

Prevención del oscurecimiento enzimático de rebanadas de manzana por efecto de un tratamiento hidrotérmico, N-acetilcisteína y cloruro de calcio

Prevention of enzymatic browning of apple slices by effect of hydrothermal treatment, N-acetylcysteine and calcium chloride

Chaidez-Gastelum, D.C.¹, Costich-Costich, G.¹, Ayón-Reyna, L.E.¹, López-Velázquez, J.G.¹, García-Armenta, E.¹, Vega-García, M.O.^{1*}

¹Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Cd. Universitaria, Av. De las Américas y Josefa Ortiz, Culiacán, Sinaloa, 80010, México.

RESUMEN

El procesamiento mínimo de la manzana favorece el oscurecimiento enzimático. La aplicación de un tratamiento hidrotérmico (TH) combinado con antioxidantes y sales de calcio pudiera ser un tratamiento prometedor para solucionar este problema. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de un TH combinado con N-acetilcisteína (NAC) y cloruro de calcio (CaCl_2) sobre la calidad poscosecha y la actividad de enzimas relacionadas al oscurecimiento de rebanadas de manzana cv. Granny Smith. La fruta entera fue sometida a un tratamiento hidrotérmico (TH, 45 °C x 10 min), para posteriormente rebanarse y sumergirse durante 3 min en la solución de N-acetilcisteína y cloruro de calcio (NAC- CaCl_2). Enseguida, las rebanadas tratadas fueron empacadas en charolas de polietileno y almacenadas a 4 °C durante 24 días. Se realizaron retiros del almacenamiento cada 6 días y se evaluaron las concentraciones de O_2 y CO_2 dentro del envase, así como firmeza, color, fenoles totales y la actividad de polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (POD). Los resultados mostraron que la aplicación del tratamiento hidrotérmico combinado con N-acetilcisteína y cloruro de calcio (TH+NAC- CaCl_2) fue efectiva para mantener el color de las rebanadas de manzana y el contenido de fenólicos totales durante todo el almacenamiento; además, redujo la actividad de PPO y de POD durante el almacenamiento a 4 °C. El tratamiento TH+NAC- CaCl_2 puede ser empleado de manera efectiva para disminuir el oscurecimiento enzimático de rebanadas de manzana, ya que conserva su color original y mantiene los parámetros de calidad por 24 días.

PALABRAS CLAVES: *Manzana mínimamente procesada, Tratamiento hidrotérmico, Sales de calcio, Antioxidantes.*

ABSTRACT

Minimal processing of apple promotes enzymatic browning. The application of a hydrothermal treatment (HT) combined with antioxidants and calcium salts could be a promising treatment to solve this problem. The aim of the present study was to evaluate the effect of a hydrothermal treatment combined with N-acetylcysteine and calcium chloride (CaCl_2) on the postharvest quality and the activity of enzymes related to the darkening of apple slices cv. Granny Smith. The whole fruit was subjected to a hydrothermal treatment (HT, 45 °C x 10 min), then sliced and immersed for 3 min in the solution of N-acetylcysteine and calcium chloride (NAC- CaCl_2). Then, the treated slices were packed in polymer trays and stored at 4 °C for 24 days. Withdrawals were made from storage every 6 days and the concentrations of O_2 and CO_2 inside the container, firmness, color, total phenols, and polyphenoloxidase (PPO) and peroxidase (POD) activities were evaluated. The results showed that the application of HT + NAC- CaCl_2 was effective in maintaining the internal color of apple slices and the total phenolic content. The treatment was also useful to reduce PPO and POD activity during storage at 4 °C. TH+NAC- CaCl_2 treatment can be used effectively to reduce the enzymatic darkening of apple slices since it preserves its original color and maintains quality parameters for 24 days.

KEYWORDS: *Minimally processed apple, hot water treatment, calcium salt, antioxidants.*

*Autor de correspondencia: Misael Odín Vega García

E-mail: mvega6@yahoo.com

ORCID ID: [0000-0003-4122-2454](https://orcid.org/0000-0003-4122-2454)

Registro ORCID Autores: DCC: [0009-0000-3184-5952](https://orcid.org/0009-0000-3184-5952), LDA: [0000-0001-7150-8846](https://orcid.org/0000-0001-7150-8846), JGL: [0000-0002-0901-5984](https://orcid.org/0000-0002-0901-5984), EG: [0000-0001-7219-9221](https://orcid.org/0000-0001-7219-9221) MOV: [0000-0003-4122-2454](https://orcid.org/0000-0003-4122-2454)

Revista online: <https://revistas.uas.edu.mx/index.php/QBU/index>

INTRODUCCIÓN

Los frutos mínimamente procesados, también llamados frescos cortados, son productos listos para consumir que proporcionan beneficios a la salud, y han sido cambiados físicamente de su estado natural mediante un procesamiento mínimo, como el cortado, pelado, triturado o rebanado (Ayón-Reyna *et al.*, 2019). Las manzanas frescas cortadas, en particular, son empleadas como un refrigerio conveniente para los servicios de catering en bares de ensaladas, escuelas y cafeterías de empresas. Sin embargo, tienen una vida útil corta, reflejada en la pérdida de parámetros de calidad como color, firmeza, jugosidad, sabor y pérdida excesiva de humedad (Yousuf, Qadri y Srivastava, 2018).

En los frutos procesados en fresco se daña el tejido vegetal, lo que frecuentemente inicia una secuencia de actividades respiratorias, metabólicas y enzimáticas que llegan a disminuir su calidad. Un ejemplo es la actividad de enzimas como polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD), las cuales producen el oscurecimiento de los frutos. Por otro lado, la β -galactosidasa, la poligalacturonasa (PG) y la pectinmetilesterasa (PME) pueden provocar modificaciones en la pared celular, disminuyendo la firmeza (Giannakourou & Tsironi, 2021).

Para prevenir o retrasar estos cambios no deseables en los frutos mínimamente procesados, se hace uso de diferentes compuestos como los tioles, que son compuestos con el grupo funcional sulfhidrilo (-SH), tales como glutatión, L-cisteína y N-acetilcisteína, que actúan como inhibidores del oscurecimiento enzimático (Cerit *et al.*, 2020). Por otro lado, los tratamientos hidrotérmicos son una técnica segura que induce respuestas de defensa en las frutas y hortalizas cosechadas, y se utilizan como método de control del oscurecimiento en frutos ya que la temperatura puede inhibir la actividad de PPO y POD (Rodríguez-Arzuaga y Piagentini, 2019). A su vez, la aplicación de calcio en la etapa poscosecha de los frutos logra extender su vida de almacenamiento, resaltando su capacidad de mantener la firmeza, reducir la incidencia de enfermedades por patógenos y la prevención del desarrollo de trastornos fisiológicos. Es por ello que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de un tratamiento hidrotérmico y la inmersión de rebanadas de manzana cv. Granny Smith en una solución de N-acetilcisteína (NAC) y cloruro de calcio (CaCl_2) sobre la calidad poscosecha y la actividad de enzimas relacionadas al oscurecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las manzanas (*Malus domestica*) variedad "Granny Smith" se obtuvieron del mercado de abastos de la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México. La fruta se seleccionó cuidadosamente con base en la uniformidad de tamaño, color y firmeza, evitando aquellas que tuvieran golpes o magulladuras, así como pudriciones. Los reactivos N-acetilcisteína y CaCl_2 se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Estado de México, México).

Métodos

Aplicación de los tratamientos

Las manzanas fueron lavadas y sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio (100 $\mu\text{L/L}$) durante 3 min. Posteriormente, la fruta fue sometida a un tratamiento hidrotérmico (45 °C x 10 min) de acuerdo con lo reportado por López-López *et al.* (2013), y luego se colocó en un recipiente con agua a 21 °C por 5 min para su enfriamiento. Después, se procedió al rebanado y descorazonado utilizando cuchillos comerciales afilados. Las rebanadas de 1 cm de espesor fueron sumergidas en la solución NAC (0.05 M) y CaCl_2 (5 g/L) a una temperatura de 4 °C por un periodo de 3 min, posteriormente se les retiró el exceso de solución con la ayuda de papel absorbente. Las rebanadas fueron pesadas para formar grupos de 90-120 g, se colocaron dentro de charolas de polietileno y se cubrieron con película plástica para crear una atmósfera modificada pasiva. Todo el proceso de elaboración y almacenamiento se realizó a 4 °C. La fruta rebanada se almacenó por 24 días y se realizaron retiros cada 6 días para los respectivos análisis.

Análisis de gases

Para la determinación de la concentración de los gases (O_2 y CO_2) en el interior de las charolas se utilizó un analizador de gases dual modelo GCS-150 Gas Control Systems (Sparta, Michigan, EUA). A través del septo colocado en la charola se introdujo la aguja del analizador, la cual permitió hacer la medición durante 30 s manteniendo la atmósfera modificada. Se realizaron 3 mediciones por tratamiento cada 6 días de evaluación durante 24 días (Ayón-Reyna *et al.*, 2019).

Firmeza

La pérdida de firmeza se evaluó de acuerdo con la metodología reportada por López-López *et al.* (2013) con algunas modificaciones, empleando un medidor de textura Chatillon Ametek E-DFE 100 (California, EUA) equipado con una punta plana de 11 mm de diámetro a una velocidad de penetración constante (50 mm/min). Se penetró en el centro de cada rebanada de manzana a una profundidad de 5 mm aproximadamente. La prueba se realizó 9 veces por cada tratamiento. Los resultados se reportaron como la fuerza de compresión máxima necesaria para penetrar el tejido del fruto, expresada en Newtons.

Color

El color se evaluó en la superficie de las rebanadas de manzana donde se utilizó un colorímetro Minolta CR-200 (Osaka, Japón). Se midieron los parámetros de color L^* y a^* , donde L^* corresponde a la luminosidad de la muestra (100 representa el blanco y 0 el negro) y el valor negativo y positivo de a^* indica una coloración verde a roja, respectivamente (López-López *et al.*, 2013)

Fenoles totales

Los fenoles totales se determinaron siguiendo la metodología reportada por Ayón-Reyna *et al.* (2019) con algunas modificaciones. Se homogenizaron 5 g de pulpa de manzana con 10 mL de metanol al 80% por 1 min en un homogenizador Ultra-Turrax T25 (Carolina del Norte, EUA). La muestra homogenizada se sonicó por 10 min. Posteriormente se filtró con papel Whatman #1 para ser centrifugada a 4,000 rpm por 30 min a 4 °C. Enseguida, se realizó una decantación y el sobrenadante se reservó. Con la pastilla formada se realizó una segunda extracción repitiendo los mismos pasos que en la primera extracción. Finalmente, se recolectaron y mezclaron los sobrenadantes de las dos extracciones, para posteriormente ser aforado con metanol al 80%. Del extracto diluido se tomaron 20 μ L y se adicionaron 1.58 mL de agua desionizada y 100 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu 1 N, se agitó y se dejó reposar por 5 min. Posteriormente, se le adicionaron 300 μ L de Na_2CO_3 al 20%, se agitó y se incubó por 30 min a 40°C, después se midió la absorbancia a 740 nm con un espectrofotómetro Único SQ-2800 UV/VIS (Dayton, Nueva Jersey, EUA). Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/100 gramos de fruto fresco (gff).

Extracción y análisis de polifenoloxidas (PPO)

Se determinó la actividad específica de la enzima PPO de acuerdo con la metodología empleada por López-López *et al.* (2013) con algunas modificaciones. Para llevar a cabo la extracción de la PPO, se pesaron 5 g de muestra y se homogenizaron con 5 mL de amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M (pH 7) por 1 min a velocidad constante de 14,000 xg utilizando un Ultra-Turrax T25 (Carolina del Norte, EUA). El homogenizado se filtró con 4 capas de tela de organza para obtener el extracto enzimático crudo. La reacción se llevó a cabo mezclando 900 μ L de amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M (pH 7) + 500 μ L de amortiguador de citrato 0.1 M (pH 4) + catecol 0.2 M (pH 4) (disuelto en el amortiguador de citrato) + 100 μ L de extracto enzimático y se registraron los cambios de absorbancia a 400 nm cada 10 s durante 5 min utilizando un espectrofotómetro UNICO SQ-2800 UV/VIS (Dayton, Nueva Jersey, EUA). El blanco se preparó de manera similar, pero sin agregar extracto enzimático. La concentración de proteína se determinó de acuerdo con el método descrito por Bradford (1976) empleándose albúmina de suero de bovino (BSA) como estándar de calibración a 595 nm. La unidad de actividad (UA) se definió como el cambio de 0.001 unidades de absorbancia/min. Los resultados se expresaron como UA/mg de proteína.

Extracción y análisis de peroxidasa (POD)

Se determinó la actividad específica de la enzima POD de acuerdo con la metodología empleada por López-López *et al.* (2013) con algunas modificaciones. Para la extracción de la enzima se utilizaron 10 g de pulpa de rebanadas de manzana y se homogenizaron por 1 min con 20 mL de amortiguador de fosfato de sodio 0.05 M (pH 7) + 2 g de polivinil polipirrolidona (PVPP). Una vez homogenizado, se dejó reposar por 2 h en oscuridad a temperatura de 4 °C. Transcurrido el tiempo, se filtró con 4 capas de tela organza y se midió el sobrenadante (volumen inicial). Se tomó una alícuota de 2 mL, se centrifugó a 11,000 xg por 25 min a 4 °C empleando una centrifuga Eppendorf modelo 5804-R (Hamburgo, Alemania), y el sobrenadante se recolectó y se le midió el volumen. Posteriormente, se tomó 1 mL y se saturó al 70% con sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ sólido. Una vez hecho esto, se llevó a una segunda centrifugación (11,000 xg a 25 min a 4 °C). La pastilla que se obtuvo fue disuelta en 1.5 mL de amortiguador de fosfato de sodio 0.05 M (pH 7).

Para la medición de la actividad de la POD se registró el cambio de absorbancia con base en la oxidación del sustrato fenólico guayacol a 25

°C. Se tomaron 150 μ L del extracto enzimático + 2,700 μ L del amortiguador de fosfato de sodio 0.2 M (pH 6.5) con 0.1 mL de H₂O₂ al 1% + 150 μ L de guayacol al 4%. La absorbancia fue leída a 470 nm cada 10 s por 3 min empleando un espectrofotómetro UV-VIS UNICO SQ-2800 UV/VIS (Dayton, Nueva Jersey, EUA). El blanco se preparó de manera similar sin aplicación del extracto enzimático. La concentración de proteína se determinó de acuerdo con el método descrito por Bradford (1976) donde se empleó albúmina de suero de bovino (BSA) como estándar de calibración a 595 nm. La unidad de actividad (UA) se definió como el cambio de 0.001 unidades de absorbancia/min. Los resultados se expresaron como UA/mg de proteína.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó utilizando un diseño de 2 factores: tipo de procesamiento (control, TH, NAC-CaCl₂ y TH + NAC-CaCl₂) y días de almacenamiento (0, 6, 12, 18 y 24). Se consideró una charola como una unidad experimental. Se utilizaron 2 unidades experimentales por tratamiento con 8 repeticiones para firmeza y color, mientras que para contenido fenólico y actividad enzimática se utilizaron 3 repeticiones. Para la concentración de gases (O₂ y CO₂) se tomaron 4 repeticiones por tratamiento. El ANOVA fue calculado considerando el tipo de procesamiento y los días de almacenamiento con la ayuda del paquete estadístico STATGRAPHICS plus 5.1. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Fisher con un nivel de significancia del 0.05. La elaboración de los gráficos se realizó utilizando el programa SigmaPlot 7.0 (2001).

RESULTADOS

Análisis de gases

Composición de O₂ dentro del envase

Al día 0, la concentración de O₂ promedio para todos los lotes fue de 19.12% (DE=0.85). Durante los primeros 12 días de almacenamiento, este valor fue disminuyendo para todos los tratamientos, en donde las rebanadas de manzana control presentaron los niveles más bajos de O₂ (Figura 1a). A pesar de esto, durante todo el almacenamiento, no se presentaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos.

Composición de CO₂ dentro del envase

Se puede observar que las charolas conteniendo la fruta presentaron una concentración inicial de CO₂ de 0.725% en todos los lotes, la cual fue

aumentando conforme pasaban los días de almacenamiento, acumulándose más rápidamente en frutos control y TH y en menor proporción en frutos tratados con NAC-CaCl₂ y TH+NAC-CaCl₂ (Figura 1b).

Firmeza

Las rebanadas de manzana tuvieron una firmeza inicial promedio de 52.84 N (DE=4.77), la cual se mantuvo casi constante durante los primeros 6 días de almacenamiento sin presentar diferencia estadística significativa entre los tratamientos (Figura 2a). Fue a partir del día 12 en el que se detectaron diferencias, donde los frutos tratados con TH+NAC-CaCl₂ obtuvieron los valores de firmeza más altos significativamente ($p \leq 0.05$) durante todo el almacenamiento, llegando a alcanzar los 55.00 N. Las rebanadas de manzana tratadas con NAC-CaCl₂ tuvieron valores significativamente más altos ($p \leq 0.05$) que el control solamente los días 12 y 18.

Color

Luminosidad (L*)

A partir del día 6 de almacenamiento se empezaron a registrar diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los valores de L* entre los tratamientos, siendo los frutos tratados con la combinación TH+NAC-CaCl₂ quienes presentaron los niveles más altos a lo largo del estudio, con un valor inicial de 80.2 y un valor máximo de 81.4 al día 12 (Figura 2b). Los tratamientos TH y NAC-CaCl₂ también lograron conservar la luminosidad de los frutos, aunque en menor grado que la combinación, mostrando valores más altos que aquellos de las rebanadas de manzana control.

Parámetro a*

Al inicio del estudio, el valor promedio de a* fue -5.51 para todos los frutos (Figura 2c). Las diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) se identificaron a partir del día 6 entre los frutos control y los tratados con NAC-CaCl₂ y TH+NAC-CaCl₂, en donde los frutos tratados con NAC-CaCl₂ y la combinación TH+NAC-CaCl₂ conservaron los valores de a* más bajos durante el resto del almacenamiento.

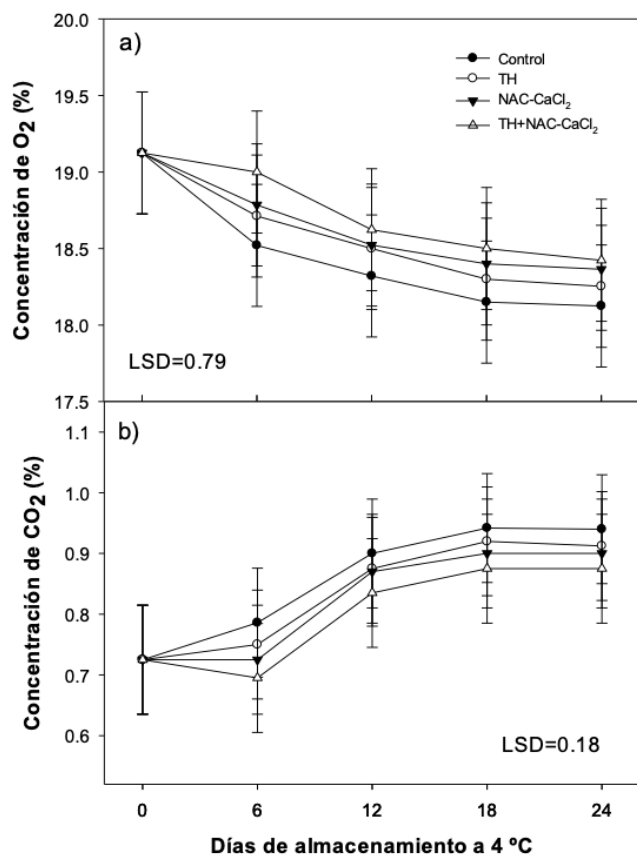


Figura 1. Cambios en la concentración de O₂ (a) y CO₂ (b) en el interior del envase conteniendo rebanadas de manzana Granny Smith tratada hidrotérmicamente (TH), con una solución de N-acetil cisteína y cloruro de calcio (NAC-CaCl₂) y la combinación TH+NAC-CaCl₂ durante el almacenamiento a 4 °C. Barras verticales indican LSD.

Fenoles totales

Conforme avanzaron los días de almacenamiento, el contenido de fenoles en los frutos control se redujo significativamente ($p \leq 0.05$), partiendo de un valor inicial de 273.4 hasta llegar a 149.7 mg ácido gálico/100 gff (Figura 3). Un comportamiento diferente se registró en las rebanadas de manzana tratadas con NAC-CaCl₂ y la combinación TH+NAC-CaCl₂, cuyos niveles de compuestos fenólicos se mantuvieron casi constantes sin detectarse diferencias estadísticas significativas a lo largo del almacenamiento ($p > 0.05$). Por otro lado, las rebanadas tratadas con TH mantuvieron constante su contenido de fenoles hasta el día 12, seguido de una disminución hasta el final del almacenamiento, mostrando diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) con el tratamiento TH+NAC-CaCl₂.

Análisis enzimático

PPO

A lo largo de los 24 días de almacenamiento, no se identificaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la actividad enzimática de PPO entre las rebanadas de manzana tratadas con TH+NAC-CaCl₂, NAC-CaCl₂ y TH, registrando valores iniciales de 513.85 UA/mg proteína y finalizando con valores entre 501.85 y 573.21 UA/mg proteína (Figura 4a). Caso contrario, en los frutos control se observó un aumento significativo ($p \leq 0.05$) en la actividad de esta enzima, llegando a su punto más alto al día 18 con 819.39 UA/mg proteína.

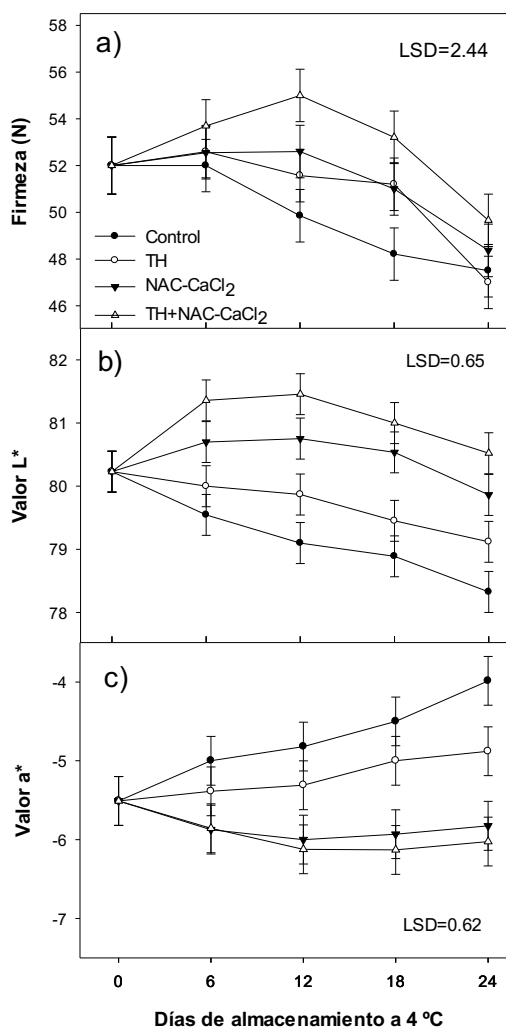


Figura 2. Cambios de firmeza (a), valor de L* (b) y valor de a* (c) en rebanadas de manzana Granny Smith tratada hidrotérmicamente (45 °C) y con aditivos químicos durante el almacenamiento a 4 °C. Barras verticales corresponden a LSD.

POD

Los frutos mostraron un promedio inicial de 61.32 UA/mg proteína, el cual fue aumentando significativamente ($p \leq 0.05$) para el tratamiento control, llegando a su nivel más alto al día 18 con 92.65 UA/mg proteína (Figura 4b). El resto de los tratamientos obtuvieron valores finales significativamente más bajos ($p \leq 0.05$) en comparación con el control, presentando valores entre los 62.25 y los 64.89 UA/mg proteína, distinguiéndose el tratamiento TH+NAC-CaCl₂ al presentar el valor más bajo de actividad al día 12 con 59.8 UA/mg proteína.

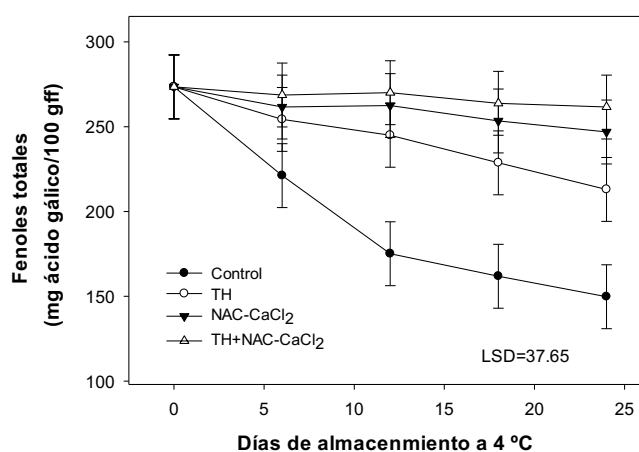


Figura 3. Contenido de compuestos fenólicos totales en rebanadas de manzana Granny Smith tratada hidrotérmicamente (TH), con una solución de N-acetilcisteína y cloruro de calcio (NAC-CaCl₂) y la combinación TH+NAC-CaCl₂ durante el almacenamiento a 4 °C. Barras verticales corresponden a LSD.

DISCUSIÓN

El comportamiento del O₂ y CO₂ a lo largo del almacenamiento pudo ser influenciado por la baja temperatura de almacenamiento y el uso de atmósferas modificadas. La combinación de ambas técnicas ayuda a prolongar la vida útil de frutas y hortalizas mínimamente procesadas, además de mantener su calidad al reducir la tasa de respiración. Los resultados obtenidos en los niveles de O₂ coinciden con los reportados por Ayón-Reyna *et al.* (2019), quienes estudiaron rebanadas de piña tratadas con N-acetilcisteína, las cuales presentaron una disminución de O₂ durante los primeros 10 días de almacenamiento a 5 °C. Concentraciones bajas de O₂ y/o elevadas de CO₂, dentro de los límites de tolerancia, logran reducir la actividad metabólica del fruto y la biosíntesis de etileno, así como también frena los procesos de maduración (Pinto de la Vega, y Cañarejo, 2016). Siddiq *et al.* (2020)

observaron que el uso de atmósferas modificadas logró extender con éxito la vida útil de las peras d'Anjou frescas cortadas a 21 días, sin presentar cambios de color.

El incremento de la firmeza de los frutos tratados con TH+NAC-CaCl₂ pueden derivar del efecto sinérgico producido por la combinación del calcio con el tratamiento térmico. Por separado, el TH previene la degradación de la pared celular compuesta por celulosa y pectina al lograr inhibir enzimas como PG y PME, las cuales atacan la pared del fruto reduciendo su firmeza (Naser *et al.*, 2018). Por otro lado, la incorporación de calcio en una concentración adecuada puede formar puentes de hidrógeno con la pectina, ayudando a mantener la integridad de la pared celular (Xu *et al.*, 2020). Resultados similares fueron obtenidos por Naser *et al.* (2018) quienes probaron una combinación de lactato de calcio y tratamiento hidrotérmico, logrando una mayor retención de firmeza en frutos de caqui. De igual manera, Xu *et al.* (2020) obtuvieron valores de firmeza más altos en frutos de chile tratados con la combinación TH-CaCl₂ que en aquellos que solo fueron tratados con TH o CaCl₂ por separado.

El color de los frutos se vio afectado por los distintos tratamientos. Para L*, aquellas rebanadas cuyo tratamiento incluían NAC-CaCl₂ en su formulación presentaron mayores valores de luminosidad que el control y el TH, lo cual puede deberse al efecto del antioxidante del NAC sobre el fruto para evitar el oscurecimiento enzimático. Los antioxidantes pueden reaccionar con el oxígeno para evitar el inicio del oscurecimiento en el fruto o con productos intermedios para romper la reacción en cadena, mientras inhibe la síntesis de melanina al reducir las o-quinonas a su compuesto fenólico original (Moon *et al.*, 2020). En el caso del NAC, este puede actuar como agente reductor e inhibidor de PPO por medio de la formación de complejos. Fan, Sokorai y Phillips (2018) trataron rebanadas de manzana Granny Smith con una formulación de ácido cítrico, ácido ascórbico y NAC, manteniendo valores de L* mayores a 70. A su vez, el TH ayuda a retrasar el proceso de maduración de los frutos, además de aumentar su vida útil y preservar su calidad (López-López *et al.*, 2013). Por otro lado, los frutos tratados con TH+NAC-CaCl₂ y NAC-CaCl₂ mantuvieron bajos los valores del parámetro a*, lo cual indica que ambos tratamientos lograron evitar la formación de pigmentos no deseados, previniendo el comienzo del oscurecimiento al reaccionar con el O₂ o con los productos intermedios, deteniendo la reacción en cadena y previniendo la formación de melanina. Pleșoianu y Nour (2022) usaron un recubrimiento de pectina combinado con una inmersión en solución de N-acetilcisteína al 1% en pera, logrando mantener los niveles

de a^* durante su almacenamiento. Así mismo, Fan, Sokorai y Phillips (2018) aplicaron una combinación de ácido cítrico, ácido ascórbico y NAC en manzanas rebanadas, cuyo modelo sugirió que el NAC fue el compuesto más importante para mantener los valores de a^* bajos, logrando que el oscurecimiento disminuyera al aumentar su concentración.

La disminución en el contenido de fenólicos totales puede estar relacionada a la actividad oxidante de la enzima PPO, la cual usa fenoles como sustrato para producir compuestos como o-quinonas, causantes del oscurecimiento enzimático en frutos (Prasad *et al.*, 2016). Las rebanadas tratadas con TH+NAC-CaCl₂ y NAC-CaCl₂ tuvieron una mejor preservación de los compuestos fenólicos, probablemente por efecto del NAC. Brannan y Wang (2017) probaron un tratamiento con NAC en pulpa de pawpaw, la cual no mostró disminución en los fenólicos totales durante el almacenamiento, relacionando que el NAC posee actividad inhibitoria sobre el PPO al poder reaccionar con las quinonas en la etapa inicial de la reacción enzimática de oscurecimiento para reducir las o-difenoles, produciendo productos incoloros. A su vez, el calcio ayuda a mantener la integridad de la célula, lo cual beneficia la conservación de fenólicos al evitar una lisis celular en donde la PPO se ponga en contacto con los compuestos fenólicos y el oxígeno (Nogales-Delgado, 2021). Las rebanadas con TH lograron mantener buenas concentraciones de fenólicos, lo cual puede estar ligado a la desnaturalización de la enzima a temperaturas altas, haciendo cambios en su estructura terciaria (Shrestha *et al.*, 2020).

Por su parte, el aumento en la actividad de PPO pudo deberse a la concentración de O₂ presente en el empaque, la cual fue suficiente para activar a la enzima y que comenzara a formar quinonas. Generalmente, la PPO se localiza en los plastidios y las sustancias fenólicas en las vacuolas de la célula. Cuando el tejido se daña, la enzima entra en contacto con los sustratos fenólicos y se produce oscurecimiento (Cerit *et al.*, 2020). Aquellas rebanadas de manzana tratadas con TH+NAC-CaCl₂ y NAC-CaCl₂ alcanzaron los niveles más bajos de actividad enzimática, lo cual puede estar ligado a la actividad inhibitoria del NAC sobre PPO al reducir las o-quinonas a sus precursores de o-difenol. Cerit *et al.* (2020) trataron varas de papa con NAC, logrando inhibir la actividad de PPO. Por otro lado, los iones de calcio pueden disminuir la actividad de la enzima PPO durante el almacenamiento, probablemente por su contribución a la reducción del daño celular. Kou *et al.* (2015) trataron peras mediante inmersión en CaCl₂ al 2%, y concluyeron que la inhibición de PPO fue la razón por la que los tratamientos tuvieron un menor riesgo

de trastorno del oscurecimiento. El TH logró disminuir la actividad enzimática al inactivar la PPO. Rodríguez-Arzuaga y Piagentini (2019) redujeron la actividad de esta enzima en manzana cultivar "Eva" mediante un TH (40 °C – 50 °C) antes de cortarlas en gajos.

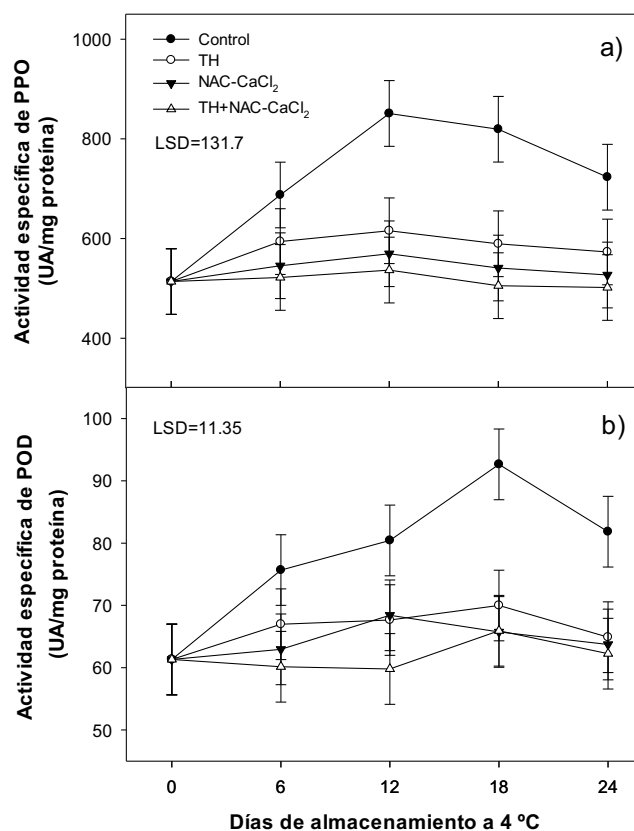


Figura 4. Cambios en la actividad específica de PPO (a) y POD (b) de rebanadas de manzana Granny Smith tratada hidrotérmicamente (TH) previo al procesamiento mínimo seguido de la inmersión en aditivos químicos y almacenada a 4 °C. Las barras verticales corresponden a LSD.

Los frutos control presentaron los valores más altos de actividad específica de POD, lo cual concuerda con las altas pérdidas de fenólicos y los índices más altos en oscurecimiento. Comparando con la actividad enzimática de la PPO, se presentan menores niveles de POD en las rebanadas de manzana. A pesar de esto, puede ser responsable de mejorar la degradación de los fenólicos cuando coexiste con las PPO (Shrestha *et al.*, 2020). Se ha reportado que los TH acompañados con antioxidantes han ayudado a la disminución de la actividad enzimática, por ejemplo, López-López *et al.* (2013) reportaron resultados similares a los obtenidos en este estudio, ya que observaron que la combinación de un tratamiento hidrotérmico seguido de la inmersión en N-acetilcisteína

y cloruro de calcio inhibió de manera efectiva la actividad de las enzimas PPO y POD de rebanadas de manzana cv. Red Delicious. Por su parte, Shrestha *et al.* (2020) observaron que un tratamiento de escaldado en agua caliente a 60 °C combinado con 1% de ácido ascórbico logró reducir la actividad de la POD en rodajas de manzana Elstar.

CONCLUSIÓN

El procesamiento mínimo acelera la actividad metabólica y los procesos de oxidación de manzana mínimamente procesada. En este sentido, la combinación de tratamiento hidrotérmico más aditivos químicos aplicados a rebanadas de manzana disminuyó la velocidad de deterioro y mantuvo la calidad, retrasando la presencia de oscurecimiento. En general, la aplicación de TH+NAC-CaCl₂ resultó ser efectiva para conservar la calidad de las rebanadas de manzana, siendo una buena alternativa para prolongar su vida de anaquel.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECyT) por el apoyo económico otorgado para la realización del trabajo experimental.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

REFERENCIAS

- Ayón-Reyna, L. E., Ayón-Reyna, L. G., López-López, M. E., López-Angulo, G., Pineda-Hidalgo, K. V., Zazueta-Niebla, J. A. and Vega-García, M. O. (2019). Changes in ascorbic acid and total phenolics contents associated with browning inhibition of pineapple slices. *Food Science and Technology*. 39(3), 531-537. <https://doi.org/10.1590/fst.21117>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brannan, R. G. and Wang, G. (2017). Effect of Frozen Storage on Polyphenol Oxidase, Antioxidant Content, and Color of Pawpaw (*Asimina triloba* [L.] Dunal) Fruit Pulp. *Journal of Food Research*, 6(3), 93-101. <https://doi.org/10.5539/jfr.v6n3p93>
- Cerit, İ., Pfaff, A., Ercal, N. and Demirkol, O. (2020). Postharvest application of thiol compounds affects surface browning and antioxidant activity of fresh-cut potatoes. *Journal of Food Biochemistry*, 44(10), e13378. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13378>
- Fan, X., Sokorai, K. and Phillips, J. (2018). Development of antibrowning and antimicrobial formulations to minimize *Listeria monocytogenes* contamination and inhibit browning of fresh-cut “Granny Smith” apples. *Postharvest Biology and Technology*, 143, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.04.009>
- Giannakourou, M. C. and Tsironi, T. N. (2021). Application of processing and packaging hurdles for fresh-cut fruits and vegetables preservation. *Foods*, 10(4), 830. <https://doi.org/10.3390/foods10040830>
- Kou, X., Wu, M., Li, L., Wang, S., Xue, Z., Liu, B. and Fei, Y. (2015). Effects of CaCl₂ dipping and pullulan coating on the development of brown spot on “Huangguan” pears during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*. 99, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.08.001>
- López-López, M., Vega-Espinoza, A., Ayón-Reyna, L., López-Valenzuela, J. and Vega-García, M. (2013). Combined effect of hot water dipping treatment, N-acetylcysteine and calcium on quality retention and enzymatic activity of fresh-cut apple. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 11, 243-248. https://www.academia.edu/37624334/Combined_effect_of_hot_water_dipping_treatment_N_acetylcysteine_and_calcium_on_quality_retention_and_enzymatic_activity_of_fresh_cut_apple
- Moon, K. M., Kwon, E.-B., Lee, B. and Kim, C. Y. (2020). Recent trends in controlling the enzymatic browning of fruit and vegetable products. *Molecules*. 25(12), 2754. <https://doi.org/10.3390/molecules25122754>
- Naser, F., Rabiei, V., Razavi, F. and Khademi, O. (2018). Effect of calcium lactate in combination with hot water treatment on the nutritional quality of persimmon fruit during cold storage. *Scientia Horticulturae*. 233, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.036>
- Nogales-Delgado, S. (2021). Polyphenoloxidase (PPO): Effect, Current Determination and Inhibition Treatments in Fresh-Cut Produce. *Applied Sciences*. 11(17), 7813. <https://doi.org/10.3390/app11177813>
- Pinto, N., de la Vega, J. and Cañarejo, M. (2016). Utilización del método de conservación bajo atmósferas controladas en frutas y

- hortalizas. *Agroindustrial Science*. 6(2), 231-238.
<https://doi.org/10.17268/agroind.science.2016.02.08>
- Pleșoianu, A. M. and Nour, V. (2022). Pectin-based edible coating combined with chemical dips containing antimicrobials and antibrowning agents to maintain quality of fresh-cut pears. *Horticulturae*. 8(5), 449.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae8050449>
- Prasad, K., Sharma, R. R. and Srivastav, M. (2016). Postharvest treatment of antioxidant reduces lenticel browning and improves cosmetic appeal of mango (*Mangifera indica* L.) fruits without impairing quality. *Journal of Food Science and Technology*. 53(7), 2995–3001. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2267-z>
- Rodríguez-Arzuaga, M., Ríos, G. and Piagentini, A. M. (2019). Mild heat treatments before minimal processing reduce browning susceptibility and increase total phenolic content of low-chill apple cultivars. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2019;00:e14209. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14209>
- Shrestha, L., Kulig, B., Moschetti, R., Massantini, R., Pawelzik, E., Hensel, O. and Sturm, B. (2020). Optimization of Physical and Chemical Treatments to Control Browning Development and Enzymatic Activity on Fresh-cut Apple Slices. *Foods*. 9(1), 76. <https://doi.org/10.3390/foods9010076>
- Siddiq, R., Auras, R., Siddiq, M., Dolan, K. D. and Harte, B. (2020). Effect of modified atmosphere packaging (MAP) and NatureSeal® treatment on the physico-chemical, microbiological, and sensory quality of fresh-cut d'Anjou pears. *Food Packaging and Shelf Life*. 23. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100454>
- Xu, H., Wang, Y., Ding, S., Zhou, H., Jiang, L. and Wang, R. (2020). Effect of hydrothermal-calcium chloride treatment on pectin characteristics and related quality in green peppers during storage. *Journal of Food Science and Technology*. 58(10), 3712–3724. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04829-0>
- Yousuf, B., Qadri, O. S. and Srivastava, A. K. (2018). Recent developments in shelf-life extension of fresh-cut fruits and vegetables by application of different edible coatings: A review. *Food Science and Technology*. 89, 198–209.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.05>