

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

EVALUACIÓN DE PURÉ DE PALTA TRATADO MEDIANTE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y EMPLEANDO EXTRACTOS NATURALES

Grimaldi, Giuliano – LU1038795

Ingeniería en Alimentos

Ohanian Dergazarian, María Victoria – LU1038270

Ingeniería en Alimentos

Tutor:

Rodríguez, Silvio David, UADE

Co-Tutor:

Denoya, Gabriela, INTA

Diciembre 07, 2018



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Agradecimientos

A nuestros tutores Gabriela y Silvio, por su paciencia, acompañamiento y apoyo durante todo el proceso de investigación y redacción.

A Pablo y Mercedes, del laboratorio de UADELabs por su colaboración en la preparación de los materiales y predisposición para ayudar.

A nuestras familias por habernos apoyado en todo momento, por su comprensión y motivación constante.

Resumen

Durante el almacenamiento y procesamiento de la palta, un fruto cuya demanda mundial se encuentra en aumento, la acción enzimática es causante de deterioro en su composición nutricional y de cambios indeseables en las características organolépticas. Ante la tendencia de los consumidores que prefieren alimentos con características similares a las de los productos frescos, y con un rotulado limpio, tecnologías emergentes como la aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas (APH) se han comenzado a utilizar comercialmente. La presente investigación consistió en evaluar el efecto del tratamiento por APH (600 MPa, 3 min) en conjunto con el agregado de extractos naturales, obtenidos a partir de cebolla deshidratada y carozo de palta, sobre la reducción de los efectos de la oxidación en el puré de palta (*Persea americana* Mill. cv. Hass) envasado al vacío y almacenado en condiciones de refrigeración (30 días, 4°C). Para medir la efectividad del tratamiento propuesto se cuantificaron los polifenoles totales, se determinó la capacidad antioxidante y se analizaron las características cromáticas del puré de palta. Se logró confirmar que el proceso de APH en combinación con el empleo de agentes antioxidantes naturales resulta eficaz para conservar los parámetros evaluados en el puré de palta durante el almacenamiento refrigerado. Todos los resultados fueron comparados con la aplicación de ácido ascórbico como antioxidante de referencia, obteniendo con éste los mejores resultados luego de 30 días de almacenamiento. También los extractos naturales produjeron buenos resultados, siendo entre ellos, el de carozo de palta aquel que logró retener la mayor cantidad de polifenoles y de capacidad antioxidante. Al alcanzar rendimientos similares a los del ácido ascórbico y siendo que su empleo representaría el aprovechamiento de un producto de desecho, el carozo de palta se plantea como una alternativa para la industria en el empleo de antioxidantes naturales.

Abstract

During the storage and processing of the avocado, a fruit with global demand on the rise, enzymatic reactions cause deterioration in its nutritional composition and may generate undesirable changes in the organoleptic characteristics. In line with the tendency of consumers who prefer foods with similar characteristics to those of fresh products, in addition to clean labeling, emerging technologies such as the application of High Pressure Processing (HPP) are currently being used commercially. The present research consisted in evaluating the effect of the treatment by HPP (600 Mpa for 3 min) combined with the addition of natural extracts, obtained from dehydrated onion and avocado seed, on the reduction of oxidation effects in vacuum packed avocado puree (*Persea americana* Mill Hass cv.), stored under refrigerated conditions (30 days at 4 ° C). Polyphenol content, antioxidant capacity and chromatic characteristics of the avocado puree were determined in order to measure the effectiveness of the proposed treatment. HPP in combination with natural antioxidants turned out to be effective for the preservation of avocado puree during its refrigerated storage. All results were compared against ascorbic acid applications as antioxidant reference, obtaining with it the best results after 30 days of storage. Natural extracts achieved good results as well, being the avocado seed among both, the one with the highest amount of polyphenols and antioxidant capacity after 30 days of storage. Since its performance resulted similar to ascorbic acid, and its use would entail the exploitation of a waste product, avocado seed could be considered as a good alternative of natural antioxidants for the industry.

Abreviaturas

ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)
AC	Ácido cítrico
AGE	Ácido Gálico Equivalente
APH	Altas Presiones Hidrostáticas
ASC	Ácido ascórbico
Aw	Actividad acuosa
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
CA	Capacidad Antioxidante
CAA	Código Alimentario Argentino
CIE	Comisión Internacional de Iluminación
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ECE	Extracto de Cebolla
ECP	Extracto de Carozo de Palta
EDTA	Ácido etilendiamintetracético
FRAP	Poder antioxidante de la reducción férrica (Ferric reducing antioxidant power)
IDR	Ingesta Diaria Recomendada
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agroalimentaria
ITA	Instituto de Tecnología de Alimentos
LDL	Lipoproteína de baja densidad (Low Density Lipoprotein)
LOX	Lipooxigenasa
MPa	Megapascuales
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PPO	Polifenoloxidasa
PT	Polifenoles Totales
ROS	Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)
TBHQ	Butilhidroquinona terciaria

THBP

2,4,5-trihidroxi-2,3,4,5-tetrahidro-2H-pirano

Trolox

Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

Contenidos

1.	Antecedentes	9
1.1	Palta: características generales	9
1.1.1	Composición de la pulpa	10
1.1.2	Composición del carozo de palta	12
1.1.3	Consumo de palta: Beneficios para la salud	14
1.2	Producción de palta	16
1.2.1	Producción y demanda mundial de palta	16
1.2.2	Producción de palta en Argentina	20
1.2.3	Productos industrializados de palta	23
1.3	Antecedentes de los métodos de preservación de alimentos	24
1.3.1	Cambios durante el procesamiento y almacenamiento de productos industrializados de palta	24
1.3.2	Antecedentes del empleo de Altas Presiones Hidrostáticas (APH) en productos de palta	25
1.4	Tecnología de procesamiento mediante Altas Presiones Hidrostáticas (APH)	28
1.5	Acciones enzimáticas de deterioro en la palta	32
1.5.1	Polifenoloxidasas (PPO)	32
1.5.2	Lipooxigenasa (LOX)	33
1.6	Antioxidantes	34
1.6.1	Antioxidantes y especies reactivas de oxígeno (ROS) en el organismo	34
1.6.2	Acción de los antioxidantes	36
1.6.3	Antioxidantes y oxidación en alimentos	38
1.6.4	Efectos de la oxidación de lípidos en alimentos	39
1.6.4.1	Sabores oxidados	39
1.6.4.2	Pérdida de vitaminas liposolubles y pigmentos	39
1.6.4.3	Efecto sobre proteínas	40
1.6.5	Antioxidantes en la industria alimentaria	40
1.6.6	Clasificación de antioxidantes	41
1.6.6.1	Antioxidantes sintéticos	41
1.6.6.2	Antioxidantes naturales	42
1.6.7	Antioxidantes en la palta	44
1.6.8	Antioxidantes en la cebolla	45
1.7	Aspectos cromáticos	46
1.7.1	Pigmentos naturales	46
1.7.2	Color como medida de calidad	47
1.7.3	Sistema CIELab	48
1.8	Fundamento de las metodologías de análisis	51
1.8.1	Método del reactivo de Folin-Ciocalteu: Cuantificación de polifenoles totales	51
1.8.2	Ensayo de ABTS: Medición de capacidad antioxidante	52

1.9	Motivación	54
2.	Hipótesis	54
3.	Objetivos	54
4.	Diseño Experimental	55
5.	Materiales y métodos	56
5.1	Obtención y generación de los extractos	57
5.1.1	Preparación sustrato de cebolla en polvo	57
5.1.2	Preparación sustrato de carozo de palta	57
5.1.3	Generación de extractos	58
5.2	Caracterización de extractos	61
5.2.1	Cuantificación de polifenoles totales a través del método de Folin-Ciocalteu	61
5.2.2	Determinación de capacidad antioxidante por el método ABTS	63
5.3	Preparación de muestras de puré de palta	65
5.3.1	Caracterización reológica del puré de palta	67
5.3.2	Tratamiento de las muestras de puré de palta	67
5.4	Caracterización del puré de palta	72
5.4.1	Cuantificación de polifenoles totales	72
5.4.2	Determinación de la capacidad antioxidante	72
5.4.3	Medición de características cromáticas	72
5.5	Análisis estadístico	73
6.	Resultados	73
6.1	Generación de extractos: elección del método de extracción	73
6.2	Caracterización de los extractos	76
6.3	Caracterización del puré de palta	77
6.3.1	Caracterización reológica	77
6.3.2	Cuantificación de polifenoles totales	79
6.3.3	Determinación de la capacidad antioxidante	81
6.3.4	Medición de características cromáticas	83
6.4	Efectos del procesamiento con APH sobre la actividad enzimática de las PPO y LOX	86
7.	Discusión y conclusiones	87
8.	Bibliografía	90

1. Antecedentes

1.1 Palta: características generales

La palta (*Persea americana*) es una especie arbórea originaria de América Central y del Sur aparentemente domesticada y cultivada por primera vez en México, en el año 500 A.C. Luego de la conquista, los españoles introdujeron este fruto a otros países de América e incluso a Europa (Duester, 2000; California Avocado Commission, 2011). En el año 1871 la palta fue introducida a la región de California, con árboles provenientes de México, y ya en la década del '50 se conocían y comercializaban alrededor de 25 variedades diferentes de palta. La gran expansión en la comercialización de este cultivo de origen mesoamericano se dio en la década del '70, cuando la variedad conocida como Hass reemplazó a la variedad Fuerte como la principal variedad comercializada. Otras variedades que se comercializan aunque en menor escala son: Gwen, Bacon, Zutano, Pinkerton y Reed.

La variedad Hass contiene en promedio entre 136 y 365 gramos de pulpa de color amarillo y verde, cubierta por una cáscara rugosa de color púrpura oscuro (verdosa en estadio de madurez temprano) y una semilla redonda en el interior de un tamaño considerable (Figura 1). La cáscara y la semilla representan un 33% del peso total del fruto (USDA, 2011).



Figura 1: Fotografía del fruto de la palta (*persea americana*, variedad Hass).

Fuente: <https://www.irishtimes.com/news/world/uk/strange-fruit-beware-the-curse-of-the-avocado-hand-1.3079478>.

1.1.1 Composición de la pulpa

En cuanto a su composición nutricional, la palta es considerada como una fruta de contenido energético medio (100 gramos de pulpa contienen 167 kcal); y aproximadamente el 80% de la misma consiste en: agua (72%) y fibra dietaria (6,8%) (USDA, 2011). En la Tabla I se muestran los valores de los macronutrientes para 100 gramos de pulpa de palta, siendo destacable el contenido de grasas totales con un valor de 15,4 gramos cada 100 gramos de pulpa.

La pulpa de la palta contiene un aceite rico en ácidos grasos monoinsaturados (71% del contenido lipídico), contenidos en una base acuosa, lo cual incrementa su biodisponibilidad; y además, presenta un contenido de 13% de ácidos grasos poliinsaturados y un 16% de ácidos grasos saturados. Dentro de los monoinsaturados, el ácido graso principal y de mayor proporción es el oleico, perteneciente a la serie omega-9 (ω -9). A medida que la palta va madurando, su perfil de ácidos grasos saturados y monoinsaturados se va modificando. Este fenómeno se debe a que el fruto continúa su etapa de maduración luego de cosechado, característica propia de los frutos climatéricos.

Un estudio realizado en adultos sugiere que los consumidores de palta tienen valores mayores de colesterol HDL, menor riesgo de enfermedades metabólicas y menor peso e índice de masa corporal que los adultos no consumidores de dicho fruto (Fulgoni *et al*, 2010). Otro trabajo sugiere que los ácidos grasos del fruto de palta, en conjunto con otros fitoquímicos presentes, tales como los polifenoles, son responsables de la reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares en los consumidores de palta (Dreher y Davenport, 2013).

Tabla I: Macronutrientes presentes en el fruto de palta variedad Hass

Componente	Valor cada 100 gramos de pulpa de palta
Agua (g)	72,3
Proteínas (g)	1,96
Grasas totales (g)	15,4
Cenizas (g)	1,66
Carbohidratos (g)	8,64
Fibra total (g)	6,80
Azúcares totales (g)	0,30
Almidón (g)	0,11

Fuente: Hass Avocado Composition and Potential Health Effects (Dreher y Davenport, 2013).

El 80% de los carbohidratos presentes en la palta se compone de fibra dietaria, siendo el 70% fibra insoluble y el 30% soluble. En cuanto a su contenido de azúcares, éste es muy bajo en comparación con otras frutas (0,3 g/100 g de pulpa de palta), por lo que se espera que su índice glucémico sea despreciable (Dreher y Davenport, 2013).

Además del destacable aporte en grasas monoinsaturadas, la gran cantidad de micronutrientes (minerales y vitaminas) y fitoquímicos que componen la palta lo convierten en un fruto de alto poder nutritivo con grandes beneficios para la salud. En la Tabla II se muestran los valores de estos micronutrientes y fitoquímicos por cada 100 g de pulpa de palta, destacándose el alto contenido de vitamina E (2 mg en 100 g de pulpa) y en menores proporciones la aparición de ciertas vitaminas del grupo B, como la B6 (0,3 mg en 100 g de pulpa), la vitamina C y pro-vitamina A.

Tabla II: Micronutrientes presentes en el fruto de palta variedad Hass

Componente	Valor cada 100 gramos de pulpa de palta
Minerales	
Calcio (mg)	13,0
Hierro (mg)	0,61
Magnesio (mg)	29,0
Fósforo (mg)	54,0
Potasio (mg)	507
Sodio (mg)	8,0
Zinc (mg)	0,68
Vitaminas y Fitoquímicos	
Vitamina C (mg)	8,80
Tiamina (mg)	0,08
Riboflavina (mg)	0,14
Niacina (mg)	1,91
Ácido pantoténico (mg)	1,46
Vitamina B6 (mg)	0,29
Folatos, dietario Eq.(DFE) (µg)	89,0
Vitamina E (alfa-tocoferol) (mg)	1,97
Pro-vitamina A: Eq. Retinol (µg)	7,0
Vitamina K ₁ (filoquinona) (µg)	21,0

Fuente: Hass Avocado Composition and Potential Health Effects (Dreher y Davenport, 2013)

1.1.2 Composición del carozo de palta.

Si bien hay numerosos estudios sobre las propiedades nutricionales y de los compuestos relevantes en generar beneficios para la salud humana de la pulpa de la palta, poco se conoce acerca de la semilla de palta. Dicha semilla, está siendo actualmente estudiada como potencial fuente de nutrientes, revalorizando de este modo un producto de desecho de la producción de puré de palta. Soong y Barlow (2004) publicaron un trabajo sobre el contenido

de polifenoles y la capacidad antioxidante de las semillas de algunas frutas, entre ellas la de palta. En este trabajo encontraron que la cantidad de compuestos fenólicos en las semillas superaba al de la pulpa en todos los casos. En la Tabla III se muestran los valores de capacidad antioxidante (métodos ABTS y FRAP) y el contenido de polifenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu) para los extractos etanólicos obtenidos de la pulpa de palta y la semilla de palta. Si bien en el artículo mencionado no se hace referencia a la variedad de palta utilizada para el estudio, los datos reflejados en la Tabla III serán empleados únicamente a modo referencia para dimensionar la riqueza antioxidante de la semilla respecto de la pulpa de palta.

Tabla III: Valores de capacidad antioxidante (mediante métodos ABTS y FRAP) y contenido de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu) para la pulpa y la semilla de palta (*Persea americana* Mill.) n=3.

Componente	Actividad Antioxidante (ABTS) (μmol ácido ascórbico equivalente por gramo)	Actividad Antioxidante (FRAP) (μmol ácido ascórbico equivalente por gramo)	Contenido de Polifenoles Totales. (mg ácido gálico equivalente por gramo)
Semilla	236,1 \pm 45,1	1484 \pm 15,7	88,2 \pm 2,2
Pulpa	4,9 \pm 1,1	9,6 \pm 1,4	1,3 \pm 0,0

Fuente: Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds (Soong y Barlow, 2004)

Como se puede observar en la Tabla III, tanto el contenido de polifenoles de la semilla de palta, como la capacidad antioxidante supera ampliamente a los valores de la pulpa de palta. Muchos estudios epidemiológicos demostraron que los fitonutrientes, tales como los polifenoles contenidos en los vegetales que son ingeridos, tienen un efecto en la protección en contra del daño producido por las especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno. Además de la actividad antioxidante, se demostró que dichos compuestos presentan actividad antiinflamatoria y antitumoral, frente a algunos tipos de tumores (Soong y Barlow, 2004).

1.1.3 Consumo de palta: Beneficios para la salud.

La palta se destaca por su alto valor nutritivo, convirtiéndose en una de las frutas más completas a nivel nutricional. Posee hidratos de carbono, proteínas, lípidos, pro-vitaminas A y vitaminas C, D, B6 y E, fibra dietaria, agua y minerales, siendo abundante el potasio, el fósforo y el magnesio y muy bajo su nivel de sodio. Además de ser un alimento completo, también es considerada como un alimento funcional, es decir, que va más allá de sus ingredientes nutricionales básicos y presenta propiedades específicas benéficas para la salud. Investigaciones realizadas por la Universidad de California, en Los Ángeles, señalaron que este fruto contiene micronutrientes que ayudan a combatir enfermedades cardíacas y algunos tipos de cáncer (Juri, 2010).

Su contenido lipídico es mayoritariamente monoinsaturado, y superior a la mayoría de las frutas, siendo el 72% ácido oleico, característico del aceite de oliva. Este ácido se encuentra en gran cantidad y contribuye a combatir enfermedades cardiovasculares, dado que actúa directamente disminuyendo los niveles de colesterol LDL (Juri, 2010).

Al ver en detalle su contenido de micronutrientes, puede establecerse que la palta es fuente de una amplia variedad de vitaminas y minerales*, conteniendo en una porción de 100 gramos:

- Vitamina K: 32 % de la Ingesta Diaria Recomendada (IDR).
- Ácido fólico (Eq. dietético de Folato): 22 % de la IDR.
- Vitamina C: 20 % de la IDR.
- Potasio: 14 % de lo recomendado por día según establece la Organización Mundial de la Salud (OMS).
- Vitamina B5 (ácido pantoténico): 29 % de la IDR.
- Vitamina B6: 22 % de la IDR.
- Vitamina E: 20 % de la IDR.
- Además, contiene pequeñas cantidades de magnesio, manganeso, cobre, hierro, zinc, fósforo, vitamina A, B1 (tiamina), B2 (riboflavina) y B3 (niacina).

* Según lo establecido en el Capítulo V: Normas para la rotulación y publicidad de los alimentos, del Código Alimentario Argentino (CAA). Para atribuirle a un alimento el carácter

de “Fuente de vitaminas y minerales”, debe cumplir con un mínimo del 15% de la IDR de referencia por 100 g de producto (sólido).

Actualmente, la palta se reconoce en ciertos ámbitos como “alimento funcional”, avalado por la Comisión Californiana de Palta (California Avocado Commission). Se conoce como alimento funcional aquel que tiene propiedades que son beneficiosas para la salud y/o preventivas de enfermedades más allá de sus funciones básicas nutricionales de aportar nutrientes. Por lo tanto, observando la composición de la pulpa de palta (Tabla II) se desprenden varias de sus propiedades beneficiosas para el cuerpo humano:

- Tiene un gran poder antioxidante por su un alto contenido de vitamina E (tocoferoles), encargada de neutralizar los radicales libres causantes del estrés oxidativo celular (envejecimiento, enfermedades degenerativas, cáncer) (Sanginés, 2008).
- Es fuente considerable de luteína y zeaxantina (271 $\mu\text{g}/100$ g de pulpa de palta), carotenoides con poder antioxidante vinculados a la protección y prevención de enfermedades oculares como cataratas o la degeneración muscular (Sanginés, 2008; Dreher y Davenport, 2013). Es uno de los frutos con mayor contenido de estos carotenoides.
- Debido a su alto contenido en potasio (507 mg/100 g de pulpa de palta), su consumo ayuda a reducir la presión sanguínea, especialmente importante para las personas con problemas cardíacos o de hipertensión. Una porción de 100 gramos de palta comestible incluye el 14% de la IDR, lo que representa un 4% más que la banana (358 mg/100 g de banana), alimento comúnmente conocido por ser rico en potasio (Delgado Suarez, 2013).
- Por su destacado contenido de beta-sitosterol (76 mg/100 g de pulpa de palta), compuesto perteneciente al grupo de los fitoesteroles, y siendo además la fruta con la mayor cantidad de este compuesto, su consumo ayuda a reducir los niveles de colesterol al interferir con su absorción en el cuerpo humano (Duester, 2001).

1.2 Producción de palta

La palta suele cultivarse entre los paralelos 36° norte y 36° sur y en altitud muy variable de entre el nivel del mar y los 2500 metros sobre el nivel del mar. Sin embargo, su cultivo se recomienda entre los 800 y 2500 m.s.n.m.

Otro de los factores de mayor importancia para su producción es la temperatura, siendo de 25°C en los meses cálidos y 15°C en los meses fríos las temperaturas óptimas. Además, el árbol de palta requiere una precipitación anual de 1200 mm repartidos durante todo el año (Delgado Suárez *et al*, 2013).

1.2.1 Producción y demanda mundial de palta

Según datos registrados en el 2016, el mercado de palta aumentó a 5.788.000 toneladas, con una expansión de 5,6% anual entre 2007 y 2016. Aunque la palta no puede considerarse hoy un producto de demanda diaria, continúa ganando popularidad en todo el mundo ya que además de ser un alimento con un sabor muy agradable, es rico en fibra, grasas monoinsaturadas, vitaminas y minerales, lo que ha favorecido al crecimiento tendido y constante del mercado en los últimos seis años.

México, los Estados Unidos y la República Dominicana fueron los principales países consumidores de palta. Los países con mayor consumo fueron México (17%), Estados Unidos (16%), República Dominicana (10%), Indonesia (5%), Colombia (5%), Perú (4%), Brasil (3%), China (3%), Kenia (3%) y Ruanda (3%). El resto de los países representaron cerca del 31% del consumo mundial.

Entre los principales países consumidores, se registraron altos niveles de consumo per cápita en la República Dominicana (54,6 kg/año), cinco veces más que el promedio mundial de 10 kg/año. En este país, el consumo per cápita aumentó rápidamente un 13,6% por año desde 2007-2016.

A nivel mundial, México es el mayor productor de palta con 1,89 millones de toneladas al año (2016), lo que representa alrededor del 34% de la producción mundial. El país aumentó su producción en un 65% total entre el 2007 y 2016, a expensas de expandir su superficie destinada al cultivo de palta manteniendo un rendimiento bastante estable, cercano al promedio mundial (10 tons/ha) y significativamente menor que en otros países productores,

como República Dominicana, Brasil, Indonesia y Perú, tal como se muestra en la Tabla IV. Los países productores que le siguen en orden de importancia son: República Dominicana (0,6 millones de toneladas), Perú (0,45 millones de toneladas), Colombia (0,31 millones de toneladas) e Indonesia (0,3 millones de toneladas) (FAOSTAT, 2016). En la Figura 2 se muestran los 10 países con mayor producción de palta a nivel mundial, según datos obtenidos durante 2016 por la FAO.

Además de ser el principal productor, México se destaca por ser el mayor exportador, aumentando año tras año sus volúmenes enviados al mercado mundial, siendo los EE. UU. su principal importador.

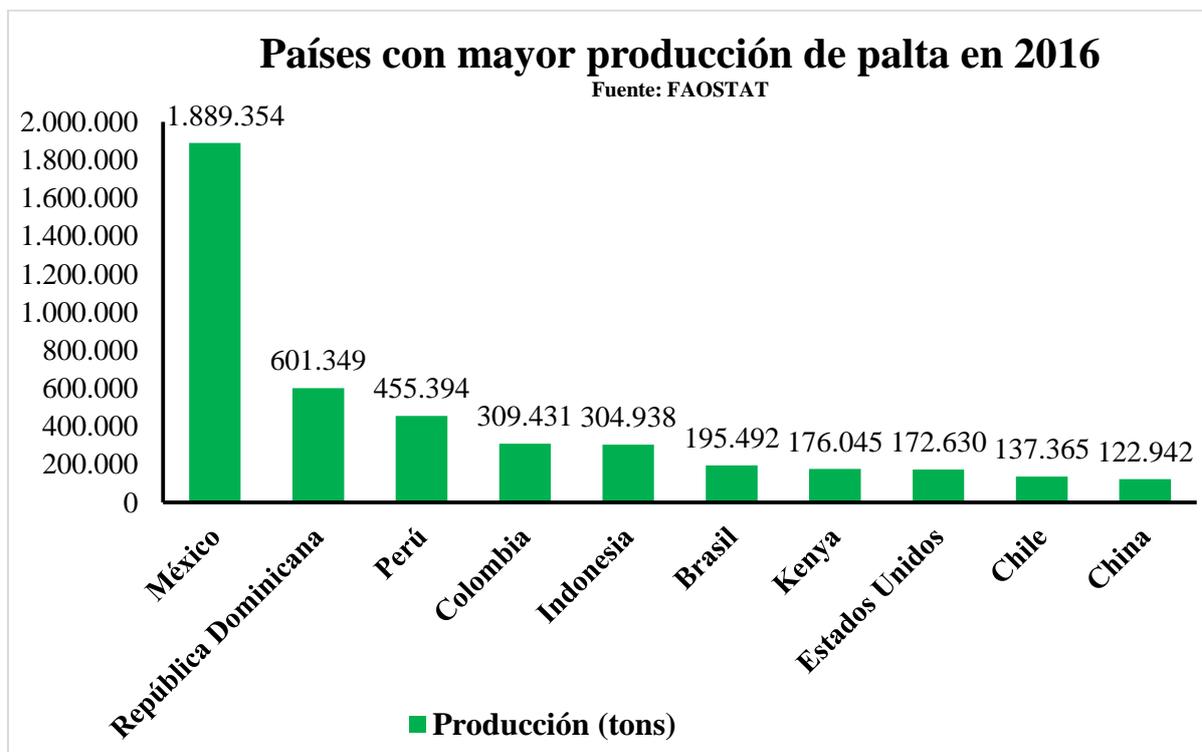


Figura 2: Países con mayor producción de palta en el 2016 (FAOSTAT, 2016)

Como puede observarse en la Figura 2, México destaca como el país con mayor producción de palta en el mundo, con el 33,9% del total, siguiéndole República Dominicana con 10,8%, Perú con 8,2%, Colombia con 5,6% e Indonesia con 5,5%. Estados Unidos, se ubica octavo en el ranking con un 3,1% del total, sin embargo, se destaca por ser el principal

importador de dicho fruto a nivel mundial, importando principalmente paltas de México y exportando una parte de las mismas a Canadá.

Tabla IV: Rendimiento (tons/ha) de los países con mayor producción de palta en el 2016

Ranking	País	Rendimiento (tons/ha)
1	República Dominicana	45,0
6	Brasil	18,0
7	Kenya	17,1
13	Indonesia	12,7
17	Perú	12,0
24	México	10,5
27	Colombia	8,8
34	Estados Unidos	7,4
40	China	6,1
55	Chile	4,6

Fuente: Estadísticas agrícolas del aguacate (1961-2016) (FAOSTAT, 2016)

Los datos de la tabla IV se extraen de los registros estadísticos obtenidos por la FAO en el 2016 y la cual se basa en un total de 74 países censados donde existe plantación de palta.

República Dominicana, segundo país con mayor producción de palta (2016), encabeza el listado de los países con mayor rendimiento con 45 tons/ha, lo que representa más de cuatro veces el rendimiento de México (10,5 tons/ha). Chile, por el contrario, siendo el noveno país con mayor producción a nivel mundial, es de los países con menor rendimiento (4,6 tons/ha). Argentina, por otro lado, no se encuentra dentro de los principales productores de palta a nivel mundial (10000 toneladas anuales), pero presenta un rendimiento moderado de 8 tons/ha en promedio.

En la Figura 3 se reflejan los 10 países con mayor rendimiento de palta en el 2016, destacándose varios países de África y otras pequeñas islas, y quedando fuera México y Perú.

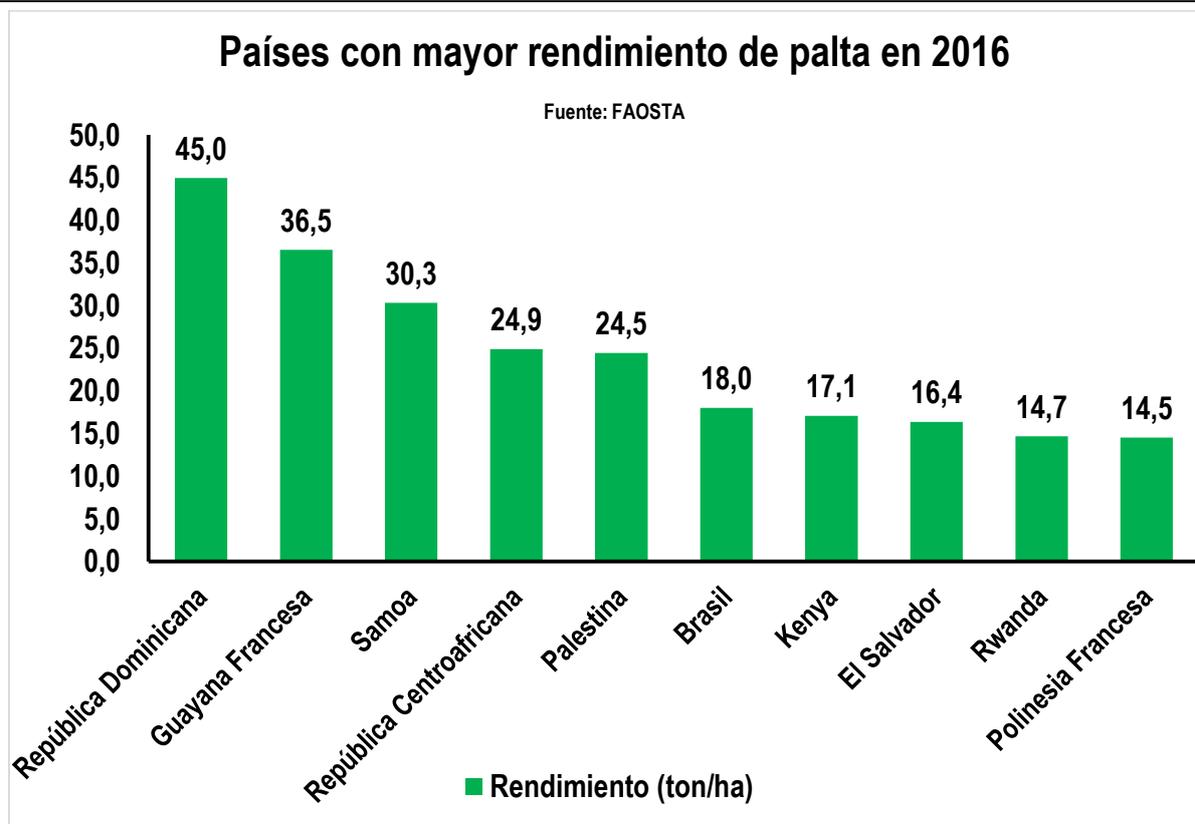


Figura 3: Países con mayor rendimiento (tons/ha) de palta en el 2016 (FAOSTAT, 2016)

Como ya se mencionó, las paltas son un producto muy comercializado en todo el mundo, alcanzando exportaciones que supusieron un 32% de la producción mundial total en 2016. La mayor variable que delimita actualmente el mercado son las grandes distancias entre los principales países productores de palta y los principales países consumidores.

En 2016, la exportación mundial de palta se expandió a 1.848.000 toneladas, lo que equivalió a 4.281 millones de dólares. En los últimos años la exportación ha experimentado un crecimiento constante, con tasas anuales promedio de +10,1% desde 2007-2016. Sin embargo, esto fue resultado de un rápido aumento de la producción entre 2012-2016, impulsado en gran parte por el incremento de la oferta de México a los EE. UU. (principales consumidores del fruto).

México, líder mundial en términos de exportaciones de palta, con una participación de aproximadamente 50% de las importaciones globales, en 2016, exportó 927.000 toneladas, que representaron el 49% de su producción total de paltas. De esta cantidad, el 75% se

suministró a los EE. UU., donde las paltas mexicanas tuvieron una participación del 74% en el consumo total.

Además de México, los proveedores globales más grandes en 2016 fueron Perú (194.000 toneladas) y Chile (147.000 toneladas), con una participación entre ambos del 18% de las exportaciones mundiales. Los proveedores de más rápido crecimiento entre 2007 y 2016 fueron México (más de 13,4% anual) y Perú (más de 20% anual), mientras que las exportaciones de Chile se mantuvieron prácticamente igual. Los Países Bajos también mostraron una cifra considerable de exportación con 148.000 toneladas. Sin embargo, todo este volumen de exportación proviene de fruto importado, ya que este país no es productor de paltas.

Los EE. UU. son los mayores importadores de palta de todo el mundo. En el 2016 importaron un total de 821.000 toneladas, lo que representó cerca del 43% de las importaciones mundiales. Le siguieron, de lejos, los Países Bajos (186.000 toneladas), Francia (134.000 toneladas), el Reino Unido (96.000 toneladas), España (87.000 toneladas), Canadá (78.000 toneladas) y Japón (74.000 toneladas). Estos países constituyeron los principales destinos de las importaciones de palta, que en conjunto representaron otro 34% de las importaciones mundiales. Sin embargo, mientras los EE. UU. importan paltas para el consumo interno, los Países Bajos exporta más del 80% de los productos importados, principalmente a Alemania y otros países europeos (Mercado Mundial de Aguacate, <http://www.freshplaza.es>, Agosto 2018).

1.2.2 Producción de palta en Argentina

En nuestro país, la producción de palta se realiza principalmente en el Noroeste Argentino (NOA), en las provincias de Salta, Jujuy y Tucumán. Es en esta zona en donde se encuentra gran parte de la superficie plantada, debido a sus condiciones de suelo y clima para lograr un producto satisfactorio. Entre las variedades que se cultivan, la predominante es la variedad Hass, seguida de la variedad local Torres y en menor medida la variedad Lula (Protocolo de calidad para paltas frescas, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, 2009). La superficie implantada ronda las 1.290 hectáreas con una producción anual que asciende a 10.320 Toneladas, obteniendo rendimientos de entre 8 y 16 Tons/ha

(Consumo de palta, <http://www.senasa.gob.ar>, Mayo 2018), según la zona. El 75% de esa producción proviene de la provincia de Tucumán que tiene una superficie implantada de 800 hectáreas, siguiéndole las provincias de Jujuy, Salta y Misiones (INTA EECT Yuto, Jujuy, 2018). La cosecha abarca principalmente los meses entre abril y julio, comenzando con la variedad Lula desde abril a junio y la variedad Hass que inicia en mayo y puede extenderse hasta el mes de septiembre. Entre primavera y fin de año se cosecha la variedad Torres, que es una variedad local no apta para la exportación. Aparte de la producción nacional, la mayoría de la fruta que se consume en la Argentina es importada, principalmente desde México, Chile y Perú. Tanto a nivel nacional como internacional, la variedad Hass es de las más apreciadas con un fuerte predominio en el mercado.

El consumo de palta en nuestro país ronda los 100 gramos por habitante por año, lo que representa un valor bajo comparado con otros países; por ejemplo, Chile tiene un consumo de 3 kg por habitante por año y México 10 kg por habitante por año. Toda la producción nacional se destina únicamente al consumo en fresco de la fruta que se comercializa en cajas de 5 kg que es almacenada refrigerada y posteriormente transportada a los distintos centros de consumo (Asociación de Ingenieros Agrónomos del Noroeste de Entre Ríos, 2015).

Para los productores de palta nacionales, queda implícito el cumplimiento de las reglamentaciones vigentes sobre Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para la sala de empaque, condiciones para fruta fresca y envases descriptas en el Código Alimentario Argentino (C.A.A.) en el Capítulo I, II, XI, IV, Resolución SENASA 756/97, Resolución SENASA 256/03, Resolución SENASA 619/05 y Resolución SENASA 803/05.

Según el protocolo de calidad para paltas frescas establecido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, dentro de los requisitos de calidad diferenciada los requerimientos mínimos que cada palta debe cumplir son los siguientes: Fruto bien desarrollado, sin deformaciones severas, fruto sano y libre de enfermedades, madurez apropiada, no poseer olores ni sabores extraños, libre de materias extrañas (polvo, hojas, ramas, piedras, etc.), exenta de heridas abiertas o no cicatrizadas, sin podredumbres, exentas de signos de sobremadurez, libre de daño por helada, exenta de desorden fisiológico, libre de daños por animales y exenta de quemadura por exposición al sol. La madurez comercial se

determina en laboratorio midiendo el contenido de materia seca, que debe ser igual o mayor a 23% para poder cosechar el fruto. El exterior del fruto debe ser verde brillante, áspero y de textura rugosa. El largo de pedúnculo no deberá ser superior a 1 cm., y de estar ausente, no deberá haber desagarrado la piel del fruto. Al perder presión y estar lista para el consumo la pulpa debe ser fácilmente separable de la cáscara, de color amarillo cremoso, sin fibras, de ligero sabor nogado. El tamaño de las paltas dependerá de su destino y se deberán respetar los calibres establecidos para su clasificación según lo que se establece en la Tabla V.

Tabla V: Relación de escala de peso en función del calibre para la clasificación de las paltas.

Escala de peso (g)	Código de calibres
781 – 1220	4
576 – 780	6
456 – 576	8
364 – 462	10
300 - 371	12
258 – 313	14
227 – 274	16
203 – 243	18
184 – 217	20
165 – 196	22
151 – 175	24
144 – 157	26
134 – 147	28
123 – 137	30
80 – 123	S*

* Solo para la variedad Hass.

Fuente: Ministerio de Agroindustria

1.2.3 Productos industrializados de palta

El consumo de palta a nivel mundial se ha incrementado en los últimos años y con ello la cantidad de superficie plantada. Esto ha provocado que haya un incremento en los volúmenes de fruta que, por no cumplir con las especificaciones de calibre o tener defectos menores, se comercializan en mercados domésticos o de manera informal. Si la tendencia observada se mantiene en el futuro, la industrialización de los remanentes de la producción en fresco podría tornarse entonces en una alternativa viable de mayor interés.

La palta posee una amplia posibilidad de usos como productos industrializados, por ejemplo, pulpa como base para productos untables (ya sea frescas, refrigeradas o congeladas) o pulpa en mitades o cubos, refrigerada o congelada. Dentro de dichas alternativas la más difundida es la pulpa congelada. Dichos productos pueden ser almacenados congelados durante un período de hasta 8-10 meses, pero su calidad organoléptica comienza a decrecer a partir de los 3 meses de almacenamiento congelado. Los productos congelados presentan al ser descongelados una pérdida en las características de textura y color que es fácilmente detectada por el consumidor. En estos productos industrializados es de especial interés el control del proceso denominado pardeamiento enzimático, debido a la presencia de las polifenoloxidasas presentes en la fruta. En general se utilizan aditivos que actúan como agentes antioxidantes para el control de dicho proceso de degradación, siendo los más utilizados el bisulfito de sodio, el ácido ascórbico, el ácido isoascórbico y el ácido cítrico (también empleado para la disminución del pH del producto). Algunos productos industrializados que se comercializan en la actualidad presentan también, un elevado número de aditivos estabilizantes como gomas, alginatos y polifosfatos y otros agentes antimicrobianos como el sorbato o benzoato de sodio o potasio. Los expertos sugieren que la cantidad de aditivos empleados deberá ser reducida en el futuro, debido a que existe una gran tendencia por parte de los consumidores a consumir productos con menos cantidad de aditivos agregados (Olaeta, 2003).

1.3 Antecedentes de los métodos de preservación de alimentos

1.3.1 Cambios durante el procesamiento y almacenamiento de productos industrializados de palta

Cuando la palta es procesada, por ejemplo, cortada en mitades, cubos o incluso en forma de puré la calidad nutricional y sensorial se ve afectada en forma rápida y durante todo el almacenamiento debido a la presencia y acción de enzimas oxidativas. La enzima polifenoloxidasas (PPO) es la responsable de oscurecer el puré de palta debido a la oxidación de los compuestos fenólicos presentes. Además, la lipooxigenasa (LOX) afecta la calidad nutricional degradando los ácidos grasos esenciales presentes, participando en la oxidación de compuestos carotenoides y posteriormente afecta la calidad sensorial generando aromas y sabor indeseados. En el fruto también hay actividad hidrolítica por acción de las lipasas, las cuales rompen los enlaces éster-ácido graso en los triglicéridos generando ácidos grasos libres, diacilgliceroles, monoacilgliceroles y glicerol. La generación de estos ácidos grasos por parte de las lipasas, aceleran las reacciones radicalarias de oxidación. Los dos procesos, dan como resultado la rancidez del puré de palta en forma muy rápida durante el almacenamiento. Generalmente en la industria se emplea el uso de tratamientos térmicos para la inactivación enzimática. Sin embargo, el empleo de dichos tratamientos en el puré de palta afecta en forma negativa su calidad organoléptica, generando cambios en el color, sabor, pérdida de vitaminas y de calidad nutricional. Como se mencionó anteriormente la estrategia más común para contrarrestar el efecto de las enzimas en los productos procesados de palta ha sido durante mucho tiempo el empleo de aditivos antioxidantes (Jacobo-Velázquez *et al*, 2013).

Numerosos esfuerzos se han llevado a cabo a nivel de investigación para mitigar el efecto de la polifenoloxidasas, la lipooxigenasa y las lipasas presentes en la pulpa de la palta. Entre ellos se destacan por ejemplo el empleo de luz pulsada en combinación con almacenamiento refrigerado durante 15 días (Aguiló-Aguayo *et al*, 2014), el congelamiento y posterior liofilización (Santos Souza *et al*, 2014), exposición a ondas de ultrasonido (Bi *et al*, 2015) y el empleo de técnicas combinadas como el agregado de agentes quelantes y modificación de la atmósfera por agregado de nitrógeno o vacío (Soliva *et al*, 2001). A pesar

de dichos esfuerzos, las estrategias tradicionalmente utilizadas, hasta el momento son las que combinan el almacenamiento refrigerado en conjunto con la adición de agentes acidulantes y antioxidantes.

En función de lo mencionado anteriormente y al interés creciente, se produjeron muchas investigaciones para el posible reemplazo de los aditivos sintéticos por aditivos extraídos de fuentes naturales. Las reacciones de oxidación no son solo reacciones que ocurren en productos alimenticios procesados, sino también en otras industrias como la de cosméticos, la farmacéutica y la de polímeros plásticos. Los materiales vegetales y/o los residuos de descarte de su producción pueden ser fuentes potenciales de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, además de las otras propiedades anteriormente mencionadas (Moure *et al*, 2001). En este contexto, Elez-Martínez y colaboradores (2005) emplearon α -tocoferol en reemplazo al ácido ascórbico, obteniendo buenos resultados sobre puré de palta (cv. Hass) envasado al vacío y refrigerado durante 12 semanas de almacenamiento. Además, otros aceites extraídos de fuentes vegetales se han utilizado para el mismo propósito, por ejemplo, agregado de extractos acuosos de col silvestre y ajo sobre puré de palta (cv. Hass), en combinación con envasado al vacío y almacenamiento refrigerado (Bustos *et al*, 2014; Bustos *et al* 2015). Incluso se han estudiado los efectos de extractos liposolubles naturales, como el extracto de tomillo, sobre paltas envasadas (cv. Hass y cv. Fuerte) en atmósfera modificada y refrigeradas (Sellamuthu *et al*, 2013).

1.3.2 Antecedentes del empleo de Altas Presiones Hidrostáticas (APH) en productos de palta

Uno de los primeros antecedentes encontrados sobre el tratamiento por altas presiones sobre el puré de palta se remonta a la década del '90. Weemaes y colaboradores (1998) estudiaron el efecto de la combinación de presión junto con un tratamiento térmico sobre la inactivación irreversible de las polifenoloxidasas (PPO) presentes en la palta. En total probaron alrededor de 100 combinaciones dentro del rango de 0,1 a 900 MPa y 25 a 77,5°C y informaron los valores de constante de velocidad y energía de activación en función de la presión y la temperatura de proceso. Los autores describieron la cinética de inactivación

enzimática mediante APH y calor, como un proceso de primer orden para todas las condiciones evaluadas. Según lo informado en ese estudio, cuando se trabaja a temperatura ambiente es necesaria una presión de 900 MPa durante un lapso de tiempo considerable (270 min) para lograr la reducción de un ciclo decimal en el valor inicial de la actividad de la PPO. También pudieron observar que hay un efecto antagonista al trabajar a temperaturas superiores a 62,5°C y baja presión (menor a 250 MPa). Al analizar estos resultados, observaron que la inactivación de la PPO era demasiado lenta y sugirieron que sería necesario aplicar otras estrategias para lograr una mayor inactivación en menor tiempo. En otro trabajo estudiaron el efecto de agregar dentro de la formulación diferentes agentes antipardeantes, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamintetracético (EDTA), cloruro de sodio o ácido benzoico trabajando a temperatura ambiente en todos los casos. Observaron entonces buenos resultados trabajando a presiones de 700 MPa quedando solo una pequeña fracción resistente de PPO sin inactivar de alrededor del 10% del valor inicial (Weemaes *et al*, 1999).

Por otra parte, López-Malo y colaboradores (1999), estudiaron los cambios de color, la inactivación microbiana y la actividad de la enzima PPO en puré de palta tratado por APH. Exploraron presiones de 700 MPa, durante 10, 20 o 30 minutos con reducción del pH por agregado de ácido cítrico en el rango de 3,9 a 4,3 durante el almacenamiento a temperatura de refrigeración y ambiente encontrando que el producto obtenido se mantenía estable durante 60 días con una actividad residual menor al 45% del valor inicial de la actividad de la PPO.

Estudios más recientes afirman que un tratamiento de 600 MPa durante 3 minutos a temperatura ambiente es suficiente para mantener las características organolépticas y los valores de algunos marcadores de la calidad nutricional (cuantificación de carotenoides), sin una pérdida significativa de los mismos, durante 40 días almacenados en condiciones de refrigeración (4°C) y envasados al vacío (Jacobo-Velazquez y Hernández-Brenes, 2012). Trabajos más recientes sobre el puré de palta procesado por APH confirman las condiciones experimentales señaladas por Jacobo-Velazquez y Hernández-Brenes (2012) pero los esfuerzos están enfocados en el reemplazo de los agentes antioxidantes como BHT, o BHA por agentes antioxidantes de origen natural, como extractos de romero, tomillo y semillas de uva. En todos los casos se recomendó el empleo de ácido cítrico que, si bien podría poseer actividad antioxidante, su función principal es la disminución del valor del pH del puré de

palta hasta valores cercanos a 4,5 o inferiores. Además, luego del tratamiento por APH en casi todos los artículos analizados combinan el envasado al vacío en bolsas plásticas utilizado durante el proceso con la refrigeración (4°C) para el almacenamiento, aunque esto no consista en una condición necesaria para su conservación. En estas condiciones se encontró que el producto puede mantenerse sin perder en forma significativa su calidad organoléptica durante al menos 30 días (Jacobó-Velázquez *et al*, 2013; Woolf *et al*, 2013).

En ciertos países, como Chile, Guatemala, México y Estados Unidos, entre otros, ya se ha comenzado a comercializar productos a base de palta preservados por tratamiento con Altas Presiones Hidrostáticas, algunos con el agregado de conservantes como ácido ascórbico, y otros declarados 100% libre de preservantes, es decir, sin adición de acidulantes ni antioxidantes (Figura 4). Los mismos se pueden encontrar tanto refrigerados como congelados.



Figura 4: Ejemplos de productos a base de palta con procesamiento por APH, refrigerados, y con adición de antioxidantes y acidulantes (izquierda y centro) y sin adición de aditivos (derecha). Imágenes obtenidas de: <https://www.food24.com/News-and-Guides/Features/Avocado-on-the-go-20130613>, <https://www.vivanda.com.pe/guacamole-vitta-clasico-paquete-225gr/p?sc=2>, <https://www.solostocks.com.co/venta-productos/fruta/aguacates/guacamole-gordian-100-natural-como-en-casa-4653326>

1.4 Tecnología de procesamiento mediante Altas Presiones Hidrostáticas (APH)

Los métodos tradicionales de conservación, tales como el tratamiento térmico o la congelación, traen asociados efectos indeseados sobre los productos que se desean conservar. Hoy en día los consumidores prefieren alimentos que posean características similares a las de los productos frescos y con “etiquetas limpias” y es debido a ello que diferentes tecnologías emergentes han sido revalorizadas y adoptadas por la industria, tales como: aplicación de campos eléctricos pulsados, irradiación, empleo de luz pulsada de alta intensidad y empleo de altas presiones hidrostáticas (APH), entre otras. La aplicación de APH es un proceso de conservación no térmico cuyo uso en la industria de alimentos está experimentando un período de crecimiento comercial a nivel global. El empleo de APH logra cumplir con los requisitos de los consumidores tanto como los de las empresas manufactureras: seguridad en la aplicación, productos con etiquetas limpias, vida útil extendida y alimentos de calidad superior.

Como su nombre lo indica, éste método de preservación consiste en exponer al producto envasado (aplicación indirecta, la más difundida) a un alto nivel de presión (aplicado en forma isostática dentro de un espacio confinado y utilizando un fluido, generalmente agua, como medio de presurización) en el rango de 100 a 900 MPa, durante un tiempo determinado (generalmente entre 1 a 10 minutos).

Dicho tratamiento, se emplea frecuentemente de manera comercial en productos semisólidos, como papillas y purés o líquidos, como jugos de frutas. También alimentos sólidos, como carnes, pescados y listos para consumir constituyen un gran grupo de productos de aplicación de esta tecnología. La figura 5 muestra los principales segmentos de la industria que utilizan la tecnología APH como medio de preservación (Heinz *et al*, 2009).

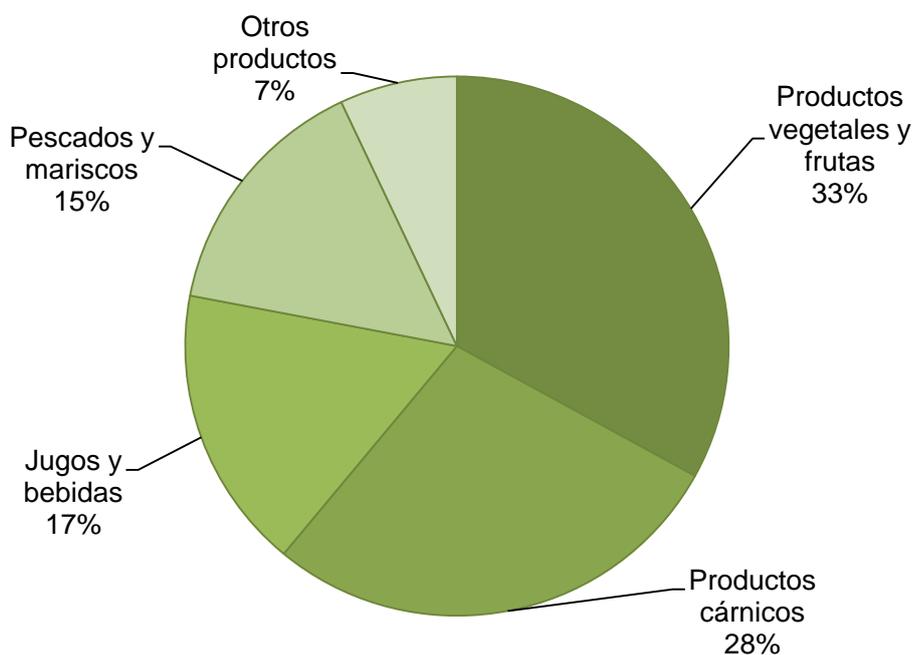


Figura 5: Utilización de conservación por APH en diferentes segmentos de la industria de alimentos (Heinz et al, 2009).

Algunas de sus ventajas radican en la reducción de la carga microbiana (mencionada anteriormente) y la inactivación de enzimas que catalizan reacciones de deterioro, tales como pueden ser las polifenoloxidasas responsables del denominado pardeamiento enzimático o las peroxidases responsables de la oxidación de lípidos (San Martín *et al* 2002; Guerrero-Beltrán *et al*, 2005). Además el tratamiento por APH no altera los compuestos de bajo peso molecular ni uniones covalentes, por lo que los productos tratados resultan con pocos cambios en el color, el sabor y el aroma en comparación con otras tecnologías. Como resultado de estas ventajas, los productos tratados mediante esta tecnología presentan una vida útil más prolongada. Si bien los efectos de reducción microbiana dependen de la matriz, se han logrado reducciones de alrededor de 5 ciclos decimales en los recuentos de patógenos de los géneros *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus* y *Vibrio*. En contraste con el tratamiento térmico, el proceso de APH permite un efecto uniforme e instantáneo en el producto que es tratado independientemente de su geometría o tamaño (Torres y Velazquez, 2005). Se ha demostrado que la eficacia del proceso de APH como estrategia de preservación se ve

ampliamente magnificada cuando actúa sinérgicamente con una segunda barrera como lo es el descenso del pH del producto, al aplicar en paralelo algún agente acidulante.

El empleo de APH fue adoptado y adaptado a partir de su uso en la industria de materiales cerámicos. Las variables del proceso (nivel de presión, tiempo de mantenimiento) dependen del producto que se desea procesar, la temperatura y el fluido transmisor de la presión (generalmente agua). El proceso en sí es bastante simple, el alimento envasado, ya sea líquido o sólido, es sometido a presiones superiores a los 100 MPa, pudiendo alcanzar presiones de hasta 900 MPa. Comercialmente el rango de presiones más utilizado es entre 300 y 600 MPa.

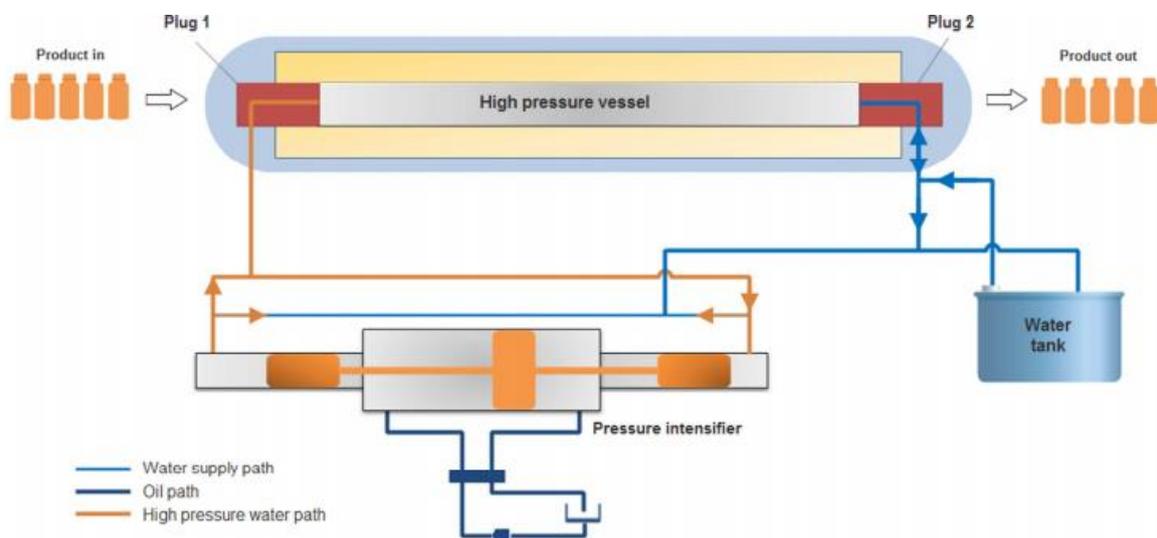


Figura 6: Esquema simplificado de equipo APH. Incluye cámara de alta presión, intensificadores de presión, tanque de agua y circuito de aceite.

(Aganovic *et al*, 2016)

El tratamiento es aplicado durante un lapso previamente estipulado en un espacio confinado (recipiente o cilindro de alta presión), que contiene un fluido (generalmente agua o una mezcla de agua y alcohol) que actúa como medio de transmisión de la presión. La presión es ejercida en forma isostática, esto significa, que es ejercida en todas las direcciones, lo cual implica que los alimentos sólidos pueden conservar su forma original. La presión entonces es mantenida durante el tiempo deseado y luego desciende hasta llegar a la presión atmosférica. La combinación de valor de presión y cantidad de tiempo es dependiente del producto y el efecto que se desea, inactivación microbiana o inactivación enzimática.

Para alcanzar estos altos niveles de presión se utilizan uno o más intensificadores de presión (Figura 6). La cámara de alta presión, donde se coloca el producto, se llena con el fluido presurizador a presión atmosférica y se libera el aire contenido en la misma. Para generar la compresión se utiliza energía eléctrica, que alimenta las bombas intensificadoras las cuales magnifican la presión mediante un pistón de diferentes áreas, lo que genera el incremento de la presión del fluido que ingresa a la cámara hasta alcanzar el nivel de presión de trabajo o regimen, la cual es mantenida por el tiempo estipulado, luego se libera gradualmente la presión y el proceso se da por concluido.

La adquisición del equipamiento, exige de una importante inversión inicial. A pesar de este costo, la amortización del equipo a largo plazo, la obtención de productos de mejor calidad nutricional y sensorial y las tendencias de consumo han aumentado su demanda. Hoy en día existen equipos de APH con diversas capacidades, algunos más reducidos, con cámaras de menos de 1L de capacidad, diseñados para pruebas experimentales y de desarrollo, hasta los más grandes que ofrece el mercado, que permiten procesar hasta 3000 kg de producto por hora. Todos ellos varían en la capacidad y forma de carga y descarga de la cámara, pero funcionan por el mismo principio; lo que implica producciones tipo “batch”, impidiendo la carga continua de producto, debido a que la cámara debe permanecer herméticamente cerrada durante el período de mantenimiento de la presión. Para mayor productividad se han diseñado algunos equipos con bocas opuestas de carga y descarga y rieles que permiten la carga de productos en canastos como muestra la figura 6.

Para poder tolerar un tratamiento tan extremo, que puede alcanzar hasta 9000 veces la presión atmosférica, los alimentos o productos que ingresen al equipo de APH, deben estar contenidos en un *packaging* especial. Por lo general, se trata de envases plásticos flexibles siendo recomendado el polipropileno. Es importante que los empaques estén llenos al menos al 90% de su capacidad para evitar fracturas o estallidos en el tratamiento. Los decorados y rótulos también deben ser diseñados de modo que no se vean alterados por el fluido o las presiones de tratamiento. La figura 7 muestra algunos ejemplos de envases utilizados para envasar productos tratados por APH.



Figura 7: Envases utilizados para alimentos sometidos a tratamiento de APH.
Imágenes obtenidas de <https://universalpure.com/capabilities/#benefits-of-hpp>

1.5 Acciones enzimáticas de deterioro

Cuando los tejidos de las frutas u hortalizas se dañan, enzimas como peroxidases, polifenoloxidasas, glicolasas, estearasas y lipoxigenasas entran en contacto con los sustratos, produciendo la degradación y transformación de los componentes celulares, generando en consecuencia cambios en el color y la percepción de la calidad en los alimentos.

1.5.1 Polifenoloxidasa (PPO)

El grupo de enzimas conocido como fenolasas, reúne varias enzimas e isoenzimas que producen oscurecimiento en alimentos de origen vegetal. En las plantas se hallan unidas a la membrana tilacoide, tendrían un rol importante en la resistencia a la infección de virus, bacterias y hongos cuando se ve dañada mecánicamente (Queiroz *et al*, 2008)

El resultado de las reacciones de pardeamiento enzimático son macromoléculas con estructuras complejas llamadas melaninas, derivados de la copolimerización de diversos compuestos denominados quinonas. Las melaninas varían en su color desde el amarillo hasta el marrón oscuro, según la intensidad de transformación de las quinonas.

La figura 8 muestra el mecanismo de reacción de las fenolasas. En primer lugar, los monofenoles presentes pueden hidroxilarse, formando difenoles o polifenoles. En segundo lugar, un difenol es oxidado enzimáticamente en presencia de oxígeno por la acción de la

catecolasa o polifenoloxidasa, utilizando ión Cu^+ para llevar a cabo la reacción. Por último, las quinonas formadas pueden polimerarse para formar melanina.

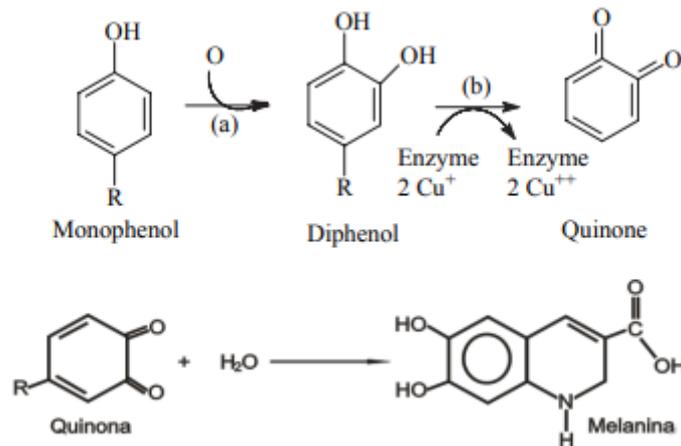


Figura 8: formación de melanina a partir de compuestos fenólicos por acción enzimática. (Badui, 2006).

En células intactas existe un microambiente anaeróbico que impide el funcionamiento de la enzima. Por otro lado, enzima y sustrato se encuentran separados. Hay numerosos sustratos naturales: mono, di o polifenoles.

Entre las formas más comunes de evitar la acción de esta enzima a nivel comercial, se encuentran: el tratamiento térmico, adición de sulfitos y/o de ácidos y la creación de un ambiente anaeróbico de conservación (Badui, 2006).

1.5.2 Lipooxigenasa (LOX)

El nombre de lipooxigenasas o lipoxidasas (LOX) se utiliza para denominar a un grupo de enzimas responsables de la oxidación de compuestos de carácter insaturado como lo son los ácidos grasos libres, triacilglicéridos, pigmentos y vitaminas. Suele tener concentraciones importantes en alimentos con altos contenidos grasos como la palta.

Su presencia en frutas y hortalizas se explica por la función benéfica que cumple en el metabolismo de estos alimentos. Actúa en la síntesis de diversos alcoholes y aldehídos característicos de los productos frescos (Badui, 2006).

En la oxigenación o peroxidación de ácidos grasos, su mecanismo de acción suele estar dirigido a sustratos específicos, ácidos grasos con insaturación no conjugada cis-cis-1,4-pentadieno (Figura 9). La enzima extrae un átomo de hidrógeno del carbono central del sistema de insaturación, produciendo un radical ácido graso cuya resonancia le permite establecer dos formas. Cada uno de estos radicales toma una molécula de oxígeno y se isomeriza en los hidroperóxidos cis-trans. Estos peróxidos pueden continuar por diversas vías (enzimáticas o no) de degradación, de las que derivan varios compuestos, algunos de los cuales son tan reactivos que pueden inhibir la actividad de la enzima LOX.



Figura 9: sistema de insaturaciones no conjugado cis-cis-1,4-pentadieno (Badui, 2006).

Estos compuestos generados por la acción de la enzima, se convierten en sustratos para la hidroperóxido liasa, alcohol deshidrogenasa y otras isomerasas. La LOX afecta en un primer lugar, la calidad nutricional de los alimentos destruyendo los ácidos grasos esenciales y co-oxidando carotenoides. En un segundo lugar, afecta la calidad sensorial ya que por la rotura oxidativa de los dobles enlaces de ácidos grasos insaturados se producen aldehídos y ácidos carboxílicos de cadena más corta y más volátiles, que dan olores y sabores desagradables (Jacobo-Velázquez *et al*, 2010).

1.6 Antioxidantes

1.6.1 Antioxidantes y especies reactivas de oxígeno (ROS) en el organismo

Para comprender qué son los antioxidantes y de qué manera actúan en el organismo, es importante conocer primero el concepto de oxidación y su relación con las especies reactivas de oxígeno.

El proceso de oxidación se presenta cuando un átomo inestable pierde un electrón y forma un nuevo compuesto al combinarse con otro elemento; y si esto ocurre en un sistema biológico causa un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno, y la capacidad para limpiar el organismo de sustancias nocivas. El término colectivo especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS en inglés) hace referencia no solo a

compuestos radicales que contienen oxígeno como el radical hidroxilo (OH°); el radical superóxido ($\text{O}_2^{\circ-}$) y el radical óxido nítrico (NO°), sino también a los compuestos derivados del oxígeno no radicales que son oxidantes y/o que se convierten fácilmente en radicales libres como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ozono (O_3) (Hartwig, 2015). Como puede verse, aunque el oxígeno sirve para producir energía en el organismo, pequeñas porciones de este elemento producen los radicales libres (ROS) que se forman de manera normal a través de una serie de reacciones bioquímicas esenciales para el organismo (propias del metabolismo biológico) (Ramírez *et al*, 2012; Salinas, 2015).

En circunstancias normales, existe un equilibrio en el organismo entre las especies reactivas del oxígeno y los sistemas de defensa antioxidante. Cuando dicho equilibrio se ve alterado, ya sea por una elevada concentración de ROS o porque las concentraciones de antioxidantes se hallan disminuidas, se produce lo que se denomina “estrés oxidativo”, condición del organismo en la cual hay un desequilibrio oxidantes/antioxidantes. Esto puede desencadenarse por radiación solar, respuestas inflamatorias e inmunológicas, déficit de vitaminas, alcoholismo, tabaquismo, entre otros (Hartwig, 2015; Salinas, 2015).

Los antioxidantes, a pesar de que se encuentran en bajas concentraciones dentro del organismo, tienen la capacidad de retrasar el comienzo o reducir la velocidad de oxidación de aquellos sustratos que son autooxidables. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN. Debido a que eliminan y/o estabilizan los radicales libres sobrantes y las especies reactivas del oxígeno (ROS), logran bloquear parte del daño y/o deterioro provocado por la oxidación (Douglas W. Wilson, 2017).

Los radicales libres son especies químicas en cuya estructura presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, pudiendo provocar cambios celulares y genéticos debido a su gran inestabilidad y alta reactividad. Presentan una vida media relativamente corta por lo que actúan cercano al sitio donde se forman. Para lograr la estabilidad reaccionan con moléculas de su alrededor dando lugar a nuevas especies reactivas, lo que genera una reacción en cadena que puede llegar a dañar los constituyentes celulares si los antioxidantes no intervienen (Fullana y González Gebhard, 2016).

Si bien el cuerpo genera radicales para su propio uso (controlar el tono muscular, eliminar bacterias, regular la actividad de órganos y vasos, etc.), al mismo tiempo genera los antioxidantes necesarios para eliminar los radicales libres que sobran.

El problema empieza cuando hay un exceso de radicales libres que no se destruyen. Situaciones como el ejercicio físico intenso, la contaminación ambiental, el tabaquismo, las infecciones, el estrés, dietas ricas en grasas y la sobre exposición al sol pueden ser posibles detonantes de esta sobreproducción de radicales libres; la cual podría estar implicada en muchas enfermedades importantes como el cáncer, el Alzheimer, enfermedades respiratorias o cardiovasculares (Beckman y Ames, 1998). Es aquí entonces donde los antioxidantes intervienen, encargándose de balancear los radicales libres necesarios para fines funcionales contra los que producen estrés oxidativo. Aparte de los antioxidantes propios del organismo, un nutriente tiene propiedades antioxidantes cuando es capaz de neutralizar la acción oxidante de la molécula inestable de una ROS sin perder su propia estabilidad electroquímica.

1.6.2. Acción de los antioxidantes

Los antioxidantes, según su procedencia, pueden ser endógenos: producidos por el mismo organismo como un mecanismo de defensa intrínseco; o exógenos: aportados principalmente por los alimentos (vitaminas en su mayoría). A su vez, los antioxidantes endógenos pueden clasificarse, según su naturaleza, en enzimáticos (superóxido dismutasas, catalasas, peroxidasas, etc) y no enzimáticos (ácido úrico, melatonina, etc) (Tabla VI). Todos ellos tienen diferentes mecanismos de acción; unos impiden la formación de los radicales y/o especies reactivas, por lo que aportan a un sistema de prevención, mientras otros inhiben la acción de los radicales, lo que se denomina sistema barredor; y otros favorecen la reparación y la reconstitución de las estructuras biológicas dañadas, lo que se conoce como sistema de reparación (Salinas, 2015).

En síntesis, cualquiera sea su procedencia o naturaleza, los antioxidantes pueden prevenir o retardar la oxidación de un sustrato biológico, y en algunos casos revertir el daño oxidativo de las moléculas afectadas. Según el mecanismo de acción, se clasifican en:

- Antioxidantes primarios o preventivos: actúan al comienzo de una cadena de oxidación, inhibiendo la fase de propagación por reacción con radicales libres y

convirtiendo a estos últimos en compuestos más estables gracias a que les donan electrones o hidrógenos. Ej.: las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa; tocoferoles, etc.

- Antioxidantes secundarios (chain-breaking): bloquean o interrumpen alguna etapa de la cadena de oxidación una vez iniciada, removiendo el oxígeno de los sistemas cerrados. También retrasan la oxidación mediante regeneración de antioxidantes primarios o por quelación de metales, los cuales aceleran el proceso de oxidación por catálisis (principalmente cobre y hierro). Ej.: ácido ascórbico, lecitina, ácido cítrico, etc.

Los diversos mecanismos implican: la interacción directa con especies reactivas; la prevención de la formación enzimática de especies reactivas; la prevención de la formación de especies reactivas dependientes de metales (como agentes quelantes); o bien la activación o inducción de la actividad de enzimas antioxidantes (Finley, J. W. *et al*, 2011; Fullana y González Gebhard, 2016).

Tabla VI: Ejemplos de antioxidantes endógenos y exógenos

Antioxidantes Endógenos		Antioxidantes Exógenos	
Enzimáticos	No enzimáticos	Vitaminas	Otros
<ul style="list-style-type: none"> - Glutatión peroxidasa - Superóxido dismutasa - Catalasa 	<ul style="list-style-type: none"> - Ácido úrico - Coenzima Q10 (ubiquinona) 	<ul style="list-style-type: none"> - Vitamina C - Vitamina E - Carotenoides 	<ul style="list-style-type: none"> - Fitoquímicos (Flavonoides, Catequinas, Tioles) - Agentes quelantes (EDTA, ácido cítrico)

Si bien los antioxidantes pueden actuar neutralizando los radicales libres sobrantes en el organismo, el objeto del presente proyecto fue estudiar la función tecnológica de los antioxidantes, es decir como aditivo utilizado en la preservación de los alimentos, particularmente en puré de palta.

1.6.3. Antioxidantes y oxidación en alimentos

En tecnología de alimentos, los antioxidantes son definidos como sustancias que previenen o retardan la oxidación de los lípidos, una de las principales causas de deterioro de los alimentos. Este proceso es responsable de la formación de compuestos químicos que pueden afectar negativamente la calidad del alimento (nutrientes, flavor, textura y color) además de que algunos pueden resultar tóxicos (Finley y Given, 1986; Huang *et al*, 2005). El grado de deterioro depende del tipo de grasa o de aceite; en términos generales, los lípidos que más fácilmente se afectan son los de origen marino, seguidos por los aceites vegetales y por último, las grasas animales.

Los antioxidantes, por lo tanto, ya sea que se encuentren o adicionen en ciertos productos, ayudan a mantener las características fundamentales de los alimentos, el nivel de nutrientes, la textura, el color, el sabor, el aroma y su frescura (Huang *et al*, 2005).

Para evitar el deterioro de los lípidos, puede agruparse a los antioxidantes en dos categorías:

- Antioxidantes tipo I: se incluye en este grupo aquellas sustancias capaces de interrumpir la cadena de radicales cediendo un hidrógeno a un radical lipídico libre y quedando ellos en forma de radical. Como consecuencia, disminuye el número de radicales libres y desciende la velocidad de la oxidación. Los antioxidantes en forma de radical son estables y no reaccionan con los lípidos, sino que lo hacen con otras moléculas similares, dando lugar a productos no radicales, o bien a quinonas. Ejemplos: BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno), tocoferoles.
- Antioxidantes tipo II: son compuestos que actúan impidiendo o disminuyendo la formación de radicales libres. Los más utilizados son los agentes quelantes de los metales, tales como el EDTA, ácido cítrico y ascórbico; y además potencian la acción de los antioxidantes de tipo I. La acción de los mismos depende del pH y de la temperatura, ya que estos parámetros gobiernan la estabilidad del complejo formado.

Una “tercera categoría” (Antioxidantes tipo III) podría incluir a aquellos procedimientos físicos que protegen a los alimentos de la oxidación, basándose en el control del contenido de oxígeno, de la humedad relativa y de la temperatura.

Para evitar el contacto del alimento con el oxígeno, se utiliza el envasado al vacío o en atmósferas de nitrógeno. Por otro lado, cuanto menos contenido acuoso presente el alimento, siendo recomendable un A_w próximo a 0,2 ya que la rancidez se desarrolla rápidamente tanto a niveles de humedad muy altos como muy bajos, y menor sea la temperatura del medio, la velocidad de oxidación será menor. Por último, se aconseja proteger a los alimentos oxidables de la luz, ya que la misma afecta ciertas etapas de la oxidación (Badui, 2006).

1.6.4. Efectos de la oxidación de lípidos en alimentos

1.6.4.1 Sabores oxidados

El efecto inmediatamente reconocible de la oxidación de los lípidos en los alimentos es el desarrollo de olores y sabores indeseables. Los productos "rancios" de la oxidación de lípidos son en su mayoría compuestos carbonílicos de cadena corta, formados como resultado de la descomposición de los peróxidos. La aparición de "flavors" rancios en productos lácteos se debe fundamentalmente a la autooxidación; por ejemplo, en el caso de la leche líquida, el sustrato está representado por los fosfolípidos y la reacción es catalizada por vestigios de hierro o de cobre; en cambio en la leche en polvo, la autooxidación afecta fundamentalmente a los ácidos grasos de los triglicéridos. Según Jayathilakan *et al* (2007), las papas, cuando son cocidas en agua a ebullición y luego almacenadas en frío, desarrollan rápidamente un sabor no agradable como resultado de la actividad de la lipoxigenasa (Hartwig, 2015).

1.6.4.2 Pérdidas de vitaminas liposolubles y pigmentos

La oxidación de lípidos en alimentos ricos en vitaminas liposolubles (A, D, E y K) suele ir acompañada de pérdidas en dichos compuestos por reacciones catalizadas que involucran la presencia de radicales libres. La vitamina E, por ejemplo, actúa como antioxidante y es consumida durante el período de inducción de las reacciones de autooxidación. La oxidación de los lípidos también puede afectar indirectamente el color de los alimentos; un típico ejemplo lo constituyen los pigmentos carotenoides y clorofilas por reacción con los hidroperóxidos.

1.6.4.3 Efecto sobre proteínas

Los productos de la oxidación lipídica pueden reaccionar con las proteínas presentes en el alimento provocando la polimerización de las proteínas con un significativo aumento del peso molecular de las mismas. Existen varios grupos en la molécula de proteína capaces de convertirse en radicales libres mediante la pérdida de un átomo de hidrógeno ante la acción de un radical libre de origen lipídico. Por lo mismo, la interacción entre lípidos oxidados y proteínas afecta negativamente al valor nutricional y a la funcionalidad de las proteínas en sistemas alimenticios debido a la desnaturalización de las proteínas con la consiguiente disminución de su solubilidad y de su capacidad de retención de agua, pudiendo generar también ciertos cambios texturales (“hardening texture”) (Hartwig, 2015).

1.6.5. Antioxidantes en la industria alimentaria

En el área de alimentos, existen tanto antioxidantes naturales como sintéticos, estos últimos utilizados generalmente en la industria alimenticia como aditivos alimentarios. El uso de antioxidantes no sólo permite mantener la calidad normal de un producto, sino también extender su vida útil.

Los primeros antioxidantes utilizados fueron de origen natural, pero al transcurrir los años, éstos fueron reemplazados por sustancias sintéticas, más baratas, de pureza controlada y con una capacidad antioxidante más uniforme. Debido a su alto grado de estabilidad, eficacia y ventaja económica, los antioxidantes sintéticos se volvieron los más utilizados por la industria alimenticia.

Sin embargo, en los últimos años, el uso de aditivos alimentarios de origen sintético ha sido cada vez más cuestionado por los consumidores. En consecuencia, la industria alimenticia está volviendo a utilizar aditivos naturales como antioxidantes. Los mismos están conquistando el mercado progresivamente y su acción está correlacionada al contenido de compuestos fenólicos que actúan como aceptores de ROS, además de actuar en los procesos oxidativos catalizados por metales. Estudios toxicológicos han demostrado la posibilidad de que ciertos antioxidantes sintéticos presenten efectos tóxicos y sean promotores de algunos tipos de cáncer, entre otros efectos fisiológicos (Ardestani y Yazdanparast, 2007). Por esa

razón, varias investigaciones han buscado encontrar antioxidantes naturales, con la finalidad de sustituirlos en los alimentos (Valenzuela y Nieto. 2000)..

1.6.6 Clasificación de antioxidantes

1.6.6.1. Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos son propiamente donadores de protones, como el butilhidroxianisol (butilhidroxianisol, BHA), el butilhidroxitolueno (butilhidroxitolueno, BHT), la 2,4,5-trihidroxi-3-terc-butil-4-metoxifenol (THBP), el 4-hidroximetil-2,6-ditertbutilfenol, la tertbutilhidroquinona (butilhidroquinona terciaria, TBHQ) y los galatos (figura 10). Estos compuestos no detienen la formación de los radicales, sino que reaccionan con ellos, los estabilizan y producen radicales de antioxidante menos activos. Es decir, se consumen en la reacción y, por lo tanto, la estabilidad del lípido siempre va a depender de la cantidad residual (Badui, 2006).

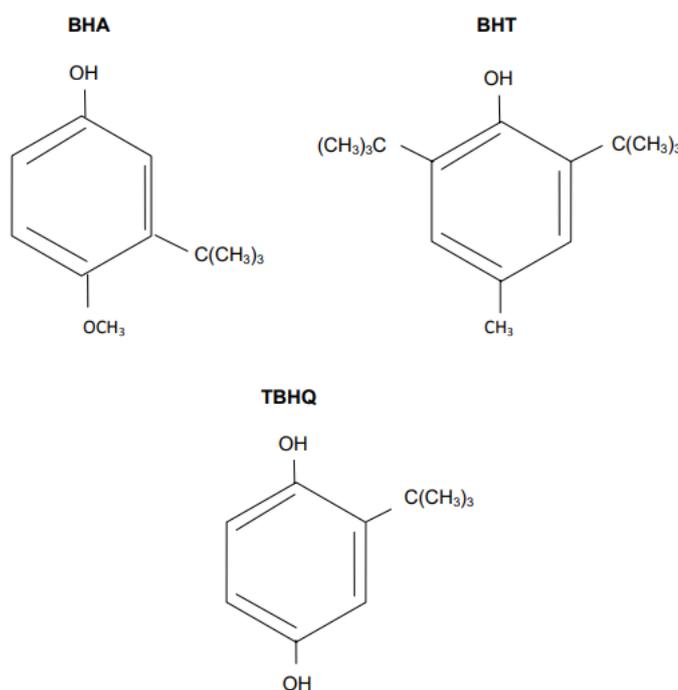


Figura 10: estructura química de los antioxidantes sintéticos

El BHA y BHT son muy poco solubles en agua, pero solubles en etanol, aceites y parafinas. Son considerados más efectivos en las aplicaciones con grasas animales que con aceites vegetales, pudiéndose encontrar también en aplicaciones como protectores del color y del aroma de aceites esenciales. Ambos son estables al calor (temperaturas de frituras y horneado) por lo que suelen usarse como protectores de lípidos en productos de confitería con contenido graso (horneados y fritos); y además, suelen utilizarse en combinación debido al efecto sinérgico resultante.

El TBHQ es muy poco soluble en agua y muy soluble en grasas y aceites. Es considerado el mejor antioxidante para las aplicaciones de frituras y en aceites vegetales, pero resulta poco eficaz en los procesos de panificación u horneado.

1.6.6.2. Antioxidantes Naturales

Al contrario de los antioxidantes sintéticos, los naturales se encuentran en plantas y en diversos alimentos, y se manifiestan en forma de micronutrientes, como son las vitaminas y minerales y en otras sustancias “no nutrientes”, como los flavonoides o polifenoles. Las figuras 11, 12, 13 y 14 muestran las estructuras químicas de las vitaminas A, C, E y Beta-caroteno, siendo estos los antioxidantes más comunes y abundantes en una dieta balanceada.

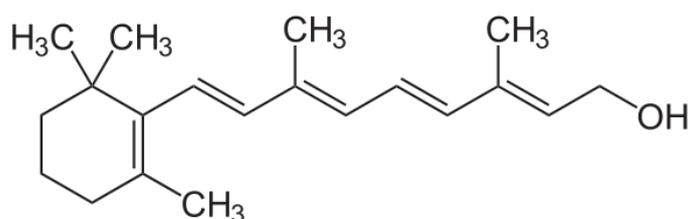


Figura 11: estructura de la Vitamina A

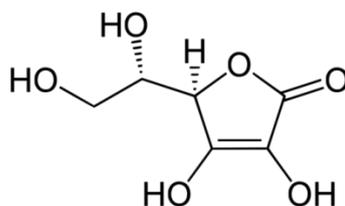


Figura 12: estructura de la Vitamina C

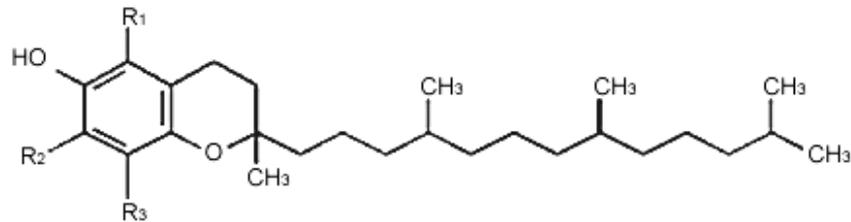


Figura 13: estructura de la Vitamina E

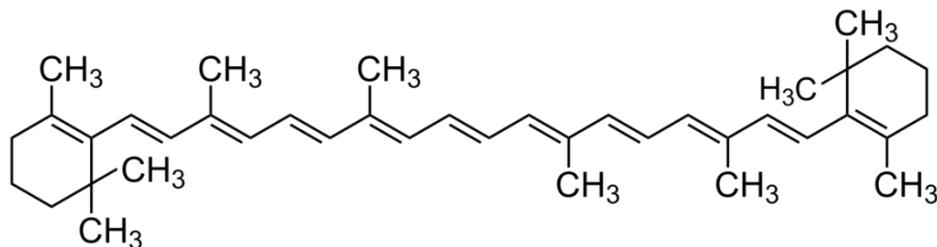


Figura 14: estructura del Beta-caroteno

En la Tabla VII se detallan algunos de los antioxidantes naturales y las fuentes alimenticias donde pueden encontrarse.

Tabla VII: Antioxidantes naturales presentes en alimentos

Antioxidante	Alimento
Vitamina A	Leche, huevo, carnes
Vitamina C	Kiwi, cítricos, piña, espinaca, tomate, pimiento
Beta-caroteno	Zanahoria, pimientos, acelga, espinaca, brócoli, calabaza
Luteína y zeaxantina	Verduras de hoja verde, brócoli, palta
Vitamina E	Frutos secos (nueces), palta, germen de trigo, aceites vegetales
Licopeno	Tomate
Antocianos	Uvas, manzanas, frutos rojos (fresas, arándanos, moras)
Catequinas	Té verde, Cacao
Taninos	Uvas
Coenzima Q	Espinaca, atún, algunos mariscos y pescados
Tioles	Cebolla, ajo

1.6.7. Antioxidantes en la palta

Como se mencionó en la sección 1.2 acerca de los beneficios del consumo de palta, este fruto presenta un gran poder antioxidante, el cual proviene de su contenido de fitoesteroles, carotenoides y tocoferoles principalmente. Debido a que es fuente de vitamina E, antioxidante por excelencia dentro de los antioxidantes naturales presentes en alimentos, se detalla debajo sus características y propiedades.

Vitamina E: es una vitamina liposoluble que se puede encontrar de 8 formas distintas. Cuatro de ellas son diferentes isómeros de tocoferoles y las 4 restantes son denominadas tocotrienoles. Todos los isómeros tienen anillos aromáticos con un grupo hidroxilo, el cual puede donar un átomo de hidrogeno para reducir las ROS de los compuestos que componen las membranas. Al ser liposolubles, su efectividad se ve favorecida ya que las membranas celulares están formadas por lípidos, por lo que penetran más fácilmente en las mismas y eliminan así los radicales libres.

Existen formas alfa α , beta β , gamma γ , y delta δ (para ambos isómeros), siendo el α -tocoferol la forma más común, abundante y activa de la vitamina. Éste ayuda a prevenir o retrasar enfermedades coronarias limitando la oxidación del LDL (colesterol “malo”) y previene también la formación de los coágulos en la sangre. Además de hallarse en gran cantidad en la palta, sus niveles son muy abundantes en semillas oleaginosas, nueces, maní y aceitunas.

Por otro lado, en cuanto a la semilla de la palta, aunque al momento no existan suficientes investigaciones que avalen su potencial poder antioxidante, como sí las hay sobre las semillas de otros frutos como los cítricos, uvas, mango y canola, en donde se ha logrado determinar e identificar sus compuestos antioxidantes (Soong y Barlow, 2004), algunos estudios han intentado demostrar su capacidad antioxidante de modo que puedan identificarse nuevos antioxidantes naturales, más económicos y efectivos que los ya conocidos, para incorporarse en los alimentos.

Estudios fitoquímicos previos realizados sobre la semilla de palta han identificado diferentes clases de metabolitos entre los que se encuentran glucósidos del ácido abscísico, importantes en la maduración del embrión, fitosteroles, triterpenos, ácidos grasos con enlaces oleofínicos y acetilénicos, ácidos furanoicos, dímeros de flavanoles, proantocianidinas

oligoméricas, polifenoles y antocianinas. Por otra parte, los extractos de semillas obtenidos empleando acetona/agua/ácido acético han mostrado actividad frente al ensayo de absorbancia del radical oxígeno (ORAC) y la inactivación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Polania, 2014).

1.6.8. Antioxidantes en la cebolla

La cebolla, perteneciente al género *Allium* junto con el ajo y el puerro, entre otros, posee numerosos componentes bioactivos con grandes propiedades, dentro de ellas, la de ser antioxidante.

Posee compuestos azufrados (tioles) que son los que le confieren el olor y sabor tan característico y que a su vez tienen un efecto mucolítico. Por otro lado, cuenta con flavonoides, principalmente quercetina, los que sintetiza para su propia defensa. Ambos componentes (los azufrados y los flavonoides) tienen una importante función antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana (Carbajal, 2016).

La cebolla es una de las principales fuentes del flavonoide ya mencionado, quercetina (Figura 15), siendo en promedio su contenido de 347 mg/kg de cebolla, 5 a 10 veces más que cualquier otro vegetal (Lachman, J. *et al*, 2003).

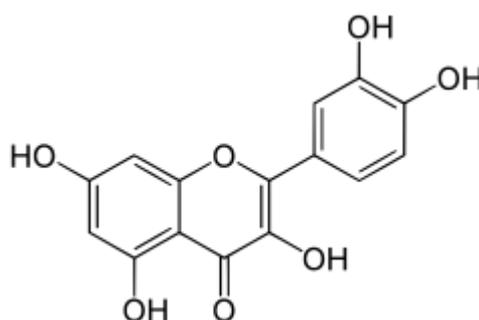


Figura 15: Estructura química de la quercetina

El otro grupo de compuestos polifenólicos presente en la cebolla son los ácidos fenolcarboxílicos, como el cafeico, ferúlico, p-hidroxibenzoico, p-cumárico, entre otros. También es significativa la presencia del aminoácido tirosina.

1.7 Aspectos cromáticos

1.7.1 Pigmentos naturales

Los alimentos elaborados a partir de ingredientes de origen natural adquieren su color característico debido a los pigmentos que contienen. Algunos de los pigmentos se producen durante su manipulación o durante el procesamiento, como sucede en la caramelización o en las reacciones de Maillard, otros colores pueden ser modificados en procesos como la fermentación. Estas sustancias responsables de la coloración de un alimento cuentan con un grupo cromóforo, una parte de la molécula que es capaz de absorber energía y excitarse, luego los electrones de la molécula vuelven a su estado basal y liberan la energía a diferentes longitudes de onda dentro del espectro visible, haciendo que el ojo humano capte así el color.

Entre los principales pigmentos naturales en los alimentos se encuentran los carotenoides, clorofilas, pigmentos fenólicos: flavonoides, antocianinas y taninos, hemopigmentos, otros. En la mayoría de los casos, los pigmentos naturales cumplen una función biológica en el organismo donde se encuentran, por ejemplo: la clorofila actúa en la fotosíntesis y la mioglobina en el almacenamiento de oxígeno en el músculo (Badui, 2006).

Los colores característicos de la pulpa de palta (verde, amarillo) se deben principalmente a la presencia de clorofila, carotenoides y antocianinas (Ashton *et al*, 2006). Mientras que en la cebolla también hay flavonoides (Lachman *et al* 2003).

Lu *et al* (2005) han encontrado que la pulpa de palta Hass Madura, contiene los siguientes pigmentos y concentraciones (por gramo de pulpa) 2,93 $\mu\text{g/g}$ de luteína, 0,11 $\mu\text{g/g}$ zeaxantina, 0,25 $\mu\text{g/g}$ de β -criptoxantina y α -caroteno, y unos 0,60 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno.

La clorofila es el principal compuesto de las plantas capaz de absorber la energía de la luz solar y transformarla en energía química en la fotosíntesis. En su forma a o b (Figura 16) da coloración verde. En los alimentos la disminución de pH puede provocar la formación de feofitinas de color café u olivo (Badui, 2006)

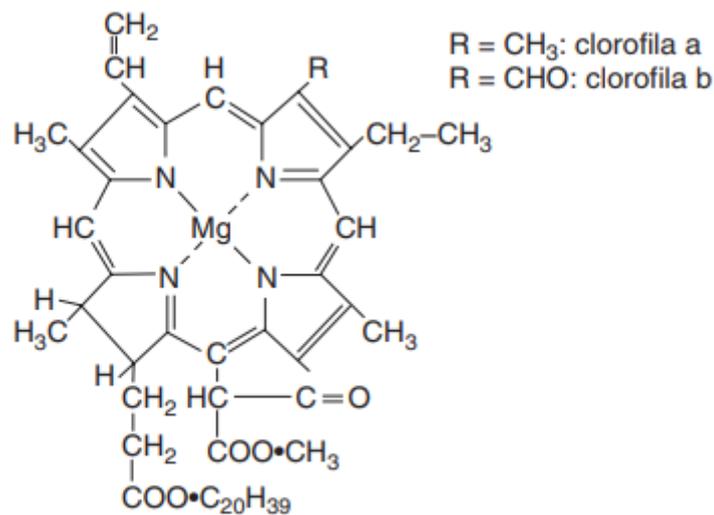


Figura 16: Estructura de la clorofila a y b.

Los carotenoides constituyen un grupo de pigmentos liposolubles muy grande. El grupo cromóforo genérico está formado por una cadena larga con dobles enlaces conjugados y produce colores que van desde el amarillo hasta el rojo intenso. Se dividen en dos grupos importantes: carotenos, de los que destaca el β -caroteno y xantofilas, entre las que cobran importancia la luteína y la zeaxantina.

En las plantas cumplen un rol importante para que se realice la fotosíntesis, debido a que ayudan a atrapar la luz solar y, también, como escudo contra la fotooxidación destructiva (Badui, 2006).

Los flavonoides y antocianinas son un grupo de compuestos fenólicos, no nitrogenados, solubles en agua. Son poco estables y tienden a reaccionar con radicales libres por lo que tienen una destacable capacidad antioxidante. También pueden complejarse con los iones metálicos.

1.7.2 Color como medida de calidad

A la hora de elegir un producto alimenticio, los consumidores tienen una fuerte preferencia por aquellos de apariencia atractiva y el color es la primera característica que se percibe de los productos, esto sucede principalmente con productos naturales, mínimamente procesados como frutas, verduras o carnes, donde el color está directamente asociado con la

procedencia, madurez o estado de conservación del producto. El color es una cualidad organoléptica de los alimentos y cada producto, ya sea natural o procesado, tiene un color característico con el cual son identificables (Mathias-Rettig *et al*, 2014).

Para los productores y comerciantes de alimentos, poder mantener las propiedades de color es decisivo para que un producto resulte elegido, ya que se ha comprobado que cuando se percibe un cambio en el color de un alimento sin alterar otros atributos como la forma, la textura o el aroma, se obtiene una respuesta de rechazo por parte de los consumidores (Badui, 2006).

Los consumidores asocian rápidamente las cualidades organolépticas con la idoneidad del producto y este es considerado un factor en la calidad del mismo.

Un cambio perceptible en el color a los ojos del consumidor puede proporcionar cierta información sobre la calidad de comestible de un alimento, sobre su identidad o sobre la intensidad del sabor. Sin embargo, el color se percibe físicamente a través del sentido de la vista y no siempre resulta válida la correlación entre color y calidad. Además de que puede resultar en una evaluación subjetiva y poco regular de parte del consumidor debido a factores de iluminación, genéticos o psicológicos en la percepción, los productores han implementado el uso de aditivos y colorantes, que pueden enmascarar esta apreciación (Bello, 2008).

1.7.3 Sistema CIELab

Esta subjetividad en la apreciación ha sido tratada por expertos a lo largo de la historia, intentando proponer modelos de referencia en el análisis del color de los objetos, pinturas y alimentos.

La colorimetría es una ciencia que tiene como objeto la medición del color. Debido a que el color no es una propiedad intrínseca de cada objeto, sino que depende de múltiples factores, se han establecido algunos modelos que permiten analizar esta característica. En todos los modelos conocidos, se deben tener en cuenta algunos condicionantes de modo que las medidas de color puedan ser comparables entre sí.

La comisión Internacional de la Iluminación (CIE), es un organismo comprometido mundialmente en la cooperación e intercambio de información científica relacionada con la iluminación, el color y la visión. En 1976 la CIE ha adoptado el sistema CIELab. El espacio

de color Lab es un espacio tridimensional con tres coordenadas L, a y b, las cuales identifican las siguientes características de los colores: L* refiere a la luminosidad o claridad. Esta variable acromática puede tener valores entre 0 (negro) y 100 (blanco). a* es una de las componentes cromáticas, varía del verde (valores negativos) al rojo (valores positivos). b* es la segunda componente cromática que oscila del azul (valores negativos) al amarillo (valores positivos) (León, 2006). Las tres variables son adimensionales y las coordenadas a* y b* forman un plano perpendicular a la coordenada de luminosidad como lo demuestra la Figura 17.

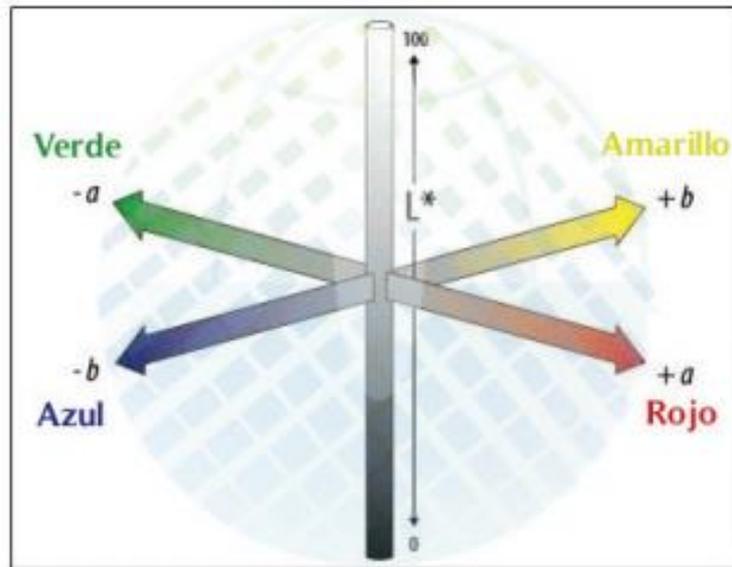


Figura 17: Coordenadas del sistema CIELab (Mathias-Rettig *et al*, 2014).

En el ojo humano, el color se percibe al recibir una señal estímulo de la energía radiante no absorbida por el objeto observado y la percepción resulta en una integración de los tres parámetros mencionados (Mathias-Rettig *et al*, 2014).

La simple observación de un objeto, en este caso: alimentos, deriva en una descripción subjetiva del observador. Si bien la elección final de un producto alimenticio en la góndola va a estar determinada por algunos factores psicológicos y subjetivos en la apreciación de la calidad del alimento, para poder tener una mirada más objetiva sobre el color, se pueden controlar algunos factores que influyen en la percepción. Un análisis de este tipo debe darse en un ambiente controlado.

En primer lugar, se debe conocer el iluminante o la luz incidente sobre el alimento. La luz natural o los distintos tipos de luz artificial contienen los colores del espectro visible pero en distinta proporción. Ya que la energía radiante no absorbida por el alimento estará directamente relacionada con la radiación emitida por la luz de incidencia, es preciso poder identificar a los iluminantes en términos de su longitud de onda. Existen en la actualidad, ciertas fuentes estándar de iluminación de las cuales se conoce su comportamiento en cuanto a la emisión de energía en el espectro de luz visible (Mathias-Rettig *et al*, 2014).

En segundo lugar, se debe tener en cuenta que el observador puede adquirir diferentes ángulos de observación respecto del objeto observado, lo que puede incidir en la percepción del color debido a cómo reflejan las ondas de luz incidente. El entorno también tiene su propia iluminación la cual puede no incidir directamente sobre el alimento pero sí sobre el ojo observador. Además los colores de contraste con el fondo donde está ubicado el alimento también influyen en la percepción humana del color, en este sentido los empaques y presentaciones juegan un rol fundamental. Por otro lado, la forma, textura y humedad en la superficie del alimento, influyen en la reflexión o absorción de la luz.

Debido a los factores mencionados, sumados a los de las propias condiciones de aptitud fisiológica del observador, es que resulta necesaria la utilización de modelos para obtener mediciones que permitan comparar los colores entre distintas muestras y alimentos de forma objetiva.

Los valores de $L^*a^*b^*$ son usualmente utilizados en investigaciones sobre alimentos. Para este fin, también resulta ventajosa la utilización de programas para análisis de imágenes por computadora debido a la posibilidad de examinar pixel por pixel en la superficie del alimento en estudio ya que el modelo CIELab cuenta con la ventaja de que es un espacio de color independiente de los dispositivos de entrada, como pueden ser scanners o cámaras digitales y de los dispositivos de salida, como monitores o impresoras, que se utilicen para analizar la imagen (Yam & Papadakis, 2004).

En el espacio de color CIELab la diferencia de color percibida corresponde a una distancia euclidiana, es decir, que es un espacio perceptualmente uniforme (León *et al*, 2006). Estas distancias pueden usarse para representar aproximadamente las diferencias de dos

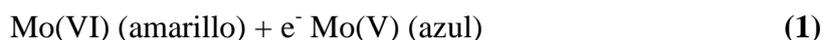
estímulos de color que se generen en objetos del mismo tamaño, en entornos blancos a grises con un iluminante estándar CIE D65 (Hunt, 1991).

1.8 Fundamentos de las metodologías de análisis

1.8.1 Método del reactivo de Folin-Ciocalteu: Cuantificación de polifenoles totales

El método del reactivo de Folin-Ciocalteu es un ensayo sencillo, muy utilizado para la cuantificación de compuestos fenólicos en productos naturales. El mecanismo básico del método consiste en una reacción de óxido-reducción como suelen ser otros métodos de determinación de antioxidantes.

Los polifenoles en la muestra se detectan por diferencias en la absorbancia de la misma, debido a un cambio de color generado por el reactivo. El método de Folin-Ciocalteu antes era sensible y preciso, sin embargo, era lento y carecía de especificidad. Singleton y Rossi encontraron la forma de hacer la reacción más específica, usando el reactivo fosfomolibdotúngstico (formado por las sales de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico), el cual tiene una coloración amarilla que al ser reducida por los fenoles toma una coloración azul (Prior, 2005), como indica la Ecuación 1.



La coloración azul tiene un valor máximo de absorbancia a 765 nm y se cuantifica por espectrofotometría en referencia a la respuesta de un estándar de ácido gálico (Figura 18)

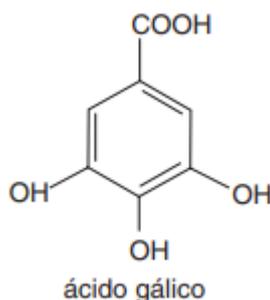


Figura 18: estructura del ácido gálico.

La gran ventaja del método radica en su simpleza y utilidad para caracterizar muestras de origen vegetal.

Para poder interpretar correctamente los resultados se debe conocer también la naturaleza de la muestra a evaluar, ya que hay otras sustancias que pueden interferir en la cuantificación de sustancias fenólicas. Algunos de los interferentes del método pueden ser azúcares, aminos aromáticos, dióxido de azufre, ácido ascórbico, ácidos orgánicos y Fe (II) (Prior *et al*, 2005).

Es importante considerar que muchos alimentos ricos en antioxidantes tienen, además de fenoles, otros antioxidantes de naturaleza no-fenólica como pueden ser vitaminas y carotenoides. Para comprender mejor la riqueza antioxidante del alimento en estudio es, por lo tanto, importante acompañar este análisis con la medición de la capacidad antioxidante del mismo.

1.8.2 Ensayo de ABTS: Medición de capacidad antioxidante

Para tener una medición de la capacidad antioxidante de un alimento, se deberían poder cuantificar todas las moléculas presentes en este que tengan actividad antioxidante.

Existen en la actualidad numerosos métodos empleados para este fin, sin contar aún con un método de referencia que mida capacidad antioxidante total en una matriz biológica, como lo pueden ser alimentos, extractos botánicos o suplementos dietarios, esto se debe a la complejidad y cantidad de sustancias antioxidantes de diferente naturaleza: algunos son lipofílicas o hidrofílicas, algunas reacciones son imposibles de realizar a pH fisiológico.

El ensayo de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) o ensayo de ABTS se sustenta en la generación del radical de radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) o ABTS^{•+} (Figura 19) para la medición de la actividad antioxidante total de soluciones de sustancias puras, mezclas acuosas y bebidas. Una de las ventajas del método es que es aplicable a una amplia clase de antioxidantes hidrosolubles y liposolubles, compuestos puros y extractos de alimentos.

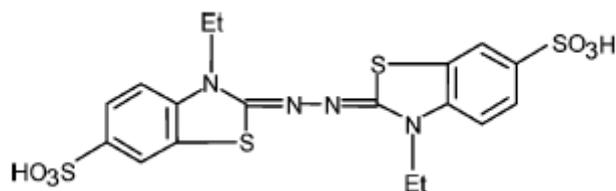


Figura 19: Estructura del radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) o ABTS^{•+}

En este método, el ABTS es oxidado al catión radical ABTS^{•+} de un intenso color de tono verde azulado. Se prueba la capacidad de las sustancias antioxidantes en reaccionar con el radical, reduciéndolo, y disminuir el color de la solución. Las longitudes de onda de máxima absorbancia para el ABTS^{•+} son 415nm, 645nm, 734nm y 815nm, siendo las más utilizadas 415 nm y 734 nm (Prior *et al*, 2005). De este modo, la capacidad antioxidante total de la sustancia o extracto en estudio será determinada en función de la disminución en los valores de absorbancia y se expresan en términos de Trolox equivalente. El ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico o Trolox es un reductor estable, similar al antioxidante alfa-tocoferol (Figura 20).

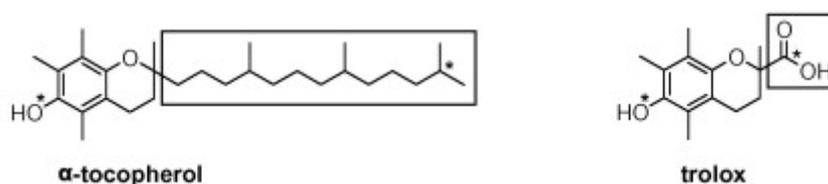


Figura 20: Estructura del alfa-tocoferol comparada con la del Trolox

1.9 Motivación

Habiendo mencionado lo anterior, en este trabajo se estudió la posibilidad de emplear dos extractos naturales (uno de cebolla y otro obtenido de las semillas de palta) en combinación con el tratamiento por APH (600 MPa por 3 min, condiciones que se utilizan comercialmente según Jacobo Velázquez *et al*, 2013) para la preservación del puré de palta envasado al vacío. Cabe aclarar, que, si bien el puré de palta ya se comercializa en otros países empleando la tecnología APH para su preservación, consideramos que la eficacia de la combinación de estrategias de preservación (APH más agregado de extractos de origen natural) a nuestro entender aún no ha sido del todo explorada. Por otro lado, en el presente trabajo también se evaluó una forma de aprovechamiento de los residuos del fruto, siendo que uno de los extractos empleados fue obtenido de las semillas de la palta, contribuyendo a la producción sustentable de alimentos y al desarrollo de procesos amigables con el ambiente.

2. Hipótesis

Se pueden generar extractos naturales ricos en antioxidantes a partir de la cebolla deshidratada y el carozo de palta. Al añadir los mismos al puré de palta en combinación con un tratamiento por Altas Presiones Hidrostáticas, es posible reducir los efectos del deterioro por oxidación del puré almacenado en condiciones de refrigeración.

3. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto consistió en evaluar el efecto del tratamiento por Altas Presiones Hidrostáticas en conjunto con el agregado de extractos naturales sobre la preservación de puré de palta (*Persea americana* Mill. cv. Hass) envasado al vacío. Para ello, se requirió la obtención y caracterización de los extractos naturales a partir de cebolla y de semillas de palta.

La evaluación realizada consistió en determinar el efecto del tratamiento planteado sobre la actividad de enzimas de deterioro, y analizar los parámetros de calidad referidos a las características cromáticas, capacidad antioxidante y contenido de polifenoles del puré de palta durante toda la vida útil del producto tratado y almacenado en condiciones de refrigeración.

4. Diseño experimental

Para lograr el objetivo principal planteado en este trabajo, el diseño experimental se compuso de la preparación y caracterización de 4 grupos de muestras de puré de palta. Los cuales se constituyeron de la siguiente manera:

- CONTROL: puré de palta sin adición de antioxidantes.
- ASCÓRBICO: puré de palta con ácido ascórbico (ASC). Se emplea este compuesto a modo de referencia para comparar los resultados obtenidos por las muestras con extractos naturales.
- CAROZO: puré de palta con extracto de carozos de palta (ECP).
- CEBOLLA: puré de palta con extracto de cebolla en polvo (ECE).

Por cada grupo, se prepararon triplicados (A, B y C), siendo en total 12 muestras independientes de igual peso para todo el set de experimento. Cada una de esas 12 muestras se subdividió a su vez en 4 bolsas de porciones iguales, todas envasadas al vacío, de las cuales 2 se sometieron a tratamiento por APH, y las otras 2, no. Por cada par de muestras se reservó una para abrir y analizar al día 1 y la otra, al día 30, a partir de la fecha de tratamiento de las mismas. En total se generaron 48 bolsas, 12 por cada grupo de muestras, como se detalla en la figura 21.

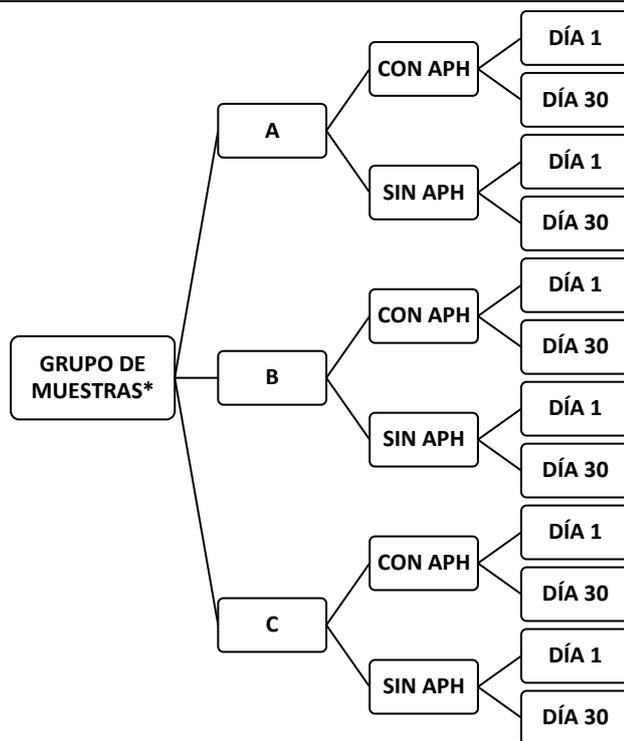


Figura 21: Distribución de las muestras por cada grupo.

*Grupos de muestras: CONTROL, ASCÓRBICO, CAROZO y CEBOLLA.

Debido a la capacidad del equipo utilizado para el tratamiento por APH, las muestras que debían ser sometidas a este proceso fueron distribuidas en 3 corridas del equipo, siendo la corrida 1 para las muestras A de todos los grupos, la corrida 2 para las muestras B y la corrida 3 para las muestras C. En cada una de las corridas se colocaron entonces 8 bolsas de muestras distribuidas de forma aleatoria dentro del cilindro del equipo.

5. Materiales y métodos

Todos los ensayos fueron llevados a cabo en las instalaciones de UADE Labs en la sede Montserrat de Fundación UADE y en el Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA), Centro de Investigación de Agroindustria, de INTA Castelar.

5.1 Obtención y generación de extractos

5.1.1. Preparación sustrato de cebolla en polvo

Para el sustrato de cebolla se decidió utilizar cebolla en polvo, ya que a través de pruebas preliminares se logró establecer que hay una reducción en la complejidad de la preparación en comparación con la utilización de cebollas frescas. La misma fue adquirida en envase herméticamente cerrado, en un comercio en el barrio de Belgrano, C.A.B.A.

5.1.2. Preparación sustrato de carozo de Palta

Para el sustrato de carozo de palta se obtuvieron Paltas (*Persea americana* Mill cv. Hass) en un comercio del barrio Palermo, C.A.B.A. Se separó la pulpa de los carozos, los cuales fueron limpiados manualmente con papel absorbente con el fin de eliminar los remanentes de pulpa. Los carozos se cortaron con cuchillo en 8 piezas regulares de no más de 5 cm de espesor. Luego, se sometieron a un proceso de escaldado en agua a una temperatura de 100°C durante 2 minutos, posteriormente se retiraron del agua, se sumergieron en agua fría con hielo y finalmente fueron secados con papel absorbente. Para reducir su tamaño, las piezas de carozo se molieron en licuadora de uso doméstico (ELECTROLUX Cuisine Silver, Industria China) de manera tal de obtener partículas de un diámetro no mayor a 5 mm.



Figura 22: Carozo de palta sin escaldar (izquierda) y carozo de palta con previo tratamiento de escaldado en agua (derecha).

Debido a las diferencias en el color que pueden observarse en la Figura 22, se definió someter al carozo de palta a un proceso de escaldado con el fin de inactivar las enzimas (principalmente, la polifenoloxidasa) que auto-oxidaban al propio carozo, otorgándole una coloración rojizo/anaranjada (Figura 22, izquierda), indeseada para el producto final.

5.1.3 Generación de extractos

Para ambos casos se pesaron dentro de varios tubos de polipropileno de 50 mL de capacidad con fondo cónico 5 g. de muestra en balanza analítica y se mezclaron con 10 g. de solvente (relación muestra-solvente 1:2). Las extracciones se hicieron con agua bidestilada como solvente en la mitad de los tubos, mientras que en el resto se usó una solución 1:1 agua-etanol (ver Tabla VIII).

Para lograr una mejor extracción, los tubos pasaron por una agitación en vórtex durante 1 minuto y luego se introdujeron en un baño ultrasónico (Testlab Ultrasonic Cleaner Modelo tb 010, Industria Argentina) con hielo y agua fría (para evitar un elevado aumento de la temperatura). Se sonicaron a máxima potencia (325 Watts) estableciendo dos tiempos de sonicado: 20 minutos y 40 minutos, manteniendo la temperatura del baño a 5°C (ver Tabla VIII).

A continuación, se centrifugaron los tubos a 5000 rpm (centrífuga PRESVAC, modelo DCS-16-RV Line-Running, Industria Argentina), durante 10 minutos a una temperatura de 20°C.

El sobrenadante resultante en los tubos se recolectó y se filtró en vacío, empleando papel de filtro Whatman banda negra.

Finalmente, el líquido obtenido del filtrado se reservó, para su posterior análisis, en condiciones de refrigeración dentro de tubos de polipropileno de 50 mL de capacidad con fondo cónico (Figura 23).

Tabla VIII: Resumen de los ensayos realizados para la obtención de extractos

CEBOLLA EN POLVO		
Muestra	Solvente	Tiempo en Sonicador (min)
5 g.	10 g. H ₂ O	20
5 g.	10 g. H ₂ O	40
5 g.	10 g. Sn. 1:1 H ₂ O:EtOH	20
5 g.	10 g. Sn. 1:1 H ₂ O:EtOH	40
CAROZO DE PALTA MOLIDO		
Muestra	Solvente	Tiempo en Sonicador (min)
5 g.	10 g. H ₂ O	20
5 g.	10 g. H ₂ O	40
5 g.	10 g. Sn. 1:1 H ₂ O:EtOH	20
5 g.	10 g. Sn. 1:1 H ₂ O:EtOH	40

Luego de realizar los extractos según los diferentes parámetros, se realizó la prueba de Folin-Ciocalteu (ver sección 5.2.1) para determinar la cantidad de polifenoles totales (PT), y la prueba de ABTS (ver sección 5.2.2) para determinar la capacidad antioxidante (CA) en cada extracto generado, a modo de elegir un método de extracción. Si bien se esperaba que un mayor tiempo de extracción y un solvente de solución etanólica fueran más eficaces, se decidió hacer una valoración de los datos obtenidos con el fin de elegir el método de extracción más conveniente. Para ello se calculó un porcentaje de diferencia, el cual se obtuvo de la siguiente manera: por un lado, para comparar la eficiencia de un solvente respecto a otro, a un mismo tiempo de sonicación, se tomó como referencia el agua (ecuación 2 para extracción de polifenoles totales y ecuación 3 para capacidad antioxidante); mientras que para comparar los distintos tiempos de sonicación, se tomó como referencia el tiempo más bajo, 20 minutos (ecuación 4 para extracción de polifenoles totales y ecuación 5 para capacidad antioxidante). Estas ecuaciones se aplicaron para cada matriz de extracción: carozo de palta y cebolla en polvo (resultados en sección 6.1).

$$\% \text{ de diferencia}_{\text{solvente}} = \frac{PT_{\text{agua:etanol}} - PT_{\text{agua}}}{PT_{\text{agua}}} \times 100 \quad (2)$$

$$\% \text{ de diferencia}_{\text{solvente}} = \frac{CA_{\text{agua:etanol}} - CA_{\text{agua}}}{CA_{\text{agua}}} \times 100 \quad (3)$$

$$\% \text{ de diferencia}_{\text{tiempo}} = \frac{PT_{40 \text{ minutos}} - PT_{20 \text{ minutos}}}{PT_{20 \text{ minutos}}} \times 100 \quad (4)$$

$$\% \text{ de diferencia}_{\text{tiempo}} = \frac{CA_{40 \text{ minutos}} - CA_{20 \text{ minutos}}}{CA_{20 \text{ minutos}}} \times 100 \quad (5)$$

Finalmente, el método de extracción seleccionado para llevar a cabo las sucesivas determinaciones fue el de 20 minutos de baño de ultrasonido con agua como solvente.

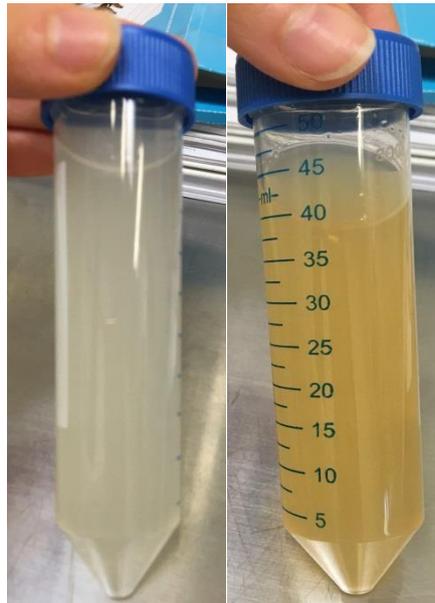


Figura 23: Extracto de carozo de palta (izquierda) y extracto de cebolla (derecha) contenidos dentro de tubos de polipropileno de 50 mL.

En la figura 23 pueden observarse los extractos obtenidos luego del proceso de centrifugación y posterior filtrado. En apariencia ambos extractos son líquidos turbios y opacos, siendo el extracto de carozo de palta (izquierda) el menos intenso en cuanto al color.

Esto es en parte debido al color natural del carozo conservado por el escaldado previo al que se lo debió someter para lograr la inactivación de las enzimas oxidativas.

5.2 Caracterización de extractos

5.2.1 Cuantificación de polifenoles totales a través del método de Folin-Ciocalteu

La determinación de polifenoles de los extractos mencionados anteriormente se realizó por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), empleando en este caso una alícuota de 250 μ l de extracto. Se mezclaron dentro de cubetas de cuarzo 250 μ l de los extractos con 500 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich); 250 μ l de una solución de carbonato de sodio al 20% en hidróxido de sodio 0,1 N; y 100 μ l de agua destilada. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado para cada uno de los extractos mencionados en la Tabla VIII, agitando manualmente cada una de las cubetas con el fin de impedir la formación de burbujas de aire que pudiesen interferir con la medición.

Luego se dejaron incubar durante 30 minutos a 25° C en la oscuridad, y se procedió con la medición de absorbancia de cada una de las cubetas en espectrofotómetro (modelo UV-1203, Shimadzu Corporation, Japón), a una longitud de onda de 765 nm.

Para la preparación de las soluciones de calibración de ácido gálico se realizó en primera instancia una solución madre de 500 mg/L, pesándose 0,0125 g de gálico en 25 mL de agua dentro de matraz aforado de 25 mL. A partir de esta disolución se prepararon disoluciones de 1 mL con concentraciones crecientes de ácido gálico entre 0 y 450 ppm, según se detalla en la Tabla IX.

Para llevar a cabo estas disoluciones se añadió dentro de cada cubeta de cuarzo una cantidad correspondiente de agua destilada y otra de ácido gálico.

Tabla IX. Preparación de la curva patrón de ácido gálico a partir de una disolución concentrada de 500 mg/L.

	Concentración (mg/L) de la curva patrón de ácido gálico											
Reactivos	0	5	10	20	25	50	100	200	250	300	400	450
Sn madre (µL)	0	10	20	40	50	100	200	400	500	600	800	900
Agua (µL)	1000	990	980	960	950	900	800	600	500	400	200	100

Posteriormente, se tomaron 150 µl de cada disolución patrón de ácido gálico y se colocaron en cubetas de cuarzo donde se añadieron 250 µl del reactivo Folin, 250 µl de la solución de carbonato de sodio y 1550 µl de agua destilada. Las preparaciones se efectuaron por triplicado y se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos. Finalmente, se procedió con la medición de absorbancia de cada una de las cubetas, a una longitud de onda de 765 nm.

A partir de los valores de absorbancia obtenidos de cada concentración de ácido gálico se construyó la correspondiente curva de calibración (ver Figura 24), obteniendo un $R^2=0,9839$ y la siguiente ecuación:

$$Y = 0,0025x - 0,0139 \quad (6)$$

Esto permitió determinar posteriormente el contenido de polifenoles totales de los extractos en cuestión (ver resultados en la sección 6.1).

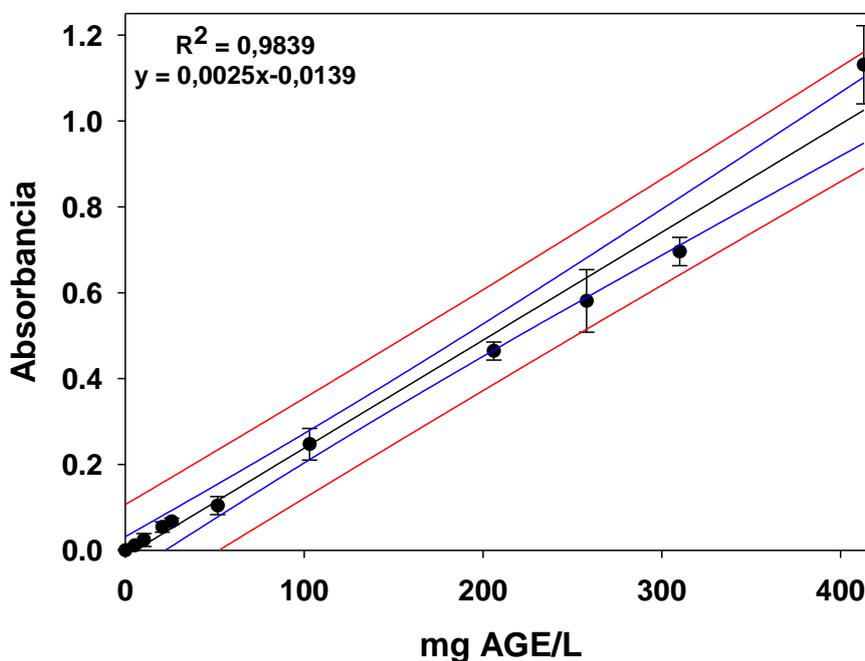


Figura 24: Curva de calibración para la obtención de la relación entre la absorbancia medida y la cantidad de ácido gálico equivalente por litro de extracto (mg AGE/L).

5.2.2 Determinación de capacidad antioxidante por el método ABTS

Para medir la capacidad antioxidante de los extractos descritos en la Tabla VIII, se llevó a cabo la reacción del radical ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)), según la metodología desarrollada por Re *et al* (1999) con modificaciones de Kuskoski *et al* (2004).

En primer lugar, se preparó una solución de ABTS 7 mM (solución madre) a la que se le agregó el persulfato de potasio (Sigma-Aldrich), de modo que la concentración final de la sal fuese de 2,45 mM. Se dejó la solución durante 16 horas en la oscuridad para que desarrolle el radical correspondiente. Se obtuvo una solución azul-verdosa muy intensa que fue diluida con buffer PBS 0,01M (pH 7,4) en matraz de 250 mL, hasta alcanzar una absorbancia entre 0,700 y 1 a 734 nm medida en espectrofotómetro (modelo UV-1203, Shimadzu Corporation, Japón).

Por otro lado, dado que la capacidad antioxidante de los compuestos se calcula en relación con la reactividad del reactivo denominado Trolox (Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-

tetrametilcroman-2-carboxílico), como estándar antioxidante, se prepararon bajo las mismas condiciones soluciones de Trolox (grado HPLC, marca Fluka) a distintas concentraciones a partir de una solución madre de 4mM (1 mg/ml). Para ello, se pesaron 25 mg de Trolox diluido en etanol absoluto, llevando el contenido a 25 mL con agua destilada en matraz aforado. A dichas soluciones de Trolox se les adicionó una cantidad constante de la solución madre de ABTS preparada anteriormente (ABTS, Sigma-Adrich), obteniendo así una curva de calibración. Se realizaron en todos los casos blancos sin adición de ABTS.

En la Tabla X se detallan las diluciones realizadas para la generación de la curva estándar de calibración.

Tabla X: Valores tomados para la curva estándar de calibración de Trolox.

Matraz	Trolox (mg/mL)	Vol de Sn madre (mL)	Vol de agua (mL)
0	0	0	10,0
1	0,02	0,200	9,80
2	0,04	0,400	9,60
3	0,06	0,600	9,40
4	0,08	0,800	9,20
5	0,10	1,000	9,00
6	0,12	1,200	8,80
7	0,15	1,500	8,50
8	0,17	1,700	8,30

En el caso de los extractos, cada uno de ellos se diluyó en 10 mL de etanol absoluto. Luego se tomaron alícuotas de 10 µl de cada solución y colocándose dentro de cubetas de cuarzo se les añadieron 1,9 mL de la solución madre de ABTS. Se dejaron reposar las muestras 30 minutos (cada una de ellas por triplicado) y se procedió a la medición de absorbancia a una longitud de onda de 734 nm.

A partir de los valores de absorbancia obtenidos, se calcularon los porcentajes de disminución de la absorbancia de las diluciones respecto del blanco (cuyo valor de

absorbancia fue en promedio 0,945). Con estos valores se construyó la curva de calibración correspondiente (ver Figura 25), obteniendo un $R^2=0,9979$ y cuya ecuación fue:

$$Y = 541,58x + 1,1787 \quad (7)$$

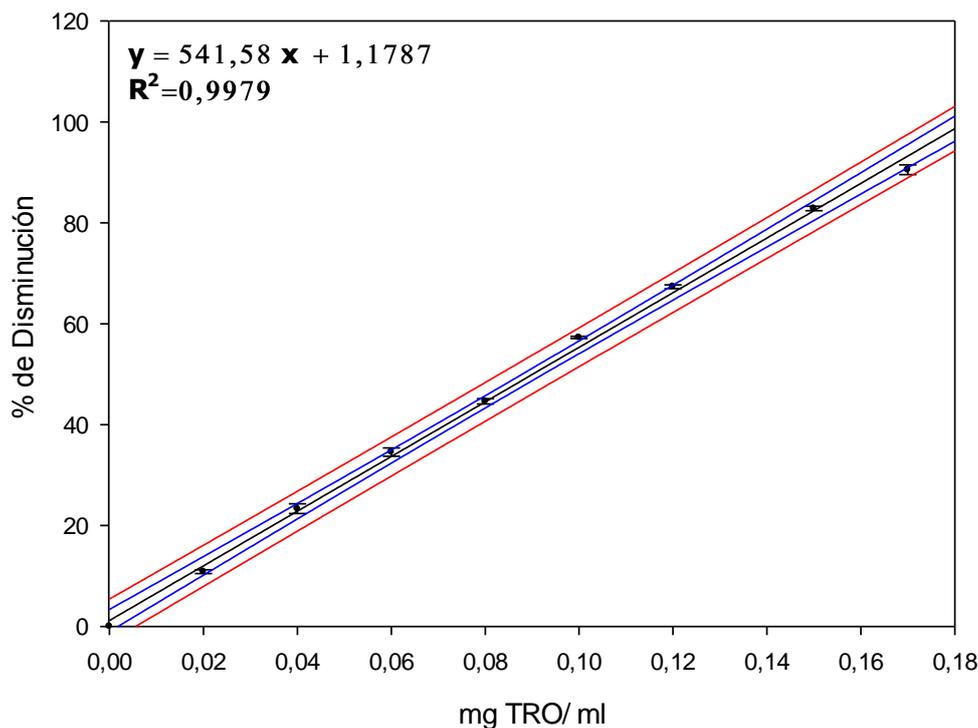


Figura 25: Curva de calibración para la obtención de la relación entre el porcentaje de disminución de absorbancia respecto del blanco y la cantidad del reactivo *Trolox* equivalente por mililitro de extracto (mg TRO/ml).

5.3 Preparación de muestras de puré de palta

En primer lugar, para la obtención del puré de palta se procedió a cortar las paltas con cuchillo por la mitad, retirando el carozo (el cual es utilizado para la generación del extracto) y la pulpa con una cuchara, vertiéndola en un recipiente de polipropileno. La pulpa obtenida fue tratada con prensador manual de uso doméstico hasta lograr un puré homogéneo.

Posteriormente, el puré obtenido fue fraccionado en porciones iguales y pesado en balanza analítica dentro de vasos de precipitados de 500 mL de capacidad y se lo acidificó siguiendo la siguiente proporción: cada 100 g de puré de palta, se adicionó 1 mL de ácido

cítrico (AC) en solución 0,54 % p/p (Biopack, grado alimenticio), de modo que el pH de la mezcla final en todos los vasos fuera de 4,5. Luego, a partir de la mezcla de puré acidificado se prepararon por triplicado los grupos de muestras para análisis, respetando las proporciones indicadas en la Tabla XI:

Tabla XI: Proporciones utilizadas en la preparación de las muestras de puré de palta

Componentes Grupos de Muestras	PURÉ	AC ¹ (0,54%)	ASC ²	ECP ³	ECE ⁴	H ₂ O	TOTAL
ASCÓRBICO	100 g	1g	20 mg	-	-	15 g	116 g
CAROZO	100 g	1g	-	15 g*	-	-	116 g
CEBOLLA	100 g	1g	-	-	15 g*	-	116 g
CONTROL	100 g	1g				15 g	116 g

¹Ácido Cítrico. ²Ácido Ascórbico. ³Extracto de Carozo de Palta. ⁴Extracto de Cebolla Deshidratada.

*esta cantidad fue determinada como la mayor cantidad de extracto que se puede aplicar al puré sin ver alterada la apariencia y consistencia del mismo (ver Figura 26).

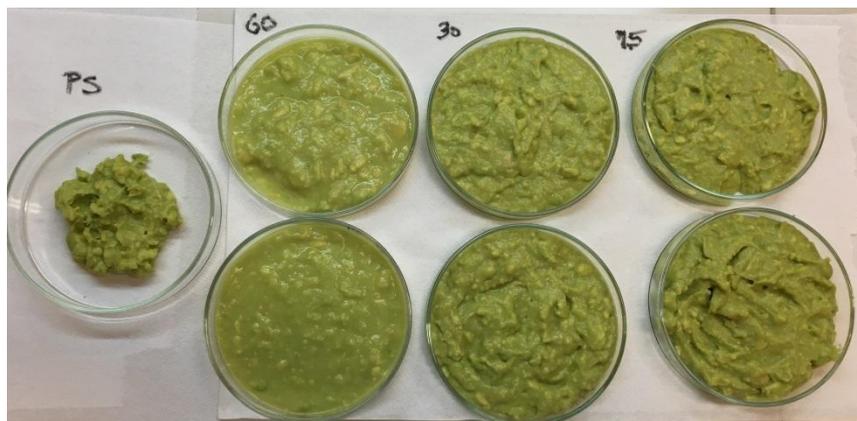


Figura 26: Muestras de puré de palta sin extracto (placa izquierda) y con adición de 60, 30 y 15 g respectivamente de los extractos de cebolla (placas superior) y de carozo de palta (placas inferior).

Para poder definir la cantidad de extracto a aplicar sobre la muestra, se evaluaron tres volúmenes posibles: 60, 30 y 15 g. Para lograr una mejor conservación del puré, se buscó aplicar la mayor cantidad de extracto posible sin alterar sus características organolépticas. En la Figura 26 se observa cómo estos volúmenes añadidos sobre el puré de palta afectan tanto a la consistencia como apariencia del producto final.

5.3.1 Caracterización reológica del puré de palta

Además de evaluar la consistencia y apariencia del puré con agregado de extractos, se decidió realizar una caracterización reológica del mismo. Para esto se llevaron a cabo 3 mediciones independientes en un viscosímetro Brookfield (modelo RVDV-E). Según lo establecido por Mitschka (1982) y con el promedio de las 3 mediciones se elaboraron gráficas de $\log(\tau)$ vs $\log(N)$, para el puré de palta sólo y el puré de palta con agregado de 15 mL de extracto respectivamente.

5.3.2 Tratamiento de las muestras de puré de palta.

Los triplicados preparados de cada una de las muestras, según se indica en la sección 5.3, se fraccionaron en 4 porciones de 50 g. que fueron colocadas en bolsas Cryovac BB2620 (tasa de transmisión de O_2 6-14 cc/m²/24 hs a 22-24°C y a 0 % HR). Todas las bolsas con puré se envasaron al vacío con envasadora de doble campana marca Rapivac mod. Máximax800 (Bs As, Argentina).

La mitad de las bolsas de cada uno de los grupos de muestras fueron tratadas por APH en un equipo marca Stansted Fluid Power Ltd. modelo Iso-Lab FPG9400:922 (Stansted, Reino Unido, volumen del cilindro para las muestras de 2 L, presión máxima de operación de 900 MPa, y rango de temperatura de trabajo entre -20 y 120°C) disponible en el Instituto Tecnología de Alimentos (ITA), CIA, INTA Castelar. La figura 27 muestra un esquema del equipo utilizado.

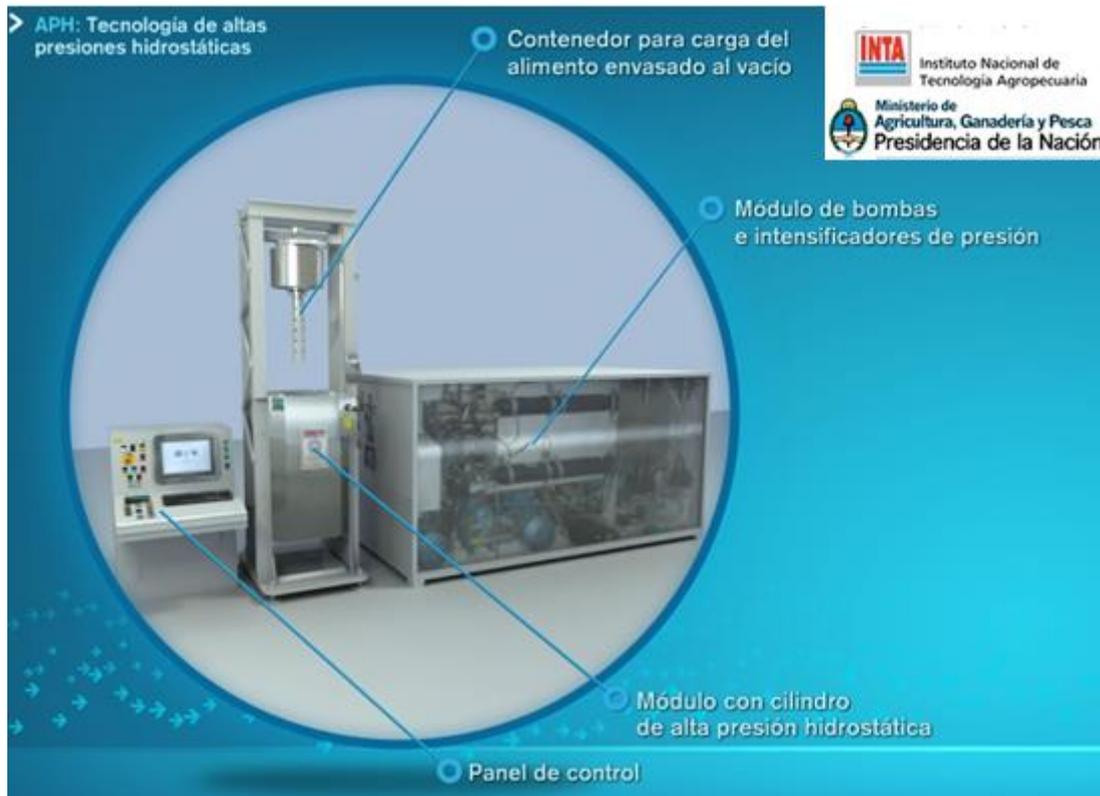


Figura 27: Esquema del equipo de APH marca Stansted Fluid Power Ltd. modelo Iso-Lab FPG9400:922, del ITA en INTA Castelar. Imagen extraída de <https://inta.gob.ar/documentos/altas-presiones-hidrostaticas-aph>

Las bolsas restantes no fueron tratadas mediante APH y se conservaron en heladera a 4°C, como control del proceso. Se establecieron como tiempos de análisis los días 1 y 30, a partir de la fecha de tratamiento con APH de las mismas (Bustos *et al*, 2014). Una vez establecidos estos parámetros se procesaron las muestras, cuya distribución se detalla en la Tabla XII.

Tabla XII: Distribución de las muestras

	ASCÓRBICO	CAROZO	CEBOLLA	CONTROL
DÍA 1 S/APH	A	A	A	A
	B	B	B	B
	C	C	C	C
DÍA 30 S/APH	A	A	A	A
	B	B	B	B
	C	C	C	C
DÍA 1 C/APH	A	A	A	A
	B	B	B	B
	C	C	C	C
DÍA 30 C/APH	A	A	A	A
	B	B	B	B
	C	C	C	C

Aquellas muestras que se sometieron a un tratamiento por APH, lo hicieron a un nivel de presión de 600 MPa, durante un tiempo de mantenimiento de 3 minutos, empleando como líquido de transmisión de la presión una mezcla de agua y propilenglicol (70:30). Para tratar todas las muestras en estudio, se llevaron a cabo 3 corridas en el equipo de APH. En cada corrida, el equipo arroja las curvas correspondientes a Presión (MPa) y Temperatura (°C) alcanzadas dentro del cilindro, en función del tiempo (min). Ver Figuras 28, 29 y 30. En la corrida 1 fueron procesadas todas las muestras A, en la corrida 2, las muestras B, y en la corrida 3, las C.

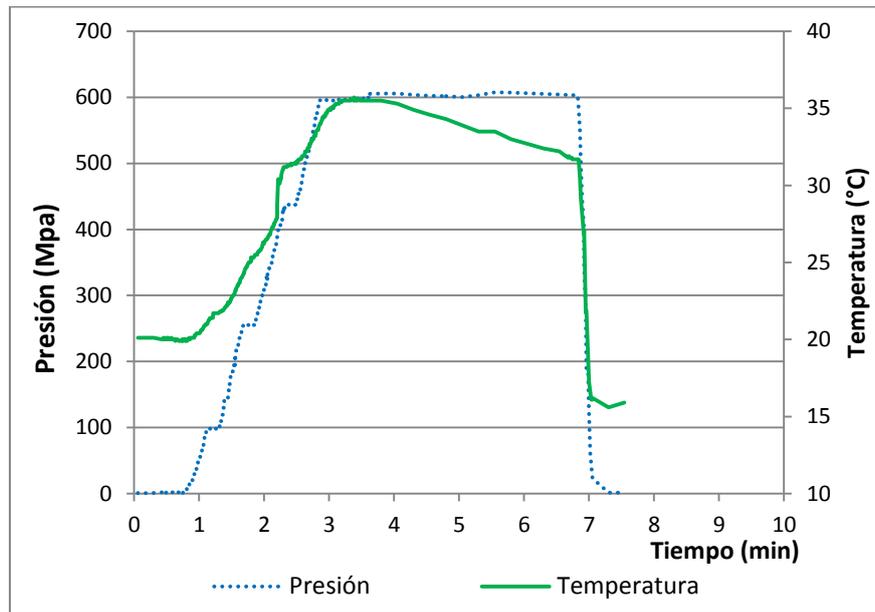


Figura 28: Curvas de Presión y Temperatura de Corrida 1

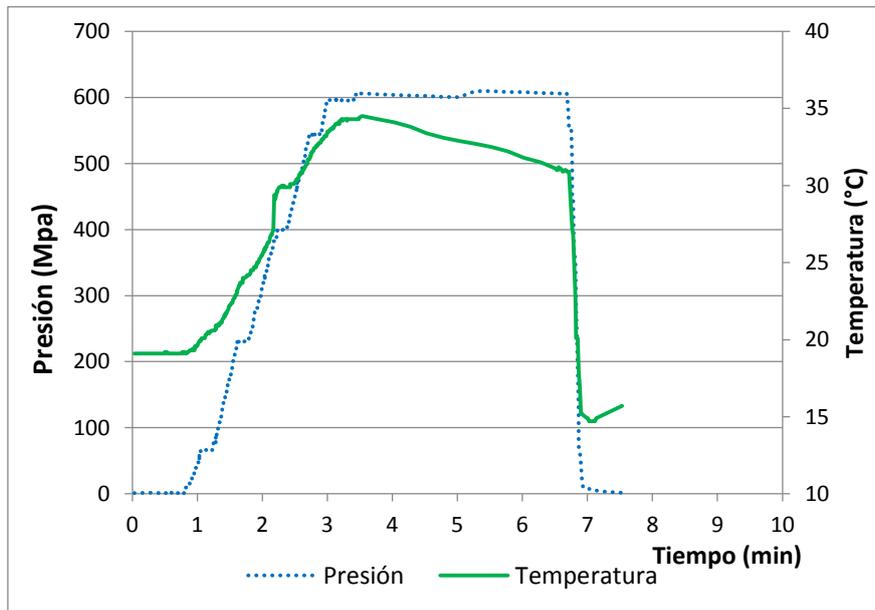


Figura 29: Curvas de Presión y Temperatura de Corrida 2

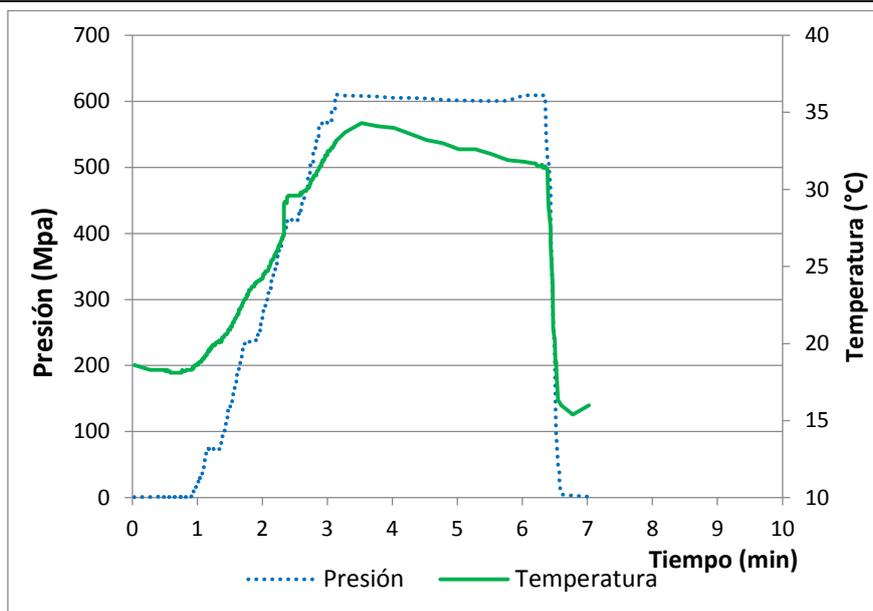


Figura 30: Curvas de Presión y Temperatura de Corrida 3

Para alcanzar la presión deseada dentro del cilindro (600 MPa), el equipó necesitó de 3,4 minutos en promedio; mientras que, para descender la presión hasta igualar a la atmosférica, requirió de 0,7 minutos en promedio.

La temperatura inicial fue la temperatura del ambiente, la cual sólo se modificó por el calentamiento debido a la presión (aproximadamente 2,5°C cada 100 MPa en este caso). Los valores de temperatura y sus variaciones para cada una de las corridas se detallan en la Tabla XIII.

Tabla XIII: Valores de Temperatura y sus variaciones para las corridas 1, 2 y 3 realizadas en el equipo APH.

	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3
T inicial (°C)	19,6	19,6	19,6
T máx. (°C)	35,7	34,5	34,3
Variación T (°C)	16,1	14,9	14,7

Una vez finalizado el tratamiento por APH, se retiró el cilindro para sacar las muestras del equipo y se limpiaron exteriormente con papel absorbente. Las muestras así extraídas se conservaron en heladera (4°C) hasta su análisis.

5.4 Caracterización del puré de palta

Para llevar a cabo los diferentes análisis de caracterización, en primer lugar, se debieron generar extractos de las muestras de puré de palta (ver Tabla XII).

Tanto para la cuantificación de polifenoles totales (por el método Folin-Ciocalteu) como para la determinación de la capacidad antioxidante (según ensayo ABTS), se pesaron 6 g. de cada una de las muestras de puré dentro de frascos de color caramelo, usando como solvente 15 mL de una mezcla de agua:metanol (1:4). Las muestras así obtenidas se sonicaron durante 40 minutos a una temperatura de 20 °C. Se definió utilizar esta mezcla de solventes para obtener una mejor extracción debido al elevado contenido lipídico de la palta y un sonicado de 40 minutos por la complejidad de la matriz del alimento.

Por último, se procedió a centrifugar el contenido en tubos de polipropileno de 50 mL de capacidad con fondo cónico, a 5000 rpm durante 10 minutos y a una temperatura de 20 °C. Los sobrenadantes obtenidos, se utilizaron luego para realizar los análisis correspondientes (5.4.1 y 5.4.2).

5.4.1 Cuantificación de polifenoles totales

Para la cuantificación de polifenoles totales, se procedió del mismo modo que con los extractos, mediante el método de Folin-Ciocalteu, ver sección 5.2.1.

5.4.2 Determinación de la capacidad antioxidante

Para la determinación de la capacidad antioxidante, se procedió del mismo modo que con los extractos, mediante la reacción del radical ABTS, ver sección 5.2.2.

5.4.3 Medición de características cromáticas

Para poder medir los cambios de color en los purés de palta, los mismos fueron fotografiados y las imágenes obtenidas se analizaron mediante el programa ImageJ, según lo establecido por Bustos *et al*, 2014. Para ello, se colocó una porción de cada una de las muestras en un recipiente plástico transparente y dichos recipientes se acomodaron sobre un

fondo de color blanco, dentro de una cámara gris estandarizada (N7 en el sistema de color Munsell). Se utilizó un iluminante estándar D65. Las imágenes se tomaron con una cámara digital de alta resolución (10.1 mega pixel), una EOS 40D (Canon Inc., Japón), con una macro lente EF-S 60 mm f2.8 (Canon Inc., Japón), al día 1 y día 30 de almacenamiento a una temperatura de 4 °C.

De cada fotografía se seleccionó un área de 70200 pixeles para poder analizar los valores medios de las coordenadas CIELAB (L^* (luminosidad), a^* (coordenada verde-roja), b^* (coordenada azul-amarilla)) y la función ΔE (diferencia de color total, incluyendo luminosidad) detallada en la ecuación 8.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})} \quad (8)$$

5.5 Análisis estadístico

Los resultados de caracterización de puré de palta fueron presentados como promedios de los triplicados con sus desvíos estándar. Para llevar a cabo el análisis estadístico de estos datos, se realizó una prueba Test-t con un nivel de significancia $P < 0.05$, utilizando el programa Sigma Plot versión 12.0.

6. Resultados

6.1 Generación de extractos: Elección del método de extracción

A partir de las muestras de extractos generadas según la Tabla VIII, se realizaron las determinaciones de polifenoles totales (método Folin-Ciocalteu) y de capacidad antioxidante (método ABTS), como se describe en la sección 5.2. Los resultados obtenidos para los extractos de cebolla y carozo de palta se detallan en las Tablas XIV y XV respectivamente.

Tabla XIV: Resultados obtenidos en los ensayos de Folin-Ciocalteu y ABTS para los diferentes métodos de extracción del ECE

Solvente de extracción.	Polifenoles Totales Folin-Ciocalteu (mg equivalentes de ácido gálico/mL de extracto de cebolla).		Capacidad antioxidante: ABTS (mg de TROLOX equivalentes/mL de extracto de cebolla).	
	Tiempo de sonicado			
	20 min.	40 min.	20 min.	40 min.
Agua	0,08 ± 0,02	0,12 ± 0,01	6,1 ± 0,7	7,5 ± 2
Agua:Etanol	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,04	6,1 ± 0,6	7,8 ± 1

Tabla XV: Resultados obtenidos en los ensayos de Folin-Ciocalteu y ABTS para los diferentes métodos de extracción del ECP

Solvente de extracción.	Polifenoles Totales Folin-Ciocalteu (mg equivalentes de ácido gálico/mL de extracto de carozo de palta).		Capacidad antioxidante: ABTS (mg de TROLOX equivalentes/mL de extracto de carozo de palta).	
	Tiempo de sonicado			
	20 min.	40 min.	20 min.	40 min.
Agua	0,19 ± 0,005	0,22 ± 0,02	8,0 ± 0,01	11 ± 2
Agua:Etanol	0,28 ± 0,03	0,29 ± 0,03	14 ± 0,3	15 ± 0,3

Con los resultados de las tablas XIV y XV y las ecuaciones 2, 3, 4 y 5 de la sección 5.1.3, se calcularon los porcentajes de diferencia entre los diferentes tiempos de sonicado y los solventes propuestos. Los mismos se detallan en las tablas XVI y XVII, para cada método de análisis.

Tabla XVI: Porcentajes de diferencia en el contenido de polifenoles totales para los parámetros de extracción evaluados (tiempo de sonicado y solvente) en ECE y ECP

Parámetros evaluados		% dif. ECE	% dif. ECP
20'	Agua	101%	48,6%
	Agua:Etanol		
40'	Agua	34,3%	35,5%
	Agua:Etanol		
Agua	20'	52,6%	16,8%
	40'		
Agua:Etanol	20'	1,82%	6,44%
	40'		

Tabla XVII: Porcentajes de diferencia en la capacidad antioxidante para los parámetros de extracción evaluados (tiempo de sonicado y solvente) en ECE y ECP

Parámetros evaluados		% dif. ECE	% dif. ECP
20'	Agua	0,64 %	76,3 %
	Agua:etanol		
40'	Agua	2,85 %	41,1 %
	Agua:etanol		
Agua	20'	23,7 %	37,3 %
	40'		
Agua:etanol	20'	26,5 %	9,88 %
	40'		

A partir de esta comparación puede observarse que, tal como se esperaba, con un mayor tiempo de sonicación y empleando solución etanólica como solvente, se logran extracciones más eficientes. A pesar de ello, duplicando los tiempos de sonicado no se alcanza a duplicar el rendimiento de las extracciones, mientras que utilizando la solución agua:etanol sólo se duplica el rendimiento en la extracción de polifenoles de la cebolla con 20 minutos de sonicado.

Por lo mencionado, se eligió proceder con la extracción de menor duración, debido a que a fines prácticos no se justificó duplicar los tiempos del proceso para obtener una mayor extracción de polifenoles y antioxidantes; y si bien hubo una mejoría, se puede inferir que aumentar el tiempo de sonicación podría generar una descomposición química de los compuestos antioxidantes, reduciendo gradualmente la eficiencia de la misma. Respecto a la utilización del solvente, a pesar de que la solución con etanol resultó más efectiva en todas las extracciones, las diferencias encontradas tanto para los métodos de análisis como para las matrices en estudio, resultaron muy dispersas entre sí, por lo que se decidió utilizar el solvente más simple y económico, es decir, agua.

6.2 Caracterización de los extractos

Luego de haber definido el método de extracción, tal como se detalla en la sección 6.1, se procedió a comparar los resultados obtenidos a través de los análisis descriptos en la sección 5.2, con el fin de evaluar la riqueza antioxidante de los extractos elegidos y generados.

Tabla XVIII: Comparación entre ECE y ECP, respecto de la cantidad de polifenoles totales y capacidad antioxidante.

	Polifenoles Totales: Folin-Ciocalteu (mg equivalentes de ácido gálico/mL de extracto).	Capacidad antioxidante: ABTS (mg de TROLOX equivalentes/mL de extracto).
ECE¹	0,08 ± 0,02	6,1 ± 0,7
ECP²	0,19 ± 0,005	8,0 ± 0,01

¹Extracto de Cebolla Deshidratada. ²Extracto de Carozo de Palta.

En la tabla XVIII se observa que el ECP cuenta con una mayor riqueza antioxidante que el ECE, por lo que se espera que tenga un mejor desempeño en la conservación del puré de palta tratado.

6.3 Caracterización de puré de palta

6.3.1 Caracterización reológica

En las figuras 31 y 32, donde se observan las curvas $\log(\tau)$ vs $\log(N)$ para el puré de palta sin adición de extractos y el puré de palta con 15 g de extracto, se obtuvieron para ambos casos buenas relaciones lineales, con un valor de R^2 de 0,99 y de 0,98 respectivamente, por lo que puede afirmarse que ambas muestras se ajustan bien al modelo de Ostwald (Ley de la Potencia) donde la pendiente de la curva representa el índice de consistencia (n).

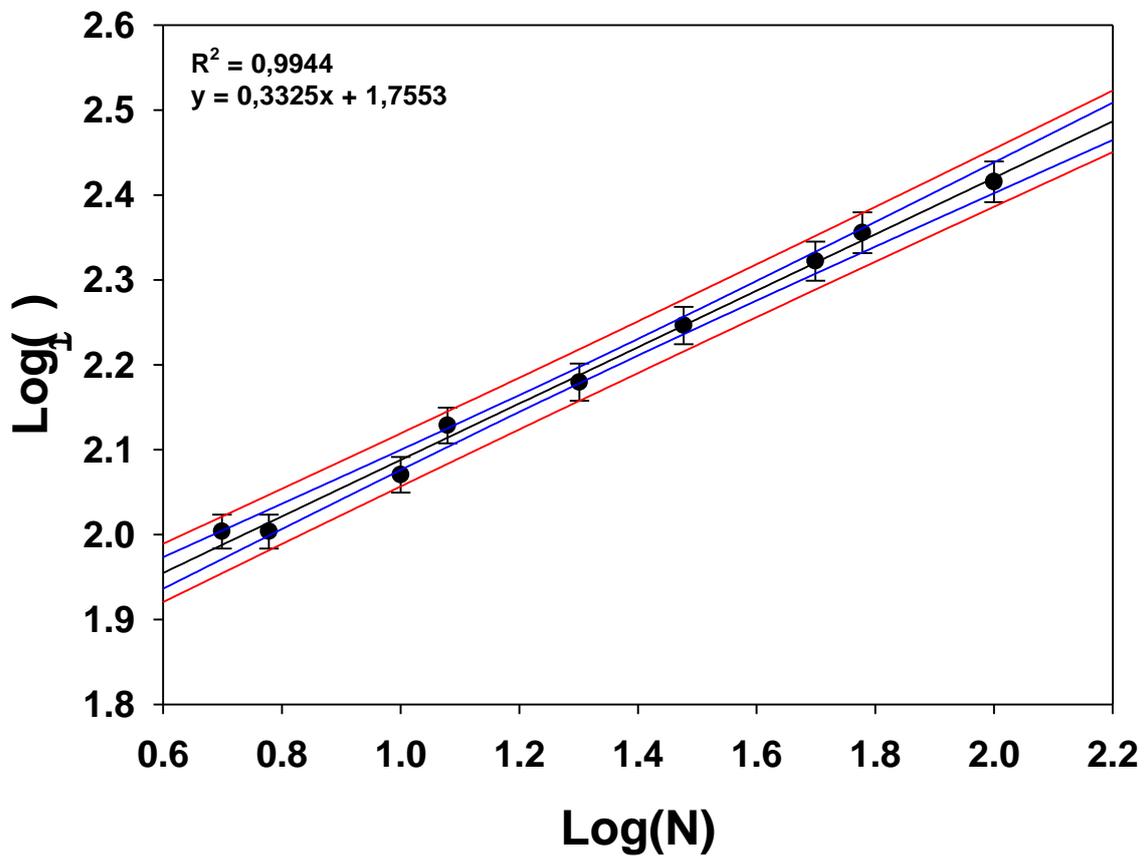


Figura 31: Curva $\log(\tau)$ vs $\log(N)$ del puré de palta sin agregado de extractos

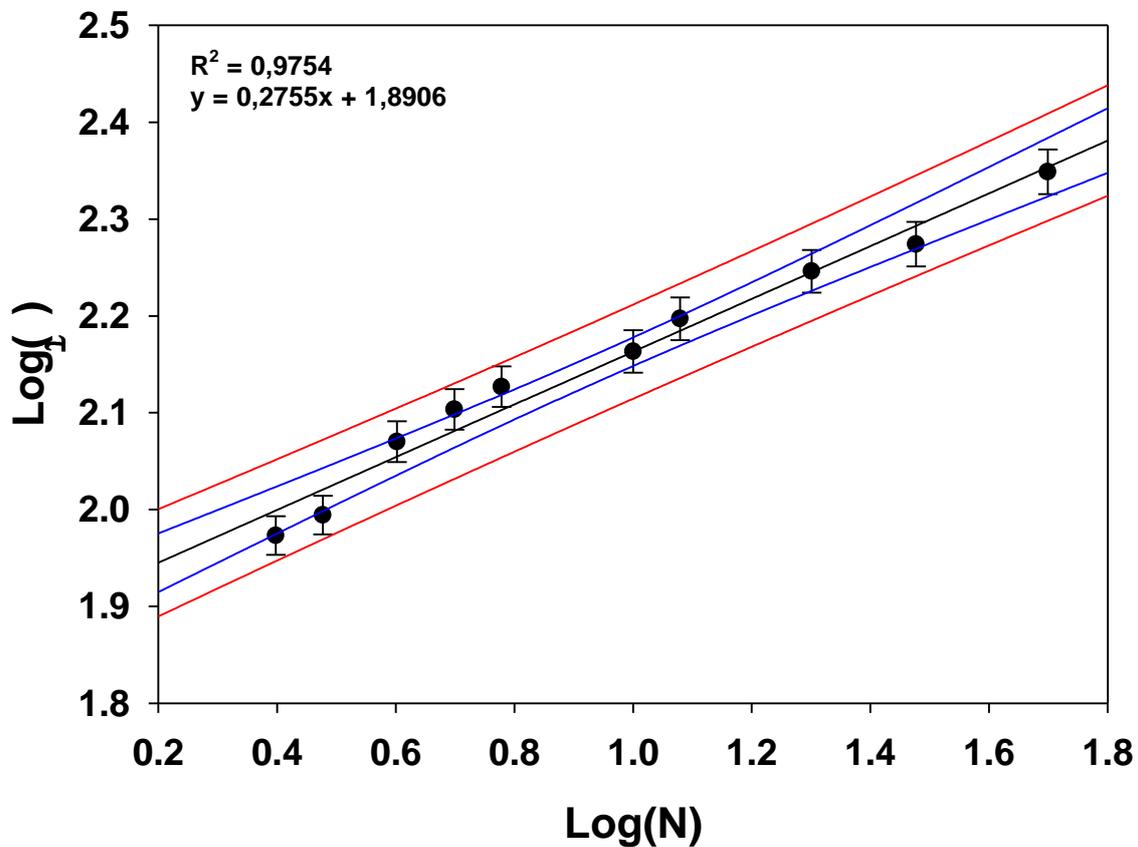


Figura 32: Curva $\log(\tau)$ vs $\log(N)$ del puré de palta con agregado de 15 mL de extracto

Se obtuvieron valores de $n=0,33$ para el puré de palta sólo y $n=0,28$ para el puré de palta con agregado de extracto. Dado que en ambos casos $n < 1$, se puede establecer que las muestras responden a un modelo de fluido de tipo pseudoplástico.

Luego de analizar los resultados obtenidos se decidió utilizar la menor cantidad aplicada, 15 g de extracto. De esta forma, la concentración final de polifenoles en el puré de palta (mg AGE/g de puré), agregados por la adición de los extractos, resulta equivalente a la informada por Bustos *et al* (2015) para evitar el pardeamiento del puré de palta, mediante el uso de extractos del género *Allium* hasta 30 días de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración.

6.3.2 Cuantificación de polifenoles totales

Mediante el método de Folin-Ciocalteu se logró determinar el contenido de polifenoles totales de las distintas muestras de puré de palta, generadas según Tabla XI. Los resultados obtenidos para las muestras con tratamiento por APH se presentan en la Figura 33 y para las de sin tratamiento por APH, en la Figura 34. A su vez, estos fueron sometidos a un análisis estadístico por Test-t con un nivel de significancia de $p < 0,05$ para identificar diferencias en los contenidos de polifenoles de las muestras a lo largo del tiempo de almacenamiento.

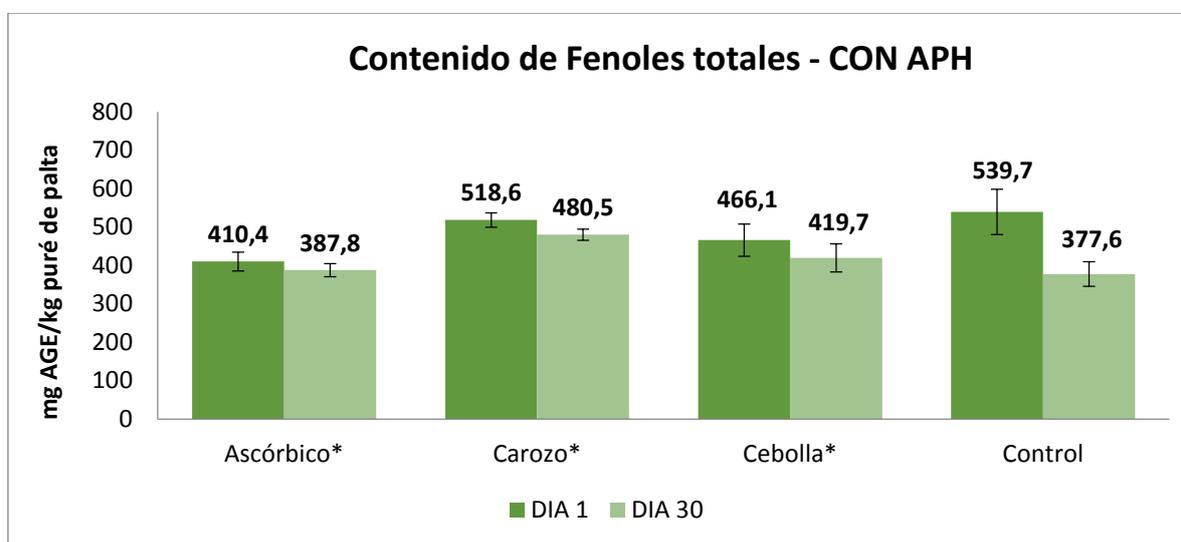


Figura 33: Contenido de polifenoles totales en las distintas muestras con APH.

* las muestras señaladas no difieren significativamente ($p < 0,05$) en su contenido de polifenoles entre día 1 y día 30.

Como se puede observar en la figura 33, al día 1, todas las muestras difieren en la cantidad inicial de polifenoles, siendo la muestra control la que presentó el mayor contenido, mientras que al día 30 de almacenamiento en heladera a una temperatura de 4°C la muestra con ECP es la que se destacó por tener el mayor contenido de polifenoles, siendo casi un 30% mayor que la muestra con cítrico, ésta última alcanzando el menor contenido frente al resto de las muestras estudiadas. A través del análisis estadístico realizado, se logró determinar que la muestra Control fue la única que presentó diferencias significativas en el contenido de

polifenoles totales entre el día 1 y día 30 de almacenamiento. Mientras que para las muestras con Ascórbico, ECP y ECE no puede establecerse que existan diferencias significativas.

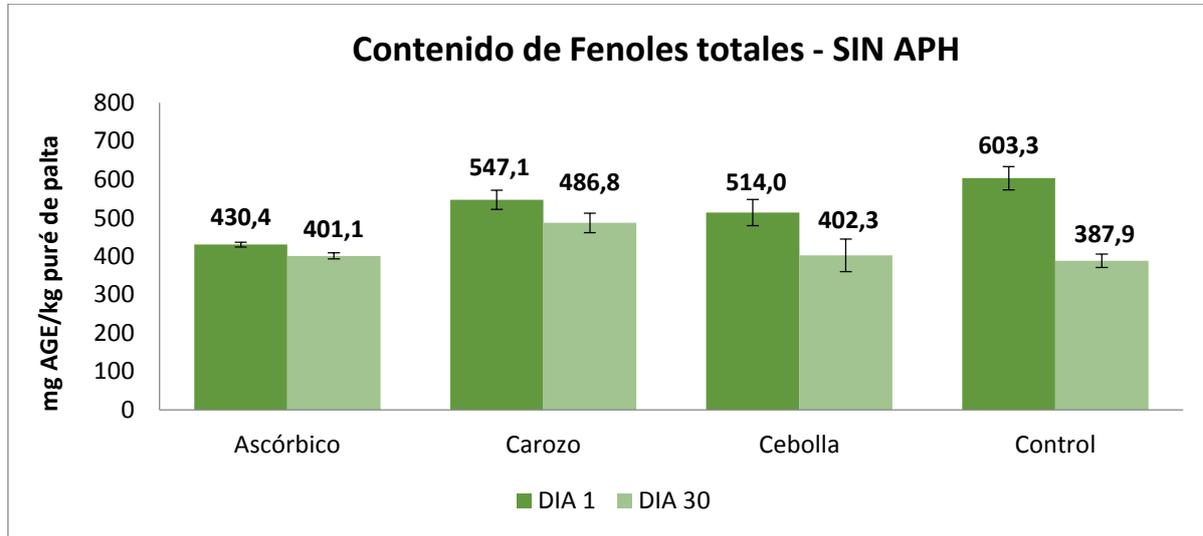


Figura 34: Contenido de polifenoles totales en las distintas muestras sin APH.

Por otro lado, en la figura 34, también puede observarse que todas las muestras difieren en la cantidad inicial de polifenoles, siendo la muestra control la que presentó el mayor contenido, mientras que al día 30 de almacenamiento en heladera a una temperatura de 4°C, ésta última alcanzó el menor contenido promedio frente al resto de las muestras estudiadas. En este caso, para todas las muestras se puede establecer que difieren significativamente en su contenido de polifenoles entre los días 1 y 30.

A modo de comparar las diferencias en el contenido de polifenoles en las distintas muestras, en la Tabla XIX se detallan los porcentajes de pérdida de polifenoles totales entre el día 1 y día 30 de almacenamiento para las muestras que sí presentaron diferencias significativas, de acuerdo a la prueba de Test-t realizada.

Tabla XIX: Porcentajes de pérdida de polifenoles totales entre los días 1 y 30 de almacenamiento refrigerado (4°C) de las muestras con tratamiento por APH y sin tratamiento.

Muestras de puré de palta	% de pérdida de polifenoles totales entre D1 y D30 (Método Folin-Ciocalteu)	
	Con APH	Sin APH
ASCÓRBICO	-	6,79%
CAROZO	-	11,01%
CEBOLLA	-	21,73%
CONTROL	30,02%	35,70%

La Tabla XIX permite visualizar que todas las muestras sin tratamiento por APH presentaron diferencias en su contenido de polifenoles totales, mientras que no sucedió así con las muestras que recibieron tratamiento por APH. La que menos variación obtuvo al cabo de 30 días de almacenamiento fue la muestra con Ascórbico, seguida por la muestra con ECP, con un porcentaje similar. La muestra Control sin tratamiento por APH presentó la mayor pérdida de polifenoles totales, incluso 5 veces mayor que la muestra con Ascórbico, siendo también la única muestra que obtuvo diferencias aún luego del tratamiento con APH.

6.3.3 Determinación de la capacidad antioxidante

Para la determinación de la capacidad antioxidante se utilizó la metodología descrita en la sección 5.2.2; y las muestras en estudio se generaron según Tabla XI. Los resultados obtenidos para las muestras con tratamiento por APH se presentan en la Figura 35 y para las de sin tratamiento por APH, en la Figura 36. A su vez, estos fueron sometidos a un análisis estadístico por Test-t con un nivel de significancia de $p < 0,05$ para identificar diferencias en la capacidad antioxidante de las muestras a lo largo del tiempo de almacenamiento.

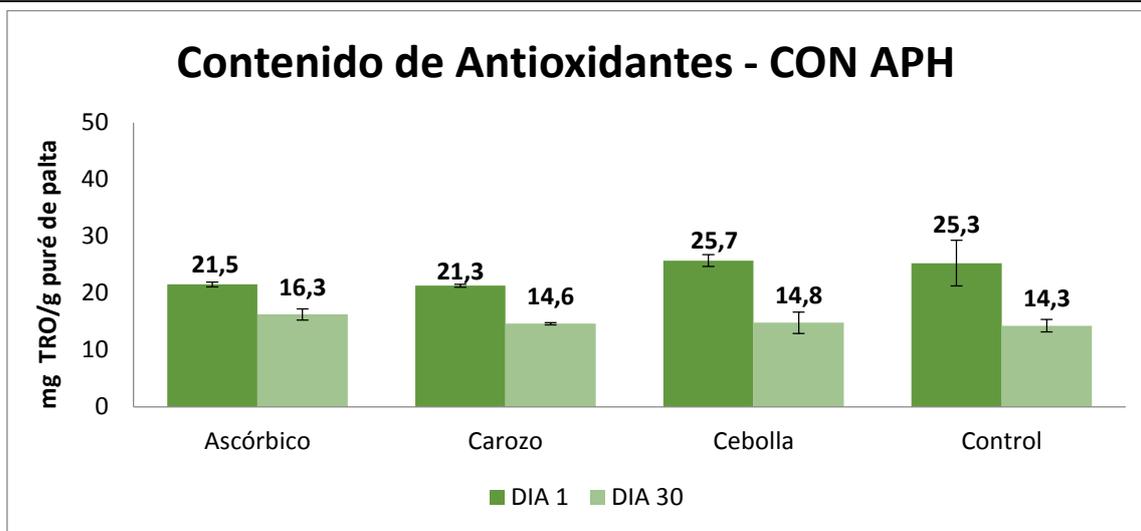


Figura 33: Capacidad antioxidante de las distintas muestras con APH.

Todas las muestras al día 30 de almacenamiento presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) en la capacidad antioxidante con respecto a las muestras analizadas al día 1. Al finalizar el período de análisis, todas las muestras redujeron su capacidad antioxidante (medida como mg de Trolox/g de puré de palta), siendo la muestra con ácido ascórbico la que presenta mayor capacidad antioxidante al día 30.

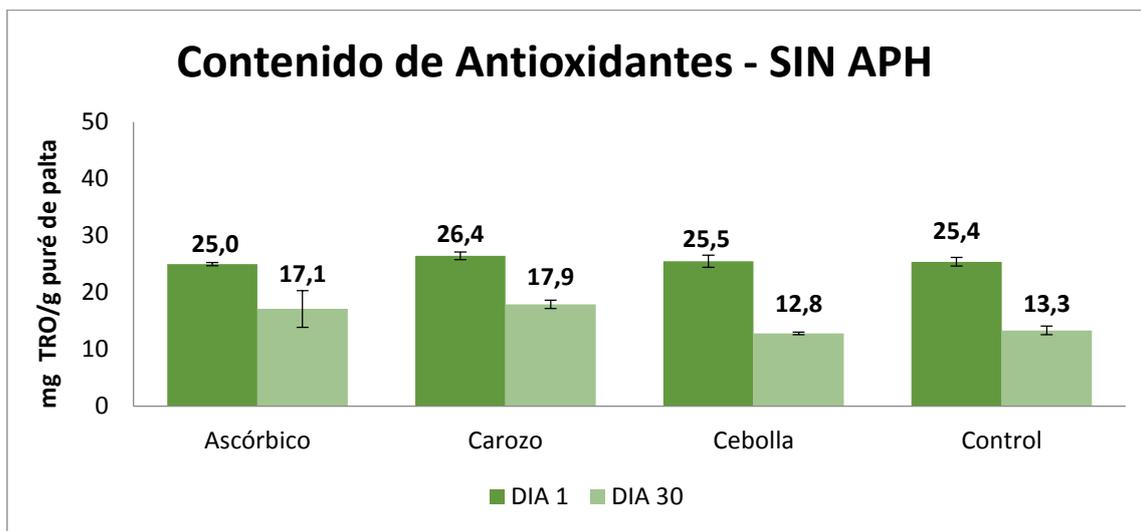


Figura 36: Capacidad antioxidante de las distintas muestras sin APH.

En la Figura 36, se observa que todas las muestras al día 1 tienen una capacidad antioxidante similar. Además, el análisis estadístico permite establecer que todas las muestras al día 30 de almacenamiento presentan una diferencia significativa ($p < 0,05$) en su CA.

Debido a que todas las muestras (con y sin tratamiento por APH) difirieron significativamente en su CA entre los días 1 y 30 de análisis, se calcularon los porcentajes de pérdida de la misma, los cuales se detallan en la Tabla XX.

Tabla XX: Porcentajes de pérdida de capacidad antioxidante entre los días 1 y 30 de almacenamiento (4 °C) de muestras con tratamiento por APH y sin tratamiento.

Muestras de puré de palta	% de pérdida de capacidad antioxidante entre D1 y D30 (Método ABTS)	
	Con APH	Sin APH
ASCÓRBICO	24,6 %	31,60%
CAROZO	31,4 %	32,29%
CEBOLLA	42,5 %	49,82%
CONTROL	43,6 %	47,57%

Se puede observar que la muestra con ácido ascórbico es la que menos redujo su capacidad antioxidante en ambos casos, seguida por la muestra con aplicación de ECP. La muestra de puré con ECE presenta resultados similares a los de la muestra control, ambas con porcentajes de pérdida considerablemente mayores a los de la muestra con ECP y la muestra con ASC. Las muestras que recibieron tratamiento por APH obtuvieron porcentajes de pérdida de CA menores a los de las muestras sin tratamiento.

6.3.4 Medición de características cromáticas

Las imágenes tomadas de las muestras de puré de palta con y sin tratamiento por APH se pueden observar en las Figuras 37 y 38, respectivamente.

CON APH	ASC ¹	ECP ²	ECE ³	Control (AC) ⁴
Día 1				
Día 30				

¹Ácido Ascórbico. ²Extracto de Carozo de Palta. ³Extracto de Cebolla Deshidratada. ⁴Ácido cítrico sin adicionados de antioxidante.

Figura 37: Imágenes del puré de palta con agregado de ácido cítrico (control), ácido ascórbico (ASC), ECP y ECE con tratamiento de APH a los días 1 y 30 de almacenamiento en condiciones de refrigeración.

SIN APH	ASC ¹	ECP ²	ECE ³	Control (AC) ⁴
Día 1				
Día 30				

¹Ácido Ascórbico. ²Extracto de Carozo de Palta. ³Extracto de Cebolla Deshidratada. ⁴Ácido cítrico sin adicionados de antioxidante.

Figura 38: Imágenes del puré de palta con agregado de ácido cítrico (control), ácido ascórbico (ASC), ECP y ECE sin tratamiento de APH a los días 1 y 30 de almacenamiento en condiciones de refrigeración.

A simple vista no se observan grandes cambios en la coloración al día 30 de almacenamiento, tanto para las muestras que fueron tratadas por APH como las que no. Tampoco se perciben diferencias notables entre los diferentes componentes adicionados (control, ASC, ECE, ECP).

A pesar de no percibirse a simple vista las diferencias en los aspectos cromáticos, el análisis de estas características se basó en los resultados obtenidos mediante el programa ImageJ, con el fin de poder compararlos objetivamente.

La Tabla XXI muestra los resultados comparativos entre los días 30 y 1 de análisis, los cuales fueron obtenidos luego de utilizar el programa ImageJ y aplicar la ecuación (8), como lo detalla la sección 5.4.3 para todas las muestras de puré de palta generadas.

Tabla XXI: Cambios en el color total (ΔE) entre el día 30 y día 1, en las muestras de puré de palta con y sin tratamiento por APH almacenadas en condiciones de refrigeración.

Muestras de puré de palta	Cambio en color total ΔE	
	Sin APH	Con APH
ASCÓRBICO	5,59	1,70
CAROZO	5,72	5,22
CEBOLLA	9,83	4,22
CONTROL	3,52	4,79

En todos los casos, a pesar de que las muestras sufrieron una pérdida de la coloración verde característica, la variación de color total comparando día 30 y día 1 es considerada pequeña ($\Delta E < 10$), según lo informado por Keraité *et al* (2017). Puede establecerse que en términos generales el tratamiento con APH mejora la conservación del color original durante el almacenamiento.

Por otro lado, las muestras con los extractos de carozo de palta y de cebolla fueron las que mayor variación de color total sufrieron mientras que el mejor resultado se obtuvo para el caso del ácido ascórbico con tratamiento por APH, el cual arrojó un $\Delta E = 1,70$.

6.4 Efectos del procesamiento con APH sobre la actividad enzimática de las PPO y LOX

En este proyecto de investigación se planteó como uno de los objetivos, evaluar la actividad de enzimas de deterioro para determinar si los tratamientos propuestos son eficaces en la conservación del puré de palta.

El desarrollo de la investigación se realizó en conjunto con el Instituto de Alimentos de INTA Castelar, quienes proveyeron el equipo de APH con el que se llevaron a cabo los ensayos. El equipo Stansted Fluid Power Ltd. modelo Iso-Lab FPG9400:922, estuvo en operación en el ITA desde mediados del 2009 y a causa del desgaste por el uso, por una pérdida del fluido de presurización durante las corridas, quedó fuera de servicio desde Agosto del 2017, sin perspectivas de reparación hasta la fecha de publicación del presente trabajo.

Para proceder con lo planteado en este objetivo, se tomaron como referencia las enzimas LOX y PPO, por ser conocidos sus mecanismos de acción en matrices alimenticias y por ser las principales causantes del pardeamiento enzimático, característica visible del deterioro. De modo de poder cuantificar su actividad en el puré de palta, se procedería a utilizar la técnica de espectrofotometría UV-Vis descrita por Soliva *et al* (2001). Los reactivos para esta determinación fueron adquiridos por Fundación UADE en Sigma Aldrich, Argentina, y los mismos fueron entregados en Agosto del 2017.

Debido a las limitaciones en el tiempo y disponibilidad de los equipos y reactivos, este trabajo se limitó a realizar los análisis de caracterización de los extractos, evaluación de capacidad antioxidante, aspectos cromáticos y cuantificación de polifenoles totales en el puré de palta. La realización de estos ensayos permitió determinar las características de los extractos para su implementación como antioxidantes en diversas matrices y evaluar la acción de los mismos en conjunto con la aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas en la conservación del puré de palta.

Con las determinaciones de cuantificación de actividad enzimática, que no lograron realizarse debido a las limitaciones mencionadas, se esperaba encontrar información que confirmara y complementara los resultados obtenidos en los otros ensayos.

Era de esperarse que al tratar las muestras por Altas Presiones Hidrostáticas, con los parámetros establecidos, se encontrara una disminución en la actividad enzimática para ambas enzimas de estudio, como lo demostrado por Jacobo-Velázquez *et al* (2013).

7. Discusión y conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que los extractos generados a partir de fuentes naturales presentaron un elevado contenido de polifenoles y capacidad antioxidante, sugiriendo también que la capacidad antioxidante que presentan los extractos podría deberse en gran parte a la presencia de los polifenoles, pero no limitada a estos compuestos.

El extracto de carozo de palta aplicado sobre el puré de palta, mostró una menor disminución en la capacidad antioxidante luego de 30 días de almacenamiento en condiciones de refrigeración (4°C) en comparación con el extracto de cebolla. Si bien puede establecerse que para todas las determinaciones, el ácido ascórbico es el que obtuvo los mejores resultados en porcentajes de disminución de capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales, como así también en la conservación del color luego del tratamiento por APH transcurridos los 30 días de almacenamiento, el extracto de carozo de palta ha alcanzado rendimientos similares, por lo que podría presentarse como una alternativa al empleo de ácido ascórbico o eventualmente un reemplazo parcial. Por otro lado, se estaría aprovechando un producto de desecho del procesamiento de productos elaborados a partir de la palta.

Los métodos de extracción han sido evaluados y seleccionados de acuerdo a su conveniencia para la operatoria. Sin embargo, se considera necesario evaluar nuevos métodos que alcancen una mayor eficacia en la extracción de antioxidantes para lograr resultados aún más contundentes y que, a su vez, resulten eficientes para su aplicación en la industria.

Siguiendo el marco de las posibilidades que genera un extracto de este tipo, debe considerarse también la posibilidad de generar extractos de forma sólida, que no alteren la reología del puré de palta, con la oportunidad de poder aumentar la concentración del contenido de polifenoles en el producto final y mejorar su desempeño.

En un escenario actual donde la industria agroalimentaria requiere introducir elementos de innovación y diferenciación y con una demanda mundial creciente en el

consumo de palta, la utilización de su carozo como fuente de antioxidantes naturales plantea la importancia de continuar conociendo en profundidad las cualidades del mismo, que aún no han sido del todo exploradas y explotadas. De esta manera, podría lograrse su valorización como fuente emergente de compuestos antioxidantes, aprovechándolo como ingrediente en la industria, y no tan solo como un desecho.

Además, el proceso de APH en combinación con el empleo de agentes antioxidantes naturales propone una alternativa interesante para la conservación de puré de palta almacenado en condiciones de refrigeración. Si bien existen actualmente en el mercado productos refrigerados y congelados de puré de palta, obtenidos mediante procesamiento con Altas Presiones Hidrostáticas, no se han encontrado al momento este tipo de productos en nuestro país. Tampoco se han hallado productos generados bajo las mismas condiciones que plantea el presente trabajo en otras partes del mundo.

La mayoría de los productos elaborados a base de palta y tratados con APH, que existen en el mercado mundial, se comercializan congelados. Esta condición puede afectar en cierta medida a la textura y apreciación organoléptica por parte del consumidor y plantea un inconveniente más en la logística y almacenamiento de estos productos, por lo que la alternativa de un producto refrigerado y que conserve sus características organolépticas al transcurrir el tiempo, se convierte en una opción interesante tanto para los elaboradores como consumidores, manteniendo un rotulado limpio, acorde a las tendencias de consumo actual.

Se evidencia a través de los resultados de aspectos cromáticos que el puré envasado al vacío, con adición de ácido cítrico y almacenado en condiciones de refrigeración no sufrió grandes cambios en la coloración característica, por lo que las enzimas de deterioro en estudio se vieron desfavorecidas por estos factores. Además, puede observarse que el tratamiento con APH y la adición de ácido ascórbico mejoran levemente las características cromáticas, que es un factor fundamental para la toma de decisión por parte del consumidor durante la compra. Se considera prudente, en investigaciones futuras, incluir la evaluación de un panel sensorial entrenado o encuestas a consumidores que pudieran arrojar más información al respecto.

Los extractos añadidos resultaron eficaces para aumentar la capacidad antioxidante y el contenido de los polifenoles totales, pudiendo tener un aporte desde el punto de vista nutricional respecto del puré sin agregados. No obstante, el alcance de este trabajo no ha

podido evidenciar los impactos del tratamiento planteado en la actividad enzimática o microbiana.

Para poder implementar los modelos planteados a nivel industrial, aún son necesarios mayores antecedentes científicos que validen las propiedades de estos métodos de conservación, complementados por un análisis de factibilidad económico-financiera.

8. Bibliografía

- AGUILÓ-AGUAYO, I., OMS-OLIU, G., MARTÍN-BELLOSO, O., SOLIVA-FORTUNY, R. 2014. Impact of pulsed light treatments on quality characteristics and oxidative stability of fresh-cut avocado. *LWT – Food Science and Technology*. 59: 320-326.
- ARDESTANI, Amin; YAZDANPARAST, Razieh. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food chemistry*, 2007, vol. 104, no 1, p. 21-29.
- Asociación de Ingenieros Agrónomos del Noroeste de Entre Ríos. (2015). La palta gana terreno en Argentina. Reporte Técnico disponible en: <https://www.aianer.com.ar/noticias/175_la-palta-gana-terreno-en-argentina-.html> [consulta: 20 mar. 2018].
- BADUI DERGAL, S. 2006. *Química de los alimentos*. Pearson educación.
- BI, X., HEMAR, Y., BALABAN, M.O., LIAO, X. 2015. The effect of ultrasound on particle size, color, viscosity and polyphenol oxidase activity of diluted avocado puree. *Ultrasonics Sonochemistry*. 27: 567-575.
- BUSTOS, M. C.; MAZZOBRE, Maria Florencia; BUERA, Maria del Pilar. Stabilization of refrigerated avocado pulp: Effect of Allium and Brassica extracts on enzymatic browning. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, vol. 61, no 1, p. 89-97.
- BUSTOS, M.C., AGUDELO-LAVERDE, L.M., MAZZOBRE, F., BUERA, P. The relationship between antibrowning, anti-radical and reducing capacity of Brassica and Allium extracts. 2014.
- California Avocado Commission. California Avocado History, 2012. [consulta: 20 ago. 2017] <<http://www.californiaavocado.com/the-california-difference/avocado-history>>
- CARBAJAL AZCONA, A. La cebolla: una aliada para tu salud, 2016.

-
- Consumo de palta: una fruta saludable, <http://www.senasa.gob.ar/senasa-comunica/noticias/consumo-de-palta-una-fruta-saludable>, [consulta: 15 ago. 2018].
 - DELGADO SUÁREZ, A., DÍAZ RUÍZ, D., ESPINOZA GUZMÁN, B., GERÓNIMO MENDOZA, G., JUÁREZ BAYONA, K. Diseño de la línea de producción para la elaboración y envasado de puré de palta en el departamento de Piura. 2014.
 - DEN HERDER, Kelly. Mercado Mundial del Aguacate: resultados y perspectivas, Revista Fresh Plaza. 17, Abril de 2018. [consulta: 08 oct. 2018]. <<https://www.freshplaza.es/article/115119/Mercado-mundial-del-aguacate-resultados-y-perspectivas/>>
 - DREHER, Mark L.; DAVENPORT, Adrienne J. Hass avocado composition and potential health effects. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2013, vol. 53, no 7, p. 738-750.
 - DUESTER, Karen C. Avocados a look beyond basic nutrition for one of nature's whole foods. *Nutrition Today*, 2000, vol. 35, no 4, p. 151-157.
 - ELEZ-MARTÍNEZ, P., SOLIVA-FORTUNY, R.C., GORINSTEIN, S., MARTÍN-BELLOSO, O. Natural antioxidants preserve the lipid oxidative stability of minimally processed avocado purée. *Journal of food science*, 2005, vol. 70, no 5, p. S325-S329.
 - FAOSTAT, base de datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO). Estadísticas agrícolas del aguacate 1961-2016, 2016. [consulta: 18 sep. 2018] <**Error! Hyperlink reference not valid.**www.fao.org/faostat/es>
 - FINLEY, John W., KONG, A. N., HINTZE, K. J., JEFFERY, E. H., JI, L. L., & LEI, X. G. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 2011, vol. 59, no 13, p. 6837-6846.
 - FULGONI, Victor L.; DREHER, Mark; DAVENPORT, Adrienne J. Avocado consumption is associated with better diet quality and nutrient intake, and lower metabolic syndrome risk in US adults: results from the National Health and Nutrition

Examination Survey (NHANES) 2001–2008. *Nutrition journal*, 2013, vol. 12, no 1, p. 1.

- GUERRERO-BELTRÁN, José A.; BARBOSA-CÁNOVAS, Gustavo V.; SWANSON, Barry G. High hydrostatic pressure processing of fruit and vegetable products. *Food Reviews International*, 2005, vol. 21, no 4, p. 411-425.
- HARTWIG, Vanessa Graciela. Obtención de extractos secos de yerba mate con alto contenido de polifenoles y alta capacidad antioxidante. 2015. Tesis Doctoral. Tesis Doctoral en Química Industrial 2015-Universidad de Buenos Aires [en línea]
- HEINZ, Volker; BUCKOW, Roman. Food preservation by high pressure. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2010, vol. 5, no 1, p. 73-81.
- HICKS, D. T., PIVARNIK, L. F., MCDERMOTT, R., RICHARD, N., HOOVER, D. G., & KNIEL, K. E. Consumer awareness and willingness to pay for high-pressure processing of ready-to-eat food. *Journal of food science education*, 2009, vol. 8, no 2, p. 32-38.
- HUANG, Dejian; OU, Boxin; PRIOR, Ronald L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, vol. 53, no 6, p. 1841-1856.
- HUNT, R. W. G.; HORWOOD, E. Measuring Colour. 2nd. Ed., Ellis HORWOOD, New York, 1991.
- ISO 11664-4, 2008: Colourimetry - Part 4: CIE 1976 L*a*b* Colour space.
- JACOBO-VELÁZQUEZ, Daniel A., et al. Partial purification and enzymatic characterization of avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass) lipoxygenase. *Food research international*, 2010, vol. 43, no 4, p. 1079-1085.
- JACOBO-VELÁZQUEZ, Daniel.A., CASTELLANOS-DOHNAL, G.C., CABALLERO-MATA, P., HERNÁNDEZ-BRENES, Carmen. Cambios bioquímicos durante el almacenamiento de puré de aguacate adicionado con antioxidantes naturales y procesado con alta presión hidrostática. *CyTA-Journal of Food*, 2013, vol. 11, no 4, p. 379-391.

-
- JACOBO-VELAZQUEZ, Daniel.A., HERNÁNDEZ-BRENES, Carmen. Stability of avocado paste carotenoids as affected by high hydrostatic pressure processing and storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2012, vol. 16, p. 121-128.
 - JAYATHILAKAN, K.; SHARMA, G. K.; RADHAKRISHNA, K.; BAWA, A. S. Antioxidant potential of synthetic and natural antioxidants and its effect on warmed-over-flavour in different species of meat. *Food Chemistry*, 2007, vol. 105, no 3, p. 908-916.
 - JURI MASSARO, Caterina. Características Generales de las Paltas. 2010. ODEPA, Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Gobierno De Chile.
 - KERAITĖ, Greta; SIVAKOVA, Birutė; KIUBERIS, Jonas. Investigation of the impact of organic and inorganic halides on the ageing stability of paper with iron gall ink. *chemija*, 2017, vol. 28, no 3, p. 137-147.
 - LACHMAN, J. PRONEK, D., HEJTMANKOVA, A., DUDJAK, J., PIVEC, V., & FAITOVÁ, K. Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (*Allium cepa* L.) varieties. *Horticultural science*, 2003, vol. 30, no 4, p. 142-147.
 - LEON, K., MERY, D., PEDRESCHI, F., & LEON, J. Color measurement in L* a* b* units from RGB digital images. *Food research international*, 2006, vol. 39, no 10, p. 1084-1091
 - LÓPEZ-MALO, A., PALON, E., BARBOSA-CÁNIVAS, G.V., WELTI-CHANES, J., SWANSON, B.G. Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree. *Food Research International*, 1998, vol. 31, no 8, p. 549-556.
 - MÍNGUEZ MOSQUERA, María Isabel; PÉREZ GÁLVEZ, Antonio; HORNERO-MÉNDEZ, Dámaso. Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales: mucho más que simples “colorantes” naturales. 2005.

-
- MOURE, A., CRUZ, J.M., FRANCO, D., DOMÍNGUEZ, J.M., SINEIRO, J., DOMÍNGUEZ, H., NÚÑEZ, M.J., PARAJÓ, J.C., Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry*, 2001, vol. 72, no 2, p. 145-171.
 - NEIRA, J. I.. Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca. *Universidad Santiago de Compostela*, 2009.
 - OHLOW, M. J., GRANOLD, M., SCHRECKENBERGER, M., & MOOSMANN, B. Is the chromanol head group of vitamin E nature's final truth on chain-breaking antioxidants?. *FEBS letters*, 2012, vol. 586, no 6, p. 711-716.
 - OLAETA, J. A. Industrialización del aguacate: estado actual y perspectivas futuras. En Consejería de Agricultura y Pesca. *V Congreso Mundial del Aguacate*. 2003. p. 749-754.
 - PATTERSON, M. F. Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of applied microbiology*, 2005, vol. 98, no 6, p. 1400-1409.
 - PRIOR, Ronald L.; WU, Xianli; SCHAICH, Karen. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, vol. 53, no 10, p. 4290-4302.
 - Protocolo de calidad para paltas frescas (Variedad Hass). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Dirección Nacional de Agroindustria, 2009. Código: SAA018. Versión; 09. 30/07/2009.
 - QUEIROZ, Christiane, MENDES LOPES, Maria Lucia; FIALHO, Eliane; VALENTE-MESQUITA, Vera Lucia. Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control. *Food reviews international*, 2008, vol. 24, no 4, p. 361-375.
 - RAMÍREZ, J., GARCÍA, C. F., VIZCAÍNO, J., CÁRDENAS, J., GUTIÉRREZ, F. J., MARIEL, H., & VILLAGRÁN, S. ¿Qué son y para qué sirven los antioxidantes? *Revista de Divulgación Científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana*, 1, 2012.

-
- RETTING, M. K.; AH-HEN, K. El color de los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro Sur*, 2014, vol. 42, p. 2-7.
 - SALINAS ARROYO, Michelle Paola. Cuantificación de Antioxidantes en Alimentos Naturales y Artificiales. 2015. Tesis de Licenciatura. PUCE.
 - SAN MARTIN, M. F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. Food processing by high hydrostatic pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2002, vol. 42, no 6, p. 627-645
 - SANTOS-SOUZA, D., GIMENO MARQUES, L., DE BARROS GOMES, E., NARAIN, N. Lyophilization of avocado (*Persea americana* Mill.): effect of freezing and lyophilization pressure on antioxidant activity, texture, and browning of pulp. *Drying technology*, 2015, vol. 33, no 2, p. 194-204.
 - SELLAMUTHU, P.S., MAFUNE, M., SIVAKUMAR, D., SOUNDY, P. (2013). Thyme oil vapour and modified atmosphere packaging reduce anthracnose incidence and maintain fruit quality in avocado. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, vol. 93, no 12, p. 3024-3031.
 - SOLIVA, R.C., ELEZ, P., SEBASTIÁN, M., MARTÍN, O. Evaluation of browning effect on avocado purée preserved by combined methods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2000, vol. 1, no 4, p. 261-268.
 - SOONG, Yean-Yean; BARLOW, Philip J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food chemistry*, 2004, vol. 88, no 3, p. 411-417.
 - TORRES, J. Antonio; VELAZQUEZ, Gonzalo. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of food Engineering*, 2005, vol. 67, no 1-2, p. 95-112
 - USDA (U.S. Department of Agriculture). Avocado, almond, pistachio and walnut Composition. Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. U.S. Department of Agriculture, 2001. Washington, DC. [consulta: 20 oct 2018]. <<https://www.usda.gov>>

-
- VALENZUELA, Alfonso; NIETO, Susana. Los antioxidantes, protectores de la calidad de la industria alimentaria. 1995. *Federación Nacional de cultivadores de Palma de Aceite*, Colombia. p.310.321.
 - VAUDAGNA, S. R., & RODRÍGUEZ E. Altas Presiones Hidrostáticas (APH), 2012. [consulta: 28 oct. 2018]. <<https://inta.gob.ar/documentos/altas-presiones-hidrostaticas-aph>>
 - WEEMAES, C., LUDIKHUYZE, L., Van DEN BROECK, I., HENDRICKX. Kinetic study of antibrowning agents and pressure inactivation of avocado polyphenoloxidase. *Journal of Food Science*, 1999, vol. 64, no 5, p. 823-827.
 - WEEMAES, C.A., LUDIKHUYZE, L.R., VAN DER BROECK, I., HENDRICKX, M.E. Kinetics of combined pressure-temperature inactivation of avocado polyphenoloxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, vol. 60, no 3, p. 292-300.
 - WILSON, Douglas, et al. The role of food antioxidants, benefits of functional foods, and influence of feeding habits on the health of the older person: an overview. *Antioxidants*, 2017, vol. 6, no 4, p. 81.
 - WOOLF, A.B., WIBISONO, R., FARR, J., HALLET, I., RICHTER, L., OEY, I., WOHLERS, M., ZHOU, J., FLETCHER, G.C., REQUEJO-JACKMAN, C. Effect of high pressure processing on avocado slices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2013, vol. 18, p. 65-73.
 - World Atlas. The Biggest Avocado Producing Countries In The World. Economics. 2014. Reporte Técnico [consulta: 05 abr 2018]. <<https://www.worldatlas.com/articles/the-biggest-avocado-producing-countries-in-the-world.html>>.
 - YAM, Kit L.; PAPADAKIS, Spyridon E. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of food engineering*, 2004, vol. 61, no 1, p. 137-142. AGANOVIC, K., SMETANA, S., GRAUWET, T., TOEPFL, S., MATHYS, A., VAN LOEY, A., & HEINZ, V. Pilot scale thermal and

alternative pasteurization of tomato and watermelon juice: An energy comparison and life cycle assessment. *Journal of cleaner production*, 2017, vol. 141, p. 514-525.