

**I Congreso Argentino
de Biología y Tecnología
Poscosecha**

**IX Jornadas Argentinas de Biología
y Tecnología Poscosecha**



**Libro de Trabajos
Completos**

**25 al 27 de octubre de 2017
Concordia - Entre Ríos - Argentina**

Libro de Trabajos Completos I Congreso Argentino de Biología y Tecnología
Poscosecha : IX Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Poscosecha /
Mariángeles Cocco ... [et al.] ; compilado por Juan Manuel Castagnini ; Luz
Marina Zapata ; Liliana Mabel Gerard. - 1a ed. - Paraná : Universidad
Nacional de Entre Ríos. UNER, 2018.
Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-950-698-437-3

1. Agronomía. 2. Ciencia. 3. Tecnología Alimentaria . I. Cocco, Mariángeles II.
Castagnini, Juan Manuel, comp. III. Zapata, Luz Marina , comp. IV. Gerard, Liliana Mabel
, comp.
CDD 641.4

ISBN 978-950-698-437-3



Editores

Luz Marina Zapata

Liliana Gerard

Juan Manuel Castagnini



Instituciones organizadoras

Facultad de Ciencias de la
Alimentación. Universidad Nacional de
Entre Ríos



Instituto Nacional de Tecnología
Agropecuaria. EEA Concordia



Ministerio de Agroindustria
Presidencia de la Nación

Centro de Investigación y Desarrollo en
Criotecnología de Alimentos



Instituto de Fisiología Vegetal.
Universidad Nacional de La Plata





Comité Científico

- Bello Fernando (INTA Concordia – Fisiopatías cítricos, arándanos).
- Castagnini Juan Manuel (FCAL-UNER – Nuevas tecnologías para agregado de valor).
- Davies Cristina (FCAL-UNER – Tecnologías para prolongar la vida útil).
- Gerard Liliana (FCAL-UNER – Nuevas tecnologías para agregado de valor).
- Rasia Mercedes Carolina (FCAL-UNER – Efectos de los procesos tecnológicos sobre la calidad).
- Rodriguez Viviana Rita (FCAL-UNER - Tecnologías para prolongar la vida útil).
- Vázquez Daniel (INTA Concordia – Alteraciones Patológicas).
- Zapata Luz Marina (FCAL-UNER – Efectos de los procesos tecnológicos sobre la calidad).



Indice de Trabajos

Evaluación de la aplicación de fungicida en drencher (ducha de bins) para el control de <i>Penicillium digitatum</i> en naranjas.....	6
Evaluación del filtrado y desinfección sobre la efectividad de caldos fungicidas reutilizados aplicados en drencher.....	12
Contaminación fúngica de manzanas de cultivo orgánico y convencional para consumo en fresco e industrialización	20
Determinación del momento de cosecha de durazno cv. Opedepe, campaña 2015 en el Valle de Los Pericos, Jujuy, R. A.	30
Expresión de genes de biosíntesis y degradación de glucosinolatos indólicos en brócoli durante el ritmo circadiano y senescencia poscosecha	38
Comportamiento poscosecha de frutos de berenjena violeta proveniente de plantas injertadas.....	47
Efecto del tratamiento combinado (1-metilciclopropeno/CaCl ₂) en parámetros de calidad poscosecha de frutilla (<i>Fragaria x ananassa</i> , Duch)	54
Efecto del tratamiento poscosecha 1-MCP/CaCl ₂ en la expresión de genes del metabolismo de la pared celular de frutilla	63
Factores bioquímicos y fisiológicos que diferencian tres variedades de arándanos (<i>Vaccinium corymbosum</i>) con distinto grado de firmeza.....	72
La sobreexpresión del CBM de la expansina 1 de tomate modifica la firmeza y la susceptibilidad a <i>Botrytis cinerea</i>	82
Efecto de la sobreexpresión de CBM-FaEXP2 en frutilla.....	92
Estudio de las propiedades superficiales del arándano. Análisis de la mojabilidad de la superficie del fruto con soluciones de almidón	102
Influencia del estado de desarrollo y la estación de cosecha sobre la microestructura y textura de berenjena	112
Tratamientos con luz de baja intensidad para retrasar la senescencia durante el almacenamiento de brócoli a temperatura ambiente: ¿clorofilas o fitocromos?	123
Variabilidad en las características físicas de los frutos de calafate (<i>Berberis microphylla</i>) cosechados de diferentes poblaciones de Tierra del Fuego.....	132
Variabilidad en las características químicas de los frutos de calafate (<i>Berberis microphylla</i>) cosechados de diferentes poblaciones de Tierra del Fuego.....	139
Estudio de la calidad de los frutos de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) cultivados en San Pedro (Provincia de Buenos Aires)	145
Efecto de la deshidratación osmótica en el secado de rodajas de mango para comercializar como snacks saludables.....	154
Estudio fenológico y calidad de frutos de tres cultivares de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) cultivados en San Pedro (Buenos Aires).....	163



Efecto del almacenamiento congelado sobre los parámetros de calidad y textura de moras (<i>Rubus sp</i>) del noreste argentino.....	173
Comparación de métodos de conservación de nueces Pecán [<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch] utilizados por productores de Entre Ríos	182
Uso de pretratamientos de deshidratación osmótica para mejorar el color y prevenir las pérdidas de antioxidantes en dulces de frutilla	188
Efecto del tratamiento térmico sobre el color y contenido de antocianinas en jugos de zarzamora y frambuesa.....	197
Estudio cinético de la degradación térmica de antocianinas en pulpas y jugos de frambuesa	207
Modelización matemática de la cinética de secado de rodajas de manzana y zapallo impregnadas con jugo de arándanos.....	215



Alteraciones Patológicas



Evaluación de la aplicación de fungicida en drencher (ducha de bins) para el control de *Penicillium digitatum* en naranjas

Cocco M. ⁽¹⁾, Meier G. ⁽¹⁾, Stivanello J. P., Almirón N. ⁽¹⁾

(1) Estación Experimental Agropecuaria Concordia, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Concordia, Entre Ríos, Argentina.

Dirección de e-mail: cocco.mariangeles@inta.gov.ar

Resumen

Para evitar pérdidas por podredumbres en postcosecha de cítricos, se utilizan diferentes aplicaciones de fungicidas, entre ellas el tratamiento denominado “drencher” que consiste en una ducha de los bins con fruta. Este tratamiento es importante realizado antes de 24 h de la cosecha y de forma homogénea para toda la carga de fruta. Sin embargo, los empacadores no siempre conocen si los tratamientos que aplican son efectivos o no, ni si la reutilización constante del fungicida provoca una pérdida de su efectividad durante la jornada de trabajo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de un sistema de “drencher” en una planta de empaque de mercado interno y la pérdida de efectividad de la mezcla fungicida durante la jornada de trabajo. Se utilizaron 3 repeticiones de 30 naranjas inoculadas con *Penicillium digitatum* colocadas en la parte superior de la pila de 4 bins a tratar y en la parte inferior del mismo, en los bins tratados con mezcla fungicida inicial, intermedia y final (0, 48 y 96 bins tratados respectivamente). El tratamiento se realizó en un empaque del departamento Federación, Entre Ríos, con una mezcla del fungicida procloraz (716 ppm) con fosfito de potasio (430 ppm). Además se tomaron muestras de fungicida en dichos momentos para evaluar su eficacia para el control de *P. digitatum* “in vitro” e “in vivo”. La evaluación “in vitro” se realizó comparando el crecimiento del hongo, en Agar Papa Glucosado con y sin el agregado del caldo fungicida evaluado. La evaluación “in vivo” se realizó mediante el agregado de 15 µL de fungicida a las heridas de frutos previamente inoculados. En ambos casos la evaluación se realizó luego de 7 días a 20°C. No se observaron diferencias de control de podredumbres por la posición de los frutos en la pila de bins, ni diferencias entre la evaluación inicial e intermedia, aunque hubo una disminución leve del control al final del proceso. Las muestras de caldo fungicida tomadas en los distintos momentos mostraron un aumento en su contaminación macroscópica, sin embargo en la evaluación “in vivo” no se observó pérdida de eficacia del producto. En la evaluación “in vitro”, en cambio se observó una disminución en la efectividad del fungicida para inhibir al hongo especialmente entre el inicial y las muestras intermedia y final (100, 70 y 65% de inhibición, respectivamente). Por lo que este sistema específico fue eficaz en su forma de aplicación, siendo homogéneo para toda la carga tratada, sin embargo el producto aplicado se va contaminando durante la jornada de trabajo lo que provoca una pérdida de efectividad y una aplicación heterogénea entre los primeros y los últimos bins tratados.

Palabras clave: postcosecha, cítricos, moho verde.



Introducción

Una de las principales causas de pérdidas de fruta es debido a las podredumbres generadas por los hongos (Smilanick et al., 1997; Palou et al., 2008). En frutos cítricos, las podredumbres provocadas por el moho verde (*Penicillium digitatum*) son las más importantes en la mayoría de las regiones citrícolas y ha sido mencionada como una problemática por el sector productivo de la región citrícola del río Uruguay (Meier et al., 2010).

Las heridas que originan este tipo de podredumbres pueden ocurrir previo a la cosecha, como durante todo el período postcosecha, sin embargo, la mayor incidencia de las mismas se ha observado en la cosecha (Cocco, 2005).

Desde que se producen las heridas hasta su procesamiento en línea de empaque puede pasar desde pocas horas hasta varios días, dependiendo de las prácticas del empaque. Es por eso que la aplicación de un tratamiento fungicida lo antes posible es de gran importancia, ya que pasadas las 30 h desde la inoculación los fungicidas ya no son efectivos (Eckert and Brown, 1986).

El método que suele utilizarse para esta primera aplicación de fungicidas es la ducha de bins (drencher), que puede realizarse en el momento de cosecha (en el campo) o bien al llegar a la planta de empaque.

Debido a su importancia como primer tratamiento antifúngico, esta aplicación debe ser controlada de forma de mantener su efectividad en toda la carga de fruta (Meier y Cocco, 2007). Sin embargo, los empacadores no siempre conocen si los tratamientos que aplican son efectivos o no, ni si la reutilización constante del fungicida provoca una pérdida de su efectividad durante la jornada de trabajo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de un sistema de “drencher” en una planta de empaque de mercado interno y la pérdida de efectividad de la mezcla fungicida durante la jornada de trabajo.

Materiales y Métodos

Material biológico

Tanto para la evaluación de la efectividad de la aplicación **(A)** como para la evaluación de control “in vivo” por el caldo fungicida **(B)** se utilizaron 3 repeticiones de 30 frutos de naranja cv. Salustiana provenientes de la EEA Concordia del INTA, cosechados en condiciones de madurez comercial (IM: 6,7). Los frutos fueron inoculados 20 h previa a la aplicación de caldos fungicidas.

Para la inoculación de los frutos y para la evaluación “in vitro” de efectividad del caldo se utilizó la cepa de *Penicillium digitatum* (A-8) de la colección de la EEA Concordia del INTA.

La inoculación se realizó mediante una herida por fruto en la zona ecuatorial, de 3 mm de profundidad y 1 mm de diámetro, con elemento punzante previamente sumergido en suspensión de 10^6 conidios/mL.



Procedimiento

Se trabajó en un empaque de mercado interno de Villa de Rosario (Entre Ríos), cuyo drencher trataba 8 pilas de 4 bins de naranjas Navel, cada una con una ducha de fungicida de 750 L de caldo preparado que contenía procloraz (716 ppm) y fosfito de potasio (430 ppm). El caldo fungicida se aplicó mediante un dispositivo que iba recorriendo las pilas de bins, con un tiempo de total de tratamiento por pila de bins de 28 segundos. Se evaluó la aplicación **(A)** y también se tomaron muestras de caldo para evaluar el control de *P. digitatum* “in vitro” e “in vivo” **(B y C)** en tres momentos: **t1** al inicio con el caldo recién formulado, **t2** luego de procesar 48 bins (aproximadamente 15 toneladas) y **t3** luego de procesar 96 bins (29 toneladas).

A) Evaluación de eficacia de la aplicación: se trató fruta inoculada directamente en el drencher colocadas en bolsas de red, 3 repeticiones en la parte superior de la pila de bins y 3 repeticiones en el bin de abajo de la pila. Se evaluaron 3 momentos de aplicación con frutos tratados arriba y debajo de la pila: Inicial (M1: arriba y M2: abajo); Intermedio (M3: arriba y M4: abajo) y final (M5: arriba y M6: abajo).

El tratamiento testigo consistió en fruta inoculada tratada por inmersión en agua a temperatura ambiente durante 60 segundos.

B) Eficacia del caldo para el control *P. digitatum* “in vivo”: la evaluación se realizó mediante el agregado de 15 µL de fungicida a las heridas de frutos previamente inoculados. Se determinó la incidencia de podredumbres luego de 7 días a 20°C.

C) Eficacia del caldo para la inhibición de *P. digitatum* “in vitro”: se realizó comparando el crecimiento del hongo en Agar Papa Glucosado con y sin el agregado del caldo fungicida evaluado. El agregado de fungicida al medio de cultivo se realiza mediante una dilución 1:1000.

Análisis estadístico

Se aplicó análisis de la varianza (ANOVA) a los datos de incidencia de podredumbres en fruta inoculada e inhibición del crecimiento de *P. digitatum* “in vitro” para los distintos tratamientos, con un nivel de significancia de 0,05. En caso de encontrar diferencias significativas se aplicó test de Tukey para separación de medias con un nivel de confianza del 95%.

Resultados y Discusión

A) Evaluación de eficacia de la aplicación: a diferencia de lo observado por Colodner et al. (2015) en duchas de bins para manzanas, en este trabajo no se observaron diferencias en la efectividad del tratamiento para las frutas que estaban en la parte superior o inferior de la pila de bins (Figura 1).

Respecto al tiempo de tratamiento, no se observaron diferencias entre la evaluación inicial e intermedia (alrededor del 100% de control de podredumbres), aunque sí hubo una disminución del control (86% de control) al final del proceso (Figura 1), superior a lo observado en drencher para manzanas (Colodner et al., 2015), debido



principalmente a la cantidad de bins tratados por volumen de caldo que en este caso es superior en un 66%.

B) Eficacia del caldo para el control *P. digitatum* “in vivo”: Las muestras de caldo fungicida tomadas en los distintos momentos mostraron un aumento en la contaminación observada a simple vista (Figura 2). Sin embargo, al evaluar la efectividad in vivo del caldo no se observaron diferencias entre el control de las mismas por las muestras de caldo tomadas en distintos momentos del proceso (Figura 3).

C) Eficacia del caldo para la inhibición de *P. digitatum* “in vitro”: se observó una disminución en la efectividad del fungicida para inhibir al hongo especialmente entre la muestra inicial de caldo y las muestras intermedia y final. Así, el caldo pasa de una efectividad de inhibición del 100% en la muestra inicial, a un 70 y 65%, para las muestras intermedia y final, respectivamente (Figura 4).

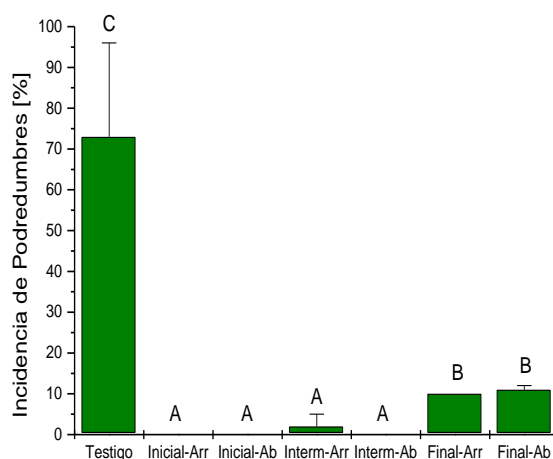


Figura 1. Incidencia de podredumbres de la fruta inoculada testigo y tratada en distintos momentos y posiciones del drencher. Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, 95% confianza).



Figura 2. Muestras de caldo fungicida en los distintos momentos.

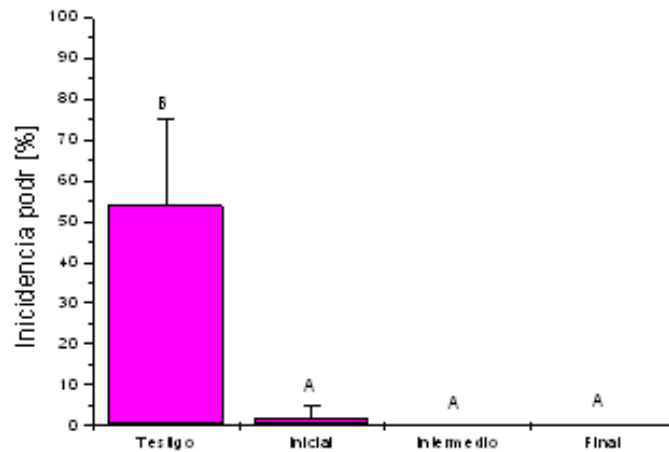


Figura 3. Incidencia de podredumbres en los frutos inoculados testigo y tratados con las muestras de caldo. Letras distintas indican diferencia significativa (Tukey, 95% confianza).

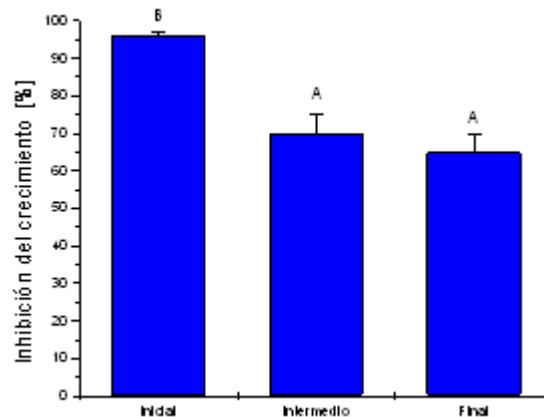


Figura 4. Nivel de inhibición del crecimiento de *P. digitatum* con las distintas muestras. Letras distintas indican diferencia significativa (Tukey, 95% confianza).

Conclusiones

El sistema de drencher evaluado fue eficaz en su forma de aplicación, con una distribución homogénea de caldo fungicida que permite un control similar de podredumbres entre los frutos que están en la parte superior e inferior de la pila de bins.

El caldo fungicida se va contaminando durante la jornada de trabajo, acompañado de una pérdida de la efectividad.

Por lo que no hay homogeneidad de tratamiento durante el tiempo de utilización del caldo fungicida, tratando las últimas pilas de bins con un caldo de efectividad menor.



Este caldo residual, a pesar de tener menos efectividad que el inicial, aún conserva un elevado nivel de efectividad.

Agradecimientos

Se agradece la colaboración de los señores Gustavo Belluzo y José Luis Fracalossi por su participación en la realización de este ensayo.

La realización de este ensayo fue financiada por el Proyecto INTA PNFRU1105083 “Nuevas tecnologías para el mantenimiento de la calidad en la cosecha, acondicionamiento y logística de frutas frescas”.

Referencias

COCCO M. (2005). Determinación de resistencia a fungicidas tradicionales en cepas de *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* en distintas quintas y empaques de la región, en: VÁZQUEZ D E, MEIER G E, COCCO M. *Actas del II Seminario Internacional de Postcosecha de Cítricos*: 104-107.

COLODNER A, ROMERO S, JARA G. (2015). Ducha de bines para la aplicación de productos fitosanitarios en manzanas, en: *Libro de actas de las VIII Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Poscosecha*: 44.

ECKERT J W, BROWN G E. (1986). Evaluation of postharvest Fungicide Treatments for Citrus Fruit, en: *Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens*: 92-97.

MEIER G, COCCO M. (2007). *Prácticas recomendadas para la cosecha y postcosecha de frutos cítricos*. Ediciones INTA. Serie de Extensión nº 02. Argentina.

MEIER G, BACIGALUPO R, IRIARTE L. (2010). La instalación de cámaras frigoríficas en empaques de cítricos como innovaciones socio-técnicas. *II Congreso Internacional de Desarrollo Local y I jornadas de Ciencias Sociales y Desarrollo Rural*. San Justo, Buenos Aires, Argentina.

PALOU L, SMILANICK J L, DROBY S. (2008). *Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds*. *Stewart Postharvest Review* 2:2. Disponible en: < <http://ucce.ucdavis.edu/files/datastore/234-1524.pdf> > [20 de octubre de 2017].

SMILANICK J L, MACKEY B E, USALL J, MARGOSAN D A. (1997). Influence of concentration of soda ash, temperature, and immersion period on the control of postharvest green mold of oranges. *Plant Disease*, 81: 379-382.



Evaluación del filtrado y desinfección sobre la efectividad de caldos fungicidas reutilizados aplicados en drencher

Cocco M. ⁽¹⁾, Stivanello J. P., Meier G. ⁽¹⁾, Almirón N. ⁽¹⁾

(1) Estación Experimental Agropecuaria Concordia, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Concordia, Entre Ríos, Argentina.

Dirección de e-mail: cocco.mariangeles@inta.gob.ar

Resumen

La aplicación de fungicidas postcosecha en “drencher” es un método muy difundido en la región citrícola del río Uruguay por su importancia para el control de podredumbres. Una correcta distribución del fungicida por toda la carga es el primer aspecto a considerar y está relacionado al diseño del equipo aplicador. Además se debe garantizar la efectividad del caldo aplicado a todo el tratamiento, aunque se ha observado una disminución de la misma a medida que el caldo se contamina durante el proceso. A su vez, los grandes volúmenes de fungicida desechados luego del tratamiento por su menor efectividad, afectan el medio ambiente de la zona productora, donde el número de empaques citrícolas es muy elevado. Es por eso que se planteó la incorporación de un sistema de filtrado y desinfección del caldo fungicida para la reutilización del mismo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad de un caldo fungicida reutilizado durante varios días luego de ser filtrado y desinfectado constantemente. Se evaluó un drencher en planta de empaque que trataba naranjas destinadas a Mercado Interno, con una mezcla fungicida de procloraz (900 ppm) y guazatina (800 ppm). El sistema de filtrado constaba con 2 tanques de 1000 L, un filtro de arena y una bomba de alto caudal (16 m³/h), donde una vez tratada una tanda de 96 bins se filtraba la mezcla fungicida durante 20 minutos, se aplicaba un refuerzo de 20% de los fungicidas utilizados y se desinfectaba con amonio cuaternario (50 ppm). Se trabajó durante 4 días con un total de 762 bins procesados. Se tomaron muestras de caldo fungicida al inicio del tratamiento (M1), luego del primer lote de 96 bins (M2), luego del primer proceso de filtrado y desinfección (M3), al inicio del segundo día (M4) y al finalizar la última tanda en el último día (M5). Las muestras de caldo se utilizaron para evaluar su efectividad “in vivo” en fruta inoculada con *P. digitatum* o “in vitro” mediante la siembra de *P. digitatum* y *Geotrichum citri-aurantii* en APG con la mezcla evaluada. Se observó una reducción similar del control “in vivo” de *P. digitatum* luego del primer lote (M2) y al final del proceso (M5), con pérdidas de 43% y 41% respectivamente. En los resultados “in vitro” la tendencia fue similar con *P. digitatum* (84 y 74% de pérdida de efectividad para M2 y M5, respectivamente), mientras que para *Geotrichum* sp. la pérdida es muy leve (12 y 9% para M2 y M5, respectivamente) lo que hace suficiente el refuerzo de 20 % de guazatina. Así es que se obtiene un resultado similar tratando 762 bins al original procesando sólo 96, con menores costos para el productor y menor volumen de efluentes.

Palabras clave: podredumbres, cítricos, *Penicillium*, *Geotrichum*.



Introducción

La producción de cítricos es una actividad muy importante como economía regional en la provincia de Entre Ríos, con 45 % y 39% de la producción nacional de mandarinas y naranjas, respectivamente (FEDERCITRUS, 2017). Esta región se caracteriza por la presencia de una gran cantidad de pequeños empaques, alrededor de 400, que representan el 78% de empaques de mercado interno (Meier, 2012). La zona de mayor densidad de empaques se encuentra en Chajarí y Villa del Rosario, donde se procesa alrededor del 60 al 70% del volumen de la producción cítrica de la provincia (Almada et al., 2012).

Uno de los principales problemas en la postcosecha de cítricos suele ser la incidencia de podredumbres, ocasionando la mayoría de las pérdidas (Smilanick et al., 1997; Palou et al., 2008; Meier et al., 2010). Entre los métodos de control de podredumbres, la mayoría de estos empaques utilizan la tecnología de ducha de bins con caldos fungicidas o drencher (Meier e Iriarte, 2010). Este método es de gran importancia porque puede aplicarse a la fruta dentro de las 24 h de su cosecha donde la efectividad de los fungicidas puede ser más relevante (Eckert and Brown, 1986). Esta aplicación debe ser homogénea no sólo en la distribución en toda la carga de fruta, sino también durante el tiempo de utilización del caldo fungicida. Previamente la recomendación de los fungicidas utilizados es usarlos durante una jornada de trabajo y eliminarlos al final de la misma (Meier y Cocco, 2007).

Sin embargo, lo que ya se ha observado es que al tratar un grupo de alrededor 100 bins se pierde mucha efectividad (Cocco et al., 2017), y muchas veces en una jornada suele procesarse mayor cantidad de fruta, por lo que la fruta tratada con el caldo final presenta un control muy inferior. A su vez, los grandes volúmenes de fungicida desechados luego del tratamiento por su menor efectividad, afectan el medio ambiente de la zona productora, donde el número de empaques cítricos es muy elevado.

En algunos empaques cítricos de Entre Ríos se ha implementado el filtrado de caldos fungicidas del drencher mediante filtro de lecho de arena. Si bien se ha estudiado aumentar el tiempo de vida útil de los caldos fungicidas mediante sistemas de filtrado (Conesa Roca et al., 2012), no se conoce su efecto sobre la efectividad del caldo fungicida en las condiciones de uso de esta región cítrica.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad de un caldo fungicida reutilizado durante varios días luego de ser filtrado y desinfectado constantemente.

Materiales y Métodos

Descripción del sistema

Se evaluó el sistema de un drencher que trataba naranjas con 1000 L de mezcla fungicida de procloraz (900 ppm) y guazatina (800 ppm), en un empaque de Villa del Rosario (Entre Ríos).

El tratamiento se aplicaba a tandas de 96 bins apilados de a cuatro, con un dispositivo recorriendo las pilas de bins, con un tiempo de total de tratamiento por pila de bins de 28 segundos.



El drencher contaba con 2 tanques de 1000 L, un filtro de lecho de arena y una bomba de alto caudal ($16 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$). El filtrado del caldo fungicida se aplicó un sistema discontinuo, donde una vez tratada una tanda de 96 bins se filtraba la mezcla fungicida durante 20 minutos, se aplicaba un refuerzo de 20% de los fungicidas utilizados y se desinfectaba con amonio cuaternario (cloruro de benzalconio, 50 ppm). Se realizó un promedio de 2 limpiezas de filtro por retrolavado diarias.

Se evaluó el trabajo del drencher durante 4 días, procesando 271 bins el primer día, 192 bins el segundo día, 196 bins el tercer día y 103 bins el cuarto día, con un total de 762 bins procesados (aproximadamente 229 toneladas de fruta).

Se tomaron muestras de caldo fungicida en distintos momentos de procesamiento: **M1-INICIAL**: caldo fungicida previo a tratar a la fruta; **M2**: luego del primer lote de 96 bins; **M3**: después del primer lote y el primer filtrado; **M4**: caldo inicial al segundo día: 271 bins tratados y luego de filtrado; **M5-FINAL**: caldo del cuarto día, luego de tratar 762 bins.

Material biológico

Para evaluar el control “in vivo” de las muestras de fungicida se utilizaron frutos de naranja cv. Cadenera provenientes de la EEA Concordia del INTA, cosechados en condiciones de madurez comercial (IM: 7,7). Se utilizaron 3 repeticiones de 30 frutos inoculados 20 h previas a la aplicación.

Se utilizó una cepa de *Penicillium digitatum* de la colección de la EEA Concordia del INTA (A-8) para evaluar el control “in vivo” y la inhibición “in vitro” de las muestras de fungicida. Además se evaluó la inhibición “in vitro” de *Geotrichum citri-aurantii* utilizando un aislamiento de la misma procedencia.

La inoculación se realizó mediante una herida (3 mm de profundidad y 1 mm de diámetro) en la zona ecuatorial de cada fruto con elemento punzante embebido en suspensión de 10^6 conidios/mL.

Determinaciones

A) Eficacia del caldo para el control *P. digitatum* “in vivo”: la evaluación se realizó mediante el agregado de 15 μL de fungicida a las heridas de frutos previamente inoculados. Se determinó la incidencia de podredumbres luego de 7 días a 20°C.

B) Eficacia del caldo para la inhibición de *P. digitatum* y *G. citri-aurantii* “in vitro”: se filtró el caldo con papel de filtro para eliminar los restos de tierra y luego se filtró en membrana para esterilización de agua (Millipore, Millex GV, 0,22 μm) y se lo combinó con APG en placa a una relación de dilución 1:1000. Luego se sembró en esas placas *P. digitatum* y *G. citri-aurantii* y se comparó el crecimiento de la colonia con un testigo en APG sin fungicida.



Análisis Estadístico

Se aplicó análisis de la varianza (ANOVA) a los datos de control de podredumbres de *P. digitatum* e inhibición del crecimiento “in vitro” de *P. digitatum* y *G. citri-aurantii*, para los distintos tratamientos, con un nivel de significancia de 0,05. En caso de encontrar diferencias significativas se aplicó test de Tukey para separación de medias con un nivel de confianza del 95%.

Resultados y Discusión

El caldo aumentó su contaminación luego de tratar los 96 bins (**M2**) respecto del inicial (**M1**) como se observa en la figura 1. Luego del filtrado (**M3**) esta contaminación disminuye, empezando el segundo día (**M4**) con un caldo fungicida de aspecto similar al inicial (**M1**). Al final de los 4 días (**M5**) se observó nuevamente un caldo contaminado pero de aspecto similar al caldo antes del primer filtrado (**M2**).



Figura 1. Muestras de caldo tomadas en los distintos momentos.

A) Eficacia del caldo para el control *P. digitatum* “in vivo”: el caldo inicial presentó el mayor nivel de control (82%) respecto del testigo que presentó un promedio de 93% de podridos (Figura 2).

En paralelo a lo observado respecto al aspecto del caldo, el control “in vivo” de *P. digitatum*, se redujo un 43% respecto del inicial, luego de procesar el primer lote de fruta (**M2**).

A pesar que, en esta primera tanda, la cantidad de bins tratados por volumen de caldo se redujo en un 25% respecto a ensayos previos (Cocco et al., 2017), la pérdida de efectividad en este ensayo fue superior, probablemente debido a la mayor contaminación que la fruta traía de campo y a una mayor temperatura ambiente respecto de las evaluaciones anteriores (Cocco et al., 2017).

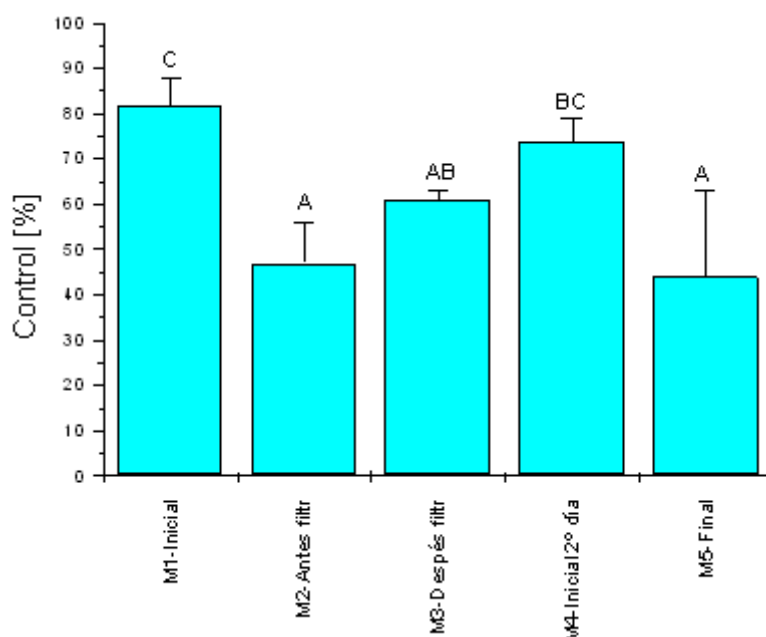


Figura 2. Control de podredumbres (promedio y desviación estándar) en la fruta inoculada tratada con distintos caldos. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, 95% confianza).

El nivel de control volvió a subir luego del filtrado (**M3**), aunque sin alcanzar el nivel inicial (Figura 2). El segundo día se inició con un caldo (**M4**) sin diferencias significativas de control al caldo inicial (**M1**). Luego de 4 días se observó nuevamente con un caldo (**M5**) que perdió su capacidad de control de podridos (41% de reducción), aunque a los mismos niveles que se perdieron luego de la primera tanda (**M2**) de bins tratados (Figura 2).

B) Eficacia del caldo para la inhibición de *P. digitatum* y *G. citri-aurantii*: en los resultados “in vitro” con *P. digitatum* la tendencia fue similar a los resultados previos (Figura 3). La muestra de caldo inicial (**M1**) provocó un 88% de inhibición del hongo, mientras que la efectividad se redujo a un 14% de inhibición para la muestra **M2**, que luego de filtrado y refuerzos ascendió a un 40% (**M3**). El segundo día se inició con un caldo (**M4**) de efectividad algo inferior al inicial, ya que provocó un 74% de inhibición de *P. digitatum* (Figura 3). Mientras que la muestra final de caldo (**M5**) presentó un 21% de inhibición, que no presentó diferencias significativas con el caldo **M2** (Figura 3).

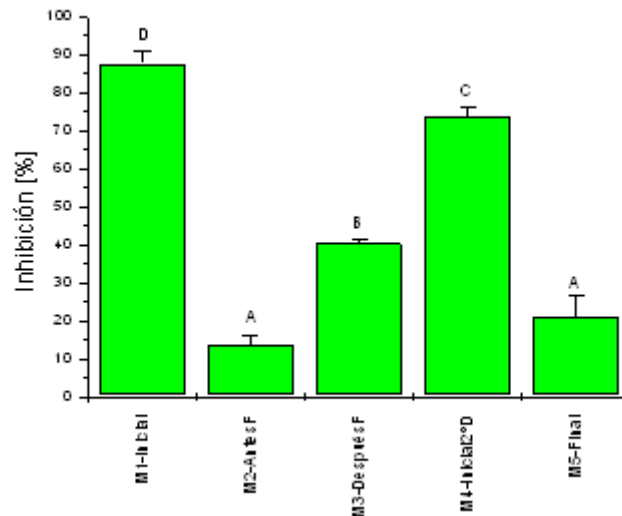


Figura 3. Inhibición del crecimiento de *P. digitatum* en placas de APG con las distintas muestras de caldo evaluadas. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, 95% confianza).

En el caso de la inhibición “in vitro” de *G. citri-aurantii*, la muestra de caldo inicial (**M1**) provocó 94% de inhibición (Figura 4), reduciéndose sólo a 82% luego de tratar la primera tanda de bins (**M2**). Luego de filtrado y refuerzos nuevamente el nivel de inhibición asciende a 92% (**M3**), comenzando cada tanda nueva con un nivel similar al inicial (Figura 4). Así el segundo día (**M4**) se comienza con un nivel de inhibición del 93% y éste disminuye sólo a 85% al final del ensayo (**M5**).

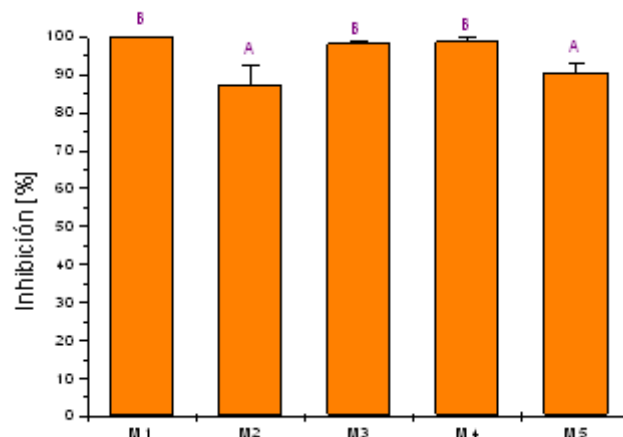


Figura 4. Nivel de inhibición del crecimiento de *G. citri-aurantii* en placas de APG con las distintas muestras de caldo evaluadas. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, 95% confianza).



Conclusiones

El sistema de filtrado en lecho de arena redujo la contaminación del caldo utilizado, permitiendo iniciar una nueva tanda de bins con un caldo de aspecto similar al inicial.

Respecto del control de podredumbres por *Penicillium digitatum* en los frutos inoculados caldo inicial presentó el mayor nivel de control, que se redujo significativamente luego de procesar 96 bins.

El filtrado y posterior refuerzo con 20% de fungicida vuelve a subir el nivel de control aunque no alcanza el nivel inicial. Por lo que, el nivel de refuerzo de fungicida procloraz necesario es superior al 20%.

El fungicida final luego de tratar 762 bins al finalizar el cuarto día presentó nuevamente un nivel de control inferior. Sin embargo, a pesar de esta capacidad de control residual inferior al inicial, la misma no difiere de la del caldo posterior a tratar los primeros 96 bins.

Los resultados “in vitro” de inhibición de *P. digitatum* presentaron una tendencia similar a los resultados de control de podredumbres “in vivo”.

En el caso de *G. citri-aurantii* la inhibición del desarrollo “in vitro” fue superior en el caldo inicial y, aunque se redujo luego de tratar 96 bins, esta reducción fue muy leve y el refuerzo es suficiente para obtener al inicio de cada tanda de bins un nivel similar al caldo inicial y se observó una reducción de su efectividad del 9% luego de tratar 762 bins.

El sistema implementado de filtrado y refuerzos fue suficiente para mantener la efectividad de los fungicidas durante todo el proceso, extendiendo el uso del caldo fungicida hasta 4 días.

Así, con el mismo caldo y en condiciones similares a la inicial, se trató una carga de fruta 8 veces superior, se disminuyeron los costos para el productor de 14 L de fungicida y se evitó la eliminación de 4200 L de efluentes al medio ambiente.

Se debe estudiar el efecto de desinfección del caldo para evitar su contaminación, especialmente que se acumulen conidios de hongos causantes de podredumbres.

Agradecimientos

La realización de este ensayo fue financiada por el Proyecto INTA PNFRU1105083 “Nuevas tecnologías para el mantenimiento de la calidad en la cosecha, acondicionamiento y logística de frutas frescas”.

Referencias

ALMADA C, MEIER G, PERINI S. (2012). La extensión rural como herramienta de mejora en la agroindustria de Entre Ríos. *XVI Jornadas Nacionales y VIII Jornada del Mercosur de Extensión Rural*: 1-8.

COCCO M, MEIER G, STIVANELLO J P, ALMIRÓN N. (2017). Evaluación de la aplicación de fungicida en drencher (ducha de bins) para el control de *Penicillium*



digitatum en naranjas. *I Congreso Argentino de Biología y Tecnología Poscosecha y IX Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Poscosecha* (en prensa).

CONESA ROCA E, TORMO ASES D, ARGÜELLES FOIX A L, CONESA DOMÍNGUEZ C. (2012). Prolongación del uso de las aguas de tratamiento fitosanitario en la postcosecha de cítricos. *Levante Agrícola: Revista internacional de cítricos. Especial Postcosecha* 411:210-214.

ECKERT J W, BROWN G E. (1986). Evaluation of postharvest Fungicide Treatments for Citrus Fruit. en: *Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens*, 92-97.

FEDERCITRUS (2017). *La actividad cítrica argentina*. Federación argentina del citrus. Disponible en: < <http://www.federcitrus.org/newsite/estadisticas/> > [20 de octubre de 2017].

MEIER G, COCCO M. (2007). *Prácticas recomendadas para la cosecha y postcosecha de frutos cítricos*. Ediciones INTA. Serie de Extensión nº 02. Argentina.

MEIER G, IRIARTE L. (2010). Trayectoria socio – técnica relacionada a la generación de tecnologías de postcosecha en la citricultura de Entre Ríos. *VIII Jornada Latinoamericana de Estudios Sociales de la Ciencia y la Tecnología*. Buenos Aires, Argentina.

MEIER G, BACIGALUPO R, IRIARTE L. (2010). La instalación de cámaras frigoríficas en empaques de cítricos como innovaciones socio-técnicas. *II Congreso Internacional de Desarrollo Local y I jornadas de Ciencias Sociales y Desarrollo Rural*. San Justo, Buenos Aires, Argentina.

MEIER G. (2012). Postcosecha en la región cítrica del Río Uruguay: Pasado y presente de los empaques y la comercialización. *Simposio Argentino de Postcosecha de Cítricos*. Concordia, Entre Ríos, Argentina.

PALOU L, SMILANICK J L, DROBY S. (2008). *Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds*. *Stewart Postharvest Review* 2:2. Disponible en: < <http://ucce.ucdavis.edu/files/datastore/234-1524.pdf> > [20 de octubre de 2017].

SMILANICK J L, MACKEY B E, USALL J, MARGOSAN D A. (1997). Influence of concentration of soda ash, temperature, and immersion period on the control of postharvest green mold of oranges. *Plant Disease*, 81: 379-382.



Contaminación fúngica de manzanas de cultivo orgánico y convencional para consumo en fresco e industrialización

Pavicich M. A. ⁽¹⁾, Iturmendi F. ⁽²⁾, Pose G. ⁽²⁾, Fernández Pinto V. ⁽¹⁾, Patriarca A. ⁽¹⁾

(1) Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

(2) Universidad Nacional de Río Negro, Sede Villa Regina, Argentina.

Dirección de e-mail: agustina.pavicich@qo.fcen.uba.ar

Resumen

La manzana es un cultivo de alta importancia en Argentina que se destina tanto al consumo en fresco, como a la industrialización. Existen distintas formas de cultivo: el convencional (CC), y el orgánico (CO). El objetivo del presente trabajo es caracterizar la micota de manzanas obtenidas por ambas formas de cultivo, y comparar la contaminación de estas frutas según el destino de las mismas, focalizando en el impacto y género fúngico responsable del corazón mohoso (CM). Se analizaron 144 manzanas cultivadas en el Alto Valle de Río Negro; 15 destinadas a consumo en fresco y 100 destinadas a industrialización (CC), y 29 destinadas a consumo en fresco (CO). Para las frutas con síntomas de daño fúngico externo se tomó una porción de tejido vegetal y se incubó en DCMA por 7 días a 25°C. Cada fruta fue luego desinfectada superficialmente y cortada para evaluar el grado y tipo de corazón mohoso. Una porción del centro de la fruta se colocó en DCMA y se incubó por 7 días a 25°C. *Alternaria*, *Penicillium* y *Cladosporium* fueron los géneros predominantes y se aislaron de todos los tipos de manzana analizadas. En las de CC destinadas a consumo en fresco, se detectaron además *Trichoderma*, *Nigrospora*, *Epicoccum* y *Geotrichum* y el porcentaje de CM fue de 33%. En cuanto a las destinadas a proceso (CC), se detectaron *Botrytis* además de los 3 géneros predominantes, y el porcentaje de CM fue de 50%. En las de CO se detectaron además *Phoma*, *Botrytis*, *Nigrospora* y *Acremonium*, y el porcentaje de CM fue del 41%. En todos los casos, el principal género causante de CM fue *Alternaria*. En cuanto a las manzanas para consumo en fresco, las de CO mostraron mayor contaminación fúngica que las CC. Sin embargo, las destinadas a proceso (CC) presentaron mayor grado de CM que las de CO. Teniendo en cuenta que dicha lesión no es detectada por inspección visual y que *Alternaria* es un género productor de micotoxinas, esto representa un riesgo asociado a los productos procesados a base de manzana.

Palabras clave: *Malus doméstica*, *Alternaria*, corazón mohoso, hongos, poscosecha.

Introducción

La manzana (*Malus doméstica*) es un cultivo de alta importancia en la zona del Alto Valle de Río Negro en Argentina. El 24% de la cosecha se destina a exportación, el 33% se consume en fresco, y el 43% restante se industrializa (FUNBAPA, 2014). La



industria de producción de concentrados de manzana trabaja a lo largo de todo el año para satisfacer al mercado local y exportar en contra estación. Esto implica el procesado tanto de fruta recién cosechada, como almacenada en cámaras refrigeradas por un período de hasta 9 meses. A su vez, las industrias procesan fruta de descarte, que es aquella que ha sido dañada por condiciones climáticas adversas o por baja demanda del producto fresco (Idigoras, 2014).

Este cultivo es susceptible a sufrir contaminaciones fúngicas a campo y en etapa poscosecha, generando enfermedades que causan severas pérdidas económicas. Las mismas pueden manifestarse en el exterior o en el interior de los frutos. La enfermedad en el interior se denomina corazón mohoso (CM) y se manifiesta como una podredumbre en el centro del fruto, que puede comenzar tanto en la etapa de floración de los árboles, cuando esporas de hongos se ponen en contacto con las flores generando la infección, como en la etapa de almacenamiento (Gao et al., 2013).

Distintos géneros han sido reconocidos como agentes causales de esta enfermedad a nivel mundial; entre ellos, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Botrytis*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* y *Phoma*. (Serdani et al., 1998; Van der Walt et al., 2010; Gao et al., 2013). En Argentina, *Alternaria* ha sido identificado como el principal género causante de corazón mohoso (Di Massi, 2007). Cuando las manzanas son infectadas con hongos capaces de producir micotoxinas, como por ejemplo *Alternaria*, *Penicillium* o *Fusarium*, existe un inminente riesgo para la salud asociada al consumo de los frutos y sus derivados.

En particular, *Alternaria* es capaz de producir más de 70 metabolitos secundarios con diversas estructuras químicas que se acumulan en las partes comestibles de las plantas y no son destruidas con los procesamientos tradicionales (López et al., 2016). Los más destacados, por sus conocidos efectos adversos sobre la salud, son los derivados de la dibenzopirona como el alternariol (AOH) y alternariol monometiléter (AME), y los derivados del ácido tetrámico como el ácido tenuazónico (TeA). Este último ha ocasionado toxicidad aguda en animales y está asociado al Onyalai, un desorden hematológico (Andersen et al., 2015). El AOH y AME demostraron actividad genotóxica y mutagénica en células bacterianas y de mamíferos *in vitro*, además de estar relacionadas con alta incidencia de cáncer de esófago en China (Pahlke et al., 2016; Logrieco et al., 2009).

Existen distintas formas de manejo de los cultivos: el convencional (CC) que implica la aplicación de sustancias químicas para prevenir las enfermedades fúngicas, y el orgánico (CO), en el que no se utiliza ningún tipo de pesticidas para su control. En las últimas décadas se está tendiendo a formas de manejo más sustentables y ecológicas e, inclusive, en algunos países de la comunidad europea está prohibido el uso de fungicidas en etapa poscosecha (Wisniewski et al., 2016).

Es importante conocer los principales agentes etiológicos causantes del corazón mohoso en nuestro país para implementar estrategias integradas de control, reduciendo la aplicación de pesticidas, para disminuir la contaminación de los frutos y la consecuente acumulación de metabolitos tóxicos, tanto en frutos de manzana como en sus productos derivados. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar la micobiota de manzanas obtenidas por cultivo convencional y orgánico, y comparar



la contaminación de estas frutas según el destino de las mismas, haciendo foco en el impacto y género fúngico responsable del corazón mohoso.

Materiales y Métodos

Muestras

Se analizaron 144 manzanas cultivadas en el Alto Valle de Río Negro; 29 destinadas a consumo en fresco (CO), 15 destinadas a consumo en fresco (CC) y 100 destinadas a industrialización (CC) almacenadas durante 9 meses en cámara.

Aislamientos

En el caso de las frutas con síntomas de daño fúngico externo se tomó una porción de tejido vegetal de la zona de la lesión y se incubó en Agar Diclorán Cloranfenicol Extracto de Malta (DCMA) por 7 días a 25°C. Cada fruta fue luego desinfectada superficialmente y cortada para evaluar el grado y tipo de corazón mohoso. Una porción del centro de la fruta se colocó en DCMA y se incubó por 7 días a 25°C.

Identificación

Se identificaron los géneros fúngicos presentes siguiendo la clave morfológica de Pitt y Hocking (2009). Las cepas de *Alternaria* obtenidas se pasaron a Agar Papa Zanahoria (APZ) y se incubaron con ciclos de 8 horas de luz y 16 de oscuridad a 25°C durante 7 días. La identificación de cada cultivo a nivel de grupo especie se hizo según Simmons (2007) basándose en el patrón de esporulación, color y tamaño de las colonias y características de los conidios.

Producción de micotoxinas in vitro

Para evaluar la capacidad de producción de micotoxinas, se seleccionaron 42 cepas de *Alternaria* provenientes de manzanas de los dos tipos de destino y origen: 17 provenientes de CO para comercialización en fresco, 6 de CC para venta en fresco, y 19 de CC destinadas a industrialización. Cada cepa se sembró individualmente en Agar Diclorán Rosa de Bengala Extracto de Levadura Sacarosa (DRYES) en 3 puntos de la placa. Se cultivaron en oscuridad durante 14 días a 25°C.

Extracción de micotoxinas

De cada placa de DRYES se cortaron 3 plugs de 6 mm de diámetro del centro de cada una de las 3 colonias y se colocaron en un vial para su extracción. Se agregó 1 ml de acetato de etilo con 1% de ácido fórmico y se agitó en sonicador ultrasónico por 60 min. El extracto se transfirió a un vial limpio y se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Luego se resuspendió en 400 µl de metanol y se filtró por filtro de poro 0,2 µm a un vial de HPLC para su posterior análisis.



DetECCIÓN DE MICOTOXINAS POR HPLC-MS

El análisis de cada extracto se realizó por cromatografía líquida de ultra alta performance con detector de arreglo de diodos y cuadrupolo con tiempo de vuelo y espectroscopía de masa (UHPLC-DAD-QTOFMS) en un equipo Agilent Infinity 1290 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). El análisis de MS se realizó en un equipo Agilent 6550 QTOF con un ionizador electrospray Dual Jet Stream. Las muestras fueron analizadas en modo ESI⁺ y la identificación de cada metabolito fue obtenida mediante una búsqueda dirigida y comparación del espectro MS/HRMS con librerías con el programa MassHunter Quantitative Analysis para QTOF (versión B.06.00).

Resultados y Discusión

Aislamientos

Los géneros predominantes en todos los tipos de manzanas analizadas fueron *Alternaria*, *Penicillium* y *Cladosporium*. Los mismos se aislaron de los frutos provenientes de ambos tipos de cultivo y destino. *Alternaria* fue el principal género fúngico responsable de CM, por ello se identificaron los aislamientos de este género a nivel de grupo especie a fin de lograr una mayor caracterización de los mismos.

En las manzanas de CO para consumo en fresco se detectaron además *Botrytis*, *Phoma*, *Nigrospora* y *Acremonium* (figura 1), y el porcentaje total de incidencia de CM fue del 41%. Todos los géneros excepto *Nigrospora* fueron aislados del interior de los frutos causando CM. En particular, *A. tenuissima* fue la principal especie causante de esta enfermedad.

Estos resultados muestran una amplia diversidad fúngica capaz de colonizar tanto el exterior como el interior de estas frutas de origen orgánico, y están en concordancia con Abdelfattah et al. (2016), quienes hallaron estos mismos géneros como contaminantes de manzanas orgánicas en Estados Unidos.

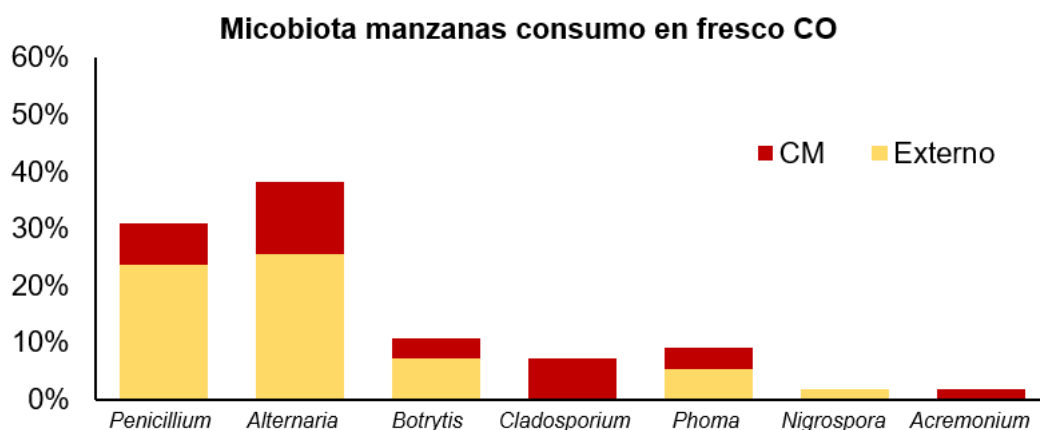


Figura 1. Porcentaje de manzanas para consumo en fresco, cultivo orgánico, contaminadas por cada género fúngico según el tipo de lesión. CM: Corazón mohoso; Externo: Contaminación superficial.



Como se muestra en la figura 2, en los frutos de CC destinados a consumo en fresco, se detectaron además de los tres géneros mayoritarios, *Nigrospora*, *Trichoderma*, *Geotrichum* y *Epicoccum* y el porcentaje total de CM fue del 33%. *Penicillium* y *Alternaria* se aislaron tanto del exterior como del interior de los frutos, mientras que *Epicoccum* únicamente del interior, y sólo estos tres géneros fueron los causantes de CM, lo que parecería indicar una menor diversidad fúngica en el interior de los frutos debido a la aplicación de antifúngicos a campo y la consecuente disminución del porcentaje de esta enfermedad. En cuanto a las especies de *Alternaria* causantes de corazón mohoso, se hallaron *A. tenuissima* y *A. arborescens*.

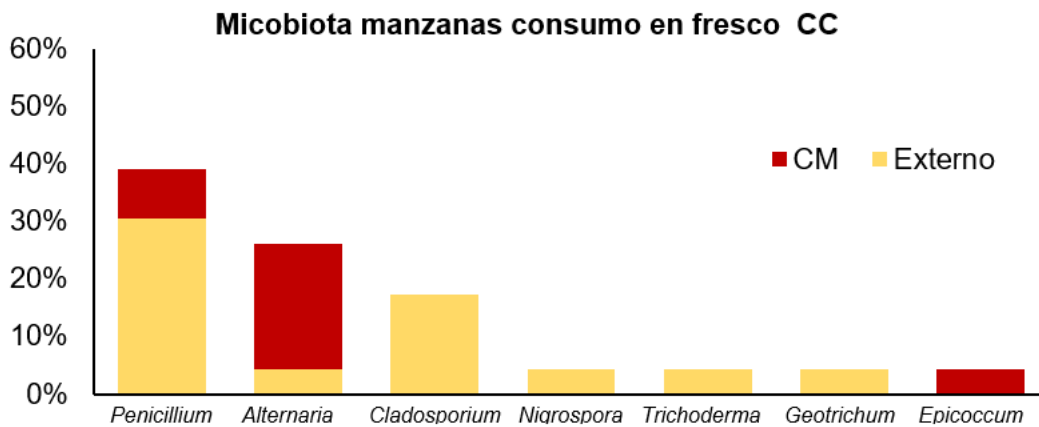


Figura 2. Porcentaje de manzanas para consumo en fresco, cultivo convencional, contaminadas por cada género fúngico según el tipo de lesión. CM: Corazón mohoso; Externo: Contaminación superficial.

Como se muestra en la figura 3, en las manzanas destinadas a proceso (CC), almacenadas 9 meses en cámara, solo se detectó *Botrytis* además de los 3 géneros predominantes, y el porcentaje de CM fue del 50%, causado por los géneros principales, y en particular por *A. tenuissima* y *A. gaisen*.

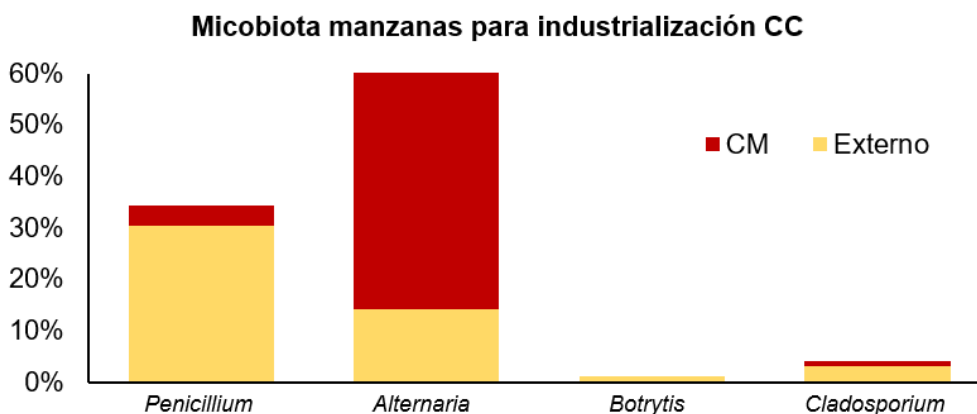


Figura 3. Porcentaje de manzanas para consumo en fresco, cultivo orgánico, contaminadas por cada género fúngico según el tipo de lesión. CM: Corazón mohoso; Externo: Contaminación superficial.



Estos resultados parecerían indicar un aumento en el grado de corazón mohoso conforme avanza el tiempo de almacenamiento, y una selección de los géneros toxicogénicos *Alternaria* y *Penicillium* frente a los demás. Esto está en concordancia con lo propuesto por Reuveni et al. (2002) en donde indica que una vez ocurrida la infección y durante el almacenamiento, las esporas de los hongos en el interior de las manzanas están protegidas contra los fungicidas y las condiciones son adecuadas para el desarrollo de los mismos. Más aún, cuando las esporas de los hongos colonizaron el interior de las manzanas, la aplicación de antifúngicos parecería aumentar la proporción de corazón mohoso ya que eliminaría la flora presente en la superficie de la manzana, permitiendo un mejor desarrollo de los hongos en el interior (Snowdon, 1991).

Tabla 1. Porcentaje de manzanas con corazón mohoso por tipo de cultivo y destino.

Porcentaje de frutos con corazón mohoso (%)		
Consumo en fresco (CO) (n=29)	Consumo en fresco (CC) (n=15)	Industrialización (CC) (n=100)
41	33	50

En todos los casos, el principal género causante de CM fue *Alternaria*. En cuanto a la clasificación a nivel de grupo-especie causante de corazón mohoso, el predominante fue *A. tenuissima*, aislándose también, aunque en mucha menor proporción, *A. arborescens* y *A. gaisen*. Estos resultados concuerdan con estudios realizados en Sudáfrica, en los cuales la principal especie causante de CM fue *A. tenuissima* (Serdani et al., 2002), y estudios realizados en China (Gao et al., 2013) y en Grecia (Ntasiou et al., 2015) identificaron como los principales agentes causantes de esta enfermedad a *A. tenuissima* y *A. arborescens*.

Capacidad de producción de micotoxinas

La capacidad toxicogénica de las especies de *Alternaria* aisladas de los distintos tipos de manzana fue investigada *in vitro*. En la tabla 2 se muestra el porcentaje de cepas de *Alternaria* spp. aisladas de ambos orígenes de manzana y tipos de destino, capaces de producir las principales micotoxinas.



Tabla 2. Porcentaje de cepas de *Alternaria* aisladas de los distintos tipos de manzana capaces de producir micotoxinas. TeA: ácido tenuazónico; AOH: alternariol; AME: alternariol monometileter.

Porcentaje de <i>Alternaria</i> spp. productoras de micotoxinas (%)			
	Consumo en fresco CO (n=17)	Consumo en fresco CC (n=6)	Industrialización CC (n=19)
TeA	71	67	68
AOH	65	67	58
AME	53	67	58

Estos resultados podrían indicar un riesgo para la salud del consumidor, ya que el 38% de las manzanas provenientes de CO y el 26% de CC analizadas presentaron contaminación con *Alternaria* spp., y un alto porcentaje de estas cepas fueron capaces de sintetizar metabolitos tóxicos que difunden por las partes comestibles de la fruta, con lo que la remoción de la lesión no sería suficiente para eliminar el riesgo.

En cuanto a las manzanas con fines industriales, la incidencia de CM provocado por *Alternaria* fue mayor, y un alto porcentaje de las cepas causantes de la enfermedad fueron capaces de producir al menos una de las micotoxinas estudiadas. Al seleccionarse este género fúngico en las cámaras, y a su vez ser capaz de producir metabolitos secundarios tóxicos, el riesgo asociado a la presencia de los mismos en productos a base de manzana resulta muy elevado.

Conclusiones

Alternaria, *Penicillium* y *Cladosporium* fueron los géneros predominantes y se aislaron de todos los tipos de manzana analizadas.

Las manzanas destinadas a proceso (CC) almacenadas en cámara presentaron mayor grado de CM que las destinadas a consumo en fresco, lo que indica que la enfermedad puede progresar durante los meses de almacenamiento. El género *Alternaria* fue hallado como el principal causante de CM en todos los tipos de manzanas. Teniendo en cuenta que esta lesión interna no es detectada por inspección visual a menos que se corte la fruta y que *Alternaria* es el principal género causante de la misma, así como su elevada capacidad de sintetizar metabolitos tóxicos, se puede establecer un riesgo sanitario asociado a los productos procesados a base de manzana. Serían necesarios estudios a futuro que permitan confirmar la presencia de los mismos en productos derivados de manzana y evaluar las cantidades acumuladas en ellos a fin de realizar una completa evaluación del riesgo y establecer estrategias de prevención.



Referencias

- ABDELFATTAH A, WISNIEWSKI M, DROBY S, SCHENA L. (2016). Spatial and compositional variation in the fungal communities of organic and conventionally grown apple fruit at the consumer point-of-purchase, en: *Horticulture research*, 3: 16047.
- ANDERSEN B, NIELSEN K F, PINTO V F, PATRIARCA A. (2015). Characterization of *Alternaria* strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat, en: *International journal of food microbiology*, 196: 1-10.
- DI MASSI S N. (2007). *Epidemiología, ecofisiología y control de Alternaria spp. causante del corazón mohoso en manzanas Red Delicious en Argentina*. Tesis Doctoral. Universitat de Lleida.
- FUNBAPA, Fundación Barrera Zoofitosanitaria Patagónica (2014). Mensuario estadístico – Agosto de 2014. Egreso de peras y manzanas de la región protegida Patagónica. Disponible en: <http://www.funbapa.org.ar/funbapa/wp-content/uploads/2014/10/agosto-MANZANA-PERA-2014.pdf>. Último acceso: septiembre 2018.
- GAO L, ZHANG Q, SUN X Y, JIANG L, ZHANG R, SUN G Y, BIGGS A R (2013). Etiology of moldy core, core browning, and core rot of Fuji apple in China, en: *Plant disease*, 97(4): 510-516.
- IDIGORAS G. (2014). Producción y procesamiento de productos frutihortícolas. Documento de referencia, Agroindustria, Argentina Innovadora 2020. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.
- LOGRIECO A, MORETTI A, SOLFRIZZO M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risk, en: *World Mycotoxin Journal*, 2(2): 129-140.
- LÓPEZ P, VENEMA D, DE RIJK T, DE KOK A, SCHOLTEN J M, MOL H G, DE NIJS M. (2016). Occurrence of *Alternaria* toxins in food products in The Netherlands, en: *Food Control*, 60: 196-204.
- NTASIOU P, MYRESIOTIS C, KONSTANTINOUS S, PAPADOPOULOU-MOURKIDOU E, KARAOGLANIDIS G S. (2015). Identification, characterization and mycotoxigenic ability of *Alternaria* spp. causing core rot of apple fruit in Greece, en: *International journal of food microbiology*, 197: 22-29.
- PAHLKE G, TIESSEN C, DOMNANICH K, KAHLE N, GROH I A M, SCHRECK I, MARKO D. (2016). Impact of *Alternaria* toxins on CYP1A1 expression in different human tumor cells and relevance for genotoxicity, en: *Toxicology letters*, 240(1): 93-104.
- PITT J I, HOCKING A D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Nueva York: Springer.
- REUVENI M, SHEGLOV D, SHEGLOV N, BEN-ARIE R, PRUSKY D. (2002). Sensitivity of Red Delicious apple fruit at various phenologic stages to infection by *Alternaria alternata* and moldy-core control, en: *European journal of plant pathology*, 108(5): 421-427.
- SERDANI M, CROUS P W, HOLZ G, PETRINI O. (1998). Endophytic fungi associated with core rot of apples in South Africa, with specific reference to *Alternaria* species, en: *SYDOWIA-HORN*, 50: 257-271.



SERDANI M, KANG J C, ANDERSEN B, CROUS P W. (2002). Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa, en: *Mycological research*, 106(5): 561-569.

SIMMONS E G. (2007). *Alternaria: An Identification Manual*. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre.

SNOWDON A L. (1991). A colour atlas of post harvest diseases and disorders of fruit and vegetables, en: *General Introduction and Fruits*, Vol. 1. Londres: Wolfe Publishing.

VAN DER WALT L, SPOTTS R A, VISAGIE C M, JACOBS K, SMIT F J, MCLEOD A. (2010). *Penicillium* species associated with preharvest wet core rot in South Africa and their pathogenicity on apple, en *Plant Disease*, 94(6): 666-675.

WISNIEWSKI M, DROBY S, NORELLI J, LIU J, SCHENA L. (2016). Alternative management technologies for postharvest disease control: the journey from simplicity to complexity, en: *Postharvest Biology and Technology*, 122, 3-10.



Tecnologías para prolongar la vida útil



Determinación del momento de cosecha de durazno cv. Opedepe, campaña 2015 en el Valle de Los Pericos, Jujuy, R. A.

Toncovich M.E. ⁽²⁾, Ortín S.P. ⁽³⁾, Curzel V. ⁽⁴⁾, Tejerina M. ⁽³⁾, Delgado J. ⁽²⁾, González A.C. ⁽²⁾, Britos P. ⁽⁵⁾, Payo G.E. ⁽²⁾, Murray R. ⁽⁶⁾, Morales L. I. ⁽⁵⁾.

²INTA EEA Salta, Cerrillos, Salta.; ³Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta; ⁴Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy; ⁵Sede Regional Sur: Metán – Rosario de la Frontera, Universidad Nacional de Salta; ⁶INTA EEA San Pedro, R.A.

¹Trabajo financiado por el Proyecto INTA PNFRU-053911.

Dirección de e-mail: pamebritos@hotmail.com

Resumen

El momento oportuno de cosecha es fundamental en la comercialización y en la respuesta del mercado en durazno. El objetivo de este trabajo fue determinar el momento oportuno de cosecha y la evolución de los índices de calidad desde cosecha a comercialización en mercados lejanos del durazno temprano var. Opedepe en el Valle de Los Pericos, Jujuy. La firmeza de la pulpa en kg/cm² se consideró como indicador de la calidad de consumo. Se evaluaron cinco cosechas (desde el 13/10/2015 al 25/10/2015), que coincidieron con la cosecha en la zona, realizadas cada tres días, de tres plantas por fecha de un total de 15 plantas seleccionada al azar previamente. De cada una se tomaron 90 frutos al azar para cada cosecha, y los frutos se mantuvieron en estantería a 20°C y humedad superior a 90%. Se evaluaron al momento de cosecha presión, sólidos solubles, tamaño y la evolución de estos índices a las 48 y 96 horas de cosechados. Según los resultados obtenidos, los frutos deberían cosecharse con una firmeza de 6,58 kg/cm², para que alcancen una presión a consumo lo más próxima a 2 kg/cm² al cabo de seis días. Esta presión a cosecha se observó a partir de la tercera cosecha (19 de octubre). Los sólidos solubles correspondientes a esta tercera cosecha fueron de 7,39 °Brix y evolucionaron a 8,15 °Brix a los seis días. Los diámetros longitudinales y ecuatoriales promedios fueron de 65,24 mm y 56,57 mm, respectivamente, evidenciando una disminución de estos valores a los seis días en estante a 60,08 mm y 50,73 mm respectivamente. En cuanto a la presión promedio de la pulpa de los frutos fue de 2,51 Kg/cm². Con estos resultados preliminares, se prevé continuar con las determinaciones para extraer conclusiones definitivas.

Palabras Clave: madurez, momento de cosecha, parámetros de cosecha

Introducción

La producción de durazno es una promisoriosa actividad en la zona de Perico en la provincia de Jujuy, donde sus condiciones climáticas son favorables para la producción de fruta temprana y extratemprana. Esta ventaja permite a los productores



de la región, anticipar la oferta de esta fruta, en relación a las otras zonas frutícolas del país. Debido a ello, y en búsqueda de ampliar las oportunidades de comercialización, aspiran a alcanzar mercados lejanos para la colocación del durazno producido en el lugar.

Siendo el durazno un fruto de tipo climatérico, se espera que los índices sufran variaciones luego de la recolección; por lo que el momento oportuno de cosecha incide en la calidad de comercialización y en la respuesta del mercado, teniendo una significativa relevancia el estudio de los índices de cosecha y su comportamiento poscosecha.

Actualmente, las exigencias de calidad en los mercados son superiores cada año (Luchsinger y Walsh, 1997), por lo tanto, la producción de fruta debe orientarse a lograr los máximos estándares de calidad y cantidad a la cosecha.

El concepto de calidad para los alimentos frutihortícolas involucra varios aspectos; por un lado, los relacionados al aporte nutricional del fruto y a la seguridad alimentaria, y por otro, aquellos vinculados a la valoración sensorial, como tamaño, forma, color, sabores y aromas, características cada vez más demandadas por el consumidor. (Murray, 1997)

La obtención de estos productos frutícolas de óptima calidad está relacionada con diversos factores entre los que se incluye el estado de madurez a la cosecha (Murray, 1998). Estudios realizados por Luchsinger y Walsh (1997) demuestran que los frutos que son cosechados en estado inmaduro son de inferior calidad al alcanzar su madurez de consumo, mientras que aquellos frutos sobre maduros se ablandan con facilidad y adquieren texturas y sabores indeseables a pocos días de ser cosechados.

A pesar de que el estado de madurez es solo uno de los aspectos relevantes con relación a la calidad de los productos perecederos, tiene gran importancia ya que limita el comportamiento en postcosecha, tanto en la comercialización como en sus características organolépticas finales, determinando en cierta medida el potencial de almacenaje; condición fundamental para la región del NOA, para acceder a mercados distanciados.

Según Crisosto (2002), un durazno de óptima calidad debe tener abundante color rojo en la piel, con una firmeza de pulpa entre 2- 3 lb (0.91 – 1.36 kg/cm²) y un alto contenido de sólidos solubles, junto a una baja acidez.

El objetivo de este trabajo fue determinar el momento oportuno de cosecha del durazno temprano de la var. Opedepe, y la evolución de los índices de calidad desde cosecha a comercialización en mercados lejanos. Para este trabajo, la firmeza de la pulpa en kg/cm² fue el parámetro que se consideró como indicador de la calidad de consumo, coincidiendo con Dobrzanski y Rybczkynski (1999), quienes dan más relevancia a la firmeza de la fruta por encima de otros índices de cosecha.

Materiales y Métodos

Se trabajó con la variedad temprana Opedepe, en un huerto comercial ubicado sobre ruta nacional 43 km 5 en el Valle del Perico, al noroeste del departamento El Carmen, provincia de Jujuy.



Las plantas de durazno *Prunus persica* L. cv. Opedepe, de 8 años de edad, fueron conducidas en vaso con un marco de plantación de 4 x 2 m, el sistema de riego es por goteo, y se realiza raleo y poda corta.

Se evaluaron 5 cosechas (Tabla N°1), cuyas fechas coincidieron con la cosecha de la zona. La recolección se realizó cada 3 días de 3 plantas por fecha, totalizando 15 plantas seleccionadas previamente al azar.

Tabla 1: Fechas de cosecha de los duraznos

COSECHA	FECHA
1	13/10/2015
2	16/10/2015
3	19/10/2015
4	22/10/2015
5	25/10/2015

Se tomaron 270 frutos por cosecha, recolectando 90 frutos al azar por planta, teniendo 30 frutos por planta para cada tratamiento. Los frutos se mantuvieron en estantería a 20°C y una humedad superior al 90%.

Se definieron tres tratamientos para evaluar el comportamiento de los frutos:

T1: Momento de Cosecha

T2: A los 3 días de cosecha

T3: A los 6 días de cosecha

Los índices de cosecha medidos fueron:

- Resistencia de la pulpa a la presión: se tomó cada fruta con la mano izquierda y con la mano derecha se introdujo la barra del penetrómetro haciendo una pequeña presión hasta la marca señalada en la misma. El instrumental utilizado fue el penetrómetro marca TR y la unida fue Kg/cm².
- Sólidos solubles totales (cont SS): se estrujó la pulpa hasta obtener una o dos gotas de jugo dejando caer sobre el prisma del refractómetro portátil de mano marca ATAGO. La lectura del ° Brix se realizó directamente sobre el ocular graduado del instrumental en %.
- Tamaño: se midieron diámetros longitudinales y ecuatoriales, utilizando para ello calibre electrónico.

Para determinar el momento oportuno de cosecha, con los valores obtenidos de resistencia de la pulpa a la presión, se ordenó la resistencia de los frutos de menor a mayor de cada planta cosechada y de cada tratamiento. Luego, se realizó el recuento de los frutos con resistencia menor o igual a 2 km/cm² en los tratamientos 2 y 3 (3 y 6 días en estanterías). Se determinó la firmeza al momento de la cosecha (Tratamiento 1). Para ello se tuvo en cuenta la cantidad de frutos con firmeza menor o igual a 2 kg/cm². Ejemplo: a los 6 días en estanterías para la planta 5 se midieron 5 frutos menores o iguales a 2 kg/cm², en el tratamiento 1 de la planta se ubica la firmeza que



se encuentra en el quinto lugar y ese valor corresponde a la firmeza que se debería cosechar los frutos. Una vez obtenidos estos valores por planta y por tratamientos se promedió los valores obtenidos.

Resultados y Discusión

Resistencia de la pulpa a la presión

La resistencia de la pulpa a la presión de los frutos de la variedad Opedepe presentó diferencias significativas entre los días que la fruta permaneció en estanterías (Tabla 2).

Analizando la interacción entre las cosechas y los días en estanterías se observó en el tratamiento 1 (0 días en estanterías) que la resistencia de la pulpa a la presión disminuyó desde la cosecha 1 (8,26 kg/cm²) hasta la cosecha 5 (4,23 kg/cm²),

En cuanto al tratamiento 2 (3 días en estanterías) la resistencia de la pulpa a la presión fue disminuyendo paulatinamente, tomando rangos desde 4,84 kg/cm² en la cosecha 1 (09/1) hasta 1,75 kg/cm² en la cosecha 5 (23/10/2010).

Tabla 2: Evolución de la firmeza medida en Kg/cm² en las cinco cosechas

FIRMEZA	TRATAMIENTO 1		TRATAMIENTO 2		TRATAMIENTO 3	
	Kg/cm ²	DE	Kg/cm ²	DE	Kg/cm ²	DE
COSECHA 1	8,26	±2,66	4,84	±2,30	5,23	±2,58
COSECHA 2	7,44	±2,03	5,69	±2,66	4,12	±3,14
COSECHA 3	6,59	±1,62	3,64	±2,36	2,52	±1,88
COSECHA 4	4,71	±1,93	1,50	±1,48	1,08	±0,70
COSECHA 5	4,23	±2,76	1,75	±1,25	0,64	±0,67

En el tratamiento 3 (6 días en estantería) se puede apreciar una disminución de la resistencia de la pulpa a la presión desde la cosecha 1 (5,23 Kg/cm²) hasta la cosecha 5 (0,64 kg/cm²).

Para el momento oportuno de cosecha, los frutos deberían cosecharse con una firmeza media de 6,58 kg/cm² al momento de cosecha para que éstos alcancen una presión a consumo lo más próxima a 2 kg/cm² al cabo de 6 días. Por lo tanto, esta firmeza corresponde al 19/10/2015, fecha de la tercera cosecha, donde los frutos presentaron una presión de 6,59 kg/cm² y alcanzaron una resistencia a la presión promedio a los 6 días en estante de 2,52 kg/cm² (Figura 1).

Estos resultados coinciden con los de Altube et al (1999) quienes afirman que la resistencia de la pulpa a la presión varía según la fecha de cosecha. Gutiérrez et al (2007) sostienen que la firmeza no solo es un índice de cosecha, sino que también un indicador de la vida poscosecha del durazno, dado que la firmeza disminuye considerablemente mientras la fruta madura.



Figura 1. Evolución de la firmeza de los frutos de durazno en la 3° cosecha

Sólidos Solubles Totales

Un contenido elevado de azúcar, medido a través de los grados brix de los sólidos solubles totales, es asociado por el consumidor de frutales de carozo como un atributo de calidad (Crisosto et al., 1996). De acuerdo a estudios realizados por [Berger \(1975\)](#), el contenido de sólidos solubles representa un índice de calidad más que un índice de cosecha para duraznos. Este contenido de sólidos solubles debe acompañar la evolución del ablandamiento de la pulpa, para obtener un fruto de calidad.

Los sólidos solubles totales no mostraron diferencias significativas entre la fruta recién cosechada y la fruta en estante tanto a los 3 como a los 6 días en cada fecha de cosecha (Tabla 3). Asimismo, no se encontraron diferencias significativas del contenido de sólidos solubles totales entre las cosechas (Tabla 3).

Tabla 3: Evolución del contenido de sólidos solubles en °Brix para las cinco cosechas

FIRMEZA	TRATAMIENTO 1		TRATAMIENTO 2		TRATAMIENTO 3	
	°Brix	DE	°Brix	DE	°Brix	DE
COSECHA 1	6,94	±1,62	6,86	±1,54	7,64	±1,78
COSECHA 2	7,47	±1,56	7,90	±1,89	8,45	±2,01
COSECHA 3	7,39	±1,64	7,92	±1,95	8,05	±1,98
COSECHA 4	7,83	±1,60	7,94	±2,09	8,74	±2,14
COSECHA 5	7,68	±1,64	8,54	±2,01	8,66	±1,86



Dado que el momento oportuno de cosecha fue establecido para la cosecha 3 (19/10/2015) en función de la resistencia de la pulpa a la presión; el valor promedio de sólidos solubles totales en esa cosecha, varió de 7,39 °Brix en el momento de cosecha y alcanzó un valor de 8,05 °Brix a los seis días en estante y de 7,92 °Brix a los tres días (Figura 2). Esto coincide con los resultados de Lill *et al.* (1989), quienes afirman que el contenido en sólidos solubles totales cambia muy poco y en forma errática a medida que el fruto madura.

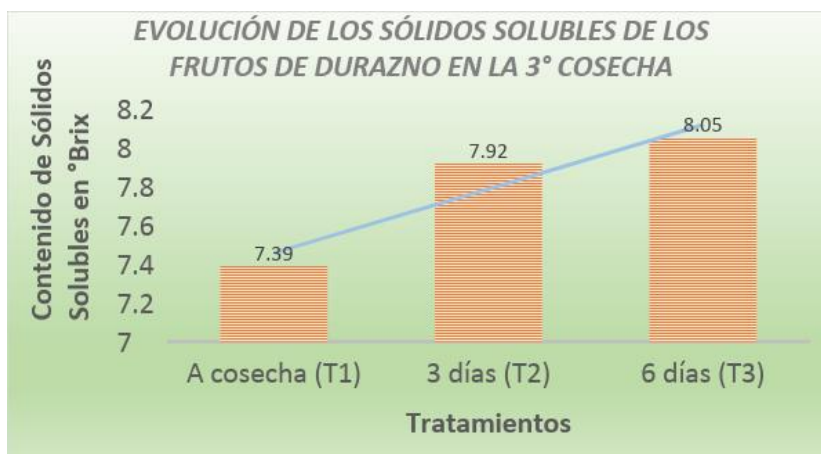


Figura 2. Evolución de los Sólidos Solubles de los frutos de durazno en la 3ª cosecha

Diámetros Longitudinal y Ecuatorial

El tamaño del fruto es otro parámetro de calidad que tiene en cuenta el consumidor en el momento de comprar un producto fresco.

En cuanto a la evolución del diámetro longitudinal de los frutos, en las distintas fechas de cosecha, el mismo aumentó de 60,53 mm en la primera cosecha (Tabla 4) hasta 68,67 mm en la quinta cosecha (en un lapso de 12 días). De igual manera se presentó la evolución del diámetro ecuatorial (Tabla 5), que presentó una diferencia de 7,55 mm entre la primera cosecha (13/10/2015) y la última cosecha (25/10/2015).

Tabla 4: Evolución del diámetro longitudinal en las cinco cosechas

FIRMEZA	TRATAMIENTO 1		TRATAMIENTO 2		TRATAMIENTO 3	
	mm	DE	mm	DE	mm	DE
COSECHA 1	60,53	±6,47	56,88	±7,92	51,70	±5,58
COSECHA 2	59,50	±7,07	56,10	±7,07	54,38	±6,13
COSECHA 3	65,24	±5,25	62,26	±6,54	59,77	±6,94
COSECHA 4	68,47	±4,63	61,31	±6,67	60,99	±5,84
COSECHA 5	68,67	±6,97	69,35	±5,47	66,47	±5,94



En la tercera cosecha, ambos diámetros presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Los diámetros longitudinales y ecuatoriales promedios fueron de 65,24 mm y 56,57 mm respectivamente, evidenciando una disminución de estos valores a los 6 días en estante a 59,77 mm para el diámetro longitudinal, y 52,79 mm para el ecuatorial (Figura N°3).

Tabla 5: Evolución del diámetro ecuatorial en las cinco cosechas

FIRMEZA	TRATAMIENTO 1		TRATAMIENTO 2		TRATAMIENTO 3	
	mm	DE	mm	DE	mm	DE
COSECHA 1	52,97	6,76	48,81	7,92	42,50	5,58
COSECHA 2	51,60	±6,14	48,14	±6,14	47,44	±6,43
COSECHA 3	56,57	±4,05	54,89	±5,22	52,79	±7,02
COSECHA 4	60,24	±3,81	53,92	±5,89	52,50	±3,99
COSECHA 5	60,52	±5,61	60,32	±5,22	58,15	±5,58

La disminución en ambos diámetros medidos puede ser efecto de la deshidratación de la fruta, lo cual deberá ser objeto de estudios más detallados, dado que según Seibert et al (2009) las pérdidas de masa superiores al 10% afectan la apariencia de los frutos, siendo las mismas acumulativas en la cosecha y almacenaje, afectando la presentación del fruto en la comercialización.

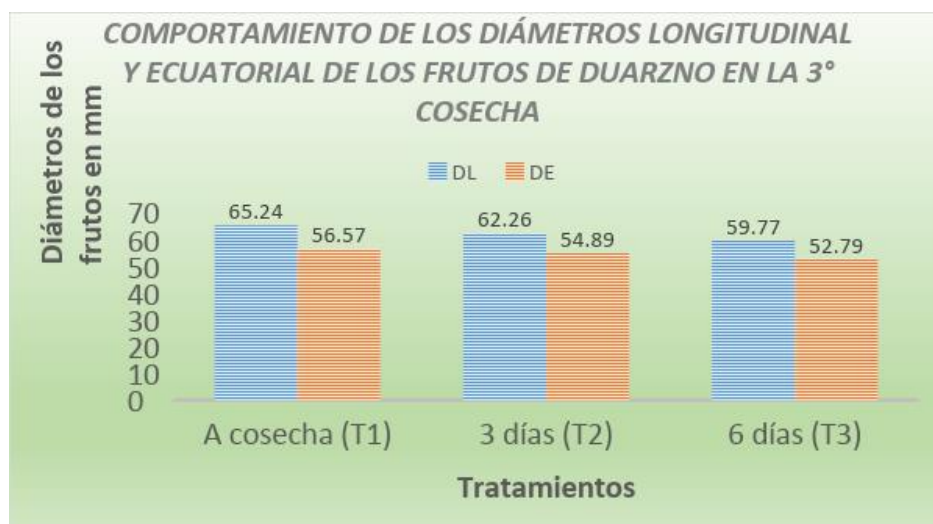


Figura 3. Comportamiento de diámetros longitudinal y ecuatorial en frutos de durazno en la 3ª cosecha



Conclusiones

De los resultados obtenidos se puede concluir que el momento óptimo de cosecha, para la fruta producida en el Valle de los Pericos en la provincia de Jujuy, ocurre alrededor del 19 de octubre, tomando como parámetro de cosecha la firmeza de la pulpa.

Teniendo en cuenta el tiempo de transporte que lleva hasta el Mercado Central de Buenos Aires, cosechar la fruta próxima a la fecha ya mencionada, permitiría el arribo de la misma con valores de firmeza apropiados para la preferencia del consumidor.

Referencias

ALTUBE, H. A., BUDDE, C.O., ONTIVERO, M. G AND RIVATA, R. S. 1999. Determinación de los índices de cosecha de duraznos cvs. Flordaking y San Pedro 16 – 33. www.inia.cl/at/espanol/v61n2/AT04.htm. Abril 2002.

BERGER, H. 1975. Primer Simposio sobre Manejo, Calidad, Cosecha y Postcosecha de Frutas y Hortalizas, Santiago, Chile. 26-27-28 de mayo. Publicaciones Misceláneas Agrícolas NE 9. Universidad de Chile, Facultad de Agronomía, Santiago, Chile.

CRISOSTO, C. H., R. S. JONSON, K. R. DAY, AND T. DEJONG. 1997. Orchard factors affecting postharvest stone fruit quality. *HortScience* 32(5): 820 – 823.

DOBRZANSKI, B., AND R. RYBCZYNSKI. 1999. Stress-strain relationship for fruit firmness estimation. *Acta Hortic.* 485:117-123.

GUTIÉRREZ, A., J. BURGOS Y E. MOLTO. 2007. Pre-commercial sorting line for peaches firmness assessment. *J. Food Eng.* 81, 721-727. Doi: 10.1021/jf020136b

LILL, R.E., E.M. O'DONOHUE, AND G.A. KING. 1989. Postharvest physiology of peaches and nectarines. *Hortic. Rev.* 11:413-450.

LUCHSINGER, L. E. Y C. S. WALSH. 1997. Problemática de la exportación de duraznos, nectarines y ciruelas. *Aconex* 55: 5-10.

MURRAY, R. 1997. <http://edant.clarin.com/suplementos/rural1997/08/17/nota10.htm>.

SEIBERT, E., S. GONZÁLEZ, ORELLANA, A., LUCHSINGER, L., RENAR. J.B. calidad postcosecha y daños por frío en duraznos 'NOS 21'. 2009. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* pg 51-60



Expresión de genes de biosíntesis y degradación de glucosinolatos indólicos en brócoli durante el ritmo circadiano y senescencia poscosecha

Casajús V. ⁽¹⁾, Gómez Lobato M.E. ⁽¹⁾, Civello P.M. ^(1,2), Martínez G.A. ^(2,3)

(1) Instituto de Fisiología Vegetal CCT CONICET La Plata, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

(2) Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

(3) Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-INTECH, UNSAM), Chascomús, Argentina

Dirección de e-mail: vickycasajus@gmail.com

Resumen

El consumo de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) aporta una gran cantidad de compuestos con potencial nutracéutico a la dieta humana. El brócoli posee un elevado contenido de glucosinolatos, compuestos del metabolismo secundario, ricos en nitrógeno y azufre, y con actividad anticarcinogénica. Del brócoli se consume la inflorescencia, la cual se cosecha en un estado de desarrollo incompleto. La cosecha provoca un importante estrés y, como consecuencia, se produce una senescencia acelerada. El objetivo del presente trabajo es evaluar la expresión relativa de genes vinculados a la biosíntesis y degradación de glucosinolatos indólicos a distintas horas del día y durante la senescencia poscosecha de brócoli. Se cosecharon cabezas de brócoli en distintos momentos del día (8 h, 12 h y 18 h) y para el ensayo de senescencia las muestras cosechadas se almacenaron durante 7 días a 20 °C en oscuridad. Se realizaron medidas de color y contenido de clorofilas total a las distintas horas de cosecha y durante el almacenamiento. A las distintas horas del día inicial, el contenido de clorofilas y el color superficial se mantuvieron constantes. Se observó una disminución en el contenido de clorofilas y en el color superficial durante el almacenamiento poscosecha. Se evaluó la expresión relativa mediante qRT-PCR de los genes de biosíntesis de glucosinolatos indólicos (*BoCYP83B1*, *BoST5a*, *BoCYP81F4*) y de degradación (*BoMyr*). Se observó que la expresión de *BoMyr* se incrementó a las 18 horas poscosecha. Mientras que la expresión de *BoCYP83B1* aumentó a las 12 horas. Diferentemente, la expresión relativa de *BoST5a* no varió durante el día y *BoCYP81F4* disminuyó su expresión relativa hacia las 18 horas. Cuando se analizó la expresión relativa de estos genes en las muestras que fueron cosechadas a las 8 h a lo largo del almacenamiento poscosecha, se encontró que *BoMyr* y *BoCYP81F4* disminuyeron su expresión significativamente en el día 5 y 7 respecto al día 0. Mientras que la expresión relativa de *BoST5a* disminuyó de forma continua a lo largo de los días. Finalmente, la expresión relativa de *BoCYP83B1* disminuye entre el día 5 y el día 7. Se observó que las muestras cosechadas a las 18 h muestran un retardo en la senescencia, con menor disminución en el color superficial y el contenido de clorofilas total respecto a las muestras cosechadas en otras horas del día. La expresión relativa de los genes estudiados, involucrados en la biosíntesis



de glucosinolatos indólicos se ven afectados tanto por variaciones en un mismo día como por el almacenamiento poscosecha.

Palabras clave: brócoli, glucosinolatos indólicos, poscosecha

Introducción

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) es una hortaliza del grupo de las crucíferas ampliamente cultivado y consumido a nivel mundial. Además de ser un vegetal climatérico y percedero, el brócoli se cosecha en un estado de desarrollo incompleto lo cual provoca un gran estrés y una senescencia acelerada del mismo (Downs et al., 1997); por lo tanto, el uso de técnicas que extiendan la vida útil del brócoli, su comercialización y permitan mantener o aumentar las cualidades nutricionales del mismo son de gran necesidad.

El consumo de brócoli aporta una gran cantidad de metabolitos con propiedades nutricionales tales como antioxidantes, compuestos fenólicos, vitamina C, carotenoides, ácido fólico y fibra soluble, entre otros. Sumado a esto, al igual que otros vegetales del grupo de las coles, el brócoli contiene un alto contenido de glucosinolatos (GLS): β -tioglicósidos, metabolitos secundarios que derivan de aminoácidos y se pueden clasificar en tres grupos de acuerdo al aminoácido precursor: alifáticos (derivados de alanina, leucina, isoleucina, valina o metionina), indólicos (derivados de triptófano) o aromáticos (derivados de fenilalanina o tirosina). Su biosíntesis se puede dividir en tres grandes etapas: descarboxilación oxidativa, elongación de cadenas laterales y por último, modificaciones secundarias. Los glucosinolatos se encuentran localizados en las vacuolas, son químicamente estables, pero cuando se produce un daño tisular provocado por un estrés biótico o abiótico, estos se ponen en contacto con la enzima mirosinasa (la cual se encuentra almacenada en un compartimiento celular diferente). La enzima mirosinasa cataliza la hidrólisis del azúcar del glucosinolato dando como resultado un aglicón inestable que se transforma rápidamente en isotiocianatos, tiocianatos y/o nitrilos (Halkier y Gershenzon, 2006). Estos productos de hidrólisis están siendo ampliamente estudiados no solo por su acción biopesticida sino también por sus beneficios en la salud humana actuando como agentes de prevención en cáncer, especialmente de colon, vejiga y pulmón (Voorrips et al., 2000a; Voorrips et al., 2000b).

En los últimos años, se han utilizado diferentes tratamientos para extender la vida poscosecha del brócoli, incluyendo el uso de atmósferas controladas y modificadas (Jacobsson et al. 2004), tratamientos térmicos (Funamoto et al., 2002, Costa et al., 2005b), UV-C (Costa et al., 2006a; Costa et al., 2006b) y 1-MCP (Ku y Wills, 1999) entre otros, con el objetivo de retrasar la senescencia y mantener las calidades organolépticas y nutricionales de dicha inflorescencia. Sin embargo, muchas de las calidades organolépticas son afectadas por diversos factores precosecha tales como el clima, el suelo, etc., siendo uno de los factores potencialmente más importantes el momento del día en que se cosechan los vegetales. Como lo indica Hasperué et al., (2011), si se cosechan las cabezas de brócoli al final del día se ve retrasada la senescencia, posiblemente debido a una acumulación de almidón durante el ciclo



diurno. Se ha demostrado en plántulas de 15 y 21 días de *Arabidopsis thaliana* que el ritmo circadiano y la cantidad de luz acumulada influye sobre la síntesis y el contenido de glucosinolatos (Huseby et al., 2013). Asimismo, se ha visto que el contenido de glucosinolatos y los niveles de expresión de algunos de los genes de su biosíntesis, muestran cambios en ciclos de 24 h luz/oscuridad y se observaron fluctuaciones en los metabolitos, afectados por la temperatura en distintos cultivares de *Brassica oleracea* (Rosa et al., 1994, Schuster et al., 2006).

El objetivo del presente trabajo es evaluar la expresión relativa de genes vinculados a la biosíntesis y degradación de glucosinolatos indólicos durante la cosecha en distintos momentos del día y durante el almacenamiento poscosecha.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se utilizaron cabezas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) obtenidas de un productor local en la zona del Gran La Plata, Buenos Aires, Argentina en el mes de Septiembre. Se realizaron 3 cosechas en un día a diferentes horas (8 h, 12 h y 18 h). Para cada uno de los tiempos se cosecharon 15 cabezas y se transportaron al laboratorio para ser procesadas inmediatamente después de la cosecha. Las cabezas fueron almacenadas en oscuridad a 20 °C durante 7 días. Se tomaron muestras periódicamente, las cuales se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C.

Medida del color superficial

El color superficial en las cabezas de brócoli fue evaluado midiendo los parámetros L*, a* y b* usando un colorímetro (CR300, Minolta, Osaka, Japón). Se calculó el ángulo Hue usando las siguientes fórmulas: $^{\circ}\text{HUE} = \tan^{-1}(b/a)$ cuando $a > 0$ y $b > 0$ o $^{\circ}\text{HUE} = \tan^{-1}(b/a) + 180^{\circ}$ cuando $a < 0$ y $b > 0$. Se midió color a 5 cabezas por condición realizando 5 mediciones por cabeza respetando los horarios de cosecha.

Contenido de clorofilas

Las inflorescencias congeladas se molieron con nitrógeno líquido y del polvo resultante se pesaron 0,5 g, el cual se mezcló con 5 mL de acetona 80% (v/v). La mezcla se homogeneizó con vórtex y se centrifugó a 10000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se midió por espectrometría a 647 y 665 nm (Inskeep et al., 1985).

Todas las medidas se realizaron por quintuplicado y los resultados obtenidos se expresaron como mg de clorofila total/ g de peso fresco.

Extracción de ARN y análisis de la expresión génica por RT-qPCR

Se realizó una extracción de ARN total de inflorescencias de brócoli por el método del borato caliente (Wan y Wilkins, 1994). Aproximadamente 6 µg del ARN total obtenido



fue purificado usando ADNasa (Promega) y 2 µg del ARN purificado se utilizó como molde para la reacción de retrotranscripción utilizando MMLV retrotranscriptasa (siguiendo las indicaciones del fabricante), para la obtención del ADN complementario.

Se realizaron reacciones de RT-qPCR utilizando: SYBR Green I como método de detección, un equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied biosystems) y el kit FastStart Universal SYBR Green Master (Roche). Se siguieron las condiciones propuestas por el fabricante del kit, mezclando Master Mix, cDNA molde y oligonucleótidos. El gen de actina (*BoAct*) de *Brassica oleracea* se utilizó como gen normalizador. Se diseñaron cebadores para tres genes de la biosíntesis de glucosinolatos indólicos: *BoCYP83B1*, *BoST5a* y *BoCYP81F4* y para un gen de degradación de los mismos: *BoMyr* (Tabla 1). Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó la base de datos <http://brassicadb.org/brad/>, la opción primer-BLAST de la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y el programa *Beacon designer v7.21*.

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos y número de acceso de los genes utilizados para el análisis de expresión relativa mediante RT-qPCR. También se indica el tamaño del amplicón en pares de bases esperado.

Genes	Secuencia nucleotídica	pb	Nº de acceso
<i>BoCYP83B1Fw</i>	5' ACTATCGTGAGATGAGGAAG 3'	214	GU584125
<i>BoCYP83B1Rv</i>	5' TCGTTATACCGCTTACCAA 3'		
<i>BoST5a Fw</i>	5' TTGATCTCTGGTCCTTT 3'	151	BoI039695
<i>BoST5a Rv</i>	5' TGAAGTAGCTCTGAATGTTT 3'		
<i>BoCYP81F4 Fw</i>	5' GAGTTTTGAGAAGAAAGTGAAAG 3'	120	BoI032712
<i>BoCYP81F4 Rv</i>	5' AAAGAGAGCAAGTGATTAACC 3'		
<i>BoMyr Fw</i>	5' ACTGACCAAGCCAGCAGAGATG 3'	122	EU004075
<i>BoMyr Rv</i>	5' AGCCGACTACCCACAATTTCCC 3'		
<i>BoAct Fw</i>	5' CCAGAGGTCTTGTTCCAGCCATC 3'	137	AF044573
<i>BoAct Rv</i>	5' GTTCCACCACTGAGCACAATGTTAG 3'		

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y se utilizó el test de Tukey para comparar las medias con un nivel de significancia $p \leq 0,05$.



Resultados y Discusión

Color superficial y contenido de clorofilas

El cambio de color superficial en brócoli es uno de los parámetros de calidad que afecta la elección de los consumidores. En este trabajo, se cosecharon cabezas de brócoli en diferentes momentos del día y se evaluó su vida poscosecha mediante la medida del color superficial. En el día inicial se observó, que las cabezas cosechadas a distintas horas presentaron un valor similar del ángulo Hue (Figura 1). A diferencia, en el día 5 y 7 del almacenamiento poscosecha, las cabezas que fueron cosechadas a las 18 h presentaron una menor disminución del ángulo Hue comparado con aquellas cosechadas a las 8 h. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Hasperué et al., (2011).

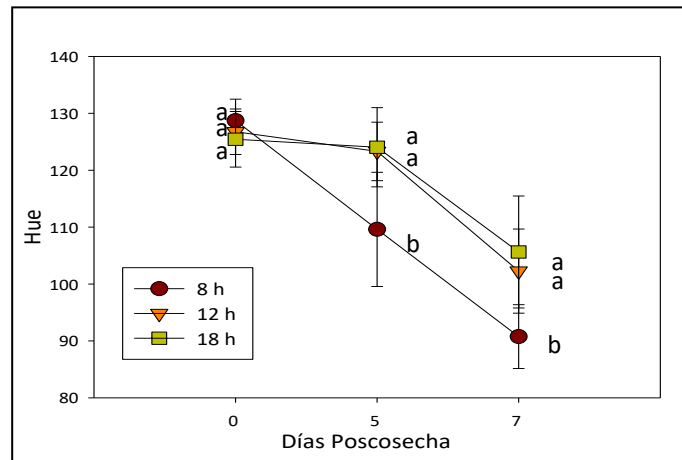


Figura 1. Cambio del color superficial (Hue) en las muestras cosechadas a las 8, 12 y 18 h durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en un mismo día.

Se analizó además el contenido de clorofilas de las cabezas durante el almacenamiento poscosecha (Tabla 2). Se observó un descenso de este contenido en concordancia con el avance de la senescencia. Al cabo de 7 días de almacenamiento, se detectó un menor descenso en las muestras cosechadas a las 18 h.



Tabla 2. Contenido de clorofila total (mg clorofila total/ g peso fresco) de las muestras cosechadas a las 8 h, 12 h y 18 h durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en un mismo día.

Tiempo (días)	8 h	12 h	18 h
0	0.057 ± 0.013 ^a	0.043 ± 0.004 ^a	0.044 ± 0.006 ^a
5	0.032 ± 0.005 ^a	0.018 ± 0.001 ^b	0.023 ± 0.002 ^b
7	0.007 ± 0.002 ^a	0.008 ± 0.002 ^a	0.012 ± 0.001 ^b

Como se mencionó previamente, los dos grupos más importantes de glucosinolatos son los alifáticos y los indólicos, los cuales derivan de los aminoácidos metionina y triptófano, respectivamente (Burow et al. 2010; Halkier and Gershenzon 2006). Estas rutas de biosíntesis involucran una variedad de enzimas y genes para la formación de las diversas estructuras de los glucosinolatos.

En este trabajo, se evaluó la expresión relativa de tres genes de biosíntesis de glucosinolatos indólicos: *CYP83B1*, *ST5a*, *CYP81F4*, y un gen de degradación de los mismos: *Myr*. El gen *CYP83B1* codifica una enzima que cataliza el segundo paso de la primera etapa en la biosíntesis de glucosinolatos indólicos convirtiendo el indol-3-acetaldoxima en el correspondiente nitrocompuesto (Barlier et al., 2000). Se detectó que la expresión de este gen aumentó en las muestras cosechadas a las 12 h respecto de las muestras de las 8 h (Figura 2a). El gen *ST5a* codifica para una enzima sulfotransferasa con más afinidad por sustratos desulfoglucosinolatos derivados de triptofano y fenilalanina (Piotrowski et al., 2004). En la figura 2b se observa que la expresión de *ST5a* no varía durante el día. El gen *CYP81F4* está involucrado en la formación de un grupo metoxi en el anillo indólico para obtener 1-metoxindol-3-il-metil glucosinolato, en las últimas etapas de la biosíntesis que determinan la estructura final del glucosinolato. Se observó que la expresión relativa de este gen disminuye hacia las 18 h (Figura 2c). Por último el gen *BoMyr* codifica para la enzima mirosinasa responsable de la hidrólisis de los glucosinolatos, dando los productos de interés y este gen aumenta su expresión a las 18 h (Figura 2d).

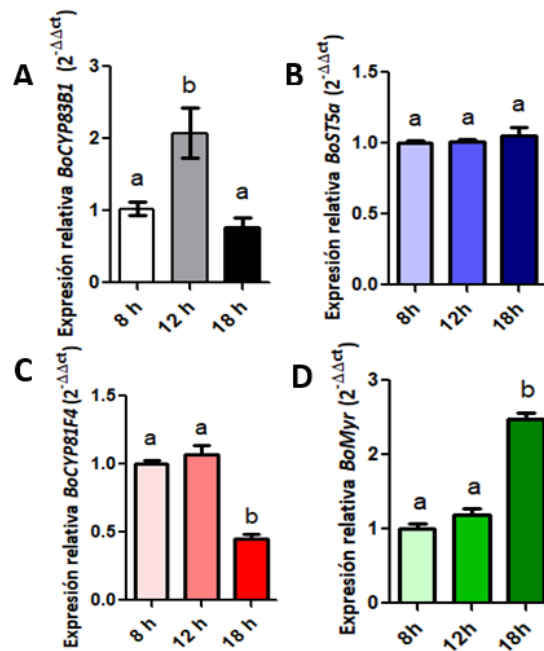


Figura 2. Expresión relativa de *BoCYP83B1* (2a), *BoST5a* (2b), *BoCYP81F4* (2c) y *BoMyr* (2d) en los distintos momentos de cosecha. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas para un mismo gen ($p < 0.05$).

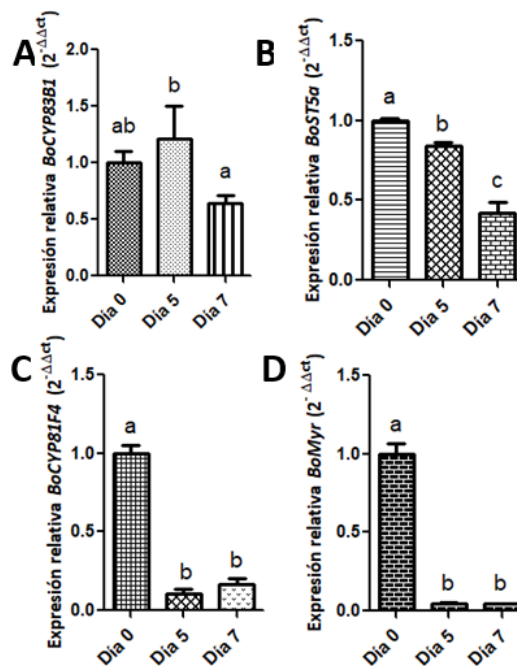


Figura 3. Expresión relativa de *BoCYP83B1* (2a), *BoST5a* (2b), *BoCYP81F4* (2c) y *BoMyr* (2d) durante el almacenamiento poscosecha. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas para un mismo gen ($p < 0.05$).

Al evaluarse la expresión de estos mismos genes a lo largo del almacenamiento poscosecha de las muestras cosechadas a las 8 h, se encontró que el gen *BoCYP83B1* disminuye su expresión relativa en el día 7 de poscosecha (Figura 3a). Los genes *BoCYP81F4* y *BoMyr* (Figura 3c y Figura 3d) disminuyeron su expresión



significativamente en el día 5 y 7 respecto al día inicial. Finalmente, para el gen *BoST5a* la expresión relativa disminuyó a lo largo del almacenamiento aunque de manera más gradual que los genes *BoCYP81F4* y *BoMyr* (Figura 3b).

Conclusiones

Se observó que las muestras cosechadas a las 18 h muestran un retraso de la senescencia, con una menor disminución en el color superficial y el contenido de clorofilas total respecto a las muestras cosechadas en otras horas del día. También se observó que la expresión relativa de los genes estudiados, involucrados en la biosíntesis y degradación de glucosinolatos indólicos, se ve afectada tanto por los distintos momentos de la cosecha en un día como durante la senescencia poscosecha.

Referencias

- BARLIER I, KOWALCZYK M, MARCHANT A, LJUNG K, BHALEROO R, BENNEETT M, BELLINI C. (2000). The SUR2 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis, en: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26):14819-14824.
- BUROW M, HALKIER BA, KLIEBENSTEIN DJ. (2010). Regulatory networks of glucosinolates shape *Arabidopsis thaliana* fitness, en: *Current Opinion Plant Biology*, 13:348–353.
- CHENG F, LIU S, WU J, FANG L, SUN S, LIU B, LI P, HUA W, WANG X. (2011). BMC Plant Biology 11:136. Brassica database. Disponible en: <<https://brassicadb.org/brad/>>.
- COSTA ML, CIVELLO PM, CHAVES AR, MARTÍNEZ GA (2005b). Effect of hot air treatments on senescence and quality parameters of harvested broccoli (*Brassica oleracea L var Italica*) heads, en: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(7):1154-1160.
- COSTA ML, CIVELLO PM, CHAVES AR, MARTÍNEZ GA. (2006a). Hot air treatment decreases chlorophyll catabolism during postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea L. var. italica*) heads, en: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(7):1125-1131.
- COSTA ML, VICENTE AR, CIVELLO PM, CHAVEZ AR, MARTÍNEZ GA (2006b). UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets, en: *Postharvest Biology and Technology*, 39(2):204-210.
- DOWN C, SOMERFIELD S, DAVEY M. (1997). Cytokinin treatment delays senescence but not sucrose loss in harvested broccoli, en: *Postharvest Biology and Technology*, 11(2):93-100.
- FUNAMOTO Y, YAMAUCI N, SHIGENAGA T, SHIGYO M. (2002). Effects of heat treatment on chlorophyll degrading enzymes in stored broccoli (*Brassica oleracea L.*), en: *Postharvest Biology and Technology*, 24(2):163-170.



HALKIER B, GERSHENZON J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates, en: *Annual Review of Plant Biology*, 57:303-333.

HASPERUÉ J, CHAVES A, MARTÍNEZ GA. (2011). End of day harvest delays postharvest senescence of broccoli florets, en: *Postharvest biology and technology*, 59(1): 64-70.

HUSEBY S, KOPRIVOVA A, LEE BR, SAHA S, MITHEN R, WOLD AB, KOPRIVA S. (2013). Diurnal and light regulation of sulphur assimilation and glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*, en: *Journal of experimental botany*, 64(4): 1039-1048.

INSKEEP W y BLOOM P. (1985). Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-dimethylformamide and 80% acetone, en: *Plant Physiology*, 77:483-485.

JACOBSSON A, NIELSEN T, SJOHOLM I. (2004). Influence of temperature, modified atmosphere packaging, and heat treatment on aroma compounds in broccoli, en: *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(6):1607-1614.

KU VVV y WILLS RBH (1999). Effect of 1-methylcyclopropene on the storage life of broccoli, en: *Postharvest Biology and Technology*, 17(2): 127-132.

PIOTROWSKI M, SCHEMENEWITZ A, LOPUKHINA A, MULLER A, JANOWITZ T, WEILER EW, OECKING C. (2004). Desulfoglucosinolate sulfotransferases from *Arabidopsis thaliana* catalyze the final step in the biosynthesis of the glucosinolate core structure, en: *Journal Biology Chemistry*, 279: 50717-50725.

ROSA EAS, HEANEY RK, REGO FC, FENWICK GR. (1994). The variation of glucosinolate concentration during a single day in young plants of *Brassica oleracea* var. *Acephala* and *Capitata*, en: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66:457-463.

SCHUSTER J, KNILL T, REICHELT M, GERSHENZON J, BINDER S. (2006). BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis*, en: *The Plant Cell*, 18:2664-2679.

VOORRIPS LE, GOLDBOHM RA, VAN POPPEL G, STURMANS F, HERMUS RJJ, VAN DEN BRANDT PA. (2000a). Vegetable and fruit consumption and risks of colon and rectal cancer in a prospective cohort study; the Netherlands cohort study on diet and cancer, en: *American Journal of Epidemiology*, 152:1081-1092.

VOORRIPS LE, GOLDBOHM RA, VERHOEVEN DTH, VAN POPPEL G, STURMANS F, HERMUS RJJ, VAN DEN BRANDT PA.(2000b). Vegetable and fruit consumption and lung cancer risk in the Netherlands cohort study on diet and cancer, en: *Cancer Cause Control*, 11:101-115.

WAN C y WILKINS T (1994). A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.), en: *Analytical Biochemistry*, 223: 7-12.



Comportamiento poscosecha de frutos de berenjena violeta proveniente de plantas injertadas

Darré M.^(1,3), Valerga L.⁽¹⁾, Ortiz Araque L.⁽¹⁾, Zaro M. J.^(1,2), Vicente A. R.^(1,3), Lemoine M. L.^(1,3), Concellón A.⁽¹⁾

(1) Grupo de Investigación en Tecnología Poscosecha (GITeP). Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, (CIDCA, CONICET- CIC-UNLP). La Plata, Buenos Aires, Argentina.

(2) Curso Bioquímica y Fitoquímica, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). La Plata, Buenos Aires, Argentina.

(3) Laboratorio de Investigación en Productos Agroindustriales (LIPA). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Dirección de e-mail: magalidarre_87@hotmail.com

Resumen

El uso de plantas injertadas está ampliamente difundido en fruticultura. Sin embargo, en horticultura es mucho más reciente, debido a que generalmente son cultivos anuales. En este sentido, se están empleando portainjertos en especies como berenjena, tomate y pimiento, permitiendo esta técnica mejorar el rendimiento de la planta (mayor número y tamaño de los frutos), aumentar la precocidad, reducir la susceptibilidad a enfermedades principalmente de suelo y aumentar el vigor de la planta, pero todavía no se ha estudiado si el uso de portainjertos puede afectar la calidad poscosecha de los frutos de berenjenas violetas. En el presente trabajo se evaluó el efecto de dos portainjertos sobre el comportamiento poscosecha de berenjena violeta (*Solanum melongena* L.) almacenadas a 10 °C. Para ello se cosecharon frutos de tamaño comercial (0,17 m de longitud) de plantas de berenjena cv Monarca injertadas "a bisel" sobre portainjertos *Maxifort* y *Java* y cultivadas sobre pie franco (control). Todos los frutos fueron transportados inmediatamente al laboratorio, lavados, sanitizados, secados, envasados y almacenados a 10 °C (temperatura recomendada) durante 0, 7, 14, 21 y 28 días. Para cada período de almacenamiento se determinó: pérdida de peso, firmeza (texturómetro) y color de pulpa (colorímetro). Durante el almacenamiento a 10 °C tanto los frutos control como provenientes de plantas injertadas sobre portainjertos *Maxifort* y *Java* no presentaron escaldaduras ni pérdida de brillo, ni oscurecimiento de pulpa (indicado por los parámetros de color L* y Hue), hasta el día 28 (final del almacenamiento). Sin embargo, los frutos provenientes de plantas injertadas mostraron algunos signos de deshidratación más notorios que los frutos controles. En particular sólo los frutos provenientes de plantas injertadas con *Maxifort* tuvieron una mayor pérdida de peso y menor firmeza hacia el final del almacenamiento. Los resultados mostraron que los frutos de berenjena violeta cv Monarca cosechados de plantas injertadas sobre el pie *Java* y almacenados a la temperatura recomendada (10 °C) no presentaron grandes diferencias respecto de los frutos control, mientras que aquellos frutos de plantas injertadas sobre *Maxifort* vieron afectada levemente su calidad en el almacenamiento.



Palabras claves: portainjerto, *Java*, *Maxifort*, almacenamiento, deshidratación.

Introducción

En fruticultura es común el empleo de portainjertos para modificar la resistencia a plagas y enfermedades y la adaptabilidad a condiciones edáficas y climáticas. En horticultura es mucho más reciente, debido a que generalmente son cultivos anuales por lo que la duración de las plantas y con ello el tiempo necesario para amortizar su costo son mucho más limitados. En muchos casos, los patógenos de suelo infectan las plantas reduciendo su productividad, lo cual requiere un mayor empleo de agroquímicos y desinfectantes, tales como el bromuro de metilo de gran toxicidad. Sin embargo, una técnica alternativa para reemplazar el uso de estos productos, ser más sustentable y amigable con el medio ambiente, son los portainjertos capaces de aportar resistencia a patógenos como los géneros *Fusarium* sp, *Verticillum* sp, *Meloydogine* sp. En este sentido, se están empleando portainjertos en especies de la familia de las Solanáceas (berenjena, tomate, pimiento) y Cucurbitáceas (sandias y melones), permitiendo esta técnica mejorar el rendimiento de la planta (mayor número y tamaño de los frutos), y productividad de las plantas debido a una mejor condición de la planta y menor infección de patógenos. La berenjena (*Solanum melongena* L.) es una de las solanáceas que más se cultiva en el cinturón hortícola de La Plata luego del tomate y pimiento. En los últimos años su producción se ha visto beneficiada con el uso de estos portainjertos. Hay estudios que ensayan compatibilidad entre pie (portainjerto) y variedad (planta aérea) y hallaron que se pueden usar pies de tomate, de otras variedades de berenjenas e incluso Solanáceas silvestres que pertenezca a la misma familia. Así, Gisbert et al., (2011) estudiaron la compatibilidad de diferentes híbridos interespecíficos de berenjena y observaron su compatibilidad, rendimiento y calidad, concluyendo que el uso de estos híbridos aumentó el vigor y la precocidad en plantas de berenjena. Por otro lado, también se ha estudiado el efecto de estrés salino e hídrico sobre las plantas injertadas (Wei et al., 2009, Lopez- Marin et al., 2017). Sin embargo, son muy pocos los trabajos que se centran en el fruto y particularmente en su calidad y comportamiento durante un almacenamiento poscosecha, lo que determinará si su vida útil se verá beneficiada o no. Por ello el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del empleo de dos portainjertos sobre la calidad poscosecha de berenjena violeta (*Solanum melongena* L.) en el almacenamiento refrigerado a 10 °C.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Frutos de berenjenas cv. Monarca fueron producidos en invernaderos de la ciudad de La Plata (Buenos Aires, Argentina) empleando dos tipos de cultivos: plantas injertadas “a bisel” con portainjerto de la variedad Java (Taki) y Maxifort (Syngenta) (*injertados*), y plantas no injertadas que se emplearon como control (*control*). Se seleccionaron y cosecharon 100 frutos de tamaño comercial (0,17 m de longitud) de cada cultivar que fueron transportados inmediatamente al laboratorio. Se descartaron aquellos que presentaron defectos y los remanentes fueron lavados, sanitizados, secados, y



envasados en bandejas plásticas recubiertas con film de PVC perforado. Las mismas fueron almacenadas a 10 °C (temperatura recomendada) durante 0, 7, 14, 21 y 28 días.

Pérdida de peso

Se pesaron, en balanza digital (Marca: KERN 572), 8 bandejas con 2 frutos cada una al inicio y al final de cada período del almacenamiento. Los resultados fueron calculados como porcentaje de pérdida de peso.

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = (100 \times (P_i - P_f)) / P_i$$

Donde P_i y P_f son peso inicial y peso final de los frutos.

Color de pulpa

Se cortaron 3 rodajas de la zona ecuatorial del fruto y se midió el color en la pulpa, empleando un colorímetro (Minolta, Modelo CR-400, Osaka, Japón) obteniendo los parámetros L^* , a^* , b^* y el ángulo de tono se calculó como: $\text{Hue} = 180 - \text{tg}^{-1} b^*/a^*$. Las determinaciones se realizaron por triplicado en 16 frutos para cada tipo de planta y tiempo de almacenamiento.

Firmeza

Se analizó empleando un texturómetro (TextureAnalyzer -TA.XT2) equipado con una sonda plana de 3 mm de diámetro. Se realizó un ensayo de penetración a 8 mm de profundidad y velocidad de 1 mm/s sobre la zona ecuatorial del fruto. Se calculó la pendiente inicial de la curva y los resultados se expresaron como firmeza en N/s. Se emplearon 16 frutos y las medidas se realizaron por triplicado para cada tipo de planta y tiempo de almacenamiento.

Análisis estadístico

Se definió un diseño factorial y los resultados fueron analizados mediante ANOVA. Las medias fueron comparadas mediante el test LSD de Fisher con $P < 0,05$ empleando el software INFOSTAT.

Resultados y Discusión

Pérdida de peso

La pérdida de peso se incrementó con el período de almacenamiento en los frutos control y provenientes de ambos portainjertos (Figura 1). Los frutos provenientes del portainjerto Maxifort presentaron una pérdida de peso superior a su control (4-5% a los 21-28 d respecto de 3,5% para el control), aunque su calidad no se vio afectada dado que permanecieron perfectamente consumibles. Mientras que, en las berenjenas procedentes del portainjerto Java se observó menor pérdida de peso que aquellas provenientes de Maxifort y no mostraron diferencias con su control. Esto es coincidente con lo observado por Concellón et al., (2012) que a pesar de no haber



trabajado con frutos procedentes de plantas injertadas percibieron un incremento en la pérdida de peso a lo largo del almacenamiento a 10 °C en frutos de berenjena violeta cv Lucía.

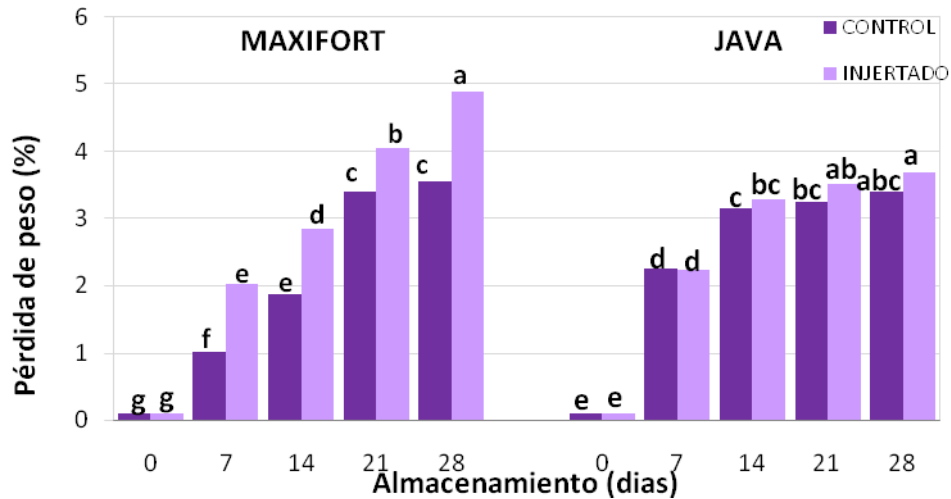


Figura 1: Pérdida de peso de frutos de berenjena provenientes de plantas control e injertadas almacenadas a 10 °C durante 0, 7, 14, 21 y 28 días. Para cada portainjerto, Maxifort y Java, las letras diferentes indican diferencia significativa según el test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$.

Color de pulpa

Como puede observarse en la Figura 2, no hubo grandes variaciones en el color de la pulpa a lo largo del almacenamiento tanto en frutos de las combinaciones portainjerto-variedad “Maxifort-Monarca” y “Java-Monarca”, como en los frutos provenientes de plantas controles. Ello se debe a que el almacenamiento a 10 °C no produjo desarrollo de pardeamiento de la pulpa de ningún fruto. Así, los frutos provenientes de Maxifort mantuvieron su pulpa más clara en los días 21 y 28 del almacenamiento evidenciándose en los mayores valores de Hue y L^* y menores valores de b^* . Mientras que en las berenjenas provenientes de portainjerto Java, el color de la pulpa permaneció prácticamente constante hasta el último día del almacenamiento y casi sin diferencias con su control.

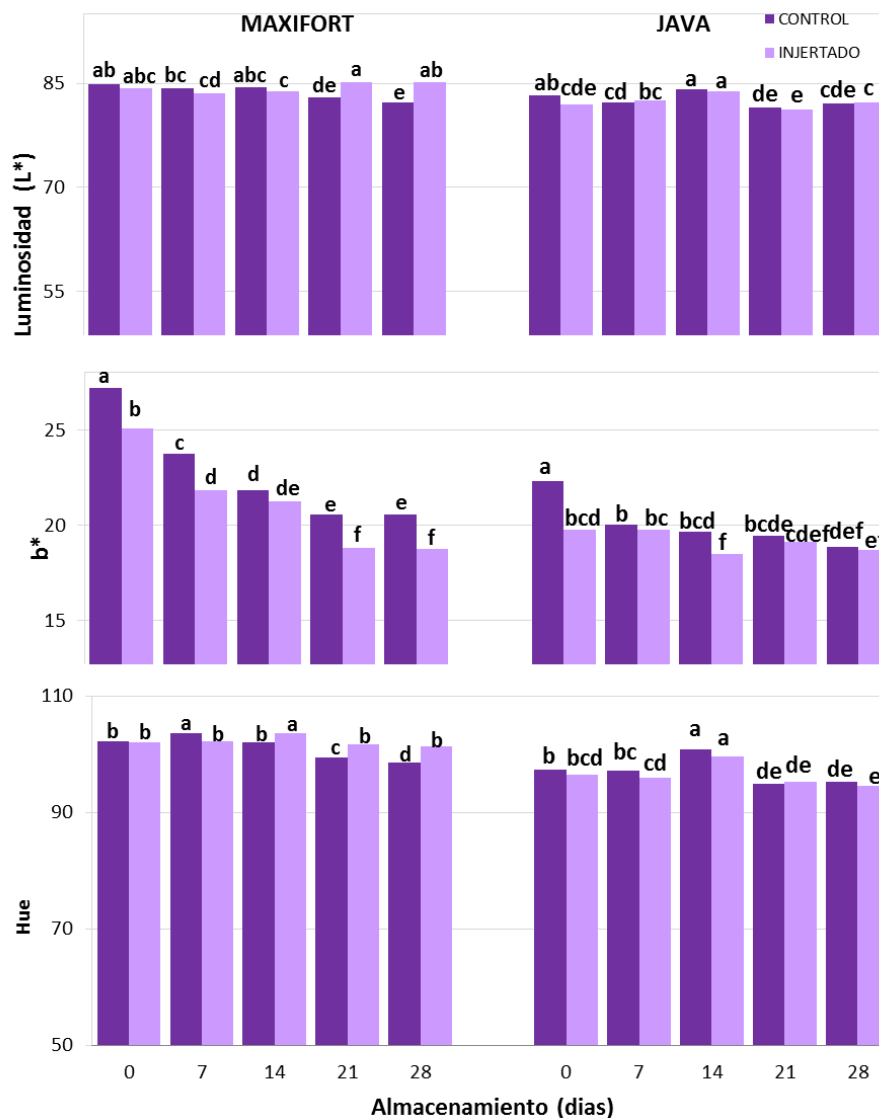


Figura 2: Color de pulpa de frutos de berenjena provenientes de plantas control e injertadas almacenadas a 10 °C durante 0, 7, 14, 21 y 28 días. Para cada portainjerto, Maxifort y Java, las letras diferentes indican diferencia significativa según el test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$.

Firmeza

Las berenjenas provenientes del portainjerto Maxifort fueron notoriamente menos firme que su control durante todo el almacenamiento (Figura 3), lo que se corresponde con la mayor pérdida de peso que evidenciaron los frutos de este portainjerto (Figura 1), presentando de esta manera una apariencia de frutos menos firmes. Los frutos provenientes del portainjerto Java disminuyeron su firmeza al día 7 y luego la mantuvieron prácticamente constante durante el resto del almacenamiento y con valores similares a su control. Arvanitoyannis et al, (2005) observaron que berenjenas injertadas se ablandaban cuando eran almacenadas en aire más que su control y en atmósfera modificada pasiva (MAP) no mostraba diferencias con su control. Así



también, Jha y Matsuoka, (2002) mostraron que en berenjenas frescas almacenadas a 15 °C la firmeza fue disminuyendo a lo largo del almacenamiento y lo atribuyeron a una contracción del fruto y separación de la epidermis. A su vez encontraron que la berenjena era casi siempre menos firme a una mayor temperatura de almacenamiento.

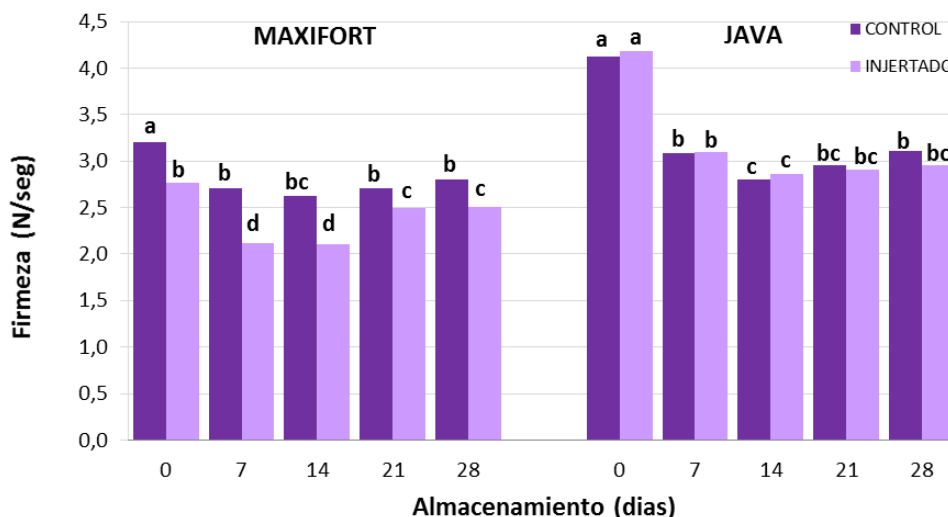


Figura 3: Firmeza de frutos de berenjena provenientes de plantas control e injertadas almacenadas a 10 °C durante 0, 7, 14, 21 y 28 días. Para cada portainjerto, Maxifort y Java, las letras diferentes indican diferencia significativa según el test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$.

Conclusiones

Las combinaciones portainjerto-variedad “Maxifort-Monarca” y “Java-Monarca” almacenadas a 10 °C presentaron frutos con ligeras diferencias. Las berenjenas cosechadas de las plantas injertadas sobre Maxifort presentaron pulpas más claras, mayor pérdida de peso y menor firmeza hacia el final del almacenamiento. Sin embargo las berenjenas provenientes de plantas injertadas sobre Java se mantuvieron casi sin cambios en la calidad por 28 días a 10 °C.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONICET (PIP-0086 y PIP-0098) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2012-2803) por el financiamiento recibido.

Referencias

ARVANITOYANNIS I S, KHAH E, CHRISTAKOU EC, BLETSOS FA. (2005). Effect of grafting and modified atmosphere packaging on eggplant quality parameters during storage. *International J Food Science Technology*, 40: 311–322.

CONCELLÓN, A., ZARO, M. J., CHAVES, A. R., VICENTE, A. R. (2012). Changes in quality and phenolic antioxidants in dark purple American eggplant (*Solanum*



melongena L. cv. Lucía) as affected by storage at 0 °C and 10 °C. *Postharvest Biology and Technology*, 66: 35-41.

CONCELLÓN, A., AÑÓN, M. C., CHAVES, A. R. (2004). Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature. *Food Chemistry*, 88(1): 17-24.

GISBERT, C., PROHENS, J., RAIGÓN, M. D., STOMMEL, J. R., NUEZ, F. (2011). Eggplant relatives as sources of variation for developing new rootstocks: Effects of grafting on eggplant yield and fruit apparent quality and composition. *Scientia Horticulturae*, 128(1): 14-22.

JHA, S. N., MATSUOKA, T. (2002). Surface stiffness and density of eggplant during storage. *Journal of Food Engineering*, 54(1): 23-26.

LÓPEZ-MARÍN, J., GÁLVEZ, A., DEL AMOR, F. M., ALBACETE, A., FERNÁNDEZ, J. A., EGEA-GILABERT, C., PÉREZ-ALFOCEA, F. (2017). Selecting vegetative/generative/dwarfing rootstocks for improving fruit yield and quality in water stressed sweet peppers. *Scientia Horticulturae*, 214: 9-17.

MONCADA, A., MICELI, A., VETRANO, F., MINEO, V., PLANETA, D., D'ANNA, F. (2013). Effect of grafting on yield and quality of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Scientia Horticulturae*, 149: 108-114.

WEI, G. P., YANG, L. F., ZHU, Y. L., CHEN, G. (2009). Changes in oxidative damage, antioxidant enzyme activities and polyamine contents in leaves of grafted and non-grafted eggplant seedlings under stress by excess of calcium nitrate. *Scientia Horticulturae*, 120(4): 443-451.



Efecto del tratamiento combinado (1-metilciclopropeno/ CaCl_2) en parámetros de calidad poscosecha de frutilla (*Fragaria x ananassa*, Duch)

Francese P.⁽¹⁾, Langer S.⁽¹⁾, Marina M.⁽¹⁾, Civello P.⁽²⁾, Martínez G.⁽¹⁾, Villarreal N.⁽¹⁾

(1) Instituto de Investigaciones Biotecnológicas – Instituto Tecnológico de Chascomús (CONICET-UNSAM).

(2) Instituto de Fisiología Vegetal (CONICET-UNLP).

Dirección de e-mail: silvilan@intech.gov.ar

Resumen

El estudio y desarrollo de tratamientos que permitan prolongar el tiempo de vida poscosecha de frutos de textura delicada como frutilla (*Fragaria x ananassa*, Duch), resulta de interés tanto para el consumo en nuestro país, como para incrementar las exportaciones de frutos de calidad a mercados distantes. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento con 1-metilciclopropeno (1-MCP, un inhibidor de la percepción del etileno) combinado con la aplicación de CaCl_2 sobre diferentes parámetros de calidad del fruto tales como contenido de antocianinas, azúcares totales, compuestos fenólicos y pH. Se utilizaron aproximadamente 500 frutos del cultivar Aroma cosechados en estadio de madurez comercial y se los sometió a los tratamientos: Control (C): 18 h aire a 20 °C + 30 min en agua a 25 °C. Tratamiento 1 (T1): 18 h aire a 20 °C + 30 min en CaCl_2 1% p/v a 25 °C. Tratamiento 2 (T2): 18 h 1-MCP 1 ppm a 20 °C + 30 min en agua a 25 °C. Tratamiento 3 (T3 o tratamiento combinado): 18 h 1-MCP 1 ppm a 20 °C + 30 min en CaCl_2 1% p/v a 25 °C. Se tomaron muestras inmediatamente después de cada tratamiento y luego de 10 días de almacenamiento a 4 °C + 2 días a 20 °C. No se detectaron diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos, ni en el pH de frutos tratados respecto a los controles. Sin embargo, se observó que el contenido de antocianinas (cuya cuantificación se utiliza habitualmente como un parámetro para evaluar el progreso de la maduración durante la poscosecha de frutilla) fue significativamente menor en frutos sometidos a los tratamientos individuales y combinado respecto a los controles (tanto a tiempo inicial como tiempo final) y que dicho efecto fue más marcado en frutos T3. Asimismo, los frutos sometidos al tratamiento combinado presentaron un contenido menor de azúcares totales que los controles, posiblemente debido a una menor degradación de los polisacáridos que constituyen la pared celular. Estos resultados, sugieren que el tratamiento combinado podría ser una buena estrategia para retrasar la maduración poscosecha de frutilla, y se encuentran en concordancia con resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación, en los que se observó que los frutos T3 presentaron una mayor firmeza y paredes celulares con un contenido mayor de pectinas y hemicelulosas que los frutos no tratados.

Palabras clave: frutilla, poscosecha, 1-MCP, CaCl_2 , calidad



Introducción

Las frutillas son frutos carnosos agrupados dentro de los denominados frutos blandos, junto con los arándanos, moras, frambuesas y grosellas (Green, 1971). Debido a sus excelentes propiedades organolépticas (aroma, sabor, textura y color), su valor nutricional y elevado contenido de compuestos antioxidantes, la frutilla es demandada tanto a nivel nacional como mundial. Argentina se encuentra entre los países de producción intermedia de frutilla en Sudamérica, cosechando alrededor de 13.200 toneladas anualmente. A nivel local, las zonas principales de producción se encuentran en Tucumán, Santa Fe y Buenos Aires (Kirschbaum y Hancock, 2000; FAOSTAT, 2013).

Los estadios de maduración de frutilla suelen clasificarse según el tamaño y color superficial del fruto (Kader, 2002). Los cambios en el color ocurren debido a la degradación de clorofilas y un aumento en la síntesis de antocianinas que son pigmentos flavonoides que confieren el color rojo al fruto. Una vez desarrollados los aquenios, se induce la asimilación de nutrientes desde la planta, así las frutillas, actúan como un sumidero de productos fotosintéticos generados en las hojas (Souleyre y col., 2004). Sin embargo, luego de la cosecha, las frutillas no acumulan cantidades apreciables de azúcares y la degradación del almidón aporta solo el 3% de los azúcares totales, razón por la cual deben ser retiradas de la planta en estadios avanzados de maduración (75-90% rojo) (Cordenunsi y col., 2003; Souleyre y col., 2004). Una vez cosechados, los frutos sufren un ablandamiento extensivo que favorece el ataque por patógenos, daño y deterioro durante el transporte resultando en pérdidas grandes económicas (Amil-Ruiz y col., 2011). Por estos motivos es de interés de desarrollo de tratamientos poscosecha que permitan prolongar el periodo de estantería de frutilla, conservando las excelentes propiedades organolépticas que caracterizan a estos frutos.

Respecto a la regulación hormonal de la maduración de frutilla, si bien es considerada un fruto no climatérico, trabajos recientes reportaron un rol del etileno en la maduración de estos frutos, regulando la expresión y actividad de enzimas y genes vinculados con el desarrollo del color del fruto y con el metabolismo de la pared celular (Villarreal y col., 2010; Villarreal y col., 2016).

En un trabajo previo llevado por nuestro grupo de investigación, se trataron frutillas en estadio de madurez comercial con un inhibidor de la percepción del etileno (1-metilciclopropeno, 1-MCP), con una solución de CaCl_2 1 % p/v, y con una combinación de ambos tratamientos (1-MCP/ CaCl_2) y se las almacenó durante 10 días a 20 °C y 2 días a 4 °C. Se observó que los frutos tratados eran más firmes que los controles, presentaban paredes celulares con un mayor contenido de hemicelulosas y pectinas unidas por interacciones iónicas y débiles, y eran más resistentes al ataque por el hongo patógeno principal de frutilla, *Botrytis cinerea*, tanto *in vivo* como en placa, respecto a controles. También se encontró una menor actividad fenilalanina amonioliasa (PAL, enzima principal de la vía de la síntesis de fenilpropanoides y flavonoides) en frutos tratados respecto a los controles. Si bien los resultados encontrados fueron significativos tanto para los frutos sometidos a los tratamientos individuales como al combinado, el efecto fue más pronunciado en el caso de los frutos tratados con 1-MCP/ CaCl_2 .



El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento con 1-MCP combinado con la aplicación de CaCl_2 sobre diferentes parámetros de calidad del fruto tales como contenido de antocianinas, azúcares totales, compuestos fenólicos y pH.

Materiales y Métodos

Materia Prima

Se utilizaron aproximadamente 500 frutos de frutilla (*Fragaria x ananassa*, Duch.) del cultivar Aroma cosechados en estadio de madurez comercial (75-90% de coloración superficial roja) en la zona del Gran La Plata, Pcia. Bs. As. Los frutos se transportaron inmediatamente al laboratorio de forma refrigerada.

Tratamientos

Los frutos se seleccionaron de acuerdo a la forma y tamaño, y para cada condición evaluada se utilizaron 120 frutos. Los tratamientos realizados fueron: Control (C): 18 h aire, 20 °C + 30 min en agua, 25 °C; Tratamiento 1 (T1): 18 h aire, 20 °C + 30 min en CaCl_2 1% p/v, 25 °C; Tratamiento 2 (T2): 18 h 1-MCP 1 ppm, 20 °C + 30 min en agua, 25 °C; y Tratamiento 3 (T3): 18 h 1-MCP 1 ppm, 20 °C + 30 min en CaCl_2 1% p/v, 25 °C. Se tomaron muestras tanto inmediatamente después de los tratamientos (tiempo inicial, T_i) como luego de un almacenamiento de 10 días a 4 °C + 2 días a 20 °C (tiempo final, T_f). Para cada tiempo, se pulverizaron por triplicado 15 g de fruto con pilón y mortero en presencia de N_2 (l) y el pulverizado se utilizó para realizar las medidas que se describen a continuación.

Medida de pH

Se pesaron 2,5 g de tejido pulverizado para cada condición y tiempo evaluados, se agregaron 25 ml de agua destilada, se agitó y se centrifugó durante 5 min a 16.000 x g a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se midió pH de las muestras utilizando un pHmetro (OAKTON pH-700).

Contenido de antocianinas

Se tomaron 0,3 g del polvo resultante y se agregaron 3 ml de metanol conteniendo 1% v/v de HCl. Se incubó a 0 °C por 10 min y se centrifugó a 3000 x g por 15 min a 4 °C. Se realizó una dilución 1:4 del sobrenadante y se midió absorbancia a 515 nm. La cantidad de antocianinas se expresó como μmoles de pelargonidina-3-glucósido por kg de fruto.

Contenido de compuestos fenólicos

Se tomó 1 g del pulverizado y se homogenizó con 6 ml de etanol absoluto. Se centrifugó a 9000 x g por 15 min a 4 °C y se realizó una dilución 1:2 del sobrenadante. Se tomaron muestras de 0,1 ml y se mezclaron con como 1,16 ml de H_2O y 0,15 ml del reactivo



Folin-Ciocalteu 1 N. Luego de 3 min a temperatura ambiente, se agregó 1,5 ml de solución Na_2CO_3 2% p/v en NaOH 0,1 N. Se midió absorbancia a 760 nm. Los resultados se expresaron mg de ácido gálico por kg de fruto.

Contenido de azúcares totales

Se tomaron 0,4 g del pulverizado y se homogenizaron con 6 ml de etanol absoluto. El homogenato se centrifugó a 9000 x g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se diluyó en relación 1:25 con H_2O_d . Se tomaron muestras de 0,1 ml y se mezclaron con 1 ml de antrona 0,2% p/v en H_2SO_4 72% v/v. La mezcla se agitó y se trató a 100 °C durante 12 min. Luego las muestras se llevaron a temperatura ambiente y se midió absorbancia a 625 nm. Los resultados se expresaron como g de glucosa por kg de fruto.

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados mediante ANOVA, y las medias comparadas mediante el test Tukey; con un nivel de significancia $p \leq 0,05$. Se utilizó el Graph-PadPrism versión 5. (GraPpad, San Diego, CA, USA) para generar los gráficos de expresión relativa en función de las condiciones evaluadas.

Resultados y Discusión

Efecto de los tratamientos sobre el pH de los frutos

En un estudio sobre el efecto del etileno en la regulación bioquímica y fisiológica de frutillas (cv. Toyonoka) cosechadas en estadio blanco, se reportó que frutos tratados con 1-MCP y almacenados 2 días a 22 °C no presentaron diferencias en las medidas de pH respecto a controles (Villarreal y col., 2010). Tampoco se observaron diferencias de este parámetro en frutillas de *Fragaria chiloensis* 75-90 % rojas luego de ser sumergidos en una solución de CaCl_2 2% p/v y almacenadas durante 8 días a 2 °C y 48 h a 20 °C (Figuroa y col., 2012). En el presente trabajo, no se encontraron diferencias significativas de pH de las muestras de frutillas luego de los tratamientos (T1, T2 y T3) respecto a los controles, en ninguno de los dos tiempos analizados (Ti y Tf).

Tabla 1. pH de muestras de frutos C, T1, T2 y T3 a Tiempo inicial (Ti) y Tiempo final (Tf)

		Control	T1	T2	T3
pH	Ti	3,72 ± 0,03	3,72 ± 0,08	3,77 ± 0,07	3,77 ± 0,01
	Tf	3,74 ± 0,03	3,82 ± 0,01	3,80 ± 0,03	3,73 ± 0,01

Contenido de antocianinas

El contenido de antocianinas en frutilla se utiliza habitualmente como un parámetro para evaluar el progreso de la maduración de los frutos (Jimenez-García y col., 2013).



Se detectó un contenido de antocianinas significativamente menor en frutos sometidos a los tratamientos individuales (CaCl_2 y 1-MCP) y combinado (1-MCP/ CaCl_2) respecto a los controles, tanto a Ti como Tf, y dicho efecto fue más pronunciado en frutos T3 (Figura 1).

La acumulación de antocianinas se encuentra estrechamente vinculada al aumento de la actividad fenilalanina amonioliase (PAL) (Song y col., 2015). En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo se encuentran en concordancia con la menor actividad PAL encontrada previamente en frutos sometidos a los tratamientos T1, T2 y T3, a Tf. Se reportó una disminución significativa del contenido de antocianinas en frutos blancos tratados con 1-MCP, en los que también se halló una menor actividad PAL (Villarreal y col., 2010). Asimismo, frutos del cv. Everest, cosechados con un color 90% rojo, luego de ser tratados con diversas concentraciones de 1-MCP (500-1000 nL/L) y mantenidos a 20 °C, exhibieron un menor aumento del contenido de antocianinas que frutos controles (Jiang y col., 2001).

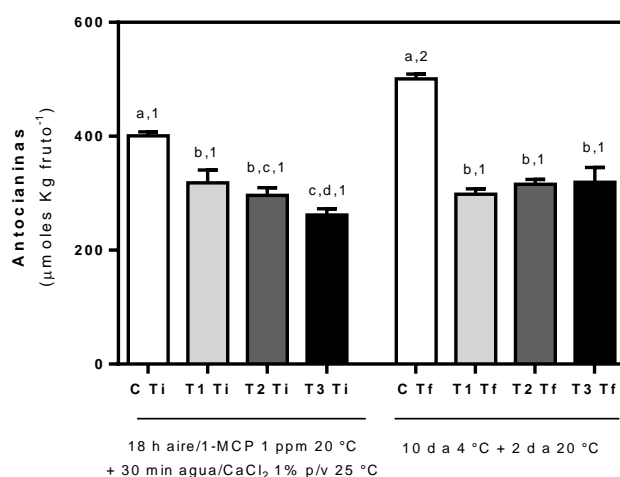


Figura 1. Contenido de antocianinas en muestras de frutos control (C), tratados con CaCl_2 (T1), tratamiento con 1-MCP (T2) y tratamiento combinado 1-MCP/ CaCl_2 (T3) a tiempo inicial (Ti) y tiempo final (Tf). Las barras indican desviaciones estándar del promedio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de un mismo tiempo de incubación (Ti o Tf). Números diferentes indican diferencias significativas entre tiempos de incubación (Ti o Tf) para un mismo tratamiento ($p \leq 0,05$).

Contenido de compuestos fenólicos

Durante la maduración de frutilla, el contenido de compuestos fenólicos decrece continuamente, siendo la caída más marcada desde el estadio verde pequeño al blanco (Martínez y col., 2001). En el presente trabajo, no se hallaron diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos entre frutos tratados y controles en ninguno de los dos tiempos analizados, Ti y Tf (Figura 2).

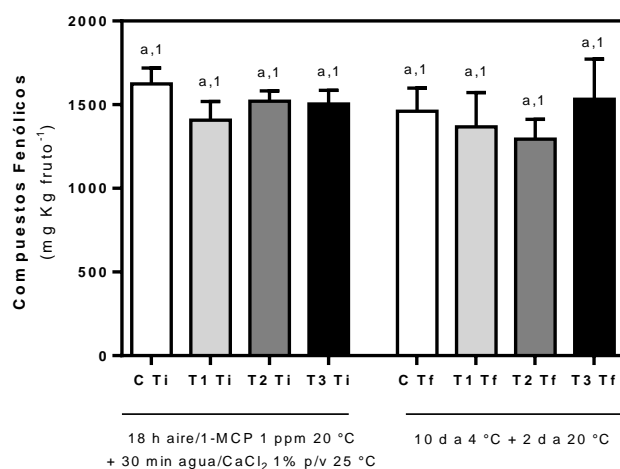


Figura 2. Contenido de compuestos fenólicos en muestras de frutos control (C), tratados con CaCl₂ (T1), tratamiento con 1-MCP (T2) y tratamiento combinado 1-MCP/CaCl₂ (T3) a tiempo inicial (Ti) y tiempo final (Tf). Las barras indican desviaciones estándar del promedio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de un mismo tiempo de incubación (Ti o Tf). Números diferentes indican diferencias significativas entre tiempos de incubación (Ti o Tf) para un mismo tratamiento ($p \leq 0,05$).

Contenido de azúcares totales

Tanto los frutos sometidos a los tratamientos individuales (T1 y T2), como al combinado (T3) presentaron un menor contenido de azúcares totales respecto a los controles inmediatamente después de los tratamientos (tiempo inicial, Ti) (**Figura 3**). Luego del almacenamiento, sólo los frutos T3 presentaron un contenido de azúcares significativamente menor que el grupo control (**Figura 3**). Debido a que frutilla no acumula cantidades apreciables de azúcares luego de la cosecha (Souleyre y col., 2004), estos resultados sugieren una menor degradación de los polisacáridos que forman parte de la pared celular. En este sentido, Villarreal y col. (2010) reportaron un menor contenido de azúcares totales en frutillas blancas, tratadas con 1-MCP y almacenadas 2 días a 22 °C respecto a controles.

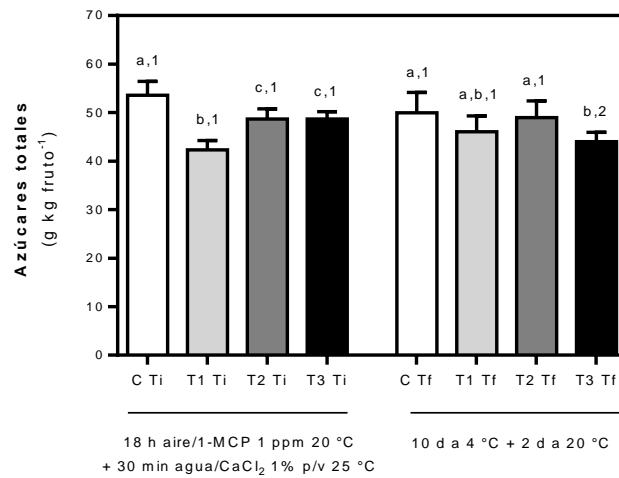


Figura 3. Contenido de azúcares totales en muestras de frutos control (C), tratados con CaCl₂ (T1), tratamiento con 1-MCP (T2) y tratamiento combinado 1-MCP/CaCl₂ (T3) a tiempo inicial (Ti) y tiempo final (Tf). Las barras indican desviaciones estándar del promedio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de un mismo tiempo de incubación (Ti o Tf). Números diferentes indican diferencias significativas entre tiempos de incubación (Ti o Tf) para un mismo tratamiento ($p \leq 0,05$).

Conclusiones

No se detectaron diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos, ni en el pH de frutos tratados T1, T2 y T3, respecto a los controles. Sin embargo, se observó que el contenido de antocianinas fue significativamente menor en frutos sometidos a los tratamientos individuales y combinado respecto a los controles y que dicho efecto fue más marcado en frutos T3. Asimismo, los frutos sometidos al tratamiento combinado presentaron un contenido menor de azúcares totales que los controles, posiblemente debido a una menor degradación de los polisacáridos que constituyen la pared celular.

Estos resultados, sugieren que el tratamiento T3 podría ser una buena estrategia para retrasar la maduración poscosecha de frutilla, y se encuentran en concordancia con resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación, en los que se observó que los frutos T3 presentaron una mayor firmeza y paredes celulares con un contenido mayor de pectinas y hemicelulosas que los frutos no tratados.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado a través de subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET; PIP 2013-2015 N° 0440) y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT; Préstamo BID PICT 2012-1562) Los autores agradecen el apoyo técnico brindado por José Luis Burgos (Técnico CIC).



Referencias

- AMIL-RUIZ F., BLANCO-PORTALES R., MUÑOZ-BLANCO J. (2011). The strawberry plant defense mechanism: a molecular Review, en *Plant and Cell Physiology*, 52: 1873-1903.
- CORDENUNSI B., NASCIMENTO J., LAJOLO F. (2003). Physico-chemical changes related to quality of five strawberry fruit cultivars during cool-storage, en *Food Chemistry*, 83: 167-173.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAOSTAT). (2014). Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [7 de Marzo de 2017].
- FIGUEROA C., OPAZO M., VERA P., ARRIAGADA O., DÍAZ M., MOYA-LEÓN M. (2012). Effect of postharvest treatment of calcium and auxin on cell wall composition and expression of cell wall-modifying genes in the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) fruit, en *Food Chemistry*, 132: 2014–2022.
- GREEN A. (1971). Soft fruits. en: *The biochemistry of Fruits and their Products*. Capítulo 11. Editor: Hulme, A.C.; Academic Press.
- JIANG Y., JOYCE D., TERRY L. (2001). 1-Methylcyclopropene treatment affects strawberry fruit decay, en *Postharvest Biology and Technology*, 23: 227-232.
- JIMENEZ-GARCIA S., GUEVARA-GONZALES R., MIRANDA-LOPEZ R., FERREGRINO-PEREZ A., TORRES-PACHECO I., VAZQUEZ-CRUZ M. (2013). Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: biochemistry, biotechnology, and genomics, en *Food Research International*, 54: 1195-1207.
- KADER A. (2002). *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. University of California. Agriculture and Natural Resources. Third Edition.
- KIRSCHBAUM D., HANCOCK J. (2000). The Strawberry Industry in South America. *Horticultural Science*, Vol 35, 5.
- MARTÍNEZ G., CIVELLO P., CHAVES A., AÑÓN M. (2001). Characterization of peroxidase-mediated chlorophyll bleaching in strawberry fruit, en *Phytochemistry* 58: 379-387.
- SONG J., DU L., LI L., KALT W., CAMPBELL P., FILLMORE S., ZHANG Y., ZHANG Z., LI X. (2015). Quantitative changes in proteins responsible for flavonoid and anthocyanin biosynthesis in strawberry fruit at different ripening stages: A targeted quantitative proteomic investigation employing multiple reaction monitoring, en *Journal of Proteomics*, 122: 1-10.
- SOULEYRE E., IANNETTA P., ROSS H., HANCOCK R., SHEPHERD L., VIOLA R. (2004). Starch metabolism in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*), en *Physiology Plantarum*, 121: 369-376.
- VILLARREAL N., BUSTAMANTE C., CIVELLO M., MARTÍNEZ G. (2010). Effect of ethylene and 1-MCP treatments on strawberry fruit ripening, en *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 683-689.



VILLARREAL N., MARINA M., NARDI C., CIVELLO M., MARTÍNEZ G. (2016). Novel insights of ethylene role in strawberry cell wall metabolism, en *Plant Science*, 252: 1-11.



Efecto del tratamiento postcosecha 1-MCP/CaCl₂ en la expresión de genes del metabolismo de la pared celular de frutilla

Langer S. ⁽¹⁾, Marina M. ⁽¹⁾, Civello M. ⁽²⁾, Martínez G. ⁽¹⁾, Villarreal N. ⁽¹⁾

(1) Instituto de Investigaciones Biotecnológicas – Instituto Tecnológico de Chascomús (CONICET-UNSAM).

(2) Instituto de Fisiología Vegetal (CONICET-UNLP).

Dirección de e-mail: silvilan@intech.gov.ar

Resumen

Debido a su textura delicada y velocidad elevada de ablandamiento, la frutilla, presenta una gran susceptibilidad al ataque por patógenos lo que reduce el tiempo de vida comercial de estos frutos. Por estos motivos, es de interés el desarrollo de tratamientos capaces de retrasar el desensamblaje de la pared celular, y el consecuente ablandamiento, durante la postcosecha de frutilla. En un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación, se halló que frutos tratados con 1-metilciclopropeno (1-MCP) y con CaCl₂ y almacenados 10 días a 4 °C y 2 días a 20 °C, eran más firmes, presentaban un mayor contenido tanto de pectinas unidas por interacciones débiles e iónicas, así como de hemicelulosas en sus paredes celulares y eran más resistentes al ataque por *Botrytis cinerea* que los frutos controles. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento 1-MCP/CaCl₂ sobre la expresión de genes vinculados con el metabolismo de los polímeros constituyentes de la pared celular de frutilla. Para ello se utilizaron 400 frutos del cultivar Aroma cosechados en estadio de madurez comercial, los cuales se dividieron en 4 grupos: Control: 18 h aire, 20 °C + 30 min en agua, 25 °C; T1: 18 h aire, 20 °C + 30 min en CaCl₂ 1% p/v, 25 °C; T2: 18 h 1-MCP 1 ppm, 20 °C + 30 min en agua, 25 °C; y T3: 18 h 1-MCP 1 ppm, 20 °C + 30 min en CaCl₂ 1% p/v, 25 °C. Se tomaron muestras tanto inmediatamente después de los tratamientos (tiempo inicial, Ti) como luego de un almacenamiento de 10 días a 4 °C + 2 días a 20 °C (tiempo final, Tf). Mediante la técnica de PCR en Tiempo Real se midió la expresión de genes relevantes en el metabolismo de pectinas: poligalacturonasa (*FaPG1*) y pectin metilesterasa (*FaPME1*); y de hemicelulosas: xiloglucano endotransglicosilasa (*FaXTH1*) y xilosidasa (*FaXyl1*). Inmediatamente después de los tratamientos (Ti), se observó una expresión significativamente mayor de *FaPME1* y una expresión significativamente menor de *FaPG1* en los frutos T1, T2 y T3, respecto a los controles. Por otro lado, la expresión *FaXTH1* fue significativamente mayor en frutos sometidos a los tratamientos individuales y combinado, respecto al control. Es de destacar que estos efectos fueron más marcados en frutos sometidos a los tratamientos con 1-MCP (T2) y combinado (T3). Respecto al gen *FaXyl1* no se encontraron diferencias significativas en la expresión de mismo entre frutos tratados y controles. Estos resultados se encuentran estrechamente vinculados con el mayor contenido de pectinas de interacciones iónicas y débiles, así como de hemicelulosas registrados previamente.



Palabras clave: frutilla, postcosecha, genes, pared celular

Introducción

Por sus magníficas propiedades organolépticas, los frutos de frutilla (*Fragaria x ananassa*, Duch) son apreciados por los consumidores, tanto a nivel mundial como local, ya sea para consumo directo como para la elaboración de salsas, conservas, congelados, yogures, bebidas y helados (Holzwarh et al., 2012). El principal problema que presenta el manejo postcosecha de frutilla es la elevada velocidad de ablandamiento de los frutos, la cual conduce a un rápido deterioro que facilita el ataque por patógenos, dificulta el transporte y disminuye el tiempo de vida de estantería, causando elevadas pérdidas económicas. El ablandamiento o pérdida de firmeza de los frutos está estrechamente vinculado a modificaciones en la estructura y composición de la pared celular primaria. El modelo aceptado actualmente indica que la pared celular primaria está conformada por una red de celulosa - hemicelulosas embebida en una matriz de pectinas hidrofílica (Carpita y McCann, 2000). La pared celular primaria contiene un 35% de pectinas, 30% de celulosa, 30% de hemicelulosa y un 5% de proteínas estructurales y de modificación de polisacáridos, siendo el contenido de pectinas sustancialmente mayor en frutos carnosos, y alcanzó un 60% en frutilla (Brummell, 2006; Villarreal et al., 2016). Las pectinas además son los componentes mayoritarios de la lámina media estructura cuya función principal es de adhesión intercelular (Bou Daher y Braybrook, 2015).

Durante el desarrollo de los frutos carnosos, las pectinas (conformadas en su mayoría por homogalacturonanos o HG) son progresivamente de-esterificadas debido a la acción de pectin metilesterasas (PMEs), lo cual por un lado proporciona el sustrato a las poligalacturonasas (PGs), que hidrolizan los enlaces α -1,4-glucosídicos de los HG, y por otro facilita la formación de puentes de Ca^{+2} entre los residuos de ácidos galacturónicos desterificados otorgando estabilidad a la matriz péctica (Jarvis et al., 2003). Por estos motivos, y con el fin de retrasar el desensamblaje postcosecha de la pared celular de frutilla, resulta de interés el estudio e implementación de tratamientos capaces de aumentar la expresión y actividad de PMEs endógenas de frutilla y que disminuyan las correspondientes a otras enzimas que degradan los polímeros de la pared celular primaria y lámina media, como las PGs. En este sentido, nuestro grupo de investigación evaluó en un trabajo previo el efecto del tratamiento combinado 1-MCP/ CaCl_2 , así como los tratamientos individuales (1-MCP y CaCl_2) y control sobre la firmeza, el contenido de los polímeros principales de la pared celular de frutilla y sobre el crecimiento del hongo patógeno *Botrytis cinerea*, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los principales resultados obtenidos revelaron que luego de un almacenamiento durante 10 días a 4 °C y 2 días a 20 °C (tiempo final ó Tf), los frutos tratados con CaCl_2 , 1-MCP y combinado fueron significativamente más firmes que los frutos controles, presentaban un mayor contenido de hemicelulosas y de pectinas unidas por interacciones iónicas y débiles. Asimismo, frutos sometidos a los tratamientos individuales y combinado presentaron un crecimiento significativamente menor de *B. cinerea*, tanto en placas que contenían paredes celulares de los frutos a Tf como única fuente de carbono, como luego de ser inoculados con un micelio de *B. cinerea* y almacenados durante 6 días a 20 °C. Es importante destacar que los resultados observados tanto en la firmeza como en el menor crecimiento del hongo fueron más



pronunciados en los frutos sometidos al tratamiento con 1-MCP y al tratamiento combinado 1-MCP/CaCl₂.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de los tratamientos individuales CaCl₂ y 1-MCP y combinado, 1-MCP/CaCl₂, sobre la expresión de genes vinculados con el metabolismo de los polímeros constituyentes de la pared celular de frutilla. Respecto al metabolismo de pectinas, se evaluó la expresión de los genes *FaPME1* y *FaPG1*, que codifican para una pectin metilesterasa y una poligalacturonasa respectivamente, y en cuanto al metabolismo de hemicelulosas, se estudió la expresión de los genes *FaXTH1* y *FaXyl1*, que codifican correspondientemente, para una xiloglucano transglicosilasa/hidrolasa y una β-xilosidasa.

Materiales y Métodos

Material Vegetal

Se utilizaron aproximadamente 400 frutos de frutilla (*Fragaria x ananassa*, Duch.) del cultivar Aroma cosechados en estadio de madurez comercial (75-85% de coloración superficial roja) en la zona del Gran La Plata, Pcia. Bs. As. Los frutos se transportaron inmediatamente al laboratorio de forma refrigerada.

Tratamientos

Los frutos se seleccionaron de acuerdo a forma, tamaño y ausencia de daños, y para cada condición evaluada se utilizaron 120 frutos. Los tratamientos realizados fueron: Control (C): 18 h aire, 20 °C + 30 min en agua, 25 °C; Tratamiento 1 (T1): 18 h aire, 20 °C + 30 min en CaCl₂ 1% p/v, 25 °C; Tratamiento 2 (T2): 18 h 1-MPC 1 ppm, 20 °C + 30 min en agua, 25 °C; y Tratamiento 3 (T3): 18 h 1-MCP 1 ppm, 20 °C + 30 min en CaCl₂ 1% p/v, 25 °C. Se tomaron muestras tanto inmediatamente después de los tratamientos (tiempo inicial, Ti) como luego de un almacenamiento de 10 días a 4 °C + 2 días a 20 °C (tiempo final, Tf). Para cada tiempo, los frutos se cuartearon, congelaron en N₂ (l) y almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

Extracción de ARN_T y síntesis de ADN_C

A partir de 5 g de pulverizado de frutos tratados y controles se extrajo ARN total (ARN_T, 5 extracciones independientes) para todas las condiciones analizadas, utilizando el método del 2-butoxietanol (Manning, 1991). Luego de comprobar la integridad de ARN_T extraído mediante electroforesis en geles de agarosa y de proceder a la cuantificación de las muestras, se trató con ADNasa con el objetivo de obtener ARN libre de ADN genómico. Posteriormente se purificó el ARN_T y se procedió a la síntesis de ADN complementario (ADN_C).

Análisis de la expresión génica por PCR en tiempo real

Para cada condición evaluada, se analizó la expresión relativa mediante PCR en tiempo Real de cuatro genes vinculados con el metabolismo de pared celular de frutilla. En la *Tabla 1* se detallan los números de acceso a las secuencias de los genes, secuencias



de los oligonucleótidos utilizados y el tamaño del amplicón en pares de bases (pb). Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo utilizando FastStart Universal SYBR Green Master Rox 2X (Roche) de acuerdo a las indicaciones del fabricante, en un equipo Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Las condiciones de PCR fueron: 95 °C por 10 min; 40 ciclos de 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 60 s; y una curva de disociación de 60 °C a 95 °C con incrementos de 0,3 °C. Se construyeron las correspondientes curvas de eficiencia para cada par de oligonucleótidos utilizado, empleando ADNc de frutos 100% rojos como molde. Cada reacción se llevó a cabo por duplicado y se incluyó agua como control negativo en cada corrida. Se midió fluorescencia al final de cada paso de amplificación. En cada experimento, los niveles de expresión relativa correspondieron al promedio de cinco réplicas biológicas, normalizadas contra el gen de referencia *FaGaPDH1*, el cual codifica una gliceraldehído fosfato deshidrogenasa de frutilla (número de acceso: AB363963.1). Para la amplificación de *FaGaPDH1* se utilizaron los siguientes cebadores específicos: Fw: 5'-TCCATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3' y Rv: 5'-AGCAGGCAGAACCTTTCCGACAG-3', y el tamaño del fragmento amplificado fue de 96 pb. Los niveles de expresión se calcularon mediante el método de las dos curvas estándares (Pfaffl, 2001)

Tabla 1.

Genes del metabolismo de pared celular	Número de acceso	Secuencias de oligonucleótidos	Tamaño amplicón (pb)
Pectinas			
<i>FaPME1</i>	AY324809	Fw: 5' CAAGTGCACCCAACTTCTGA 3', Rv: 5' CTGAGCTACCACAACGTCCA 3'	123
<i>FaPG1</i>	DQ458990	Fw: 5' AATGTGAGATTTCGACAGAGTG- 3' Rv: 5' GTGGAAATTTTTGCTGTTAAGTG 3'	72
Hemicelulosas			
<i>FaXTH1</i>	GQ367550	Fw: 5' ACTCTGCTCTTGAGCATAGTGC 3' Rv: 5' GAGCTGAATCTCATTGCCACC 3'	150
<i>FaXyl1</i>	EU736110	Fw: 5' TGCTACCAGAGATCGACGTG3' Rv: 5' CAACACCGGCATAGTTTCCT3'	274

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados mediante ANOVA, y las medias comparadas mediante el test de Tukey con un nivel de significancia $p \leq 0,05$. Se utilizó el Graph-PadPrism versión



5. (GraPhPad, San Diego, CA, USA) para generar los gráficos de expresión relativa en función de las condiciones evaluadas.

Resultados y Discusión

Expresión de genes del metabolismo de pectinas

El gen *FaPME1* codifica para la pectin metilesterasa 1 (EC 3.1.1.11) y su expresión es específica de fruto (Castillejo et al., 2004). Se ha demostrado que este gen es relevante en el metabolismo de pectinas de frutilla (Osorio et al., 2008). En este sentido, fue informado que la expresión ectópica *FaPME1* en la frutilla silvestre *Fragaria vesca*, da lugar a frutos con una pared celular con pectinas cuyos oligogalacturónidos poseen un menor grado de metil-esterificación (Osorio et al., 2008). En un estudio sobre el efecto del etileno sobre la regulación bioquímica y fisiológica de frutos de frutilla (cv. Toyonoka) cosechados en el estadio de maduración blanco, se reportó una mayor acumulación de ARNm *FaPME1* en frutos tratados con 1-MCP (Villarreal et al., 2016). Por otra parte, frutos de *Fragaria chiloensis* 75-85% rojos presentaron mayor expresión *FaPME1* luego de ser sumergidos en una solución de CaCl_2 2% p/v y almacenadas durante 8 días a 2 °C y 48 h a 20 °C (Figuroa et al., 2012). En el presente trabajo, se observó una expresión significativamente mayor de *FaPME1* en frutos T1, T2 y T3 respecto a los frutos controles a Ti; **Figura 1.A.**; siendo más pronunciado dicho aumento en los frutos sometidos al tratamiento con 1-MCP (T2) y combinado (T3). Luego de un almacenamiento de 10 días a 4 °C + 2 días a 20 °C (Tf); la expresión *FaPME1* disminuyó y no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control (**Figura 1.A.**).

El gen *FaPG1* codifica una endo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) íntimamente vinculada con la degradación de pectinas y con las diferencias de texturas observadas entre cultivares de frutilla (Villarreal et al., 2008; Quesada et al., 2009). Se informó una regulación negativa de la expresión relativa *PG* en frutos de papaya (Zerpa-Cantanhó et al., 2017) y menor actividad *PG* en frutos de mango (Razzaq Kashif et al., 2016) sometidos a la aplicación de 1-MCP. En frutilla, se ha reportado que la inhibición de la percepción del etileno en frutos blancos, tratados con 1-MCP y almacenados durante 48 h a 22 °C, genera una disminución significativa de la expresión *FaPG1* y de la actividad *PG*, respecto a los frutos no tratados (Villarreal et al., 2009, Villarreal et al., 2016). En el presente trabajo, se observó una expresión significativamente menor del gen *FaPG1* en frutos cosechados en estadio comercial y sometidos a los tratamientos T1, T2 y T3 respecto al control inmediatamente después de cada tratamiento (**Figura 1.B.**). Luego del almacenamiento, la expresión *PG* disminuyó significativamente respecto a Ti, y no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control (**Figura 1.B.**).

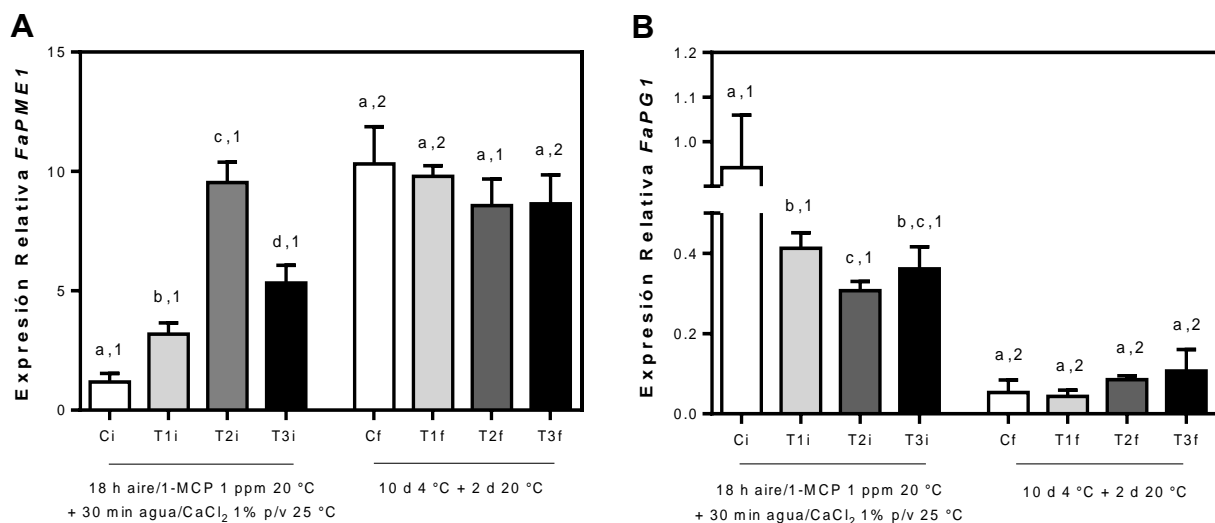


Figura 1. Expresión relativa de **A)** *FaPME1* y **B)** *FaPG1* en muestras de frutos control (C), tratados con CaCl_2 (T1), tratamiento con 1-MCP (T2) y tratamiento combinado 1-MCP/ CaCl_2 (T3) a tiempo inicial (Ti) y tiempo final (Tf). Las barras indican desviaciones estándar del promedio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de un mismo tiempo de incubación (Ti o Tf). Números diferentes indican diferencias significativas entre tiempos de incubación (Ti o Tf) para un mismo tratamiento ($p \leq 0,05$).

Expresión de genes de metabolismo de hemicelulosas

Las xiloglucano endotransglicosilasas/hidrolasas (XTHs) son enzimas involucradas en el remodelado de las hemicelulosas de la pared celular vegetal. Los genes *XTH* codifican proteínas que pueden tener dos tipos de actividades catalíticas de acuerdo a sus efectos sobre los xiloglucanos de la pared celular, xiloglucano endo-transglicosilasa (XET; EC 2.4.1.207) y xiloglucano endo-hidrolasa (XEH; EC 3.2.151) (Eklof y Brumer, 2010). Se ha sugerido que el gen *FaXTH1* codifica una enzima putativa con actividad endo-transglicosilasa exclusivamente, con lo cual se la ha asociado con el ensamblado y mantenimiento, en vez del desensamblaje de estos polímeros (Nardi et al., 2014). Villarreal et al., (2016) reportaron un aumento en la expresión *FaXTH1* en frutos en estadio blanco tratados con 1-MCP y almacenados 48 h a 22 °C. Por otro lado, se informó que no se observaron diferencias significativas en la expresión relativa *XTH1* entre frutos de *Fragaria chiloensis* controles y frutos sumergidas en una solución de CaCl_2 y luego almacenadas durante 8 días a 2 °C y 48 h a 20 °C (Figuroa et al., 2012). En el presente trabajo, inmediatamente después de los tratamientos, tanto los frutos sometidos a los tratamientos individuales (T1 y T2) como al combinado (T3) mostraron un aumento significativo en la expresión del gen *FaXTH1* (**Figura 3.A**) respecto a frutos controles, siendo este efecto más marcado en frutos T2 y T3. A tiempo final, la expresión de este gen aumenta significativamente en frutos controles, aunque continúa siendo menor que en frutos sometidos al tratamiento combinado (**Figura 3.A**).

El gen *FaXyl1* codifica para una β -D-xilosidasa (EC 3.2.1.37) que está vinculada a diferencias en la firmeza entre cultivares de frutilla (Bustamante et al., 2006). Se reportó que frutillas (cv. Camarosa) en estadio blanco, tratadas con 1-MCP y luego almacenadas durante 48 h a 20 °C, presentaron una mayor acumulación de



transcriptos *FaXyl1*, aunque no se observaron diferencias en la actividad β -Xyl entre tratados y controles (Bustamante et al., 2009). En el presente trabajo, no se hallaron diferencias significativas en la expresión *FaXyl1* entre frutos tratados y controles, en ninguno de los dos tiempos analizados (**Figura 3.B**).

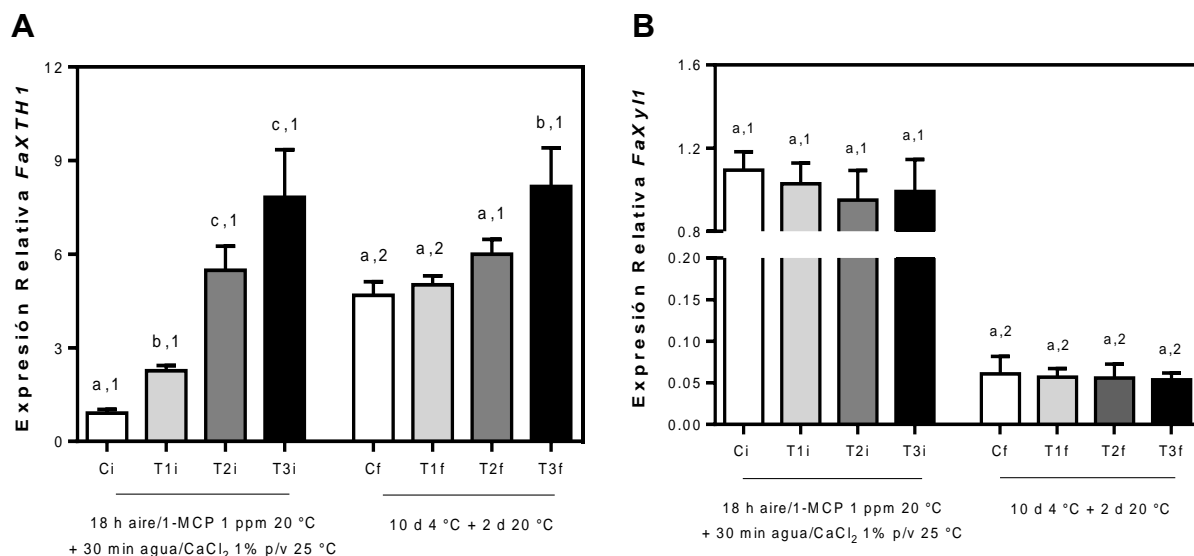


Figura 2. Expresión relativa de **A)** *FaXTH1* y **B)** *FaXyl1* en muestras de frutos control (C), tratados con CaCl₂ (T1), tratamiento con 1-MCP (T2) y tratamiento combinado 1-MCP/CaCl₂ (T3) a tiempo inicial (Ti) y tiempo final (Tf). Las barras indican desviaciones estándar del promedio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de un mismo tiempo de incubación (Ti o Tf). Números diferentes indican diferencias significativas entre tiempos de incubación (Ti o Tf) para un mismo tratamiento ($p \leq 0,05$).

Conclusiones

La mayor firmeza y el mayor contenido de hemicelulosas y pectinas unidas por interacciones iónicas y débiles observados en frutos sometidos al tratamiento CaCl₂ y particularmente, a los tratamientos 1-MCP y combinado, respecto a los controles, se debe en parte a la regulación positiva de genes tales como *FaPME1* y *FaXTH1*, y la disminución de la expresión de genes de degradación como *FaPG1*.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado a través de subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET; PIP 2013-2015 N° 0440) y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT; Préstamo BID PICT 2012-1562) Los autores agradecen el apoyo técnico brindado por José Luis Burgos (Técnico CIC).



Referencias

- BOU DAHER F. BRAYBROOK S. (2015). How to let go: pectin and plant cell adhesion, en *Frontiers in Plant Science*. 6: 523.
- BRUMMELL D. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit, en *Functional Plant Biology*, 33:103 -119.
- BUSTAMANTE C., ROSLI H., AÑÓN M., CIVELLO P., MARTÍNEZ G. (2006). β -Xylosidase in strawberry fruit: Isolation of a full-length gene y analysis of its expression and enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness, en *Plant Science*, 171:497–504.
- BUSTAMANTE C., CIVELLO P., MARTÍNEZ G. (2009). Cloning of the promoter region of Cloning of the promoter region of β -xylosidase (*FaXyl1*) gene and effect of plant growth regulators on the expression of *FaXyl1* in strawberry fruit, en *Plant Science* 177:49–56.
- CARPITA N., MCCANN M. (2000). The cell wall. Biochemistry and molecular biology of plants. Eds. BB Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones. 52-108.
- CASTILLEJO C., DELA FUENTE J., IANNETTA P., BOTELLA M., VALPUESTA V. (2004). Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of *FaPE1* a ripening-specific isoform, en *Journal of Experimental Botany*, 55:909–918.
- ZERPA-CATANHO D., ESQUIVEL P., MORA-NEWCOMER E., SÁENZ M., HERRERA R., JIMÉNEZ V. (2017). Transcription analysis of softening-related genes during postharvest of papaya fruit (*Carica papaya* L. ‘Pococi’ hybrid) en, *Postharvest Biology y Technology*, 125:42–51.
- EKLOF J., BRUMER, H. (2010). The XTH gene family: an update on enzyme structure, function, and phylogeny in xyloglucan remodelling. en: *Plant Physiology* 153:456-466.
- FIGUEROA C., OPAZO M., VERA P., ARRIAGADA O., DÍAZ M., MOYA-LEÓN M. (2012). Effect of postharvest treatment of calcium y auxin on cell wall composition y expression of cell wall-modifying genes in the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) fruit, en *Food Chemistry*, 132:2014–2022.
- HOLZWARH M., KORHUMMEL S., CARLE R., KAMMERER D. (2012). Evaluation of the effects of different freezing y thawing methods on color, polyphenol y scorbic acid retention in strawberries (*Fragaria x ananassa*, Duch.), en *Food Research International* 48:241-248.
- JARVIS M., BRIGGS S., KNOX J. (2003). Intercellular adhesion and cell separation in plants, en *Plant, Cell y Environment*, 26:977-989.
- MANNING K. (1991). Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation, en: *Analytical Biochemistry*, 195:45-50.
- NARDI C., VILLARREAL N., OPAZO C., MARTÍNEZ G., MOYA-LEÓN M., CIVELLO M. (2014). Expression of *FaXTH1* y *FaXTH2* genes in strawberry fruit. Cloning of promoter regions y effect of plant growth regulators, en *Scientia Horticulturae*, 165:111–122.



OSORIO S., CASTILLEJO C., QUESADA M.A. (2008). Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*), en *Plant Journal*, 54:43-55.

QUESADA M., BLANCO-PORTALES R., POSE S. (2009). Antisense down-regulation of the FaPG1 gene reveals an unexpected central role for polygalacturonase in strawberry fruit softening, en *Plant Physiology*, 150:1022-1032.

VILLARREAL N., MARTÍNEZ G., CIVELLO P. (2009). Influence of plant growth regulators on polygalacturonase expression in strawberry fruit, en *Plant Science*, 176:749-757.

VILLARREAL N., MARINA M., NARDI C., CIVELLO M., MARTÍNEZ G. (2016). Novel insights of ethylene role in strawberry cell wall metabolism, en *Plant Science*, 252:1–11.



Factores bioquímicos y fisiológicos que diferencian tres variedades de arándanos (*Vaccinium corymbosum*) con distinto grado de firmeza

Montecchiarini M.⁽¹⁾, Bello F.⁽²⁾, Rivadeneira F.⁽²⁾, Vázquez D.⁽²⁾, Podestá F. E.⁽¹⁾,
Tripodi K.⁽¹⁾

(1) CEFOSI-CONICET-FCByF (Universidad Nacional Rosario)

(2) INTA- EEA Concordia (Entre Ríos)

Dirección de e-mail: tripodi@cefobi-conicet.gov.ar

Resumen

El cultivo de arándano fue introducido en nuestro país en la década del 90 y su exportación en contraestación a mercados de alto poder adquisitivo lo tornan atractivo. Más del 95% de lo cosechado se exporta fresco, por lo cual el conocimiento de los factores que influyen en la firmeza de los frutos permitiría mejorar los tratamientos del cultivo y optimizar sus condiciones de comercialización. El metabolismo de la pared celular y factores nutricionales (calcio, nitrógeno) influyen en la firmeza. Este estudio responde a la necesidad de investigar los indicadores diferenciales entre variedades de distinta firmeza, dado que el conocimiento logrado en varios frutos modelo o con otras variedades no es totalmente extrapolable a las condiciones y cultivos locales. Los objetivos son: estudiar los cambios bioquímicos y fisiológicos que ocurren en frutos de tres variedades de arándano durante su maduración e identificar indicadores bioquímicos que pueden utilizarse en el futuro para desarrollar y evaluar tratamientos adecuados a cada variedad y condición de cultivo. Se analizaron metabolitos primarios, aminoácidos, fenólicos totales y actividad pectinmetilesterasa (PME) en los estadios verde y maduro de las variedades O'Neal (O), Snowchaser (S) y Emerald (E), de menor a mayor firmeza respectivamente. Análisis estadísticos (ANOVA de dos caminos) demostraron que varios metabolitos permitieron la discriminación según la etapa madurativa: así, el ácido málico, asparagina, galactosa, glicina, fosfato, manitol y ácido cítrico fueron más elevados en los frutos verdes de todas las variedades. El contenido de aminoácidos totales fue superior en frutos verdes de E y menor en O. Los niveles de fenólicos totales fueron más elevados en frutos maduros de S. En frutos verdes, la actividad PME fue significativamente menor en E verde y mayor en O, mientras que no hubo diferencias entre especies para los frutos maduros. Considerando algunas características relacionadas con el metabolismo de la pared celular: como actividad PME, contenido de xilosa/ribosa, prolina e hidoxiprolina, los análisis estadísticos descriptivos vincularon a S y E, separándola de O (menos firme). Estos estudios sientan las bases para el análisis más exhaustivo de ciertos procesos metabólicos como la dinámica de pared celular, el metabolismo de aminoácidos y de carbohidratos, a fin de poder generar indicadores bioquímicos vinculados al aumento de la vida útil del fruto. Se espera además que dichos indicadores permitan evaluar la incidencia diversos tratamientos, como por ejemplo la fertilización con calcio.

Palabras clave: arándanos, firmeza, metabólica, pared celular.



Introducción

Desde hace unos años el consumo de arándanos (*Vaccinium* sp.) en el mundo se ha incrementado, impulsado en gran parte por sus reconocidos beneficios para la salud humana. En efecto, su alto contenido en antocianinas y otras moléculas antioxidantes, relacionan a estos frutos (bayas) con el tratamiento preventivo de infecciones urinarias, degeneración macular, trastornos en la visión nocturna y riesgos cardiovasculares, entre otras dolencias. En nuestro país la zona de mayor producción abarca Buenos Aires, Entre Ríos y Tucumán, que concentran el 90% de la superficie total sembrada (INTA- Programa Frutales, Cadena Arándano). Se cultivan variedades de tipo Southern Highbush (*Vaccinium corymbosum*, familia Ericaceae), de bajo requerimiento en horas de frío. Según los datos del último censo de productores (APAMA, 2015) las variedades más cultivadas en Entre Ríos son Emerald (34%), Snowchaser (15%), O'Neal (14%), Misty (12%), Star (12%) y Jewel (7%). El gran atractivo de este cultivo para nuestro país es la posibilidad de alcanzar mercados de alto poder adquisitivo, gracias a que se produce en contra estación con el hemisferio norte. La mayor parte (95%) de la producción local se exporta fresca, hecho que destaca la importancia de generar conocimiento acerca de cómo estos frutos mantienen su calidad por un tiempo prolongado. Dentro de los parámetros de calidad, la firmeza de los frutos es uno de los más importantes, ya que influye en el transporte de la fruta fresca y, de manera muy relevante, en la comercialización. Esto es fundamental para la percepción de calidad por parte del consumidor: el fruto blando se asocia con fruto viejo que ha sobrepasado su punto de maduración. En este trabajo se expone una primera aproximación en el estudio de los factores bioquímicos y fisiológicos que estarían implicados en la determinación de la calidad del fruto y su posible vinculación con el grado de firmeza. Para ello se eligieron tres variedades cultivadas en la zona de Concordia (Entre Ríos) que difieren en este factor y se estudiaron dos estadios de maduración, verde y maduro. La relevancia de estos análisis radica en que existe una gran variabilidad de factores implicados y a que el comportamiento de frutos modelo, como tomate o manzana, no es siempre extrapolable a otros frutos como las bayas. Se realizó un estudio del contenido de metabolitos primarios, como azúcares, ácidos orgánicos, polialcoholes, aminoácidos, fenólicos totales, además de medir actividad pectinmetilesterasa (PME), una de las enzimas vinculadas con el metabolismo de la pared celular. Se espera que estas investigaciones inicien un campo aún poco desarrollado que es la caracterización bioquímica de variedades de arándanos de interés comercial en nuestro país y generen parámetros estándares para el diseño de tratamientos a campo y postcosecha de este cultivo.



Materiales y Métodos

Material vegetal

Se recogieron frutos en estadio verde (desde 25 a 60 días post floración) y maduro (desde 75 a 88 días post floración) de las variedades Emerald (E), Snowchaser (S) y O'Neal (O), cultivadas en granjas comerciales de la zona de Concordia. Se separó exocarpio de mesocarpio y endocarpio, congelándose inmediatamente los frutos a -80°C para su posterior estudio.

Metabolitos primarios

Se determinaron por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) de los extractos fraccionados y trimetilsililados, utilizando ribitol como estándar interno y expresando los resultados como área relativa de cada compuesto/ área del ribitol (Roessner et al, 2000).

Aminoácidos

Se determinaron luego de su derivatización con fenilisotiocianato, mediante HPLC en una columna Luna C18. Se cuantificaron utilizando curvas de calibración para cada aminoácido y se expresaron los resultados en nmoles o μ moles/gpf.

Fenólicos totales

Se determinaron espectrofotométricamente utilizando el reactivo Folin Ciocalteau y con ácido gálico como estándar según lo descrito en Singabet al (2011).

Actividad PME

Se determinó mediante ensayo colorimétrico en pectoplate: una vez obtenido el extracto proteico total, se sembraron 2 μ g de proteínas en un pocillo en gel de agar/pectina. Luego de incubar 3 hs a 30°C, se tiñó con rojo de rutenio y se midió el área del halo coloreada, expresando los resultados como área/gpf (Lionetti,2015).

Firmeza

El análisis de textura se realizó con un equipo TA.TX Plus (Stable Micro SystemsLtd UK), se efectuó un análisis de compresión con sonda de penetración de 75 mm de diámetro comprimiendo los frutos en forma axial 5 mm una velocidad de 1 mm.s⁻¹ y sonda de carga de 5 kg. Se registró la fuerza máxima. Este ensayo permite ver el comportamiento de la piel.



Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados empleando el Análisis de Variancias (ANOVA) de dos caminos con el programa Sigma Stat. Para el test de comparaciones múltiples se utilizó el método Holm-Sidak con un valor de significancia de $P < 0,05$. Se utilizaron estadísticas descriptivas, se estandarizaron en base al log 2 y se procesaron por análisis de componentes principales (PCA) en paquete Excel Xstat, u obteniendo mapas de calor (heatmaps) con el programa MeV-TM4 (Saeedet al, 2003).

Resultados y Discusión

En busca de diferencias metabólicas que permitan caracterizar variedades de arándanos de interés comercial, se cuantificaron en endocarpio y mesocarpio de frutos maduros y verdes los niveles de 40 metabolitos, entre ellos, aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos y polialcoholes. La primera diferenciación importante al estudiar los datos en conjunto mediante el análisis de componentes principales (ACP) fue entre las dos etapas de maduración (Figura 1). En efecto, dos Cp explicaron un 56,89% de las diferencias entre los frutos verdes y maduros, los primeros tuvieron mayor contenido de cítrico, málico, galactosa, asparagina, glicina, fosfato y manitol. Un mayor contenido de ácidos orgánicos (málico, cítrico) es característico de los frutos verdes, cuando aún no ha comenzado la acumulación de azúcares propia de la madurez. El manitol como otros polialcoholes, es un importante osmolito, que protege a los frutos contra la deshidratación, ayudando a mantener la presión de turgencia (Conde et al, 2014). La segunda y tercera Cp, permitieron separar las variedades entre sí. La Cp2 deja a la variedad fruto maduro (SM) más separada del resto de las muestras, con mayor contenido en valina, monopalmitoilglicerol y fructosa (Figura 1 A). La abundancia de este azúcar, en combinación con menor contenido de ácidos orgánicos, pueden denotar un fruto más dulce en su punto de cosecha que los de las otras dos variedades.

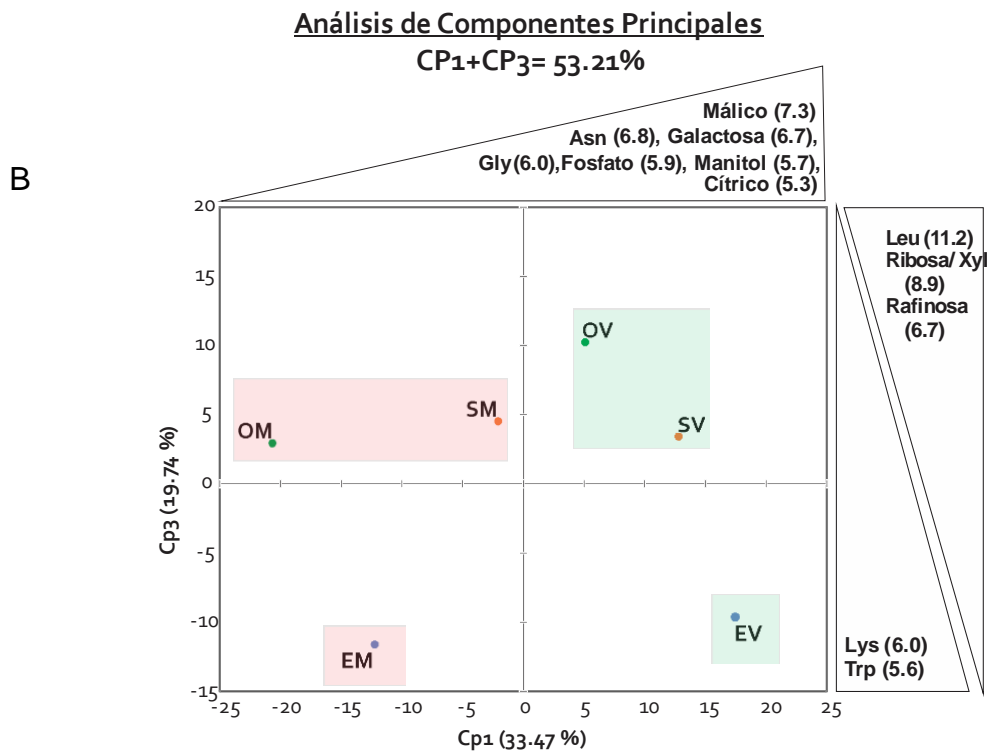
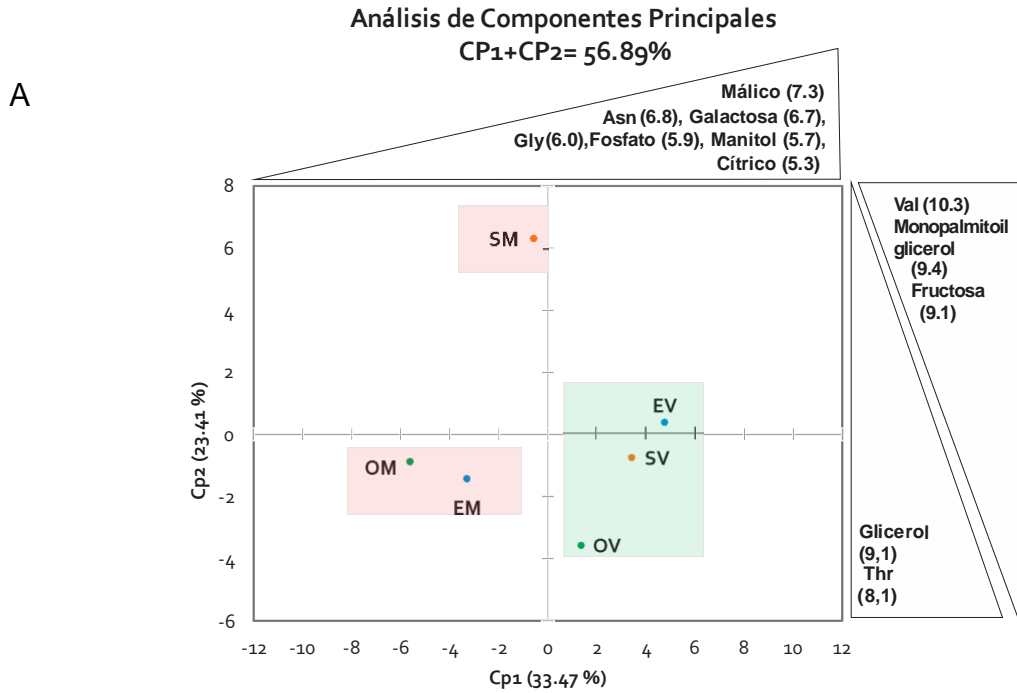


Figura 1. Análisis de componentes principales de metabolitos de tres variedades de arándanos verdes y maduros. **A-** contribución de las Cp1 y Cp2. **B-** contribución de las Cp1 y Cp3. OV y OM: O'Neal verde y maduro; EV y EM: Emerald verde y maduro;



SV y SM: Snowchaser verde y maduro. Los números al lado de cada metabolito indican la contribución de cada uno a la componente correspondiente en porcentaje.

El incremento en contenido de monopalmitoilglicerol, podría estar vinculada a reordenamientos en las membranas celulares, aunque es necesario un estudio más detallado de otras especies lipídicas para reforzar esta hipótesis. Notablemente, la Cp3 separa S y O de E en ambos estadios madurativos, según mayor abundancia en las dos primeras de leucina, ribosa/xilosa y rafinosa, y menor contenido de lisina y triptofano (Figura 1 B).

La rafinosa es un azúcar con roles de señalización y función antioxidante, que ha sido vinculado con la tolerancia al frío (Nishizawa et al, 2008). Las variaciones en azúcares neutros, como arabinosa y xilosa, pueden asociarse con el metabolismo de pared celular, al igual que los mayores niveles de actividad PME (Tabla 1) en los frutos verdes de S y O. Estas variaciones pueden deberse tanto a una mayor degradación de la pared como a reordenamientos en la misma (Vicente et al, 2007). Se ha informado que la presencia de un mayor contenido de azúcares neutros en las pectinas, las harían menos disponibles a las enzimas degradativas como las poligalacturonasas (Manganaris, 2007) y que, al mismo tiempo, la actividad PME en determinadas etapas madurativas, es necesaria para la incorporación de calcio y el refuerzo de la pared (Balic et al, 2014).

La actividad PME en el estadio maduro no presentó diferencias significativas entre variedades (Tabla 1), mientras que entre los frutos verdes de las tres variedades la diferencia es acentuada. En efecto, en E dicha actividad es 4 veces menor a la observada en S y 7 veces menor a la de O. Además, dentro de cada variedad, en el estadio maduro, en E se incrementa 4 veces la actividad PME, mientras en O, la misma disminuye a la mitad de su valor en fruto verde. Además de esta enzima, otras actividades como de poligalacturonasas, pectatoliasas y α -galactosidasas, contribuyen a la degradación/reorganización de la pared celular. La medición de estas enzimas en otras etapas de maduración, así como la disponibilidad de calcio durante las mismas, puede ayudar a establecer los factores que determinan la mayor firmeza en los frutos de E, aunque las diferencias observadas en actividad PME avalarían un rol de la misma.

Tabla 1. Actividad PME (área/ μ g de prot). Las medidas se realizaron en pectoplate. Se registró el área del halo correspondiente al rojo de rutenio (reacciona con pectinas demetiladas) en cm^2 y se normalizaron los valores por μ g de proteína total. Entre paréntesis, las letras en minúscula expresan diferencias o similitudes dentro de cada variedad, las mayúsculas entre variedades.

Estadio\Variedad	Emerald	Snowchaser	O'Neal
Verde	0.46 \pm 0.11 (a, B')	2.06 \pm 0.47 (a, A')	3.34 \pm 0.84 (a, C')
Maduro	1.94 \pm 0.16 (b, A)	1.56 \pm 0.15 (a, A)	1.44 \pm 0.63 (b, A)

Considerando los niveles totales de aminoácidos, no hubo diferencias significativas dentro de las variedades para los frutos verdes o maduros. Sin embargo, los frutos



verdes de E presentaron niveles significativamente mayores a los de O, evidenciando un mayor recambio de proteínas en la primera (Figura 2).

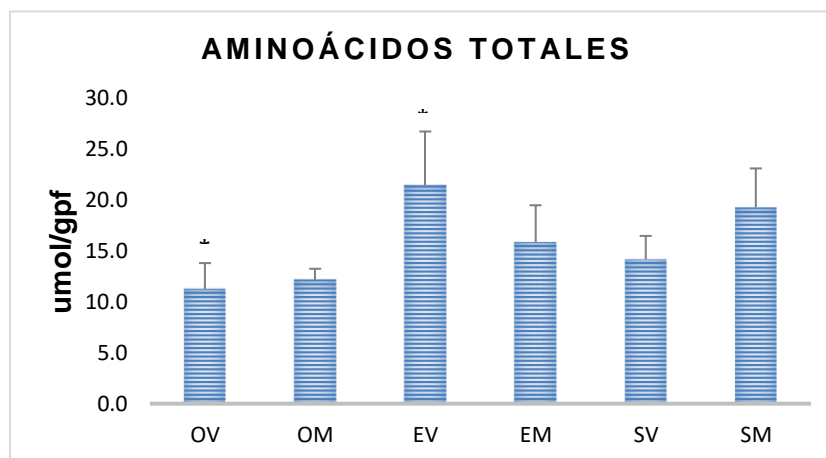


Figura 2. Contenido de aminoácidos totales en variedades de arándanos. OV y OM: O'Neal verde y maduro; EV y EM: Emerald verde y maduro; SV y SM: Snowchaser verde y maduro. Los asteriscos indican diferencias significativas.

Por otra parte, se compararon los niveles de los metabolitos que presentaron mayor variación en frutos maduros mediante un mapa de calor (heatmap), agregando al análisis los datos de niveles de fenólicos totales, actividad PME y firmeza (Figura 3). Tras ese estudio, fue posible vincular a E y S, separándola de O. Los metabolitos que más contribuyeron a esa diferencia fueron: prolina, hidroxiprolina, triptofano, sacarosa, cítrico, galactosa con mayores niveles en S y E; mientras que el contenido de shikímico fue mayor en O.

Otros metabolitos como fosfato, aspártico, 3-cafeoil-quínico, rafinosa, monopalmitoilglicerol y arginina, fueron mayores en S que en las otras dos variedades.

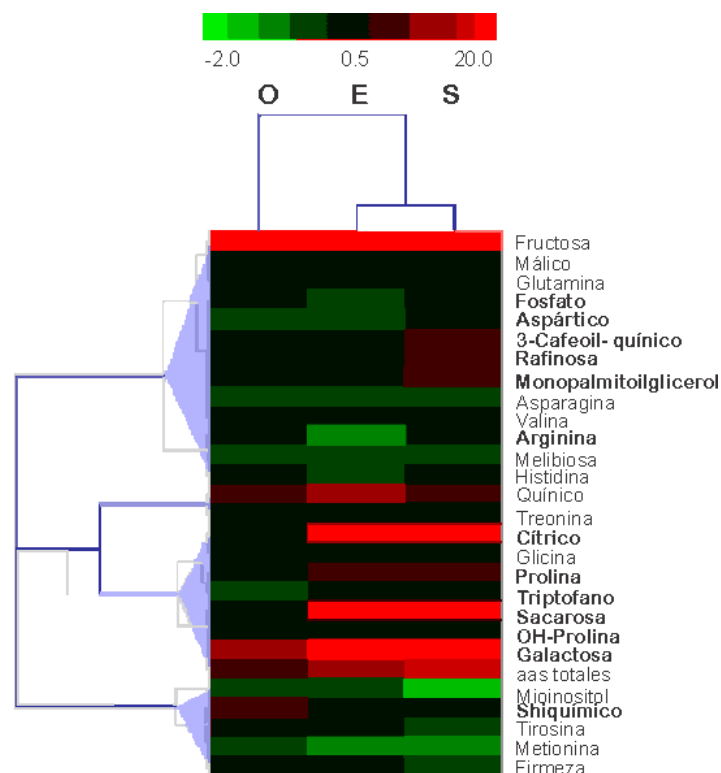


Figura 3. Mapa de calor (Heatmap) comparativo de los metabolitos con mayor diversificación en las tres variedades de arándanos en estudio.

Además de su conocido rol como osmoprotector o vinculada a varios tipos de estrés abiótico en plantas, la prolina, así como la hidroxiprolina, son constituyentes de una superfamilia de proteínas glicosiladas de la pared celular (Kishor et al, 2015). Estas proteínas poseen roles variables en el metabolismo de la pared, desarrollo, señalización y defensa (Hijazi et al 2014). La galactosa es uno de los constituyentes mayoritarios de estas glicoproteínas, siguiendo en orden de importancia la arabinosa y xilosa (Hijazi et al 2012). Se especula que se formarían redes entre proteínas y polisacáridos que reforzarían la pared y controlarían la porosidad de la misma según el grado de glicosilación y entrecruzamiento. La galactosa es también un producto de degradación de la rafinosa. Los aminoácidos y azúcares detectados corresponden a los libres (no se realizó hidrólisis previa), por lo cual indicarían una mayor degradación y/o reordenamiento de algunos componentes de la pared celular en estas variedades. El ácido shikímico es precursor de aminoácidos aromáticos y de varios fenilpropanoides (vía de los flavonoides y síntesis de lignina), un mayor contenido del mismo en O podría estar relacionado con una menor derivación del shikímico hacia las vías mencionadas en esta variedad.



Conclusiones

El tiempo que transcurre desde que los frutos de arándano son cosechados y transportados hasta su llegada al consumidor, en su mayor parte como fruto fresco, puede ser de varios días. Durante este período, la calidad de los frutos puede mermar debido a diferentes factores como pérdida de agua, infecciones fúngicas y ablandamiento. El comportamiento de los frutos difiere según la variedad, y en lo que hace a la firmeza del mismo, varios factores inciden en su determinación. En este trabajo se presentan los resultados iniciales de un estudio del metaboloma en tres variedades cultivadas en la zona de Concordia (Entre Ríos), con distinto grado de firmeza. Se ha podido observar que la variedad más firme, E posee menor actividad PME en el fruto verde respecto del maduro, mientras que en la variedad menos firme, O, ocurre lo contrario. Además, en la primera hay menor contenido de xilosa libre en ambos estadios, lo que evidenciaría una menor porosidad de la pared celular, y así, menor susceptibilidad a las enzimas degradativas. Esta y otras diferencias en contenidos de aminoácidos, lípidos, compuestos fenólicos y azúcares, requieren un estudio exhaustivo, vinculado también al proteoma diferencial, para dilucidar las vías metabólicas que podrían estar relacionadas con la firmeza. Las perspectivas son analizar también otros dos estadios de maduración (cuajado y pintón), las proteínas mediante técnicas de shotgun, las actividades de otras enzimas involucradas en el metabolismo de pared y los niveles de calcio en frutos de arándanos. Se espera que estos hallazgos permitan establecer ciertos estándares para poder comparar variedades autóctonas y desarrollar métodos adecuados de fertilización y tratamiento poscosecha de arándanos.

Referencias

- BALIC, I., EJSMENTEWICZ, T., SANHUEZA, D., SILVA, C., PEREDO, T., OLMEDO, P., & Prieto, H. (2014). Biochemical and physiological study of the firmness of table grape berries. *Postharv. Biol. Technol.*, 93, 15-23.
- CONDE, A., REGALADO, A., RODRIGUES, D., COSTA, J. M., BLUMWALD, E., CHAVES, M. M., & GERÓS, H. (2014). Polyols in grape berry: transport and metabolic adjustments as a physiological strategy for water-deficit stress tolerance in grapevine. *Exp. Bot.*, 66(3), 889-906.
- HIJAZI, M., DURAND, J., PICHEREAUX, C., PONT, F., JAMET, E., AND ALBENNE, C. (2012). Characterization of the arabinogalactan protein 31 (AGP31) of *Arabidopsis thaliana*: new advances on the Hyp-O-glycosylation of the Pro-rich domain. *J. Biol. Chem.* 287, 9623–9632. doi: 10.1074/jbc.M111.247874
- HIJAZI, M., VELASQUEZ, S. M., JAMET, E., ESTEVEZ, J. M., & ALBENNE, C. (2014). An update on post-translational modifications of hydroxyproline-rich glycoproteins: toward a model highlighting their contribution to plant cell wall architecture. *Front.Plant Sci.*, 5.
- KISHOR, P. B. K., KUMARI, P. H., SUNITA, M. S. L., & SREENIVASULU, N. (2015). Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Front.Plant Sci.*, 6.



LIONETTI, V. (2015). PECTOPLATE: the simultaneous phenotyping of pectin methylesterases, pectinases, and oligogalacturonides in plants during biotic stresses. *Front.Plant Sci.*, 6.

MANGANARIS, G. A., VASILAKAKIS, M., DIAMANTIDIS, G., & MIGNANI, I. (2007). The effect of postharvest calcium application on tissue calcium concentration, quality attributes, incidence of flesh browning and cell wall physicochemical aspects of peach fruits. *Food Chem.* 100(4), 1385-1392.

NISHIZAWA, A., YABUTA, Y., & SHIGEOKA, S. (2008). Galactinol and raffinose constitute anovel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.*, 147,1251–1263.

ROESSNER, U., WAGNER, C., KOPKA, J., TRETHERWEY, R. N., & WILLMITAER, L. (2000). Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. *Plant J.*, 23(1), 131-142.

SAEED AI, SHAROV V, WHITE J, LI J, LIANG W, BHAGABATI N, BRAISTED J, KLAPA M, CURRIER T, THIAGARAJAN M, STURN A, SNUFFIN M, REZANTSEV A, POPOV D, RYLTSOV A, KOSTUKOVICH E, BORISOVSKY I, LIU Z, VINSAVICH A, TRUSH V, QUACKENBUSH J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*. 2003 Feb; 34(2):374-8.

SINGAB, A. N., AYOUB, N., AL-SAYED, E., MARTISKAINEN, O., SINKKONEN, J., & PIHLAJA, K. (2011). 4. Phenolic Constituents of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, with Potential Antioxidant and Cytotoxic Activities. *Rec. Nat. Prod.*,5(4), 271.

VICENTE, A. R., SALADIE, M., ROSE, J. K., & LABAVITCH, J. M. (2007). The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. *J. Sci.Food Agric.ulture*, 87(8), 1435-1448.



La sobreexpresión del CBM de la expansina 1 de tomate modifica la firmeza y la susceptibilidad a *Botrytis cinerea*

Perini M. ^(1,2), Sin I. ⁽¹⁾, Villarreal N. ⁽⁴⁾, María M. ⁽⁴⁾, Powell A. ⁽³⁾, Martínez G. ⁽⁴⁾, Civello M. ^(1,2)

(1) Instituto de Fisiología Vegetal (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina.

(2) Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

(3) Plant Sciences Department, University of California, Davis. CA 95616. USA.

(4) Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-INTECH-UNSAM), Chascomús, Argentina.

Dirección de e-mail: perini1987@gmail.com

Resumen

La firmeza es uno de los principales determinantes de la calidad poscosecha y está determinada por la resistencia mecánica impuesta por la pared celular. Las expansinas (proteínas sin actividad hidrolítica conocida) están implicadas en el desmantelamiento, no hidrolítico, de las paredes celulares vegetales. Dichas proteínas poseen una organización modular compuesta por un dominio catalítico putativo y un módulo de unión a carbohidratos (CBM). El CBM actuaría anclando a la expansina a la superficie de la celulosa, mientras que el dominio catalítico putativo interactuaría con las hemicelulosas en la superficie de las microfibrillas provocando la ruptura de los enlaces no covalentes, principalmente puentes de hidrógeno, existentes entre la celulosa y las hemicelulosas de la matriz. En el presente trabajo, se sobreexpresó de manera constitutiva el CBM de la expansina 1 de tomate (CBM-SIEXPA1), en la pared celular de plantas de tomate, siendo ésta la primera vez que un CBM se sobreexpresa en un fruto destinado a controlar la degradación de la pared celular y el ablandamiento del fruto. Los frutos de las plantas transgénicas presentaron un aumento en el contenido de pared celular y un aumento del contenido de acidez titulable en estadios intermedios de madurez fisiológica. Asimismo, fueron menos susceptibles a la infección por *B. cinerea*, y el crecimiento "in vitro" del hongo en medios suplementados con residuos insolubles en alcohol de pared celular del pericarpio de los frutos transgénicos fue menor que los controles (WT y acigotas). Se concluye que la sobreexpresión de un CBM en la pared celular sería una estrategia factible de utilizar para aumentar la vida poscosecha de frutos carnosos, como lo es el tomate, sin alterar el crecimiento de la planta.

Palabras Claves: tomate, CBM, poscosecha, expansinas, firmeza



Introducción

En Argentina, el tomate (*Solanum lycopersicum*) es la quinta hortaliza a nivel de producción, siendo el cinturón hortícola de la ciudad de La Plata uno de los principales productores de tomate fresco para consumo de la Pcia. de Buenos Aires. Un aspecto clave para optimizar el aprovechamiento de la producción es mejorar los aspectos ligados a la conservación poscosecha. El ablandamiento que se produce durante la maduración de los frutos carnosos es uno de los principales actores determinantes de su calidad y vida poscosecha. La firmeza del fruto depende de varios factores, incluyendo la rigidez mecánica determinada por la pared celular vegetal (Harker et al., 1997). La misma es una red de microfibrillas de celulosa incrustadas en una matriz compleja de pectinas y hemicelulosas. Durante la maduración del fruto, la acción combinada de proteínas y enzimas hidrolíticas producen la reducción, solubilización y la despolimerización de los componentes polisacáridos del pericarpio de la pared celular (Brummell, 2006). Se ha postulado que las expansinas causan la relajación de la estructura de la pared celular (debilitando las interacciones no covalentes entre la celulosa y las hemicelulosas) y de ese modo facilitan el acceso de otras enzimas a sus sustratos (Cosgrove, 2000).

A través de diversos estudios de los patrones de expresión y acumulación, a nivel de ARNm, se ha propuesto que las expansinas participan en modificaciones de la pared celular vegetal en diferentes momentos del crecimiento y desarrollo de una planta y durante el ablandamiento de un fruto (Cosgrove, 2000). En tomate se han reportado 38 genes de expansinas de los cuales seis de ellos se expresan en el fruto, siendo SIEXPA1 el que se destaca por sus características particulares asociadas a la maduración del fruto (Lu et al., 2015). Rose et al., (1997) identificaron a esta α -expansina específica del fruto en tomate, la cual se acumula durante la maduración a partir del estadio pintón (aparición de color anaranjado). Se ha informado que la supresión de la expresión de SIEXPA1 en tomate provocó la generación de frutos más firmes en relación a los controles acigotas a lo largo de la maduración, mientras que la sobreexpresión de dicho gen dio origen a frutos significativamente más blandos (Brummell et al., 1999). Asimismo, la supresión conjunta de SIEXPA1 y poligalacturonasa de *S. lycopersicum* en frutos de tomate permitió obtener frutos con menor susceptibilidad a *B. cinerea* (Cantu et al., 2008).

La estructura de la mayoría de las proteínas implicadas en el metabolismo de la pared celular posee una organización modular; incluyen un dominio catalítico putativo y uno o más módulos de unión a carbohidratos (CBM), unidos por una cadena no estructurada (Shoseyov et al., 2006). Un CBM se define como una secuencia de aminoácidos contigua dentro de una enzima con actividad sobre carbohidratos, con plegamiento predicho y capacidad de unirse a carbohidratos (Coutinho y Henrissat, 1999). En plantas, la presencia de CBMs putativos ha sido descrita en endoglucanasas (Levy and Shoseyov, 2002), α -L-arabinofuranosidasas (Sin et al., 2016) y expansinas (Nardi et al., 2015; Yennawar et al., 2006). La sobreexpresión de CBMs en diversos sistemas vegetales, provocan cambios en los fenotipos de estas plantas (Nardi et al., 2015; Safra-Dassa et al., 2006).

Por ello, se decidió sobreexpresar, de forma constitutiva, el CBM correspondiente a la expansina 1 de tomate, SIEXPA1, en la pared celular vegetal, teniendo como hipótesis que esto reduciría el acceso de expansinas endógenas y de otras enzimas a sus



sustratos, causando una reducción general en la degradación de la pared celular, y por lo tanto en el ablandamiento.

Materiales y Métodos

Transformación, generación y caracterización genotípica de las plantas

Para la generación del vector de interés con el inserto correspondiente, se empleó la tecnología de recombinación Gateway. Se empleó el vector binario, pK7WG2D.1, que conduce la expresión constitutiva del gen de interés bajo el promotor del virus del mosaico del coliflor (CaMV-P35S). Las especificaciones de la obtención de las plantas sobreexpresantes del CBM-SIEXPA1 en la pared celular de tomate que se emplearon para la realización del siguiente trabajo, se describen en Perini et al. (2017).

Para la caracterización genotípica de las plantas se emplearon frutos en el estadio de madurez pintón (Pi). Como gen de referencia se usó el gen del factor de elongación α 1 (SIEf1 α , Solyc06g005060) descrito en Pombo et al. (2014). Para el gen de interés (P35S-CBM-SIEXPA1) los cebadores específicos usados fueron: P35S-CBM-SIEXPA1 (directo): 5'-GCGGCCG CACTAGTGATA-3' (este cebador se diseñó sobre el 5'UTR de la secuencia de ADNc del promotor P35S) y P35S-CBM-SIEXPA1 (reverso): 5'TGCACCTGCTACATTCGTGA-3'. Estos cebadores se emplearon para verificar la integridad del ADNc obtenido (SIEf1 α) y luego determinar la presencia del transgen, de modo de poder clasificar las plantas como acigotas o sobreexpresantes del gen de interés (CBM-SIEXPA1).

Material vegetal y condiciones de cultivo

Las plantas de tomate fueron cultivadas en un invernadero bajo condiciones de luz natural y temperatura controlada (16-27 °C) en la ciudad de La Plata (Buenos Aires, Argentina) en macetas de 10 L en tierra:perlita (3:1) como sustrato. Para la clasificación de los estadios de madurez de los frutos se siguieron los siguientes criterios: Verde Maduro (VM), fruto desarrollado con piel completamente verde con tonalidades claras u oscuras; Pintón (Pi), hasta 20% de la superficie del fruto con colores amarillos y anaranjados a rojos; Rojizo (R), hasta 60% de la superficie del fruto con colores amarillo, anaranjado a rojos; Maduro (M), hasta 90% de la superficie del tomate con colores rosados o rojo.

Acidez titulable y pH

Frutos de tomate en cuatro diferentes estadios de madurez: (VM, Pi, R y M) con un peso comprendido entre 25 y 35 g, de plantas WT, acigotas y sobreexpresantes, se diseccionaron, trozaron y congelaron en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Cinco gramos de frutos pulverizados se resuspendieron en 50 mL de agua destilada. El pH del homogeneizado se midió y el contenido de ácidos se determinó por titulación con NaOH 0,05 M hasta pH 8,2 (AOAC 981.12, 1998) utilizando un pHmetro Oakton (pH serie 1100). Las mediciones se realizaron por triplicado y la acidez titulable se expresó como mili-moles de H⁺ kg⁻¹ de fruto fresco.



Aislamiento de polisacáridos de la pared celular

Los polisacáridos totales de la pared celular se obtuvieron como residuo insoluble en alcohol (RIA) de acuerdo con Rosli et al., (2004) con algunas modificaciones. Aproximadamente 2,5 g de frutos (exocarpio y mesocarpio) en diferentes estadios de madurez (VM, Pi, R y M), previamente pulverizados con nitrógeno líquido, se homogeneizaron con 10 mL de etanol absoluto y la mezcla se hirvió (85 °C) a reflujo durante 30 min. Los homogeneizados se filtraron y los residuos sólidos se lavaron tres veces con 5 mL de etanol absoluto. Posteriormente, se secaron durante toda la noche a 37 °C y se pesaron con una balanza analítica de precisión. El RIA total se expresó como mg RIA por cada 100 mg de tejido (mg RIA 100 mg⁻¹fruto). Los RIA se obtuvieron a partir de tres tandas de frutos independientes.

Análisis de infección de B. cinerea y su tasa de crecimiento en placa

El estudio se realizó en frutos de plantas WT, acigotas (C22-P4) y transgénicas (C22-P2; C22-P5; C73-P4; C93-P3; C103-P2; C103-P3). Se usó la cepa B05.10 de *Botrytis cinerea* (Colección de cultivos fúngicos IIB-INTECH IFCC 458/02) en todos los experimentos.

Ensayos in vivo: Antes de la inoculación, se cultivó el micelio en medio Czapek-Dox sólido (50 g de glucosa, 2 g de NaNO₃, 1 g de KH₂PO₄, 0,5 g de MgSO₄.7H₂O, 0,5 g de KCl, 0,05 g de FeSO₄.7H₂O, 20 g de agar, pH = 5,5- 6.0) a 24 °C. Las placas se mantuvieron de 7 a 10 d en la oscuridad a temperatura ambiente para la esporulación. Para los ensayos de susceptibilidad, los conidios se cosecharon con agua estéril que contenía Tween-20 al 0,02% (v/v) y luego se filtraron y los conidios se contaron con un hemocitómetro. La concentración de inóculo se ajustó a 2 x 10⁴ conidios por mL con medio PDB, suplementado con 10 mM de sacarosa y 10 mM de KH₂PO₄. Los conidios se incubaron durante 2-3 horas a temperatura ambiente sin agitación antes de las inoculaciones (Flors et al., 2007). Para la inoculación, se colocaron cuatro gotas de 10 µL sobre la superficie superior no dañada de cada fruto. Se usaron de 3-6 frutos VM, R y M, de plantas WT, acigota y transgénicas. Los frutos se colocaron en una cámara de crecimiento a 22 °C en la oscuridad, y después de 1, 2, 4 y 7 d post inoculación se fotografiaron con una cámara digital y se evaluaron las lesiones.

Ensayo in vitro: Los polisacáridos de pared celular fueron extraídos como residuos insolubles en alcohol (RIA) tal como se explicó anteriormente. Para ello, se usó únicamente el mesocarpio del fruto, el cual se cortó, congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Se usaron 5 gramos de fruto R congelado para realizar la extracción. Una vez culminada la extracción, el residuo se secó y se pesó para evaluar la cantidad de RIA resultante. Para el ensayo, se transfirió un tapón de agar de 4 mm² de un cultivo activo de 5 d de edad de *B. cinerea* a las placas solidificadas con agar al 0,8% (p/v), 0,1mg mL⁻¹ de RIA de fruto. Las placas se cultivaron a 24 °C y se midió el área superficial de crecimiento de hongos en la placa después de 24, 48 y 72 h. Se utilizaron 3 extracciones de RIA independientes para cada genotipo de planta y se realizaron 3 réplicas técnicas. Las áreas superficiales del crecimiento del micelio de *B. cinerea* en las placas se midieron usando el software Image-Pro®Plus (Media Cybernetics Inc., San Diego, CA).



Resultados y Discusión

Con el fin de evaluar en detalle todos los efectos de la sobreexpresión del *CBM-SIEXPA1* las plantas transformadas se cultivaron durante dos generaciones, y la presencia de la expresión, a nivel de ARNm, de *CBM-SIEXPA1* se identificó en frutos en estadio Pintón (Figura 1). De las 24 plantas analizadas de la segunda generación, 17 resultaron ser positivas para la expresión del mismo (C22-P1, P2, -P3, -P5; C52-P4, -P5; C73-P3, -P4, -P5; C93- P1, -P2, -P3, -P4, -P5; C103-P2, -P3 y -P4), y éstas fueron identificadas como plantas transgénicas.

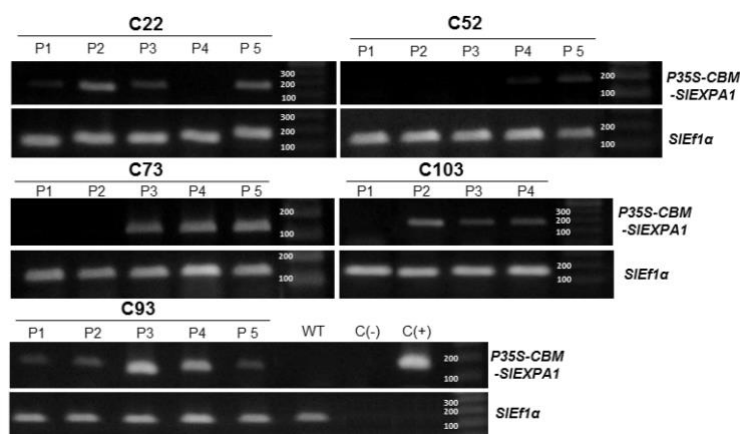


Figura 1. Expresión del gen de interés por RT-PCR en líneas transgénicas seleccionadas.

C22, C52, C73, C93 y C103 indican diferentes eventos de transformación y P1 a P5 indican diferentes plantas por evento. Tipo salvaje (WT); control negativo de RT-PCR (C (-)); control positivo de RT-PCR (C (+)). La RT-PCR generó un amplicón de 182 pb para el gen de interés y de 110 pb para el gen control de referencia.

Efecto de la sobreexpresión del CBM-EXPA1 sobre la acidez titulable

Los cambios de la calidad organoléptica de un fruto a medida que progresa la maduración pueden ser evaluados a través de la medida de una serie de parámetros fisicoquímicos. En tomate, algunos de esos parámetros son el pH, la acidez titulable, el contenido de sólidos solubles, entre otros (Klee y Giovannoni, 2011).

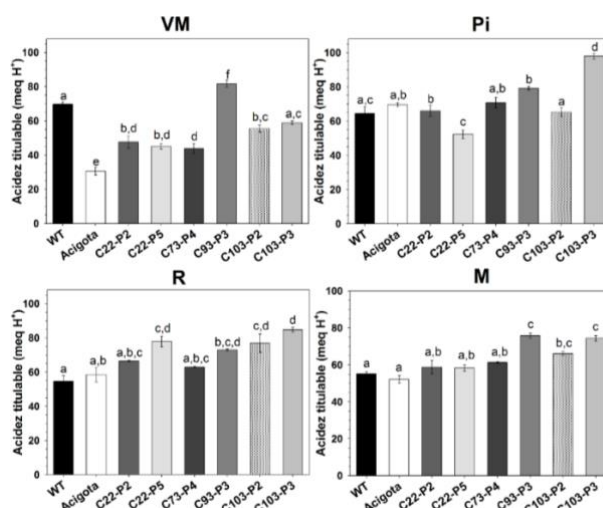


Figura 2. Cambios en la acidez titulable de frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del CBM-SIEXPA1 durante la maduración.

Los datos corresponden a la media \pm ES de 3 determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre frutos en un mismo estadio de madurez.

Los frutos sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1* presentaron un aumento de acidez titulable hacia los últimos estadios de madurez (Pi-M) en comparación con los frutos control (WT y acigota) mientras que no se observaron cambios en pH ni en el contenido de azúcares totales (datos no mostrados). Los perfiles de variación de los mismos fueron coincidentes con los que ya han sido descritos en tomate (la acidez titulable disminuye a medida que progresa la maduración, Heyes y Lugasi, 2006), El retraso en la caída de acidez podría deberse a un retraso madurativo de los frutos en planta para un mismo estadio de madurez fisiológico (figura 2).

Efecto de la sobreexpresión del CBM-SIEXPA1 en el contenido de pared celular

La arquitectura de la pared celular y los polímeros que la componen, se modifican progresivamente durante la maduración, variando la naturaleza o extensión de los mismos (solubilización y depolimerización) (Jarvis, 1984). En el caso de frutos carnosos, como el tomate, el contenido de RIA disminuye a medida que los frutos maduran. Este comportamiento fue observado para los frutos de todas las plantas ensayadas (Figura 3). Para el caso de los frutos controles, se observó que el contenido de RIA disminuyó del estadio VM a Pi para luego mantenerse constante en los siguientes estadios de madurez. En el caso de las plantas transgénicas, a excepción de los frutos de la planta C93-P3 la cual presentó un descenso muy leve, se observó que el descenso en el contenido de RIA fue más escalonado e incluso en algunos casos el descenso se observó a partir del estadio Pi (C22-P2, C103-P2, C103-P3). Del análisis del contenido de RIA por estadio de madurez (análisis estadístico no mostrado), se observa que, hacia los estadios de madurez más avanzados (R, M) el contenido de pared celular de los frutos transgénicos es mayor que en los controles



(WT y acigota). Resultados similares se obtuvieron del análisis del contenido de pared celular de hojas y tallos de plantas de *A. thaliana* sobreexpresantes del *CBM-FaEXPA2*, siendo el contenido de RIA de las plantas sobreexpresantes mayor respecto a plantas WT (Nardi et al., 2015). Esto indica que la sobreexpresión de CBMs provocaría un retardo en la degradación de los componentes de la pared celular.

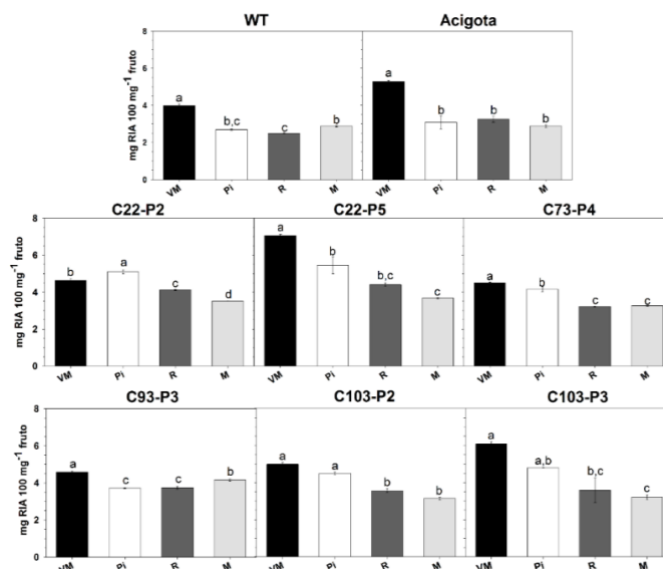


Figura 3. RIA en frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del CBM-SIEXPA1.

Los datos corresponden al contenido medio de RIA \pm ES de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de una misma planta.

Efecto de la sobreexpresión de CBM-SIEXPA1 sobre la susceptibilidad a la infección por B. cinerea

B. cinerea es uno de los hongos patógenos de tipo necrófago más estudiado, responsable de la enfermedad del moho gris y un contribuyente significativo a la descomposición poscosecha de los frutos carnosos. La infección de frutos frescos con conidios del hongo indicó que los frutos sobreexpresantes son menos susceptibles al crecimiento del patógeno (Tabla 1).



Tabla 1. Síntomas de infección sobre frutos sanos inoculados.

Frutos	Tiempo (DPI)			
	1	2	4	7
WT	+/-	+	++	++
Acigota	+/-	+	++	++
C73-P4	-	-	+/-	+
C93-P3	+/-	+/-	+	+
C103-P3	-	+/-	+	+

Diferentes grados de daño: (-), sin síntomas de infección; (+/-), insipiente lesión sobre zona de infección; (+), lesión húmeda sobre zona de inoculación; (++) , lesión húmeda sobre zona de inoculación y síntomas de putrefacción.

Por su parte, el cultivo "in vitro" de *B. cinerea* sobre medios conteniendo la misma cantidad de RIA de plantas controles y transgénicas, como única fuente de carbono, indicó que el hongo crecía menos con RIAs de plantas transgénicas como sustrato (Figura 4). De este modo, el menor crecimiento del hongo sobre RIAs provenientes de frutos transgénicos puede atribuirse a la presencia de una pared celular más íntegra. Un resultado similar fue descrito en hojas de *A. thaliana* sobreexpresantes del *CBM-FaEXPA2*, las cuales eran menos susceptibles al crecimiento de dicho hongo con relación a hojas WT. Un resultado contradictorio fue descrito en el caso de frutos de tomate que tenían suprimido el gen de *SIEXPA1*. Brummell, et al., (2002) determinaron la presencia de lesiones más grandes de la enfermedad en frutos que poseían a *SIEXPA1* suprimida cuando fueron expuestos a *B. cinerea* y a *A. alternata*. De otro modo, frutos de tomate con supresión simultánea de *SIEXPA1* y *SIPG*, el gen de la poligalacturonasa asociada a la maduración, fueron menos susceptibles a la infección por *B. cinerea* que los controles (Cantu et al., 2008).

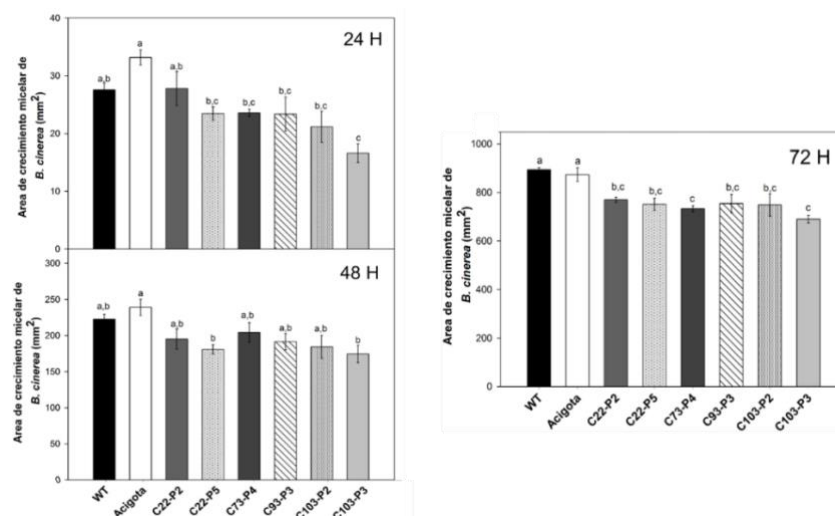


Figura 4. Crecimiento de *B. cinerea* en placas



Los datos corresponden al área de crecimiento del micelio de *B. cinérea* +/- ES de tres determinaciones independientes. Los resultados se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Las letras indican diferencias estadísticas significativas.

Conclusiones

La sobreexpresión de un CBM de expansina en la pared celular sería una estrategia factible de utilizar para retrasar el ablandamiento y aumentar la vida poscosecha del tomate, y posiblemente de otros frutos carnosos.

Referencias

- AOAC. (1998). Official Methods of Analysis, 16thed. AOAC International. Gaithersburg, USA.
- BRUMMELL, D., 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit, en: *Functional Plant Biology*. 33:103–119.
- BRUMMELL, D., HOWIE, W., MA, C., DUNSMUIR, P., 2002. Postharvest fruit quality of transgenic tomatoes suppressed in expression of a ripening-related expansin. , en: *Postharvest Biology and Technology*. 25:209–220.
- BRUMMELL, D., HARPSTER, M., CIVELLO, P., PALYS, J., BENNETT, A., DUNSMUIR, P., 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening, en: *Plant Cell*. 11:2203–2216.
- CANTU, D., VICENTE, A., LABAVITCH, J., BENNETT, A., POWELL, A., 2008. Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends Plant Science*. 13:610–617.
- COSGROVE, D., 2000. Loosening of plant cell walls by expansins, en: *Nature*. 407:321–326.
- COUTINHO, P., HENRISSAT, B. (1999). In Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach, en: *The Royal Society of Chemistry*. 3–12.
- FLORS, V., LEYVA, M., VICEDO, B., FINITI, I., REAL, M., GARCÍA-AGUSTÍN, P., BENNETT, A., GONZÁLEZ-BOSCH, C., 2007. Absence of the endo- β -1,4-glucanases Cel1 and Cel2 reduces susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato, en: *Plant Journal*. 52:1027–1040.
- HARKER, F., REDGWELL, R., HALLETT, I., MURRAY, S., CARTER, G., 1997. Texture of fresh fruit, en: *Horticultural Review (Am. Soc. Hortic. Sci)*. 20:121–224.
- HELYES, L., LUGASI, A. (2006). Formation of certain compounds having technological and nutritional importance in tomato fruits during maturation, en: *Acta Alimentaria*. 35:183–193.
- JARVIS, M.C., 1984. Structure and properties of pectin gels in plant-cell walls, en:



Plant Cell and Environment. 7:153–164.

KLEE, H.J., GIOVANNONI, J.J., 2011. Genetics and Control of Tomato Fruit Ripening and Quality Attributes, en: *Annual Review of Genetics*. 45:41–59.

LEVY, I., SHOSEYOV, O., 2002. Cellulose-binding domains: Biotechnological applications, en: *Biotechnology Advances*. 20:191–213.

LU, Y., LIU, L., WANG, X., HAN, Z., OUYANG, B., ZHANG, J., LI, H., 2015. Genome-wide identification and expression analysis of the expansin gene family in tomato, en: *Molecular Genetics and Genomics*. 291:597–608.

NARDI, C., VILLARREAL, N., ROSSI, F., MARTÍNEZ, S., MARTÍNEZ, G., CIVELLO, P., 2015. Overexpression of the carbohydrate binding module of strawberry expansin2 in *Arabidopsis thaliana* modifies plant growth and cell wall metabolism, en: *Plant Molecular Biology*. 88:101–117.

PERINI, M., SIN, I., VILLARREAL, N., MARINA, M., POWELL, A., MARTÍNEZ, G., CIVELLO, P., 2017. Overexpression of the carbohydrate binding module from *Solanum lycopersicum* expansin 1 (Sl-EXP1) modifies tomato fruit firmness and *Botrytis cinerea* susceptibility, en: *Plant Physiology and Biochemistry*. 113:122–132.

POMBO, M., ZHENG, Y., FERNANDEZ-POZO, N., DUNHAM, D., FEI, Z., MARTIN, G., 2014. Transcriptomic analysis reveals tomato genes whose expression is induced specifically during effector-triggered immunity and identifies the Epk1 protein kinase which is required for the host response to three bacterial effector proteins, en: *Genome Biology*. 15:492.

ROSE, J., LEE, H., BENNETT, A. (1997). Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated, en: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:5955–5960.

ROSLI, H., CIVELLO, P., MARTÍNEZ, G., 2004. Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening, en: *Plant Physiology and Biochemistry*. 42:823–831.

SAFRA-DASSA, L., SHANI, Z., DANIN, A., ROIZ, L., SHOSEYOV, O., WOLF, S., 2006. Growth modulation of transgenic potato plants by heterologous expression of bacterial carbohydrate-binding module, en: *Molecular Breeding*. 17:355–364.

SHOSEYOV, O., SHANI, Z., LEVY, I., 2006. Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications, en: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70:283–95.

SIN, I., PERINI, M., MARTÍNEZ, G., CIVELLO, P., 2016. Analysis of the carbohydrate-binding-module from *Fragaria x ananassa* α -L-arabinofuranosidase 1, en: *Plant Physiology and Biochemistry*. 107:96–103.

YENNAWAR, N., LI, L., DUDZINSKI, D., TABUCHI, A., COSGROVE, D., 2006. Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m 1*), a beta-expansin and group-1 pollen allergen from maize, en: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103:14664–14671.



Efecto de la sobreexpresión de CBM-FaEXP2 en frutilla

Sin I. (1), Perini M. (1,2), Rosli H. (1), Nardi C. (3), Folta K. (4), Martínez G. (5), Civello M. (1,2)

(1) Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE, CONICET, UNLP), La Plata, Argentina.

(2) Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

(3) UNTDF, Ushuaia, Argentina.

(4) Horticultural Sciences Department, University of Florida, Gainesville, FL, Estados Unidos.

(5) Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-INTECH, UNSAM, Chascomús, Argentina.

Dirección de e-mail: sinignacio@gmail.com

Resumen

Uno de los factores determinantes de la calidad y vida poscosecha de frutos carnosos es su firmeza, impuesta en gran medida por la resistencia mecánica que ofrece la pared celular vegetal. El fenómeno del ablandamiento de frutos es un proceso altamente regulado en el que participan diversos actores en forma concertada y redundante. Las expansinas (EXPs) son proteínas no hidrolíticas relevantes en procesos donde es necesaria la relajación de la pared, tal como lo es el fenómeno de ablandamiento. Estas proteínas se caracterizan por presentar un módulo catalítico similar al de las glicosilhidrolasas (carente de actividad hidrolítica) y un módulo de unión a carbohidratos (CBM) con fuerte afinidad por celulosa. En el presente trabajo se analizó el efecto de la sobreexpresión del CBM de la expansina dos de *Fragaria x ananassa* (FaExpa2) sobre el ablandamiento del fruto, usando *Fragaria vesca* cv. Hawaii 4 como sistema modelo, bajo la hipótesis de que la expresión de una proteína con la capacidad de unirse a carbohidratos, pero carente de actividad hidrolítica sobre los mismos genera una competencia por el sustrato con el resto de las enzimas involucradas en el catabolismo de la pared celular, provocando una reducción global de la degradación de la pared celular. Se analizaron distintos parámetros de calidad, la actividad expansina y poligalacturonasa en frutos transgénicos sobreexpresantes de CBM-FaEXPa2.

Palabras clave: frutilla, CBM, firmeza

Introducción

Uno de los principales factores determinantes de la calidad y vida poscosecha de un fruto es su firmeza, influyendo tanto en el deterioro asociado a la manipulación como en la susceptibilidad a patógenos. La firmeza de un fruto está condicionada por varios factores, siendo uno de los principales la rigidez mecánica impuesta por la pared



celular (Harker, et al. 2010), constituida por una red de microfibrillas de celulosa inmersas en una compleja matriz de pectinas y hemicelulosas (Brummell y Harpster, 2001). Durante la maduración, la acción combinada de diferentes proteínas y enzimas que actúan sobre los componentes de la pared celular provoca su solubilización, depolimerización y una disminución en su contenido (Brummell, 2006). Las expansinas (EXPs) son proteínas no hidrolíticas relevantes para el metabolismo de la pared celular vegetal, principalmente en procesos donde es necesaria la relajación de la pared, tal como lo es el fenómeno de ablandamiento (Cosgrove et al., 2002). Estas proteínas se caracterizan por presentar un módulo catalítico similar al de las glicosilhidrolasas (carente de actividad hidrolítica) y un módulo de a carbohidratos caracterizado por presentar fuerte afinidad por celulosa.

Se han reportado estrategias en las que se ha intentado controlar el fenómeno de ablandamiento mediante la supresión de la expresión de un único gen, a través de distintas técnicas; sin embargo, si bien se consiguió reducir los niveles de expresión a nivel de ARNm a valores muy bajos, el efecto sobre el ablandamiento del fruto fue escaso (Brummell et al., 1999; Jiménez-Bermúdez et al., 2002; Quesada et al., 2009) o en muchos casos nulo (Brummell y Harpster, 2001; Xiong et al., 2005), probablemente debido el fenómeno de ablandamiento involucra la participación de numerosas enzimas que actúan simultánea o secuencialmente sobre los componentes de la pared celular.

Existen antecedentes en los que la sobreexpresión de un CBM en la pared celular vegetal se tradujo en un metabolismo alterado de la pared celular (Nardi et al., 2015; M. A. Perini et al., 2017). La expresión de una proteína con la capacidad de unirse a carbohidratos, pero carente de actividad hidrolítica sobre los mismos, generaría una competencia por el sustrato con el resto de las enzimas involucradas en el catabolismo de la pared celular, provocando una reducción global de la degradación de la pared celular.

El objetivo del trabajo fue utilizar al módulo de unión a carbohidratos de la expansina de *Fragaria x ananassa* (FaEXPa2) para controlar el fenómeno de ablandamiento usando *Fragaria vesca* cv. Hawaii 4 como sistema modelo. Se analizaron distintos parámetros de calidad, la actividad expansina y poligalacturonasa en frutos transgénicos sobreexpresantes de CBM-FaEXP2.

Materiales y Métodos

Generación de plantas transgénicas

Se siguió el diseño descrito por Nardi et al. (2015) en el armado de la construcción destinada a la sobreexpresión de la proteína recombinante CBM-FaEXP2 en la pared celular vegetal de *Fragaria vesca* H4. La secuencia codificante para el péptido tránsito se fusionó a la propia del módulo de unión a carbohidratos (CBM) en dos reacciones de PCR consecutivas (PCR1 y PCR2) usando cebadores específicos y un plásmido con el ADNc completo del gen FaExpa2 como molde (Figura 1). Se utilizó el sistema de recombinación GateWay® para generar los respectivos clones de entrada y de expresión con el producto de la PCR2 y reacciones BP y LR estándar, con los plásmidos pDONR221 y pK7WG2D respectivamente. El vector binario pK7WG2D tiene un gen de



resistencia al antibiótico kanamicina y el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) como marcadores de selección y, el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (P35S-CaMV) para dirigir la expresión del gen de interés.

El constructo pK7WG2D[CBM-FaEXP2], fue utilizado para transformar células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101, con las cuales se infectaron explantos de hoja de *F. vesca* H4 (PI551572) mediante co-cultivo y finalmente se regeneraron plantas transformadas por medio del cultivo “in vitro” de los tejidos transformados, siguiendo el protocolo descrito en Zhang et al. (2014).

Cebadores utilizados en la reacción PCR1:

- Cebador 1F: 5'-ggggacaagtttgtaaaaaaagcaggcttaatggctttacttcatgcttg-3';
- Cebador 1R: 5'-tgcccgtagtgatgaatctg atggcataggtgcctctga-3'.

Cebadores utilizados en la reacción PCR2:

- Cebador 2F: producto de PCR1;
- Cebador 2R: 5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtactagaattgaccgcctgaaaacgt-3'.

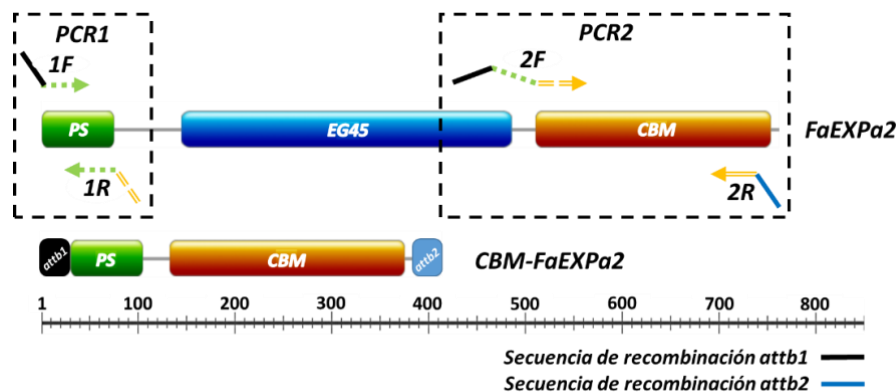


Figura 1. Armado de la construcción

Clasificación de los frutos

El cultivar *F. vesca* H4 presenta frutos que no desarrollan el color rojo característico de la mayoría de las variedades de frutilla durante la maduración, permaneciendo blancos durante el proceso de maduración. Se distinguieron 5 estadios de madurez fisiológica (Figura 2), en función de distintas características morfológicas de los frutos.

Chequeos moleculares

El chequeo de la transgénesis se realizó por medio RT-PCR a punto final. Se extrajo ARNm de frutos de *F. vesca* H4 en E3, tanto tipo salvaje (WT) como de los 7 eventos de transformación, utilizando el protocolo del CTAB modificado (Amaya et al., 2016). El ADNcopia se generó utilizando la transcriptasa reversa MMLV de Promega®, siguiendo las especificaciones del fabricante. Se utilizó un par de cebadores específicos para el gen de endoxilanasas como control endógeno y, cebadores específicos para el transgen para confirmar la transgénesis.



Firmeza del fruto

La firmeza se evaluó utilizando un Texturómetro TX.TAplus, Stable Micro System Texture Technologies®, Scarsdale, NY, equipado con una sonda Perspex cilíndrica de 25 mm de diámetro (código: P/25P) y una celda de carga de 30 kg (PL/CEL/30). Se realizó un ensayo de compresión, midiéndose la fuerza máxima en gr necesaria para generar una deformación del fruto de 0,5 mm. Se usaron las siguientes condiciones: modo del ensayo: compresión; velocidad pre-ensayo: 0,25 mm s⁻¹; velocidad durante el ensayo: 0,25 mm s⁻¹; velocidad post-test: 10 mm s⁻¹. Se midió la firmeza de 10 frutos de cada evento de transformación por estadio de madurez fisiológica.

Contenido de azúcares solubles en alcohol

Se hicieron extractos etanólicos de frutos tipo salvaje y de tres eventos transgénicos (CBM3, CBM4 y CBM5), en tres estadios de madurez (E3, E4 y E5). Frutos congelados se molieron en nitrógeno líquido, luego 1 g del polvo resultante se resuspendió en 6 mL de etanol absoluto. La mezcla se homogeneizó, se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C y se diluyó 1 mL del sobrenadante a 5 mL finales con agua destilada. El contenido de azúcares totales se determinó por el método de antrona, usando glucosa como patrón de referencia. Las medidas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como g de glucosa por kg de fruto.

Aislamiento de polisacáridos de la pared celular

Se analizó el contenido de pared celular en frutos de *F. vesca* H4 tipo salvaje y de tres eventos transgénicos (CBM3, CBM4 y CBM5), en cuatro estadios de madurez (E2, E3, E4 y E5). Los polisacáridos totales de pared celular se obtuvieron como residuo insoluble en alcohol (RIA) de acuerdo con d'AMOUR et al. (1993). Los resultados se expresaron como mg de RIA cada 100 mg de tejido.

Medida de actividad expansina total

Se midió la actividad expansina total en frutos de *F. vesca* H4 tipo salvaje y de tres eventos de transformación (CBM3, CBM4 y CBM5) en tres estadios de madurez (E3, E4 y E5). Los extractos proteicos y la determinación de la actividad expansina se realizaron de acuerdo con lo descrito en Perini et al. (2017).

Medida de actividad poligalacturonasa (PG)

Se midió la actividad PG en frutos de *F. vesca* H4 tipo salvaje y de 3 eventos de transformación (CBM3, CBM4 y CBM5) en tres estadios de madurez (E3, E4 y E5). La metodología utilizada se adaptó a la descrita por Nogata et al. (1993). Se preparó una mezcla de reacción conteniendo 350 µL de ácido poligalacturónico (0,3% p/v) disuelto en buffer acetato de sodio/ácido acético 0,05 M (pH 6,0), 350 µL de buffer acetato de sodio/ácido acético 0,05 M (pH 6,0) y 700 µL de extracto proteico. La cinética se llevó a cabo a 37 °C, tomándose alícuotas a las 0, 6, 12 y 24 h. El contenido de ácido galacturónico liberado se determinó siguiendo el protocolo descrito en Diaz et al.



(2007). Se realizó una curva de calibración utilizando cantidades variables de ácido galacturónico 1 mM (Fluka). La actividad PG se expresó como nmol de ácido galacturónico liberado por min y por kg de fruto.

Análisis Estadístico

Todos los resultados se analizaron mediante ANOVA por estadio de madurez fisiológica. En todos los casos las medias de los eventos transformados se compararon contra la media de frutos tipo salvaje mediante un test de Dunnett ($p < 0,05$).

Resultados y Discusión

Generación de Plantas Transgénicas y chequeos moleculares

Se consiguió regenerar siete eventos de transformación independientes a partir del cultivo *in-vitro* de tejidos, nombrados arbitrariamente CBM1 a CBM7. De acuerdo con los chequeos moleculares, todos los eventos resultaron ser transgénicos (Figura 2). Los mismos se propagaron por clonación mediante repique de estolones. Se eligieron los eventos CBM3, CBM4 y CBM5 para realizar las caracterizaciones de los frutos.

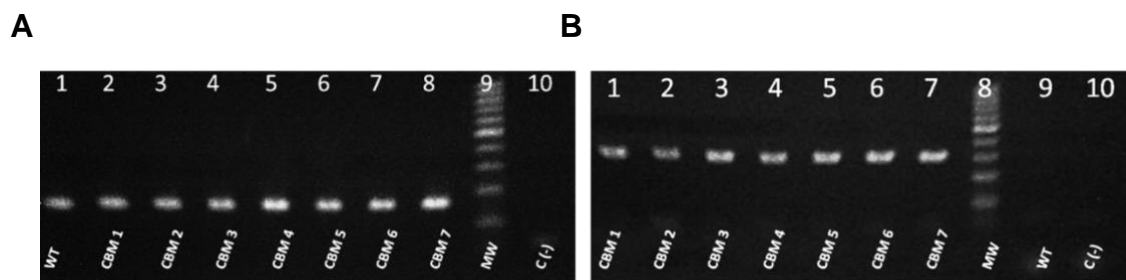


Figura 2. Chequeos Moleculares por RT-PCR. **A)** Gen FvXyn (control endógeno). **B)** Transgen. WT: frutos tipo salvaje; CBM1-CBM7: frutos de eventos transformados; C(-): control de PCR.

Estadios de Madurez Fisiológica

No se observaron diferencias morfológicas entre frutos transgénicos y tipo salvaje. Los frutos se clasificaron en 5 estadios de madurez, numerados en forma arbitraria del 1 al 5 (E1 a E5) siguiendo el desarrollo del fruto (Figura 3). E1 se caracterizó por un fruto pequeño aún verde con los achenios en contacto entre sí. En E2 comienza a perderse el color verde y se distingue una pequeña separación entre los achenios. En E3 se denota un incremento en el tamaño del fruto, no se aprecia color verde, los achenios se encuentran separados, pero aún no toman el color pardo característico de los estadios sucesivos. En E4 el fruto adquiere el tamaño final, al igual que el color de los achenios. E5 se caracteriza por el color pardo de los frutos, indicio del comienzo de su descomposición.



Figura 3. Estadios de madurez fisiológica.

Firmeza

El cultivar se caracterizó por presentar frutos blandos. Comparados con frutos de *Fragaria x ananassa* la firmeza medida en *F. vesca* H4 se encuentra casi un orden de magnitud por debajo de los valores esperados para la variedad comercial. Se observó una disminución progresiva en la firmeza con el avance de la maduración, siendo la disminución entre E2 y E3 la de mayor relevancia (Figura 4). En lo que respecta a los eventos transformados, no se observaron diferencias significativas en la firmeza de los frutos transgénicos comparados con los frutos tipo salvaje ni E2 ni en E5, pero sí se encontraron diferencias significativas en E3 y E4 (Figura 4). Para el E3, los tres eventos analizados presentan una firmeza mayor a la de los frutos tipo salvaje, mientras que en E4 la diferencia se mantiene para los eventos CBM3 y CBM4, pero deja de observarse en el evento CBM5. Resultados similares se obtuvieron en tomates transgénicos (*S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig) sobreexpresantes del CBM de la expansina 1 de tomate (SIEXPa1; Perini et al., 2017).

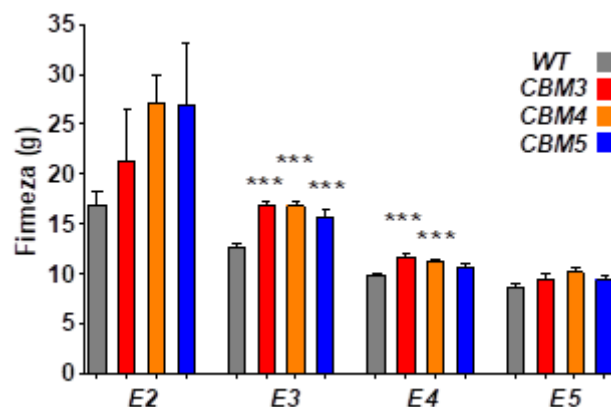


Figura 4. Firmeza en g de frutos en distintos estadios de madurez fisiológica en planta. WT: frutos tipo salvaje; CBM3 a CBM5 frutos de eventos transformados; E2, E3, E4 y E5: estadios de madurez. Asteriscos (*) indican diferencias significativas con el tipo salvaje.

Contenido de pared como residuo insoluble en alcohol

No se observaron diferencias en los perfiles de RIA de los distintos eventos analizados. Hay una caída pronunciada en el contenido de RIA entre E2 y E3, para luego mantenerse hasta el final de la maduración, a excepción del evento CBM5, donde también se verifica un descenso en el contenido de RIA entre E3 y E4 (Figura



5A). Para la mayoría de los eventos, no se observan diferencias en el contenido de RIA correspondiente a los tres últimos estadios de madurez (E3, E4 y E5). En lo que respecta a la comparación del contenido de RIA de los eventos transgénicos con el tipo salvaje por estadio, sólo se observaron diferencias significativas en frutos del evento CBM5 en E3, siendo el contenido de RIA mayor que el de los frutos tipo salvaje (Figura 5A). Si bien no se observaron diferencias significativas en el contenido de RIA en E2, E4 y E5 entre ninguno de los eventos transformados y tipo salvaje, cabe destacar que en los estadios dos, tres y cuatro (E2, E3 y E4) existe una tendencia a un mayor contenido RIA para la mayoría de los eventos transformados (Figura 5A).

Azúcares totales

Al comparar el contenido de azúcares de los distintos eventos transgénicos con los frutos tipo salvaje en cada estadio, se observaron diferencias significativas en todos los casos, al menos en uno de los eventos transgénicos (Figura 5B). En E3 todos los eventos transgénicos presentaron un menor contenido de azúcares totales que los frutos tipo salvaje (Figura 5B). En E4, se observó la misma tendencia, a excepción del evento CBM3, que a pesar de tener una media menor a la de los frutos tipo salvaje, no presentó diferencia estadística con el control sin transformar. En E5, sólo se observaron diferencias significativas en el evento CBM5, con un contenido de azúcares mayor al de los frutos tipo salvaje.

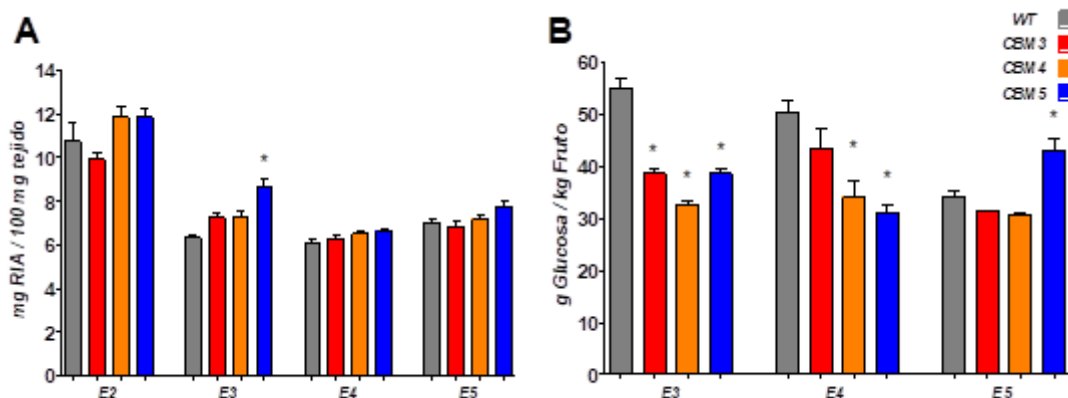


Figura 5. A) Residuos insolubles en alcohol (mg RIA /100 mg tejido). **B)** Azúcares totales (g Glucosa/kg Fruto). WT: Frutos tipo salvaje; CBM3, CBM4 y CBM5 eventos transformados; E3, E4 y E5: estadios de madurez. Asteriscos (*) indican diferencias significativas con el WT.

Actividades expansina y poligalacturonasa (PG) totales

En lo que respecta a la actividad expansina específica total, en todos los casos analizados se observó un aumento de la actividad con la maduración del fruto. Al comparar por estadio la actividad expansina determinada en los frutos transgénicos con la propia de los frutos tipo salvaje, en E3 sólo se observaron diferencias



significativas en la actividad determinada en el evento CBM5, siendo esta menor a la observada en frutos tipo salvaje (Figura 6A). En E4 y E5, en cambio, todos los frutos provenientes de eventos transgénicos presentaron una menor actividad expansina específica que en los frutos tipo salvaje, siendo la diferencia en todos los casos estadísticamente significativa (Figura 6A).

En cuanto a la actividad PG total, se observó un aumento de la actividad entre los últimos estadios de madurez (E4-E5) en frutos tipo salvaje (Figura 6B). Ninguno de los perfiles observados en los eventos transgénicos coincidió con el observado en los frutos tipo salvaje. En el evento CBM3 se observó una continua disminución en la actividad PG con la maduración, mientras que en los eventos CBM4 y CBM5 no se observaron diferencias en la actividad PG en ninguno de los estadios de madurez en estudio. Al comparar la actividad de los eventos transgénicos con la observada en frutos tipo salvaje por estadio de madurez, en todos los estadios la actividad en los eventos transgénicos resultó ser inferior a la medida en los frutos tipo salvaje, siendo la diferencia estadísticamente significativa en la mayoría de los casos (Figura 6B).

Para ambas enzimas se observó una menor actividad frutos de los eventos transgénicos que en los frutos tipo salvaje. Los resultados concuerdan con lo descrito en Nardi et al., 2015, donde la sobreexpresión de un CBM de expansina en la pared celular de *Arabidopsis thaliana* se tradujo en una menor actividad de algunas de las enzimas del catabolismo de la pared celular vegetal.

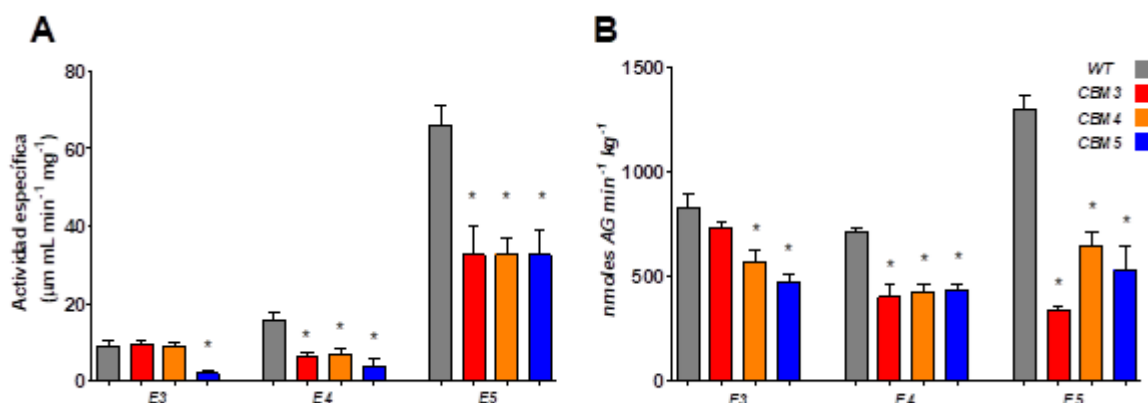


Figura 6. A) Actividad expansina específica ($\mu\text{m}\cdot\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$). **B)** Actividad PG (nmol \cdot AG \cdot min $^{-1}$ \cdot kg $^{-1}$). WT: frutos tipo salvaje; CBM3, CBM4 y CBM5 frutos de eventos transformados; E3, E4 y E5: estadios de madurez. Asteriscos (*) indican diferencia estadística al tipo salvaje.

Conclusiones

No se observaron cambios macroscópicos en el fenotipo de los frutos transgénicos al compararlos con los frutos tipo salvaje, pero si se observó una mayor firmeza, una leve tendencia hacia un mayor contenido en pared celular, menor contenido de azúcares solubles en alcohol y menor actividad tanto expansina como poligalacturonasa, dando indicios de un metabolismo alterado de la pared celular vegetal. En su conjunto los resultados indican que la sobreexpresión en la pared



celular de un CBM carente de actividad hidrolítica sobre carbohidratos, tiene potencial como estrategia para controlar el ablandamiento en frutilla.

Referencias

- AMAYA I., PLETT J., FOLTA K. (2016). Methods and Protocols: Plant Signal Transduction, Chapter 4 (Editors: Botella J.R. and Botella M.A.; Humana Press).
- BRUMMELL, D. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit, en: *Functional Plant Biology*. 33:103-119.
- BRUMMELL, D., HARPSTER, M. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants, en: *Plant Molecular Biology*. 47:311-340.
- BRUMMELL D., HARPSTER, M., CIVELLO P., PALYS, J. BENNETT, A., DUNSMUIR, P. (1999). Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening, en: *Plant Cell*. 11:2203-2216.
- COSGROVE, D., LI, L., CHO, H., HOFFMANN-BENNING, S., MOORE, R. BLECKER, D. (2002). The growing world of expansins, en: *Plant Cell Physiology*. 43: 1436-1444.
- d'AMOUR, J., GOSSELIN, C., ARUL, J., CASTAIGNE, F., WILLEMOT, C. (1993). Gamma-Radiation Affects Cell Wall Composition of Strawberries, en: *Journal of Food Science*. 58:182-185.
- DIAZ, J., ANTHON, G., BARRETT, D. (2007). Nonenzymatic degradation of citrus pectin and pectate during prolonged heating: Effects of pH, temperature, and degree of methyl esterification, en: *J. Agric. Food Chem*. 55:5131-5136.
- HARKER, F., REDGWELL, R., HALLETT, I., MURRAY S., CARTER, G. (2010). Texture of Fresh Fruit, en *Horticultural Reviews*, John Wiley & Sons, Inc., 121-224.
- JIMÉNEZ-BERMÚDEZ, S., REDONDO-NEVADO, J., MUÑOZ-BLANCO, J., CABALLERO, J., LÓPEZ-ARANDA, J., VALPUESTA, V., PLIEGO-ALFARO, F., QUESADA, M., MERCADO J. (2002). Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene, en: *Plant Physiology*. 128:751-759.
- NARDI, C., VILLARREAL, N., ROSSI, F., MARTÍNEZ, S., MARTÍNEZ, G., CIVELLO P. (2015). Overexpression of the carbohydrate binding module of strawberry expansin2 in Arabidopsis thaliana modifies plant growth and cell wall metabolism, en: *Plant Molecular Biology*. 88:101-117.
- NOGATA, Y., OHTA, H., VORAGEN, A. (1993). Polygalacturonase in strawberry fruit, en: *Phytochemistry*. 34:617-620.
- PERINI, M., SIN, I. MARTÍNEZ, G., CIVELLO, P. (2017). Measurement of expansin activity and plant cell wall creep by using a commercial texture analyzer, en: *Electronic Journal of Biotechnology*. 26:12-19.
- PERINI, M., SIN, I., VILLARREAL, N., MARINA, M., POWELL, A., MARTÍNEZ, G., CIVELLO, P. (2017). Overexpression of the carbohydrate binding module from Solanum lycopersicum expansin 1 (SI-EXP1) modifies tomato fruit firmness and Botrytis cinerea susceptibility, en: *Plant Physiology and Biochemistry*. 113:122-132.



QUEDASA, M., BLANCO-PORTALES, R., POSE, S., GARCIA-GAGO, J., JIMÉNEZ-BERMUDEZ, S., MUÑOZ-SERRANO, A., CABALLERO, J., PLIEGO-ALFARO, F., MECADO, J., MUÑOZ-BLANCO, J. (2009). Antisense Down-Regulation of the FaPG1 Gene Reveals an Unexpected Central Role for Polygalacturonase in Strawberry Fruit Softening, en: *Plant Physiology*. 150:1022-1032.

XIONG, A., YAO, Q., PENG, R., LI, X., HAN, P., FAN, H. (2005). Different effects on ACC oxidase gene silencing triggered by RNA interference in transgenic tomato, en: *Plant Cell Reports*. 23:639-646.

ZHANG, Q., FOLTA, K., DAVIS, T. (2014). Somatic embryogenesis, tetraploidy, and variant leaf morphology in transgenic diploid strawberry (*Fragaria vesca* subspecies *vesca* 'Hawaii 4'), en: *BMC Plant Biology*. 14:23.



Estudio de las propiedades superficiales del arándano. Análisis de la mojabilidad de la superficie del fruto con soluciones de almidón

Slavutsky A. ^(1,2), Bravo J. ⁽²⁾, Seppi L. ⁽¹⁾, Guari J. ⁽²⁾, Bertuzzi A. ^(1,2)

(1) Instituto de Investigaciones para la Industria Química, CONICET.

(2) Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Salta, Av. Bolivia 5150, Salta, Argentina.

Dirección de e-mail: amslavutsky@gmail.com

Resumen

La conservación de alimentos mediante el empleo de recubrimientos comestibles depende de la homogeneidad, continuidad y adherencia del recubrimiento sobre el producto que protege y estos parámetros están íntimamente ligados a las propiedades superficiales de ambos materiales. Las soluciones de hidrocoloides empleadas para el recubrimiento de alimentos, deben ser capaces de “mojar” y dispersarse uniformemente. La cobertura formada, debe poseer la adhesividad y cohesión necesarias para formar una película continua de espesor suficiente que garantice la protección mecánica y características de permeabilidad requeridas por el fruto. La mojabilidad de la cáscara del fruto y sus propiedades superficiales, pueden ser estudiados a través de estudios de ángulo de contacto. El objetivo del presente trabajo, fue estudiar las propiedades superficiales del arándano y de las soluciones formadoras de películas de almidón, con y sin la adición de ácido esteárico y Tween 80. La Teoría de Zisman se utilizó para calcular la tensión superficial crítica de la cáscara de los frutos, y a partir de la Teoría Termodinámica, se calcularon las componentes polares, dispersas y la tensión superficial del sólido. Además, se formularon soluciones de almidón con el agregado de diferentes cantidades de tensioactivo y ácido esteárico y se calculó el trabajo de adhesión, cohesión y la mojabilidad entre las soluciones formadoras de películas y la superficie del fruto. Los resultados indican que la superficie de los arándanos poseen características hidrofóbicas debido a la presencia de las ceras que recubren al fruto (bloom), con un valor de la componente dispersa de 21,09 mN/m. Se observó una disminución del trabajo de cohesión de las soluciones a medida que aumentaba la concentración de surfactante y ácido esteárico, desde 130,17 mN/m a 79,52 mN/m. Además, se registró una disminución del trabajo de adhesión de 72,22 mN/m a 46,39 mN/m. La disminución de la tensión superficial produjo un aumento de la mojabilidad por parte de las soluciones desde -58,12 mN/m a -30,31 mN/m, lo que condujo a películas con una distribución homogénea del recubrimiento sobre la superficie de la fruta pero con menor espesor. El estudio de las propiedades superficiales de los arándanos y de las soluciones empleadas para realizar los recubrimientos, permitió conocer los parámetros a tener en cuenta para obtener un recubrimiento homogéneo y completo del fruto bajo estudio.

Palabras clave: arándanos, propiedades superficiales, trabajo de adhesión y cohesión, mojabilidad.



Introducción

Las frutas y verduras, al ser cosechadas, mantienen sus funciones biológicas hasta el momento en que se consumen o son tratadas para su conservación. El control de la respiración de los tejidos vivos mejora la capacidad de almacenamiento y prolonga la vida útil de los productos frescos, haciendo que los tejidos vegetales disminuyan su senescencia y degradación (Brecht y col., 2004).

El arándano es una fruta rica en vitamina C, fibra, potasio, hierro y calcio, cuyo consumo potencia el sistema inmunológico, protege el rendimiento del cerebro, reduce el riesgo de contraer Parkinson y desarrollar diabetes tipo 2, entre otros beneficios (Paniagua y col., 2014). Por tratarse de una fruta climatérica con una alta velocidad de deterioro, las condiciones de conservación son estrictas y de costoso mantenimiento, es así que se recomienda su almacenamiento a 0°C y 90-95% de humedad relativa (Paniagua y col., 2014).

La utilización de tecnologías postcosecha, tales como los recubrimientos comestibles, tienen por objeto prolongar la vida útil de productos frescos o mínimamente procesados, y protegerlos de los efectos medioambientales nocivos (Kester y Fennema, 1986). Los recubrimientos comestibles han demostrado la capacidad de mejorar la calidad de los alimentos y reducir la velocidad de deterioro de productos frescos, mediante la regulación de la transferencia de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aromas, etc. Además, también se pueden utilizar en frutas y verduras procesadas para mejorar la integridad estructural frente a temperaturas de congelamiento, previniendo la absorción de la humedad y la oxidación (Baker y col., 1994; Baldwin y Baker, 2002; Olivas y Barbosa-Canovas 2005).

Las frutas o verduras se recubren generalmente por inmersión o aspersión con una amplia gama de materiales comestibles, de manera de formar membrana semipermeable, alrededor de la fruta, que controla el intercambio gaseoso con el medio, reduciendo la tasa respiratoria y generando una microatmósfera modificada que limita el crecimiento microbiano (Thompson 2003).

La protección de los arándanos, y alimentos en general, mediante recubrimiento comestibles depende del control de las propiedades superficiales de las soluciones del recubrimiento, lo que afecta la adhesión y el grosor de la película (Park, 2002). De hecho, el espesor de los recubrimientos comestibles afecta directamente las propiedades biológicas y la vida útil de los arándanos (Israelachvili, 1992). La energía superficial del epicarpio de arándano puede obtenerse utilizando diferentes métodos. Todos ellos se basan en mediciones de ángulo de contacto entre superficie líquido/vapor y el epicarpio de arándano de diferentes líquidos de prueba de tensión superficial conocida (Etzler, 2006). Los principales métodos utilizados son el de Zisman (Fox y Zisman, 1950) y la teoría propuesta por Fowkes (1963).

Se han realizado diferentes estudios sobre la aplicación de recubrimiento de arándanos empleando films a base de almidón, hidroxipropilmetilcelulosa, quitosano, alginato y caseinato, entre otros. La incorporación de este tipo de materiales, ha afectado positivamente a la conservación de la fruta, mejorando los tiempos de conservación (Duan y col., 2011; Osorio y col., 2011; Yan y col., 2014). A su vez, la incorporación de sustancias tensioactivas, tales como el Tween, permiten regular la tensión superficial de las soluciones empleadas para formular los recubrimientos y de



esta manera, mejorar los parámetros de adhesión y la mojabilidad de los frutos. El objetivo del presente trabajo, fue estudiar las propiedades superficiales del arándano y de las soluciones formadoras de películas a base de almidón de maíz, con y sin la adición de ácido esteárico y Tween 80.

Materiales y Métodos

Soluciones formadoras de películas.

Se trabajó con las siguientes soluciones:

Soluciones control: Se formularon soluciones de almidón de maíz (Maizena, UNILEVER, Argentina) al 5% plastificado con glicerol (Biopack) al 20%.

Solución A: Se formularon soluciones de almidón de maíz al 5% plastificado con glicerol al 20% y Tween 80 (Biopack) al 10% (p/p_{almidón}).

Solución B: Se formularon soluciones de almidón de maíz al 5% plastificado con glicerol al 20% y Tween 80 al 20% (p/p_{almidón}).

Solución C: Se formularon soluciones de almidón de maíz al 5% plastificado con glicerol al 20%, Tween 80 al 10% (p/p_{almidón}) y ácido esteárico al 10% (p/p_{almidón}).

Solución D: Se formularon soluciones de almidón de maíz al 5% plastificado con glicerol al 20%, Tween 80 al 20% (p/p_{almidón}) y ácido esteárico al 10% (p/p_{almidón}).

Finalizada la dispersión de los componentes, se llevó a cabo la gelatinización del almidón a 85°C durante 10 minutos. Luego, las mezclas se sometieron a homogeneización a 30.000 rpm durante 1 minuto.

Determinación de la tensión superficial de las soluciones formadoras de película.

La misma, se realizó a 20°C, mediante el empleo del método del anillo de Dunoy. Cada solución se analizó diez veces.

Materia prima.

Se emplearon arándanos de la variedad "Carsol". Los mismos fueron donados por la empresa Extraberry S.A., ubicada en la Ciudad de Méta, Salta. Los arándanos fueron cosechados y sometidos a los criterios de selección de la empresa y transportados al laboratorio, donde se realizaron los análisis al día siguiente.

Determinación de propiedades superficiales del epicardio de arándanos.

La determinación de la tensión superficial se realizó mediante la medición de los ángulos de contacto formados por varios líquidos de prueba sobre la superficie bajo estudio. La energía superficial del sólido está entonces relacionada a las tensiones superficiales de los líquidos y los ángulos de contacto formados. Según Zisman (1964), en los sistemas que tienen una tensión superficial inferior a 100 mN/m (energía superficial baja), el ángulo de contacto formado por una gota de líquido sobre una superficie sólida será una función de lineal de la tensión superficial del líquido, γ_{LV} , (donde V es aire saturado con el vapor del líquido, L). Este método utiliza una estimación de la tensión superficial



crítica de la superficie del sólido estudiado, por extrapolación a partir de la curva de Zisman. La tensión superficial crítica (γ_c), es una medida de la energía superficial del sólido, que indica que líquidos ($\gamma_{LV} < \gamma_c$) son capaces de extenderse sobre la superficie de un sólido, como un fina capa continua, y que líquidos no son capaces de hacerlo ($\gamma_{LV} > \gamma_c$). Es importante indicar que γ_c no es igual a la energía superficial (γ_{sv}), porque γ_{sl} , no necesariamente es igual a 0, cuando el ángulo θ es cero.

La tensión superficial crítica, está definida como:

$$\gamma_c = \lim \gamma_{LV}; \theta \rightarrow 0 \quad (1)$$

Si consideramos una superficie sólida, en ausencia de esfuerzos elásticos, el análisis termodinámico de la interface indica que el equilibrio formado por el ángulo θ de una gota de un líquido puro depositado sobre la misma, debe satisfacer la ecuación de Young. Cuando un líquido de tensión superficial conocida, está en equilibrio estático con la superficie de un sólido, la relación entre las tensiones superficiales es:

$$\gamma_s = \gamma_{sl} + \gamma_L \cos \theta \quad (2)$$

Donde γ_s es la tensión superficial del sustrato sólido, γ_L es la tensión superficial del líquido y γ_{sl} es la tensión interfacial entre el líquido y el sólido. La afinidad entre las fases aumenta a medida que las fuerzas de atracción entre diferentes fases (fuerzas de adhesión) se hacen mayores que las fuerzas de atracción entre las moléculas de la misma fase (fuerzas de cohesión). El trabajo de adhesión (W_a) se define como la energía por unidad de área necesaria para separar dos fases y es igual y de signo contrario a la energía por unidad de área liberada cuando se forma la interfase. El trabajo de cohesión (W_c) para una sustancia pura es la energía por unidad de área necesaria para producir dos superficies nuevas que contienen las mismas moléculas. El aumento de la superficie es un proceso termodinámicamente desfavorable, por lo tanto está acompañado de un aumento de energía de Gibbs equivalente al trabajo que se debe entregar al sistema para generar ese incremento de área.

El ángulo de contacto de un líquido sobre una superficie está relacionado con el trabajo de adhesión y puede ser calculado con la siguiente ecuación:

$$W_a = \gamma_L \cdot (1 + \cos \theta) \quad (3)$$

Las componentes polares (γ_L^p) y dispersas (γ_L^d) de la tensión superficial de un líquido puro son conocidas, y el ángulo de contacto (θ) entre la superficie del sólido y el líquido puede determinarse. Las interacciones existentes pueden describirse en términos del trabajo de adhesión (W_a):

$$W_a = W_a^d + W_a^p \Leftrightarrow W_a = 2 \cdot \left(\sqrt{\gamma_s^d \cdot \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_s^p \cdot \gamma_L^p} \right) \quad (4)$$

Donde W_a^d y W_a^p son las fuerzas dispersas de London y las fuerzas polares (interacciones ácido-base, por ejemplo), respectivamente y γ_s^p y γ_s^d son las contribuciones polares y dispersas de la superficie del sólido en estudio. Reemplazando en la ecuación de 12 y reordenando, se obtiene:



$$\frac{1 + \cos \theta}{2} \cdot \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_L^d}} = \sqrt{\gamma_S^p} \cdot \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}} + \sqrt{\gamma_S^d} \quad (5)$$

Como se observa, la ecuación obtenida representa la ecuación de una recta. Determinado el ángulo de contacto con diferentes líquidos de prueba, se puede calcular la variable independiente $\sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}}$ y la variable dependiente $\frac{1 + \cos \theta}{2} \cdot \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_L^d}}$ y a partir de estas, despejar las componentes polar y dispersa del sólido (Clint y Wicks, 2001; Baldan, 2012).

Mojabilidad (Wettability)

Las fuerzas de adhesión promueven que el líquido se propague en una superficie sólida y las fuerzas de cohesión promueven su contracción. El comportamiento de humectación de las soluciones dependerá principalmente del equilibrio entre estas fuerzas. La humectación se determina mediante el cálculo de los valores del coeficiente de dispersión (W_s), el trabajo de adhesión (W_a) y el trabajo de cohesión (W_c). El ángulo de contacto de una gota de líquido sobre una superficie sólida se define por el equilibrio mecánico bajo la acción de tres tensiones interfaciales: sólido-vapor (γ_{sv}), sólido-líquido (γ_{sl}), y líquido-vapor (γ_{lv}). El coeficiente de dispersión “spreading” (W_s) se define con la ecuación 15 y sólo puede ser negativo o cero.

$$W_s = W_a - W_c = \gamma_{sv} - \gamma_{lv} - \gamma_{sl} \quad (6)$$

Y W_a y W_c , pueden calcularse a partir de:

$$W_a = \gamma_{lv} + \gamma_{sv} - \gamma_{sl} = \gamma_L \cdot (1 + \cos \theta) \quad (7)$$

$$W_c = 2 \cdot \gamma_{lv} \quad (8)$$

El estudio de las propiedades superficiales del arándano, se realizó mediante la medición del ángulo de contacto entre diferentes líquidos de prueba y la superficie de los arándanos (Tabla 1).

Tabla 2. Propiedades superficiales de arándanos frente a diferentes líquidos

	Tensión superficial (mN/m)	Componente dispersa (mN/m)	Componente polar (mN/M)
Etilenglicol	48.3	29.3	19
Glicerol	63.4	37.1	26.3
Formamida	58.2	32.2	26
Dimetilsulfoxido	44	36	8



La determinación del ángulo de contacto se realizó con un goniómetro Standard Goniometer with DROP image standard, model 200-00, Ramé-Hart Instrument Co. La determinación de la tensión superficial crítica, las componentes polares y dispersas y la tensión superficial del epicardio de los arándanos, se obtuvieron a partir de las ecuaciones 1, y 5.

Los trabajos de adhesión y cohesión y la mojabilidad o coeficiente de dispersión del sistema, se obtuvieron a partir de las ecuaciones 6, 7 y 8.

Resultados y Discusión

Tensión superficial de las soluciones formadoras de películas.

En la Tabla 2, se observan las tensiones superficiales de las soluciones formadoras de películas obtenidas, empleando el método del anillo de Dunoy. Los resultados indican, que la incorporación de Tween 80, produce una disminución de la tensión superficial de las soluciones formadoras de películas. En cambio, la incorporación de ácido esteárico, no produce una disminución de la tensión superficial. Similares resultados, fueron obtenidos por Skurtys et al, 2011, en soluciones de formuladas a partir de quitosano y Tween 20.

Tabla 3. Tensión superficial de las soluciones formadoras de películas

Muestras	Tensión superficial (mN/m)
Control	65.42 ± 0.77
Solución A	43.36 ± 0.78
Solución B	41.89 ± 0.15
Solución C	39.92 ± 0.55
Solución D	39.67 ± 0.39

Tensión superficial crítica.

La tensión superficial crítica, se calculó a partir de las medidas de ángulo de contacto formado entre la superficie del arándano y los líquidos de prueba mencionados en la Tabla 1. En la Figura 1, se observan los resultados obtenidos y a partir de la ecuación 1, se calculó la tensión superficial crítica.

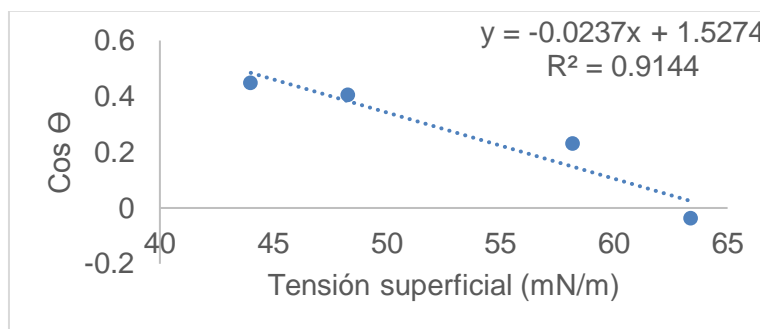


Figura 1. Gráfico de Zisman

La Tensión superficial crítica del arándano es de 22,25 mN/m (<100 mN/m, sistemas de baja energía), similar a la que poseen otros frutos de características similares, como naranjas y pomelos (Hagenmaier y Baker; 1993; Aranberri-Askargorta et al., 2003) y en el mismo orden a los obtenidos para arándanos por Skurtys et al. (2011).

Componentes polares, dispersas y tensión superficial de la superficie de los arándanos.

A partir de los ángulos de contacto formados por los líquidos de prueba y aplicación de la Ecuación 5, se obtuvieron los parámetros superficiales de los epicardios de los arándanos. Los resultados muestran una Componente dispersa = 21.09 mN/m; Componente polar = 2.22 mN/m; Tensión superficial = 23.31mN/m. La tensión superficial, es similar a la obtenida por el método de Zisman. Esto indica que ambas metodologías empleadas resultan apropiadas y que la superficie de los arándanos posee características hidrofóbicas, debido a la presencia de ceras que recubren al fruto. Por lo tanto se espera que la superficie de la fruta interactúe mejor con soluciones que posean características apolares.

Mojabilidad de las soluciones formadoras de películas de la superficie de los arándanos.

A partir de las medidas de ángulo de contacto formado entre los frutos y las soluciones estudiadas, las tensiones superficiales calculadas y las ecuaciones 6, 7 y 8, se calculó el trabajo de adhesión, el trabajo cohesión y la mojabilidad o coeficiente de dispersión. Los resultados obtenidos, se observan en la Figura 2.

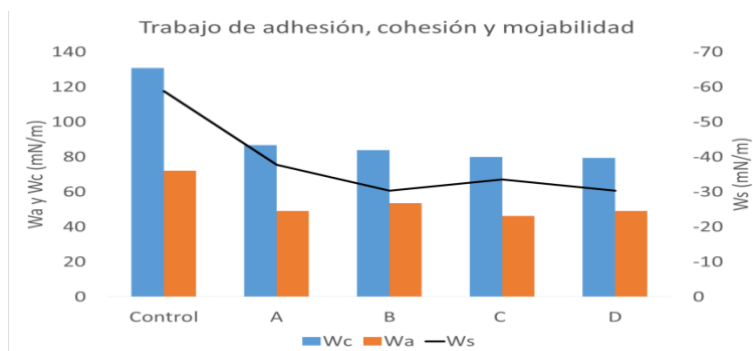


Figura 2. Trabajo de adhesión, trabajo de cohesión y mojabilidad

Se observa una disminución del trabajo de cohesión de las soluciones a medida que aumenta la concentración de surfactante y de ácido esteárico. Este comportamiento, se debe a que tanto el surfactante como el ácido esteárico, se intercalan dentro de la matriz de almidón, disminuyendo la interacción entre las cadenas poliméricas.

Se registra una disminución del trabajo de adhesión con la incorporación de los aditivos, los cuales producen una caída del ángulo de contacto y de su capacidad de adherirse a la superficie sólida.

El aumento de la concentración de Tween 80 produce un aumento (disminución valor absoluto) de la mojabilidad. Esto se debe a la pérdida de cohesividad y a una mayor compatibilidad entre las componentes dispersas y polares de la solución formadora de película y la superficie de la fruta.

Conclusiones

Se estudiaron las características superficiales de los arándanos, mediante medidas de ángulo de contacto. Las características apolares del epicardio del fruto indican una mejor interacción con soluciones que posean características hidrofóbicas. El agregado de tensioactivo y ácido esteárico produce una disminución de la tensión superficial y un aumento de la mojabilidad por parte de las soluciones, lo que conduce a una distribución más homogénea del recubrimiento sobre la superficie de la fruta pero con menor espesor final de la película formada.

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento obtenido a partir de los proyectos PICT 2015-1275 "Desarrollo de películas biopoliméricas funcionalizadas mediante nanotecnología para su aplicación en la conservación de frutas finas" y CIUNSa N° 2432 "Empleo de recubrimientos comestibles para la conservación de arándanos" y a la Empresa Extraberry S.A., por la donación de los arándanos.



Referencias

- ARANBERRI-ASKARGORTA I, LAMPKE T, BISMARCK A. (2003). Wetting behavior of flax fibers as reinforcement for polypropylene, en: *Journal of Colloid and Interface Science*, 263: 580-589.
- BAKER R, BALDWIN E, NISPEROS-CARRIEDO M. (1994). Edible coatings and films for processed foods en: *Edible coatings and films to improve food quality*, 89–104.
- BALDAN A. (2012). Adhesion phenomena in bonded joints, en: *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 38: 95–116.
- BALDWIN EA, BAKER RA. (2002). Use of proteins in edible coatings for whole and minimally processed fruits and vegetables, en: *Protein based films and coatings*, 501–515.
- BRECHT JK, FELKEY K, BARTZ JA, SCHNEIDER KR, SALTVEIT ME, TALCOTT ST. (2004). Fresh-cut vegetables and fruits, en: *Horticultural Review* 30:185–251.
- CLINT JH, WICKS AC. (2001). Adhesion under water: surface energy considerations, en: *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 21(4): 267–273.
- DUAN J, WU R, STRIK BC, ZHAO Y. (2011). Effect of edible coatings on the quality of fresh blueberries (Duke and Elliott) under commercial storage conditions, en: *Postharvest Biology and Technology*, 59(1): 71–79.
- ETZLER FM. (2006). Contact angle, wettability and adhesion, en: *Surface free energy of solids: A comparison of models*.
- FOWKES F. (1963). Additivity of intermolecular forces at interfaces. determination of the contribution to surface and interfacial tensions of dispersion forces in various liquids, en: *Journal of Physical Chemistry*, 67: 2538-2541.
- FOX H, ZISMAN, W. (1950). The spreading of liquids on low energy surfaces. I. Polytetrafluoroethylene, en: *Journal of Colloid Science*, 5:514-531.
- HAGENMAIER R, BAKER R. (1993). Reduction in gas exchange of citrus fruit by wax coatings, en: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 283-287.
- ISRAELACHVILI, J. (1992). *Intermolecular and surface forces*. Academic Press limited: New-York.
- KESTER JJ, FENNEMA OR. (1986). Edible films and coatings: a review, en: *Food Technol* 40(12): 47–59.
- OLIVAS GI, BARBOSA-CANOVAS GV. (2005). Edible coatings for fresh-cut fruits, en: *Critical Review Food Science Nutrition*, 45:657–70.
- OSORIO FA, MOLINA P, MATIACEVICH S, ENRIONE J, SKURTYS O. (2011). Characteristics of hydroxy propyl methylcellulose (HPMC) based edible film developed for blueberry coatings, en: *Procedia Food Science*, 1: 287–293.
- PANIAGUA AC, EAST AR, HEYES, JA. (2014). Interaction of temperature control deficiencies and atmosphere conditions during blueberry storage on quality outcomes, en: *Postharvest Biology and Technology*, 95: 50–59.



PARK HJ. (2002). Fruit and vegetable processing: Improving quality. chapter Edible coatings for fruits. Woodhead Publishing Limited: Cambridge.

SKURTYS O, VELÁSQUEZ P, HENRIQUEZ O, MATIACEVICH S, ENRIONE J, OSORIO. (2011). Wetting behavior of chitosan solutions on blueberry epicarp with or without epicuticular waxes, en: LWT - Food Science and Technology, 44(6): 1449–1457.

THOMPSON AK. (2003). Postharvest treatments. Fruit and vegetables. Ames, Iowa.

YANG G, YUE J, GONG X, QIAN B, WANG H, DENG Y, ZHAO Y. (2014). Blueberry leaf extracts incorporated chitosan coatings for preserving postharvest quality of fresh blueberries, en: Postharvest Biology and Technology, 92: 46–53.

ZISMAN WA. (1964). Contact angle wettability and adhesion. Advances in chemistry series: Washington, DC.



Influencia del estado de desarrollo y la estación de cosecha sobre la microestructura y textura de berenjena

Valerga L.⁽¹⁾, Darré M.^(1,2), Zaro M.J.^(1,4), Arambarri A.⁽³⁾, Vicente A.⁽²⁾, Lemoine M.L.^(1,2), Concellón A.⁽¹⁾.

(1) CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos) (CIC-CONICET-UNLP) Calle 47 y 116, La Plata, Argentina.

(2) LIPA. (Laboratorio de Investigación en Productos Agroindustriales) Fac. Cs. Agrarias y Forestales (UNLP) Calle 60 y 119, la Plata, Argentina.

(3) LAMCE (Laboratorio de Morfología Comparada de Espermatófitas), Fac. Cs. Agrarias y Forestales (UNLP).

(4) Cátedra de Bioquímica y Fitoquímica, Fac. de Cs. Agrarias y Forestales (UNLP).

Dirección de e-mail: luciavalerga@hotmail.com

Resumen

Dentro de los factores de calidad de frutas y hortalizas destinados al consumo en fresco, la textura es uno de los principales atributos de aceptabilidad a tener en cuenta. En berenjena esta propiedad determina en gran medida su calidad y capacidad de almacenamiento. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la incidencia del estado de crecimiento y la estación de cosecha sobre la microestructura y textura del tejido de berenjena. Se trabajó con berenjenas violetas cosechadas en tres tamaños (longitud) diferentes: baby (E1, 9 cm), comercial (E2, 17 cm) y avanzado (E3, 21 cm). Los frutos se obtuvieron en tres estaciones consecutivas de cosecha dentro del ciclo anual de producción: primavera (P), verano (V) y otoño (O). Se analizaron la tasa de crecimiento, materia seca, microestructura del tejido epidérmico y endocárpico (microscopía óptica), grosor de la cutícula, y firmeza (texturómetro). Los frutos cosechados en O tuvieron un prolongado período de crecimiento y un incremento del contenido de materia seca con el desarrollo, respecto de los cosechados en P y V. El tejido resultó compacto en E1, respecto de los estados E2 y E3 que mostraron células más alargadas, con ramificaciones, espacios intercelulares y un tejido esponjoso característico de la pulpa de berenjena. Si bien la estación de cosecha no afectó la microestructura de los frutos E1, se observó una evidente desorganización, pérdida de turgencia e integridad del endocarpo en frutos de los estados E2 y E3 cosechados en O debido probablemente a la sensibilidad al daño por frío en los frutos crecidos a bajas temperaturas en esta estación. El espesor de la cutícula se triplicó y duplicó en los frutos entre los estados E1 y E2 para las estaciones P y V, respectivamente, y se mantuvo sin cambios en O; mientras que no se hallaron posteriores modificaciones entre los E2 y E3 para cada estación de cosecha. Como era de esperar, la firmeza disminuyó un 33% entre frutos E1 y E3 en la estación P, lo que puede relacionarse con una mayor presencia de espacios intercelulares que crearían un tejido menos compacto, más aireado y con ello más blando. Por el contrario, la firmeza prácticamente no varió en frutos cosechados en V y se incrementó un 60% en aquéllos cosechados en O. Este último resultado no se relacionó con la variación en el espesor



de cutícula pero se condice con las características de la microestructura registrada, donde se observó un tejido aireado pero seco y presencia de células poco turgentes, deformadas y desorganizadas. En virtud de estos resultados, la estación de cosecha y el estado de crecimiento fueron determinantes en la microestructura del tejido y la firmeza de los frutos de berenjena. Las alteraciones de firmeza no estuvieron relacionadas con el espesor de cutícula, sino más bien con la desorganización celular del tejido.

Palabras clave: berenjena, calidad, textura, microscopia.

Introducción

La berenjena es una planta tropical o sub-tropical con un ciclo de producción anual. Requiere climas cálidos para su crecimiento, siendo el rango de temperatura óptima para el cuajado de 16-25 °C (Sun et al., 1990). Se planta en general en invierno y la cosecha comienza luego de 3 meses y se extiende en las estaciones siguientes (primavera-P, verano-V y otoño-O). Durante su ciclo productivo la planta posee un crecimiento vegetativo, etapas sucesivas de floración y posterior producción de frutos que se suceden escalonadamente, por lo que tanto la asimilación como distribución de nutrientes se ve modificada. Los frutos se cosechan generalmente cuando han alcanzado un 80 % de su tamaño final, en estado inmaduro (Sun et al., 1990); aunque actualmente existe una nueva tendencia del consumo de frutos baby o crecimiento reducido, aportándole un valor agregado. Si bien la planta de berenjena produce hasta el final de su ciclo anual, el agotamiento por una producción intensiva podría generar una disminución en la calidad de los frutos obtenidos en las cosechas tardías y este aspecto no ha sido estudiado en detalle en berenjena. Por otro lado, el desarrollo del fruto involucra cambios en la anatomía celular. En los frutos carnosos, como lo es la berenjena, el tejido se distribuye en varias secciones anatómicas, como la epidermis (cutícula y primeras líneas de las células) y el pericarpo formado por exocarpo o epicarpo (externo), mesocarpo (parte media) y endocarpo (parte del tejido que va hacia el centro del fruto). Las características anatómicas y factores estructurales del tejido como la presión de turgencia, la presencia de cutícula, la rigidez de la pared celular, el arreglo y empaquetamiento celular, entre otros, contribuyen a las propiedades texturales del fruto que a su vez influyen sobre la aceptabilidad, la calidad y la capacidad de conservación (Waldron et al., 1997). En mango y tomate, se observó un engrosamiento de la cutícula debido a una acumulación de cutina y ceras durante el crecimiento del fruto (Baker et al., 1982; Petit-Jiménez et al., 2007). De aquí que caracterizar la anatomía de frutos en diferente estado de desarrollo obtenidos en sucesivas estaciones de cosecha resultaría útil para entender su relación con los cambios en la textura y calidad de los mismos. Así, el objetivo de nuestro trabajo fue estudiar la incidencia del estado de crecimiento y la estación de cosecha (primavera, verano y otoño) sobre la microestructura y textura del tejido de berenjena violeta.



Materiales y métodos

Material vegetal: berenjenas violetas (*Solanum melongena* L.) cv. Monarca producidas en invernaderos de La Plata (Buenos Aires, Argentina) se cosecharon en tres tamaños (longitud) diferentes: baby o Estado 1 (E1, 0.09 m), comercial o Estado 2 (E2, 0.17 m) y avanzada o Estado 3 (E3, 0.21 m). Los frutos se cosecharon durante tres estaciones a lo largo de su ciclo productivo: primavera (noviembre-diciembre 2015), verano (febrero-marzo 2016) y otoño (abril-mayo 2016). El rango de temperatura ambiente fue de 14-26 °C, 14-25 °C y 5-15 °C en primavera, verano y otoño, respectivamente. Se midieron los días necesarios luego del cuajado del fruto, days after fruit set (DAFS), para alcanzar los E1, E2 y E3. Treinta frutos de cada estado y estación de cosecha se cosecharon y transportaron al laboratorio, para ser analizados.

Materia seca: se cortaron cubos de 2 g se secaron a 105 °C en estufa hasta peso constante. Se midieron 15 frutos por cada estado y estación de cosecha. Los resultados se expresaron como porcentaje de peso fresco.

Firmeza del fruto: se evaluó en un texturómetro (TA.XT2, Scarsdale, NY, USA) con una sonda de 3 mm (test de ruptura) que comprimió la posición ecuatorial del fruto por 8 mm a 1 mm/s. Se analizaron diez frutos de cada estado y estación de cosecha, y tres mediciones por fruto. Los resultados se expresaron en N/s.

Firmeza de la pulpa: se evaluó en el texturómetro con una sonda cilíndrica de 75 mm de diámetro (Perfil de Análisis de Textura-TPA). Se cortó un cilindro de 2,2 x 0,8 mm del centro de una rodaja de la zona ecuatorial del fruto que se comprimió un 30% a 0,5 mm/s. Se analizaron diez frutos de cada estado y estación de cosecha, y tres mediciones por fruto. Los resultados se expresaron en N/s.

Análisis micro-estructural por microscopía óptica:

Fijación: rodajas de la zona ecuatorial de frutos distintos fueron cortadas y fijadas con FAA70 (formol: ácido acético glacial: etanol 70%) hasta su análisis.

Espesor de cutícula y anatomía del tejido epidérmico: se cortaron secciones longitudinales a mano de la zona más externa, que incluye a la piel, de las rodajas fijadas. Para la detección de la cutícula se introdujeron los cortes por 15 min en Sudan IV y luego en etanol 70% por 1 min. Las secciones se montaron en un gel de glicerina. El color rojo indica la presencia de componentes lipofílicos, en este caso la cutícula. Se usó un microscopio de luz (Gemalux), las imágenes se capturaron con una cámara (Moticam 1000) a una amplitud de 400x y se analizaron mediante el software Image Plus 2.0. El espesor fue expresado en µm.

Anatomía del tejido endocárpico de la pulpa: secciones periféricas (a partir de unos 8 mm en dirección de la piel hacia el centro) y centrales de la pulpa (“corazón” del fruto) de las rodajas fijadas fueron cortadas manualmente. Dichas secciones se decoloraron, lavaron y montaron en gel de glicerina con 80% de safranina. Se usó el mismo microscopio de luz, cámara y analizador de imágenes anterior, y una magnificación de 100x.



Análisis estadístico: se definió un diseño factorial y los resultados fueron analizados mediante ANOVA. Las medias fueron comparadas mediante el test LSD de Fisher con $P < 0,05$ empleando el software INFOSTAT.

Resultados y discusión

Microestructura del tejido epidérmico y endocárpico

La microscopía es una técnica frecuentemente utilizada para describir los tejidos vegetales. Sin embargo, no se ha estudiado como se ve afectada la microestructura de la berenjena a lo largo del crecimiento del fruto y así tener una herramienta que permita interpretar diferentes respuestas del fruto según el tamaño. A su vez, no se conoce como la estación de cosecha, con sus características medioambientales representativas (la temperatura y la amplitud térmica estacional), puede influir sobre la microestructura del tejido del fruto en crecimiento. En el presente trabajo, la microestructura de la pulpa de berenjena se evaluó mediante microscopía óptica sobre rodajas de la zona ecuatorial de la fruta, diferenciando en tejido epidérmico: epidermis, epicarpio y las primeras capas celulares del endocarpio (Fig 1 A-I); y endocárpico: resto del tejido hasta el centro de la rodaja, al cual dividimos a su vez en dos secciones: periférica, corresponde al tejido placentario (Fig 2 A-I) y central, es el tejido más interno del fruto, en el centro del mismo (Fig 2 J-Q).

Dentro del tejido epidérmico (Fig 1 A-I), la epidermis se constituye de una capa de células redondeadas, empaquetadas y cubiertas por una cutícula de naturaleza lipídica; el epicarpio se extiende a través de unas pocas capas celulares adyacentes y muestra un aspecto compacto; y en las primeras capas del endocarpio se pueden observar células alargadas de mayor tamaño y con moderados espacios intercelulares). Sin embargo, las frutas en diferentes etapas del desarrollo pueden mostrar diferencias microestructurales. En nuestro trabajo, para todas las estaciones estudiadas, se observó que los frutos del E1 presentaron el menor espesor de cutícula y una mayor compactación en las primeras capas de células del endocarpio (Fig 1: A, D y G). Mientras que, con el avance del desarrollo se observó un incremento del tamaño celular y de los espacios intercelulares. Así, en el tejido de los frutos E2 y E3 se observó una diferenciación celular entre el epicarpio y las primeras capas del endocarpio, en donde las células se tornaron más alargadas y el tejido menos compacto (Fig 1: B-C, E-F y H-I).

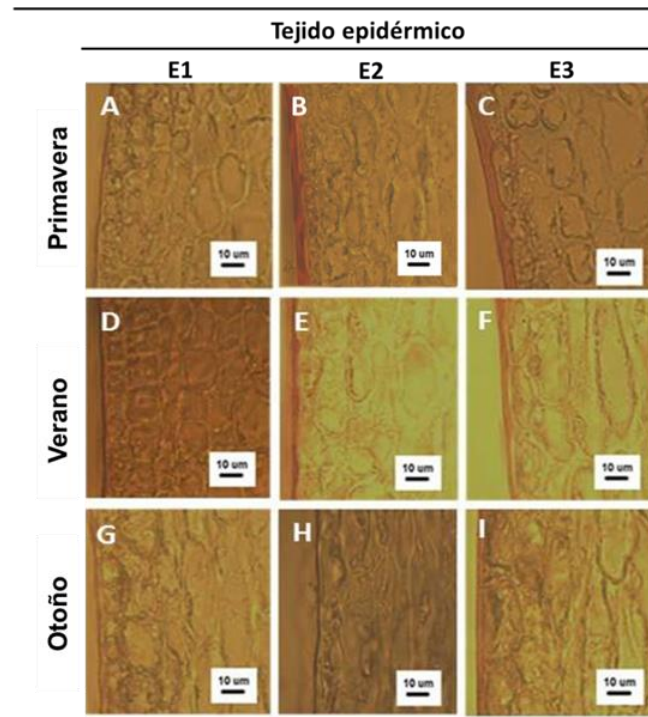


Figura 1. Imágenes de microscopía óptica de tejido epidérmico de berenjena en tres estados de desarrollo: baby o E1 (A, D, G), comercial o E2 (B, E, H) y avanzado o E3 (C, F, I); cosechados en tres estaciones diferentes: primavera (A, B, C), verano (D, E, F) y otoño (G, H, I). Magnificación 400x. Teñidas con Sudan IV.

En la estación de cosecha O no se observó un incremento en el espesor de la cutícula con el crecimiento del fruto en los estados más avanzados E2 y E3 (Fig 1: G-H-I), caso contrario a lo observado tanto para P (Fig 1: A-B-C) como para V (Fig 1: D-E-F), siendo más acentuado el incremento en P. A su vez, en la estación O los frutos presentaron un menor número y mayor tamaño de células en el epicarpio ya desde el estado inicial, E1, y a lo largo de todo el crecimiento respecto a P y V donde fueron similares; como así también se observó cierta pérdida de integridad celular. Este proceso se manifestó por una deformación y pérdida de globosidad de las células de las primeras capas del endocarpio. Así podemos decir que en la estación O, se observó un marcado efecto sobre la microestructura del tejido epidérmico, mientras que en P y V el comportamiento de los frutos fue muy similar.

Por otro lado, en el tejido endocárpico (Fig 2 A-Q) las células comienzan a diferenciarse de lo observado en el tejido epidérmico, ya que adquieren un mayor tamaño y cantidad de espacios intercelulares de tamaños diversos debido a que las células se encuentran unidas por ramificaciones de longitud variable. Características microestructurales similares fueron descritas por Puig et al. (2012) para berenjena de un tamaño comercial. A su vez, independientemente de la estación de cosecha y del estado de desarrollo, los frutos presentaron un tejido endocárpico periférico (Fig 2 A-I) más compacto que el central (Fig 2 J-Q), con células más redondeadas, ramificaciones más cortas y espacios intercelulares más pequeños. Mientras que, con el crecimiento del fruto, al igual que lo observado para el tejido epidérmico, se observó



un aumento en el tamaño celular, en la longitud de las ramificaciones y en el tamaño de los espacios intercelulares, llegando a formar lagunas o cámaras aerenquimáticas en los estados más avanzados, E2 y E3, en la sección central del tejido endocárpico (Fig 2: K-L-N y Ñ-P-Q).

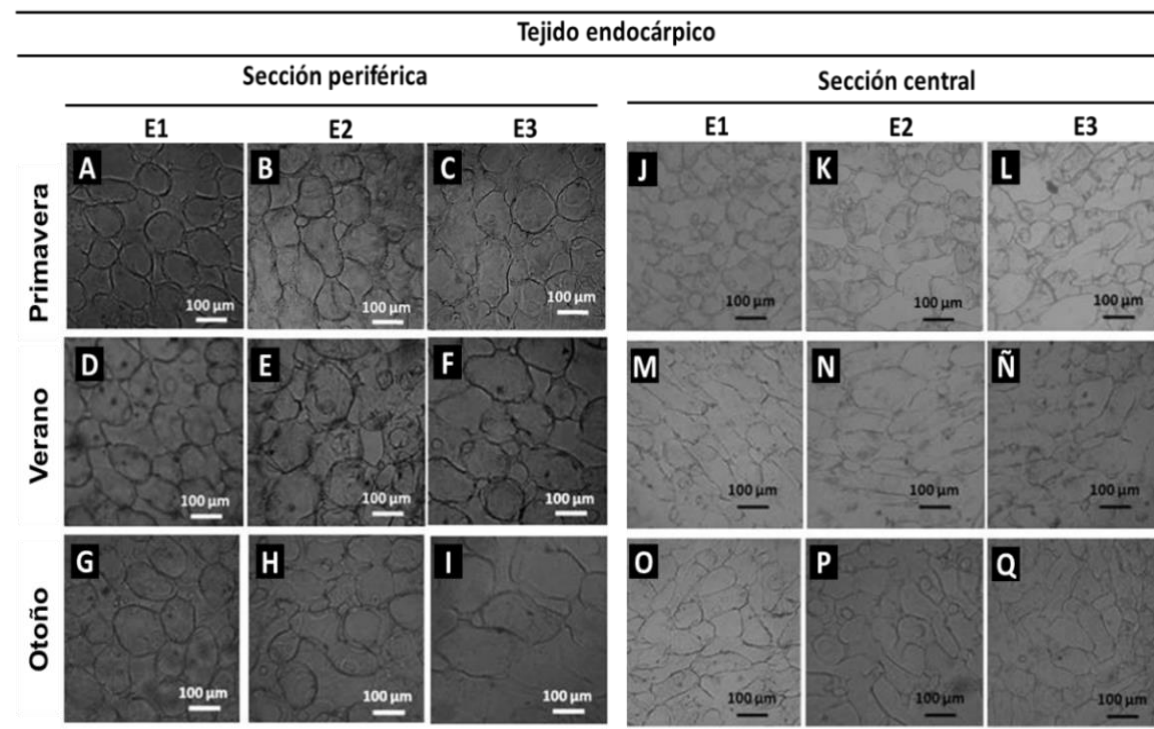


Figura 2. Imágenes de microscopía óptica de tejido endocárpico de berenjena seccionado en periférico (A-I) y central (J-Q) en tres estados de desarrollo: baby o E1 (A, D, G y J, M, N), comercial o E2 (B, E, H y K, N, P) y avanzado o E3 (C, F, I y L, Ñ, Q); cosechados en tres estaciones diferentes: primavera (A, B, C y J, K, L), verano (D, E, F y M, N, Ñ) y otoño (G, H, I y O, P, Q). Magnificación 100x. Teñidas con Safranina.

En lo que respecta al efecto de la estación de cosecha, los frutos cosechados en O (Fig 2: G, H, I y O, P, Q) mostraron cierta pérdida de integridad celular, al igual que lo observado dentro del tejido epidérmico, dando un aspecto de un tejido aireado pero seco. Este comportamiento resulta similar al trastorno relacionado con un almacenamiento a baja temperatura observado en los frutos de carozo llamado leatheriness, en el que se observa un fruto con textura seca y alto grado de engrosamiento de la pared celular (Luza et al., 1992; Ju et al., 2001). Por otro lado, los frutos cosechados en P (Fig 2: A-B-C y J-K-L) tuvieron un comportamiento similar a V (Fig 2: D-E-F y M-N-Ñ), donde mantuvieron la integridad celular, y se evidenció un tejido menos compacto, más aireado, con largas ramificaciones que se traducen en grande espacios, dando idea a un tejido más tierno.



Tasa de crecimiento y materia seca

Los DAFS necesarios para alcanzar los distintos estados de crecimiento se vieron afectados por la estación de cosecha, observándose una disminución de la velocidad de crecimiento de los frutos hacia el final del ciclo productivo, otoño (O). En O se necesitó alrededor de 3, 4 y 5 veces el tiempo requerido en las restantes estaciones para lograr los E1, E2 y E3, respectivamente (Tabla 1). La menor velocidad de crecimiento en O puede asociarse a que la temperatura ambiente (5-15 °C) se encontraba en el límite mínimo en el que la planta de berenjena se desarrolla con normalidad (15-25 °C) (Chen y Li, 1996). Así los frutos cosechados en P y V, donde la temperatura ambiente fue similar (entre 14 y 26 °C), tardaron 10 DAFS en alcanzar el E1, mientras que los cosechados en O demoraron 26 DAFS (Tabla 1). El E2 se alcanzó luego de 16, 20 y 52 DAFS en P, V y O, respectivamente (Tabla 1). En tanto los frutos tardaron 19, 27 y 62 DAFS en llegar al E3 para las cosechas de P, V y O, respectivamente (Tabla 1). En concordancia, Leonardi y Giuffrida (2010) observaron que berenjenas obtenidas durante los meses de primavera-verano tuvieron una rápida tasa de crecimiento y alcanzaron rápidamente el tamaño máximo respecto de aquellos frutos recolectados en otoño-invierno.

El contenido de materia seca varió conforme aumentaba el tamaño del fruto. Así, disminuyó en P, se mantuvo constante en V, y aumentó en O (Tabla 1). Cabe recordar que en O, los frutos presentaron una menor velocidad de crecimiento y por tanto debieron estar unidos a la planta un período de tiempo más largo para alcanzar los tamaños más grandes, E2 y E3, lo que les ha permitido asimilar un mayor nivel de nutrientes y con ello alcanzar los mayores valores de materia seca.

Espesor de la cutícula

La cutícula se extiende en forma de una membrana continua que cubre toda la superficie del fruto (Fig 1 A-J). En general la cutícula tiende a engrosarse a medida que el fruto crece, lo que indica un proceso de síntesis y deposición continua de componentes. Su espesor puede variar entre los 0.5 y 15 μm dependiendo de la especie vegetal y el estado de desarrollo del fruto (Jenks et al., 2002). Para el E1 el espesor de la cutícula alcanzó valores de 1-1.4 μm , independientemente de la estación de cosecha (Tabla 1). Por el contrario se observó un comportamiento diferencial en su deposición según el momento de cosecha para los frutos en estados de crecimiento más avanzados. Así, la cutícula se engrosó desde frutos E1 a E2 siendo 2.8 y 2 veces mayor en P y V, respectivamente, a diferencia de lo ocurrido en O donde la cutícula no se engrosó (Tabla 1), siendo siempre una cutícula fina. Lo observado numéricamente se evidencia claramente en las micrografías de la Fig 1. Se ha reportado que la síntesis de compuestos cuticulares puede ser afectada por factores ambientales (Jetter et al., 2006) ya que requiere gran cantidad de energía y la coordinación de la actividad de numerosas enzimas (Bargel et al., 2006; Yeats et al., 2010). Así, durante el O las bajas temperaturas reinantes podrían ser las responsables del no engrosamiento de la cutícula.



Firmeza del fruto y de la pulpa

A lo largo del crecimiento del fruto no se observó una tendencia única para la firmeza del fruto y de la pulpa, sino que la misma varió con la estación de cosecha.

La firmeza de los frutos cosechados en P disminuyó un 33% a lo largo del desarrollo, entre el E1 y E3, mientras que, en V aumentó entre E1 y E2 para luego mantenerse constante (Tabla 1). Finalmente, en O la firmeza presentó un marcado aumento (60%) entre E1 y E3 (Tabla 1). Estos altos valores de firmeza en el O no se correlacionaron con un mayor espesor de cutícula de los frutos; por lo que se podría pensar con mayor énfasis en la posibilidad de un incremento de la rigidez de la cutícula por un mayor grado de entrecruzamiento compuestos no lipídicos como compuestos fenoles libres, flavonoides, taninos y polisacáridos (Dominguez et al., 2009; Lara et al., 2014). También, podría deberse a que el fruto está expuesto a temperaturas menores a la fase de transición de la cutícula (Eckl y Gruler, 1980). A su vez, la pérdida de turgencia y de integridad del pericarpio y endocarpio, junto a la apariencia seca y mayor contenido de materia seca de los frutos cosechados en O podría también estar contribuyendo a esta mayor firmeza del fruto.

La firmeza de la pulpa disminuyó en función del avance del crecimiento entre E1 y E3 para todas las estaciones de cosecha. Así, disminuyó un 76 % en P y V, y sólo un 14% en O (Tabla 1). Estos valores de firmeza de los frutos cosechados en O estaría en sintonía con la apariencia seca y firme de la pulpa y con lo observado en la microestructura del tejido endocárpico (Figura 2: O, P, Q). También, podría pensarse que esté ocurriendo algo similar al leatheriness observado en duraznos como síntoma de daño por frío, donde las células se deforman y colapsan generando un tejido más firme y seco (Luza et al., 1992), debido a una reducción de la degradación de pectina por parte de la enzima poligalacturonasa (Ju et al. 2001). Se necesitarían futuros ensayos tendientes a confirmar si también podría estar ocurriendo un fenómeno similar en berenjena.

Tabla 1. DAFS, materia seca, espesor de cutícula y firmeza del fruto y de la pulpa para tres estados de desarrollo: baby o Estado 1 (E1), comercial o Estado 2 (E2) y avanzado o Estado 3 (E3); cosechados en tres estaciones distintas a lo largo de su ciclo productivo: primavera, verano y otoño. Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$.

	DAFS (días)			Materia seca (%)			Espesor de cutícula (μm)			Firmeza del fruto (N/s)			Firmeza de la pulpa (N/s)		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
Primavera	10	16	19	5,8 ^a	5,1 ^{cd}	4,6 ^e	1,4 ^c	3,9 ^a	4,0 ^a	4,5 ^c	3,4 ^f	3,0 ^g	13 ^c	5 ^e	3 ^f
Verano	10	20	27	5,3 ^{bc}	5,0 ^{cde}	5,3 ^{bc}	1,0 ^c	2,0 ^b	2,2 ^b	3,9 ^e	4,3 ^{cd}	4,3 ^{cd}	16 ^{ab}	5 ^e	4 ^c
Otoño	26	52	62	4,8 ^{de}	5,6 ^{ab}	5,5 ^{ab}	1,4 ^c	1,3 ^c	1,3 ^c	4,1 ^{de}	5,2 ^b	6,7 ^a	16 ^a	10 ^d	14 ^{bc}

Conclusión

Tanto la microestructura como la firmeza del fruto se vieron afectadas por el estado de crecimiento y por la estación de cosecha. Siendo los frutos cosechados en O los más afectados, principalmente en los estados más avanzados, mientras que P y V se



comportaron de manera similar. A su vez, no se halló una correlación directa entre espesor de cutícula y firmeza del fruto, sino que más bien esta última depende en parte de la organización celular y de la integridad del tejido.

Referencias

- BAKER EA, BUKOVAC MJ, HUNT GM. (1982) Composition of tomato fruit cuticle as related to fruit growth and development. In: *Cutler DF, Alvin KL, Price CE (eds) The Plant Cuticle*. Academic Press, London, pp. 33–44.
- BARGEL H, KOCH K, CERMAN Z, NEINHUIS C. (2006) Structure function relationships of the plant cuticle and cuticular waxes a smart material? *Funct. Plant Biol.* 33:893-910.
- CHEN N, LI H. (1996). Cultivation and breeding of eggplant. En: *Training Workshop on Vegetable Cultivation and Seed Production*. Disponible en: http://203.64.245.61/fulltext_pdf/eam0137.pdf [23 Agosto 2017]
- DOMÍNGUEZ E, HEREDIA-GUERRERO JA, HEREDIA A. (2011). The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New phytologist*, 189(4): 938-949.
- EDELMANN HG, NEINHUIS C, BARGEL H. (2005). Influence of hydration and temperature on the rheological properties of plant cuticles and their impact on plant organ integrity. *J. Plant Growth Regul.* 24: 116–126.
- JENKS M, EIGENBRODE S, LEMIEUX B. (2002) Cuticular waxes of Arabidopsis. *J. Cell Biol.* 17: 208-212.
- JETTER R, KUNST L, SAMUELS L. (2006) Composition of plant cuticular waxes. In: *Biology of the Plant Cuticle. M Riederer, C Müller (eds)*. Julius-von-Sachs-Institut, für Biowissenschaften Universität Würzburg, Germany. pp:145-175.
- JU Z, DUAN Y, JU Z, GUO A. (2001). Different responses of ‘Snow Giant’ and ‘Elegant Lady’ peaches to fruit maturity and storage temperature. *Journal of Horticultural Science e Biotechnology*, 76: 575-580.
- LARA I, BELGE B, GOULAO LF. (2014). The fruit cuticle as a modulator of postharvest quality. *Postharvest Biology and Technology*, 87: 103-112.
- LEONARDI C, GIUFFRIDA F. (2008). Growth rate and carpometric characteristics during eggplant fruit growth. In: *International Symposium on Strategies Towards Sustainability of Protected Cultivation in Mild Winter Climate 807*:. 175-180.
- LUZA JG, VAN GORSEL R, POLITO VS, KADER AA. (1992). Chilling injury in peaches: a cytochemical and ultrastructural cell Wall study. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117: 114–118.
- MARTIN JT, JUNIPER CE (1970). *The Cuticles of Plants*. Edward Arnold, London, pp. 158, 178, 185–188.
- PETIT-JIMÉNEZ D, GONZÁLEZ-LEÓN A, GONZÁLEZ-AGUILAR G, SOTELO-MUNDO R, BÁEZ-SAÑUDO R. (2007). Cambios de la cutícula durante la ontogenia del fruto de *Mangifera indica* L. *Rev. Fitotec. Mex*, 30(1): 51-60.



PUIG A, PEREZ-MUNUERA I, CARCEL JA, HERNANDO I, GARCIA-PEREZ J. V. (2012). Moisture loss kinetics and microstructural changes in eggplant (*Solanum melongena* L.) during conventional and ultrasonically assisted convective drying. *Food and Bioprocess Processing*, 90(4): 624-632.

SUN W, WANG D, WU Z, ZHI J, (1990). Seasonal change of fruit setting in eggplants (*Solanum melongena* L.) caused by different climatic conditions. *Sci. Hortic.*, 44: 55–59.

YEATS T H, HOWE KJ, MATAS AJ, BUDA GJ, THANNHAUSER TW, ROSEJKC. (2010) Mining the surface proteome of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit for proteins associated with cuticle biogenesis. *J. Exp. Bot.* 61: 3759-3771.

WALDRON KW, SMITH AC, PARR AJ, NG A, PARKER ML. (1997). New approaches to understanding and controlling and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. *Trends in Food Science & Technology*. 8(7): 213-221.



Nuevas tecnologías para agregado de valor



Tratamientos con luz de baja intensidad para retrasar la senescencia durante el almacenamiento de brócoli a temperatura ambiente: ¿clorofilas o fitocromos?

Favre N. ⁽¹⁾, Bárcena A. ⁽²⁾, Vera Bahima J. ⁽²⁾, Martínez G. ⁽³⁾, Costa L. ^(1,2)

(1) Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

(2) Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE)

(3) CONICET-FCAyF, UNLP, La Plata

Dirección de e-mail: favremnoelia@gmail.com

Resumen

Para el consumo de brócoli se cosechan las inflorescencias inmaduras mediante un corte en el tallo que las soporta. El corte induce la senescencia de los tejidos, cuyos principales síntomas son la degradación de proteínas y de clorofilas que se manifiesta como la pérdida del color verde y por lo tanto pérdida de calidad comercial del producto. En un primer ensayo se tomó como referencia la degradación de ambos parámetros y se seleccionó como tratamiento efectivo para retrasar la senescencia el uso de pulsos de 2 horas diarias con luz blanca de baja intensidad ($20-25 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) durante el almacenamiento en oscuridad de brócoli a temperatura ambiente. El retraso de la senescencia postcosecha ocasionado por el tratamiento con luz podría ser debido a la recuperación de fotosíntesis, es decir mediado por clorofilas o bien un mecanismo mediado por otros fotoreceptores que actuarían como intermediarios de señales que modifican numerosos procesos metabólicos. Uno de los fotoreceptores más estudiados son los fitocromos que absorben la luz roja y su mecanismo de acción se revierte por la luz roja lejana. El objetivo de este trabajo fue analizar si el efecto de la luz de baja intensidad sobre la senescencia postcosecha de brócoli es un mecanismo mediado por clorofilas o por fitocromos. Para ello se realizaron los tratamientos con pulsos de 2 h de luz de baja intensidad ($20-25 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), pero utilizando diferente calidad de luz: blanca (B), roja (R) y roja lejana (RL); además de un tratamiento control siempre en oscuridad (C). Para los tratamientos R y RL se colocaron filtros LEE adecuados entre las lámparas de luz blanca y las muestras. Se determinó el % de pérdida de peso, la disminución del color utilizando un colorímetro, el contenido de pigmentos en extractos con acetona 80%, el contenido de proteínas por electroforesis y el contenido de azúcares totales y solubles utilizando el método de Somogyi & Nelson. Los resultados indican que los tratamientos B y R retrasaron la senescencia postcosecha de brócoli ya que retuvieron el color, las clorofilas, las proteínas y los azúcares en comparación al control. Durante la senescencia postcosecha de brócoli no se observó acumulación de azúcares en ningún tratamiento. Sólo las retenciones de color, clorofilas y proteínas que se lograron con el tratamiento R fueron claramente revertidas por el RL. Estos resultados sugieren que el retraso de la senescencia no se debe a un mecanismo de fotosíntesis, sino que posiblemente los fitocromos actúan como reguladores.

Palabras clave: rojo-rojo lejano, clorofilas, proteínas, azúcares



Introducción

El consumo de brócoli ha aumentado notablemente en las últimas décadas, debido a su alto contenido de vitaminas, antioxidantes y compuestos anticancerígenos como los glucosilanatos (Yuan et al., 2010). Para comercializar el brócoli se cosechan las inflorescencias inmaduras, por lo que al tratarse de un vegetal en activo crecimiento la cosecha induce rápidamente el proceso de senescencia en estos tejidos, ya que además del estrés ocasionado por el corte, los tejidos quedan desprovistos de toda fuente de energía, nutrientes y hormonas (King y Morris, 1994). Durante la senescencia postcosecha de brócoli se produce el amarillamiento, acompañado por otros cambios bioquímicos que afectan la calidad nutricional y comercial del producto (Costa et al., 2006; Zhan et al., 2012; Ma et al., 2014). La vida útil de estos vegetales no supera los 3 o 4 días a temperatura ambiente y 3 semanas si se almacenan refrigerados (Toivonen y Forney, 2016). Dada esta característica es fácil comprender el problema existente para la comercialización de este producto en zonas alejadas del lugar de producción. El procedimiento generalmente utilizado para el manejo postcosecha de brócoli es el almacenamiento bajo condiciones de alta humedad relativa y refrigeración. En general no se hacen recomendaciones respecto a la luz, sólo que es conveniente el almacenamiento sin iluminación porque generalmente los sistemas de iluminación aumentan la temperatura del ambiente (Toivonen y Forney, 2016). Desde hace mucho tiempo se conoce que la senescencia es inducida por oscuridad y que en el caso de hojas puede revertirse en las etapas iniciales transfiriendo los tejidos nuevamente a la luz (Zavaleta-Mancera, 1999). En base a esto se ha comenzado a trabajar en la posibilidad de utilizar luz durante el almacenamiento postcosecha de vegetales verdes. Zhan et al. (2012) utilizaron luz continua de baja intensidad para retrasar la senescencia durante el almacenamiento de brócoli a baja temperatura y observaron que disminuyó la pérdida de color, se conservó la textura y el aroma, pero aumentó la pérdida de peso. En un trabajo previo logramos seleccionar un tratamiento con pulsos de luz de baja intensidad (2h diarias con luz blanca de 20-25 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{m}^{-2}$) que resultó efectivo para retrasar la senescencia postcosecha de brócoli ya que las muestras tratadas retuvieron clorofilas y proteínas respecto a muestras no tratadas (Favre et al., 2016). Ahora bien la luz puede actuar como un factor que regula la senescencia por dos mecanismos diferentes. Uno relacionado con la actividad fotosintética en el que las clorofilas actuarían como los fotorreceptores y sería posible recuperar la capacidad de sintetizar azúcares y con ello retrasar la senescencia. El otro mecanismo totalmente diferente, podría involucrar la participación de los fitocromos, fotorreceptores que adquieren su forma activa absorbiendo luz roja y cuyas respuestas fisiológicas pueden revertirse absorbiendo luz en el rojo lejano (Quail, 2002). Hasta el presente se han realizado muy pocos estudios sobre las bases fisiológicas de los tratamientos con luz durante el almacenamiento postcosecha. Sólo en el caso de albahaca se ha demostrado que el efecto de los pulsos de luz sobre el metabolismo de proteínas durante la senescencia postcosecha es sistémico y está mediado por fitocromos (Costa et al., 2013).

El objetivo de este trabajo fue indagar sobre las bases fisiológicas que permitirían explicar el retraso de la senescencia postcosecha de brócoli por efecto de los tratamientos con pulsos de luz de baja intensidad.



Materiales y Métodos

Diseño del experimento

Se trabajó con cabezas centrales de brócoli, *Brassica oleracea* L. var. *Italica*, cv Legacy, cultivadas a campo, por un productor local del cinturón hortícola de La Plata. Las muestras fueron cosechadas y trasladadas inmediatamente al laboratorio. Cada cabeza se colocó en una bandeja de PVC con tapa perforada. Para analizar si los fitocromos están involucrados en el efecto de retraso de la senescencia postcosecha de brócoli se realizaron tratamientos diarios de 2 h de luz de baja intensidad ($20\text{-}25 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$) utilizando diferente calidad de luz: luz blanca, luz roja y luz enriquecida en rojo lejano. Para los tratamientos con luz roja y luz enriquecida en rojo lejano se utilizaron filtros LEE ubicados entre las lámparas y las muestras como se describe en Costa et al. (2013). La intensidad de la luz se midió con un sensor cuántico de radiación fotosintéticamente activa (RADIAPAR, Cavadevices, Argentina) y se analizaron las cualidades espectrales con un espectrómetro (USB650, Red Tide, OceanOptics, USA). Se prepararon 7 bandejas para cada tratamiento y además 7 bandejas adicionales que no fueron tratadas con luz las que se utilizaron como controles. Luego de los tratamientos las muestras fueron almacenadas en oscuridad a 20°C. Se midió diariamente el color superficial y el peso fresco para calcular el porcentaje de pérdida de peso. Se tomaron muestras de las inflorescencias al comienzo y luego de 3 días de almacenamiento. Se congelaron las muestras de cinco cabezas por tratamiento a -80°C, y se conservaron a -20°C hasta el momento de los análisis. Para medir peso seco, se tomaron flores de cinco cabezas por tratamiento y se secaron en estufa a 60°C hasta peso constante.

Medida de color

Las medidas de color superficial se realizaron utilizando un colorímetro (Minolta CR300, Osaka, Japón), que permitió obtener los datos sin destrucción de muestras, midiendo los parámetros L^* , a^* y b^* . El ángulo de matiz (H°) se calculó como $H^\circ = \tan^{-1}(b/a)$, cuando $a > 0$ y $b > 0$, o como $h^\circ = 180^\circ - \tan^{-1}(b/a)$ cuando $a < 0$ y $b > 0$. Se realizaron diariamente cinco mediciones por cada cabeza.

Medida del contenido de clorofilas

El contenido de pigmentos se determinó espectrofotométricamente de acuerdo con Lichtenthaler (1987). Aproximadamente 5 g de inflorescencias congeladas fueron trituradas y se tomaron aproximadamente 0,250 g del triturado. Se homogeneizaron dos veces con 1,5 ml de acetona al 80% (v/v), cada homogenato se centrifugó a 6000 x g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes de cada muestra se recuperaron y se midió la absorbancia a 663,2 y 646,8 nm. Se calculó el contenido total de clorofilas utilizando las ecuaciones de Lichtenthaler y Wellburn (1983). Los resultados se expresaron como μg de pigmento por g de peso seco. Se analizaron 5 muestras por tratamiento y para cada fecha de muestreo.



Medida del contenido de proteínas solubles

La medida del contenido de proteínas solubles se realizó según Eason et al. (2014). Aproximadamente 5 g de inflorescencias de brócoli se trituraron y 0,5 g del triturado se homogenizaron con 1,5 mL de buffer de extracción (tris-hidroximetilaminometano-HCl, pH 7, con EDTA 1 mM y PMSF 1 mM). Luego se centrifugaron las muestras a 4 °C durante 10 min a 10000 xg. Se midió el contenido de proteínas en el sobrenadante mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS PAGE), utilizando el procedimiento clásico de Laemmli (1970). Las proteínas se visualizaron mediante la tinción con Coomassie Brilliant BlueR-250. Los geles se fotografiaron con una cámara digital y se cuantificaron las bandas obtenidas utilizando el programa SIGMA GEL. Se incluyeron diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) o marcadores de peso molecular (Sigma) en cada gel como estándar para realizar la cuantificación. Se analizaron 5 muestras por tratamiento y para cada fecha de muestreo.

Medida del contenido de fenoles

El contenido total de fenoles se determinó espectrofotométricamente según Costa et al. (2006) con ligeras modificaciones. Aproximadamente 5 g de inflorescencias congeladas se trituraron y 0,5 g del triturado se homogenizaron con 1,5 mL de etanol al 96% (v / v) y se centrifugaron a 9000 xg y 4 °C durante 20 min. El contenido de fenoles totales se midió usando el reactivo de Folin- Ciocalteu. Se midió la absorbancia a 760 nm. Los resultados se expresaron como µg de fenol por g de tejido en base seca. Se analizaron 5 muestras de cada tratamiento en cada fecha de muestreo.

Medida del contenido de azúcares totales y solubles

El contenido de azúcares reductores, insolubles y solubles se determinó usando el método de Somogy Nelson (Southgate et al., 1976, Hasperué et al., 2011). Aproximadamente 5 g de inflorescencias congeladas fueron trituradas y se tomaron muestras de 0,150 g las que se homogeneizaron dos veces con 1 ml de etanol al 96% (v / v). El homogenato se centrifugó a 9000 x g durante 5 min a 4°C. Los sobrenadantes correspondientes a cada muestra se utilizaron para el análisis de azúcares reductores solubles. El pellet obtenido después de las dos extracciones con etanol se hidrolizó con 1,5 ml de HCl al 1,1% a 100°C durante 30 min. Después de enfriar, la suspensión obtenida se centrifugó a 9000 x g durante 5 min a 4°C y el sobrenadante se usó para analizar azúcares insolubles (los que habían quedado en el pellet de la extracción etanólica). Para la determinación de azúcares se utilizó la reacción de Somog y Nelson y se midió la absorbancia a 520 nm. Se usó glucosa como estándar para la curva de calibración. Se calculó el contenido de azúcares totales sumando las fracciones soluble e insoluble. Los resultados se expresaron como mg de azucares por g de peso seco. Se analizaron cinco repeticiones por tratamiento para cada fecha de muestreo.



Resultados y Discusión

En un trabajo previo se seleccionó el tratamiento con pulsos diarios de 2h de luz blanca de baja intensidad ($20-25 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$) como tratamiento efectivo para retrasar la senescencia postcosecha de brócoli, ya que retrasó la pérdida de color y la degradación de proteínas y clorofilas (Favre et al., 2016). En este trabajo, la luz roja y luz blanca retrasaron el amarillamiento, la degradación de clorofilas y de proteínas (Figura 1 y 2). Dado que los efectos de la luz roja fueron revertidos con la luz enriquecida en rojo lejano, podemos inferir que los fitocromos juegan un papel regulatorio en el retraso de los síntomas mencionados.

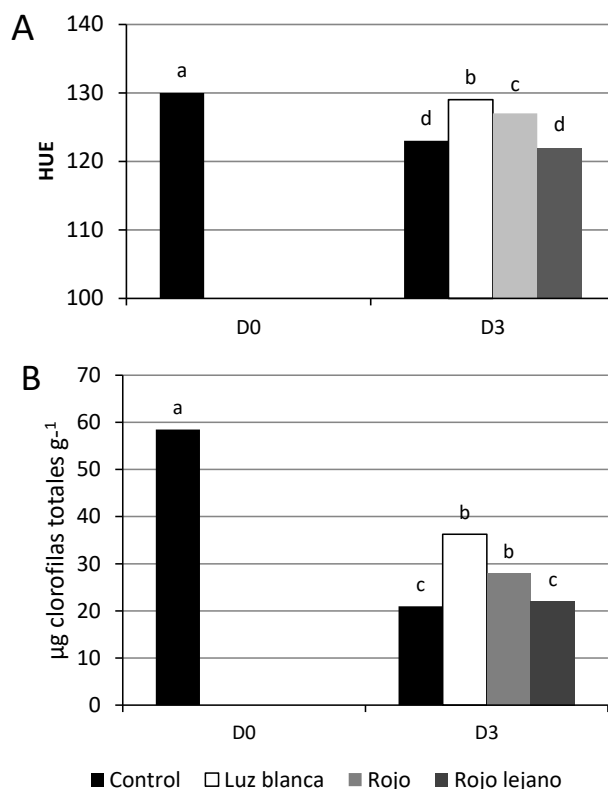


Fig 1: Pérdida de color (A), contenido de clorofilas totales (B) en inflorescencias al inicio (D0) y luego de 3 días de almacenamiento (D3).

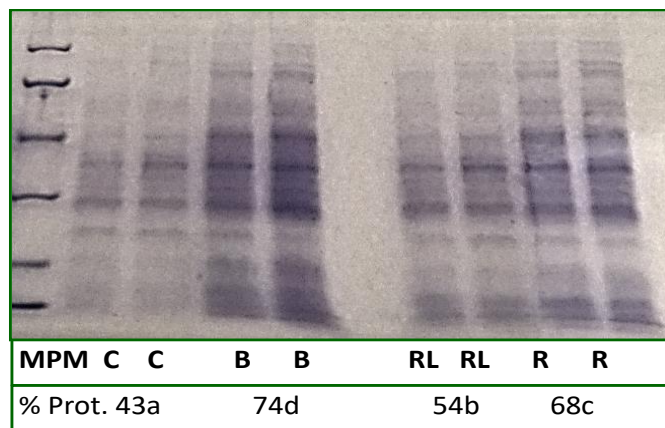


Fig. 2: Contenido de proteínas luego de 3 días de almacenamiento.

En cuanto al contenido de fenoles, se observó que el tratamiento con luz blanca incrementó el contenido de fenoles, mientras los tratamientos con luz roja y con luz enriquecida con rojo lejano presentaron el mismo contenido que los controles (Figura 3). Estos resultados sugieren que los fitocromos no estarían involucrados en el efecto del tratamiento con luz blanca sobre el contenido de fenoles.

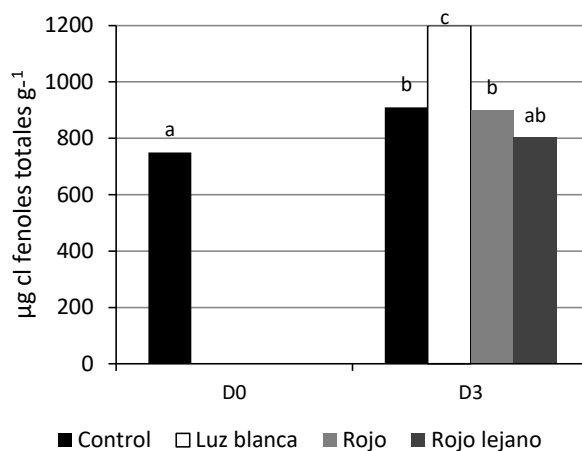


Fig.3: Contenido de fenoles al inicio (D0) y luego de 3 días de almacenamiento (D3).

Para indagar sobre la posibilidad de que el efecto de la luz sobre la senescencia postcosecha de brócoli se deba a una recuperación de la capacidad fotosintética se cuantificó el contenido de azúcares en las muestras (Tabla 1). El contenido de azúcares totales no se incrementó en ninguno de los tratamientos respecto al D0, lo que nos sugiere que no existiría a lo largo del almacenamiento la asimilación neta de dióxido de carbono (fotosíntesis neta). Este resultado concuerda con el hecho de que la baja intensidad de luz utilizada en los tratamientos corresponde a un valor que está por debajo del valor estándar del punto de compensación lumínica de los vegetales verdes (Costa et al., 2013). En cuanto al contenido de azúcares solubles reductores se observó



que independientemente de la calidad de luz todos los tratamientos retienen mayor contenido respecto al control luego de 3 días de almacenamiento (Tabla 1). Posiblemente el mayor contenido de azúcares respecto al control permita explicar en parte el retraso de la senescencia postcosecha ya que el rol de los azúcares solubles como reguladores de la senescencia ya ha sido descripto en brócoli (Hasperué et al., 2011).

Tabla 1: Contenido de azúcares solubles, insolubles y totales del D0 y D3.

	Azúcares solubles (mg g⁻¹)	Azúcares insoluble (mg g⁻¹)	Azúcares totales (mg g⁻¹)
D0	16.50 ± 1.70 a	4.37 ± 1.32 a	20.87 ± 3.02 a
D3 Control	6.00 ± 1.4 c	1.90 ± 0.50 b	7.90 ± 6.10 c
D3 LB	13.61 ± 0.87 b	2.40 ± 0.70 b	16.01 ± 1.57 b
D3 R	12.70 ± 1.3 b	1.70 ± 0.43 b,c	14.40 ± 1.73 b
D3 RL	12.90 ± 2.00 b	1.48 ± 0.16 c	16.38 ± 2.16 b

Conclusiones

Los tratamientos con pulsos de luz de baja intensidad serían una alternativa promisoriosa para retrasar la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a temperatura ambiente. El efecto sobre el amarillamiento y la degradación de clorofilas y proteínas fue similar en los tratamientos con luz blanca y con luz roja lo que sugiere la participación de los fitocromos como mediadores en el retraso de estos síntomas. Por el contrario, estos fotoreceptores no participarían en la acumulación de fenoles ya que el efecto del tratamiento con luz roja no logra la acumulación de fenoles que se obtiene en los tratamientos con luz blanca. Dado que no existe acumulación de azúcares en ninguno de los tratamientos resulta poco probable que el mecanismo de retraso de la senescencia se deba a una reversión de la fotosíntesis. Todos estos resultados nos llevan a pensar que el efecto de la luz sobre la senescencia tiene que ver con el efecto de fotoreceptores actuando como señales que conducen al retraso del desmantelamiento de los cloroplastos, síntoma específico de la senescencia. Finalmente, debemos mencionar que participarían otros fotoreceptores además de los fitocromos ya que los resultados obtenidos con el tratamiento con luz roja no logran igualar los efectos del tratamiento con luz blanca.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a los técnicos de apoyo de CONICET del INFIVE, Mauro Bartolozzi y Santiago Martínez, por ayudarnos con las instalaciones para realizar los experimentos. Esta investigación se realizó con fondos del CONICET (PIP0306)



Referencias

- COSTA M.L., VICENTE A.R., CIVELLO P.M., CHAVES A.R. MARTÍNEZ G.A. (2006). UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biol. Technol.* 39, 204–210.
- COSTA L., MONTANO Y., CARRIÓN C, ROLNY N, GUIAMET J.J. (2013). Application of low intensity light pulses to delay postharvest senescence of *Ocimum basilicum* leaves. *Postharvest Biol. Technol.*, 86, 181-191.
- FAVRE N., VERA BAHIMA J., MARTÍNEZ G.A., GUIAMET J.J. y COSTA L. (2016, Octubre). La luz blanca de baja intensidad durante el almacenamiento de brócoli a temperatura ambiente retrasa el amarillamiento. Poster presentado en 39° Congreso Argentino de Horticultura, Santa Fe, Argentina.
- GERGOFF GROZEFF G., CHAVES A., BARTOLI C. (2013). Low irradiance pulses improve postharvest quality of spinach leaves (*Spinaciaoleraceae* L. cv Bison). *Postharvest Biology and Technology* 77, 35–42.
- HASPERUÉ J.H., CHAVES A.R., MARTÍNEZ G.A. (2011). End of day harvest delays postharvest senescence of broccoli florets. *Postharvest Biol. Technol.* 59, 64–70.
- HASPERUÉ J.H, GUARDIANELLI L, RODONI L.M., CHAVES A.R., MARTÍNEZ G.A. (2016). Continuous white-blue LED light exposition delays postharvest senescence of broccoli. *LWT. Food Science and Technology*, 65, 495-502.
- KING G.A, MORRIS S.C. (1994). Early compositional changes during postharvest senescence of broccoli. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119(5): 1000-1005.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- MA G., ZHANG L., SETIAWAN C.K., YAMAWAKI, K., ASA, T., NISHIKAWA F., MAEZAWA S., SATO, H., KANEMITSU N., KATO, M. (2014). Effect of red and blue LED light irradiation on ascorbate content and expression of genes related to ascorbate metabolism in postharvest broccoli. *Postharvest Biology and Technology*. 94, 97–103.
- QUAIL P.H. (2002). Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 180–188.
- SOUTHGATE D.A.T., (1976). Determination of Food Carbohydrates. London: *Appl. Science Publ. Ltd.* 128-129.
- TOIVONEN P.M., FORNEY CH. (2016). “Broccoli” in The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks. Agriculture Handbook Number 66. Edited by Kenneth C. Gross, Chien Yi Wang, and Mikal Saltveit. Agricultural Research Service. Revised February 2016. <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/oc/np/CommercialStorage/CommercialStorage.pdf>. Accessed 31/10/17.
- YUAN G., SUN B., YUAN J., WANG Q. (2010). Effect of 1-methylcyclopropene on shelf life, visual quality antioxidant enzymes and health-promoting compound in broccoli florets. *Food Chemistry*. 118, 774-781.



ZVALETA-MANCERA H.A., FRANKLIN K.A., OUGHAM H.J., THOMAS H., SCOTT I.M. 1999. Regreening of senescent *Nicotiana* leaves: II. Redifferentiation of plastids. *J. Exp.Bot.* 50: 1677–1682.

ZHAN, L.J., HU, J.Q., LI, Y., PANG, L.G. (2012). Combination of light exposure and low temperature in preserving quality and extending shelf-life of fresh-cut broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Postharvest Biol. Technol.* 72, 76–81.



Variabilidad en las características físicas de los frutos de calafate (*Berberis microphylla*) cosechados de diferentes poblaciones de Tierra del Fuego

Guastavino N. ⁽¹⁾, Arena M. ^(1,2), Radice S. ^(1,2)

(1) Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Morón, Argentina.

(2) CONICET, Argentina.

Dirección de e-mail: nicoguastavino76@gmail.com

Resumen

Berberis microphylla G. Forst. (sinónimo de *B. buxifolia* Lam.) es un arbusto siempre verde y espinoso, que puede llegar hasta los 4 m de altura. En Tierra del Fuego a menudo crece en los montes bajos, en los márgenes y claros del bosque de *Nothofagus*, en áreas húmedas de estepas, a lo largo de ríos y arroyos. Sus pequeñas bayas púrpuras son consideradas como productos forestales no madereros y son empleadas en productos alimenticios como dulces, mermeladas, licores, bebidas sin alcohol, helados, confites y polvos deshidratados. El objetivo de este estudio fue evaluar la variabilidad en las características físicas de los frutos cosechados de 10 a 12 genotipos preseleccionados que crecen naturalmente en 3 sitios con características ambientales diferentes en la provincia de Tierra del Fuego, Argentina, a saber cercanías de Ushuaia, Lago Fagnano y Corazón de la Isla, en febrero de 2016. Así, en Ushuaia las precipitaciones acumuladas en el período octubre de 2015 a marzo de 2016 fueron superiores (240,9 mm) a las registradas en el Corazón de la Isla y Lago Fagnano (127,6 y 104,4 mm, respectivamente). Por otro lado, las temperaturas medias (°C) para el mismo período fueron de 7,9, 8,0 y 8,1, respectivamente, aunque las temperaturas medias en el mes más cálido (enero) fueron superiores en el Lago Fagnano (10,46 °C). Se determinaron el peso de frutos frescos, peso de frutos secos, diámetro ecuatorial, diámetro polar, número de semillas por fruto, peso de semillas, porcentaje de semillas por fruto, porcentaje de agua en los frutos y el porcentaje de la superficie de los frutos con coloración púrpura. Al analizar la variabilidad entre las poblaciones se encontraron diferencias significativas para el peso de fruto fresco, peso de fruto seco, diámetro ecuatorial, número de semillas, peso de las semillas, relación porcentual de las semillas en el fruto y porcentaje de agua en los frutos. Así, los máximos valores de peso fresco, peso seco, diámetro ecuatorial, número de semillas y peso seco de semillas y su relación al peso seco de los frutos se obtuvieron en el Lago Fagnano (0,35 g; 0,10 g; 8,3 mm; 6,49; 0,06 g y 55,10 % respectivamente). Los frutos con mayor porcentaje de agua fueron los de la población del Corazón de la isla (74,86%), los que a su vez presentaron también los frutos con menor peso fruto fresco y peso fruto seco, al igual que el menor diámetro Ecuatorial (0,29 g; 0,07 g y 7,79, respectivamente). Los frutos de la población de Ushuaia fueron los que presentaron menor número de semillas (5,2) y con el menor porcentaje de semillas en los frutos (43,1 %). Las diferencias encontradas en los parámetros estudiados en los frutos entre los tres sitios podrían deberse a la plasticidad fenotípica que presenta esta especie frente a condiciones ambientales notablemente distintas.



Palabras clave: patagonia, berries, peso, tamaño, semillas.

Introducción

Las especies del género *Berberis* son arbustos o pequeños árboles valiosos por sus propiedades medicinales, tintóreas y alimenticias (Fajardo Morales, 1987). En la Patagonia, el género *Berberis* posee una distribución amplia desde Neuquén hasta Tierra del Fuego y está bien representado por 16 especies de arbustos nativos (Orsi, 1984). Sin embargo, según una clasificación posterior del género realizada por Landrum (1999), el número de especies es menor al citado por los trabajos previos de Orsi (1984), dado que Landrum agrupa a especies como *B. buxifolia*, *B. microphylla* y *B. heterophylla* bajo un mismo nombre, *B. microphylla* G. Forst., postulando que las diferencias entre las mismas no se mantienen constantes como para conservar su rango de especie. Sin embargo, y si bien ésta es la última clasificación, se contradice con los estudios realizados tanto en el orden morfológico, bioquímico y molecular en el género *Berberis* por Bottini et al. (1999; 2000; 2007), quienes caracterizan y diferencian con precisión a las citadas especies por las técnicas por ellos empleadas.

Berberis microphylla G. Forst. es un arbusto siempre verde y espinoso, que puede llegar hasta los 4 m de altura. En Tierra del Fuego a menudo crece en los montes bajos, en los márgenes y claros del bosque de *Nothofagus*, en áreas húmedas de estepas, a lo largo de ríos y arroyos (Moore, 1983). Se reproduce por semillas (Arena y Martínez Pastur, 1994) y multiplica por rizomas (Arena et al., 1998). Florece en la primavera y sus frutos maduran hacia mediados del verano (Arena et al., 2003). Estos berries han sido incorporados al Código Alimentario Argentino (Resolución Conjunta 22/2006 y 409/2006 junto a frutas originarias de la zona andina), por lo que su empleo en productos alimenticios como dulces, mermeladas, licores, helados y confites ha sido autorizado. Además, la United States Department of Agriculture (USDA) ha aprobado el ingreso a los Estados Unidos del calafate, por lo cual el *Berberis* se halla en la lista de frutas y vegetales de dicho organismo. Se estima que anualmente se cosechan no menos de 10 a 15 toneladas de frutos de calafate provenientes de poblaciones naturales de la Patagonia para los usos descritos. En los últimos años, se incrementó la demanda de frutos de estos arbustos y el interés en su producción, por lo cual existe una gran necesidad de conocimientos sobre esta especie, sobre sus características nutraceuticas y biología reproductiva, que en parte ya se han publicado (Arena et al., 2012; 2013; Arena y Radice, 2014).

Los arbustos de *B. microphylla* crecidos naturalmente en diferentes zonas de la Patagonia argentina, manifiestan una alta variabilidad en los caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos (Bottini, 2000; Arena et al., 2011; Gambineri, 2012; Giordani et al., 2016), que se podría atribuir a adaptaciones a factores climáticos, edáficos y ecológicos (Bottini, 2000). Ciertos caracteres morfológicos cuali-cuantitativos de los diferentes órganos vegetativos y reproductivos de las plantas se correlacionan muy bien con la fase del ciclo biológico y con las variaciones en las condiciones ambientales, tornándose así en buenos marcadores que explican en gran parte, la variación fenotípica encontrada en muchos individuos de una población independientemente del genotipo (De Robertis, 1989).



El estudio de la variabilidad fenotípica inter poblacional de *B. microphylla* permitirá conocer las respuestas de esta especie frente a cambios en las condiciones ambientales. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar las características físicas de los frutos de los genotipos seleccionados de *B. microphylla* en tres poblaciones diferentes dentro de la provincia de Tierra del Fuego.

Materiales y Métodos

Datos geográficos y parámetros climáticos.

Las plantas adultas de *B. microphylla* G. Forst. seleccionadas para este estudio ($n=36$), crecen naturalmente en tres poblaciones en la provincia de Tierra del Fuego (Argentina), a saber: en las cercanías de la ciudad de Ushuaia, $54^{\circ} 48' \text{ LS}$, $68^{\circ} 19' \text{ LO}$, en el margen del lago Fagnano (Ruta Nacional N°3, km 2980, $54^{\circ} 36' \text{ LS}$, $67^{\circ} 38' \text{ LO}$) y en el Corazón de la Isla de Tierra del Fuego, en las cercanías de Tolhuin ($54^{\circ} 28' \text{ LS}$, $67^{\circ} 33' \text{ LO}$). Los datos climáticos registrados para el período octubre de 2014 a marzo de 2016 fueron: temperatura del aire diaria máxima (TMA), mínima (TMI) y media (TME), humedad relativa del ambiente diaria media (HR) y precipitaciones acumuladas (PA). En las cercanías de Ushuaia, los datos fueron registrados por la Estación Meteorológica ubicada en el Centro Austral de Investigaciones Científicas (CONICET, Argentina), mientras que los del lago Fagnano fueron tomados por una estación meteorológica allí ubicada, y en el Corazón de la Isla por las estaciones meteorológicas en las Estancias Indiana y Carmen.

Material vegetal y muestreos.

Sobre muestras de frutos cosechados (200 g) en el mes de febrero de 2016, y a partir de 10 a 14 genotipos preseleccionados de *B. microphylla* G. Forst. para cada población se estudiaron las siguientes variables:

- Coloración púrpura de la epidermis de los frutos medida en porcentaje (C).
- Peso fresco (PFF) y peso seco de frutos (PSF) luego de haber sido colocados en estufa a 50°C y por 7 a 10 días hasta peso constante.
- Contenido de humedad de los frutos medida en porcentaje (H).
- Medida de los frutos: (diámetro ecuatorial (DE) y diámetro polar (DP), tomado con un calibre digital Mitutoyo Modelo 500-196, $150\text{mm} \times 6'' - 0.01 \text{ mm} \times 0.0005''$).
- Número de semillas por fruto (N° SEM).
- Peso seco de las semillas por fruto (PSEM).
- Peso seco de las semillas /peso seco de los frutos (%SEM).

Los datos se analizaron mediante el análisis de la varianza usando el programa IBM SPSS Statistics 24 y las medias se separaron a través del Test de Tukey.



Resultados y Discusión

La evaluación de las características físicas de los frutos cosechados de las tres poblaciones mostró diferencias significativas en el peso fresco, peso seco, humedad, diámetro ecuatorial, número y peso de las semillas y en la relación porcentual de las semillas en el fruto (Tabla 1). Así, los máximos valores de peso fresco, peso seco, diámetro ecuatorial, número de semillas, peso seco de semillas y su relación al peso seco de los frutos se obtuvieron en el Lago Fagnano (0,35 g; 0,10 g; 8,3 mm; 6,49; 0,06 g y 55,10 %, respectivamente). Los frutos con mayor porcentaje de humedad fueron los de la población del Corazón de la Isla (74,86%), los que a su vez presentaron también los frutos con menor peso fresco y peso seco, al igual que el menor diámetro ecuatorial (0,29 g; 0,07 g y 7,79 respectivamente). Los frutos de la población de Ushuaia fueron los que presentaron menor número de semillas (5,2) y con el menor porcentaje de semillas en los frutos (43,10 %).

Tabla 1. Análisis de las propiedades físicas de los frutos de *B. microphylla* entre las poblaciones de Ushuaia, Lago Fagnano y Corazón de la isla (Tolhuin) en febrero de 2016. Coloración púrpura de la epidermis de los frutos (C), peso fresco de los frutos (PFF), peso seco de los frutos (PSF), porcentaje de humedad de los frutos (H), diámetro ecuatorial (DE), diámetro polar (DP), número de semillas por fruto (N° SEM), peso seco de las semillas (P SEM) y relación porcentual del peso seco de las semillas en el fruto (% SEM), ($n= 12$).

Población	C	PFF	PSF	H	DE	DP	N°SEM	PSEM	%SEM
	%	g	g	%	mm	mm	N°	g	%
Ushuaia	86,31a	0,31b	0,08b	73,05b	8,13ab	8,22a	5,21b	0,04b	43,10c
Fagnano	87,33a	0,35a	0,10a	70,93c	8,33a	8,39a	6,49a	0,06a	55,10a
Corazón Isla	85,21a	0,29b	0,07c	74,86a	7,79b	8,22a	5,31b	0,04b	50,65b
<i>F</i>	0,14	7,00	19,88	19,73	5,27	1,00	9,88	25,95	29,00
<i>p</i>	0,87	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,37	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Valores seguidos por letras diferentes en la columna son significativamente diferentes de acuerdo al Test de comparaciones múltiples de Tukey a $p \leq 0,05$.

En Ushuaia, las precipitaciones acumuladas en el período octubre de 2015 a marzo de 2016 (240,9 mm) fueron superiores a las registradas en el Corazón de la Isla y Lago Fagnano (127,6 y 104,4 mm, respectivamente). Por otro lado, las temperaturas medias (°C) para el mismo período fueron de 7,9, 8,0 y 8,1 respectivamente. En particular en el Lago Fagnano se registraron las temperaturas medias del mes más cálido (enero) superiores (10,5 °C) y los valores de humedad relativa ambiente fueron notablemente mayores en todo el período estudiado respecto de las poblaciones de



Ushuaia y el Corazón de la Isla. Esta diferencia se incrementó en un 10 % en el periodo “cuajado de fruto – madurez de cosecha”, respecto de los valores registrados en Ushuaia y Tolhuin.

Las condiciones climáticas afectan de forma directa el crecimiento de los frutos de *B. microphylla* (Arena, 2016); por tal motivo, las condiciones de temperatura y humedad ambiente registradas en el Lago Fagnano podrían haber influido en los mayores valores encontrados para la mayoría de las variables de los frutos de esta población. Por otro lado, el contenido de materia orgánica, carbono orgánico y la relación carbono/nitrógeno de los suelos en las tres poblaciones poseen valores elevados mientras que el contenido de nitrógeno total y fósforo son menores en el Corazón de la Isla (Arena, comunicación personal). Sin embargo, el pH del suelo en la población del Lago Fagnano es de 6,3, es decir próximo a la neutralidad hecho que podría favorecer la mayor disponibilidad de los nutrientes.

Los resultados obtenidos de las propiedades físicas de los frutos de la población Ushuaia cosechados en el año 2016 fueron diferentes de los encontrados por Arena y Curvetto (2008). El peso y tamaño de los frutos del 2016 fue menor que los citados en dicho trabajo, poniendo de manifiesto la necesidad de realizar estudios plurianuales.

Conclusiones

Las diferencias encontradas en los parámetros estudiados en los frutos entre los tres sitios y su correlación con las condiciones ambientales podrían deberse a la plasticidad fenotípica que presenta esta especie frente a las mismas.

Agradecimientos

A Julio Escobar (CADIC-CONICET) por su ayuda técnica.

Referencias

ARENA ME. (2016). Estudio de algunos fenómenos morfofisiológicos y cambios bioquímicos en *Berberis microphylla* G. Forst. (sinónimo *B. buxifolia*) asociados a la formación y maduración de frutos en Tierra del Fuego y su relación con la producción de metabolitos útiles. Tesis Doctoral. UN Sur, 234 pág.

ARENA ME, CURVETTO N. (2008). *Berberis buxifolia* fruiting: kinetic growth behavior and evolution of chemical properties during the fruiting period and different growing seasons, en: *SciHortic*, 118: 120-127.

ARENA ME, GIORDANI E, RADICE S. (2011). Flowering, fruiting and leaf and seed variability in *Berberis buxifolia*, a native Patagonian fruit species. En: *Native Species: Identification, Conservation and Restoration*. Nova Sciences Publishers, New York. Pág 117-136. ISBN: 978-1-61470-613-7. 176 pág. Editores: L. Marin and D. Kovac.



- ARENA ME, GIORDANI E, RADICE S. (2013). Phenological growth and development stages of the native Patagonian fruit species *Berberis buxifolia* Lam., en: *J Food Agric Environ*, 11 (3&4): 1323-1327.
- ARENA ME, MARTINEZ PASTUR G.(1994). Seed propagation of *Berberis buxifolia* Lam., en: *Phyton*, 56(XII): 59-63.
- ARENA ME, POSTEMSKY P, CURVETTO NR. (2012). Accumulation patterns of phenolic compounds during fruit growth and ripening of *Berberis buxifolia*, a native Patagonian species, in: *New Zeal J Bot*, 50 (1): 15–28.
- ARENA ME, RADICE S. (2014). Shoot growth and development of *Berberis buxifolia* Lam. in Tierra del Fuego (Patagonia), en: *SciHortic*, 165: 5-12.
- ARENA ME, VATER G, PERI P. (1998). Propagación por rizomas de *Berberis* de la Patagonia Austral. IX Congreso Latinoamericano de Horticultura. XLIX Congreso Agronómico de Chile. 30 de Noviembre al 3 de Diciembre de 1998. Santiago, Chile.
- ARENA ME, VATER G, PERI P. (2003). Fruit production of *Berberis buxifolia* Lam in Tierra del Fuego, en: *HortSci*, 38(2): 200-202.
- BOTTINI MCJ. (2000). Estudios multidisciplinarios en las especies patagónicas argentinas del género *Berberis* L. (Berberidaceae). Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 223 páginas.
- BOTTINI MCJ, GREIZERTEIN EJ, POGGIO L. (1999). Poliploidy levels and their relationships with the rainfall in several populations of Patagonian species of *Berberis* L., en: *Caryologia*, 52 (1, 2): 75-80.
- BOTTINI MCJ, GREIZERTEIN EJ, AULICINO MB, POGGIO L. (2000). Relationships among genome size, environmental conditions and geographical distribution in natural populations of NW Patagonian species of *Berberis* L. (Berberidaceae), en: *Ann Bot*, 86: 565-573.
- BOTTINI MCJ, DE BUSTOS A, SANZO AM, JOUVE N, POGGIO L. (2007). Relationships in Patagonian species of *Berberis* (Berberidaceae) based on the characterization of rDNA internal transcribed spacer sequences, en: *Bot J Lin Soc*, 153: 321–328.
- DE ROBERTIS EDP. (1989). Fundamentos de biología celular y molecular. Ed El Ateneo. 413 pág.
- FAJARDO MORALES V. (1987). Estudio químico de las especies chilenas del género *Berberis*, en: *Rev Lat Quím*, 18: 46-50.
- GAMBINERI F. (2012). Studio e caratterizzazione di popolazioni spontanee di calafate (*Berberis buxifolia* Lam.) in Tierra del Fuego (Argentina). Tesi di Laurea Magistrale. Università degli studi di Ferenze. Facoltà di Agraria. 43 páginas.
- GIORDANI E, MULLER M, GAMBINERI F, PAFFETTI D, ARENA M, RADICE S. (2016). Genetic and morphological analysis of *Berberis microphylla* G. Forst. accessions in southern Tierra del Fuego, en: *Plant Biosystems*. <http://dx.doi.org/10.1080/11263504.2016.1211194>.



LANDRUM LR. (1999). Revision of *Berberis* (Berberidaceae) in Chile and adjacent Southern Argentina, en: *Ann Missouri Bot Gard*, 86 (4): 793-834.

MOORE DM. (1983). Flora of Tierra del Fuego. Anthony Nelson & Missouri Botanical Garden, Oswestry, England, 396 pp.

ORSI MC. (1984). Berberidaceae, en: Correa M.N. (ed). Flora Patagónica Sección 4ª, pp 325-348, INTA, Buenos Aires.



Variabilidad en las características químicas de los frutos de calafate (*Berberis microphylla*) cosechados de diferentes poblaciones de Tierra del Fuego

Guastavino N. ⁽¹⁾, Arena M. ^(1,2), Radice S. ^(1,2)

(1) Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Morón, Argentina.

(2) CONICET, Argentina.

Dirección de e-mail: nicoguastavino76@gmail.com

Resumen

Berberis microphylla G. Forst. (sinónimo de *B. buxifolia* Lam.) es un arbusto nativo de Patagonia, cuyos pequeños frutos han sido incorporados al Código Alimentario Argentino, por lo que su empleo en productos alimenticios como dulces, mermeladas, licores, helados y confites ha sido autorizado. En los últimos años, se incrementó la demanda de frutos de estos arbustos y el interés en su producción, por lo cual existe una gran demanda de conocimientos sobre esta especie, sobre sus características nutracéuticas y biología reproductiva. El objetivo de este estudio fue evaluar la variabilidad en las características físicas de los frutos cosechados de 10 a 12 genotipos preseleccionados que crecen naturalmente en 3 sitios con características ambientales diferentes en la Provincia de Tierra del Fuego, Argentina, a saber cercanías de Ushuaia, Lago Fagnano y Corazón de la Isla, en febrero de 2016. Así, en Ushuaia las precipitaciones acumuladas en el período octubre de 2015 a marzo de 2016 fueron superiores (240,9 mm) a las registradas en el Corazón de la Isla y Lago Fagnano (127,6 y 104,4 mm, respectivamente). Por otro lado, las temperaturas medias (°C) para el mismo período fueron de 7,9, 8,0 y 8,1, respectivamente, aunque las temperaturas medias en el mes más cálido (enero) fueron superiores en el Lago Fagnano (10,46 °C). Se determinaron la acidez inicial (pH), sólidos solubles (°Brix) (SS), acidez total titulable (% de ácido málico) (ATT) y la relación sólidos solubles/acidez total titulable (SS/ATT) de los frutos, encontrándose diferencias significativas en todas las variables entre las tres poblaciones. Los frutos de la población de Ushuaia fueron los que presentaron el mayor pH inicial (2,7), mientras que la acidez en términos de ATT fue mínima (3,7 %), los sólidos solubles alcanzaron un valor de 17,3 °Brix, resultando en una relación SS/ATT máxima (4,9). Los frutos de la población del Lago Fagnano presentaron valores intermedios de pH inicial (2,4), de ATT de 4,9 % y una la relación SS/ATT de 3,7. Por último los frutos de la población del Corazón de la Isla fueron los que tuvieron los menores valores de pH inicial (2,1), de sólidos solubles (13,7 °Brix), la mayor ATT (5,9 %), resultando en la mínima relación SS/ATT (2,5). Los resultados encontrados pueden relacionarse con las condiciones ambientales de los sitios de las poblaciones. Así los valores intermedios de los frutos de la población del Lago Fagnano se corresponden con una situación climático-ambiental de transición entre las ciudades de Ushuaia, en la costa del canal Beagle y el Corazón de la Isla (Tolhuin), ubicado en el centro de la isla de Tierra del Fuego.



Palabras clave: patagonia, berries, sólidos solubles, acidez total titulable.

Introducción

El estudio del contenido de los componentes de los frutos de *B. microphylla* tales como los sólidos solubles, la acidez total titulable, los hidratos de carbono y los ácidos orgánicos, puede contribuir en el establecimiento del valor funcional de los frutos en una etapa de madurez determinada. Estos conocimientos son de gran utilidad en la selección de genotipos para su posterior mejoramiento, dado que la existencia de la variabilidad y la capacidad de detectarla son los primeros eslabones en la cadena del mejoramiento, como se ha observado en otras especies frutales silvestres (Kremer et al., 2009), hecho que además contribuye a la conservación y al manejo sustentable de la especie.

La fructificación como etapa fenológica, representa cambios metabólicos en la totalidad de la planta y se manifiesta en el crecimiento de los frutos hasta su madurez y la culminación de su ciclo biológico. Las tasas de crecimiento de los frutos varían extremadamente entre especies, según las prácticas culturales, según su posición en la rama y las condiciones ambientales. La evolución de los sólidos solubles y de la acidez en los frutos, son indicadores útiles de los cambios metabólicos que ocurren durante la fructificación y que permiten definir el momento óptimo para la cosecha (Boulton et al., 1996). Tanto los sólidos solubles como la acidez son relativamente fáciles de determinar. Esta última puede ser evaluada mediante la determinación del pH, de la acidez total titulable, o por ambos métodos. La acidez titulable y el pH no están directamente relacionados, dado que el pH depende de la concentración de hidrogeniones libres y de la capacidad tampón del jugo extraído. Sin embargo, el pH constituye una medida útil, de fácil obtención con la ayuda de un peachímetro, por lo que es ampliamente utilizado (Wills et al., 1981). La acidez libre (acidez titulable) representa a los ácidos orgánicos libres presentes en el fruto y se mide neutralizando los jugos o extractos de frutas con una base fuerte. Para reportar la acidez, se considera el ácido orgánico más abundante el cual varía dependiendo de la especie de que se trate, es decir que el resultado se expresa en términos de la cantidad del ácido dominante. Los sólidos solubles están compuestos por los hidratos de carbono, los ácidos orgánicos, proteínas, lípidos y minerales varios, siendo los azúcares los principales componentes de ellos en la mayoría de los frutos (Wills et al., 1981). Los hidratos de carbono y los ácidos orgánicos, compuestos que provienen de la asimilación fotosintética, son de especial importancia en el crecimiento de los frutos y en la fisiología de la maduración. Los hidratos de carbono son los compuestos primarios usados metabólicamente a través de las distintas etapas de crecimiento de los frutos. De hecho, grandes cantidades de estos productos primarios se convierten inmediatamente en otros compuestos tales como ácidos orgánicos, que son también importantes en el metabolismo de la planta. Los hidratos de carbono son también los principales constituyentes de las paredes celulares, y además proporcionan el esqueleto para la síntesis de grasas y proteínas; grandes cantidades se oxidan en la respiración, otra fracción se acumula como fotosintatos de reserva, y aún otra fracción se utiliza de manera diferente en el metabolismo secundario. Los hidratos de carbono solubles aumentan la presión osmótica de los jugos celulares, e hidratos de carbono tales como los pentosanos, las pectinas, las gomas y los mucílagos aumentan la



capacidad de retención de agua de los tejidos. Cuantitativamente, los hidratos de carbono son los componentes más importantes de las plantas leñosas, ya que comprenden las tres cuartas partes de su peso seco (Kramer y Kozlowski, 1979). Los hidratos de carbono también son componentes importantes de los atributos sensoriales de calidad en los frutos ya que contribuyen a su dulzor y sabor. Los ácidos orgánicos y en especial en su relación con los azúcares pueden afectar el sabor de las frutas y verduras, siendo el cítrico y el málico los ácidos más abundantes (Vicente et al., 2009).

En la provincia de Tierra del Fuego, *B. microphylla* se puede encontrar en toda su extensión, inclusive en lugares aún más australes como ser La Isla de Los Estados; sin embargo hasta la fecha no se cuenta con bibliografía que estudie la calidad de los frutos de esta especie en ecosistemas diferentes o con características ambientales diversas dentro de esta provincia. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar las características químicas de los frutos de los genotipos seleccionados de *B. microphylla* en tres poblaciones diferentes dentro de la provincia de Tierra del Fuego.

Materiales y Métodos

Datos geográficos y parámetros climáticos.

Las plantas adultas de *B. microphylla* G. Forst. seleccionadas para este estudio ($n=36$), crecen naturalmente en tres poblaciones en la provincia de Tierra del Fuego, Argentina, a saber: en las cercanías de la ciudad de Ushuaia, 54° 48' LS, 68° 19' LO, en el margen del Lago Fagnano (Ruta Nacional N°3, km 2980, 54° 36' LS, 67° 38' LO) y en el Corazón de la Isla de Tierra del Fuego, en cercanías de Tolhuin (54° 28' LS, 67° 33' LO). Los datos climáticos registrados para el período octubre de 2014 a marzo de 2016 fueron: temperatura del aire diaria máxima (TMA), mínima (TMI) y media (TME), humedad relativa del ambiente diaria media (HR) y precipitaciones acumuladas (PA). En las cercanías de Ushuaia, los datos fueron registrados por la Estación Meteorológica ubicada en el Centro Austral de Investigaciones Científicas (CONICET, Argentina), mientras que los del Lago Fagnano fueron tomados por una estación meteorológica allí ubicada, y en el Corazón de la Isla por las estaciones meteorológicas en las estancias Indiana y Carmen.

Material vegetal y muestreos.

Sobre muestras de frutos cosechados (200 g) en el mes de febrero de 2016, y a partir de 10 a 14 genotipos preseleccionados de *B. microphylla* G. Forst. Para cada población se estudiaron las siguientes variables:

- Los sólidos solubles (SS) fueron determinados con el jugo obtenido de cada genotipo, usando un refractómetro ATAGO N1- con una escala de medición de 0 a 32 °Brix con incrementos de 0,2 °Brix, con compensación de temperatura.
- El pH inicial (pH) fue registrado mediante un peachímetro.
- La acidez total titulable (ATT) fue determinada con un equipo de titulación manual y un peachímetro, usando una solución de OHNa 0,1 N, y fue expresada como ácido málico, por ser el ácido orgánico más abundante en los



frutos de *B. microphylla*, según los resultados encontrados en muestras obtenidas previamente a esta experiencia.

- La relación entre sólidos solubles y la acidez total titulable (SS/ATT) según metodología de Arena y Curvetto, 2008.

Los datos se analizaron mediante el análisis de la varianza usando el programa IBM SPSS Statistics 24 y las medias se separaron a través del Test de Tukey.

Resultados y Discusión

Los sólidos solubles, la acidez inicial, la acidez total titulable y la relación SS/ATT de los frutos de las tres poblaciones, mostraron diferencias significativas en los resultados (Tabla 1). Los frutos de las poblaciones de Ushuaia y Lago Fagnano presentaron los máximos valores de sólidos solubles (17,3 y 17,5 ° Brix, respectivamente), siendo significativamente superiores a los 13,7 ° Brix de los frutos del Corazón de la Isla. Los valores máximos de pH fueron obtenidos en la población de Ushuaia (pH= 2,7). En la misma población se observó el menor valor de acidez total titulable (ATT= 3,7), y la relación SS/ATT fue la máxima registrada (SS/ATT= 4,9). Los frutos cosechados en la población del Corazón de la Isla resultaron con la menor relación SS/ATT (SS/ATT= 2,5), como así también el pH inicial (pH= 2,1) que fue el menor registrado. Por el contrario, la ATT de estos frutos resultó ser significativamente mayor respecto de los valores observados de las otras dos poblaciones (ATT= 5,9).

Tabla 1. Análisis de las propiedades químicas de los frutos de *B. microphylla* entre las poblaciones de Ushuaia, Lago Fagnano y Corazón de la Isla (Tolhuin) en febrero de 2016.

Sólidos solubles (°Brix) (SS), acidez inicial (pH), acidez total titulable (%) (ATT) y relación sólidos solubles/ acidez total titulable (SS/ ATT) ($n= 3$).

Población	SS	pH	ATT	SS/ATT
Ushuaia	17,3a	2,7 ^a	3,7c	4,9 ^a
Lago Fagnano	17,5a	2,4b	4,9b	3,7ab
Corazón de la Isla	13,7b	2,1c	5,9a	2,5b
<i>F</i>	9,35	63,87	14,05	9,93
<i>p</i>	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Valores seguidos por letras diferentes en la columna son significativamente diferentes de acuerdo al Test de comparaciones múltiples de Tukey a $p \leq 0,05$.



En Ushuaia, las precipitaciones acumuladas en el período octubre de 2015 a marzo de 2016 (240,9 mm) fueron superiores a las registradas en el Corazón de la Isla y Lago Fagnano (127,6 y 104, 4 mm, respectivamente). Por otro lado, las temperaturas medias (°C) para el mismo período fueron de 7,9, 8,0 y 8,1 respectivamente. En particular en el Lago Fagnano se registraron las temperaturas medias del mes más cálido (enero) superiores (10,5 °C) y los valores de humedad relativa ambiente fueron notablemente mayores en todo el periodo estudiado respecto de las poblaciones de Ushuaia y el Corazón de la Isla. Esta diferencia se incrementó en un 10 % en el periodo “cuajado de fruto – madurez de cosecha”, respecto de los valores registrados en Ushuaia y Tolhuin.

Es sabido que las condiciones climáticas afectan de forma directa el crecimiento de los frutos de *B. microphylla* (Arena, 2016); así, las condiciones climáticas reinantes en Ushuaia y en el Lago Fagnano en cuanto a temperatura y particularmente para el período comprendido en octubre de 2015 y febrero de 2016 (mes de cosecha de los frutos) podrían haber determinado los máximos valores encontrados para los SS con respecto a los frutos del Corazón de la Isla. Además, en las plantas de esta población el inicio del ciclo reproductivo ha sido posterior a las plantas situadas en Ushuaia y en el Lago Fagnano, particularmente por las bajas temperaturas registradas al inicio del ciclo de crecimiento, hecho que pudo haber afectado la acumulación temprana de dichos metabolitos primarios.

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo para la población de Ushuaia con los encontrados en años previos por Arena y Curvetto (2008), pudo observarse que los SS, la relación SS/ATT y el pH de los frutos fueron menores que los citados en dicho trabajo, mientras que la ATT fue mayor, poniendo de manifiesto la necesidad de realizar estudios plurianuales. Los sólidos solubles obtenidos en los frutos de las tres poblaciones también fueron inferiores a los citados para los frutos de esta especie (33 °Brix) crecida naturalmente en el sur de Chile (Arribillaga García, 2001).

Conclusiones

Las diferencias encontradas en los parámetros estudiados en los frutos entre los tres sitios y su correlación con las condiciones ambientales podrían deberse a la plasticidad fenotípica que presenta esta especie frente a las mismas. El contenido de sólidos solubles así como la relación entre los sólidos solubles y la acidez total titulable de los frutos cosechados en la provincia de Tierra del Fuego es destacada, hecho que indica que los mismos pueden considerarse como alimentos con muy buena calidad nutricional.

Agradecimientos

A Julio Escobar (CADIC-CONICET) por su ayuda técnica.



Referencias

- ARENA ME. (2016). Estudio de algunos fenómenos morfofisiológicos y cambios bioquímicos en *Berberis microphylla* G. Forst. (sinónimo *B. buxifolia*) asociados a la formación y maduración de frutos en Tierra del Fuego y su relación con la producción de metabolitos útiles. Tesis Doctoral. UN Sur, 234 pág.
- ARENA ME, CURVETTO N. (2008). *Berberis buxifolia* fruiting: kinetic growth behavior and evolution of chemical properties during the fruiting period and different growing seasons, en: *SciHortic*, 118: 120-127.
- ARRIBILLAGA GARCÍA D. (2001). Domesticación del calafate (*Berberis buxifolia* Lam.) para fines agroindustriales. INIA, Chile. 137 p
- BOULTON R B, SINGLETON VL, BISSON LF, KUNKEE RE. (1996). Principles and Practices of Winemaking, Chapman and Hall, New York, 604 pp.
- KRAMER PJ, KOZLOWSKI TT. (1979). Physiology of Woody Plants. Academic Press, New York, p. 811.
- KREMER D, KARLOVIĆ K, JURIŠIĆ GRUBEŠIĆ R. (2009). Morphological variability of seeds and fruits of *Ruscus hypoglossum* in Croatia, en: *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 51/1: 91–96.
- VICENTE AR, MANGANARIS GA, SOZZI GO, CRISOSTO CH. (2009). Nutritional Quality of Fruits and Vegetables. In: Postharvest Handling: A Systems Approach, Second Edition. ISBN: 978-0-12-374112-7. Pp 57-106. Edited by Wojciech J. Florkowski, Robert L. Shewfelt, Bernhard Brueckner and Stanley E. Prussia.
- WILLS R, LEE T, GRAHAM D, MCGLASSON W, HALL E. (1981). Postharvest: An Introduction to the physiology and Handling of Fruits and vegetables. New South Wales University press Limited. Kensington, Australia. 150 p.



Estudio de la calidad de los frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivados en San Pedro (Provincia de Buenos Aires)

Langé G. ⁽¹⁾, Tomas Laibol A. ⁽¹⁾, Arena M. ^(1,2), Radice S. ^(1,2)

(1) Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Morón, Argentina.

(2) CONICET, Argentina.

Dirección de e-mail: gracielaglange@hotmail.com

Resumen

Es sabido que las frutas finas, y en particular los arándanos son consideradas como alimentos funcionales, con propiedades nutraceuticas que son influenciadas por los factores de precosecha. Es por ello que se estudió la calidad de los frutos de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.) provenientes de plantas cultivadas en San Pedro (establecimientos A y T), de distintas variedades (O'Neal, Misty y Blue-Crisp) y condiciones de crecimiento (con malla antiheladas (CM), y sin malla antiheladas (SM), a la vez que se comparó dicha calidad con otras frutas disponibles en el mercado de arándanos, frutillas (*Fragaria x ananassa*) y cassis (*Ribes nigrum* L.). Los frutos de O'Neal-ACM presentaron el mayor porcentaje de su superficie con coloración púrpura (85%), mientras que el contenido de sólidos solubles fue máximo en los frutos de O'Neal-TCM y Misty-ACM (11,1 y 11,4 °Brix, respectivamente), presentando a su vez el mayor ratio SS/ATT (18,9 y 16,1, respectivamente). La concentración de antocianinas fue máxima en los frutos de O'Neal-TCM (117,0 mg cianidina-3-glucósido/100 g PF), mientras que los de Blue-Crisp-ACM alcanzaron un valor de 17,9 mg cianidina-3-glucósido/100 g PF. Sin embargo, los frutos de Misty-ACM fueron los que tuvieron la máxima concentración de fenoles totales (183,7 mg ácido tánico/100 g PF), mientras que los de Blue-Crisp-CM tuvieron el menor valor (126,1 mg ácido tánico/100 g PF). La actividad antioxidante medida a través del efecto secuestrador de radicales DPPH varió entre el 68% (O'Neal-TCM) y el 87% (Misty-ACM), aunque sin presentar diferencias significativas. Al comparar la concentración de las antocianinas con las frutas finas del mercado, se encontró que los mayores valores se presentaron en los arándanos adquiridos (242,0 mg cianidina-3-glucósido/100 g PF), luego en los frutos de cassis (187,57 mg cianidina-3-glucósido/100 g PF) seguidos por los frutos de arándanos del ensayo (en promedio 83,7 mg cianidina-3-glucósido/100 g PF) y por las frutillas (26,3 mg cianidina-3-glucósido/100 g PF). Los resultados obtenidos confirman el efecto de la malla antiheladas sobre la maduración de los frutos y sus índices (frutos más coloreados, con mayor contenido de sólidos solubles y SS/ATT), a la vez que pone de manifiesto el valor nutraceutico de las frutas finas, en particular de los arándanos maduros.

Palabras clave: Berries, sólidos solubles, antocianinas, actividad antioxidante.



Introducción

Durante las últimas décadas la investigación sobre prácticas dietéticas saludables se centró particularmente en los efectos beneficiosos que se pueden obtener a partir de la adopción de una dieta rica en frutas y verduras. De hecho, estos alimentos pueden ayudar a reducir el riesgo de enfermedades crónicas, degenerativas, y enfermedades mediadas por el estrés oxidativo como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Roussos et al., 2009). Como resultado de esto, en la actualidad se dirige la atención hacia muchos frutos pequeños que se consideran una fuente de nutrientes orgánicos e inorgánicos y de factores de regulación metabólicos. Además, por sus propiedades nutricionales y medicinales se los considera como alimentos funcionales (Béliveau y Gingras, 2005; Kuskoski et al., 2005). Los pequeños frutos cultivados de *Ribes*, *Rubus* y de las especies de *Vaccinium* son una excelente fuente de productos naturales con propiedades antioxidantes (Deighton et al., 2002), que se atribuyen principalmente a su alto contenido en polifenoles, especialmente ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas, así como a otros importantes antioxidantes naturales como el ácido ascórbico (vitamina C) (Béliveau y Gingras, 2005).

Los ácidos orgánicos y en especial en su relación con los azúcares pueden afectar el sabor de frutas y verduras. El contenido de los sólidos solubles, y de la acidez en los frutos son indicadores útiles que permiten definir el momento óptimo para la cosecha (Boulton et al., 1996). Los sólidos solubles están compuestos por los hidratos de carbono, los ácidos orgánicos, proteínas, lípidos y minerales varios, siendo los azúcares los principales componentes de ellos en la mayoría de los frutos (Wills et al., 1981). Las antocianinas son los componentes fenólicos principales de las bayas de pequeños frutos, y se ha demostrado que su actividad antioxidante está estrechamente relacionada con el contenido total de fenoles (Deighton et al., 2002).

Los factores genéticos y epigenéticos tales como los antecedentes genéticos de las plantas, las etapas de maduración del fruto, las condiciones ambientales durante el crecimiento de las mismas y las prácticas culturales empleadas, todos juntos influyen en la síntesis de los azúcares, los ácidos, los compuestos fenólicos (Kähkönen et al., 2001; Ferreyra et al., 2007) y en la constitución de su capacidad antioxidante (Roussos et al., 2009), resultando en algunos casos aún más relevante el rol de la ontogenia cuando las bayas se utilizan inmaduras, como por ejemplo en los arándanos (*Vaccinium* spp.) para la industria de jugos (Çelik et al., 2008).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la calidad de los frutos de arándanos (*V. corymbosum* L.) provenientes de plantas cultivadas en San Pedro (establecimientos A y T), de distintas variedades (O'Neal, Misty y Blue-Crisp) y condiciones de crecimiento (con malla antiheladas (CM), y sin malla antiheladas (SM), a la vez que se comparó dicha calidad con otras frutas disponibles en el mercado de arándanos, frutillas (*Fragaria x ananassa*) y cassis (*Ribes nigrum* L.).

Materiales y Métodos

La recolección de los frutos de *Vaccinium corymbosum* L. se realizó en dos establecimientos ubicados en la Localidad de San Pedro, Buenos Aires, en el mes de noviembre de 2015. En el primer establecimiento denominado Tielas con posición



satelital: 33°45'15.5"S, 59°43'35.5"O, se trabajó solamente con plantas de la variedad O'Neal. En esta finca, la variedad O'Neal se cultivó bajo dos formas diferentes de plantación: parcelas con cubierta de malla plástica como protección para las heladas (333 μm) (O'Neal-TCM) y otras a campo, es decir desprovistas de protección (O'Neal-TSM). En el segundo establecimiento denominado Andinian con posición satelital: 33°44'43.1"S, 59°42'33.0"O se cosecharon frutos de plantas de las variedades O'Neal (O'Neal-ACM), Misty (Misty-ACM) y Blue-Crisp (Blue Crisp-ACM), las cuales se cultivaron con el mismo tipo de malla descrito anteriormente (Tomas Laibol, comunicación personal 2017). Se contó con 28 plantas de cada variedad en el cultivo del establecimiento de Tielas y con 15 plantas de cada variedad en el cultivo del establecimiento de Andinian. Sobre los frutos cosechados en San Pedro se evaluó el porcentaje de la superficie de los frutos con coloración púrpura, el contenido de los sólidos solubles, la acidez total titulable, el ratio entre sólidos solubles y acidez total titulable, pH, el rendimiento de jugo (Arena y Curvetto, 2008), la concentración de antocianinas mediante el método de pH diferencial de Giusti y Wrolstad (2001), concentración de fenoles totales (Makkar et al., 1993), y la actividad antioxidante (método de Shimada et al. 1992 modificado). En los frutos de frutilla, cassis y arándanos de otras procedencias se determinaron la concentración de antocianinas, fenoles totales y la actividad antioxidante para su comparación con los frutos de *V. corymbosum* del ensayo.

Los datos se analizaron mediante el análisis de la varianza usando el Programa IBM SPSS Statistics 24 y las medias se separaron a través del test de Tukey. Se realizaron correlaciones entre diversos pares de variables.

Resultados y Discusión

*Análisis de la calidad de los frutos de *Vaccinium corymbosum* L. provenientes de plantas de distintas variedades y crecidas bajo diferentes condiciones de crecimiento.*

La coloración de la epidermis de los frutos presentó diferencias significativas según la variedad y las condiciones de crecimiento de las plantas. La variedad O'Neal-ACM fue la que presentó mayor proporción de frutos coloreados, mientras que en la variedad Blue Crisp-ACM se encontró la mayor cantidad de frutos verdes (Tabla 1). Cabe mencionar que el porcentaje de la superficie de los frutos con coloración púrpura fue la única variable medida en la variedad O'Neal-ACM, ya que el material vegetal restante fue insuficiente para poder realizar los estudios posteriores.



Tabla 1. Porcentaje de la superficie de los frutos de *Vaccinium corymbosum* L. con coloración púrpura (%) (Color) según la variedad y condiciones de crecimiento.

Variedad	Color (%)
O'Neal – TSM	43 b
O'Neal – TCM	62 ab
O'Neal – ACM	85 a
Misty – ACM	47 b
Blue Crisp – ACM	30 b
<i>F</i>	5,633
<i>P</i>	0,000

Valores seguidos por letras diferentes en la columna son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a $p \leq 0,05$.

Los sólidos solubles, el pH inicial, la acidez total titulable, la relación sólidos solubles/ acidez total titulable y el rendimiento de jugo de los frutos de *V. corymbosum* L. presentaron diferencias significativas según las variedades estudiadas y las condiciones de crecimiento de las plantas (Tabla 2). Así, los máximos valores para los sólidos solubles se encontraron para la variedad O'Neal-TCM y Misty-ACM (11,1 y 11,4 °Brix, respectivamente), mientras que fue mínimo para Blue-Crisp-ACM (7,7 °Brix). La variedad Misty-ACM fue la que presentó el mayor pH (3,0), mientras que la variedad Blue-Crisp-ACM tuvo los frutos más ácidos (2,8). A su vez, la variedad Blue-Crisp-ACM fue la que presentó mayor acidez total titulable (1,2 %), significativamente superior al resto de las variedades y condiciones de crecimiento (0,6 a 0,7% de acidez total titulable). Con respecto a la relación sólidos solubles/ acidez total titulable, la menor relación se obtuvo con la variedad Blue-Crisp-ACM (6,8) y la mayor en la variedad O'Neal-TCM (18,9). Respecto al rendimiento de jugo contenido en los frutos, la variedad Blue-Crisp-ACM fue la más rendidora (25,3 ml), mientras que la variedad O'Neal-TCM fue la que produjo menor rendimiento de jugo (15,7 ml).



Tabla 2. Análisis de la varianza para sólidos solubles (°Brix) (SS), acidez inicial (pH), rendimiento de jugo (ml) (R), acidez total titulable (%) (ATT) y relación sólidos solubles/acidez total titulable (SS/ATT) de los frutos de *Vaccinium corymbosum* L. según la variedad y condiciones de crecimiento.

Variedad	SS	pH	ATT	SS/ATT	R
O'Neal – TSM	9,8 b	2,91 b	0,74 b	13,51 b	18,06 bc
O'Neal – TCM	11,14 a	2,91 b	0,60 b	18,87 a	15,70 c
Misty – ACM	11,44 a	3,04 a	0,74 b	16,14 ab	21,68 ab
Blue Crisp - ACM	7,74 c	2,76 c	1,17 a	6,83 c	25,32 a
<i>F</i>	29,822	11,812	14,064	14,747	14,141
<i>p</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a $p \leq 0,05$.

Realizando las correlaciones entre las diferentes variables determinadas (Fig. 1) puede observarse una correlación de la concentración de las antocianinas con los sólidos solubles positiva y significativa ($r = 0,636$, $p = 0,003$), con el rendimiento de manera negativa y significativa ($r = -0,733$, $p < 0,001$), con la acidez total titulable siendo negativa y significativa ($r = -0,704$, $p = 0,001$), con SS/ATT positiva y significativa ($r = 0,618$, $p = 0,004$) y con el color de manera positiva y significativa ($r = 0,589$, $p = 0,006$). Además se encontró una correlación de la concentración de fenoles con los sólidos solubles positiva y significativa ($r = 0,500$, $p = 0,025$) y el pH inicial siendo positiva y significativa ($r = 0,672$, $p = 0,001$). Los sólidos solubles también se encuentran relacionados con el pH inicial de manera positiva y significativa ($r = 0,803$, $p < 0,001$), con el rendimiento siendo negativa y significativa ($r = -0,653$, $p = 0,002$), con la acidez titulable de manera negativa y significativa ($r = -0,812$, $p < 0,001$), con el SS/ATT positiva y significativa ($r = 0,886$, $p = 0,000$) y con el color de manera positiva y significativa ($r = 0,615$, $p = 0,004$). El pH inicial tiene una relación negativa y significativa con la acidez titulable ($r = -0,755$, $p < 0,001$) y positiva y significativa con SS/ATT ($r = 0,795$, $p < 0,001$). El rendimiento como antes se dijo tiene una estrecha relación con la concentración de antocianinas y sólidos solubles, además de una correlación positiva y significativa con la acidez titulable ($r = 0,735$, $p < 0,001$), negativa y significativa con SS/ATT ($r = -0,697$, $p = 0,001$) y con el color de manera negativa y significativa ($r = -0,514$, $p = 0,020$). El color también tiene una relación negativa y significativa con la acidez titulable ($r = -0,729$, $p < 0,001$) y positiva y significativa con SS/ATT ($r = 0,634$, $p = 0,003$).



		DPPH 0,05 ml	DPPH 0,1 ml	DPPH 0,25ml	Antocianinas mg	mg Tán/100 g PH	SS	pH Inical	R (ml)	ATT	SS/ATT	Color
DPPH 0,05 ml	r	1	,657*	,648*	-,446	-,073	-,233	-,300	0,362	0,408	-,206	-,077
	p		0,002	0,004	0,049	0,759	0,323	0,199	0,117	0,074	0,385	0,746
DPPH 0,1 ml	r	,657*	1	0,445	0,042	-,105	-,169	-,325	-,051	0,233	-,090	0,048
	p	0,002		0,064	0,859	0,659	0,477	0,162	0,829	0,323	0,705	0,840
DPPH 0,25ml	r	,648*	0,445	1	-,278	0,241	0,038	0,023	0,352	0,418	-,165	-,381
	p	0,004	0,064		0,264	0,336	0,882	0,927	0,151	0,084	0,512	0,119
Antocianinas mg	r	-,446	0,042	-,278	1	0,355	,636*	0,428	-,733*	-,704*	,618*	,589*
	p	0,049	0,859	0,264		0,124	0,003	0,059	0,000	0,001	0,004	0,006
mg Tán/100 g PH	r	-,073	-,105	0,241	0,355	1	,500	,672*	-,144	-,433	0,433	0,227
	p	0,759	0,659	0,336	0,124		0,025	0,001	0,545	0,057	0,056	0,335
SS	r	-,233	-,169	0,038	,636*	,500	1	,803*	-,653*	-,812*	,886*	,615*
	p	0,323	0,477	0,882	0,003	0,025		0,000	0,002	0,000	0,000	0,004
pH Inical	r	-,300	-,325	0,023	0,428	,672*	,803*	1	-,321	-,755*	,797*	0,409
	p	0,199	0,162	0,927	0,059	0,001	0,000		0,167	0,000	0,000	0,074
R (ml)	r	0,362	-,051	0,352	-,733*	-,144	-,653*	-,321	1	,735*	-,697*	-,514*
	p	0,117	0,829	0,151	0,000	0,545	0,002	0,167		0,000	0,001	0,020
ATT	r	0,408	0,233	0,418	-,704*	-,433	-,812*	-,755*	,735*	1	-,940*	-,729*
	p	0,074	0,323	0,084	0,001	0,057	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000
SS/ATT	r	-,206	-,090	-,165	,618*	0,433	,886*	,797*	-,697*	-,940*	1	,634*
	p	0,385	0,705	0,512	0,004	0,056	0,000	0,000	0,001	0,000		0,003
Color	r	-,077	0,048	-,381	,589*	0,227	,615*	0,409	-,514*	-,729*	,634*	1
	p	0,746	0,840	0,119	0,006	0,335	0,004	0,074	0,020	0,000	0,003	

Figura 1. Correlación (r) y significancia (p) entre pares de las variables estudiadas en los frutos de *Vaccinium corymbosum* L. según variedad y condiciones de crecimiento de las plantas. Los valores de $p \leq 0,05$ son significativamente diferentes.

De los resultados obtenidos puede observarse que las variaciones encontradas en el porcentaje de la superficie de los frutos con coloración púrpura y por ende en la maduración de los mismos estuvieron estrechamente relacionadas positivamente con el contenido de sólidos solubles, lo cual llevó también al aumento de la concentración de antocianinas en el fruto, ya que a medida que avanza la maduración y como resultado de los procesos bioquímicos naturales, se manifiestan las principales características organolépticas que los hacen aptos para el consumo. Una de ellas es la síntesis de pigmentos antocianínicos a través de la cual el color de la piel toma tonalidades desde el verde rosa para finalizar en un azul/morado (Feippe et al., 2012).

Análisis comparativo de la calidad de los frutos de Vaccinium corymbosum L. del ensayo y frutos del mercado de frutilla (Fragaria x ananassa), cassis (Ribes nigrum L.) y arándanos (Vaccinium corymbosum L.)

Se pudo observar que la concentración de antocianinas presentó diferencias significativas entre especies, siendo el arándano del mercado la fruta que presentó el mayor valor (*Vaccinium corymbosum* L.) (242,0 mg cianidina-3-glucósido/100 g peso fresco de frutos), seguido por cassis (*Ribes nigrum* L.) (187,6 mg cianidina-3-glucósido/100 g peso fresco de los frutos). El fruto que presentó la menor concentración es Blue Crisp-ACM (17,9 mg cianidina-3-glucósido/100 g peso fresco de los frutos). También se puede observar que el cassis (*Ribes nigrum*) presentó la mayor concentración de fenoles (585,0 mg ácido tánico/100 g peso fresco de los frutos), seguido por los arándanos adquiridos en el mercado (*Vaccinium corymbosum*



L.) (350,1 mg ácido tánico/100 g peso fresco de los frutos), las frutillas (*Fragaria x ananassa*) (215,5 mg ácido tánico/100 g peso fresco de los frutos), siendo los frutos de la variedad Blue Crisp-ACM los que presentaron la menor concentración de fenoles (126,1 mg ácido tánico/100 g peso fresco de los frutos).

Las especies presentaron diferencias significativas en la evaluación del efecto secuestrador de radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). El cassis presentó el mayor valor (50,91%), seguido por el arándano (27,09 %) y la frutilla (24,7%) en la alícuota de 0,05 ml de extracto metanólico, siendo los frutos de O'Neal-TSM los que presentaron el menor valor (-4,10 %). En la alícuota de 0,1 ml, el que presentó la mayor actividad fue el cassis (49,86 %), seguido por la frutilla (37,84 %), siendo las que presentaron menor actividad O'Neal-TSM (17,86%) Misty-ACM (15,38%). En la alícuota 0,25 ml se puede observar que las frutas que presentaron mayor actividad fueron el arándano y el cassis (91,37 y 91,29 %, respectivamente), mientras que la menor nuevamente fue O'Neal-TSM (68,02 %).

En la Figura 2 se puede observar el aumento de la actividad antioxidante a medida que aumenta el contenido de fenoles, particularmente en los frutos de arándanos y cassis.

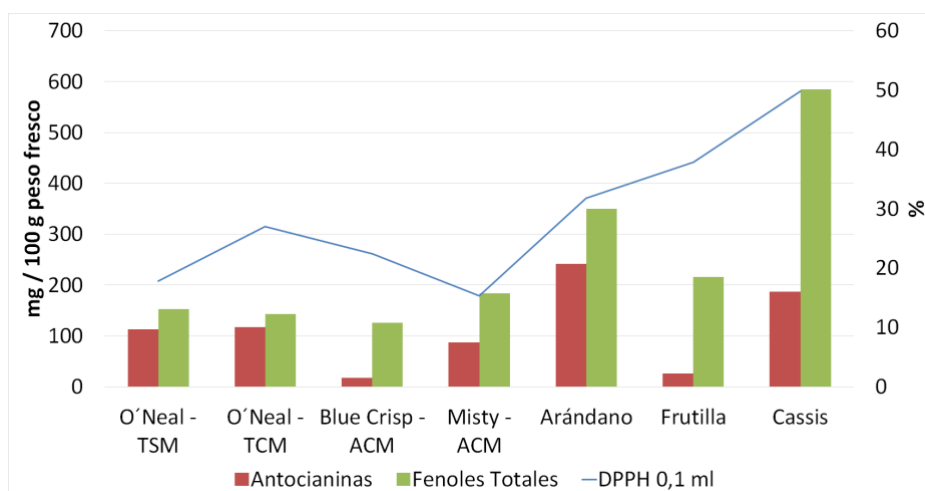


Figura 2: Actividad antioxidante (% en eje y de la derecha) con 0,1 ml de solución metanólica de frutos, contenido de antocianinas (mg cianidina-3-glucósido/100 g peso fresco de frutos) y contenido de fenoles (mg ácido tánico/100 g peso fresco de frutos) según variedad, especie y condición de crecimiento.

Los contenidos de antocianinas de los frutos obtenidos en este trabajo son comparables con los datos publicados en *V. corymbosum* var Legacy (226,6 mg antocianinas/100 g peso fresco de frutos) (Ribera et al., 2010), aunque fueron menores que aquellos valores citados en la bibliografía (para cassis 411 mg antocianinas/100 g peso fresco de fruto, para arándano 500 mg antocianinas/ 100 g fruto, para frutilla 75 mg antocianinas/100 g fruto) (García Pastor, 2016). Sin embargo, los valores obtenidos en la concentración de antocianinas de los frutos estudiados en este trabajo están dentro de los parámetros de antocianinas que se espera que posea un fruto maduro (entre 20 a 1000 mg antocianinas/100 g peso fresco de fruto), al



mismo tiempo que se encontró que el arándano fue el fruto con más antocianinas y la frutilla el de menor contenido (García Pastor, 2016).

Conclusiones

La protección con malla antiheladas mejoró algunas de las características organolépticas y nutraceuticas de los frutos de arándano favoreciendo la acumulación de sólidos solubles, contenido de antocianinas y actividad antioxidante, hecho que además se vio reflejado en la coloración de la epidermis de los frutos. En cambio los frutos de O'Neal-TSM presentaron los mayores valores de acidez y rendimiento de jugo. La variedad de arándano afectó el contenido de sólidos solubles, acidez, antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante, estando todas estas características también ligadas al estado de madurez de los frutos. La variedad O'Neal fue la más precoz y presentó los mayores valores de sólidos solubles y antocianinas, mientras que la variedad Blue Crisp fue la más tardía y presentó menores valores de sólidos solubles y antocianinas, pero la máxima acidez total titulable. Los frutos de arándano cosechados en este ensayo tienen la posibilidad de obtener el sello del SENASA por su contenido de sólidos solubles (siempre y cuando sigan los otros requisitos del protocolo), aunque la variedad Blue Crisp no cumple con la relación de sólidos solubles y acidez titulable (SS/AT) ya que la misma es baja, hecho que está indicando que estos frutos deben ser cosechados con un estado de madurez mayor. Los frutos de *V. corymbosum* provenientes del ensayo y aquellos comprados en el mercado presentaron mayores contenidos de antocianinas con respecto a las frutillas, mientras que su actividad antioxidante (medida con una concentración de extracto metanólico de 0,25 ml) fue comparable a la del cassis y la frutilla. Por lo expuesto puede concluirse que los frutos de arándano poseen un valor funcional destacado, estando el mismo afectado tanto por la variedad como por las condiciones de crecimiento y estado de madurez.

Agradecimientos

A los establecimientos Tielas y Andinian (San Pedro, Buenos Aires).

Referencias

- ARENA ME, CURVETTO N. (2008). *Berberis buxifolia* Fruiting: Kinetic Growth Behavior and Evolution of Chemical Properties During the Fruiting Period and Different Growing Seasons, en: *SciHortic*, 118 (2): 120-127.
- BÉLIVEAU R, GINGRAS D. (2005). Les aliments contre le cancer. Éditions TRÉCARRÉ. ISBN: 2-89568-255-0.
- BOULTON RB, SINGLETON VL, BISSON LF, KUNKEE RE. (1996). Principles and Practices of Winemaking, Chapman and Hall, New York, 604 pp.
- ÇELIK H, ÖZGEN M, SERÇE S, KAYA C. (2008). Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit, en: *SciHortic*, 117: 345–348.



DEIGHTON N, STEWART D, DAVIES HV, GARDNER PT, DUTHIE GG, MULLEN W, CROZIER A. (2002). Soft fruit as sources of dietary antioxidants, en: *Acta Hort*, 585: 459-465.

FEIPPE A, IBÁÑEZ F, FREDES A, PABLO VARELA, JOANNA LADO. (2012). Efecto del estado de desarrollo de arándanos sobre las propiedades físico – químicas, en: *Revista INIA Uruguay*, 30: 39-42.

FERREYRA RM, VIÑA SZ, MUGRIDGE A, CHAVES AR. (2007). Growth and ripening effects on antioxidant capacity on strawberry cultivar Selva, en: *SciHortic*, 112: 27-32.

GARCÍA PASTOR ME. (2016). Contenido de antocianos y compuestos fenólicos en diferentes frutos frescos y deshidratados. Tesis de Magister de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

GIUSTI MM, WROLSTAD RE. (2001). Unit F1.2.1-13: Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. In: Wrolstad RE (ed) *Currents Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley&Sons: New York.

KÄHKÖNEN MP, HOPIA AI, HEINONEN M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity, en: *J Agric Food Chem*, 49: 4076-4082.

KUSKOSKI EM, ASUERO AG, TRONCOSO AM, MANCINI-FILHO J, FETT R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos, en: *Ciën Tec Alimen*, Campinas 25 (4): 726-732.

MAKKAR HPS, BLUEMEL M, BOROWY NK, BECKER K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods, en: *J Sci Food Agric*, 61: 161-165.

RIBERA AE, REYES M, ALBERDI M, ZUÑIGA G, MORA M. (2010). Antioxidant compounds in skin and pulp of fruits change among genotypes and maturity stages in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in Southern Chile, en: *J Soil Sci Plant Nutr*, 10(4): 509-536.

ROUSSOS PA, DENAXA N-K, DAMVAKARIS T. (2009). Strawberry fruit quality attributes after application of plant growth stimulating compounds, en: *SciHortic*, 119: 138-146.

SHIMADA K, FUJIKAWA K, YAHARA K, NAKAMURA T. (1992). Antioxidative properties of Xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion, en: *J Agric Food Chem*, 6: 945-948.

WILLS R, LEE T, GRAHAM D, MCGLASSON W, HALL E. (1981). *Postharvest: An Introduction to the physiology and Handling of Fruits and vegetables*. New South Wales University press Limited. Kensington, Australia.



Efecto de la deshidratación osmótica en el secado de rodajas de mango para comercializar como snacks saludables

Seppi L. ⁽¹⁾, Slavutsky A. ^(1,2), Bertuzzi M. ^(1,2)

(1) Instituto de Investigación para la Industria Química, Universidad Nacional de Salta, Argentina.

(2) Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Salta, Argentina.

Dirección de e-mail: luzseppi@gmail.com

Resumen

En el presente trabajo se estudió la influencia que tiene el pretratamiento de deshidratación osmótica en el proceso de secado de rodajas de mango (*cv. Tommy Atkins*) con aire caliente a 50°C, con el fin de desarrollar una tecnología para la obtención de snacks de mango deshidratado. Para ello, se utilizaron 4 tipos de muestras. La primera, definida como muestra control, fue sometida a secado convectivo a 50°C sin ningún tratamiento previo y las restantes, fueron sometidas a un pretratamiento osmótico, sumergiéndolas en soluciones de sacarosa y glucosa (1:1) con agitación constante, de 45, 55 y 65°Brix, a una temperatura de 40°C y a presión atmosférica. Una vez alcanzado el equilibrio osmótico (2 h), se procedió al secado convectivo de las muestras pre-tratadas. Se analizó la pérdida de agua de las muestras, en cada etapa del secado (deshidratación osmótica y secado convectivo), la humedad final y la cinética de secado para cada tratamiento. Además, se obtuvieron las isotermas de sorción de agua a 25°C para las muestras deshidratadas. Los resultados indicaron que el mango sometido a deshidratación osmótica a 65° Brix presentó la mayor pérdida de agua (36%) y la menor velocidad de eliminación de agua (0,2417 kg agua/h.m²). A su vez, el secado de mango sin pretratamiento (muestra control) mostró la mayor velocidad de eliminación de agua (0,5707 kg agua/h.m²) durante el periodo de velocidad constante en la curva de secado y la menor humedad final (10,5%) luego del secado convectivo. La humedad final de las muestras osmodeshidratadas creció con la concentración de azúcares de la solución osmótica, mientras que la velocidad de eliminación de agua mostró una disminución con este parámetro. Esto está relacionado a la mayor retención de agua por parte de los azúcares incorporados durante el proceso de ósmosis. Las isotermas de sorción mostraron, para una misma actividad de agua, un notorio aumento en el contenido de humedad en función del contenido de azúcares de la muestra. Si bien el menor tiempo de secado corresponde a la muestra control, la ventaja de incorporar la deshidratación osmótica como un pretratamiento del proceso, reside en la obtención de un alimento estable en cuanto a su conservación y con un mayor contenido de humedad final.

Palabras clave: Mango, Deshidratación osmótica, Secado



Introducción

El mango es una fruta tropical originaria de Asia. Es rica en azúcares, fibras, vitaminas y beta carotenos. Crece en la zona intertropical y es de pulpa carnosa y dulce, que a su vez, puede ser o no fibrosa. Por su riqueza en ácidos, vitamina C y especialmente por su alto contenido de vitamina A, posee buenas características antioxidantes. Es una fruta con una alta producción mundial, sin embargo, su comercialización se ve dificultada por su estacionalidad y corta vida, además de un escaso procesamiento poscosecha en los países productores. En Argentina, el mango es un cultivo que cobró importancia desde la década del noventa, se estima una superficie de 450 hectáreas plantadas, distribuidas en Salta, Jujuy, Formosa y Misiones. El rendimiento varía entre 10 y 15 toneladas por hectárea (Molina, 2016). Debido a su elevado contenido de agua y azúcares es un producto altamente perecedero, cuyo almacenamiento por largos periodos de tiempo puede lograrse a través de técnicas que disminuyan la actividad del agua a un nivel inferior a aquel en el que se puedan desarrollar reacciones químicas de deterioro. Una de las principales técnicas para la conservación de alimentos es la deshidratación, que consiste en la eliminación del agua contenida en los alimentos, usualmente por medios térmicos. La remoción de agua genera la pérdida de peso del alimento y la disminución del volumen, lo cual permite reducir los costos de almacenamiento, transporte y distribución (Toledo, 2007).

Es muy común el empleo de métodos combinados en la conservación de frutas y hortalizas, ya que permiten lograr productos estables y de buena calidad (Sluka, 2015). La aplicación de la deshidratación osmótica, seguida del secado por aire caliente en el procesamiento de frutas y hortalizas, presenta numerosas ventajas con respecto a los tratamientos tradicionales y su estudio es primordial para la obtención de un producto deshidratado de buena calidad (Spiazzi y Mascheroni, 2001).

La deshidratación osmótica es un proceso que involucra la eliminación del agua de un alimento que se sumerge en una solución hipertónica que posee mayor presión osmótica y menor actividad de agua. La diferencia de potenciales químicos, entre los componentes de la solución y el producto, genera las fuerzas impulsoras que permiten la transferencia de agua del alimento hacia el medio osmótico, y en contracorriente, la de soluto hacia el seno del alimento (Rahman, 2007). Este método puede reducir hasta en un 50% el agua presente inicialmente en los alimentos, dependiendo de la fisiología del mismo y las condiciones de trabajo. El uso de la deshidratación osmótica como pretratamiento en la industria alimenticia, mejora la calidad del producto en términos de color, flavour y textura. Se aplica como etapa previa de muchos procesos para mejorar las propiedades nutricionales, sensoriales y funcionales del alimento sin modificar su integridad (Torreggiani, 1993). Generalmente precede a procesos como la congelación, liofilización, secado al vacío o secado por aire caliente. La ventaja de secado por convección, luego del pretratamiento, radica en las mayores velocidades de secado alcanzadas, preservando las propiedades organolépticas del producto cuando se lo compara, solamente, con el secado convectivo.

En el siguiente trabajo se estudió la influencia de la deshidratación osmótica en la cinética de secado de rodajas de mango con el fin de desarrollar una tecnología para la elaboración de snacks de mango



Materiales y Métodos

Materia Prima

Se emplearon mangos de la variedad Tommy Atkins y Osteen producidas en el departamento de Orán, provincia de Salta, Argentina. Se seleccionaron con una madurez entre 10 – 12 °Bx. La fruta se peló a mano y se cortó en rodajas de 6 mm.

Para la deshidratación osmótica se utilizó sacarosa y glucosa de grado alimenticio.

Deshidratación osmótica

Las muestras de mango fueron sumergidas en soluciones osmóticas (1:1) de 45, 55 y 65°Bx medidas con un refractómetro manual (Hand held refractometer ZGRB-32ATC) a 40°C. La relación en peso entre la muestra y la solución fue 1:4. Se tomaron muestras a diferentes tiempos, hasta alcanzar el equilibrio y se determinó la disminución de los sólidos solubles del jarabe y la pérdida de peso de las muestras.

Secado por convección.

El secado convectivo se realizó en estufa (Tecno Dalvo) a 50°C. El peso de las mismas se tomó a diferentes tiempos hasta obtener peso constante, empleando una balanza de precisión (Ohaus). Después de concluir el proceso de secado, se retiró la muestra y se registró el peso final para luego envasarlos en bolsas herméticas.

Cinética de secado.

Los pesos obtenidos se convirtieron de la siguiente manera:

$$X_t = \frac{W - W_s}{W_s} \quad (1)$$

Donde W es el peso del sólido húmedo en el tiempo “t” (kg de agua más sólido seco), W_s es el peso del sólido seco (kg sólido seco) y X_t es la relación entre el peso del agua y el peso del sólido seco en un tiempo determinado (kg de agua/kg sólido seco).

Después de haber establecido las condiciones de velocidad de secado constante, se determinó el contenido de humedad de equilibrio, X* (Kg de humedad de equilibrio/Kg de sólido seco) con el que se procedió a calcular el contenido de humedad libre X (Kg de agua libre/Kg de sólido seco) para cada valor de X_t.

$$X = X_t - X^* \quad (2)$$

Luego, se graficó el contenido de humedad libre (X) en función del tiempo (t). Para obtener la curva de velocidad de secado y a partir de esta gráfica, se midieron las pendientes de la curva, lo cual proporciona valores de dx/dt para cada valor de t. Luego se calculó la velocidad, R, para cada punto con la siguiente expresión:

$$R = -\frac{W_s}{A} * \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

Donde A es la superficie expuesta (superficie de la rodaja).

Con el fin de evaluar el modelo que describe el comportamiento cinético de secado, se va a utilizar el modelo de capa delgada.



$$MR = \frac{X - X_e}{X_0 - X_e} = \exp(-k * t) \quad (4)$$

Donde MR es la razón de humedad, X es la humedad en base seca (kg agua/kg s.s.) a cada tiempo, X_e es la humedad de equilibrio (kg agua/kg s.s.) y X_0 es la humedad inicial (kg agua/kg s.s.), t es el tiempo en horas y k la constante del modelo, de la cual se puede calcular la difusividad de la siguiente manera:

$$k = \frac{D_f * \pi^2}{4 * l^2} \quad (5)$$

Donde l es el semi espesor de la rodaja.

Humedad final y actividad de agua

La humedad final de las muestras, se determinó por gravimetría, luego de secar las muestras a 104°C por 24 h:

$$\%H = W_H / W_S * 100 \quad (6)$$

Dónde W_H es la cantidad de agua que posee la muestra y W_S es el peso seco de la muestra.

La a_w de los snacks deshidratados se midió empleando un medidor de actividad de agua Aqualab (Decagon Devices) a 25°C.

Isotermas de sorción

La humedad de equilibrio de las muestras se determinó en estufa a 105°C por 24 horas. Para obtener las isotermas, se utilizó el método estático gravimétrico utilizando soluciones salinas saturadas. Se pesaron 0,5 g de muestra, previamente deshidratadas durante una semana con sílica gel, que fueron colocadas en recipientes cerrados herméticamente, exponiéndose las muestras a atmósferas de humedad relativa conocida, en un rango de a_w entre 0.10 – 0.9, empleando soluciones salinas sobresaturadas, de acuerdo a lo descrito por el proyecto COST 90 (Spiess y Wolf, 1983). Los recipientes se colocaron en un ambiente con temperatura controlada de 25°C y se pesaron periódicamente hasta alcanzar peso constante. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se determinaron las isotermas para la muestra control y las muestras pretratadas con 45 y 65°Bx.

Los datos experimentales se modelaron con la ecuación de Brunauer, Emmett y Teller (BET):

$$X_e = \frac{X_m * C * a_w}{(1 - a_w) * (1 + a_w * (C - 1))} \quad (7)$$

Dónde: X_e : humedad de equilibrio (kg agua/kg masa seca); a_w : actividad de agua; X_m : humedad de la monocapa (kg agua/kg sólido seco); C: constante de Guggenheim, que depende del calor de sorción.

Análisis estadístico

Los parámetros del modelo se obtuvieron mediante el software Graphpad Prism 5.0.



Resultados y Discusión

Deshidratación osmótica

La variación de las concentraciones de sólidos solubles de las soluciones osmóticas para cada uno de los experimentos se muestra en la Tabla 1. Los resultados indican que el equilibrio se alcanza a las 120 horas.

Tabla 1: Variación de concentración de sólidos solubles durante la deshidratación osmótica

Tiempo (min)	Muestra 1 °Bx	Muestra 2 °Bx	Muestra 3 °Bx
0	45,2	55,6	65,2
30	42,6	52,4	56,0
60	40,8	50,2	54,0
90	40,0	47,8	52,4
120	38,1	47,4	50,8
150	38,9	47,2	49,6

Se observa que los frutos pierden entre un 22 y 36%, dependiendo de la concentración de azúcares en la solución osmótica (Tabla 2).

Tabla 2: Pérdida de peso por deshidratación osmótica.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Peso pulpa	101,9	116,4	115,5
Peso final	79	84,8	74,1
Perdida por osmosis	22%	27%	36%

El aumento de la presión osmótica, produce un aumento de la diferencia de potenciales químicos entre la fruta y la solución, lo que conduce a un aumento de las fuerzas impulsoras y de los flujos, lo que conduce a que el equilibrio se alcance con una mayor pérdida de peso en la fruta.



Cinética de secado

Para la obtención del modelo cinético del proceso de secado, se establecen las curvas de secado para cada muestra Figura 1.

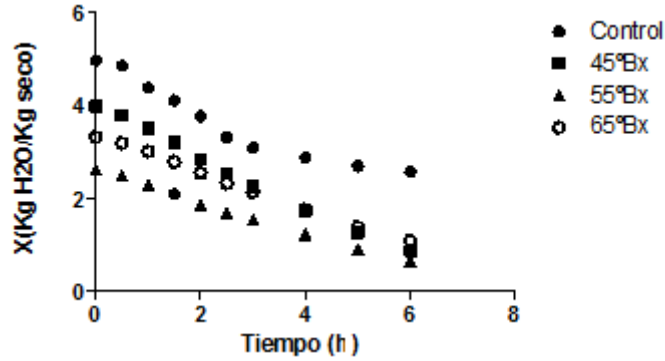


Figura 1: Curva de secado

La velocidad promedio de secado, se obtuvo de acuerdo a la ecuación 3. Los resultados obtenidos, se observan en la Tabla 3.

Tabla 3: Velocidad promedio de eliminación de agua

	R (kg H ₂ O/h.m ²)
Control	0,5707
45°Bx	0,3343
55°Bx	0,2700
65°Bx	0,2417

Durante el proceso de secado convectivo se observa que la muestra control posee la mayor velocidad de eliminación de agua, esto está relacionado a la mayor retención de agua por parte de los azúcares incorporados durante el proceso de ósmosis, lo cual se ve reflejado en la Tabla 4 donde se observan las humedades finales de las 4 muestras.

Tabla 4: Humedad final de las muestras

	Control	45°Bx	55°Bx	65°Bx
Humedad Final	10,500%	11,347%	11,610%	13,250%

Para modelar el periodo de velocidad decreciente en el secado se utilizó el modelo de capa fina (Ec.4).

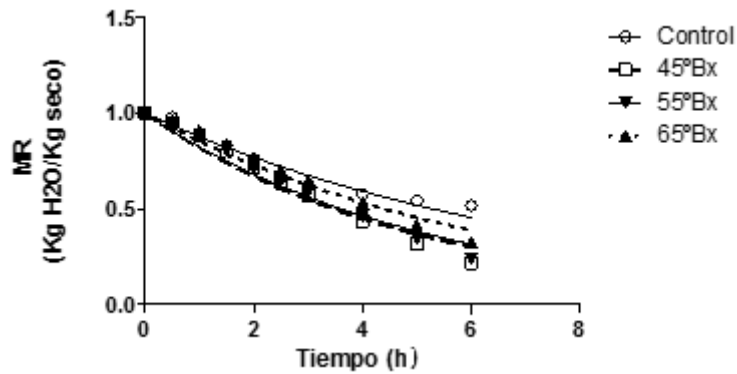


Figura 2: Puntos experimentales y modelado matemático

El coeficiente de difusión (Def) se calculó a partir de la pendiente de la línea recta obtenida al graficar $\ln(MR)$ en función del tiempo, los valores obtenidos se ven reflejados en la Tabla 5.

Tabla 5: Coeficientes de difusión

	Def (cm ² /s)x10 ⁷
Control	7.61
45°Bx	16.03
55°Bx	14.82
65°Bx	11.96

Los valores de difusividad disminuyeron con el incremento de la concentración de la solución osmótica, lo que muestra un aumento en las resistencias internas del sólido, ya que a mayor concentración de azúcar se forma una capa superficial de la misma en el sólido, obteniéndose una menor porosidad y mayor obstrucción de poros, lo que genera un aumento en la resistencia interna de la fruta.

Isotermas de sorción y a_w final después del proceso de secado.

Las isotermas de sorción se realizaron para las muestras control, 45 y 65°Brix (Figura 3). Los resultados obtenidos, indican que el contenido de humedad de las muestras, aumenta exponencialmente a partir de una $a_w = 0.65$. Además, la muestra control posee una menor humedad, comparada con las muestras que se sometieron a tratamiento osmótico. Esto puede estar relacionado a la mayor afinidad por el agua de las muestras con mayor contenido de azúcares, como lo son las muestras pretratadas osmóticamente.

Los datos obtenidos se ajustaron mediante la ecuación de BET. Los parámetros del ajuste se muestran en la Tabla 6.



Tabla 6: Parámetros de ajuste del modelo BET para cada tratamiento

	X_m	C	R^2
Control	0,05437	0,901	0,9811
45Bx	0,07417	0,6978	0,9958
65Bx	0,0763	0,8395	0,9933

El modelo de BET muestra un buen grado de ajuste a los datos experimentales ($R^2 > 0.98$). En la Figura 4, se puede observar los puntos experimentales y las curvas modeladas con el modelo BET a 25°C para cada muestra. No se observan diferencias significativas entre las muestras obtenidas por los diferentes tratamientos osmóticos. De acuerdo al modelo BET, las isothermas son del tipo III, características de alimentos con un alto contenido de azúcares y con calor de adsorción de la monocapa muy próximo al calor latente de condensación del agua pura.

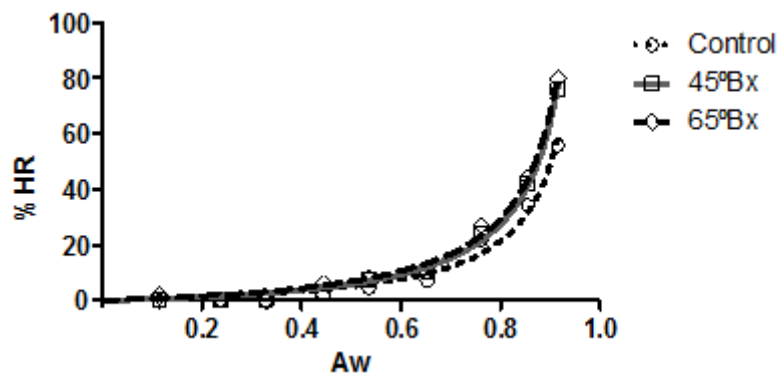


Figura 3: Datos experimentales y modelados con BET

Los datos de a_w finales de cada muestra se ven en la Tabla 7. Los resultados indican, que las muestras que fueron sometidas a tratamiento osmótico, presentan valores por debajo de 0.55. En general, el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias, ocurre en alimentos que poseen a_w mayor a 0.7. Además, la velocidad de deterioro, debido a reacciones enzimáticas aumentan notoriamente a valores superiores a $a_w = 0.6$. Por lo tanto, si bien el menor tiempo de secado corresponde a la muestra control, la ventaja de incorporar la deshidratación osmótica como un pretratamiento del proceso, reside en la obtención de un alimento más estable en cuanto a su conservación.

Tabla 7: Valores de actividad de agua de las muestras deshidratadas

	Control	45°Bx	65°Bx
A_w	0,649	0,519	0,524



Conclusiones

La deshidratación osmótica colabora en el proceso de deshidratación y estabilización de las muestras de mango.

La humedad final de las muestras osmodeshidratadas creció con la concentración de azúcares de la solución osmótica, mientras que la velocidad de eliminación de agua mostró una disminución con este parámetro. Esto está relacionado a la mayor retención de agua por parte de los azúcares incorporados durante el proceso de ósmosis.

Las isotermas de sorción muestran que las muestras pre tratadas poseen un mayor contenido de humedad a medida que aumenta la humedad relativa del ambiente. Pero, al finalizar el proceso de secado, las muestras pretratadas presentan a_w menores a 0,55, condiciones que inhiben el crecimiento de la mayoría de los microorganismos y disminuyen las velocidades de las reacciones enzimáticas de deterioro.

De esta manera, se obtiene un producto de buena calidad, mayor estabilidad y vida útil.

Referencias

- MOLINA, N. 2016. La producción de frutas tropicales: Panorama mundial y en Argentina. *INTA*.
- RAHMAN, M. S. 2007. *Handbook of food preservation*, CRC press.
- SLUKA, E. F. 2015. Conserva de mango (*mangifera indica* L.) por deshidratación combinada.
- SPIAZZI, E. A. & MASCHERONI, R. H. 2001. Modelo de deshidratación osmótica de alimentos vegetales. *Mat-Serie A*, 4, 23-32.
- SPIESS, W. & WOLF, W. 1983. Results of the COST 90 project on water activity. *Physical properties of foods/edited by R. Jowitt... et al.*
- TOLEDO, R. T. 2007. *Fundamentals of food process engineering*, Springer Science & Business Media.
- TORREGGIANI, D. 1993. Osmotic dehydration in fruit and vegetable processing. *Food Research International*, 26, 59-68.



Estudio fenológico y calidad de frutos de tres cultivares de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivados en San Pedro (Buenos Aires)

Tomas Laibol A. ⁽¹⁾, Langé G. ⁽¹⁾, Arena M. ⁽²⁾, Radice S. ⁽²⁾

(1) Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Morón, Argentina.

(2) CONICET, Argentina.

Dirección de e-mail: gracielaglange@hotmail.com

Resumen

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la fenología de floración y la producción de frutos de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.) provenientes de plantas cultivadas en la localidad de San Pedro de distintas variedades (O'Neal, Misty y Blue-Crisp) y para el cv O'Neal, diferentes condiciones de crecimiento (con malla antiheladas, CM, y sin malla antiheladas, SM). Entre los meses de agosto y octubre se realizaron a campo los registros fenológicos, la valoración del sector productivo de los arbustos y la cosecha de frutos. La fenología de floración fue diferente según el cultivar. La variedad Blue-Crisp fue la que presentó mayor porcentaje de flores en pre antesis y antesis el 4 de septiembre, manifestando un retraso significativo de la floración respecto de los otros cultivares. Por otro lado, la variedad O'Neal, cultivada CM y SM presentó un 50-60% de frutos cuajados el 14 de septiembre, siendo significativamente superior a Blue Crisp (18%). El 4 de octubre se registró el fin de la floración para todos los tratamientos. Las flores mostraron también características diferentes entre sí. En la fase de preantesis la variedad Misty fue la que presentó significativamente menores dimensiones y peso respecto de los otros tratamientos (8,95 mm x 4,31 mm y 0,04 g). Estas diferencias se mantuvieron en la fase de antesis. Con respecto al color de la flor durante las fases de preantesis y antesis se observó que en la pre antesis había flores de color rosado y blancas en diversas proporciones mientras que en antesis solo blancas. La variedad O'Neal cultivada CM presentó mayor proporción de ramas productivas respecto de la misma variedad cultivada SM. Sobre los arbustos de Misty se calculó un 57,33% de sector productivo es decir significativamente menor al observado en las variedades O'Neal y Blue Crisp cultivadas CM. En cuanto al rendimiento de la planta se observó que tanto el número de frutos como el peso total de la cosecha fue significativamente mayor para la variedad O'Neal-CM respecto de la O'Neal-SM, aunque sólo se observaron diferencias significativas en el número total de frutos obtenidos entre O'Neal-CM y Misty. En la evaluación individual del fruto se observó que O'Neal-CM presentó valores significativamente mayores en las variables peso fresco y seco, en las dimensiones y en la coloración del epicarpio. Los resultados obtenidos demuestran que el genotipo juntamente con el manejo aplicado al cultivo determinan los tiempos de floración y maduración.

Palabras clave: pequeños frutos, floración, productividad, características físicas.



Introducción

El arándano es una especie proveniente del Hemisferio Norte, que pertenece al género *Vaccinium* de la familia de las *Ericaceae*. De más de 30 especies conocidas de este género sólo un pequeño grupo se utiliza para la comercialización de fruta. En nuestro país la producción de arándanos es relativamente nueva, cuyas plantaciones fueron establecidas en los años noventa y actualmente la superficie ronda las 4.700 hectáreas implantadas. En la localidad de San Pedro, Buenos Aires, el cultivo de arándano desplazó a otros cultivos tradicionales de la zona, como el de duraznero. La producción de fruta de nuestro país se exporta al Hemisferio Norte en los meses de octubre y noviembre, en contra-estación, obteniéndose los precios más favorables. Para la producción de fruta en dichos meses se utilizan variedades que florecen durante julio y agosto, por esto es necesario utilizar algún método de protección contra las heladas para evitar la pérdida de flores.

La mayoría de la superficie implantada en nuestro país se hace en zonas de clima templado o templado-cálido con variedades de gran porte que pueden, alcanzar los dos metros de altura. Estas variedades de floración más temprana suelen presentar dos momentos de crecimiento vegetativo. El primer crecimiento de brotes se inicia en la primavera (septiembre) y continúa su crecimiento hasta mediados de diciembre (BP: brotes de primavera). El segundo crecimiento vegetativo surge de las yemas formadas en los brotes de primavera y luego de la maduración de los frutos, es decir en el mes de diciembre (según las zonas de cultivo). Este segundo ciclo finaliza alrededor de la segunda quincena de marzo (BV: brotes de verano) (Bañados et al, 2007). La inducción floral (IF) ocurre en las yemas de las ramas crecidas durante el año anterior a la floración (Bell y Burchill, 1955; Gough et al., 1978; Aalders y Hall, 1964). El proceso comienza después que los brotes (BP y BV) detienen su crecimiento (Aalders y Hall, 1964; Bañados y Strik, 2006). La IF está afectada significativamente por el fotoperiodo (Hall et al., 1963).

Durante la ruptura de las yemas florales es decir en la preantesis, los daños por heladas son máximos debido a la alta susceptibilidad de las flores (Chaar, 2013) En la fase de antesis se produce la polinización y fecundación de las flores que depende principalmente de la presencia de insectos polinizadores y condiciones climáticas que favorezcan esta actividad (Molina, 2001). Una vez que la flor fue fecundada, se produce la caída de pétalos dejando al descubierto el pistilo. Luego del cuaje se produce el aumento del tamaño del fruto y más adelante el cambio de color junto a la maduración. El crecimiento de los frutos se prolonga durante 2 a 3 meses. La cosecha se inicia a mediados de octubre o principios de noviembre y se realiza en días sucesivos hasta noviembre o diciembre dependiendo de las variedades y condiciones climáticas durante esta etapa.

Por todo ello, es importante conocer el comportamiento fenológico de las diferentes variedades comerciales de *V. corymbosum* L. para optimizar sus respectivos manejos y así obtener mejores producciones de fruta.



Materiales y Métodos

El registro de datos y colección de material se realizó en dos establecimientos ubicados en la Localidad de San Pedro, Buenos Aires. En el primer establecimiento, denominado Tielas, se trabajó solamente con la variedad O'Neal, con el objetivo de estudiar la fenología de floración y producción de fruta en dos lotes diferentes, uno con plantas cultivadas a campo (TSM) y otro con plantas protegidas por malla anti heladas (TCM). En el segundo establecimiento llamado Andinian (A), todas las plantas se cultivaron con malla antiheladas y se utilizaron tres variedades de *V. corymbosum* L: O'Neal, Misty, Blue-Crisp con el objetivo de estudiar la fenología de floración, el período de crecimiento del fruto y las características físicas de los frutos en una determinada fecha.

El diseño experimental fue de 28 plantas para ambas parcelas del cultivo Tielas y de 15 plantas para cada una de las variedades del cultivo Andinian. Los registros fenológicos se hicieron según la metodología de Ledesma (1953) y la evaluación de los frutos sobre la base de muestras biológicas obtenidas del total de fruta cosechada según metodología de Arena (2016).

Los resultados se evaluaron estadísticamente con el programa SPSS 19.

Resultados y Discusión

Fenología de floración

A través de la evolución de las flores fue posible determinar la duración de las diferentes etapas fenológicas para los cultivares O'Neal-TCM y O'Neal-TSM; y los cultivares O'Neal-ACM, Blue-Crips-ACM y Misty-ACM.

Al inicio del registro de datos para ambos cultivos se registraron altos valores de flores en antesis (Figura 1). La variedad Blue Crisp-ACM presentó un 50% de flores en antesis el 4 de septiembre significativamente superior al resto de los tratamientos para luego decaer. Las variedades O'Neal-ACM, O'Neal-TSM y O'Neal-TCM presentaron un nuevo incremento de valores entre el 13 y el 20 de septiembre. El 11 de octubre con valores menores al 10% se consideró el fin de la floración.

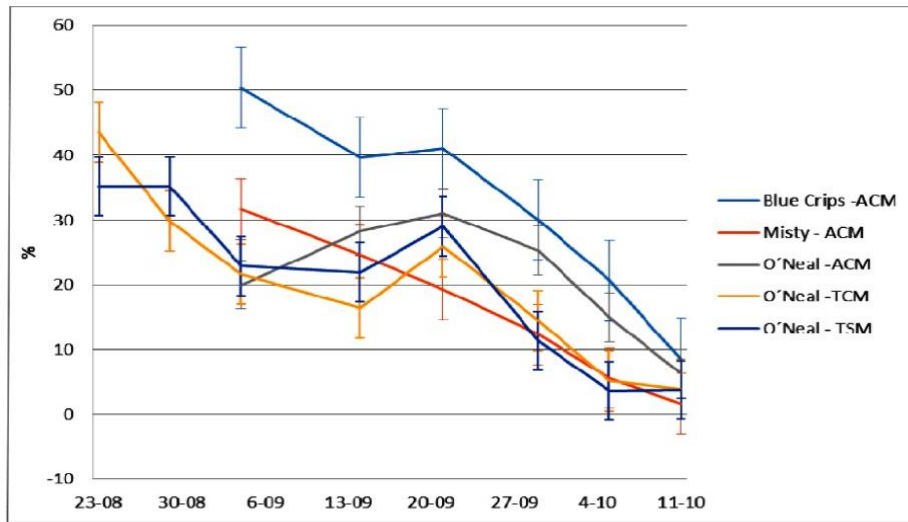


Figura 1: Evolución de la fase de antesis de *V. corymbosum* L. según variedad y cultivo.

El 23 de agosto se registró entre un 14 y 19% de frutos cuajados (Figura 2), sin embargo Blue Crips-ACM solo un 2% siendo de frutos cuajados significativamente menor al resto de los tratamientos. Las variedades O'Neal-TCM y O'Neal-ACM entre el 13 al 20 de septiembre presentaron una caída en la fase, mientras que la variedad O'Neal-TSM se mantuvo constante. Esta presencia de flores en diferentes fases en la misma fecha podría deberse a los diferentes momentos de IF ya mencionados (Pescie y Lopez, 2007).

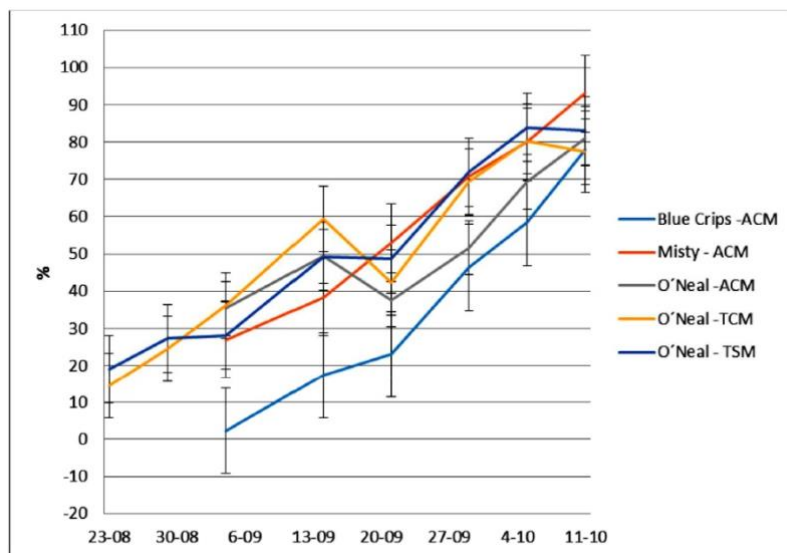


Figura 2: Evolución del cuaje de *V. corymbosum* L a través del tiempo según variedad y cultivo.



Polinización, presencia y viabilidad de polen en el estigma

El único polinizador que se observó en ambos establecimientos fue la abeja *Apis mellifera*. En el caso del establecimiento Andinian el productor posee colmenas para incentivar la polinización en el cultivo dado que se ha demostrado que pueden obtenerse incrementos del 40% de los rindes de fruta (INTA, 2016). Las abejas recolectan polen y succionan néctar introduciendo el cuerpo dentro de la flor facilitando la polinización (Figura 3A, 3D). El polen, en este género como tétrades (Figura 3E) cae sobre el estigma (Figura 3C), luego emite el tubo polínico (Figura 3B) hasta llegar a los óvulos (Figura 3F).

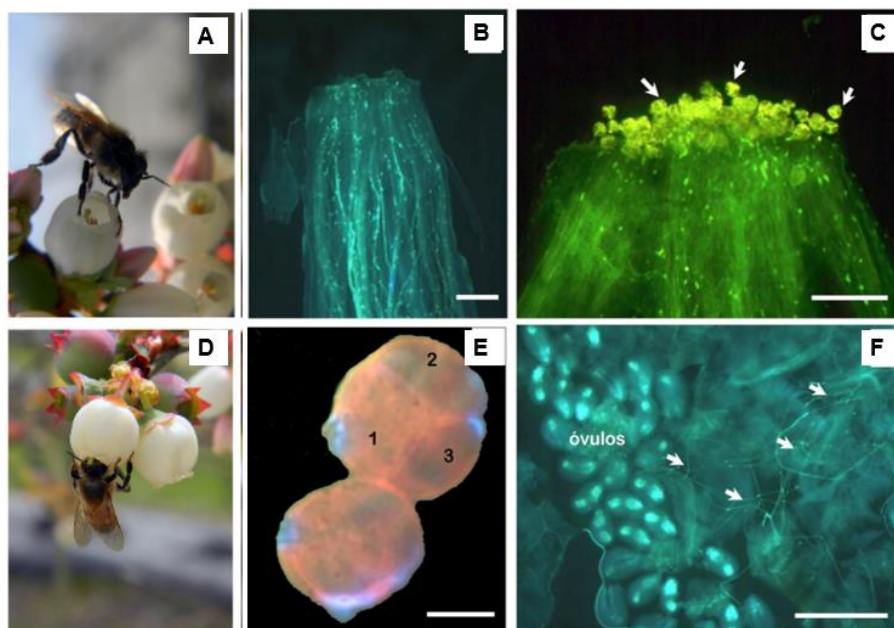


Figura 4: Polinización de *V. corymbosum* L. Barras: AB= 500 μ m; CD= 50 μ m.

Producción de fruta

El rendimiento de fruta por planta varió según los tratamientos estudiados. La variedad O'Neal-TCM presentó un rinde en peso significativamente mayor que O'Neal-TSM (Tabla 1). O'Neal-TCM también presentó un número de frutos significativamente mayor a Misty-ACM y O'Neal-TSM (Tabla 1).



Tabla 1: Rendimiento de frutos de *Vaccinium corymbosum* según variedad y tratamiento

Variedad	Rendimiento (g)	Frutos (N°)
Blue Crips-ACM	256,00 ab	246,76 ab
Misty-ACM	248,67 ab	206,87 b
O'Neal-TCM	335,36 a	340,51 a
O'Neal-TSM	180,54 b	161,52 b
F	<i>6,591</i>	<i>9,48</i>
p	<i>0,000</i>	<i>0,000</i>

Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes según Tukey ($p \leq 0,05$)

Aspectos físicos de los frutos de las diferentes variedades de V. corymbosum L.

El cultivar O'Neal-ACM presentó valores significativamente mayores en el peso y tamaño del fruto respecto del resto de las variedades (Tabla 2). La coloración del epicarpio de O'Neal-ACM también presentó un valor significativamente mayor (85 %) que el observado en los frutos de Blue Crips-ACM, Misty-ACM y O'Neal-TSM (Tabla 2). El número de semillas por fruto encontrado fue significativamente más alto en los tratamientos O'Neal-ACM y O'Neal-TSM respecto de Misty-ACM (Tabla 2). O'Neal-ACM también presentó un valor significativamente más alto en el peso de las semillas en comparación con Blue Crips-ACM, Misty-ACM, O'Neal-TSM (Tabla 2).



Tabla 2: Aspectos físicos de los frutos de las diferentes variedades y tratamientos de *V. corymbosum* L.

Variedad	Peso fresco del fruto (g)	Peso seco del fruto (g)	Diámetro ecuatorial (mm)	Diámetro polar (mm)	Color epicarpio (%)	Semillas (N°)	Peso de semillas (g)
Blue Crisp-ACM	1,05 b	0,14 b	13,06 b	10,80 c	30,00 b	42,92 ab	0,01 bc
Misty-ACM	1,21 b	0,14 b	13,43 b	11,00 bc	47,00 b	31,56 b	0,01 c
O'Neal-ACM	1,64 a	0,30 a	15,32 a	13,20 a	85,00 a	57,90 a	0,02 a
O'Neal-TCM	0,99 b	0,15 b	12,76 b	11,59 bc	62,00 ab	46,36 ab	0,02 ab
O'Neal-TSM	1,12 b	0,15 b	13,34 b	11,89 b	43,00 b	53,36 a	0,02 b
F	6,143	12,106	5,276	11,067	5,633	3,986	11,477
P	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,005	0,000

Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes Tukey ($p \leq 0,05$).

Estos resultados concuerdan con las observaciones de Gordó (2011), quien señala que la variedad O'Neal tiene menores requerimientos de horas frías en comparación con las otras dos variedades. Por lo tanto bajo las mismas condiciones climáticas O'Neal puede florecer y fructificar antes que Misty-ACM y Blue Crisp-ACM y más aún si se lo protege con malla.

Conclusiones

Los resultados obtenidos nos indican que la variedad O'Neal es la primera en producir frutos maduros, aptos para el mercado, seguida en segundo lugar por Misty y Blue-Crisp. La variedad O'Neal podría tener mayores rendimientos cuando es cultivada bajo protección contra heladas.

Si bien no existieron temperaturas críticas durante el período estudiado, la cobertura contra heladas no solo protege sino que además promueve un adelanto en la fenología de las plantas y mejora la calidad y cantidad de frutos producidos.

Según los estudios realizados se confirma que la floración del arándano se produce durante un período prolongado, en este caso en particular se inició antes del 23 de



agosto y culminó el 11 de noviembre. En consecuencia, la maduración de los frutos es escalonada.

La presencia de polinizadores, es importante para aumenta la cantidad y calidad de fruta producida.

Los frutos producidos fueron cosechados en su totalidad y en una misma fecha con diferentes grados de madurez, pese a esto y según los parámetros evaluados, estos frutos ya tenían características que los indicaban como productos de calidad, por lo cual siguiendo el dictamen dado por el SENASA, respondieron a la categoría de “ALIMENTOS ARGENTINOS UNA ELECCIÓN NATURAL”

Agradecimientos

A los establecimientos Tielas y Andinian (San Pedro, Buenos Aires).

Referencias

AALDERS LE, HALL IV. (1964). A comparison of flower-bud development in the lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium*. Ait. under greenhouse and field conditions. In Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 85: 281-284.

ARENA ME. (2016). Estudio de algunos fenómenos morfofisiológicos y cambios bioquímicos en *Berberis microphylla* G. Forst. (sinónimo *B. buxifolia*) asociados a la formación y maduración de frutos en Tierra del Fuego y su relación con la producción de metabolitos útiles. Tesis Doctoral. UN Sur, 234 pág.

BAÑADOS MP, STRIK B. (2006). Manipulation of the annual growth cycle of Blueberry using photoperiod, en: *Acta Hort*, (ISHS) 715: 65-72.

BAÑADOS P, DONNAY D, URIBE P. (2007). Poda en verde en arándanos, en: *Agronomía y Forestal*, 31: 16-19.

BELL HP, BURCHILL J. (1955). Flower development in the lowbush blueberry, en: *Canadian J Botany*, 33: 251-258.

CHAAR J. (2013). Resistencia a heladas en plantas frutales, en: *AIA*, 17: 109-121.

GOUGH RE, SHUTAK VG, HAUKE RL. (1978). Growth and development of highbush blueberry. II. Reproductive growth, histological studies, en: *J. Amer. Soc. Hort. Sci*, 103: 476-479.

GORDÓ M. (2011). Guía práctica para el cultivo de arándanos en la zona norte la provincia de Buenos Aires; INTA: 15.

HALL IV, AALDERS LE, TOWNSEND LR. (1963). The effects of soil pH on the mineral composition and growth of the lowbush blueberry, en: *Canadian J Plant Sci* 44: 433-438.

INTA 2016b. La polinización aumenta los rindes de más del 70 % de los cultivos; <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=34511>.



MOLINA JM. (2001). Incidencia de *Tropinota squalida* (Scopoli, 1783) en el cultivo del arándano en Huelva (España): Problemática asociada a su control, en: *Zapateri Revista Aragonesa de Entomología*, 9: 93-98.

PESCIE MDLA, LOPEZ CG. (2007). Inducción floral en arándano alto del sur (*Vaccinium corymbosum*), var. O'Neal, en: *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 36 (2): 97-107.



Efectos de los procesos tecnológicos sobre la calidad



Efecto del almacenamiento congelado sobre los parámetros de calidad y textura de moras (*Rubus sp*) del noreste argentino

Fernández N.L.⁽¹⁾, Montenegro S.⁽²⁾, Yamul D.K.⁽³⁾, Navarro A.S.⁽³⁾⁽⁴⁾

(1) Facultad de Ingeniería en Alimentos. Universidad Nacional del Chaco Austral, CONICET.

(2) Facultad de Ingeniería en Alimentos. Universidad Nacional del Chaco Austral

(3) CIDCA, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, CCT La Plata, CONICET.

(4) Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata.

Dirección de e-mail: albanavarro@conicet.gov.ar

Resumen

La utilización de frutas regionales brinda una alternativa para el desarrollo de alimentos con un grado mínimo de procesamiento, alto valor nutricional y propiedades organolépticas similares a las del producto fresco. La mora (*Rubus sp.*) es una fruta de la familia de las berries, posee vitamina C y alto contenido de antocianinas y polifenoles. Durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos a base de esta fruta se pueden alterar la concentración y actividad biológica de sus compuestos activos. El objetivo fue seleccionar moras en dos estados de madurez, someterlas a almacenamiento congelado, determinar el contenido de polifenoles, parámetros fisicoquímicos y de textura. Se recolectaron manualmente 2 lotes (verde y maduro) de 15 frutas cada uno en la provincia del Chaco. La mitad de cada lote se almacenó a -20°C por 30 días. Se midió altura y diámetro de las frutas con un calibre. Se analizó el pH, acidez titulable, grados Brix con refractómetro y grado de madurez (ratios). El color superficial de las frutas fue determinado con un colorímetro de superficie y se realizaron ensayos de punción en texturómetro. Se procesaron las pulpas y se determinó el contenido de polifenoles en los extractos por el método de Folin-Ciocalteu. Las moras maduras presentaron mayor longitud (24,89mm) y mayor diámetro (13,51mm). Los valores de pH, acidez, grados Brix y ratios no mostraron diferencias significativas entre los lotes de moras verdes frescas y congeladas por un lado y moras maduras frescas y congeladas por otro lado. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en dichos parámetros al analizar los lotes de moras verdes y moras maduras sean frescas o congeladas. Los parámetros de color a^* , b^* y L^* fueron menores en el caso de las moras maduras, además la congelación disminuyó el parámetro L^* tanto en las moras verdes como en las maduras. Las moras frescas presentaron valores de fuerza máxima de punción de 6N y 3N para las verdes y maduras, respectivamente. Por otro lado, el almacenamiento a -20°C debilitó la estructura de estos frutos viéndose reflejado en los menores valores de fuerza máxima de punción obtenidos (3N y 0,3N para verdes y maduras, respectivamente). El contenido de polifenoles de moras en los dos estados de madurez fue mayor luego de la congelación. Los resultados indican que el método de congelación es apropiado para mantener la acidez, el pH, grados Brix, grado de madurez y elevado contenido de polifenoles de las moras por lo que estas frutas



preservadas en estado congelado pueden considerarse para la elaboración de alimentos de alto valor nutricional.

Palabras clave: Mora, Congelación, Parámetros fisicoquímicos, Textura.

Introducción

Las moras son frutas de fácil cultivo y extremadamente tolerantes a condiciones del sitio y suelo. Contienen un alto nivel de fructosa, factor fisiológico importante que determina la calidad de la fruta como postre (Kafkas et al., 2006). Estudios recientes han indicado que los extractos de moras tienen varias actividades biológicas y atenúan el estrés oxidativo (Chen et al., 2016). Las moras se cultivan y consumen a nivel mundial debido a su buen sabor y alto contenido de compuestos bioactivos naturales como fibra, vitaminas, fitoesteroles, carotenoides y ácidos orgánicos, que pueden tener efectos beneficiosos para la salud humana (Ríos de Souza et al., 2014). Los alimentos funcionales a base de estas frutas pueden aportar gran cantidad de compuestos bioactivos como vitaminas, minerales, antioxidantes y fibra, que incrementan el valor nutricional (Sun-Waterhouse et al., 2011). Los frutos de la familia de las berries se caracterizan por ser frutos no climatéricos de vida útil muy corta, estructura morfológica frágil, enfrentan continuos cambios fisicoquímicos y de firmeza que afectan su aceptabilidad, calidad y tiempo de permanencia en anaquel, situación que en conjunto afectan su precio (Samec y Piljac-Zegarac, 2011).

En frutas de textura delicada y susceptibles al manejo y transporte, se producen pérdidas físicas y de calidad del producto después de recolectados (Veberic et al., 2014). La textura es uno de los atributos de calidad organoléptica apreciados por el consumidor de frutas y el principal contribuyente a la textura de las frutas frescas es la presión de turgencia celular. Durante la congelación, el hielo comienza a formarse en el medio extracelular y cuando la membrana celular pierde permeabilidad, progresa a través del citoplasma. La descompartimentalización causada por los cristales de hielo impide el retorno de agua del medio intracelular durante la descongelación, causando pérdida de turgencia y, por lo tanto, de textura de la fruta. La tasa de congelación determina el tamaño de los cristales de hielo que se forman, y esto a su vez determina el grado de daño estructural, que produce un cambio en los parámetros reológicos del tejido (Sousa et al., 2007). Es importante adquirir información que permita precisar el punto óptimo de recolección y determinar si la congelación es apta como un proceso de conservación que servirá de sustento a futuros procesos de comercialización, investigación y desarrollo de alimentos funcionales. El objetivo de este trabajo fue seleccionar frutos de moras en diferentes estados de madurez, someterlos a almacenamiento congelado, determinar el contenido de polifenoles y sus parámetros fisicoquímicos y de textura.



Materiales y Métodos

Recolección de la materia prima

Se recolectaron manualmente 2 lotes (verde-maduro y maduro) de 15 frutas cada uno en la provincia del Chaco, zona con temperatura media de 21,5°C y 74% de humedad relativa promedio anual. La recolección se realizó en los meses de septiembre y octubre (2016), temporada de fructificación de las plantas. El lote 1 correspondió al estado verde-maduro, con 100% de superficie rosada-rojiza y el lote 2 al estado maduro, con su superficie 100% morada oscura. La recolección de las moras se realizó en forma manual, utilizando una tijera para realizar cortes en los tallos del producto evitando roturas y daños por extirpación. Los frutos recolectados fueron transportados en potes plásticos hasta las instalaciones del laboratorio de la Universidad Nacional del Chaco Austral (UNCAus) para su procesamiento y análisis. La mitad de cada lote se almacenó en cámara a -20°C durante 30 días, obteniéndose moras verde-maduras congeladas (MoVC) y moras maduras congeladas (MoMC). El resto de las frutas fueron conservadas a 4°C y analizadas dentro de los 2 días posteriores a la cosecha, estas moras se identificaron como moras verde-maduras frescas (MoVF) y moras maduras frescas (MoMF). Las moras se almacenaron enteras debido a su estructura morfológica y tamaño que impide la división y separación de las semillas.



Figura 1. Fotografías que muestran el procesamiento de las muestras y obtención de los extractos.

Determinación de las características fisicoquímicas de los frutos

Se determinó la altura y el diámetro de las moras utilizando un calibre electrónico digital (Schwiz, Argentina). La determinación del peso de las moras se efectuó en una balanza electrónica (OHAUS, China) con precisión $\pm 0,0001$ g.

Luego las frutas fueron apartadas de sus receptáculos y procesadas con procesadora manual (Philips, 220-240V 700W, Argentina) obteniendo el jugo y la pulpa. Se cuantificó el peso de zumo y pulpa y se determinó el rendimiento de fruta según el grado de madurez. Se analizó la variación de pH con peachímetro (Lutron, modelo WA-2011, EE.UU.), acidez titulable por volumetría (Norma IRAM 15735) y grados Brix con refractómetro de Abbe (NAR-1T, Atago, EE.UU.). El grado de madurez (ratio) se obtuvo a través de la relación entre el valor mínimo de sólidos solubles totales ($^{\circ}$ Brix) y el valor máximo de acidez.



Se realizaron ensayos de color en la superficie de las frutas y en pulpas, la medición de diferentes segmentos se realizó con un colorímetro de superficie (Minolta, Japón), obteniendo valores de las coordenadas $L^*a^*b^*$ de las superficies de las muestras tratadas. El parámetro L^* representa la luminosidad de la muestra, tomando valores entre 0 para el negro y 100 para el blanco. El parámetro a^* representa rojo para valores positivos y verde para los negativos, mientras que b^* define amarillo para los valores positivos y azul para los valores negativos.

Análisis de las propiedades de textura de frutos enteros y pulpas

Para una evaluación objetiva de las propiedades de textura de los frutos se realizaron pruebas de punción en un texturómetro (Texture Analyzer TA.X2Ti, Stable Micro Systems, Reino Unido). Se midió la fuerza en compresión con una velocidad de pre-ensayo de 5mm/s, velocidad de ensayo de 1 mm/s, velocidad de post-ensayo de 5 mm/s, distancia 50%, fuerza 0,05 N, velocidad de adquisición 10 pps. Las condiciones del ensayo se mantuvieron constantes teniendo en cuenta que las moras fuesen similares en cuanto a color y tamaño. El ensayo se llevó a cabo a 25°C y se utilizó una sonda de punción múltiple (P/50). Las moras fueron analizadas enteras, puncionando con la sonda en la mitad de la fruta posicionada longitudinalmente.

Determinación del contenido de polifenoles totales de los extractos de frutas

El contenido de polifenoles totales en extractos de moras se determinó por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Schlesier et al., 2002). Se utilizó como reactivo una mezcla de ácidos fosfotungstácico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio y molibdeno. Los extractos se prepararon con 10g de pulpa y jugo más 50 ml de agua destilada, filtrando con papel de filtro Whatman N°1 luego de un tiempo de 20 minutos de extracción a temperatura ambiente. Para la determinación, se colocaron 2 ml de Na_2CO_3 en tubos de ensayo, 200 μL de la muestra del extracto y 200 μL del reactivo Folin-Ciocalteu (1:1) (Anedra, Argentina). Se agitaron los tubos en vortex y se dejaron en la oscuridad durante 30 min. Posteriormente se leyó la absorbancia del color azul desarrollado en un espectrofotómetro Shimadzu Double Bean Spectrophotometer UV-150-02 (Seisakusho Ltd., Kyoto, Japón) a una longitud de onda de 725 nm. Se realizó la curva de calibración con ácido gálico pues es el compuesto polifenólico comúnmente tomado como referencia durante el estudio de antioxidantes provenientes de fuentes vegetales (Borneo et al., 2009). Los resultados del contenido de polifenoles totales se informaron como mg ácido gálico por 100 g de fruta fresca.

Análisis estadístico de los datos

Los resultados obtenidos por triplicado en cada ensayo fueron tabulados y evaluados a través de análisis de varianza ANOVA, empleando diferencias mínimas significativas de Tukey como método de comparación múltiple, con un nivel de confianza del 95,0%. Dicho análisis se realizó con el programa estadístico InfoStat (InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).



Resultados y Discusión

Caracterización fisicoquímica de los frutos en sus dos estados de madurez

Los parámetros de altura, diámetro y rendimiento de los frutos se observan en la Tabla 1. Los valores no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en ambos estados de madurez.

Tabla 1. Valores de altura, diámetro y rendimiento de los frutos en los dos estados de madurez ensayados.

Estado de madurez	Altura (mm)	Diámetro (mm)	Rendimiento (%)
Verde-maduro	21,86 \pm 3,42	10,89 \pm 0,91	98,99 \pm 0,97
Maduro	24,89 \pm 5,14	13,51 \pm 1,42	99,00 \pm 0,98

Los resultados sobre los valores de pH, acidez titulable, grados Brix y Ratios en las moras analizadas se muestran en la Figura 2. Estos parámetros no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) dentro de un mismo estado de madurez de las moras, para los lotes sin tratar y congelados, sin embargo se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos estados de madurez de las frutas, ya sea frescas o congeladas.

El pH (Fig. 2.A) de las moras presentó valores menores para verde-maduras frescas y congeladas, mostrando diferencias significativas con el estado de madurez maduro cuyos valores fueron mayores. En la Fig. 2.B. se muestra el contenido de ácidos orgánicos en las moras representados como el porcentaje de ácido málico, observándose que la acidez presentó una tendencia descendente opuesta al pH a medida que el fruto avanzó en desarrollo y maduración. Estudios realizados en diferentes variedades de moras indican que los principales ácidos presentes son el ácido málico y el ácido ascórbico (Kafkas et al., 2006), determinándose un mayor contenido de ácido málico en todas las variedades.

Los valores de grados Brix y ratios de las moras (Fig. 2.C y 2.D), presentaron diferencias significativas en ambos estados de madurez (verde-maduro y maduro). El contenido de sólidos solubles totales presentó un incremento directamente proporcional al grado de madurez. En moras verdes los grados Brix (Fig. 2.C) arrojaron valores menores respecto de moras maduras frescas y congeladas. Estos últimos valores fueron mayores a los reportados por Van de Velde (2016) para variedades maduras de Jumbo (5,5 \pm 1), Blacksatin (7,0 \pm 1) y Dirksen (6,9 \pm 0,6). La relación °Bx / Acidez Titulable (Fig. 2.D), indicativa del estado de madurez (ratios) de moras maduras dieron valores muy elevados en comparación a las moras verdes lo que confirma la diferencia entre los dos estados de madurez.

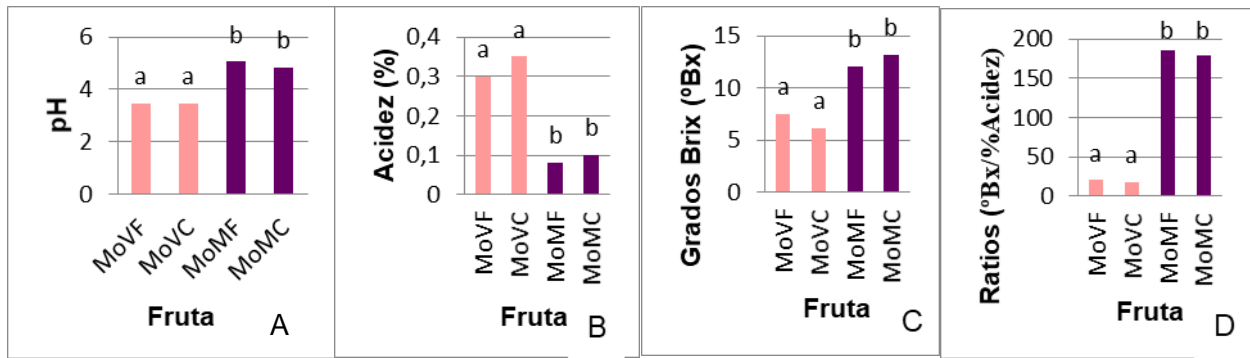


Figura 2. Efecto del almacenamiento congelado sobre los valores de pH, acidez titulable, grados Brix y ratios de las frutas en los dos estados de madurez ensayados. Letras iguales representan que no existen diferencias significativas entre muestras.

Respecto al efecto de la congelación, la Figura 2 muestra que tanto el pH, los grados Brix como la acidez titulable de moras en ambos estados de madurez no presentaron diferencias significativas luego del almacenamiento a -20°C .

Por otro lado, la Figura 3 muestra los resultados obtenidos en la caracterización del color en la superficie de las frutas. Las moras verdes-maduras presentaron valores mayores de los parámetros L^* (42,3), $a^*(+)$ (11,5) y $b^*(+)$ (11,9), asociados a la luminosidad y a los colores rojo y amarillo, respectivamente, lo que es esperable por lo determinado visualmente debido a la coloración rojo claro que presenta la fruta al estado verde-maduro. Las moras maduras presentaron valores más bajos de luminosidad L^* (27,4), al igual que de los parámetros $a^*(+)$ y $b^*(+)$, cuyos resultados fueron 3,2 y 3,1 respectivamente. Estos valores de color se deben al aporte de pigmentos solubles llamados antocianinas, de elevado poder antioxidante, responsables de los tonos rojos a morado de alimentos vegetales (Ríos de Souza et al., 2014).

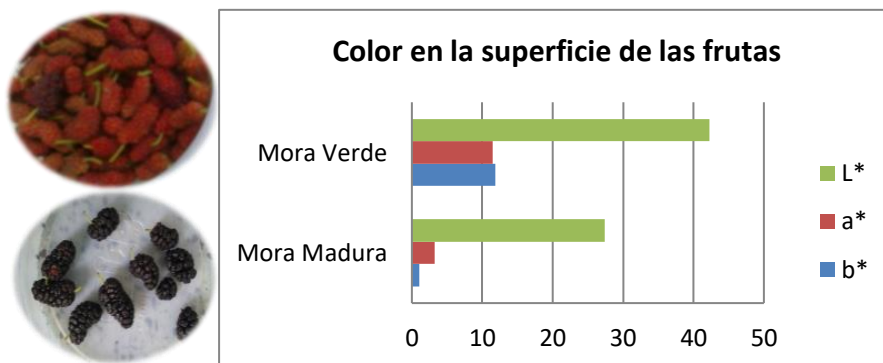


Figura 3: Parámetros de luminosidad L^* , a^* y b^* obtenidos en la determinación del color en la superficie de las moras. Máx. desviación estándar 2,25%.



En el caso de las pulpas, el almacenamiento congelado disminuyó los parámetros L^* y $b^*(+)$ en ambos estados de madurez (Fig. 4). Mientras que el parámetro $a^*(+)$, asociado al color rojo y al contenido de antocianinas, aumentó en moras verde-maduras congeladas. En moras maduras congeladas $a^*(+)$ disminuyó lo cual puede atribuirse a que el almacenamiento a bajas temperaturas produce una modificación en la estructura de las antocianinas influenciada por la disminución de pH (Veberic et al., 2014).

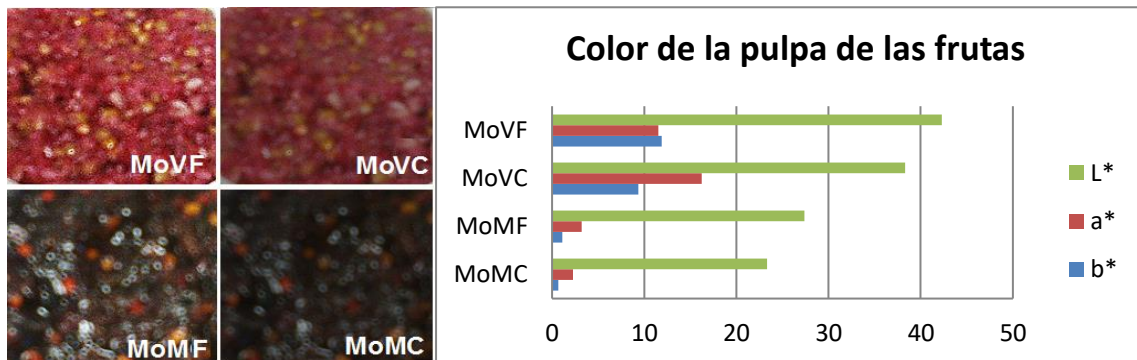


Figura 4: Parámetros de luminosidad L^* , a^* y b^* obtenidos en la determinación del color de las pulpas de moras frescas y congeladas. Máx. desviación estándar 2,7%.

Análisis de las propiedades de textura de frutos y pulpas

En la Figura 5 se muestran los perfiles de fuerza de los ensayos de punción en las moras. La fuerza máxima de punción ($F_{m\acute{a}x}$) disminuyó en ambos estados de madurez, luego de la congelación, indicando que el almacenamiento congelado debilitó su estructura. En la Fig. 5. A. se observa que las moras verdes-maduras presentaron valores de $F_{m\acute{a}x}$ de 6N para las frescas y 3N para las congeladas. En moras maduras, el efecto de la congelación fue mayor ya que los valores de la $F_{m\acute{a}x}$ disminuyeron a un 10% (0,3N) del valor inicial de las frutas frescas (3N).

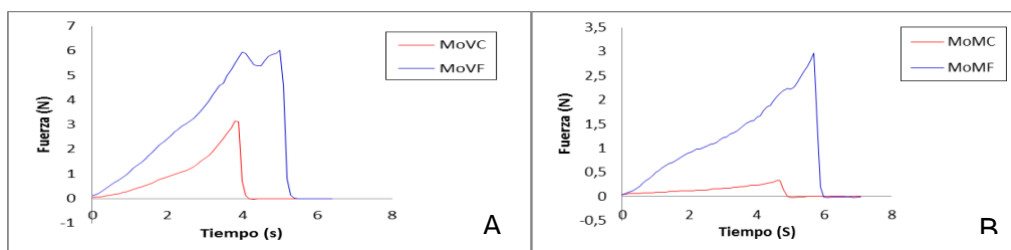


Figura 5: Efecto de la congelación sobre la textura (Fuerza de punción vs tiempo) de las moras en los dos estados de madurez.

Las moras son frutas de textura delicada por lo que la congelación y posterior descongelación provoca una pérdida de turgencia y firmeza. La velocidad de congelación es también un factor importante en el deterioro de la textura de las moras,



siendo éste menor cuanto más rápido es el proceso de congelación. Sousa et al. (2007) congelaron moras de variedad *Rubus fruticosus* L. por convección forzada con vapor de nitrógeno líquido a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y hallaron valores de $F_{\text{máx}}$ de 2N para las frutas frescas y 1,5N luego de la congelación de las mismas.

Determinación del contenido de polifenoles totales de los extractos de frutas

El contenido de polifenoles de las frutas en los dos estados de madurez (Tabla 2) fue mayor para moras maduras. El contenido de polifenoles determinado en el zumo fresco de moras maduras fue menor comparado con los valores hallados para la variedad *Rubus spp* por Ríos de Souza (2014) ($850,52 \pm 4,77$ mg AG/100 g de fruta fresca) y mayor a valores informados por Samec y Piljac-Zegarac (2011) para la variedad *Rubus fruticosus*. ($364,24 \pm 9,09$ mg AG/100 g de fruta fresca). Se puede observar que a medida que aumenta el estado de madurez el contenido de polifenoles aumenta ($p < 0,05$), debido a su alto contenido en flavonoides que forman parte de este grupo de compuestos.

Tabla 2. Valores de contenido de fenoles totales de moras en los dos estados de madurez ensayados frescos y congelados.

Estado de madurez	Fenoles Totales (mg AG/100 g fruta)	
	Fruta fresca	Fruta congelada
Verde-maduro	$109,6 \pm 1,3$	$90,4 \pm 0,5$
Maduro	$491,1 \pm 1,1$	$363,0 \pm 1,4$

Luego de la congelación se obtuvieron valores menores ($p < 0,05$) en el contenido de polifenoles (Tabla 2), si bien aún constituyen un elevado contenido de estos compuestos antioxidantes. Un efecto similar fue observado por Türkben et al. (2010) en moras congeladas durante 6 meses, mientras que Veberic et al. (2014) hallaron un incremento en los compuestos fenólicos al aplicar velocidades de congelación lentas, debido al mayor daño producido en el tejido lo que condujo a una mayor extracción de los mismos.

Conclusiones

Los resultados indican que el método de congelación es apropiado para mantener la acidez, el pH, grados Brix, grado de madurez y elevado contenido de polifenoles de las moras durante 1 mes de almacenamiento. Por lo tanto estas frutas preservadas en estado congelado pueden considerarse para la elaboración de alimentos de alto valor nutricional, lo cual evidencia la competitividad del producto local para el mercado y elaboración de alimentos procesados.



Referencias

- BORNEO R, LEÓN AE, AGUIRRE A, RIBOTTA P, CANTERO JJ. (2009). Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their *in vitro* testing in a model food system, en: *Food Chemistry*, 112(3), 664-670.
- CHEN W, XU Y, ZHANG L, SU H, ZHENG X. (2016). Blackberry subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion affords protection against Ethyl Carbamate-induced cytotoxicity, en: *Food Chemistry*, 212: 620–627.
- KAFKAS E, KOSAR M, TUREMIS N, BASER K.H.C. (2006). Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey, en: *Food Chemistry*, 97: 732–736.
- RIOS DE SOUZA V, PIMENTA PEREIRA PA, TEODORO DA SILVA TL, OLIVEIRA LIMA LC, PIO R, QUEIROZ F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits, en: *Food Chemistry*, 156: 362–368.
- SAMEC D, PILJAC-ZEGARAC J. (2011). Postharvest stability of antioxidant compounds in hawthorn and cornelian cherries at room and refrigerator temperatures—Comparison with blackberries, white and red grapes, en: *Scientia Horticulturae*, 131: 15-21.
- SCHLESIER K, HARWAT M, BÖHM V, BITSCH R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods, en: *Free Radical Research*, 36(2), 177-187.
- SOUSA MB, CANET W, ALVAREZ MD, TORTOSA ME. (2007). Effect of processing on the texture and sensory attributes of Raspberry (Cv. *Heritage*) and Blackberry (Cv. *Thornfree*), en: *Journal of Food Engineering*, 78: 9-21.
- SUN-WATERHOUSE D. (2011). The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review, en: *International Journal of Food Science and Technology*, 46: 899-920.
- TÜRK BEN, C., SARIBURUN, E., DEMIR, C., UYLAŞER, V. (2010). Effect of freezing and frozen storage on phenolic compounds of raspberry and blackberry cultivars, en: *Food Analytical Methods*, 3(3), 144-153.
- VAN DE VELDE F, GRACE MH, ESPOSITO D, PIROVANI MÉ, LILA MA. (2016). Quantitative comparison of phytochemical profile, antioxidant, and anti-inflammatory properties of blackberry fruits adapted to Argentina, en: *Food Composition and Analysis*, 1:1-38.
- VEBERIC, R, STAMPAR, F, SCHMITZER, V, CUNJA, V, ZUPAN, A, KORON, D, MIKULIC-PETKOVSEK, M. (2014). Changes in the contents of anthocyanins and other compounds in blackberry fruits due to freezing and long-term frozen storage, en: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 6926-6935.



Comparación de métodos de conservación de nueces Pecán [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] utilizados por productores de Entre Ríos

Panozzo, M.⁽¹⁾; Zapata, L.M.⁽²⁾; Kulczycki, C. ⁽¹⁾

(1) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.

(2) Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina.

Dirección de e-mail: panozzo.marina@inta.gov.ar

Resumen

La producción de nuez Pecán en Argentina alcanza las 600 t, siendo Entre Ríos responsable de la mitad de la producción. En esta provincia los productores tienen diferentes prácticas de almacenamiento; sin embargo, carecen de estudios científicos que les permita aseverar qué práctica posibilita una mejor conservación. El objetivo de este trabajo fue evaluar cambios de atributos de calidad de nueces Pecán de tres tratamientos de conservación ampliamente utilizados por productores, con el propósito de determinar el tratamiento que mejor conserva la calidad luego de nueve meses de almacenamiento. Se trabajó con mezcla de las variedades Mohawk, Stuart, Starking y Pawnee. La muestra se dividió en 3 fracciones, las que fueron sometidas a 3 tratamientos (T). TA: Las nueces fueron peladas, envasadas en atmosfera modificada (70% de nitrógeno y 30% de dióxido de carbono) y almacenadas a temperatura ambiente 9 meses; TB: Las nueces se conservaron enteras a 5°C durante 4,5 meses, luego fueron peladas, envasadas en atmosfera modificada y almacenadas a temperatura ambiente 4,5 meses; TC: Las nueces se conservaron enteras a 5°C durante 9 meses en bolsas de red. Se utilizaron en TA y TB bolsas tricapa de polietileno de alta densidad de 90 micrones de espesor. Al inicio y al finalizar los ensayos se evaluó: Color de la pepita (Espacio Cie $L^*a^*b^*$ con colorímetro Minolta modelo CR300), Índice de oscurecimiento (IO), Índice de peróxido (IP) (AOAC 965.33.2005) y Humedad (H) (AOAC 925.40.2005). La luminosidad de las nueces antes de los tratamientos fue $49,74 \pm 3,71$ y al final del tratamiento $L^*_{TC} = 48,87 \pm 3,48$, no mostrando diferencias significativas entre estos; sin embargo, la $L^*_{TA} = 44,57 \pm 3,08$ y $L^*_{TB} = 45,24 \pm 3,13$; mostraron disminución respecto del valor inicial; la que fue acompañada por un incremento del IO donde $IO_{inicial} = 90,21 \pm 3,16$; $IO_{TA} = 99,75 \pm 3,68$; $IO_{TB} = 98,02 \pm 4,27$ y $IO_{TC} = 93,76 \pm 4,42$. El parámetro a^* aumentó respecto del valor inicial ($6,09 \pm 1,39$) para todos los tratamientos, siendo $a^*_{TA} = 10,54 \pm 1,09$; $a^*_{TB} = 10,54 \pm 1,09$ y $a^*_{TC} = 8,59 \pm 1,18$. Los valores de b^* no mostraron diferencias significativas entre $b^*_{inicial} = 32,37 \pm 1,58$ y $b^*_{TA} = 32,37 \pm 1,58$ y $b^*_{TB} = 34,07 \pm 2,43$; sin embargo fue mayor en las nueces del TC, donde $b^*_{TC} = 35,60 \pm 2,39$. La H se mantuvo sin diferencias significativas, siendo $H_{inicial} = 3,41 \pm 0,35\%$, $H_{TA} = 3,19 \pm 0,28\%$, $H_{TB} = 3,77 \pm 0,18\%$ y $H_{TC} = 3,40 \pm 0,16\%$. El IP tuvo un incremento importante respecto del valor inicial, siendo $IP_{inicial} = 0,11 \pm 0,03$; $IP_{TA} = 1,79 \pm 0,2$; $IP_{TB} = 5,81 \pm 0,2$ y $IP_{TC} = 1,93 \pm 0,2$ meqO₂/kg de aceite. Los TA y TB tuvieron disminución de L^* y los mayores incrementos de a^* e IO; mientras que TB mostró el más alto IP. De lo expuesto se concluye que el tratamiento que mejor conservó la calidad de nueces Pecán, fue TC.



Palabras clave: Almacenamiento, conservación, nuez Pecán.

Introducción

La producción de nuez Pecán en Argentina alcanza las 600 t, siendo la provincia de Entre Ríos responsable de aproximadamente la mitad de dicha producción.

La producción industrial de nueces fue iniciada hace más de cien años, en donde Estados Unidos es responsable de más del 80% de la producción mundial (Venkatachalam, 2004).

En la provincia de Entre Ríos los productores tienen diferentes prácticas de conservación de nuez Pecán; sin embargo, carecen de estudios científicos que les permita aseverar qué práctica de almacenamiento posibilita una mejor conservación de los atributos de calidad del producto.

La principal reacción química de deterioro que controla la vida útil de los alimentos de alto contenido en aceite es la oxidación de lípidos (Simon *et al.*, 2000, Jin *et al.*, 2001, Tan *et al.*, 2001, Pu y Sathivel, 2011; Shim y Lee, 2011; Karagoz, 2012). Por tanto, el índice de peróxidos es uno de los índices de calidad más importantes en las nueces de Pecán.

La humedad es posiblemente el segundo factor más importante que debe ser regulado para extender la vida útil del Pecán (Santerre, 2012), por lo que resulta importante su determinación. Williams *et al.* (1973) encontraron un amplio rango de niveles de humedad en pepitas de Pecán recogidas en góndolas de comercios minoristas. Las humedades variaron de 2,3% a 6,4%.

Otro de los principales criterios para la determinación de calidad de la pulpa de la nuez Pecan, es el color, siendo este característico de la variedad. En posibles mercados de exportación, la preferencia de los consumidores es por nueces claras, siendo los colores oscuros asociados con una calidad inferior (Sancho *et al.*, 2005).

El objetivo de este trabajo fue evaluar cambios de atributos de calidad de nueces Pecán de tres metodologías de conservación ampliamente utilizados por productores de la provincia de Entre Ríos, con el propósito de determinar la metodología que mejor conserva la calidad luego de nueve meses de almacenamiento.

Materiales y Métodos

Materiales

Una vez que la nuez es cosechada, los productores no las mantienen separadas por variedad para su conservación y comercialización, sino que las mezclan debido a que actualmente el volumen de producción es relativamente bajo. Por lo que en este ensayo se trabajó con mezcla de las variedades Mohawk (5 kg), Stuart (3 kg), Starking (3 kg) y Pawnee (6 kg) de cosecha 2015, provenientes de fincas rurales de la provincia de Entre Ríos, Argentina.



Luego de recolectadas, las nueces se secaron a 32 °C en estufa marca Instrumentalia modelo DHG-9240, con circulación forzada de aire, de manera de disminuir su humedad hasta alcanzar aproximadamente un 4 % en la pepita.

La muestra original se dividió en 3 fracciones, las que fueron sometidas a 3 tratamientos (T). TA: Las nueces fueron peladas, envasadas en atmosfera modificada y almacenadas a temperatura ambiente (20±3 °C) durante 9 meses; TB: Las nueces se conservaron enteras a 5 °C durante 4,5 meses, luego fueron peladas, envasadas en atmosfera modificada y almacenadas a temperatura ambiente durante 4,5 meses; TC: Las nueces se conservaron enteras a 5 °C durante 9 meses en bolsas de red.

Se utilizaron como envases bolsas tricapa de polietileno de alta densidad de 90 micrones de espesor y para el tratamiento de atmosfera modificada se trabajó con 70% de nitrógeno y 30% de dióxido de carbono.

Técnicas Analíticas

Al inicio y al finalizar el ensayo se evaluó:

Humedad de la pepita: AOAC 925.40.2005.

Color de la pepita: Se midieron los parámetros L*, a* y b* del espacio Cie L*a*b* con colorímetro triestímulo Minolta modelo CR300.

Índice de Oscurecimiento (IO): Se calculó según la fórmula propuesta por Buera *et al.*, en 1985:

$$IO = \frac{100 (x \cdot 0.31)}{0,172}$$

$$\text{con } x = \frac{a^* + 1,75 L^*}{5,645 L^* + a^* - 3,012 b^*}$$

Índice de peróxido (IP): Se obtuvo aceite de la pepita por prensado en frío, se pesaron 5,00±0,05 g de aceite y se efectuó la determinación según el método AOAC 965.33.2005.

Ensayos Estadísticos

Las medias de los tratamientos fueron comparadas mediante Análisis de Varianza y Test de Rango Múltiple según Tukey (p<0,05) con programa MiniTab versión 16.

Resultados y Discusión

La calidad de las nueces y su estabilidad dependen de múltiples factores, entre los que se encuentran los métodos utilizados en el procesamiento, el envase y el almacenamiento (Oro *et al.*, 2008). En la Tabla 1 se muestran los atributos de calidad evaluados al inicio y al final de cada tratamiento.



Tabla 1. índice de peróxidos y humedad de las pepitas de Pecán al inicio y final del tiempo de almacenamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Trat.	IP (meq O ₂ /kg de aceite)		Humedad (%)	
Inicial	0,11 ± 0,0	a	3,41 ± 0,35	a
TC	1,93 ± 0,6	b	3,40 ± 0,16	a
TA	1,79 ± 0,2	b	3,19 ± 0,28	a
TB	5,81 ± 0,2	c	3,77 ± 0,18	a

El contenido de humedad se mantuvo sin diferencias significativas, para los tres tratamientos, respecto del valor inicial. Lo que resulta satisfactorio ya que si la humedad es excesiva puede provocar migración de taninos desde la cáscara a la pepita en nueces enteras (Santerre, 2012). El contenido ideal de humedad para la conservación es el comprendido entre 3,5 – 4,0 % (Shahidi y Miraliakbari, 2005).

Con referencia al índice de peróxido se observó un incremento importante respecto del valor inicial, especialmente en las nueces del TB.

También Erickson *et al.* (1994) observaron aumento en el IP tras el almacenamiento de pepitas de Pecán durante 8 meses a 24 °C. Estos autores reportaron valores de 1,65-1,81 meq O₂/kg aceite; los que fueron semejantes a los obtenidos en nueces de los tratamientos A y C.

Por su parte, Oro (2007) observó cambios significativos en el IP cuando almacenó nueces peladas y envasadas al vacío en película de nylon-polietileno y en potes plásticos de polipropileno. En las dos experiencias las nueces fueron mantenidas en local con temperatura media de 23,1 °C por 150 días. A los 120 días de almacenamiento este parámetro alcanzó los valores de 5,86±0,07 y 4,30±0,07 meq O₂/kg aceite; respectivamente; mientras que al final del almacenamiento el IP fue 4,67±0,07 meq O₂/kg aceite en las nueces almacenadas y envasadas al vacío; mientras que en las envasadas en potes fue de 2,66±0,07 meq O₂/kg aceite. Por lo que las nueces envasadas al vacío alcanzaron valores de IP similar a los obtenidos en la presente investigación para el TB.

Referido a los parámetros de color, la luminosidad de las nueces del TC no mostró diferencias respecto del valor inicial; sin embargo, las nueces de los TA y TB tuvieron luminosidad más baja, disminución que fue acompañada por un incremento del índice de oscurecimiento (Tabla 2).



Tabla 2. Parámetros de color e índice de oscurecimiento al inicio y final del almacenamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)

Trat.	L*		a*		b*		IO	
Inicial	49,74 ± 3,71	a	6,09 ± 1,39	a	32,37 ± 1,58	a	90,21 ± 3,16	a
TC	48,87 ± 3,48	a	8,59 ± 1,18	b	35,60 ± 2,39	c	93,76 ± 4,42	b
TA	44,57 ± 3,08	b	10,54 ± 1,09	c	34,07 ± 1,68	b	99,75 ± 3,68	c
TB	45,24 ± 3,13	b	10,84 ± 1,27	c	34,07 ± 2,43	bc	98,02 ± 4,27	c

El parámetro a^* , que representa el color rojo, tuvo, respecto del valor inicial, un aumento, especialmente en las nueces correspondientes a los TA y TB; mientras que el parámetro b^* aumentó en las nueces de todos los tratamientos, principalmente en los TC y TB.

También Erickson *et al.* (1994) y Oro (2008) observaron alteraciones en la luminosidad y en las tonalidades amarilla y roja de nueces, lo que se tradujo en el oscurecimiento superficial de las mismas. Sancho *et al.* (2005) estudiaron la evolución temporal del color de nuez pecan variedad Stuart almacenada a distintas temperaturas (-15, 2, 5 y 20 °C). Los resultados instrumentales indicaron que la luminosidad de la pepita disminuyó significativamente cuando el almacenamiento fue a temperatura ambiente.

Conclusiones

La humedad de las nueces al final del almacenamiento no mostró diferencias respecto del valor inicial. Sin embargo, el índice de peróxido aumentó, especialmente en las nueces que se conservaron enteras a 5 °C durante 4,5 meses y que luego fueron peladas, envasadas en atmosfera modificada y almacenadas a temperatura ambiente durante 4,5 meses más. Los parámetros de color a^* y b^* aumentaron, al igual que el índice de oscurecimiento; mientras que la luminosidad disminuyó, excepto en las nueces conservadas enteras a 5 °C durante 9 meses en bolsas de red.

De lo expuesto se concluye que la metodología que mejor conservó la calidad de nueces Pecán luego de nueve meses de almacenamiento fue el tratamiento donde las nueces se conservaron enteras a 5°C.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por la financiación de la presente investigación en el marco del Proyecto PNFru 1105083.

Referencias

AOAC 2005. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC. 18th Ed. AOAC, Arlington, VA.

BUERA MP, LOZANO RD, PETRIELLA C. (1985). Definition of colour in the nonenzymatic browning process. *Die Farbe* **32/33**, 316-326.



ERICKSON MC, SANTERRE CR, MALINGRE ME. (1994). Oxidative stability in raw and roasted pecans: chemical, physical and sensory measurements, en: Journal of Food Science **59** (6) 1234-1239.

KARAGOZ I. (2012). Safety assurance of Pecans by irradiation without a detrimental effect on quality. Tesis doctoral. Office of Graduate Studies of Texas A&M University.

ORO T. (2007). Composição nutricional, compostos bioativos e vida de prateleira de noz e óleo prensado a frio de noz-Pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. Tesis de maestría. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

ORO T, OGLIARI PJ, DIAS DE MELLO CASTANHO AMBONI R, BARRERA-ARELLANO D, BLOCK JM. (2008). Evaluación de la calidad durante el almacenamiento de nueces Pecán [*Carya Illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] acondicionadas en diferentes envases, en: Grasas y Aceites, 59 (2), abril-junio, 132-138, 2008, ISSN: 0017-3495

PU JN, SATHIVEL S. (2011). Kinetics of lipid oxidation and degradation of flaxseed oil containing crawfish (*Procambarus Clarkii*) Astaxanthin, en: Journal of the American Oil Chemists Society 88(5), 595-601.

SANCHO A, GRIGIONI G, BIOLATTO A, IRURUETA M, FRUSSO E, Madero E. (2005). Efecto de diversas temperaturas de almacenamiento sobre la evolución del color de la nuez Pecan, en: Jornada de Análisis Sensorial. Buenos Aires 2005.

SANTERRE CR. (2012). Pecan Technology. Chapman & Hall.

SHAHIDI F, MIRALIAKBARI H. (2005). Tree Nut Oils en Shahidi F. (Ed). Bailey's Industrial Oil and Fat Products 3, 6th Ed. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ.

SHIM SD, LEE SJ. (2011). Shelf-life prediction of perilla oil by considering the induction period of lipid oxidation, en: European Journal of Lipid Science and Technology 113(7), 904-909.

SIMON P, KOLMAN L, NIKLOVA I, SCHMIDT S. (2000). Analysis of the induction period of oxidation of edible oils by differential scanning calorimetry, en: Journal of the American Oil Chemists Society 77(6), 639-642.

TAN CP, MAN YBC, SELAMAT J, YUSOFF, MSA. (2001). Application of Arrhenius kinetics to evaluate oxidative stability in vegetable oils by isothermal differential scanning calorimetry, en: Journal of the American Oil Chemists Society 78(11), 1133-1138.

VENKATACHALAM M. (2004). Chemical composition of select Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] varieties and antigenic stability of Pecan proteins. (Dissertation) - College of Human Sciences, The Florida State University.

WILLIAMS FW, LA PLATE MG, HEATON EK. (1973). Evaluation of quality of pecans in retail markets en Journal of Amer. Soc. Hort. Sci. 98(5):460-462



Uso de pretratamientos de deshidratación osmótica para mejorar el color y prevenir las pérdidas de antioxidantes en dulces de frutilla

Rodoni L.M.^(1,2), Lemoine M.L.^(1,2), Vicente A.R.^(1,2)

(1) Grupo de Investigación en Tecnología Poscosecha (GITeP), CIDCA, CONICET-UNLP. La Plata, Bs.As.

(2) Laboratorio de Investigación en Productos Agroindustriales (LIPA), FCAyF, UNLP. La Plata, Bs.As.

Dirección de e-mail: luisrodoni@gmail.com

Resumen

En los últimos años ha aumentado el interés en la búsqueda de métodos de procesamiento que permitan mantener los niveles de compuestos bioactivos presentes en los frutos. La deshidratación osmótica (DO) es un proceso que extrae parte del agua y solutos de los alimentos por intercambio con una solución altamente concentrada de un osmolito. En este trabajo se estudió la influencia de pretratamientos de DO sobre la calidad y nivel de compuestos bioactivos en dulce de frutilla. Se cosecharon frutillas (80% de color superficial rojo). Los frutos se cortaron longitudinalmente, empleándose una mitad para la elaboración con DO y tratamiento térmico y la restante para un proceso convencional de elaboración (control). Para los dulces con DO previa, las mitades fueron cortadas en trozos de 3 mm de espesor, a los cuales se les adicionó 60% de sacarosa y se mantuvo dicha mezcla por 15 min a 20°C. Posteriormente, los frutos deshidratados (FD) ($22\% \pm 2$ de sólidos solubles (SS)) y el jarabe obtenido ($SS=63\% \pm 3$) se separaron y el jarabe fue concentrado (JC) hasta $81 \pm 3\%$ SS. Por otra parte, los FD fueron procesados y se adicionaron al jarabe concentrado, obteniéndose una mezcla de $54 \pm 2\%$ de SS la cual se evaporó para obtener un producto final con $64 \pm 2\%$ de SS. Paralelamente, se realizaron elaboraciones tradicionales mezclando las frutillas con 60% de sacarosa ($SS=44\% \pm 2$) y evaporando inmediatamente hasta $64 \pm 2\%$ de SS. Se realizaron siete elaboraciones para cada uno de los tratamientos, evaluándose el color (L^* , a^* y b^* , $^{\circ}$ Hue, y chroma), las antocianinas por espectrofotometría y la capacidad antioxidante empleando el radical ABTS^{•+}. La elaboración con DO redujo el tiempo en que los frutos fueron tratados térmicamente. Los dulces obtenidos por DO y tratamiento térmico fueron más claros (mayor L^* que los control). Los valores de a^* y b^* fueron también más elevados en los dulces obtenidos con DO que en los control, indicando una menor pérdida de componentes rojos y amarillos del color. Los dulces de frutilla con DO tuvieron un 20% más de antocianinas y un 11% más de poder antioxidante que los obtenidos por el método convencional. Esta variante del método tradicional permitió obtener dulces con un color más parecido a la de la fruta original, de aspecto más natural y con incremento en compuestos bioactivos y capacidad antioxidante. Los dulces con DO previa poseen mayor *flavor* a frutilla. Esta información puede resultar útil para la industria de confituras.



Palabras clave: antocianina, mermelada, conservación, color, bioactivos

Introducción

Las frutillas son apreciadas por los consumidores debido a sus características de sabor, aroma y color. Las frutillas pueden consumirse frescas o procesadas de diferentes formas dentro de las que se destaca la obtención de confituras. El color característico de las frutillas está determinado por su contenido en antocianinas, compuestos de naturaleza fenólica (flavonoides) generalmente unidos covalentemente a un azúcar (Goulas et al., 2012). En frutilla la antocianina predominante es la pelargonidina-3-glucósido (Wang y Lewers, 2007). Además de su rol en el color, las antocianinas son importantes compuestos bioactivos con reconocida actividad antioxidante. Estos compuestos son sensibles al calor (Howard et al., 2012), por lo que pueden verse afectados durante la elaboración de las confituras.

Varios trabajos han evaluado la influencia de factores de proceso tales como el tipo de pectina utilizado, la temperatura de cocción (Holzwarth et al., 2013), el estado de madurez de los frutos (Levaj et al., 2010), el reemplazo de azúcares por edulcorantes (Basu et al., 2012) o el agregado de diferentes agentes gelificantes (Javanmard et al., 2012) en la calidad de confituras. En la mayor parte de los trabajos se ha observado una reducción de los niveles de antioxidantes (Rababah et al., 2012). De todos modos se ha sugerido que la hidrólisis de los azúcares asociados con los antioxidantes podría aumentar su biodisponibilidad en ciertos casos (Rickman et al., 2007). La deshidratación osmótica (DO) es un proceso de concentración que consiste en extraer parte del agua de los alimentos por intercambio con una solución altamente concentrada de un osmolito sin necesidad de recurrir a tratamientos con alta temperatura (Jain et al., 2010). Si bien *a priori* la DO puede ser utilizada por sí sola para la preparación de mermeladas, debido a las bajas temperaturas utilizadas, se ve comprometida la estabilidad microbiológica y enzimática del producto durante el almacenamiento (Igual et al., 2013). No obstante, la DO podría ser útil en forma previa a la cocción para reducir el procesado térmico y preservar mejor las propiedades nutricionales y sensoriales de los frutos. En ese sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de pretratamientos con deshidratación osmótica sobre el color, el contenido de antocianinas y la capacidad antioxidante de dulces de frutillas.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron frutillas (*Fragaria x ananassa*) con 80% de color superficial rojo y 8,3% de sólidos solubles, las cuales, luego de ser lavadas con agua conteniendo 100 ppm de HClO, fueron desprovistas del cáliz y cortadas longitudinalmente a la mitad. Una mitad se utilizó para la elaboración de dulce con DO previa y la otra para la elaboración tradicional (control).



Elaboración de dulce

Las etapas del proceso de elaboración se encuentran resumidas en la **Figura 1**. Para la elaboración de dulces con deshidratación osmótica previa (DO), las frutillas procesadas como se indica en la *sección 2.1* fueron nuevamente cortadas transversalmente en trozos de 3 mm de espesor y a las mismas se les adicionó 60% p/p de sacarosa. La mezcla se mantuvo 15 min a 20 °C para permitir un proceso de deshidratación previa. Posteriormente los frutos deshidratados se separaron (FD) (SS=22%±2), del jarabe obtenido por la deshidratación (J); (SS=63%±3) y este último fue concentrado hasta 81%±3 de SS. Los FD fueron procesados y se adicionó al jarabe concentrado (JC), obteniéndose una mezcla de 54%±2 de SS la cual se evaporó hasta 64%±2 de SS. Para las elaboraciones control se mezclaron los frutos trozados como se indicó en 2.1, se adicionó 60% de sacarosa (SS=44%±2) y se evaporó hasta 64%±2 de SS. El ensayo siguió un diseño en bloques donde cada bloque representa una elaboración DO y otra tradicional. Se realizaron 7 elaboraciones de cada tipo de dulce.

Color

Se utilizó un colorímetro (Minolta, Modelo CR-400) provisto con un cabezal de inmersión. Se midieron las variables de color CIE a^* , b^* y L^* y se calculó el °Hue (ángulo de color) y el croma (C^*) utilizando las siguientes ecuaciones:

$$^{\circ}\text{Hue} = \text{atan}(b^*/a^*) \quad (1)$$

$$C^* = ((a^*)^2 + (b^*)^2)^{1/2} \quad (2)$$

Antocianinas

Aproximadamente 2 g de dulce de frutilla fueron extraídos con 20mL de etanol frío al 75 % v/v conteniendo 0.1% p/p de HCl. La mezcla se centrifugó a 9.000 x g por 10 min a 4 °C. Se tomaron 5 mL del sobrenadante y se llevaron a 10 mL con el solvente de extracción. Se midió la absorbancia a 515 nm. En contenido de antocianinas se expresó como mg de pelargonidina-3-glucósido equivalente por kg de peso fresco usando el coeficiente de extinción $\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Antioxidantes por ABTS^{•+}

Aproximadamente 2 g de dulce de frutilla fueron extraídos con 20mL de etanol. La mezcla se centrifugó a 9.000 x g por 10 min a 4 °C. Se tomaron 5 mL del sobrenadante y se llevaron a 10 mL con etanol. El sobrenadante se utilizó para la determinación de antioxidantes por el radical ABTS^{•+}. A 1 mL de solución del radical ABTS^{•+} (7 mM de ABTS con 2,45 mM K₂S₂O₈, absorbancia 0,700 +/- 0,05 a 734 nm) se le adicionaron 25 µL del extracto. La mezcla se dejó reaccionar 6 minutos y se leyó la absorbancia a 734 nm. Los resultados se expresaron como mg de Trolox por kg de peso fresco. Se realizaron tres replicados por cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.



Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un ANOVA. Se utilizó un diseño en bloque donde cada bloque representó una elaboración control y una con DO previa, las medias se compararon empleando un test de Tukey, $\alpha \leq 0,05$.

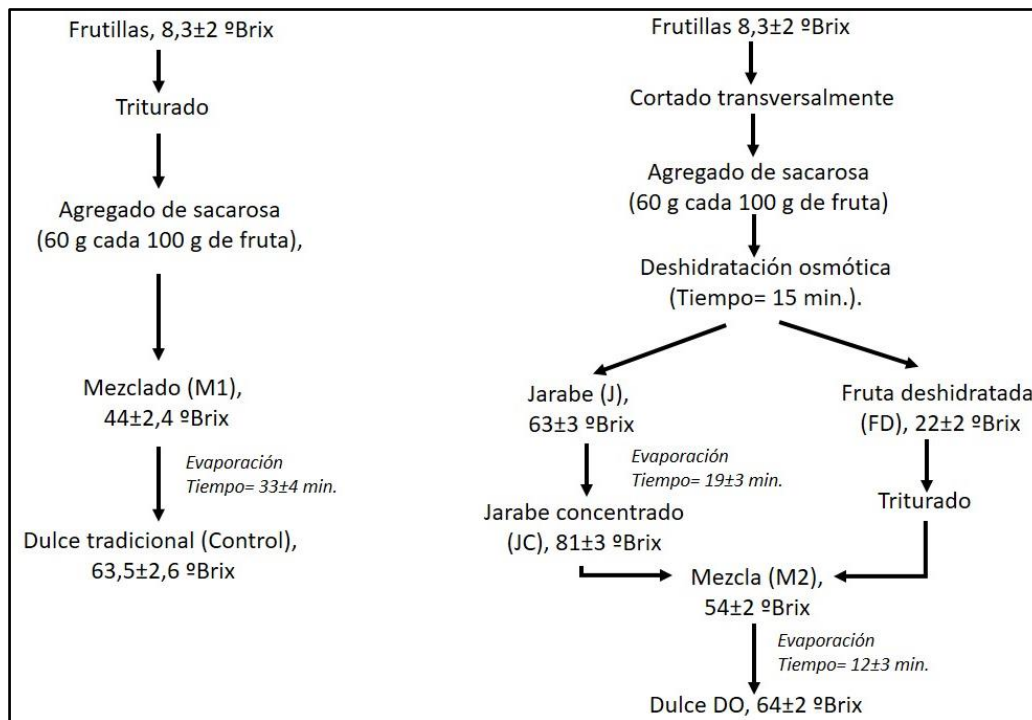


Figura 1: Esquema de las elaboraciones para los dulces de frutilla; izquierda, elaboración tradicional (control); derecha, elaboración con deshidratación osmótica previa. Se muestran promedios y desviaciones en algunos parámetros obtenidos considerando todas las elaboraciones. $n=7$.

Resultados y discusión

Color

En la **Figura 2** pueden observarse la apariencia y los parámetros de color para ambos tipos de dulce, control y DO. Los dulces con DO previa tuvieron un color más semejante al fruto fresco en comparación a los dulces control (**Figuras 2A y 2B**). La luminosidad (L^*) para los dulces control fue de 21, mientras que en los dulces con DO previa fue de 22,8 (**Figura 2C**). El mayor L^* de los dulces DO en comparación a los dulces control puede estar relacionado a un menor contenido de compuestos pardos derivados de la reacción de Maillard (Flores y del Castillo, 2016) o de la degradación térmica de antocianinas (Jackman et al., 1987). Los valores de a^* y b^* fueron de 20,1 y 9,2 respectivamente en dulces DO mientras que en los tradicionales fue inferior, aproximadamente 15,8 y 6,1 para a^* y b^* respectivamente (**Tabla 1**). Estos parámetros derivaron en un $^{\circ}\text{Hue}$ de 24,5, mientras que en los dulces tradicionales el $^{\circ}\text{Hue}$ fue de 21 (**Figuras 2D**). El menor $^{\circ}\text{Hue}$ en los dulces control podría deberse a que la fruta



sufrió mayor tiempo de exposición a altas temperaturas. Con respecto a la saturación del color (C^*), los dulces DO tuvieron un C^* de 22,1 mientras que en los controles fue de 16,9 (**Figuras 2E**). Los mayores valores del C^* de los dulces DO en relación a los controles puede estar relacionado a un mayor contenido de antocianinas, y pueden tomarse como referencia de los cambios del color en dulces de frutilla (Watanabe et al., 2011). Adicionalmente, los dulces DO presentaron un aroma y sabor más cercano al fruto fresco que los controles (*datos no mostrados*). En síntesis, el pretratamiento de DO antes de la cocción permitió obtener un dulce con características de color diferentes a las obtenidas en las elaboraciones tradicionales.

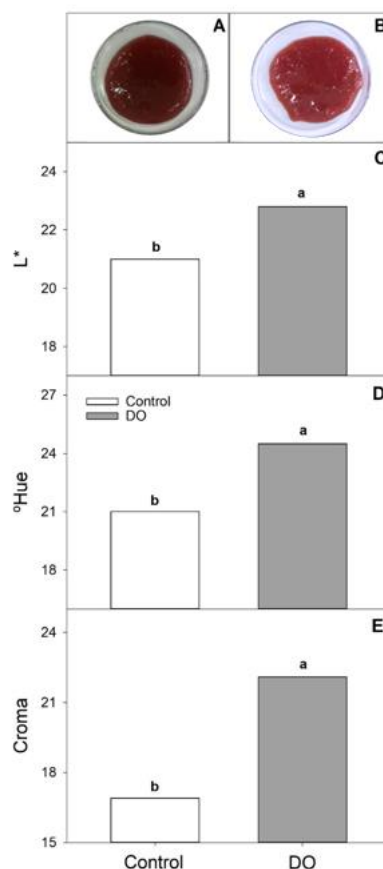


Figura 2: A, dulce de frutilla elaborado de forma tradicional (Control); B, dulce de frutilla elaborado con deshidratación osmótica previa (DO); C, luminosidad (L^*); D, $^{\circ}$ Hue y E, Croma (C^*), para los frutos control y DO. Diferentes letras indican diferencias significativas según un test de Tukey, $\alpha \leq 0,05$, $n=7$.

Tabla 1: Valores de los parámetros de color a^* y b^* para los dulces de frutilla elaborados de forma tradicional (control) y con deshidratación previa (DO). Diferentes letras indican diferencias significativas según un test de Tukey, $\alpha \leq 0,05$, $n=7$.

	a^*	b^*
Control	15,8b	6,1b
DO	20,1a	9,2a



Contenido de Antocianinas y poder antioxidante

Luego del proceso de evaporación, los dulces con DO previa tuvieron un contenido de antocianinas de 183 mg kg^{-1} , mientras que las elaboraciones control rondaron los 153 mg kg^{-1} (**Figura 3**). El proceso de DO extrae agua de los alimentos por

diferencia de potencial osmótico entre la matriz del alimento y el osmolito altamente concentrado. Las antocianinas son compuestos solubles en agua. Transcurrido el proceso de DO, el 35% de las antocianinas migró hacia el J (**Figura 4**), quedando las restantes 65% en la pulpa. Luego de la concentración del jarabe J, el 40% del contenido de antocianinas se retuvo en el JC (13% en relación al fruto fresco). Teniendo en cuenta que la mayor parte de las antocianinas fue retenida en la pulpa (FD), en principio podemos adjudicar el mayor contenido de antocianinas hallado en los dulces DO a un menor tiempo de exposición al calor (**Figura 1**). Hay trabajos que han sugerido que los azúcares pueden ejercer un efecto protector contra la degradación de las antocianinas (Watanabe et al., 2011). La mayor concentración de azúcares en la pulpa de las frutillas luego de la DO podría haber estabilizado las antocianinas haciéndolas más tolerantes al procesamiento posterior (Barraza-Jáuregui et al., 2017).

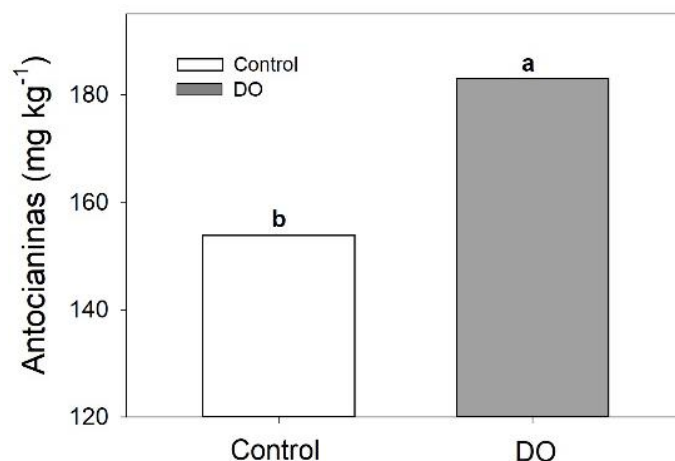


Figura 3: Contenido de antocianinas en dulces elaborados de forma tradicional (control) o con deshidratación osmótica previa (DO). Diferentes letras indican diferencias significativas según un test de Tukey, $\alpha \leq 0,05$, $n=7$.

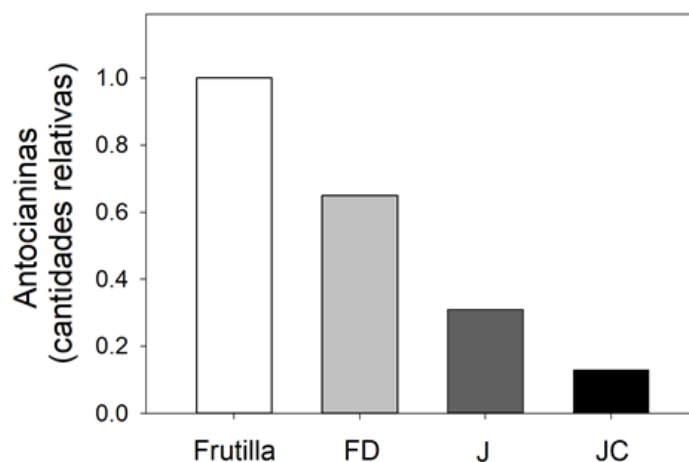


Figura 4: Cantidades relativas de antocianinas en dulces elaborados con deshidratación osmótica previa (DO). FD, fruta deshidratada; J, jarabe; JC, jarabe concentrado (ver figura 1).

La capacidad antioxidante contra el catión radical ABTS^{•+} fue significativamente mayor en los dulces con DO en comparación a los control (**Figura 5**). Se sabe que la degradación térmica de las antocianinas resulta en la generación de compuestos polifenólicos pero no está claro si esta degradación resulta en una pérdida neta de la capacidad antioxidante (Patras et al., 2010). De esta forma, el tratamiento térmico podría degradar las antocianinas convirtiéndolas en otros compuestos fenólicos que también posean actividad antioxidante. Por otra parte se conoce que algunos intermediarios de la reacción de Maillard generados durante los tratamientos térmicos pueden presentar capacidad antioxidante por lo que resulta necesario realizar un estudio más detallado.

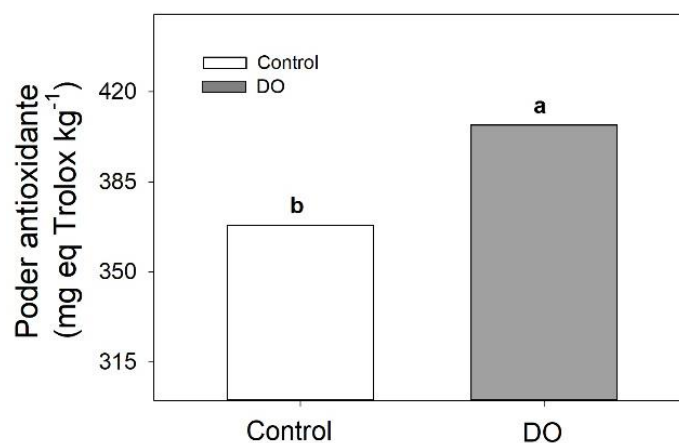


Figura 5: Poder antioxidante de dulces elaborados de forma tradicional (control) o con deshidratación osmótica previa (DO). Diferentes letras indican diferencias significativas según un test de Tukey, $\alpha \leq 0,05$, $n=7$.



Conclusiones

En este trabajo se elaboraron dulces de frutilla aplicando una deshidratación osmótica (DO), previa a la evaporación, utilizando el mismo azúcar de la formulación. Luego de la deshidratación osmótica, el 65% de las antocianinas quedó retenido en la pulpa. El proceso de DO permitió reducir el tiempo de evaporación. Esto provocó que las antocianinas de los dulces con DO estén menos expuestas al calor en comparación a los controles. Los dulces DO tuvieron mayor luminosidad, °Hue y croma, con características más similares a la pulpa del fruto fresco que los obtenidos de forma tradicional. La diferencia en color podría estar relacionada con el mayor contenido de antocianinas hallada en los dulces DO. La capacidad antioxidante fue superior en los dulces DO. Esta información podría ser de utilidad para la industria de confituras.

Referencias

- BASU S, SHIVHARE US. (2013). Rheological, textural, microstructural, and sensory properties of sorbitol-substituted mango jam. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 1401-1413.
- BARRAZA-JÁUREGUI G, VEGA G, VALERIANO J, OBREGÓN J, SICHE R, MIANO AC. (2017). Osmotic pretreatment to assure retention of phenolics and anthocyanins in berry jams. *Food Bioscience*. 17, 24-28.
- FLORES G, DEL CASTILLO MLR. (2016). Cancer-related constituents of strawberry jam as compared with fresh fruit. *Cancers*, 8, 16.
- JACKMAN RL, YADA RY, TUNG MA. (1987). A review: Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. *Journal of Food Biochemistry*, 11, 279-308.
- GOULAS V, VICENTE AR, MANGANARIS GA. (2012). Structural diversity of anthocyanins in fruits. In: Motohashi N. (Ed.), *Anthocyanins: Structure, Biosynthesis and Health Benefits*. Nova Science Publisherspp225-250.
- HOLZWARATH M, KORHUMMEL S, SIEKMANN T, CARLE R, KAMMERER DR. (2013). Influence of different pectins, process and storage conditions on anthocyanin and colour retention in strawberry jams and spreads. *LWT - Food Science and Technology*, 52, 131-138
- HOWARD LR, PRIOR RL, LIYANAGE R, LAY JO. (2012). Processing and storage effect on berry polyphenols: challenges and implications for bioactive properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 6678–6693.
- IGUAL M, SAMPEDRO F, MARTÍNEZ-NAVARRETE N, FAN X.(2013). Combined osmodehydration and high pressure processing on the enzyme stability and antioxidant capacity of a grapefruit jam. *Journal of Food Engineering*, 114, 514-521.
- JAIN SK, VERMA RC, MURDIA LK, JAIN HK, SHARMA GP.(2010). Optimization of process parameters for osmotic dehydration of papaya cubes. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 211–217.
- JAVANMARD M, CHIN NL, MIRHOSSEINI SH, ENDAN J. (2012). Characteristics of gelling agent substituted fruit jam: studies on the textural, optical, physicochemical and



sensory properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 47, 1808-1818.

LEVAJ B, BUNIĆ N, DRAGOVIĆ-UZELAC V, KOVAČEVIĆ DB. (2010). Gel Strength and Sensory Attributes of Fig (*Ficus carica*) Jams and Preserves as Influenced by ripeness. *Journal of Food Science*, 75, 120-124.

PATRAS A, BRUNTON NIGEL P, O'DONNELL C, TIWARI BK. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 3-11.

RABABAH TM, AL-MAHASNEH MA, KILANI I, YANG W, ALHAMAD MN, EREIFEJ K, AL-ÚDATT M.(2011). Effect of jam processing and storage on total phenolics, antioxidant activity, and anthocyanins of different fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1096-1102.

RICKMAN JC, BARRETT DM, BRUHN CM. (2007). Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins C and B and phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 930-944.

WANG SY, LEWERS KS. (2007). Antioxidant capacity and flavonoid content in wild strawberries. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132, 629-637.

WATANABE Y, YOSHIMOTO K, OKADA Y, NOMURA M. (2011). Effect of impregnation using sucrose solution on stability of anthocyanin in strawberry jam. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 891-895.



Efecto del tratamiento térmico sobre el color y contenido de antocianinas en jugos de zarzamora y frambuesa

Rodoni L.M.⁽¹⁾⁽²⁾, Massolo F.⁽¹⁾, Badin E.⁽³⁾, Rossi Y.E.⁽³⁾, Moroni F.⁽³⁾, Vicente A.R.⁽¹⁾⁽²⁾, Lespinard A.R.⁽³⁾

(1) Grupo de Investigación en Tecnología Poscosecha (GiTeP), CIDCA, CONICET-UNLP. La Plata, Bs.As.

(2) Laboratorio de Investigación en Productos Agroindustriales (LIPA), FCAYF, UNLP. La Plata, Bs.As.

(3) Centro de Investigaciones y Transferencia de Villa María (CIT VM) – (CONICET - UNVM). Villa María, Córdoba.

Dirección de e-mail: luisrodoni@gmail.com

Resumen

El cultivo de “berries” se desarrolla en zonas templadas, aunque actualmente existen incipientes producciones en la zona centro de nuestro país. La elaboración de jugos surge como una alternativa de preservación y agregado de valor a dichos productores. Para lograr un producto inocuo y estable es necesario someter a los jugos al proceso de pasteurización, el objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios de las propiedades nutritivas y sensoriales durante este proceso. Se utilizaron frutos de zarzamora y frambuesa provistos por la empresa “Yuco Frutos”, de Villa María, los cuales fueron procesados para separar la pulpa del jugo. Al jugo obtenido se lo diluyó al 50% con agua y se le adicionó 70 g kg⁻¹ de sacarosa. Se colocaron 6 ml de cada jugo en tubos de vidrio de 10 ml y los mismos se sometieron a calentamiento en baño de agua termostatzado a 70, 80, 90 y 100°C a diferentes tiempos (0-180 min.). Las muestras se colocaron en una celda de 5,5 ml en donde fueron analizadas con un colorímetro Minolta-CR-400. Se registraron los parámetros L*, a* y b* y se calcularon el ángulo °Hue y croma (C*). Las antocianinas se determinaron espectrofotométricamente. El L* no presentó cambios significativos, mientras que a* se redujo solo 30% a la mayor temperatura (100°C) para ambos jugos. El b* resultó ser más afectado que a*, lo cual desplazó el ° Hue hacia tonalidades más oscuras. El C* fue seleccionado para modelar el cambio en el color. Este siguió una cinética de primer orden cuya constante de velocidad de degradación (k_T) aumentó de 0,0010 a 0,0022 (min⁻¹) para zarzamora y de 0,0010 a 0,0025 (min⁻¹) para frambuesa, con el incremento de la temperatura. La dependencia de dicha constante con la temperatura fue descrita por la Ley de Arrhenius, obteniéndose una energía de activación (E_a) de 27,8 y 33,1 kJ mol⁻¹ para zarzamoras y frambuesas, respectivamente. La variación de antocianinas con el tiempo siguió una cinética de primer orden, donde k_T aumentó de 0,0015 a 0,0106 (min⁻¹) para zarzamora y de 0,0015 a 0,0092 (min⁻¹) para frambuesa, incrementando la temperatura desde 70 a 100 °C. Las E_a para las antocianinas fueron de 69,9 y 62,3 kJ mol⁻¹ para zarzamoras y frambuesas, respectivamente. Los resultados obtenidos indican una mayor sensibilidad de las antocianinas tanto para los aumentos de temperatura como así también para el tiempo de exposición en comparación al color. Las cinéticas



obtenidas podrían ser útiles para optimizar las condiciones de pasteurización de jugos de “berries” en vistas a conservar la calidad nutricional y sensorial del producto.

Palabras clave: berries, procesamiento, pasteurización, color, antocianinas.

Introducción

La producción de “berries” en la Argentina se ubica en quinto lugar siguiendo a la de cítricos, uva, frutos de pepita y carozo, y constituye uno de los sectores de mayor dinamismo y crecimiento en las últimas dos décadas. Desde el punto de vista de su conservación en fresco los “berries” son altamente perecederos, por lo que las pérdidas de calidad y cantidad en la cadena de distribución suelen ser elevadas (Kader, 2007). En tal sentido, el procesamiento aparece en estos frutos como una estrategia de interés para reducir estas mermas, agregar valor y aumentar la oferta tanto geográfica como temporal. El color característico de estos frutos está dado por un tipo de polifenoles denominados genéricamente antocianinas, sustancias que a su vez son los principales responsables de su capacidad antioxidante (Goulas et al., 2012). Las antocianinas están formadas por una molécula de antocianidina unida a una molécula de glucosa, galactosa o arabinosa (Howard et al., 2012). La estabilidad de las antocianinas depende de su estructura química, del pH y de la composición de la matriz donde se encuentran. Las antocianinas acetiladas son las que poseen mayor estabilidad (Wrolstad, 2004). Los berries son ricos en antocianinas no acetiladas. La pasteurización por calor es el tratamiento más común para extender el periodo de aptitud de los jugos. Los microorganismos patógenos, gran parte de la flora banal y las enzimas tales como la pectin-metil esterasa, la polifenol oxidasa y peroxidasa (estas dos últimas principales responsables de la degradación de antocianinas) pueden ser inactivados con tratamientos de 90-98 °C por 10-60 seg (Vervoort et al., 2011). Desde el punto de vista de la estabilidad microbiológica, los jugos de berries poseen un pH < 4,5, por lo cual la aplicación de un proceso térmico de pasteurización posibilitaría que el producto fuera estable incluso a temperatura ambiente (Silva y Gibbs, 2004). Durante la pasteurización del jugo de arándano se pierde entre 30-60 % del contenido de antocianinas, sin considerar los demás antioxidantes (Brownmiller et al., 2008). En jugos de mora las pérdidas de antocianinas rondan el 30 %. Sin embargo, otros componentes fenólicos tales como los elagitaninos de la frambuesa, pueden ser más estables al tratamiento térmico (Azofeifa et al., 2015). En jugo de mango, un tratamiento de 90 °C por 60 segundos redujo el contenido de polifenoles en 38% (Santhirasegaram et al., 2013). Para poder predecir los efectos indeseados durante el tratamiento térmico es necesario conocer los parámetros cinéticos, tales como las constantes de degradación y la energía de activación, correspondientes a estos cambios (Patras et al., 2010). El objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar el efecto de los tratamientos térmicos sobre el color y el contenido de antocianinas en jugos de frambuesa y zarzamora y obtener los parámetros cinéticos que gobiernan dichos cambios.



Materiales y métodos

Materia prima y preparación de los jugos: Se utilizaron frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus* 'Jumbo') y frambuesa (*Rubus idaeus* 'Autunm Bliss') provistos por la empresa "Yuco Frutos", de Villa María, los cuales fueron procesados para separar la pulpa del jugo. El jugo obtenido se diluyó al 50% con agua y se le adicionó 70 g kg⁻¹ de sacarosa.

Tratamientos: Para las mediciones del color, se colocaron 6 ml de cada jugo, preparado como se indicó en 2.1, en tubos de vidrio de 10 ml y los mismos se sometieron a calentamiento en baño de agua termostatzado a 70, 80, 90 y 100 °C a diferentes tiempos (0-180 min.). Para la determinación de antocianinas los tratamientos se realizaron de la misma forma que para el color, excepto que se utilizaron viales de 3 ml conteniendo 1,5 ml de jugo.

Color: Las muestras se colocaron en una celda de 5,5 ml en donde fueron analizadas con un colorímetro Minolta-CR-400. Se registraron los parámetros L*, a* y b* y se calcularon el ángulo °Hue y el croma (C*):

$$^{\circ}\text{Hue} = \text{atan} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (1)$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (2)$$

Antocianinas: Unos 50 µL de jugo se mezclaron con 950 µL de etanol con HCl al 0,1% p/v. Se homogeneizó en vortex durante 30 segundos y se centrifugó a 13.000 x g por 10 min a 4 °C. Al sobrenadante se le midió la absorbancia a 520 nm utilizando un espectrofotómetro (Shimadzu Corporation, Modelo UV Mini-1240, Japón). Los valores se expresaron en mg L⁻¹ considerando la absortividad de la cianidina (0,082 L mg⁻¹ cm⁻¹).

Análisis Estadístico: El experimento se realizó por duplicado. Los análisis de correlación y el cálculo de las respectivas constantes se realizaron utilizando el programa Microsoft Excel® 2013.

Resultados y Discusión

Antocianinas

El contenido inicial de antocianinas de los jugos de zarzamora y frambuesa fue de 240 y 160 mg kg⁻¹ respectivamente (Figura 1). La Figura 2 muestra la variación del contenido de antocianinas, expresado como porcentaje de retención, durante el calentamiento de los jugos a las diferentes temperaturas ensayadas.

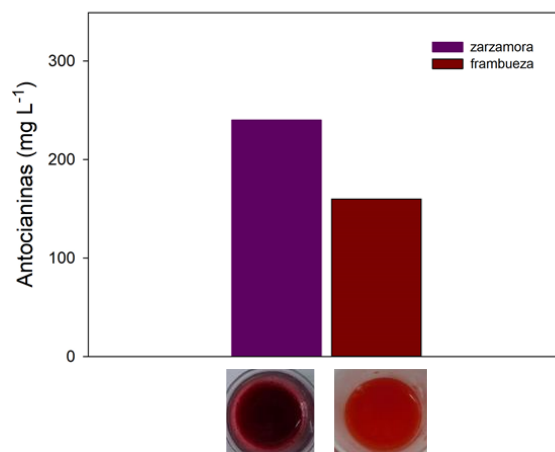


Figura 1: Contenido de antocianinas y apariencia de los jugos preparados a partir de frutos de frambuesa y zarzamora

Si bien todas las condiciones de temperatura evaluadas mostraron reducir el contenido de antocianinas, se requirieron al menos 60 min a 90 y 100 °C para una degradación superior al 40 %. A 80 °C por 180 min la reducción fue de 35 (zarzamora) y 40 % (frambuesa). En el caso de la temperatura más baja, luego de 180 min, la pérdida de antocianinas fue de alrededor de 23 % para ambos jugos (Figura 2A y 2B). A pesar de que los “berries” son ricos en antocianinas no acetiladas, las antocianinas de frambuesa y zarzamora mostraron una estabilidad a los tratamientos térmicos, superior a otros compuestos termolábiles como lo es el ácido ascórbico (Aghajanzadeh et al., 2016). El bajo pH de los jugos (~3) pudo haber ayudado a estabilizar las moléculas frente a los tratamientos térmicos (Kirca et al., 2006). Por otro lado, también es posible que el tratamiento térmico propiciara la liberación de los compuestos antociánicos retenidos en la pulpa hacia la fase acuosa, (Rickman et al., 2007). De hecho, algunos trabajos han mostrado que los tratamientos térmicos moderados pueden favorecer la extracción de antioxidantes en algunas matrices (Guldiken et al., 2016).

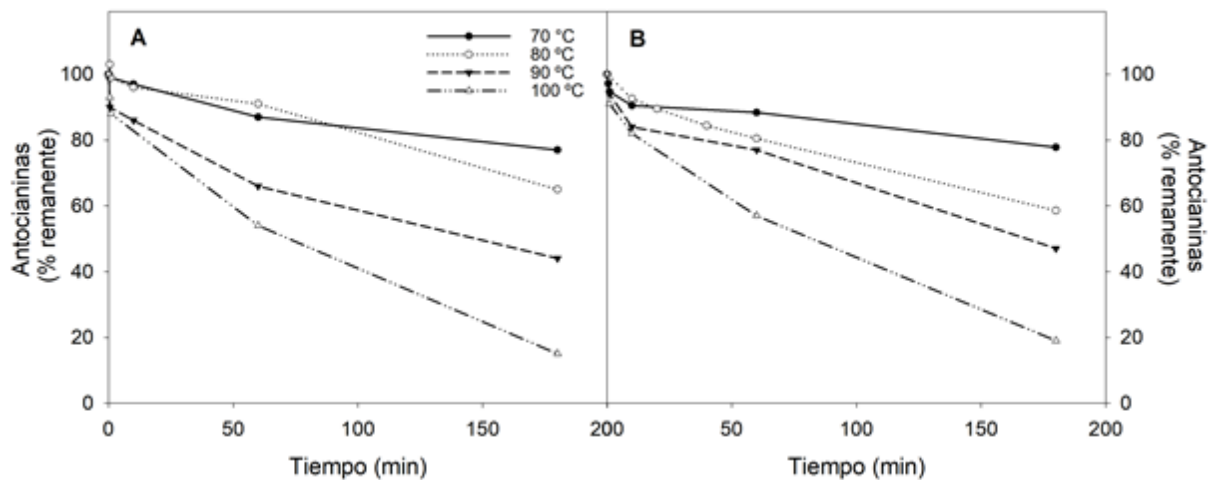


Figura 2: Variación de la retención porcentual de antocianinas con el tiempo de calentamiento a temperaturas de 70, 80, 90 y 100 °C para jugos de zarzamora (A) y frambuesa (B).

Se calcularon las constantes de degradación térmica de antocianinas (k_T), el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) a partir de las siguientes ecuaciones correspondientes a una cinética de degradación de primer orden:

$$\ln \left(\frac{C_t}{C_0} \right) = -k_T \times t \quad (3)$$

$$t_{1/2} = -\frac{\ln 0,5}{k_T} \quad (4)$$

Donde C_0 y C_t corresponden a las concentraciones de antocianinas iniciales y luego de un tiempo (t) de iniciado el tratamiento térmico de las muestras, respectivamente, a una determinada temperatura (T).

A partir de las k_T se graficó el $\ln k_T$ vs. $(RT)^{-1}$ (Figura 3) para el cálculo de la energía de activación (E_a) y la constante de referencia (k_{ref}) que fueron calculadas a partir de la ecuación de Arrhenius:

$$\ln (k_T) = \ln (k_{ref}) - \frac{E_a}{RT} \quad (5)$$

Donde R corresponde a la constante de los gases ideales ($8,31 \times 10^{-3} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) y T a la temperatura en grados kelvin.

La Tabla 1 muestra los parámetros cinéticos de degradación térmica para ambos jugos. En el caso de los jugos de frambuesa, la k_T aumentó de 15×10^{-3} a $92 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ con el incremento de temperatura de 70 a 100 °C con una E_a de $62,3 \text{ kJ mol}^{-1}$. El mismo incremento de temperatura derivó en un incremento de k_T de 15×10^{-3} a $109 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ con una E_a de $69,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ en los jugos de zarzamora (Tabla 1). Las antocianinas de los jugos de frambuesa, a pesar de encontrarse en menor cantidad que en los jugos de zarzamora, demostraron poseer una mayor estabilidad. Esto puede estar relacionado a diferencias en el tipo de antocianinas presente en cada jugo, ya que la estructura de estas moléculas influye marcadamente en la estabilidad de las mismas (Gras et al., 2018).

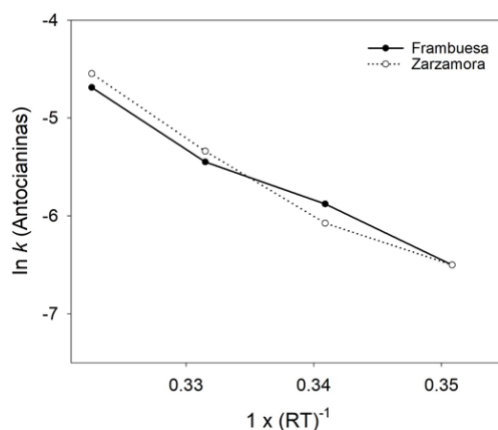


Figura 3: Logaritmo natural de la constante de velocidad k_t a una determinada temperatura contra $1/RT$ (mol kJ^{-1}).

Tabla 1: Constantes de degradación térmica de antocianinas (k_T), tiempo de vida media ($t_{1/2}$), energía de activación (E_a) y constante de referencia (k_{ref}) para el contenido de antocianinas en jugos de frambuesa y zarzamora tratados a 70, 80, 90 y 100 °C por tiempos entre 0 (jugo fresco) y 180 minutos. Entre paréntesis se encuentra el coeficiente de correlación.

		T (°C)	K_T (s^{-1}) x 10^3	$t_{1/2}$ (min.)	K_{ref} (min.)	E_a (kJ mol^{-1})
Antocianinas	Zarzamora	70	15 (0,955)	7,7	1.006.164	69,9 (0,977)
		80	23 (0,948)	5,0		
		90	48 (0,907)	2,4		
		100	106 (0,998)	1,1		
	Frambuesa	70	15 (0,955)	7,7	76.013	62,3 (0,971)
		80	28 (0,962)	4,1		
		90	43 (0,993)	2,7		
		100	92 (0,998)	1,3		

Parámetros de color

La luminosidad presentó valores iniciales de entre 19-22 y 17-23 para jugos de frambuesa y zarzamora, respectivamente. Contrariamente a lo observado en otros trabajos, en donde la luminosidad se incrementa luego del tratamiento térmico (Fernández-López et al., 2013), no pudo observarse una tendencia clara respecto a este parámetro (datos no mostrados). La degradación de antocianinas provocó un cambio en los valores de a^* , b^* y $^{\circ}\text{Hue}$ (Tabla 2).



Tabla 2: Parámetros de color (a^* , b^* y $^{\circ}\text{Hue}$) para jugos de frambuesa y zarzamora tratados a 70, 80, 90 y 100 °C por 0 (jugo sin tratar térmicamente), 10, 60 y 180 minutos.

	Tiempo (min.)	a^*				b^*				$^{\circ}\text{Hue}$			
		<i>Temperatura (°C)</i>											
		70	80	90	100	70	80	90	100	70	80	90	100
Frambuesa	0	21,0	20,2	19,3	18,8	8,5	6,4	6,1	5,8	22,0	17,6	17,5	17,2
	10	21,0	19,5	17,7	17,5	8,3	6,2	4,7	4,2	21,6	17,6	14,9	13,5
	60	20,7	18,5	16,2	15,9	6,8	5,0	3,0	2,5	18,2	15,1	10,5	8,9
	180	18,2	16,0	14,9	12,2	4,7	3,5	2,3	2,1	14,5	12,3	8,8	9,8
	Zarzamora	0	19,7	23,0	21,9	17,8	6,1	8,0	7,7	4,7	17,2	19,2	19,4
	10	19,9	22,8	20,7	16,0	6,0	8,2	6,4	3,1	16,8	19,8	17,2	11,0
	60	17,9	20,7	18,9	15,7	4,4	6,7	4,9	2,6	13,8	17,9	14,5	9,4
	180	17,0	20,2	17,0	12,0	3,3	6,1	3,7	1,2	11,0	16,8	12,3	5,7

En general se observó una tendencia similar en ambos jugos con una reducción mayor del b^* en comparación al a^* que derivó en valores del $^{\circ}\text{Hue}$ inferiores conforme aumentaba el tiempo de exposición a cada temperatura. Sin embargo, el croma (C^*) fue el parámetro que mejor ajustó a una cinética de degradación de primer orden y fue elegido para continuar con la obtención de los parámetros cinéticos correspondientes al cambio de color.

La Figura 4 muestra las curvas de reducción relativa del C^* con forme aumenta el tiempo de exposición a las diferentes temperaturas. Puede observarse que inclusive luego de tiempos prolongados a altas temperaturas la reducción del croma no superó el 40 % del valor inicial. En comparación con las antocianinas (Figura 2), la degradación del C^* parece transcurrir a menor velocidad.

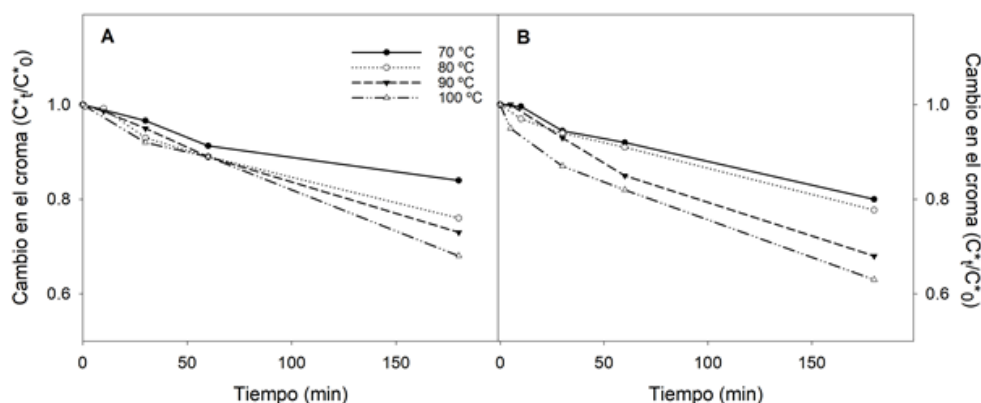


Figura 4: Retención del C^* a diferentes tiempos de tratamiento a 70, 80, 90 y 100 °C para jugos de zarzamora (A) y frambuesa (B).



La Tabla 3 muestra los parámetros cinéticos de degradación térmica del C*, calculados de igual forma que para las antocianinas. En el caso de los jugos de frambuesa, la k_T aumentó de 10×10^{-3} a $25 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ con el incremento de temperatura de 70 a 100 °C con una E_a de 33,1 kJ mol⁻¹. El mismo incremento de temperatura derivó en un incremento de k_T desde 10×10^{-3} a $22 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ con una E_a de 27,8 kJ mol⁻¹ en los jugos de zarzamora. Comparando estos valores con los de la Tabla 1, el C* resultó ser menos afectado por el incremento de la temperatura y el tiempo de tratamiento térmico en comparación a las antocianinas. Una de las rutas de degradación de las antocianinas es su condensación en compuestos pardos (Danişman et al., 2015). Estos polímeros podrían llegar a reducir el descenso del croma.

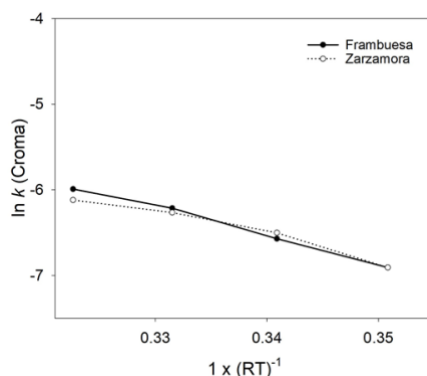


Figura 5: Logaritmo natural de la constante de velocidad k_t a una determinada temperatura contra $1/RT$ (mol kJ⁻¹).

Tabla 3: Constantes de degradación térmica de antocianinas (k_T), tiempo de vida media ($t_{1/2}$), energía de activación (E_a) y constante de referencia (k_{ref}) para el croma (C*) de los jugos de frambuesa y zarzamora tratados a 70, 80, 90 y 100 °C por tiempos entre 0 (jugo fresco) y 180 minutos. Entre paréntesis se encuentra el coeficiente de correlación.

		T (°C)	k_T (s ⁻¹) x 10 ³	$t_{1/2}$ (min.)	K_{ref} (min.)	E_a (kJ mol ⁻¹)
Croma (C*)	<i>Zarzamora</i>	70	10 (0,866)	11,6	0,3	27,8 (0,962)
		80	15 (0,984)	7,7		
		90	19 (0,976)	6,1		
		100	22 (0,984)	5,3		
	<i>Frambuesa</i>	70	10 (0,998)	11,6	1,8	33,1 (0,994)
		80	14 (0,992)	8,3		
		90	20 (0,963)	5,8		
		100	25 (0,976)	4,6		



Conclusiones

Se estudiaron la degradación térmica de antocianinas y los cambios en los parámetros del color para jugos de frambuesa y zarzamora. A pesar de encontrarse en menor concentración, las antocianinas de los jugos de frambuesa mostraron una mayor estabilidad que las de zarzamora. En relación a los parámetros de color, si bien el a^* , b^* y el $^{\circ}$ Hue fueron afectados por los tratamientos, el croma fue el que mejor se ajustó a una cinética de degradación de primer orden. La determinación espectrofotométrica de las antocianinas resultó un mejor indicador que el croma para monitorear el daño térmico provocado en los jugos, principalmente por tener una mayor sensibilidad al incremento de la temperatura y al tiempo de tratamiento térmico. Estos datos pueden ser de utilidad para la industria de jugos.

Agradecimientos

A “Yuco Frutos” quien proveyó los frutos. Al Proyecto PIO Pablo Yaryura PIO 20320150100008CO RD 4800. Agregado de valor en origen a la producción frutihortícola de la región de Villa María. Evaluación y desarrollo de estrategias de manejo pre y poscosecha.

Referencias

- AGHAJANZADEH S, KASHANINEJAD M, ZIAIIFAR AM. 2016. Effect of infrared heating on degradation kinetics of key lime juice physicochemical properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 38, 139-148.
- AZOFEIFA G, QUESADA S, PÉREZ AM, VAILLANT F, MICHEL A. 2015. Pasteurization of blackberry juice preserves polyphenol-dependent inhibition for lipid peroxidation and intracellular radicals. *Journal of Food Composition and Analysis*, 42, 56-62
- BROWNMILLER C, HOWARD LR, PRIOR RL. 2008. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of Food Science*, 73, H72-H79
- DANIŞMAN G, ARSLAN E, TOKLUCU AK. 2015. Kinetic analysis of anthocyanin degradation and polymeric colour formation in grape juice during heating *Czech Journal of Food Sciences*, 33, 103-108.
- FERNÁNDEZ-LÓPEZ JA, ANGOSTO JM, GIMÉNEZ PJ, LEÓN G. 2013. Thermal Stability of Selected Natural Red Extracts Used as Food Colorants. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68, 11-17.
- GOULAS V, VICENTE AR, MANGANARIS GA. 2012. Structural Diversity of Anthocyanins in Fruits. In: Motohashi N. (Ed.), *Anthocyanins: Structure, Biosynthesis and Health Benefits*. Nova Science Publishers, 10, 225-250.
- GRAS CC, BAUSE K, LEPTIHN S, CARLE R, SCHWEIGGERT RM. 2018. Effect of chlorogenic acid on spectral properties and stability of acylated and non-acylated cyanidin-3-O-glycosides. *Food Chemistry* 240, 940-950.



GULDIKEN B, BOYACIOGLU D, CAPANOGLU E. 2016. Optimization of extraction of bioactive compounds from black carrot using Response Surface Methodology (RSM). *Food Analytical Methods*, 9, 1876–1886.

HOWARD LR, PRIOR RL, LIYANAGE R, LAY JO. 2012. Processing and storage effect on berry polyphenols: challenges and implications for bioactive properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 6678-6693.

KADER AA. 2007. Cap. 29, Sistemas de manejo poscosecha: Frutas pequeñas. En: Kader AA. (Ed). *Postharvest technology of horticultural crops* (401-420). California: Center for Information and Research on Postharvest Technology, Technology Division of Agriculture and Natural Resources. University of California Davis.

KIRCA A, ÖZKAN M, CEMEROĞLU B. 2006. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry*, 101, 212-218.

PATRAS A, BRUNTON NP, O'DONNELL C, TIWARI BK. 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends Food Science and Technology* 21, 3-11.

RICKMAN JC, BARRETT DM, BRUHN CM. 2007. Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins C and B and phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 930-944.

SANTHIRASEGARAM V, RAZALI Z, SOMASUNDRAM C. 2013. Effects of thermal treatment and sonication on quality attributes of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Ultrasonic Sonochemistry* 20, 1276-1282

SILVA FVM & GIBBS P. 2004. Target selection in designing pasteurization processes for shelf-stable high-acid fruit products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 353-360.

VERVOORT L, VAN DER PLANCKEN I, GRAUWET T, TIMMERMANS RAH, MASTWIJK HC, MATSER AM, ET AL. 2011. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part II: Impact on specific chemical and biochemical quality parameters. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 466-477.

WROLSTAD RE. 2004. Symposium 12: Interaction of natural colors with other ingredients. Anthocyanin pigments - Bioactivity and coloring properties. *Journal of Food Science*, 69, C419-C421.



Estudio cinético de la degradación térmica de antocianinas en pulpas y jugos de frambuesa

Rossi Y.E.⁽¹⁾, Moroni F.⁽¹⁾, Badin E.⁽¹⁾, Massolo F.⁽²⁾⁽³⁾, Rodoni L.M.⁽²⁾⁽³⁾, Vicente A.R.⁽²⁾⁽³⁾, Lespinard A.R.⁽¹⁾

(1) Centro de Investigaciones y Transferencia de Villa María (CIT VM) - CONICET Universidad Nacional de Villa María (UNVM). Instituto A.P. de Ciencias Básicas y Aplicadas. Campus Universitario. Villa María, Córdoba, Argentina.

(2) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) CONICET - Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

(3) Laboratorio de Investigación en Productos Agroindustriales (LIPA), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Dirección de e-mail: yanirro@hotmail.com

Resumen

Las frambuesas poseen alto valor nutricional debido a su elevado contenido de antocianinas que le confieren además su color característico. El procesamiento de estos frutos para la obtención de pulpas y jugos, y la posterior aplicación de un tratamiento térmico de conservación, resulta en una de las alternativas para generar un producto inocuo, de mayor estabilidad y valor agregado. Sin embargo, durante el procesamiento térmico, el contenido de antocianinas se ve afectado por el calor, y consecuentemente también sus propiedades nutricionales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la estabilidad térmica de antocianinas presentes en pulpas y jugos de frambuesas y obtener modelos cinéticos que describan su variación con la temperatura y el tiempo de proceso. Para ello, muestras de pulpa y de jugo diluido al 50% con agua se sometieron a calentamiento en baño de agua a 70, 80, 90 y 100°C a diferentes tiempos en un rango de 0 a 180 minutos. Las muestras tratadas fueron luego analizadas espectrofotométricamente para determinar el contenido de antocianinas. Los resultados obtenidos mostraron que la variación de la concentración de antocianinas con el tiempo de proceso siguió una cinética de primer orden para ambos productos. En pulpa, la constante de velocidad de degradación (k) aumentó de 0,0017 a 0,0056 min^{-1} y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) disminuyó de 398,28 a 123,75 min con el incremento de temperatura de 70 a 100°C. En jugo, los valores obtenidos para k de 0,0015 a 0,0092 (min^{-1}), mientras que el $t_{1/2}$ se redujo de 462,00 a 75,33 min para dicho incremento de temperatura. A su vez la dependencia de k con la temperatura fue descrita por la Ley de Arrhenius obteniéndose una energía de activación de 42,73 y 62,34 kJ/mol para pulpa y jugo, respectivamente. Los resultados obtenidos en este estudio podrían ser de utilidad para la industria con el fin de



optimizar los procesos y minimizar las pérdidas de las propiedades nutraceuticas en jugos y pulpas de frambuesa.

Palabras clave: frambuesa, antocianinas, tratamiento térmico, cinética de degradación

Introducción

Las frambuesas (*Rubus idaeus* 'Autumn Bliss') poseen alto valor nutricional debido a su elevado contenido de compuestos fenólicos a los cuales se los reconoce como agentes quimiopreventivos. Los altos contenidos de estos compuestos reducen la propensión a enfermedades cardíacas, cerebrovasculares y disminuyen la tasa de mortalidad por cáncer (Seeram, 2008). Entre estos compuestos se encuentran las antocianinas, que le confieren además su color característico. En la actualidad hay un interés creciente en los antioxidantes, en particular en aquellos que previenen los efectos nocivos de los radicales libres en el cuerpo humano, existiendo una preferencia por aquellos provenientes de fuentes naturales por sobre los de origen sintético.

Por su parte, la estabilidad química de las antocianinas ha sido evaluada en numerosos estudios recientes debido a sus variadas aplicaciones, sus efectos beneficiosos y su uso como alternativa a los colorantes artificiales en los alimentos. De estos estudios se desprende que la estabilidad de antocianinas depende de la temperatura de procesamiento, pero también es influenciada por las propiedades del producto resultante y por condiciones de proceso tales como: pH, temperatura de almacenamiento, estructura química y concentración de antocianinas, luz, oxígeno, enzimas, iones metálicos, etc. (Rein, 2005). Por lo tanto, las combinaciones tiempo-temperatura, el tipo de fruto y el mantenimiento de la actividad de la enzima después del tratamiento puede influir negativamente en la funcionalidad de los compuestos fenólicos por destrucción de ácidos fenólicos y antocianinas (García-Parra et al., 2014). Además, la degradación térmica de antocianinas afecta el color de los vegetales, un atributo particularmente apreciado por los consumidores.

En la industria de los alimentos, el procesamiento de frambuesas para la obtención de pulpas y jugos, y la posterior aplicación de un tratamiento térmico de conservación, resulta en una de las alternativas para generar un producto inocuo, de mayor estabilidad y valor agregado. Sin embargo, durante el procesamiento térmico, las características organolépticas y nutricionales del alimento se ven afectadas, entre ellas, el contenido de antocianinas y consecuentemente sus propiedades nutraceuticas (Verbeyst et al., 2011).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la estabilidad térmica de antocianinas presentes en pulpas y jugos de frambuesa y obtener modelos cinéticos que describan su variación con la temperatura y el tiempo de proceso.



Materiales y Métodos

Materia prima: Se utilizaron frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* 'Autunm Bliss') provistos por la empresa "Yuco Frutos", de Villa María (Córdoba), los cuales fueron procesados para obtener la pulpa. Para la obtención del jugo, a la pulpa obtenida se la diluyó al 50 % con agua y se le adicionó 70 g kg^{-1} de sacarosa.

Tratamientos: muestras de 6 ml de pulpa y de jugo fueron colocadas en tubos de vidrio de 10 ml y luego sometidas a calentamiento en baño de agua termostático a temperaturas de 70, 80, 90 y $100 \text{ }^\circ\text{C}$ y a diferentes tiempos (0-180 min).

Antocianinas: 1 gramo de tejido fue extraído con 5 ml de metanol conteniendo 1% v/v HCl. La mezcla se centrifugó a $5500 \times g$ durante 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, y se midió la absorbancia del sobrenadante obtenido a 515 nm utilizando un espectrofotómetro (Shimadzu Corporation, Modelo UV Mini-1240, Japón). El contenido de antocianinas se calculó usando el coeficiente de extinción ϵ : antocianina mayoritaria de la frambuesa (cianidina) = $26900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Martínez-Cruz et al., 2011). Los valores se expresaron en mg L^{-1} considerando la absorptividad de la cianidina ($0,082 \text{ L mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Análisis Estadístico: Las experiencias se realizaron por duplicado. Los análisis de correlación y el cálculo de las respectivas constantes se realizaron utilizando el programa Microsoft Excel® 2013.

Resultados y Discusión

En la **figura 1** se presentan las variaciones de la retención del contenido de antocianinas en pulpa de frambuesa durante los tratamientos térmicos a las diferentes temperaturas ensayadas. En la misma se puede observar que la velocidad de degradación de antocianinas aumenta con la temperatura y disminuye a medida que la concentración de las mismas se va reduciendo con el tiempo de proceso. Las reducciones en la concentración antocianina, para un tiempo de proceso de 180 min, fueron de 25,6%, 37,8%, 55,2% y 62,4% para temperaturas de 70, 80, 90 y 100°C , respectivamente

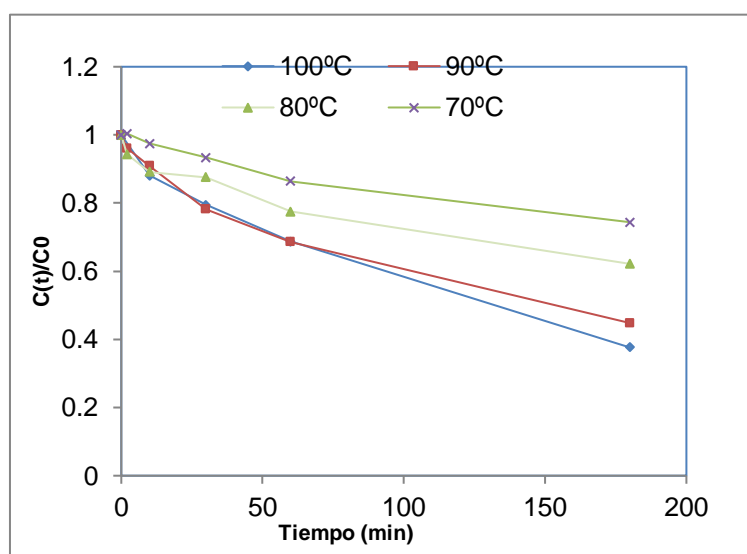


Figura 1: Variación de la retención de antocianinas con el tiempo de calentamiento en pulpa de frambuesa.



Por su parte la degradación de antocianinas en el jugo de frambuesa presentó, para las diferentes temperaturas analizadas, un comportamiento similar al de la pulpa (ver **figura 2**), siendo la reducción en la concentración de antocianinas mayor a medida que el calentamiento progresa e intensificándose dicha reducción con la temperatura. Para calentamientos a 70, 80, 90 y 100°C durante 180 min., se registraron disminuciones en el contenido de antocianinas de 22,2%, 45,0%, 53,0% y 80,9%, respectivamente.

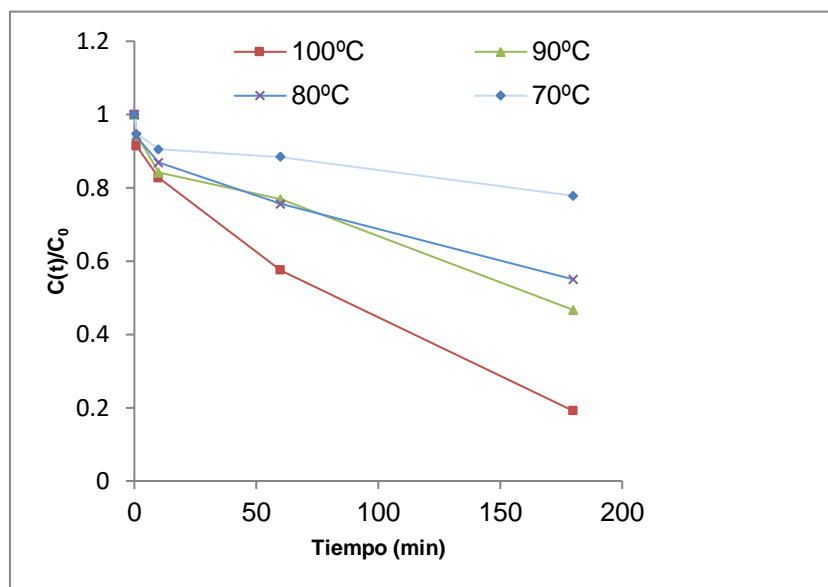


Figura 2: Variación de la retención de antocianinas con el tiempo de calentamiento en pulpa de frambuesa.

De la comparación de las **figuras 1 y 2**, se observa que la mayor diferencia en las pérdidas de antocianinas entre pulpa y jugo se establece a 100°C para 180 min. de tratamiento térmico, siendo en pulpa del 62,4% y en jugo del 80,9%, mientras que a temperaturas de 70, 80 y 90°C los valores obtenidos presentaron similitud.

Del análisis de las **figuras 1 y 2**, se identificó que la retención de antocianinas en función del tiempo sigue una cinética de primer orden (**ecuación 1**) para las diferentes temperaturas, tanto para la pulpa como para jugo de frambuesa. Los altos valores obtenidos para los coeficientes de correlación (R^2), presentados en la **tabla 1**, demuestran la bondad del ajuste del modelo cinético a los datos experimentales. Estos resultados concuerdan con los encontrados por otros autores en trabajos previos (Cemeroglu et al., 1994; Garzon y Wrolstad, 2002; Harbourn et al., 2008; Markakis et al., 1956; Verbeyst et al., 2010; Wang y Xu, 2007), quienes describieron la estabilidad térmica de antocianinas a través de modelos de primer orden. El modelo fue empleado para calcular las constantes de velocidad de degradación térmica de antocianinas (k_T) y a partir de ellas el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) (**ecuación 2**), (**tabla 1**):

$$\ln \left(\frac{C_t}{C_0} \right) = -k_T \times t \quad (1)$$

$$t_{1/2} = -\frac{\ln 0,5}{k_T} \quad (2)$$



donde C_0 y C_t corresponden a las concentraciones de antocianinas iniciales y luego de un tiempo (t) de iniciado el tratamiento térmico de las muestras, respectivamente.

En el caso de la pulpa, la constante de velocidad de degradación incremento de 0,0017 a 0,0056 min^{-1} al aumentar la temperatura de 70 a 100°C, mientras que para el jugo dicha constante varió de 0,0015 a 0,0092 min^{-1} para el mismo aumento de temperatura. Por su parte los valores de $t_{1/2}$ resultaron mayores para el jugo en comparación con la pulpa, para todas las temperaturas excepto a 100°C. En este sentido, Zhang et al. (2012) encontraron que los valores de vida media de la degradación antociánica en jugo de mora a 90 °C vario de 231 min a 298,2 min. Por su parte, Cemeroglu et al. (1994) informaron que el valor $t_{1/2}$ de la degradación de antocianina a 80°C en el jugo de cereza fue 486 min. Dichos resultados para los valores $t_{1/2}$ de la degradación de antocianinas en jugo fueron mayores, en comparación con el jugo de frambuesa analizado en el presente estudio.

Por otro lado, Cemeroglu et al. (1994) concluyeron que la degradación térmica de los compuestos polifenólicos parece ser más rápida en más muestras concentradas, probablemente debido a un mayor contenido de sólidos y moléculas que reaccionan (oxígeno), que se encuentran más cercanas y aceleran la velocidad de reacciones químicas.

El efecto de la temperatura sobre las constantes de velocidad de degradación puede ser expresada por medio de la ecuación de Arrhenius (**ecuación 3**), en la cual la dependencia de k_T con la temperatura es cuantificada por medio de la energía de activación E_a (kJ mol^{-1}). Siendo k_{ref} la constante de velocidad de degradación de referencia y R la constante universal de los gases ($8,31 \times 10^{-3} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) y T la temperatura en grados kelvin.

$$\ln(k_T) = \ln(k_{ref}) - \frac{E_a}{RT} \quad (3)$$

Para la determinación de dichos parámetros se graficó el $\ln k_T$ vs. T^{-1} (ver **figura 3**) y por medio de un análisis regresión lineal se estimó la energía de activación (E_a) a partir de su pendiente y la constante de velocidad de degradación de referencia (k_{ref}) a través de la ordenada al origen.

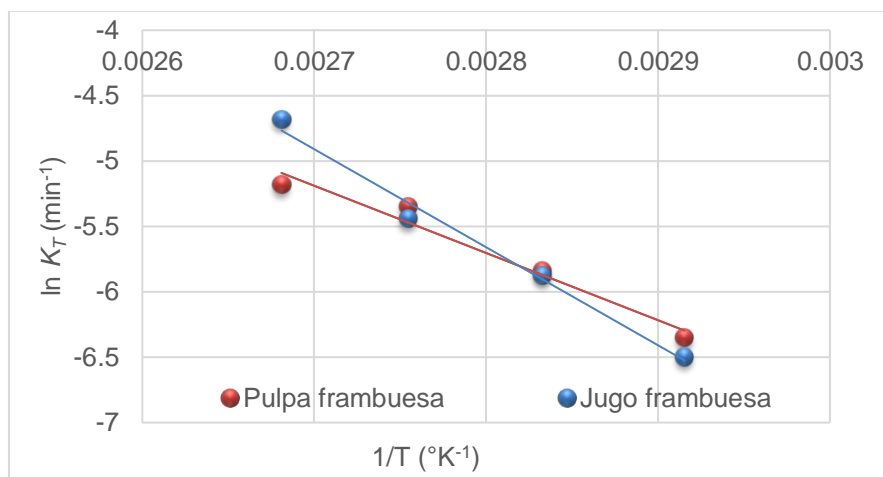


Figura 3. Dependencia de la constante de velocidad de degradación de antocianinas con la temperatura para jugo y pulpa de frambuesa.

Las constantes cinéticas de degradación de antocianinas para pulpa y jugo de frambuesa se ajustaron adecuadamente mediante la relación de Arrhenius ($R^2 > 0,98$), presentando mayor energía de activación (E_a) el jugo por sobre la pulpa, siendo respectivamente E_a 62,34 y E_a 42,73 (KJ mol^{-1}), (tabla 1). Esto indicaría una mayor dependencia de la degradación de antocianinas con la temperatura para el jugo, en comparación con la pulpa.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de degradación térmica de antocianinas de jugo y pulpa de frambuesa. Entre paréntesis se indica el coeficiente de correlación (R^2).

Muestra	T(°C)	K_T (min ⁻¹) (R^2)	$t_{1/2}$ (min)	E_a (kJ/mol)	R^2
<i>Pulpa de frambuesa</i>	100	0,0056 (0,980)	123,75	42,73	0,967
	90	0,0047 (0,943)	145,89		
	80	0,0029 (0,855)	238,97		
	70	0,0017 (0,958)	398,28		
<i>Jugo de frambuesa</i>	100	0,0092 (0,998)	75,33	62,34	0,986
	90	0,0043 (0,993)	161,16		
	80	0,0028 (0,962)	247,50		
	70	0,0015 (0,955)	462,00		

Conclusiones

Los resultados obtenidos mostraron que la variación de la concentración de antocianinas con el tiempo de proceso siguió una cinética de primer orden para jugo y pulpa de frambuesas. Las constantes de la velocidad de degradación térmica de



antocianinas obtenidas mostraron que la temperatura tiene un efecto acelerador de dicha velocidad para ambos productos. La dependencia de las constantes de velocidad de degradación con la temperatura fue descrita adecuadamente por medio de la Ley de Arrhenius. Las energías de activación obtenidas indicaron una mayor dependencia de la degradación de antocianinas con la temperatura para el jugo, en comparación con la pulpa. Los valores obtenidos para las energías de activación mostraron que estos compuestos bioactivos son sensibles a la temperatura y que leves cambios en las condiciones de procesamiento pueden resultar en la pérdida de su funcionalidad. Los resultados obtenidos en este estudio podrían ser de utilidad para la industria con el fin de optimizar los procesos y minimizar las pérdidas de las propiedades nutraceuticas en jugos y pulpas de frambuesa.

Agradecimientos

Los autores agradecen a “Yuco Frutos” quien proveyó los frutos de frambuesa y al Proyecto PIO Pablo Yaryura PIO 20320150100008CO RD 4800. Agregado de valor en origen a la producción frutihortícola de la región de Villa María. Evaluación y desarrollo de estrategias de manejo pre y poscosecha.

Referencias

- CEMEROGLU B, VELIOGLU S, ISIK S. (1994). Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate, en: *Journal of Food Science*, 59(6):1216– 1218.
- GARCÍA-PARRA J, GONZALEZ-CEBRINO F, CAVA R, RAMÍREZ R. (2014). Effect of a different high pressure thermal processing compared to a traditional thermal treatment on a red flesh and peel plum puree, en: *Innov Food Sci. Emerg. Technol.*, 26:26-33.
- GARZON G, WROLSTAD R. (2002). Comparison of the stability of pelargonidin- based anthocyanins in strawberry juice and concentrate, en: *Journal of Food Science*, 67(4):1288-1299.
- HARBOURNE N, JACQUIER JC, MORGAN DJ, LYNNG JG. (2008). Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods, en: *Food Chemistry*, 111(1):204-208.
- MARKAKIS, P., LIVINGSTON, G.E., FELLERS, C.R., 1956. Quantitative aspects of strawberry pigment degradation, en: *Food Research* 22 (2), 117-130.
- MARTÍNEZ-CRUZ N, ARÉVALO-NIÑO K, VERDE-STAR M, MORALES C. (2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de *rubus adenotrichus* Schltld (zarzamora), en: *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 42:66-71.
- REIN M. (2005). Copigmentation Reactions and Color Stability of Berry Anthocyanins. University of Helsinki, Helsinki, pp.10-14.
- SEERAM N. (2008). Berry Fruits for Cancer Prevention: Current Status and Future Prospects, en: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:630-635.



VERBEYST L, OEY I, VAN DER PLANCKEN I, HENDRICKX M, VAN LOEY A. (2010). Kinetic study on the thermal and pressure degradation of anthocyanins in strawberries, en: *Food Chemistry*, 123(2):269–274.

VERBEYST L, VAN DER PLANCKEN I, HENDRICKX M, VAN LOEY A. (2011). Anthocyanin degradation kinetics during thermal and high pressure treatments of raspberries, en: *Journal of Food Engineering*, 105:513-521.

WANG W, XU S. (2007). Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate, en: *Journal of Food Engineering*, 82(3):271–275.



Modelización matemática de la cinética de secado de rodajas de manzana y zapallo impregnadas con jugo de arándanos.

Zapata L.M. ⁽¹⁾, Zampedri P. ⁽¹⁾, Zampedri C. ⁽¹⁾, Flores A. ⁽¹⁾, Mongelat S. ⁽¹⁾, Scattolaro O. ⁽¹⁾, Quinteros F. ⁽¹⁾, Castagnini J.M. ⁽¹⁾.

(1) Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina.

Dirección de e-mail: zapatam@fcal.uner.edu.ar

Resumen

El secado constituye uno de los métodos más antiguos para preservar alimentos a través de la reducción del contenido de humedad hasta niveles seguros. El objetivo del trabajo fue aplicar diferentes modelos matemáticos para describir la cinética de deshidratación de rodajas de manzana y zapallo impregnados con jugo de arándano para obtener un aperitivo enriquecido con antocianinas. Se trabajó con manzana (*Granny Smith*) y zucchini (*Cucurbita pepo*) que fueron cortados en rodajas (diámetro externo=0,060 m, diámetro interno=0,023 m y espesor=0,005 m), impregnadas a vacío (50mbar-10min y 1049 mbar-10min) con jugo de arándano para incorporarles antocianinas y secadas a las temperaturas de 40, 50 y 60°C. Cada media hora se registró la pérdida de agua de las rodajas de manzana (M) y zucchini (Z) impregnadas y, al inicio y al final de los ensayos, se midió el contenido de antocianinas monoméricas totales (AMT) por el método diferencial de pH. Para describir el comportamiento cinético de secado de las M y Z se evaluó el ajuste de los datos experimentales a los modelos matemáticos de Lewis, Henderson-Pabis, Logarítmico, Page y Weibull. Los parámetros de los modelos matemáticos y de bondad de ajuste fueron obtenidos con software Matlab. Los modelos matemáticos describieron satisfactoriamente la cinética de secado de las M y Z; sin embargo, el modelo que mejor describió la cinética de secado fue el modelo de Page. Las diferentes temperaturas y matrices provocaron cambios significativos en k, siendo: $k_{M40^{\circ}C}=0,2559\pm 0,02 \text{ h}^{-1}$; $k_{M50^{\circ}C}=0,3103\pm 0,03 \text{ h}^{-1}$; $k_{M60^{\circ}C}=0,6271\pm 0,06 \text{ h}^{-1}$; $k_{Z40^{\circ}C}=0,3459\pm 0,02 \text{ h}^{-1}$; $k_{Z50^{\circ}C}=0,3192\pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ y $k_{Z60^{\circ}C}=0,4329\pm 0,04 \text{ h}^{-1}$. El contenido de AMT fue $MI=639,13\pm 29,97$; $M40^{\circ}C=364,28\pm 17,70$; $M50^{\circ}C=400,05\pm 23,30$; $M60^{\circ}C=592,81\pm 52,55$; $ZI=591,55\pm 41,32$; $Z40^{\circ}C=239,90\pm 22,91$; $Z50^{\circ}C=432,79\pm 28,50$; $Z60^{\circ}C=464,62\pm 48,44$ mg cianidina-3-glucósido/kg materia seca. El tratamiento de 60°C fue el que proporcionó el aperitivo con mayor contenido de AMT, probablemente debido a que en éste el tiempo de deshidratación fue de 8h, mientras que en los de 40 y 50°C fue 10h. El modelo de Page podría aplicarse para predecir los efectos de la temperatura sobre la velocidad de secado de las rodajas de manzana y zapallo impregnadas con jugo de arándano, como así también para estimar el tiempo de deshidratación. La mejor temperatura de deshidratación fue 60°C ya que permitió obtener un aperitivo con mayor contenido de AMT y a menor tiempo, lo que es de interés desde el punto de vista tecnológico.



Palabras clave: secado, modelo matemático, manzana y zapallo impregnados.

Introducción

Los productos vegetales representan una alternativa importante como fuente potencial de antioxidantes, ya que contienen una variedad de compuestos bioactivos que aportan beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Estos alimentos entran en la gama de productos denominados alimentos funcionales (Restrepo et al., 2010).

Muchos autores sugirieron que fitoquímicos presentes en frutas y vegetales demostraron capacidad para actuar como antioxidantes al secuestrar radicales libres, contribuyendo a la prevención de enfermedades crónicas y degenerativas (Molan, 2017). Los arándanos han adquirido especial interés por su alto contenido en sustancias fenólicas, especialmente antocianinas (Li et al., 2017), por lo que estos frutos o sus productos se pueden incorporar a otros alimentos para potenciar sus propiedades antioxidantes (Değirmencioğlu et al., 2017).

Mediante la técnica de impregnación a vacío es posible incorporar componentes bioactivos dentro de la estructura porosa de alimentos (Martelo et al., 2011), como rodajas de frutas y hortalizas. Sin embargo, la fruta fresca cortada tiene una vida útil muy corta, debido a su elevado contenido de humedad, a la inducción de cambios fisicoquímicos y fisiológicos por efecto de la mayor acción enzimática y a deterioros provocados por microorganismos (Arias et al., 2017; Taghian-Dinani et al., 2014).

Es posible prolongar la vida útil del material impregnado con un secado posterior. Sin embargo, este proceso puede afectar su textura, color, aroma y composición química (Değirmencioğlu et al., 2017); por lo que el secado con aire caliente es un proceso extremadamente complejo (Barrera et al., 2016) y de difícil predicción. Para simplificar el tratamiento del fenómeno se suele interpretar la información experimental mediante modelos empíricos y semiempíricos (Arias et al., 2017).

Diferentes investigaciones han utilizado distintos modelos para predecir la pérdida de agua de los alimentos, tales como el modelo de Weibull en el secado de rodajas de coroba (Corzo et al., 2008), el modelo de Page en el secado de pulpa de cupuaçu (Giraldo-Zuniga et al., 2010). Taghian-Dinani et al. (2014) utilizaron los modelos matemáticos de Newton, Page, Page modificado, Henderson-Pabis, Logarítmico, Exponencial, Midilli-Kucuk, Wang-Singh y Weibull para describir el secado de rodajas de champiñones; encontrando que el modelo de Midilli-Kucuk fue el que mejor se ajustó a los datos experimentales; mientras que Montes-Montes et al. (2008) trabajaron con los modelos de Page, Thompsom, Newton, Page modificado, Henderson-Pabis y Logarítmico en el secado de ñame en capa delgada, determinando que el modelo Logarítmico fue el que mejor describió el proceso de secado.

El objetivo del presente trabajo fue aplicar diferentes modelos matemáticos para describir la cinética de deshidratación de rodajas de manzana y zapallo impregnadas con jugo de arándano para obtener un aperitivo enriquecido con antocianinas y seleccionar la temperatura de deshidratación más adecuada desde el punto de vista funcional y tecnológico.



Materiales y Métodos

Tratamiento de las muestras

Se trabajó con manzanas variedad Granny Smith y zapallos tipo Zucchini. Ambos frutos fueron adquiridos en el comercio local y tratados, según se describe a continuación, en forma separada.

Los frutos fueron lavados, escurridos, pelados, cortados en rodajas de 0,060 m de diámetro exterior; 0,023 m de diámetro interior y de 0,005 m de espesor. A continuación las rodajas fueron impregnadas a vacío y secadas.

La operación de impregnación se dividió en dos etapas. En la primera etapa las rodajas fueron sumergidas en el líquido de impregnación, que consistió en jugo de arándano, y el conjunto se colocó en una cámara de impregnación (Vacuum Oven DZF-6020, China) con las siguientes condiciones de trabajo: presión de vacío 50 mbar, tiempo 10 minutos y temperatura $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. En una segunda etapa se rompió el vacío y las condiciones de trabajo fueron: presión 1049 mbar, tiempo 10 minutos y temperatura $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

El secado se realizó a escala piloto en horno con circulación forzada de aire (FAC 4554, Argentina), velocidad de aire 1m/s, humedad relativa 50%. Se ensayaron 3 temperaturas: 40, 50 y 60 °C, realizando tres repeticiones por tratamiento. El tiempo de secado fue de 10 h para los tratamientos a 40 y 50°C y de 8 h para el de 60°C. Durante el secado las muestras fueron pesadas en balanza electrónica de precisión (Moretti NJW Series, Argentina) cada media hora para controlar la pérdida de humedad. El producto deshidratado se denominó aperitivo enriquecido con antocianinas.

Modelos matemáticos de cinética de secado

Con el fin de determinar el modelo que mejor describe el comportamiento cinético de secado de las rodajas de manzana y zapallo impregnadas, se evaluó el ajuste de los datos experimentales a 5 modelos matemáticos (Tabla 1), representando la relación de humedad (RH) en función del tiempo de secado (t).



Tabla 1. Modelos empleados para ajustar los datos experimentales.

Modelo	Ecuación	Referencia
Lewis (Newton)	$RH = \exp(-kt)$	Doymaz et al., 2015.
Henderson-Pabis	$RH = n_1 \exp(-k_1 t) + n_2 \exp(-k_2) + n_3 \exp(-k_3)$	Puente-Díaz et al., 2013.
Logarítmico	$RH = c + n \exp(-kt)$	Doymaz et al., 2015; Vega-Gálvez et al., 2011.
Page	$RH = c \exp(-kt^n)$	Doymaz et al., 2015.
Weibull	$RH = \exp\left[-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta\right]$	Corzo et al., 2008.

Dónde: c y n son constantes empíricas, k es parámetro cinético (h^{-1}) que podría ser considerado como una pseudo-difusividad. En el modelo de Weibull α es el parámetro de escala (h) y β es el parámetro de forma (adimensional).

La relación de humedad fue calculada según se muestra en la Ecuación 1.

$$RH = \frac{X_t - X_e}{X_0 - X_e} \quad (1)$$

Dónde: X_t es la humedad media en el instante t (kg agua/kg MS), X_e es la humedad de equilibrio (kg agua/kg MS), X_0 es la humedad inicial (kg agua/kg MS) y MS es materia seca.

Antocianinas Monoméricas Totales (AMT)

En las rodajas de manzana impregnadas (MI), zapallo impregnadas (ZI) y en los aperitivos se cuantificó la concentración de AMT mediante el método diferencial de pH en espectrofotómetro UV-Visible (Hach DR600, Alemania). La concentración de AMT fue calculada mediante las Ecuaciones 2 y 3 (Zapata et al., 2014).

$$\Delta A = [A_{510} - A_{700}]_{(pH=1)} - [A_{510} - A_{700}]_{(pH=4,5)} \quad (2)$$

$$AMT = \frac{\Delta A \cdot PM \cdot FD \cdot 1000}{\epsilon \cdot l} \quad (3)$$

Dónde: ΔA = cambio en la absorbancia, AMT= concentración de antocianinas monoméricas totales en mg cianidina-3-glucósido/kg MS; PM= masa molecular para cianidina-3-glucósido (449,2 g/mol), FD= factor de dilución, ϵ = coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido (26900), l= longitud de paso de celda (1cm), 1000= factor de conversión de gramos a miligramos. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Análisis Estadístico

Los parámetros empíricos y cinéticos de los modelos matemáticos fueron obtenidos con software Matlab al representar la RH en función del tiempo de secado. La bondad de ajuste de los modelos matemáticos a los resultados experimentales se obtuvo evaluando el coeficiente de determinación (R^2), la suma del cuadrado de los errores



(SSE) y el error medio cuadrático (RMSE), los que fueron calculados de acuerdo a las Ecuaciones 4, 5 y 6. El modelo ajustó mejor cuanto más cercano a cero fueron la SSE y el RMSE y más próximo a uno R^2 (Olanipekun et al., 2015; Taghian-Dinani et al., 2014).

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (RH_i - RH_{pre,i}) \sum_{i=1}^N (RH_i - RH_{exp,i})}{\{[\sum_{i=1}^N (RH_i - RH_{pre,i})^2] [\sum_{i=1}^N (RH_i - RH_{exp,i})^2]\}^{1/2}} \quad (4)$$

$$SSE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (RH_{exp,i} - RH_{pre,i})^2 \quad (5)$$

$$RMSE = \left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (RH_{pre,i} - RH_{exp,i})^2 \right]^{1/2} \quad (6)$$

Dónde: $RH_{exp,i}$ y $RH_{pre,i}$ son la relación de humedad experimental y predicha, respectivamente, N es el número de observaciones e i es el número de términos.

Mediante análisis de varianza (ANOVA) y procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher se compararon las medias de AMT y los parámetros empíricos y cinéticos de los modelos matemáticos. Para ello se utilizó software STATGRAPHICS Centurión XV. Se consideró que hubo diferencias estadísticas significativas entre medias cuando el p de la tabla de ANOVA fue menor que 0,05.

Resultados y Discusión

El contenido inicial de humedad de las rodajas de MI y ZI con jugo de arándanos fue de $7,50 \pm 0,10$ y $7,72 \pm 0,06$ kg agua/kg MS, respectivamente. Este contenido disminuyó a medida que fue transcurriendo el tiempo de secado según se muestra en la Figura 1, donde se observa que la pérdida de humedad fue mayor en las primeras 4 horas de secado, especialmente cuando se trabajó a 60°C ; mientras que después de las 6 horas el contenido de humedad disminuyó lentamente; lo que podría atribuirse a una reducción de la porosidad de las muestras y, en consecuencia, a un incremento de la resistencia al movimiento del agua (Doymaz et al., 2015). Al final de la etapa de secado los contenidos de humedad fueron $1,10 \pm 0,01$ kg agua/kg MS para todos los casos, excepto para las rodajas de zapallo deshidratadas a 60°C que alcanzó un contenido de humedad de $0,65 \pm 0,05$ kg agua/kg MS.

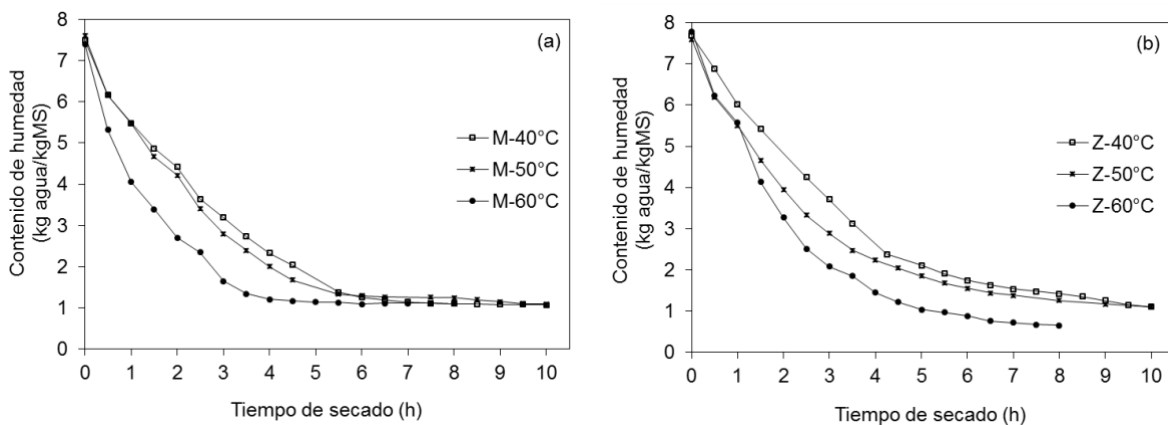


Figura 1. Curvas de secado de rodajas de manzana (a) y zapallo (b) impregnadas con jugo de arándanos a las temperaturas de 40, 50 y 60°C .



La velocidad de secado al comienzo del proceso fue $0,25 \pm 0,01$ kg agua/kg MS \times min, tanto para las rodajas de manzana como de zapallo, y luego fue disminuyendo con el incremento del tiempo de secado y a medida que la relación de humedad fue decreciendo (Figura 2), proceso durante el cual la difusión molecular interna es el mecanismo predominante de transferencia de masa (Puente-Díaz et al., 2013).

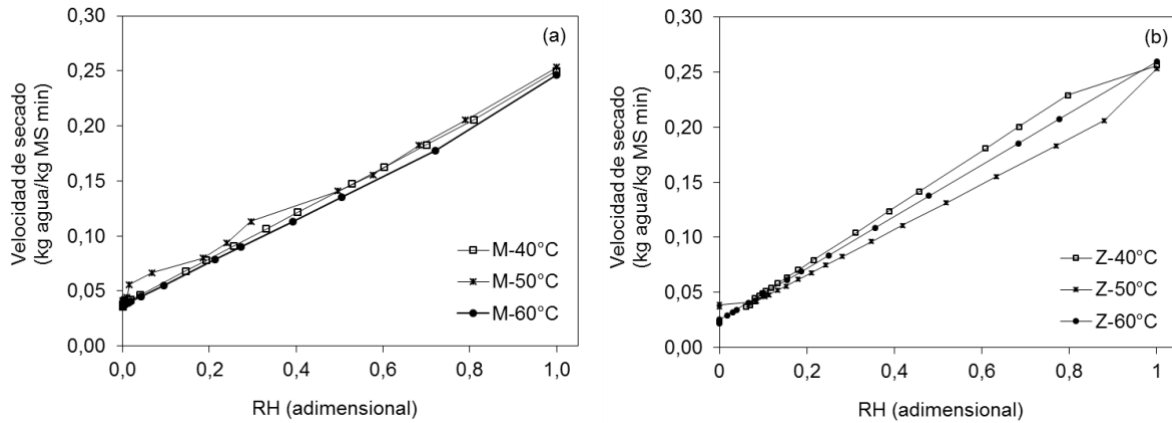


Figura 2. Curvas de velocidad de secado de rodajas de manzana (a) y zapallo (b) impregnadas con jugo de arándanos a las temperaturas de 40, 50 y 60°C.

Los modelos matemáticos de Lewis, Henderson-Pabis, Logarítmico, Page y Weibull describieron satisfactoriamente la cinética de secado de las rodajas de manzana y zapallo impregnadas, puesto que los valores obtenidos para R^2 fueron mayores a 0,96; mientras que para SSE y RMSE fueron menores a 0,06 y 0,07; respectivamente. Sin embargo, el modelo que mejor describió la cinética de secado fue el modelo de Page en el que los R^2 estuvieron comprendidos en el rango 0,9897-0,9961; SSE entre 0,0045-0,0131 y RMSE entre 0,0185-0,0370. Según el modelo de Page, las diferentes temperaturas y matrices afectaron los parámetros empíricos c y n ; como así también el parámetro cinético k (Tabla 2).

En la manzana el valor de k del modelo de Page fue mayor a 60 °C, indicando una mayor velocidad de secado a esta temperatura; mientras que los parámetros c y n no mostraron diferencias significativas. En el zapallo k y n fueron más altos a la temperatura de 60 °C y c no varío con el incremento de la temperatura de secado.



Tabla 2. Parámetros del modelo de Page. Letras minúsculas distintas en una misma matriz indica que entre las medias de las diferentes temperaturas hubo diferencias significativas y letras mayúsculas distintas en una misma temperatura indica que entre las medias de las matrices hubo diferencias significativas.

Matriz	Temperatura (°C)	c	k (h ⁻¹)	n
Manzana	40	0,9509±0,0572 ^{aA}	0,2559±0,02 ^{aA}	1,3491±0,0792 ^{aA}
	50	0,9594±0,0076 ^{aA}	0,3103±0,03 ^{aA}	1,3710±0,1014 ^{aA}
	60	0,9883±0,0483 ^{aA}	0,6271±0,06 ^{bA}	1,1304±0,1131 ^{aA}
Zapallo	40	0,9861±0,0502 ^{aA}	0,3459±0,02 ^{aB}	0,9616±0,0730 ^{aB}
	50	1,0170±0,0315 ^{aB}	0,3192±0,02 ^{aA}	1,0590±0,0859 ^{aB}
	60	0,9872±0,0918 ^{aA}	0,4329±0,04 ^{bB}	1,2190±0,1229 ^{bA}

A la temperatura de 40 °C la manzana tuvo menor valor de k y mayor valor de n que el zapallo, mientras que c no mostro diferencias entre matrices. Cuando la temperatura de secado fue de 50 °C la manzana tuvo menor valor de c y mayor valor de n, no observándose diferencias en el parámetro cinético k. A 60 °C la manzana obtuvo mayor k que el zapallo, mientras que c y n no fueron afectados por la matriz. En consecuencia, los parámetros cinético y empíricos estuvieron afectados por las características estructurales del tejido vegetal (Mahn et al., 2017).

Puente-Díaz et al. (2013) en el secado de arándanos a 40 y 60 °C obtuvieron valores de k de 0,005 y 0,009 min⁻¹; respectivamente. Por lo que al igual que en la presente investigación, k fue mayor a valores más altos de la temperatura del aire de secado. Sin embargo, Giraldo-Zuniga et al. (2010) en el secado a 50 y 60 °C de pulpa de cupuaçu en forma de rodajas de 0,50 cm de espesor obtuvieron valores de k de 0,2918 y 0,0279 h⁻¹; respectivamente. Por lo que k fue menor al aumentar la temperatura.

El contenido de AMT en las MI fue 639,13±29,97 mg cianidina-3-glucósido/kg MS (Figura 3). Los aperitivos de manzana obtenidos a de 40, 50 y 60°C conservaron el 57, 63 y 93% de AMT, respectivamente; no observándose diferencias significativas entre las medias de AMT de las MI y el aperitivo obtenido a 60°C. Por su parte, el contenido inicial de AMT en las ZI fue 591,55±41,32 mg cianidina-3-glucósido/kg MS y conservaron el 41, 73 y 79% de la AMT, para las temperaturas antes señaladas, respectivamente; siendo los tratamientos de secado a 50 y 60 °C los que conservaron mayor cantidad de AMT en el aperitivo de zapallo.

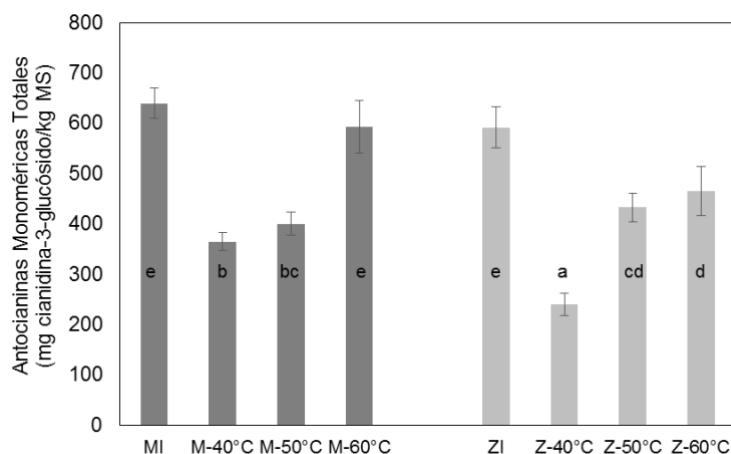


Figura 3. Contenido de antocianinas monoméricas totales en rodajas de manzana (MI) y zapallo (ZI) impregnadas con jugo de arándanos y en los aperitivos de manzana (M) y zapallo (Z) enriquecidos con antocianinas obtenidos a 40, 50 y 60°C. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias.

La mayor concentración de AMT en los aperitivos de manzana y zapallo obtenidos a 60°C podría atribuirse a que el tiempo de tratamiento fue de 8 h, mientras que cuando los tratamientos se realizaron a 40 y 50°C el tiempo fue de 10 h. Si bien la elevación de la temperatura provoca degradación de antocianinas (Peron et al., 2017), en estas experiencias parecería que un tiempo de secado 25% superior ocasionó un mayor deterioro de las AMT. En consecuencia, cuando la temperatura de deshidratación fue de 60°C se obtuvieron aperitivos enriquecidos con antocianinas con mejores propiedades funcionales y en tiempos menores.

Conclusiones

Los modelos matemáticos de Lewis, Page, Henderson-Pabis, Logarítmico y Weibull describieron adecuadamente la cinética de deshidratación de rodajas de manzana y zapallo impregnadas con jugo de arándanos a las temperaturas de 40, 50 y 60°C. El modelo de Page fue el que mejor se ajustó a los datos experimentales. Este modelo podría aplicarse para predecir los efectos de la temperatura sobre la velocidad de secado de las rebanadas de manzana y zapallo impregnadas con jugo de arándano, como así también para estimar el tiempo de deshidratación. Los parámetros cinéticos y empíricos del modelo de Page fueron afectados por la temperatura y por el efecto matriz. La mejor temperatura de deshidratación fue 60 °C ya que permitió obtener aperitivos de manzana y zapallo con mayor contenido de antocianinas monoméricas totales y a un tiempo de deshidratación menor. Esto es de interés desde el punto de vista funcional y tecnológico ya que permitió obtener productos con un mayor contenido en antioxidantes en tiempos de procesos más cortos, lo que conlleva a un menor costo energético.



Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Entre Ríos por el financiamiento de la investigación, en el marco del proyecto PID-UNER 8068 “Diseño de jugo de arándanos con propiedades antioxidantes y probióticas”.

Referencias

ARIAS L., PEREA Y., ZAPATA J.E. (2017). Cinética de la transferencia de masa en la deshidratación osmótica de mango (*Mangifera indica* L.) var. Tommy Atkins en función de la temperatura. *Información Tecnológica*, 28(3): 47-58.

BARRERA C., BETORET N., BETORET E., FITO P. (2016). Calcium and temperature effect on structural damage of hot air dried apple slices: Nonlinear irreversible thermodynamic approach and rehydration analysis. *Journal of Food Engineering*, 189: 106-114.

CORZO O., BRACHO N., PEREIRA A., VÁSQUEZ A. (2008). Weibull distribution for modeling air drying of coroba slices. *LWT - Food Science and Technology*, 41: 2023-2028.

DEĞIRMENCIOĞLU N., GÜRBÜZ O., KARATEPE G.E., IRKIN R. (2017). Influence of hot air drying on phenolic compounds and antioxidant capacity of blueberry (*Vaccinium myrtillus*) fruit and leaf. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 90: 115 – 125.

DOYMAZ I., KIPCAK A.S., PISKIN S. (2015). Characteristics of thin-layer infrared drying of green bean. *Czech Journal of Food Sciences*, 33:83–90.

GIRALDO-ZUNIGA A.D., ARÉVALO-PINEDO A., SILVA A.F., SILVA P.F., VALDES-SERRA J.C., PAVLAK M.C.M. (2010). Datos experimentales de la cinética del secado y del modelo matemático para pulpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) en rodajas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(1): 179-182.

LI D., LIA B., MAB Y., SUNA X., LINA Y., MENGA X. (2017). Polyphenols, anthocyanins, and flavonoids contents and the antioxidant capacity of various cultivars of highbush and half-high blueberries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62: 84–93.

MAHN A.V., PÉREZ C.E., REYES A.E. (2017). Efecto de las condiciones de secado en lecho fluidizado pulsante sobre el contenido de sulforafano de brócoli. *Información Tecnológica*, 28(4): 17-28.

MARTELO Y.C., CORTÉS M.R., RESTREPO D.M. (2011). Dinámica de impregnación al vacío en apio (*Apium graveolens* L.) y pepino (*Cucumis sativus* L.). *Revista MVZ Córdoba*, 16(2): 2584-2592.

MOLAN A.L. (2017). Antioxidant, free radical scavenging activities and total polyphenolic content of aqueous extracts from seven blueberry cultivars grown in New Zealand. *American Journal of Life Science Researches*, 5(1): 18-29.

MONTES-MONTES E.J., TORRES-GALLO R., ANDRADE-PIZARRO R.D., PÉREZ-SIERRA O.A., MARIMON-ESCOBAR J.L., MEZA-HERAZO I.I. (2008). Modelado de



la cinética de secado de ñame (*dioscórea rotundata*) en capa delgada. *Revista Ingeniería E Investigación*, 28 2: 45-52.

OLANIPEKUN B.F., TUNDE-AKINTUNDE T.Y., OYELADE O.J., ADEBISI M.G., ADENAYA T.A. (2015). Mathematical modeling of thin-layer pineapple drying. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39: 1431–1441.

PERON D.V., FRAGA S., ANTELO F. (2017). Thermal degradation kinetics of anthocyanins extracted from juçara (*Euterpe edulis* Martius) and “Italia” grapes (*Vitis vinifera* L.), and the effect of heating on the antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 232: 836-840.

PUENTE-DÍAZ L., AH-HEN K., VEGA-GALVEZ A., LEMUS-MONDACA R., DI SCALA K. (2013). Combined infrared-convective drying of murta (*Ugni molinae* Turcz) berries: kinetic modeling and quality assessment. *Drying Technology*, 31: 329-338.

RESTREPO A.M.D., CORTÉS M.R., ROJANO B.A. (2010). Potenciación de la capacidad antioxidante de fresa (*Fragaria ananassa* Duch.) por incorporación de vitamina e utilizando la técnica de impregnación. *VITAE*, 17(2): 135-140.

TAGHIAN-DINANI S., HAMDAMI N., SHAHEDI M., HAVET M. (2014). Mathematical modeling of hot air/electrohydrodynamic (EHD) drying kinetics of mushroom slices. *Energy Conversion and Management*, 86: 70–80.

ZAPATA L.M., HEREDIA A.M., QUINTEROS C.F., MALLERET A.D., CLEMENTE G., CÁRCEL J.A. (2014). Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 25(49):166-192.