology and Technology*, 36(2), 199–208. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.12.003>
- Tapia, M. S., Rojas-Graü, M. A., Carmona, A., Rodríguez, F. J., Soliva-Fortuny, R., y Martín-Belloso, O. (2008). Use of alginate- and gellan-based coatings for improving barrier, texture and nutritional properties of fresh-cut papaya. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1493–1503. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.10.004>
- Tarancón, P., Sanz, T., Fiszman, S., y Tárrega, A. (2014). Consumers' hedonic expectations and perception of the healthiness of biscuits made with olive oil or sunflower oil. *Food Research International*, 55, 197–206. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.011>
- Tehranifar, A., Selahvarzi, Y., Kharrazi, M., y Bakhsh, V. J. (2011). High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Industrial Crops and Products*, 34(3), 1523–1527. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.05.007>
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Patras, A., Brunton, N., y Cullen, P. J. (2009). Effect of ozone processing on anthocyanins and ascorbic acid degradation of strawberry juice. *Food Chemistry*, 113(4), 1119–1126. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.085>
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Patras, A., y Cullen, P. J. (2008). Anthocyanin and ascorbic acid degradation in sonicated strawberry juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10071–10077. <http://doi.org/10.1021/jf801824v>
- Tiwari, M., y Kakkar, P. (2009). Plant derived antioxidants – Geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. *Toxicology in Vitro*, 23(2), 295–301. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.12.014>
- Torres-Moreno, M., Tarrega, A., Torrecasana, E., y Blanch, C. (2012). Influence of

-
- label information on dark chocolate acceptability. *Appetite*, 58(2), 665–671. <http://doi.org/10.1016/j.appet.2011.12.005>
- Truchado, P., López-Gálvez, F., Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., y Allende, A. (2009). Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. *Food Chemistry*, 115(4), 1337–1344. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.065>
- Tsuchiya, A., Almiron-Roig, E., Lluch, A., Guyonnet, D., y Drewnowski, A. (2006). Higher satiety ratings following yogurt consumption relative to fruit drink or dairy fruit drink. *Journal of the American Dietetic Association*, 106(4), 550–557. <http://doi.org/10.1016/j.jada.2006.01.004>
- Tuorila, H., Andersson, Å., Martikainen, A., y Salovaara, H. (1998). Effect of product formula, information and consumer characteristics on the acceptance of a new snack food. *Food Quality and Preference*, 9(5), 313–320. [http://doi.org/10.1016/S0950-3293\(98\)00015-9](http://doi.org/10.1016/S0950-3293(98)00015-9)
- Tuorila, H., Cardello, A. V., y Leshner, L. L. (1994). Antecedents and Consequences of Expectations Related to Fat-free and Regular-fat Foods. *Appetite*, 23(3), 247–263. <http://doi.org/10.1006/appe.1994.1057>
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., y Moezelaar, R. (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561–1568. <http://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561>
- Ünal, Gü., y Akalin, A. S. (2013). Influence of fortification with sodium-calcium caseinate and whey protein concentrate on microbiological, textural and sensory properties of set-type yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 66(2), 264–272. <http://doi.org/10.1111/1471-0307.12016>
- Utkun, S., y Kunduhoglu, B. (2012). Combined effect of ultrasound and selected essential oil constituents on *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* reduction in orange juice. *African Journal of Microbiology Research*, 6(37), 6642–6652. <http://doi.org/10.5897/AJMR12.942>
- Vallverdú-Queralt, A., Odriozola-Serrano, I., Oms-Oliu, G., Lamuela-Raventós, R. M., Elez-Martínez, P., y Martín-Belloso, O. (2013). Impact of high-intensity pulsed electric fields on carotenoids profile of tomato juice made of moderate-intensity pulsed electric field-treated tomatoes. *Food Chemistry*, 141(3), 3131–3138.

- <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.150>
- Varela, P., Ares, G., Giménez, A., y Gámbaro, A. (2010). Influence of brand information on consumers' expectations and liking of powdered drinks in central location tests. *Food Quality and Preference*, 21(7), 873–880. <http://doi.org/10.1016/j.foodqual.2010.05.012>
- Varoquaux, P., y Wiley, R. C. (1994). Biological and biochemical changes in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. En R. C. Wiley (Ed.), *Minimally processed refrigerated fruits y vegetables* (pp. 226–268). New York: Chapman y Hall, Inc.
- Vasantha Rupasinghe, H. P., Boulter-Bitzer, J., Ahn, T., y Odumeru, J. A. (2006). Vanillin inhibits pathogenic and spoilage microorganisms *in vitro* and aerobic microbial growth in fresh-cut apples. *Food Research International*, 39(5), 575–580. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.11.005>
- Vega-Vega, V., Silva-Espinoza, B. A., Cruz-Valenzuela, M. R., Bernal-Mercado, A. T., González-Aguilar, G. A., Vargas-Arispuro, I., ... Ayala-Zavala, J. F. (2013). Antioxidant Enrichment and Antimicrobial Protection of Fresh-Cut Mango Applying Bioactive Extracts from Their Seeds By-Products. *Food and Nutrition Sciences*, 2013(August), 197–203. <http://doi.org/10.4236/fns.2013.48A024>
- Veldhorst, M. A. B., Nieuwenhuizen, A. G., Hochstenbach-Waelen, A., van Vught, A. J. A. H., Westerterp, K. R., Engelen, M. P. K. J., ... Westerterp-Plantenga, M. S. (2009). Dose-dependent satiating effect of whey relative to casein or soy. *Physiology y Behavior*, 96(4), 675–682. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.01.004>
- Vercet, A., Sánchez, C., Burgos, J., Montañés, L., y Lopez Buesa, P. (2002). The effects of manothermosonication on tomato pectic enzymes and tomato paste rheological properties. *Journal of Food Engineering*, 53(3), 273–278. [http://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00165-0](http://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00165-0)
- Viacava, G. E., y Roura, S. I. (2015). Principal component and hierarchical cluster analysis to select natural elicitors for enhancing phytochemical content and antioxidant activity of lettuce sprouts. *Scientia Horticulturae*, 193, 13–21. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.041>
- Vicente, A. R., Costa, M. L., Martínez, G. A., Chaves, A. R., y Civello, P. M. (2005). Effect of heat treatments on cell wall degradation and softening in strawberry fruit.

-
- Postharvest Biology and Technology*, 38(3), 213–222.
<http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.06.005>
- Vidigal, M. C. T. R., Minim, V. P. R., Carvalho, N. B., Milagres, M. P., y Gonçalves, A. C. A. (2011). Effect of a health claim on consumer acceptance of exotic Brazilian fruit juices: Açai (*Euterpe oleracea* Mart.), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Cajá (*Spondias lutea* L.) and Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda). *Food Research International*, 44(7), 1988–1996.
<http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.028>
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., y Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 9(2), 161–169.
<http://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014>
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., y García-Parrilla, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1), 230–235.
<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.03.050>
- Villegas, B., Carbonell, I., y Costell, E. (2008). Effects of product information and consumer attitudes on responses to milk and soybean vanilla beverages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(14), 2426–2434.
<http://doi.org/10.1002/jsfa.3347>
- Villegas, B., Tárrega, A., Carbonell, I., y Costell, E. (2010). Optimising acceptability of new prebiotic low-fat milk beverages. *Food Quality and Preference*, 21(2), 234–242. <http://doi.org/10.1016/j.foodqual.2009.03.001>
- Viscione, L. (2013). *Fibre-enriched beverages. Fibre-Rich and Wholegrain Foods*. Woodhead Publishing Limited. <http://doi.org/10.1533/9780857095787.4.369>
- Vojdani, J. D., Beuchat, L. R., y Tauxe, R. V. (2008). Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *Journal of Food Protection*, 71, 356–364.
- Wan, J., Mawson, R., Ashokkumar, M., Ronacher, K., Coventry, M. J., Roginski, H., y Versteeg, C. (2005). Emerging processing technologies for functional foods. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 60(2), 167–169.
- Weerakkody, N. S., Caffin, N., Turner, M. S., y Dykes, G. A. (2010). *In vitro* antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-

- borne bacteria. *Food Control*, 21(10), 1408–1414.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.04.014>
- Weidmann, M., y Jager, M. (1997). Synergistic sweeteners. *Food Ingredients and Analysis International, November-D*, 51–56.
- Williner, M. R., Pirovani, M. E., y Güemes, D. R. (2003). Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(8), 842–845. <http://doi.org/10.1002/jsfa.1422>
- Wong, E., Vaillant, F., y Perez, A. (2010). Osmosonication of blackberry juice: impact on selected pathogens, spoilage microorganisms, and main quality parameters. *Journal of Food Science*, 75(7), M468-74. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01730.x>
- Wszelaki, A., y Mitcham, E. (2003). Effect of combinations of hot water dips, biological control and controlled atmospheres for control of gray mold on harvested strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 27(3), 255–264. [http://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00095-9](http://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00095-9)
- Xiao-Fang, L., Xiao-Qiang, F., Sheng Y., Ting-Pu, W., y Zhong-Xing, S. (2008). Effects of Molecular Weight and Concentration of Chitosan on Antifungal Activity Against *Aspergillus niger*. *Iranian Polymer Journal*, 17(Rew98), 843–852.
- Xing, Y., Xu, Q., Che, Z., Li, X., y Li, W. (2011). Effects of chitosan-oil coating on blue mold disease and quality attributes of jujube fruits. *Food & Function*, 2(8), 466–474. article. <http://doi.org/10.1039/C1FO10073D>
- Xu, W.-T., Huang, K.-L., Guo, F., Qu, W., Yang, J.-J., Liang, Z.-H., y Luo, Y.-B. (2007). Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 46(1), 86–94. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.03.019>
- Yang, L.-Y., Zhang, J.-L., Bassett, C. L., y Meng, X.-H. (2012). Difference between chitosan and oligochitosan in growth of *Monilinia fructicola* and control of brown rot in peach fruit. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 254–259. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.023>
- Yegin, Y., Perez-Lewis, K. L., Zhang, M., Akbulut, M., y Taylor, T. M. (2016). Development and characterization of geraniol-loaded polymeric nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, 170, 64–71. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.09.017>

-
- Yommi, A. K., Borquez, A. M., Quipildor, S. L., González, D. J., y Kirschbaum, D. S. (2001). Caracterización de la calidad de frutillas: resultados preliminares. *Horizonte Agroalimentario 4. INTA Famaillá. Tucumán*, 11–12.
- Yu, T., Li, H. Y., y Zheng, X. D. (2007). Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. *International Journal of Food Microbiology*, 114(3), 261–266. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.008>
- Zhang, Z. H., Han, Z., Zeng, X. A., Xiong, X. Y., y Liu, Y. J. (2015). Enhancing mechanical properties of chitosan films via modification with vanillin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 638–643. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.042>

ANEXOS

ANEXO I: Abreviaturas

°Bx: grados Brix

AA: ácido ascórbico

ADN: ácido desoxirribonucleico

AE: aceites esenciales

AF: alimento funcional

AHL: acil-homoserina lactona

ANOVA: *Analisis of Variance*

AP: altas presiones

ARN: ácido ribonucleico

AT: acidez total

ATCC: *American Type Culture Collection*

AVG: Apariencia Visual General

BB: Box-Behnken

BOE: Boletín Oficial del Estado

C: condición ciega

CAA: Código Alimentario Argentino

CCC: caldo cerebro corazón (BHI)

CERELA: Centro de Referencia de Lactobacilos

CG: Cromatografía Gaseosa

CIE: *Comission Internationale de l'Éclairage*

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CON: batido control

CPT: contenido de polifenoles totales

D: función Deseabilidad

DDR: Dosis Diaria Recomendada

DMSO: dimetilsulfóxido

DO: densidad óptica

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

E: condición de expectativa o condición esperada

EAG: equivalentes de ácido gálico

EG: extracto de granada
EHEC: *E. coli* enterohemorrágica
EMB: *Eosin Methylene Blue*
ENFR: Encuesta Nacional de Factores de Riesgo
ETA: Enfermedades Transmitidas por Alimentos
FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FDA: *Food and Drug Administration*
FIB: batido enriquecido con fibras
FOSHU: *Foods for Specified Health Uses*
FUFOSE: *Functional Food Science in Europe*
G: geraniol
GD: grado de desacetilación
Gel: goma gellan o gelano
Gli: glicerol
GRAS: *Generally Recognized As Safe*
h°: ángulo hue
HPA: *Health Protection Agency*
HPLC: *High performance liquid chromatography*
HYL: hongos y levaduras
I: condición informada
IFPA: *International Fresh-cut Produce Association*
ILSI: *International Life Science Institute*
IMC: índice de masa corporal
IPV: inhibición de producción de violaceína
IQS: inhibidor de *quorum sensing*
ISO: *International Organization for Standardization*
L*: luminosidad
LB: Luria Bertani
LP: luz pulsada
MAGyP: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
MCB: mínima concentración bactericida
MCI: mínima concentración inhibitoria
MCIQS: mínima concentración inhibitoria de quórum sensing

MES: bacterias mesófilas totales
MH: Mueller Hinton
MP: mínimamente procesados
MSR: Metodología de Superficie de Respuesta
ND: no detectado
OMS: Organización Mundial de la Salud
OPT: tratamiento óptimo
p: peso
PAL: *phenylalanine ammonia lyase*
PC: película comestible
PCA: *Plate Count Agar*
PG: poligalacturonasa
PM: peso molecular
PME: pectinmetilesterasa
PRO: batido enriquecido en proteína
PSI: bacterias psicrófilas totales
QDA: *Quantitative Descriptive Analysis*
QS: *quorum sensing*
Quit: quitosano
RC: recubrimiento comestible
RFC: Reactivo *Folin-Ciocalteu*
RSM: *Response Surface Methodology*
sab: saborizante de frutilla
SINAVIMO: *Sistema Nacional Argentino de Vigilancia Y Monitoreo de Plagas*
SST: sólidos solubles totales
TDS: *Temporal Dominance of Sensations*
TI: *Time-Intensity*
UFC: unidad formadora de colonias
US: ultrasonido
UV: ultra violeta
v: volumen
V: vainillina
YGC: *yeast-glucose-chloramphenicol*

ANEXO II: Índice de Figuras

Introducción general

<i>Fig. 0.1: Principales grupos frutícolas producidos en Argentina: ubicación geográfica. Fuente: MAGyP (2014).</i>	7
<i>Fig. 0.2: Producción de frutilla en Argentina: distribución geográfica. Fuente: Senesi (2011).</i>	8
<i>Fig. 0.3: Origen de <i>Fragaria x ananassa</i></i>	10
<i>Fig. 0.4: Prevalencia de obesidad en Argentina en 2005, 2009 y 2013 según jurisdicción. Fuente: ENFR, Ministerio de Salud de la Nación Argentina.</i>	23

Capítulo 1

<i>Fig. 1.1: Estructura química de la vainillina</i>	35
<i>Fig. 1.2: Estructura química del geraniol</i>	36
<i>Fig. 1.3: Estructura química de la N-hexanoilo-homoserina lactona</i>	38
<i>Fig. 1.4: Efecto de la concentración de vainillina sobre la inhibición de la producción de violaceína de <i>C. violaceum</i> y sobre su crecimiento. Las barras indican los errores estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas en la inhibición de la producción de violaceína ($p < 0,05$). Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas en la biomasa de <i>C. violaceum</i> ($p < 0,05$).</i>	48
<i>Fig. 1.5: Efecto de la concentración de geraniol sobre la inhibición de la producción de violaceína de <i>C. violaceum</i> y sobre su crecimiento. Las barras representan los errores estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas en la inhibición de la producción de violaceína ($p < 0,05$). Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas en la biomasa de <i>C. violaceum</i> ($p < 0,05$).</i>	49

Capítulo 2

<i>Fig. 2.1: Estructuras químicas de los principales compuestos presentes en el extracto de granada: (a) ácido gálico, (b) ácido elágico, (c) punicalaginas A y B.</i>	58
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<i>Fig. 2.2: Evolución de bacterias mesófilas en jugo de frutilla tratado con agentes naturales durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. V1: 2,5 mg/mL de vainillina; V2: 5,0 mg/mL de vainillina; G1: 0,6 µL/mL de geraniol; G2: 1,2 µL/mL de geraniol; EG1: 180 µg/mL de extracto de granada; EG2: 360 µg/mL de extracto de granada.</i>	<i>72</i>
<i>Fig. 2.3: Evolución de hongos y levaduras en jugo de frutilla tratado con agentes naturales durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. V1: 2,5 mg/mL de vainillina; V2: 5,0 mg/mL de vainillina; G1: 0,6 µL/mL de geraniol; G2: 1,2 µL/mL de geraniol; EG1: 180 µg/mL de extracto de granada; EG2: 360 µg/mL de extracto de granada.</i>	<i>74</i>
<i>Fig. 2.4: Evolución de bacterias psicrófilas en jugo de frutilla tratado con agentes naturales durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. V1: 2,5 mg/mL de vainillina; V2: 5,0 mg/mL de vainillina; G1: 0,6 µL/mL de geraniol; G2: 1,2 µL/mL de geraniol; EG1: 180 µg/mL de extracto de granada; EG2: 360 µg/mL de extracto de granada.</i>	<i>75</i>
<i>Fig. 2.5: Efecto de la aplicación de agentes naturales sobre la capacidad antioxidante (actividad secuestrante del radical DPPH) del jugo de frutilla durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican los errores estándar. V1: 2,5 mg/mL de vainillina; V2: 5,0 mg/mL de vainillina; G1: 0,6 µL/mL de geraniol; G2: 1,2 µL/mL de geraniol; EG1: 180 µg/mL de extracto de granada; EG2: 360 µg/mL de extracto de granada.</i>	<i>82</i>
<i>Fig. 2.6: Efecto de la aplicación de agentes naturales sobre el contenido de polifenoles totales del jugo de frutilla durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican los errores estándar. V1: 2,5 mg/mL de vainillina; V2: 5,0 mg/mL de vainillina; G1: 0,6 µL/mL de geraniol; G2: 1,2 µL/mL de geraniol; EG1: 180 µg/mL de extracto de granada; EG2: 360 µg/mL de extracto de granada.</i>	<i>84</i>
<i>Fig. 2.7: Efecto de los agentes naturales sobre las características sensoriales del jugo de frutilla almacenado a 5°C. No se evaluaron el sabor dulce, ácido y amargo a los 7 días de almacenamiento en las muestras control, EG1 y EG2 debido a su alta carga microbiana. V1: 2,5 mg/mL de vainillina; V2: 5,0 mg/mL de vainillina; G1: 0,6 µL/mL de geraniol; G2: 1,2 µL/mL de geraniol; EG1: 180 µg/mL de extracto de granada; EG2: 360 µg/mL de extracto de granada.</i>	<i>85</i>

Capítulo 3

<i>Fig. 3.1: Aplicación de ultrasonido en alimentos y efectos bioquímicos generados por el fenómeno de la cavitación. Adaptado de Pingret y col. (2013).</i>	94
<i>Fig. 3.2: Evolución de bacterias mesófilas en jugo de frutilla tratado con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. US10min: tratamiento de ultrasonido de 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido de 30 min.</i>	100
<i>Fig. 3.3: Evolución de hongos y levaduras en jugo de frutilla tratado con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. US10min: tratamiento de ultrasonido de 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido de 30 min.</i>	102
<i>Fig. 3.4: Evolución de bacterias psicrófilas en jugo de frutilla tratado con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. US10min: tratamiento de ultrasonido de 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido de 30 min.</i>	103
<i>Fig. 3.5: Evolución de la capacidad antioxidante en jugo de frutilla tratado con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5 °C. Las barras indican errores estándar. US10min: tratamiento de ultrasonido por 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido por 30 min.</i>	107
<i>Fig. 3.6: Evolución del contenido de polifenoles totales de jugo de frutilla tratado con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5 °C. Las barras indican errores estándar. US10min: tratamiento de ultrasonido por 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido por 30 min.</i>	108
<i>Fig. 3.7: Efecto de los tratamientos de ultrasonido sobre la calidad sensorial de jugo de frutilla. US10min: tratamiento de ultrasonido por 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido por 30 min.</i>	109

Capítulo 4

Fig. 4.1: Superficies de respuesta de los parámetros de calidad microbiológica en jugo de frutilla almacenado 14 d a 5°C. Variación de: (a) hongos y levaduras y (b) bacterias psicrófilas con la concentración de extracto de granada y la concentración de

<i>vainillina, con un tiempo de tratamiento de ultrasonido de 15 min. X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de vainillina.</i>	133
<i>Fig. 4.2: Superficies de respuesta de la capacidad antioxidante de jugo de frutilla almacenado 14 d a 5°C. Variación con: (a) el tiempo de ultrasonido y la concentración de vainillina; y (b) el tiempo de ultrasonido y la concentración de extracto de granada. Las variables restantes se encuentran constantes en el nivel medio. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de vainillina.</i>	136
<i>Fig. 4.3: Superficies de respuesta para la retención de ácido ascórbico (AA) de jugo de frutilla. Variación con: (a) el tiempo de ultrasonido y la concentración de extracto de granada; y (b) el tiempo de ultrasonido y la concentración de vainillina. Las variables restantes se encuentran constantes en el nivel medio. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de vainillina.</i>	138
<i>Fig. 4.4: Superficies de respuesta para la calidad sensorial de jugo de frutilla almacenado 14 d a 5°C. Variación de olor extraño con: (a) el tiempo de ultrasonido y la concentración de extracto de granada; y (c) la concentración de extracto de granada y la concentración de vainillina. Las variables restantes se encuentran constantes en el nivel medio. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de vainillina.</i>	141
<i>Fig. 4.5: Superficies de respuesta de la función Deseabilidad. Variación con: (a) la concentración de extracto de granada y el tiempo de ultrasonido; (b) la concentración de vainillina y el tiempo de ultrasonido; y (c) las concentraciones de vainillina y extracto de granada. Las variables restantes se encuentran constantes en el nivel medio. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de vainillina.</i>	143
<i>Fig. 4.6: Superficies de respuesta para los parámetros de calidad microbiológica de jugo de frutilla almacenado 14 d a 5°C. Variación de: (a) hongos y levaduras, y (b) bacterias psicrófilas con el tiempo de ultrasonido y la concentración de geraniol, con una concentración de extracto de granada de 180 µg/mL. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_3 = concentración de geraniol.</i>	152

Fig. 4.7: Superficies de respuesta de la capacidad antioxidante de jugo de frutilla almacenado 14 d a 5°C. Variación con: (a) el tiempo de ultrasonido y la concentración de extracto de granada; y (b) el tiempo de ultrasonido y la concentración de geraniol. Las variables restantes se encuentran constantes en el nivel medio. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de geraniol..... 155

Fig. 4.8: Superficies de respuesta del contenido de polifenoles totales de jugo de frutilla almacenado 14 d a 5°C. Variación con: (a) el tiempo de ultrasonido y la concentración de extracto de granada; y (b) el tiempo de ultrasonido y la concentración de geraniol. Las variables restantes se encuentran constantes en el nivel medio. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de geraniol..... 156

Fig. 4.9: Superficies de respuesta para los parámetros de calidad sensorial de jugo de frutilla almacenado 14 d a 5°C. Variación de: (a) olor cítrico y (b) olor extraño con el tiempo de ultrasonido y la concentración de geraniol, con una concentración de extracto de granada de 180 $\mu\text{g/mL}$. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_3 = concentración de geraniol..... 158

Fig. 4.10: Superficies de respuesta de la función Deseabilidad. Variación con: (a) el tiempo de ultrasonido y la concentración de extracto de granada, (b) el tiempo de ultrasonido y la concentración de geraniol y (c) la concentración de geraniol y la concentración de extracto de granada sobre la función deseabilidad. Las variables restantes se encuentran constantes en el nivel medio. X_1 = tiempo de ultrasonido; X_2 = concentración de extracto de granada; X_3 = concentración de geraniol. 160

Fig. 4.11: Evolución de microflora nativa en jugo de frutilla tratado con los tratamientos óptimos durante el almacenamiento refrigerado a 5°C: (a) hongos y levaduras; (b) bacterias psicrófilas. Las barras indican errores estándar. OPT1: tratamiento óptimo 1 (7,5 min de tratamiento de ultrasonido + 360 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de granada + 0,9375 mg/mL de vainillina); OPT2: tratamiento óptimo 2 (30 min de ultrasonido + 360 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de granada + 0,15 $\mu\text{L/mL}$ de geraniol). 164

Fig. 4.12: Evolución de parámetros de calidad nutricional en jugo de frutilla tratado con los tratamientos óptimos durante el almacenamiento refrigerado a 5°C: (a) inhibición del radical DPPH; (b) contenido de polifenoles totales; (c) retención de ácido ascórbico. Las barras indican errores estándar. OPT1: tratamiento óptimo 1 (7,5

<i>min de tratamiento de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,9375 mg/mL de vainillina); OPT2: tratamiento óptimo 2 (30 min de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,15 µL/mL de geraniol).</i>	166
<i>Fig. 4.13: Efecto de los tratamientos óptimos sobre las características sensoriales de jugo de frutilla almacenado a 5°C. OPT1: tratamiento óptimo 1 (7,5 min de tratamiento de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,9375 mg/mL de vainillina); OPT2: tratamiento óptimo 2 (30 min de ultrasonido + 360 µg/mL de extracto de granada + 0,15 µL/mL de geraniol).</i>	170

Capítulo 5

<i>Fig. 5.1: Estructura química del gelano</i>	182
<i>Fig. 5.2: Estructura química del quitosano</i>	183
<i>Fig. 5.3: Evolución de bacterias mesófilas en frutilla cortada con recubrimientos de gelano durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. Gel: recubrimiento de gelano (0,5% p/v); G1: 1,2 µL/mL de geraniol; G2: 2,4 µL/mL de geraniol; EG1: 360 µg/mL de extracto de granada; EG2: 720 µg/mL de extracto de granada.</i>	189
<i>Fig. 5.4: Evolución de hongos y levaduras en frutilla cortada con recubrimientos de gelano durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. Gel: recubrimiento de gelano (0,5% p/v); G1: 1,2 µL/mL de geraniol; G2: 2,4 µL/mL de geraniol; EG1: 360 µg/mL de extracto de granada; EG2: 720 µg/mL de extracto de granada.</i>	190
<i>Fig. 5.5: Evolución de bacterias psicrófilas en frutilla cortada con recubrimientos de gelano durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. Gel: recubrimiento de gelano (0,5% p/v); G1: 1,2 µL/mL de geraniol; G2: 2,4 µL/mL de geraniol; EG1: 360 µg/mL de extracto de granada; EG2: 720 µg/mL de extracto de granada.</i>	191
<i>Fig. 5.6: Efecto de los recubrimientos de gelano sobre las características sensoriales de frutilla cortada almacenada a 5°C. No se evaluaron el sabor dulce y ácido a los 7 días de almacenamiento debido a su alta carga microbiana. Gel: recubrimiento de gelano (0,5% p/v); G1: 1,2 µL/mL de geraniol; G2: 2,4 µL/mL de geraniol; EG1: 360 µg/mL de extracto de granada; EG2: 720 µg/mL de extracto de granada.</i>	194

- Fig. 5.7: Evolución de bacterias mesófilas en frutilla cortada con recubrimientos de quitosano durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. Quit: recubrimiento de quitosano (2% p/v); V1: 5 mg/mL de vainillina; V2: 10 mg/mL de vainillina; G1: 1,2 µL/mL de geraniol; G2: 2,4 µL/mL de geraniol..... 196
- Fig. 5.8: Evolución de hongos y levaduras en frutilla cortada con recubrimientos de quitosano durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. Quit: recubrimiento de quitosano (2% p/v); V1: 5 mg/mL de vainillina; V2: 10 mg/mL de vainillina; G1: 1,2 µL/mL de geraniol; G2: 2,4 µL/mL de geraniol..... 197
- Fig. 5.9: Evolución de bacterias psicrófilas en frutilla cortada con recubrimientos de quitosano durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. Quit: recubrimiento de quitosano (2% p/v); V1: 5 mg/mL de vainillina; V2: 10 mg/mL de vainillina; G1: 1,2 µL/mL de geraniol; G2: 2,4 µL/mL de geraniol..... 198
- Fig. 5.10: Modificación química del quitosano con vainillina mediante la formación de un enlace aldimina. Adaptada de Zhang y col. (2015)..... 201
- Fig. 5.11: Efecto de los recubrimientos de quitosano sobre las características sensoriales de frutilla cortada almacenada a 5°C. No se evaluaron el sabor dulce ni ácido a los 7 días de almacenamiento debido a su alta carga microbiana. Quit: recubrimiento de quitosano (2% p/v); V1: 5 mg/mL de vainillina; V2: 10 mg/mL de vainillina; G1: 1,2 µL/mL de geraniol; G2: 2,4 µL/mL de geraniol..... 203
- Fig. 5.12: Evolución de bacterias mesófilas en frutilla cortada tratada con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. US10min: tratamiento de ultrasonido de 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido de 30 min. 205
- Fig. 5.13: Evolución de hongos y levaduras en frutilla cortada tratada con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. US10min: tratamiento de ultrasonido de 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido de 30 min. 206
- Fig. 5.14: Evolución de bacterias psicrófilas en frutilla cortada tratada con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C. Las barras indican errores estándar. US10min: tratamiento de ultrasonido de 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido de 30 min. 207
- Fig. 5.15: Efecto de los tratamientos de ultrasonido sobre las características sensoriales de frutilla cortada almacenada a 5°C. No se evaluaron el sabor dulce ni

ácido a los 7 días de almacenamiento debido a su alta carga microbiana. US10min: tratamiento de ultrasonido de 10 min; US30min: tratamiento de ultrasonido de 30 min. 209

Capítulo 6

Fig. 6.1: Curvas de TDS para los diferentes batidos de frutilla. CON: formulación control; FIB: formulación enriquecida en fibra; PRO: formulación enriquecida en proteína; sab: saborizante artificial a frutilla. 225

ANEXO III: Índice de Tablas

Introducción General

<i>Tabla 0.1: Estrategias para la elaboración de alimentos funcionales para combatir la obesidad y el sobrepeso. Fuente: Serrano y Sánchez González (2008).</i>	24
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Capítulo 1

<i>Tabla 1.1: Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) de vainillina y geraniol frente a patógenos de relevancia en la industria de alimentos</i>	45
<i>Tabla 1.2: Efecto del solvente DMSO sobre la inhibición de la producción de violaceína del Chromobacterium violaceum y su viabilidad</i>	47
<i>Tabla 1.3: Mínima Concentración Inhibitoria de Quorum Sensing (MCIQS) y parámetros de regresión lineal para cada compuesto natural frente a Chromobacterium violaceum</i>	50

Capítulo 2

<i>Tabla 2.1: Principales compuestos fenólicos presentes en el extracto de granada</i>	60
<i>Tabla 2.2: Descripción de los atributos sensoriales seleccionados, término de las intensidades mínima y máxima y valores consensuados para la muestra de referencia</i>	66
<i>Tabla 2.3: Evolución de sólidos solubles totales (°Bx) en jugo de frutilla tratado con agentes naturales durante el almacenamiento refrigerado a 5°C</i>	68
<i>Tabla 2.4: Evolución de acidez titulable (%AT) en jugo de frutilla tratado con agentes naturales durante el almacenamiento refrigerado a 5°C</i>	69
<i>Tabla 2.5: Evolución de los parámetros de color de luminosidad (L^*) y ángulo hue (h°) en jugo de frutilla tratado con agentes naturales durante el almacenamiento refrigerado a 5°C</i>	70
<i>Tabla 2.6: Supervivencia de E. coli O157:H7 (log UFC/mL) inoculado en jugo de frutilla tratado con agentes naturales durante el almacenamiento refrigerado a 5°C.</i>	80

Capítulo 3

<i>Tabla 3.1: Evolución del contenido de sólidos solubles totales (SST) y la acidez total (AT) en jugo de frutilla tratado con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C.....</i>	<i>98</i>
<i>Tabla 3.2: Evolución de los parámetros de color de luminosidad (L*) y ángulo hue (h°) en jugo de frutilla tratado con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C.....</i>	<i>99</i>
<i>Tabla 3.3: Supervivencia de E. coli O157:H7 (log UFC/mL) inoculado en jugo de frutilla tratado con ultrasonido durante el almacenamiento refrigerado a 5°C.....</i>	<i>105</i>

Capítulo 4

<i>Tabla 4.1: Matriz del diseño experimental de Box-Behnken para la Combinación de barreras 1</i>	<i>122</i>
<i>Tabla 4.2: Matriz del diseño experimental de Box-Behnken para la Combinación de barreras 2</i>	<i>122</i>
<i>Tabla 4.3: Valores iniciales para todas las respuestas del jugo de frutilla fresco y valores medios de la muestra sin tratar y las muestras tratadas luego de 14 días de almacenamiento a 5°C</i>	<i>129</i>
<i>Tabla 4.4: Parámetros estadísticos asociadas a los modelos cuadráticos ajustados..</i>	<i>130</i>
<i>Tabla 4.5: Parámetros estadísticos del análisis de MSR de las variables respuesta seleccionadas para optimizar en la Combinación de barreras 1.....</i>	<i>131</i>
<i>Tabla 4.6: Resultados de la validación del tratamiento óptimo 1.....</i>	<i>144</i>
<i>Tabla 4.7: Valores iniciales para todas las respuestas del jugo de frutilla fresco y valores medios de la muestra sin tratar y las muestras tratadas luego de 14 días de almacenamiento a 5°C</i>	<i>146</i>
<i>Tabla 4.8: Parámetros estadísticos asociadas a los modelos cuadráticos ajustados..</i>	<i>148</i>
<i>Tabla 4.9: Parámetros estadísticos del análisis de MSR de las variables respuesta seleccionadas en la Combinación de barreras 2.....</i>	<i>149</i>
<i>Tabla 4.10: Resultados de la validación del tratamiento óptimo 2.....</i>	<i>162</i>

<i>Tabla 4.11: Supervivencia de E. coli O157:H7 (log UFC/mL) inoculado en jugo de frutilla tratado con los tratamientos óptimos durante el almacenamiento refrigerado a 5°C.....</i>	<i>172</i>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

Capítulo 5

<i>Tabla 5.1: Descripción de los atributos sensoriales seleccionados, términos mínimo y máximo y valores consensuados para la muestra de referencia.</i>	<i>188</i>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

Capítulo 6

<i>Tabla 6.1: Atributos seleccionados para el TDS y sus definiciones consensuadas por los panelistas</i>	<i>222</i>
<i>Tabla 6.2: Puntajes medios de aceptabilidad, expectativa de saciedad y percepción de saludable obtenidos para las diferentes formulaciones en la condición E</i>	<i>229</i>
<i>Tabla 6.3: Puntajes medios de aceptabilidad y expectativa de saciedad obtenidos para las diferentes formulaciones en la condición C.....</i>	<i>230</i>
<i>Tabla 6.4: Puntajes medios de aceptabilidad y expectativa de saciedad obtenidos para las diferentes formulaciones en la condición I.....</i>	<i>232</i>