



MÁSTER EN GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Vista la solicitud presentada por el/la alumno/a D./Dña. DIANA CAROLINA VILLAMIZAR SILVA , la Comisión Académica del Máster le autoriza la realización del Trabajo Fin de Máster enmarcado en la línea de investigación "ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD FISICOQUÍMICA Y FUNCIONAL DE UN SNACK SIMBIÓTICO A PARTIR DE MANZANA ELABORADA POR IMPREGNACIÓN A VACÍO" bajo la Dirección Académica de D./Dña. CRISTINA BARRERA PUIGDOLLERS, debiendo ajustarse a las Normas establecidas para la redacción y presentación de dichos Trabajos.

Codirectores/as (si procede): NOELIA BETORET VALLS

Director/a Experimental (si procede): INDIRA BETALLELUZ PALLARDEL

Tutor/a (si procede):

Valencia, 4 de junio de 2012

EL DIRECTOR DEL MÁSTER



Daniel Vidal Brotons

** (Esta solicitud será incluida en todos los ejemplares del Trabajo, como primera página tras la portada)

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD FISICOQUIMICA Y FUNCIONAL DE UN SNACK SIMBIÓTICO ELABORADO A PARTIR DE MANZANA POR IMPREGNACIÓN A VACÍO

Diana Carolina Villamizar, Noelia Betoret Valls¹, Cristina Barrera Puigdollers²
Indira Betalleluz Pallardel³

RESUMEN

Con la finalidad de desarrollar un producto con propiedades simbióticas a partir de manzana (var. *Granny Smith*) utilizando la combinación de las técnicas de impregnación a vacío, con zumo de mandarina enriquecido con oligofructosa, inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp *salivarius*, y secado por aire caliente, se determinaron las características fisicoquímicas, funcionales, y las propiedades mecánicas y ópticas en cada una de las etapas de proceso y durante el almacenamiento de las muestras hasta 150 días.

Los resultados obtenidos demuestran que la impregnación a vacío (IV) es una operación adecuada para la incorporación de compuestos antioxidantes y permite mantener la viabilidad del microorganismo. Sin embargo, el secado a 40 °C durante 24 horas produce cambios importantes en las propiedades funcionales, fisicoquímicas y sensoriales. El contenido en probiótico en el producto seco fue superior a 10⁶ ufc/g al iniciar el almacenamiento, nivel que descendió en los primeros 15 días del estudio. A partir de este momento no se encontraron recuentos. Con respecto al resto de propiedades funcionales evaluadas, únicamente el contenido en ácido ascórbico disminuyó de forma acusada a partir de los 30 días de almacenamiento.

En estudios previos se ha demostrado que la actividad del agua y la humedad son parámetros críticos que afectan la viabilidad del probiótico, las propiedades fisicoquímicas y funcionales del snack de manzana.

RESUM

Amb la finalitat de desenvolupar un producte amb propietats simbiòtiques a partir de poma (var. *Granny Smith*) utilitzant la combinació de les tècniques d'impregnació a buit amb suc de mandarina enriquit amb oligofructosa, inoculat amb *Lactobacillus salivarius* spp *salivarius* i assecat per aire calent, es van determinar les característiques fisicoquímiques, funcionals, i les propietats mecàniques i òptiques en cada una de les etapes de procés i

^{1, 2} Instituto de Ingeniería de los Alimentos para el Desarrollo. Universitat Politècnica de Valencia. Camino de Vera, s/n 46022. Valencia. España.

³ Universidad Nacional Agraria La Molina. Avenida La Molina s/n La Molina. República del Perú.

durant l'emmagatzematge de les mostres fins a 150 dies. Els resultats obtinguts demostren que la impregnació a buit (IV) és una operació adequada per a la incorporació de compostos antioxidants i permet mantindre la viabilitat del microrganisme. No obstant això, l'assecat a 40 °C durant 24 hores produïx canvis importants en les propietats funcionals, fisicoquímiques i sensorials. El contingut en probiòtic en el producte sec va ser superior a 10⁶ ufc/g a l'iniciar l'emmagatzemament, nivell que va descendir en els primers 15 dies de l'estudi. A partir d'aquest moment no es van trobar recomptes. Respecte a la resta de propietats funcionals avaluades, únicament el contingut en àcid ascòrbic va disminuir de forma acusada a partir dels 30 dies d'emmagatzemament. En estudis previs s'ha demostrat que l'activitat de l'aigua i la humitat són paràmetres crítics que afecten la viabilitat del probiòtic, les propietats fisicoquímiques i funcionals del aperative de poma.

ABSTRACT

With the aim of developing a product with symbiotic effect from apple (var. Granny Smith) combining of vacuum impregnation techniques tangerine juice enriched with oligofructose, inoculated with *Lactobacillus salivarius* spp *salivarius* and hot air drying, physicochemical characteristics were determined, functional, mechanical and optical properties in each of the processing steps and during storage of the samples up to for 150 days.

The results show that vacuum impregnation (IV) is a suitable operation for the incorporation of antioxidant compounds and allows maintaining the viability of the microorganism. However, drying at 40 °C for 24 hours produces important changes in the functional properties, physicochemical and sensory. Probiotic content in the dried product was greater than 10⁶ cfu / g to start the storage level decreased in the first 15 days of the study. At this moment there are no counts. With respect to other functional properties evaluated, only ascorbic acid content decreased sharply after 30 days of storage.

Previous studies have shown that the water activity and moisture content are critical parameters that affect the viability of the probiotic, the physicochemical and functional properties of the apple snack.

PALABRAS CLAVE: *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*, impregnación a vacío, secado por aire caliente, actividad antioxidante, oligofructosa, almacenamiento.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una demanda creciente de alimentos funcionales y entre ellos de productos enriquecidos con probióticos y prebióticos.

Las ingesta de manzana se asocia con una disminución del riesgo de cáncer de próstata, hígado, colon y enfermedades cardiovasculares. Algunos de estos beneficios para la salud podrían derivarse de la presencia de polifenoles y de su actividad antioxidante (Röðlea et al., 2010), y se considera por tanto una excelente fuente para el desarrollo de alimentos funcionales.

Por otra parte varios estudios científicos han demostrado que las células microbianas tienen un efecto beneficioso sobre la salud y el bienestar del huésped si se suministran en cantidades apropiadas. Las bacterias probióticas se utilizan principalmente en alimentos fermentados, y los productos lácteos tienen un papel predominante como portadores de los mismos. Con el fin de diversificar la oferta de alimentos funcionales, se estudia la supervivencia de las bacterias probióticas en matrices de alimentos no fermentados y productos no lácteos (Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro, 2010).

Por otra parte los fructooligosacáridos se clasifican como prebióticos y se han definido como "ingredientes que permiten cambios específicos en la composición y/o actividad en la microbiota gastrointestinal, confiriendo beneficios a la salud". Estos efectos beneficiosos sin embargo están indirectamente generados, cuando los prebióticos alimentan selectivamente una o un número limitado de microorganismos y causan por lo tanto, una modificación selectiva de la microflora intestinal del huésped. El uso de la oligofruktosa como ingrediente funcional ha sido estudiado ampliamente, en particular, en los productos lácteos, ya que han demostrado mejorar la salud mediante la manipulación de la composición de la microflora del colon debido a su efecto prebiótico (Röðlea et al., 2010).

Los avances tecnológicos y en particular la impregnación a vacío permiten modificar la composición de las matrices de frutas y hortalizas de una manera controlada (Betoret et al., 2003), permitiendo que estos sustratos sean ideales para la introducción de los probióticos y de otros compuestos funcionales, ya que carecen de los alérgenos lácteos no recomendados para ciertos segmentos de la población (Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro, 2010). Adicionalmente, la estabilización de productos funcionales utilizando el secado por aire caliente, si bien puede afectar la funcionalidad de algunos componentes, permite prolongar la vida útil para su posterior comercialización.

Con el fin de obtener un snack de manzana con efecto simbiótico se ha estudiado el efecto de la impregnación a vacío con zumo de mandarina enriquecido con oligofruktosa y del secado por aire caliente, e inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (probiótico), sobre sus características fisicoquímicas y funcionales, y su evolución a lo largo del almacenamiento durante 150 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

Se utilizaron manzanas de la variedad *Granny Smith*, en estado de madurez adecuado y con calibre de 80 a 85 mm de diámetro aproximadamente. Se cortaron en discos de 65 cm de diámetro externo, 20 mm de diámetro interno y 5 mm de espesor.

Para la elaboración del líquido de impregnación se utilizó zumo de mandarina de la marca Don Simón. Como fuente de prebiótico se utilizó (oligofructano) Beneo™ P95 de ORAFTY (pureza 93,2%).

El microorganismo probiótico empleado fue *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063. La reactivación de los viales de la cepa almacenados en congelación congelados se realizó mediante resuspensión e incubación en el caldo MRS (Scharlau Chemie ®, Barcelona, España), a 37 °C durante 24 horas.

Preparación del líquido de impregnación

El líquido de impregnación se formuló a partir del zumo comercial, que se ajustó a pH 6 con bicarbonato de sodio y se enriqueció con 5% de levadura de cerveza y 5% de fuente comercial de oligofructosa (ORAFTY P95). El líquido se esterilizó a 121 °C durante 20 minutos para evitar la competencia con las bacterias ácido-lácticas y prevenir el excesivo oscurecimiento del medio. Posteriormente el líquido fue inoculado con 0,4% del medio MRS que contenía el microorganismo reactivado y crecido, y se incubó durante 24 horas a 37 °C.

Ensayos de impregnación a vacío (IV)

La operación de impregnación a vacío se llevó a cabo en una cámara a vacío ILMVAE (Alemania). Las manzanas cortadas en rodajas se sumergieron en el líquido de impregnación y se aplicó una presión de vacío al sistema de 50 mbar durante 10 minutos. Posteriormente se restauró la presión atmosférica, manteniendo las muestras sumergidas en el líquido durante otros 10 minutos.

Ensayos de secado por aire caliente

Para el secado de las muestras de manzana impregnadas se utilizó un secador de bandejas Pol- Eko, con flujo de aire transversal, velocidad del aire de 2 m/s, renovación del aire total y humedad relativa de 21±7%. Las muestras de manzana se secaron a 40 °C durante 24 horas.

Ensayos de almacenamiento

Las manzanas secadas por aire caliente se almacenaron en bolsas herméticas (Swiss Pack Pvt) selladas en condiciones de vacío parcial, y

dispuestas en una cabina protegida de la luz, a temperatura de 25 °C durante 5 meses. Las muestras se analizaron inicialmente con una frecuencia quincenal y posteriormente con una frecuencia mensual durante el tiempo estipulado. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Determinaciones analíticas

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

El contenido de *L. salivarius* spp. *salivarius* se determinó por duplicado, tanto en el líquido de impregnación como en las muestras de manzana, por el procedimiento de siembra en placa de acuerdo a los protocolos establecidos por la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF 2000).

Para determinar el contenido microbiano de las muestras de manzana, se homogenizaron 5 g con 45 mL de agua de peptona tamponada, y luego se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} . Para determinar el contenido microbiano en el líquido de impregnación se tomó 1 mL de éste, y se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} .

La siembra de las muestras se realizó en profundidad, con doble capa de agar MRS (Scharlau Chemie ®, Barcelona, España) para garantizar condiciones de micro anaerobiosis, posteriormente las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas.

El recuento del número de unidades formadoras de colonia (ufc) por mililitro de líquido de impregnación y por gramo de manzana se llevó a cabo en las placas cuyo número de colonias se encontraba entre 30 y 300 ufc.

HUMEDAD

La humedad de las muestras se determinó por triplicado según el método oficial 20.013 de la AOAC (1980) para frutas ricas en azúcar. Este método se basa en la determinación de la pérdida de peso que experimenta la muestra cuando se coloca en una estufa de vacío a 60 °C hasta alcanzar peso constante.

ACTIVIDAD DEL AGUA

Se midió la actividad del agua (aw) a 25 °C y por triplicado utilizando un higrómetro de punto de rocío (DECAGÓN Aqualab CX-2, $\pm 0,003$).

PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas de las muestras se evaluaron por triplicado en ocho muestras a 25 °C mediante ensayos de punción llevados a cabo en un Analizador Universal de Textura (TA.XT2, Stable Micro Systems). El ensayo se realizó con un punzón cilíndrico de 2 mm de diámetro. Las condiciones del ensayo fueron: velocidad de avance del punzón de 2,0 mm/s, fuerza de activación de 0,04903N, distancia recorrida por la sonda de

10 mm y celda de carga de 50 kg. Los datos obtenidos en cada ensayo fueron fuerza máxima ($F_{\text{máx}}$, N), distancia a la que se alcanza la $F_{\text{máx}}$ (d, mm) y área bajo la curva hasta la $F_{\text{máx}}$ (A, N·mm).

PROPIEDADES ÓPTICAS

Se realizaron medidas de la reflectancia de las muestras empleando un espectrocolorímetro (Minolta modelo CM-3600d, Tokio, Japón) por triplicado en ocho muestras, utilizando como referencia un iluminante D65 y un observador estándar con un ángulo de visión de 10° (UNE 40-080, 1984). Todas las medidas se realizaron sobre fondo blanco y negro. El carácter translúcido de las muestras de manzana impregnadas se evaluó utilizando la teoría de Kubelka-Munk de dispersión de luz múltiple (Judd y Wyszecki, 1975; Hutchings, 1999; Talens et al., 2002). Las medidas de color se expresaron con base a las coordenadas CIE $L^*a^*b^*$. A partir de las coordenadas de color CIE- $L^*a^*b^*$ se estimaron las coordenadas psicométricas tono (h^*_{ab}) y croma (C^*_{ab}) (ecuaciones 1 y 2).

$$h^*_{ab} = \arctg \frac{b^*}{a^*} \quad (1)$$

$$C^*_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (2)$$

Con el fin de cuantificar los cambios globales de color, se calculó la diferencia de color (ΔE), mediante la ecuación 3.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (3)$$

DETERMINACIÓN DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO

El ácido L-ascórbico fue determinado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) siguiendo el método propuesto por Sánchez-Moreno et al. (2003), y empleando como solvente de extracción una disolución acuosa con un 3% de ácido meta fosfórico y un 8% de ácido acético. En el procedimiento de extracción se efectuaron algunas modificaciones para su optimización, y se realizó en condiciones de nitrógeno para evitar la oxidación del ácido ascórbico. El extracto fue filtrado con un filtro de membrana de nylon de 0,45 μm . La separación del ácido ascórbico se realizó por HPLC (Alianza 1996-Water) usando una columna de fase reversa (Luna II Phenomenex) C18,5 μm (250 \times 4.6 mm de d.i.) y 5 μm (Water) y un detector de diodos. La fase móvil empleada fue una solución de 0,01% de H_2PO_4 , ajustado a pH 2,5–2,6, bajo un sistema isocrático con un caudal fijo en 1,0 mL/min y 20 μL de volumen de inyección. La identificación del ácido ascórbico se realizó comparando el tiempo de retención y espectro de absorción UV-visible con los de un estándar de ácido L-ascórbico (Scharlau) en una longitud de onda de 245 nm. Las medidas fueron realizadas por triplicado y la cuantificación

fue realizada mediante el uso de una curva de calibrado del estándar de ácido ascórbico en un rango de 10 a 100 ppm.

DETERMINACIÓN DE HESPERIDINA

La hesperidina fue determinada siguiendo el método propuesto por Cano et al. (2008) utilizando como solvente de extracción una solución de dimetilsulfóxido y metanol (1:1 v/v). El procedimiento de extracción se optimizó previamente. El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de membrana de nylon de 0,45 μm . La separación de las flavanonas se realizó por HPLC (Alianza 1996-Water) usando una columna de fase inversa C18 (5 μm) acero inoxidable (250 \times 4.6 mm de d.i.) (Water) y un detector de diodos. Las fases móviles empleadas fueron: acetonitrilo (solvente A) y una solución de ácido acético (0,6%) (solvente B). Se empleó un sistema gradiente a 1 mL/min, con un tiempo de corrida de 30 minutos y un volumen de inyección de 10 μL . La hesperidina fue identificada comparando su tiempo de retención y espectro de absorción a 280 nm con un patrón. Se determinaron las concentraciones usando una curva de calibrado estándar externa y los ensayos fueron realizados por triplicado.

DETERMINACIÓN DE FRUCTANOS

Para la determinación de fructanos se siguió el método espectrofotométrico/enzimático de la AOAC 999.03. Los ensayos fueron realizados por triplicado y utilizando un kit enzimático (Megazyme, Bray, Irlanda), el cual consiste en un proceso de extracción con agua a 80 °C y un tratamiento del extracto con una mezcla de enzimas (sucrasa, amilasa, fructanasa) que hidrolizan la sacarosa, el almidón y los fructanos, hasta azúcares reductores (glucosa y fructosa) bajo condiciones de incubación específicas para cada enzima. Finalmente, los azúcares reductores se midieron por espectrofotometría (espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis) a una longitud de onda de 410 nm, después de la reacción de la disolución muestra con el reactivo ácido p-hidro-benzoico hidrazida (PAHBAH) en baño de agua en ebullición.

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó por triplicado utilizando dos métodos: el catión radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), reportado por Roberta et al. (1999), y el método radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) reportando Brand-Williams et al., (1995). El método de extracción utilizado fue el descrito por Michiels et al. (2012) utilizando como solvente acetona/agua/ácido acético (70:28:2 v/v/v) en presencia de nitrógeno para evitar reacciones de oxidación.

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó según el método del reactivo Folin–Ciocalteu (FC) reportado por Singleton y Rossi (1977). El método de extracción utilizado fue el mismo empleado para determinar la capacidad antioxidante y las mediciones se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados a partir del análisis simple de la varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. El análisis fue realizado con el paquete estadístico Statgraphics centurión XVI.I.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio del efecto de la impregnación a vacío y secado por aire caliente sobre las propiedades ópticas, mecánicas y funcionales del snack de manzana

En la tabla 1 se presenta la evolución del contenido de humedad, actividad del agua y concentración de probiótico durante las etapas de impregnación y secado en el proceso de obtención del snack de manzana.

TABLA 1. Contenido de humedad, actividad del agua (aw) y contenido de probiótico en el líquido de impregnación y en las muestras de manzana fresca, impregnada (IV) y seca (SAC).

Muestra	Humedad	aw	Contenido microbiano (UFC/g o mL)
L.IMPREGNACIÓN	-	0,985(0,003)	1,12 (0,03) x10 ⁹ a
FRESCA	0,852 (0,002)a	0,986(0,003)a	-
IV	0,844 (0,002)a	0,989(0,003)a	1,30 (0,06) x 10 ⁸ b
SAC	0,118 (0,001)b	0,449(0,003)b	1,50 (0,03) x 10 ⁷ c

Valor entre paréntesis: desviación estándar.

Promedios con diferentes letras en la misma columna fueron significativamente diferentes (p<0,05)

Los valores obtenidos para las muestras de manzana fresca concuerdan con lo descrito en algunos estudios previos para la misma variedad de fruta (Monzón, 2006; Castelló, 2007;). Las muestras de manzanas impregnada a vacío (IV) no mostraron variaciones significativas con respecto a la composición media inicial evaluada. Sin embargo, las muestras de manzana secas (SAC), presentaron una disminución de su actividad del agua y humedad por efecto del tratamiento. Los valores establecidos para las muestras de manzana IV y SAC son próximos a los reportados en estudios previos por Salvatori et al. (1998) y Betoret et al., (2012).

En el proceso de impregnación a vacío puede observarse que la actividad del agua del líquido de impregnación fue igual a la actividad del agua de la manzana fresca, lo que demuestra su carácter isotónico e indica que en el proceso de impregnación la diferencia de presión fue la única fuerza impulsora responsable del transporte de masa, no habiendo transporte por ningún otro mecanismo (Fito et al., 1996). En estas condiciones, es posible calcular teóricamente la cantidad de líquido incorporado y por tanto, el contenido en probióticos en las muestras impregnadas, obteniéndose un valor de $1,9 \times 10^8$ ufc/g, valor similar al determinado experimentalmente.

En una investigación anterior de Betoret et al. (2012) se ha comprobado que el zumo de mandarina con levadura panaria es un buen medio de crecimiento para la cepa *L. salivarius* spp. *salivarius* llegando a concentraciones del orden de $2,754 \pm 0,012 \times 10^8$ ufc/cm³. En este estudio se ha incorporado levadura de cerveza, ya que según Rakin et al. (2004) esta contribuye al aumento del número de bacterias viables. Así mismo, la inclusión de oligofructosa le otorga el carácter prebiótico, además de que ha sido descrita en formulaciones de yogurt como elemento eficaz para el crecimiento y viabilidad de dichas bacterias (Capela et al., 2006).

El contenido microbiano obtenido en el líquido de impregnación, mayor al reportado en los estudios previos de Betoret et al. (2012), permite establecer una relación entre la formulación de este y una mayor producción de biomasa por el suministro de mejores condiciones nutricionales a la cepa.

También se observa en la Tabla 1 que el secado a 40 °C, elegido como tratamiento de estabilización, ha significado un descenso de aproximadamente un ciclo logarítmico en el contenido de probiótico, resultado que confirma lo obtenido por Betoret et al. (2012); este descenso estaría relacionado con daños en la pared celular, en la membrana y en los componentes intracelulares del prebiótico durante el secado, tal como señala Farnworth y Champagne (2008). No obstante, la concentración del microorganismo aún se encuentra en los niveles requeridos para considerarse como alimento probiótico (Samona y Robinson, 1991).

Los valores obtenidos de actividad del agua y humedad de la manzana impregnada (IV) y seca (SAC) determinaron su estabilidad microbiológica. Al respecto Rahman (2010) refiere que una actividad del agua de 0,6 es un margen seguro para el crecimiento microbiano. Señala que ninguna bacteria patógena puede crecer con una actividad del agua por debajo de 0,85 y en el caso de mohos y levaduras, no se detecta crecimiento por debajo de una actividad del agua de 0,6, por lo que el valor obtenido puede considerarse seguro. Desde el punto de vista de la supervivencia del probiótico, diferentes investigaciones han reportado que valores de actividad del agua aseguran la estabilidad del microorganismo en almacenamiento. Nualkaekul et al. (2011) demostraron que la actividad del agua tiene un efecto significativo en la supervivencia de células de *Lactobacillus plantarum* en refrescos en polvo de frutas almacenadas, y señalaron como valores de actividad del agua entre 0,1 y 0,3 favorables para la estabilidad del microorganismo. Intervalos similares de actividad del agua (0,1 a 0,214) son reportados por Passot et al. (2012) para *Lactobacillus bulgaricus* CFL1 liofilizado, ya que a dichos valores posiblemente el agua interacciona con los grupos funcionales y bloquea los

sitios de reacción, evitando así la interacción con el oxígeno y las reacciones de oxidación que generan la degradación de lípidos y proteínas del probiótico.

En las Tabla 2 se presentan las propiedades ópticas con los valores medios de las coordenadas de color L^* , a^* , b^* para las muestra frescas, impregnadas (IV) y manzana secas (SAC), así como las diferencias de color (ΔE).

TABLA 2. Valores medios de las coordenadas de color L^* , a^* , b^* y de las magnitudes tono (h^*ab) y croma (C^*ab), de manzana fresca, manzana impregnada (IV) y manzana seca (SAC). Diferencias de color (ΔE) respecto a la muestra obtenida en la etapa anterior.

Muestra	L^*	a^*	b^*	h^*ab	C^*ab	ΔE
FRESCA	75 (2)a	0,7 (0,8)a	22 (2)a	88 (2)a	22 (2)a	-
IV	58 (7)b	-0,1 (0,3)a	26 (2)b	142 (87)b	26 (2)b	18 (6)a
SAC	60 (3)b	7,5 (0,4)b	37,9 (1,4)c	78,9 (0,7)a	38,8 (1,3)c	17 (4)a

Valor entre paréntesis: desviación estándar.

Promedios con diferentes letras en la misma columna fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Las coordenadas de color L^* , a^* , b^* para las muestras de manzana fresca son muy similares a los reportados en el estudio de Vega-Gálvez et al., (2012). La impregnación a vacío afecta directamente los valores de luminosidad (L^*), que descienden debido al intercambio parcial de gas por la solución de impregnación, lo cual induce valores de índice de refracción más homogéneos en el tejido, asociados con una mayor translucidez (Contreras et al., 2008). Por otra parte, no se estableció una diferencia significativa para la coordenada a^* entre las muestras frescas e IV, lo cual indica que se mantiene el color verdoso característico de la manzana. No obstante, la coordenada cromática b^* presenta un ligero aumento que indica una evolución hacia el color amarillo, debido al uso del zumo de mandarina como líquido de impregnación, ya que este es reconocido por su alto contenido en carotenoides, componentes que proveen el característico color a la fruta (Navarro et al., 2010).

Las muestras de manzana SAC no presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a la manzana impregnada en el valor de luminosidad (L^*). Por el contrario, la coordenada cromática a^* aumentó considerablemente, generando en las muestras coloraciones rojizas, que pueden estar relacionados con los procesos de pardeamiento no enzimático favorecido por la temperatura de secado tal y como se corrobora en el estudio de Vega-Gálvez et al. (2012) donde se secaron rodajas de manzanas con aire caliente a 40 °C, 60 °C y 80 °C. Además, se observó un aumento significativo en el valor de la coordenada b^* , lo que indica una transición a una coloración más amarilla, y que concuerda con los datos descritos en un estudio previo (Contreras et al., 2008). Probablemente estos cambios se deben al efecto de la combinación de la concentración de los compuestos carotenoides incorporados en la impregnación y/o cambios

causados por la isomerización de sus moléculas sometidas a temperaturas de 40 °C (Dhuique-Mayer et al., 2007; Pereira et al., 2011).

Por otra parte, se evidenció una disminución en el valor de tono (h^*ab) con respecto a las muestras frescas e impregnadas, valor que se acerca a tonalidades naranjas, resultado relacionado con los procesos de secado y pardeamiento. Los valores de croma (C^*ab) aumentan debido a una ganancia en la saturación del color por los tratamientos aplicados, ya que el color inicial de la muestra es poco saturado (pálido).

Finalmente, se evaluó la diferencia de color (ΔE) entre las muestras frescas e IV, estableciéndose un elevado valor que se justifica mayoritariamente por el efecto de la impregnación a vacío sobre la luminosidad y sobre el tono. Con respecto a las muestras de manzana secas (SAC) la diferencia de color no es significativa, aunque continua siendo perceptible visualmente producto de la incorporación de componentes de color por el líquido de impregnación, la eliminación de agua y reacciones químicas (Lee et al, 2003).

En la Figura 1 se muestran las curvas típicas obtenidas para cada una de las muestras en los ensayos de determinación de las propiedades mecánicas.

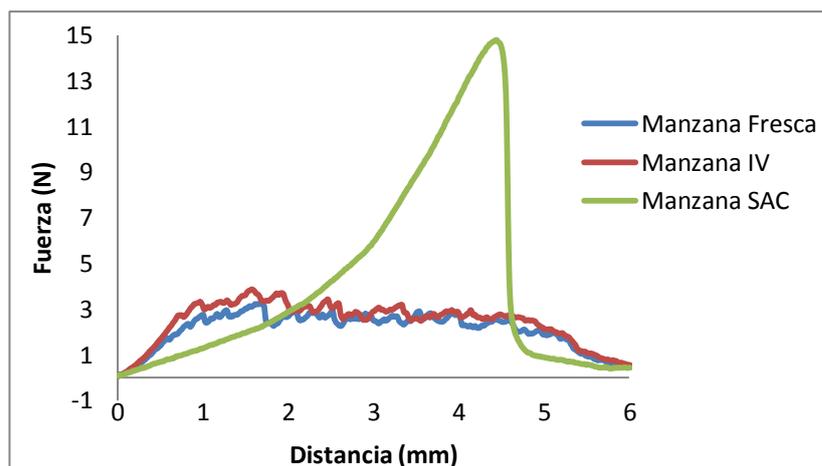


FIGURA 1. Curvas fuerza-deformación obtenidas en el ensayo de punción de muestras de manzana fresca, impregnada (IV) y seca (SAC).

Como se puede observar las curvas correspondientes a las muestras de manzana fresca e impregnada (IV) presentan una serie de picos que indican múltiples fracturas tras alcanzar la fuerza máxima, comportamiento típico de tejidos vegetales frescos y porosos constituidos por células turgentes y fuertemente unidas, con grandes espacios intercelulares (Contreras et al., 2008). Por el contrario, la curva correspondiente a la muestra de manzana seca (SAC) presenta un único pico de fractura seguido por una abrupta caída de la fuerza. El pico de fuerza máxima se relaciona con la resistencia del producto a la fractura (Prothon et al., 2001) y la posterior deformación pronunciada está asociada a que la muestra alcanza un estado gomoso tras el secado. Este comportamiento fue corroborado en el estudio de Contreras

et al. (2008), donde se refiere que el tratamiento de secado implica la formación de una dura capa externa en la fruta deshidratada.

En la Tabla 3 se presenta el contenido en componentes funcionales incorporados en el proceso de impregnación a vacío y obtenidos tras el proceso de secado por aire caliente.

TABLA 3. Contenido de los compuestos funcionales: ácido L-ascórbico, oligofruktosa, hesperidina, fenoles y actividad antioxidante en manzana fresca, manzana impregnada (IV) y manzana seca (SAC).

Muestra	Ácido L-ascórbico (mg /100g)	Oligofruktosa (g/100 g)	Hesperidina (mg /100 g)	Compuestos Fenólicos mg GAE ¹ /100g	Actividad Antioxidante DPPH ²
L.IMPREG	25,24 (1,01)	3,76 (0,04)	50,6 (1,4)	504,26 (10,9)	481,63 (6,82)
M. FRESCA	2,45 (0,03)a	-	-	87,3 (1,2) a	114,2 (1,6) a
M. IV	5,54 (0,24)b	0,684(0,004) a	6,22 (0,091)a	82,03 (0,79) a	114,7 (0,6) a
M. SAC	13,84 (1,21)c	4,16 (0,25) b	36,31 (0,11) b	509 (64) b	755,3 (100,7) b

Valor entre paréntesis: desviación estándar.

Promedios con diferentes letras en la misma columna fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$)

¹Ácido gálico equivalente (GAE)

² Método del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), expresados como mg de ácido ascórbico equivalente por 100 g de producto seco.

Con respecto al contenido de ácido ascórbico, la manzana no es reconocida como una fruta que aporte un alto contenido de esta vitamina. Planchon et al. (2004) señalan que la variabilidad de los niveles de ácido ascórbico entre manzanas de una misma variedad puede ser muy alta, en un intervalo de 2 a 30 mg de ácido ascórbico por 100 g, rango dentro del cual se encontró el contenido de ácido ascórbico en las muestras de manzana fresca. El proceso de impregnación a vacío ha incrementado el contenido de este compuesto en la manzana fresca en 2.5 (± 0.16) veces. Comparando este valor, con el obtenido de la ecuación del modelo de transporte hidrodinámico (Fito et al., 1996) utilizado para calcular el contenido de ácido L-ascórbico en la manzana impregnada (IV) se obtiene un valor de 6,16 mg/100 g. La inestabilidad de este compuesto, acompañado por el contacto con el oxígeno explicaría esta reducción. A partir del contenido de ácido L-ascórbico de las muestras de manzana impregnadas (IV) es posible calcular el contenido teórico de las muestras secas, suponiendo que solo se presenta pérdida de agua y que no existe otro proceso de degradación, dando como resultado 31,3 mg/100 g. Sin embargo, experimentalmente se obtiene un valor de 13,84 mg/100 g lo que supone una pérdida del 44%. Sokhansanj y Jayas (1995) indicaron que las pérdidas de ácido ascórbico durante el secado se encontraban entre el 10% y el 50%, y que la constante de la tasa de deterioro aumenta con el aumento de temperatura de 40 a 70°C. A pesar de la pérdida de ácido L-ascórbico en las muestras de manzana IV, el secado es esencial para disminuir el contenido de agua hasta un nivel en la que reacciones de deterioro enzimáticas y microbianas sean minimizadas.

No obstante, bajo estas condiciones es posible mantener un nivel importante de ácido L-ascórbico, como elemento funcional y nutritivo.

Por otro lado, es destacable la incorporación de oligofructosa en la manzana IV y SAC, ya que este componente es una fibra soluble que complementa la fibra insoluble presente en la manzana, aumentando por consiguiente el aporte de fibra dietética. Esta fibra es uno de los nutrientes más asociados con beneficios para la salud, tales como reducción de colesterol, prevención de la obesidad y la diabetes, cáncer de colon y disminución de la incidencia de enfermedades coronarias y cardiovasculares (Abedawo, 2006; Wakai et al., 2007). En la literatura no existe un claro consenso en el valor de ingesta mínima efectiva de prebióticos requerida para producir un efecto beneficioso. Tomomatsu, (1994) y Roberfroid, (1998) recomiendan entre 2 a 10 g por persona/día y Coussement (1999) recomienda de 3 a 8 g por porción. Otros estudios (Gibson 1999; Rao 1999) sugieren una ingesta de 15 g/día o niveles de 4-12 g/día (Conway, 2001). Por otro lado, teniendo en cuenta el consumo promedio diario de prebióticos que ha sido estimado en Europa (3 a 11 g) (Roberfroid, 2000) y en el caso particular de España con un consumo promedio diario de prebióticos (inulina+oligosacáridos no digeribles) de 1,1 g/día (Espinosa et al., 2006), el producto desarrollado proporciona un aporte importante para completar las dosis saludable. Utilizando la ecuación del modelo de transporte hidrodinámico (Fito et al., 1996) se calculó el contenido de oligofructosa en la manzana impregnada (IV) y se obtuvo un valor de 0,67 g/100 g, valor similar al obtenido experimentalmente, indicando que la impregnación a vacío fue un proceso homogéneo. A partir del contenido de oligofructosa de las muestras de manzana impregnadas (IV), es posible calcular el contenido teórico de las muestras secas (SAC) dando como resultado 3,86 g/100 g, valor muy similar al determinado en el ensayo experimental, y que nos indica que la oligofructosa no sufrió ningún proceso de hidrólisis durante el secado por aire caliente.

Por otra parte, no se observan diferencias entre la actividad antioxidante de la manzana fresca y la manzana impregnada (IV) debido a que la concentración de compuestos fenólicos y antioxidantes es similar, tanto en el líquido de impregnación, como en la manzana. Además, se observó un aumento del potencial antioxidante, posterior al proceso de secado con aire caliente, probablemente relacionado a la mejora de estas propiedades en los compuestos de origen natural o por formación de nuevos compuestos durante la reacción de Maillard, como se ha corroborado en estudios previos de frutas, zumo de naranja y hortalizas (Nicoli et al., 1999; Gil-Izquierdo et al., 2001; Turkmen et al., 2005).

Es destacable el enriquecimiento de la manzana con componentes antioxidantes de tipo flavanonas como la hesperidina aportados por el líquido de impregnación, ya que 100 mL del zumo comercial aportan 54,74 mg de hesperidina. Este compuesto es reconocido por poseer actividad biológica que incluye propiedades antioxidantes, efectos antiinflamatorios e inhibitorios de la biosíntesis de las prostaglandinas. Otros estudios conducidos en animales demostraron que la hesperidina, junto con la β -criptoxantina, inhibe la carcinogénesis química.

Con la ecuación del modelo de transporte hidrodinámico (Fito et al., 1996) se calculó el contenido de hesperidina en la manzana impregnada (IV) y se obtuvo un valor de 9,13 mg/100 g, que es mayor al determinado experimentalmente, demostrando que la impregnación a vacío no fue homogénea, posiblemente por la interacción de este compuesto con partículas del líquido, indicando así una impregnación selectiva, o porque parte de este flavonoide se insolubilizó en forma de cristales en la nube del líquido de impregnación impidiendo un mayor enriquecimiento de la manzana, resultados que han sido corroborados en estudios previos de Gil-Izquierdo et al. (2001) y Betoret et al. (2012). A partir del contenido de hesperidina de las muestras de manzana impregnadas (IV), se realizó el cálculo del contenido teórico de las muestras secas (SAC) obteniéndose un valor de 35,14 mg/100 g, que es muy similar al dato determinado experimentalmente dada la alta estabilidad térmica del compuesto, resultado que ha sido confirmado en estudios previos (Sánchez-Moreno et al., 2005; Dhuique-Mayer et al., 2007; Betoret et al., 2012).

Evolución de las propiedades ópticas, mecánicas y funcionales durante el almacenamiento del snack de manzana

En la tabla 4 se describen los valores medios de humedad y actividad del agua durante el tiempo de almacenamiento,

TABLA 4. Evolución de la humedad, actividad del agua (aw) y contenido microbiano de las muestras secas (SAC), en función del tiempo de almacenamiento.

Tiempo (días)	Humedad	aw	Contenido microbiano (UFC/g o mL)
0	0,118 (0,001)d	0,449 (0,007)bc	2,25 (0,03) x10 ⁷ a
15	0,110 (0,001)c	0,460 (0,011)d	9,25 (0,06) x10 ³ b
30	0,106 (0,002)a	0,459 (0,008)d	-
78	0,106 (0,001)ab	0,446 (0,008)b	-
90	0,115 (0,006)d	0,460 (0,011)d	-
120	0,105 (0,001)a	0,433 (0,008)a	-
150	0,109 (0,0012)bc	0,456 (0,007)cd	-

Valor entre paréntesis: desviación estándar.

Promedios con diferentes letras en la misma columna fueron significativamente diferentes (p<0,05)

Se observa que los valores de humedad durante los 150 días de almacenamiento se mantienen lo suficientemente bajos para evitar el crecimiento de hongos y bacterias no deseables. Los resultados del contenido del probiótico nos indican que después de 15 días de almacenamiento no se detectaron células viables de *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063. En un estudio de Vesterlund et al. (2012) donde se evaluaron diferentes matrices alimentarias cultivadas con *L. rhamnosus* GG a una actividad del agua de 0,43, se encontró la disminución en el recuento

del probiótico y la inviabilidad del mismo después de siete meses de almacenamiento. Cuanto menor es la actividad del agua, mejor es la estabilidad del probiótico en el alimento seco, (Vesterlund et al., 2012) y la supervivencia celular se ve particularmente afectada cuando el alimento tiene una actividad del agua mayor a 0,25 (Weinbreck et al., 2010), valores que superan los obtenidos para la manzana SAC.

Por otra parte, en el estudio de Meng et al. (2008) se trabajó con productos probióticos liofilizados y se determinó que la estabilidad de los mismos durante el almacenamiento requiere un contenido de humedad de aproximadamente 3,5%, siendo el rango óptimo para un producto liofilizado de *L. salivarius* subsp. *salivarius* entre 2.8% a 5.6%, lo cual podría indicar que la humedad de las muestras de manzana secas (SAC) estaría afectando la viabilidad del probiótico en el producto a lo largo del almacenamiento. También se ha indicado que las condiciones de almacenamiento, es decir, la temperatura, la humedad relativa, la composición de la matriz, el contenido de oxígeno, la exposición a la luz y los materiales de almacenamiento, tienen una influencia significativa en la supervivencia de los probióticos en los productos deshidratados (Meng et al., 2008), razones que pueden justificar la inviabilidad de *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 en las muestras de manzana SAC, por lo que se hace necesario establecer un control exhaustivo de todas las variables indicadas. En general el deterioro del probiótico durante el almacenamiento está relacionado con la oxidación de los lípidos de membrana, ya que se oxidan fácilmente a hidroperóxidos que han demostrado inducir daño en el ADN en un sistema modelo y en bacterias (Meng et al., 2008).

El color y la textura de un producto son los parámetros de calidad más importantes a tener en cuenta en el desarrollo del mismo, ya que juegan un papel decisivo en la aceptación final por parte del consumidor. En la tabla 5 se muestra la evolución de las propiedades ópticas medidas en la manzana seca (SAC) durante el almacenamiento.

TABLA 5. Evolución de las coordenadas de color L*, a*, b* y de las magnitudes tono (h*ab) y croma (C*ab), en función del tiempo de almacenamiento. Diferencias de color (ΔE) respecto a la muestra inicial (tiempo 0).

Tiempo (días)	L*	a*	b*	h*ab	C*ab	ΔE
0	60 (3)b	7,5 (0,4)a	37,9 (1,4)b	78,9 (0,7)b	38,8 (1,4)b	-
15	67 (3)c	7,3 (1,4)a	41,7 (1,4)c	80 (2)b	42,3 (1,6)c	0,28 (0,15)a
30	64 (4)c	7,4 (1,4)a	39,7(0,6)bc	80 (2)b	40,4 (0,8)b	0,31 (0,17)a
78	57 (3)ab	10,9 (1,10)b	38,2 (1,4)b	74 (2)a	39,8(1,4)bc	0,51 (0,27)b
90	55 (3)a	10,5 (1,2)b	34,2 (1,4)a	73 (2)a	35,9 (1,4)a	0,47 (0,26)b
120	58 (3)ab	11,4 (0,8)b	37,5(3,8)b	73 (1,07)a	39 (4)b	0,55 (0,22)b
150	57,6 (0,3)ab	11,9 (0,4)b	37,5(1,12)b	72,3(0,3)a	39,4 (1,2)b	0,61 (0,24)b

Valor entre paréntesis: desviación estándar.

Promedios con diferentes letras en la misma columna fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Se observó la disminución de la luminosidad (L^*) y también un ligero incremento de las coloraciones rojizas pardas y amarillas relacionado con un aumento de las coordenadas cromáticas a^* y b^* . Con respecto al tono (h^*ab) se observó un leve descenso a partir de los 30 días, disminución que indica una evolución hacia coloraciones amarillo-rojizas ($<90^\circ$). Estos cambios pueden ser debidos a un marcado pardeamiento enzimático, asociado a la presencia de polifenoles, como el ácido clorogénico, uno de los sustratos más importantes de la enzima polifenol peroxidasa (PPO), que en presencia de oxígeno se convierte en su o-quinona, la cual reacciona con otros compuestos fenólicos, dando como resultado la formación de pigmentos de color amarillo y marrón (Khanizadeh et al., 2008). En el caso del croma (C^*ab), se evidenció una variación en intervalos pequeños, asociado a la variabilidad de las muestras. No obstante, se puede afirmar que al final del tiempo de almacenamiento presentó valores similares al inicial, y por ende no se estableció una evolución de la saturación del color muy marcada (Magdalini et al., 2001).

Para evaluar globalmente el efecto sobre el color durante el almacenamiento se calculó la diferencia de color (ΔE) con respecto a las muestras de manzana secas (SAC). Los resultados mostraron un cambio significativo a los 30 días de almacenamiento y a partir de este tiempo, permaneció con valores constantes. Sin embargo, las diferencias de color establecidas son muy pequeñas (<2) e imperceptibles a simple vista (Lee y Coates, 2003).

La evolución de las propiedades mecánicas durante el almacenamiento se muestra en la tabla 6.

TABLA 6. Evolución de las propiedades mecánicas $F_{m\acute{a}x}$ (N), distancia (mm) y área (N·mm) de las muestras secas (SAC), en función del tiempo de almacenamiento.

Tiempo (días)	$F_{m\acute{a}x}$ (N)	Distancia(mm)	Área (N·mm)
0	13,8 (0,2)d	5,2 (0,3)a	22,9 (1,1)c
15	14,1 (0,6)d	7,5 (0,3)b	25,5 (1,6)d
30	11,8 (0,7)c	5,6 (0,3)bc	21,4 (1,1)c
78	10,7 (0,8)b	6,1 (0,4)d	18,1 (1,1)b
90	11,8 (0,2)c	5,8 (0,2)c	18,2 (0,6)b
120	8,9 (0,3)a	5,7 (0,6)c	13,7 (1,0)a
150	11,2 (0,9)b	5,3 (0,3)ab	16,4 (1,2)b

Valor entre paréntesis: desviación estándar.

Promedios con diferentes letras en la misma columna fueron significativamente diferentes ($p<0,05$)

Durante todo el tiempo de almacenamiento las curvas de fuerza-distancia obtenidas (no mostradas) desarrollaron un comportamiento viscoelástico previo a la fractura con una gran deformación, lo cual podría estar relacionado con el estado gomoso alcanzado al final del proceso de secado y mantenido durante el almacenamiento. No obstante, se evidenció una tendencia a la disminución de la fuerza, fluctuaciones que pueden estar asociadas a la redistribución del agua en el interior del producto.

La evolución en el contenido en compuestos funcionales y la actividad anti radical durante el almacenamiento se presenta en la tabla 7.

TABLA 7. Evolución de los compuestos funcionales: actividad antioxidante, compuestos fenólicos, hesperidina, oligofruktosa y ácido L-ascórbico en función del tiempo de almacenamiento.

Tiempo (días)	Actividad Antioxidante		Compuestos Fenólicos Totales mg GAE ³ /100g	Hesperidina mg/100g	Oligofruktosa g/100g	L-ácido ascórbico mg/100g
	DPPH ¹	ABTS ²				
0	675 (7)d	4263 (418)c	549 (19)c	41,8 (2,3)b	3,7 (0,3)a	8,34(0,9)d
15	626(16)cd	4775(124)c	515 (10)c	-	3,9 (0,5)a	6,89 (0,3)c
30	579 (5)bc	4684(201)c	548 (31)c	40,3 (1,6)b	3,6 (0,3)a	6,85 (1,0)c
78	609(23)cd	3422 (100)b	533 (50)c	37,4 (1,9)a	3,6 (0,5) a	2,68 (0,3)b
90	626(34)cd	3105 (72)b	545 (20)c	40,3 (0,4)b	3,4(0,3)a	3,03 (0,2)b
120	544 (39)b	3448(426)b	457 (24)b	40,2 (1,12)b	3,6(0,5)a	2,01(0,5)a
150	417 (49)a	2437(572)a	387 (24)a	39,7(1,23)ab	3,5(0,3)a	1,53 (0,5)a

Valor entre paréntesis: desviación estándar.

Promedios con diferentes letras en la misma columna fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$)

¹Método del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH⁺), expresados como mg de ácido ascórbico equivalente por 100 g de producto seco.

²Método del radical catión 2,2' ácido azinobis-3-etil- benzotiazolin-6- sulfónico (ABTS⁺), expresados como μ M trolox por 100g producto seco

³Acido gálico equivalente (GAE)

El compuesto más lábil y que se oxida con más rapidez es el ácido L-ascórbico. La tasa de degradación de este depende de algunas condiciones ambientales tales como temperatura, el O₂, la luz, etc., modificando su cinética de degradación como indica Timoumi et al. (2007). Debido a que estas condiciones fueron controladas en el estudio, cabe pensar en otros factores que afectan la estabilidad del compuesto, como la actividad del agua. En un estudio de Corey et al. (2011) la tasa de pérdida de ácido L-ascórbico aumentó con una actividad del agua superior a 0,324, siendo el valor experimental determinado mayor al citado, lo cual indica que este factor puede tener una gran influencia en la pérdida de ácido L-ascórbico en las muestras de manzana SAC. A pesar de la pérdida de ácido L-ascórbico por el proceso de secado y durante el almacenamiento, a los 30 días de almacenamiento la concentración es casi el doble que en la muestra fresca, y al final del mismo la tendencia es conservar su contenido en un valor similar a la concentración en la fruta fresca, siendo este aspecto relevante para determinar la vida útil del producto.

En los últimos años, una amplia gama de ensayos espectrofotométricos se ha adoptado para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, los más utilizados son los ensayos de ABTS y DPPH. Cuando se aplica a

análisis de alimentos, las mediciones de la capacidad antioxidante pueden ser diferentes dependiendo del ensayo utilizado (Floegel et al., 2011).

Según el método DPPH, la disminución en la actividad antioxidante es más acusada entre los 120 y 150 días. Por otra parte, se observó un descenso significativo de la capacidad antioxidante por el método ABTS a partir de los 78 días de almacenamiento, presentándose un nuevo descenso a los 150 días. Floegel et al. (2011) reportaron una fuerte correlación positiva entre el método ABTS y ensayos de DPPH, relación que ha sido demostrada en otros estudios especialmente para el grupo de frutas. El ensayo ABTS es aplicable a sistemas antioxidantes hidrófilos como la vitamina C y lipófilos (Del Caro et al., 2004), en tanto que el ensayo de DPPH es aplicable a sistemas lipófilos. Esto explicaría que el método ABTS reporta un mayor descenso de la actividad antioxidante al estar directamente influenciado por la pérdida de ácido L-ascórbico que el reportado por el DPPH.

Oszmiański et al. (2008) indicaron que las diferencias en las actividades antioxidantes de las frutas podrían estar relacionadas con los diferentes perfiles de los ácidos fenólicos, compuestos flavonoides y derivados que los componen, a pesar de las condiciones controladas del almacenamiento.

Como se observa en la tabla 7, el descenso en el nivel de compuestos fenólicos es significativo a partir de los 120 y 150 días, datos que concuerdan con la pérdida de polifenoles descritos en el estudio de Rößler et al. (2010) y Korus. (2011). En el estudio de Gorinstein et al. (2010) se reportó la alta correlación entre el contenido de polifenoles en tres frutas exóticas y la capacidad antioxidante medida por los métodos de ABTS, DPPH y ensayos de FRAP. Estos resultados en conjunto sugieren que los compuestos fenólicos contribuyen a la capacidad antioxidante de estos alimentos, aunque la contribución no sólo se debe a los flavonoides, sino presumiblemente a la presencia de compuestos fenólicos no flavonoides. Es importante resaltar que la actividad antioxidante y fenólica en las muestras almacenadas disminuyó a un ritmo lento y por ello, es importante considerar el efecto protector del ácido L-ascórbico, como se ha descrito en el estudio de Oszmiański et al., (2008) lo que representa una ventaja en la extensión de la vida útil de las manzanas SAC y de sus propiedades funcionales.

La recomendación establecida en el consumo de polifenoles es muy variable ya que depende de los hábitos dietéticos, disponibilidad, etc., encontrándose rangos que van desde los 500 mg/día a 1 g/día (Mattivi, 2002). Así se puede establecer que el consumo del snack podría cubrir esa ingesta establecida, en niveles similares a frutas como el arándano (600 mg/100g) y siendo una mayor fuente que en la manzana fresca o en otros alimentos en los que se encuentra naturalmente como el vino (257 mg/100ml).

Finalmente el contenido de hesperidina en las muestras de manzana secas (SAC) permaneció estable durante el todo el periodo de almacenamiento, al igual que el contenido de oligofructosa, cuyas concentraciones se mantuvieron constantes a lo largo del almacenamiento.

CONCLUSIONES

Los componentes bioactivos del zumo de mandarina y los añadidos como parte de la formulación del líquido de impregnación (probióticos y prebióticos) han sido incorporados con éxito a la matriz estructural de la manzana mediante la técnica de impregnación a vacío.

Salvo en el caso del ácido L-ascórbico y el probiótico, caracterizados por su inestabilidad frente a altas temperatura y oxígeno, no se observó un efecto significativo en los otros componentes funcionales después de la estabilización por secado con aire caliente. En cualquier caso estos mantuvieron niveles importantes aumentando la calidad funcional de la manzana fresca.

Los niveles de humedad y actividad del agua obtenidos tras el secado con aire caliente, garantizaron la estabilidad microbiológica del producto, aunque estos factores parecen ser responsables de la pérdida del efecto probiótico durante el almacenamiento y de la textura gomosa del producto.

Después de 150 días de almacenamiento a 25 °C, se observó un descenso del 81.6% en el contenido de ácido L-ascórbico, del 29,5% de compuestos fenólicos, del 42,9% y del 38,3% de la actividad antioxidante evaluada por los métodos ABTS y DPPH respectivamente. Por el contrario, la oligofructosa y la hesperidina mostraron una elevada estabilidad, presentando descensos del 6% y del 5% respectivamente. A pesar de las reducciones indicadas, se pone de manifiesto que el proceso de elaboración del snack permite mantener la mayoría de las características funcionales a niveles importantes, y el enriquecimiento con compuestos, que no se encuentran como fuente natural en el producto, y que contribuyen a mejorar su carácter funcional (hesperidina y oligofructosa).

El factor limitante en el desarrollo del producto está asociado a la viabilidad del probiótico que solo se mantuvo durante los primeros 15 días de almacenamiento. Este resultado introduce la necesidad de estudiar con más profundidad la cinética de secado por aire caliente, con la finalidad de establecer el nivel crítico de actividad del agua. También es necesario estudiar la implementación de nuevas herramientas tecnológicas en pro de mejorar las operaciones de procesado para el desarrollo de productos simbióticos con la calidad buscada, como por ejemplo el uso de protectores y/o de sustancias antipardeantes.

AGRADECIMIENTOS

A Monika Dabrowska por su apoyo y trabajo.

REFERENCIAS

- A.O.A.C. (1980). Official methods of analysis (13th edition) Washington DC: Association of official analytical chemists.
- Adebawo, O.; Salau, B.; Ezima, E.; Oyefuga, O.; Ajani, E.; Idowu, G.; Famodu, A.; Osilesi, O. (2006). Fruits and vegetables moderate lipid cardiovascular risk factor in hypertensive patients. *Lipids in Health and Disease* 2006, 5-14.
- Betoret, E., Betoret, N., Arilla, A., Bennár, M., Barrera, C., Codoñer, P., & Fito, P. (2012). No invasive methodology to produce a probiotic low humid apple snack with potential effect against helicobacter pylori. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 289-293.
- Betoret, E., Sentandreu, E., Betoret, N., Codoñer-Franch, P., Valls-Bellés, V., & Fito, P. (2012). Technological development and functional properties of an apple snack rich in flavonoid from mandarin juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16(0), 298-304.
- Betoret, N., Puente, L., Díaz, M. J., Pagán, M. J., García, M. J., Gras, M. L., Fito, P. (2003). Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*, 56(2-3), 273-277.
- Betoret, N., Puente, L., Díaz, M. J., Pagán, M. J., García, M. J., Gras, M. L., Fito, P. (2003). Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*, 56(2-3), 273-277.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Cano A, Medina A, Bermejo A, 2008. Bioactive compounds in different citrus varieties. Discrimination among cultivars. *J Food Compos Anal* 21: 377-381.
- Capela, P., Hay, T. K. C., & Shah, N. P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39(2), 203-211.
- Castelló, M. 2007. Efecto de las condiciones de operación en los cambios fisicoquímicos y fisiológicos de frutas mínimamente procesadas por deshidratación osmótica. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Champagne, C. P., Ross, R. P., Saarela, M., Hansen, K. F., & Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 149(3), 185-193.
- Contreras, C., Martín-Esparza, M. E., Chiralt, A., & Martínez-Navarrete, N. (2008). Influence of microwave application on convective drying: Effects on drying kinetics, and optical and mechanical properties of apple and strawberry. *Journal of Food Engineering*, 88(1), 55-64.
- Corey, M. E., Kerr, W. L., Mulligan, J. H., & Lavelli, V. (2011). Phytochemical stability in dried apple and green tea functional products as related to moisture properties. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 67-74.
- Coussement, P. A. A. (1999). Inulin and oligofructose: Safe intakes and legal status. *Journal of Nutrition*, 129, 1412-1417.
- Del Caro A., Piga A., Vacca V., Agabbio M. (2004). Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chem.* 84: 99-105
- Dhuique-Mayer, C., Tbatou, M., Carail, M., Caris-Veyrat, C., Dornier, M., and Amiot, M. J. Thermal degradation of antioxidants micronutrients in citrus juice. Kinetics and newly formed compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007), pp. 4209-4216.
- Espinosa-Martos, I., E. Rico and P. Ruperez, (2006). Note. Low molecular weight carbohydrates in foods usually consumed in Spain. *Food Sci. Technol. Int.*, 12(2): 171-175
- Fito, P., Andrés, A., Chiralt, A., & Pardo, P. (1996). Coupling of hydrodynamic mechanism and deformation-relaxation phenomena during vacuum treatments in solid porous food-liquid systems. *Journal of Food Engineering*, 27(3), 229-240.
- Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048.

- Gil-Izquierdo Angel, Gil Maria I., Ferrarés Federico, and Barberán Francisco A. Tomas. (2001). In Vitro Availability of Flavonoids and Other Phenolics in Orange Juice. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1035-1041 1035
- Gorinstein, S., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Vearasilp, S., Tashma, Z. (2011). Antioxidant properties and bioactive constituents of some rare exotic thai fruits and comparison with conventional fruits: In vitro and in vivo studies. *Food Research International*, 44(7), 2222-2232.
- Hutchings, J., 1999. Food color and appearance. Aspen Publisher, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- ICMSF. Microorganismos de los Alimentos. Ecología Microbiana de los Productos Alimentarios. [En línea] Editorial Acribia, Zaragoza. Vol. 6 (2000). Dirección URL: < www.librossanitarios.com/detalle.asp?ISBN=84-200-0908-3&codcat=148> [Consulta: Marzo. 2012]
- Judd, D., Wyszecski, G., 1975. Colour in Business. Science and Industry. New York: John Wiley and Sons, INC.
- Khanizadeh, S., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Charles, M. T., & Vasantha Rupasinghe, H. P. (2008). Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(5), 396-401.
- Korus, A. (2011). Effect of preliminary processing, method of drying and storage temperature on the level of antioxidants in kale (*brassica oleracea L. var. acephala*) leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 44(8), 1711-1716.
- Lee, H. S. & Coates, G. A. (2003). Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 36 (1) 153–156.
- Magdalini K. Krokida, Zacharias B. Maroulis & George D. Saracavos. (2001). The effect of method of drying on the color of dehydrated products. *International Journal of Food Science Technology* 36: 53-59.
- Mattivi Fulvio. (2002). Natural polyphenolic antioxidants in the diet. *Medwave*.(10):3322
- Meng, X. C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Daly, C., & Ross, R. P. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, 106(4), 1406-1416.
- Michiels Jean Albert, Kevers Claire, Pincemail Joel, Defraigne Jean Oliver, Dommes Jacques. (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays. *Food Chemistry*, 130 (2012), 986-993
- Monzón, C. 2006. Influencia del método de secado en parámetros de calidad relacionados con la estructura y el color de manzana y fresa deshidratadas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Navarro, J.M., Perez-Perez, J.G., Romero, P. and Botia, P. (2010). Analysis of the changes in quality in mandarin fruit, produced by deficit irrigation treatments. *Food Chem.* 119: 1591-1596.
- Nicoli, M. C., Anese, M., & Parpinel, M. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 94–100.
- Nualkaekul, S., Deepika, G., & Charalampopoulos, D. (2012). Survival of freeze dried *Lactobacillus plantarum* in instant fruit powders and reconstituted fruit juices. *Food Research International*, 48(2), 627-633.
- Oszmiański, J., Wolniak, M., Wojdyło, A., & Wawer, I. (2008). Influence of apple purée preparation and storage on polyphenol contents and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 107(4), 1473-1484.
- Passot, S.; Cenard, S.; Douania, I.; Tréléa, I.C.; Fonseca, F. (2012) Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. *Food Chem.* 132, 1699-1705.
- Pereira, A.L.F.; Maciel, T.C.; Rodríguez, S. (2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Res. Int.* 44, 1276-1283.
- Planchon, V., Lateur, M., Dupont, P., & Lognay, G. (2004). Ascorbic acid level of belgian apple genetic resources. *Scientia Horticulturae*, 100(1–4), 51-61.
- Prothon, F., Ahrné, L. M., Funebo, T., Kidman, S., Langton, M., & Sjöholm, I. (2001). Effects of combined osmotic and microwave dehydration of apple on texture, microstructure and rehydration characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 34(2), 95-101.
- Rahman, M.S. (2010) Food stability determination by macro–micro region concept in the state diagram and by defining a critical temperature. *J. Food Eng.* 99, 402-416.

- Rakin, M., Vukasinovic, M., Siler-Marinkovic, S., & Maksimovic, M. (2007). Contribution of lactic acid fermentation to improved nutritive quality vegetable juices enriched with brewer's yeast autolysate. *Food Chemistry*, 100(2), 599-602.
- Rivera-Espinoza, y Gallardo-Navarro. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27(1), 1-11.
- Roberfroid, M.B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am. J. Clin. Nutr* , 71, 1682S-7S; discussion 1688S-90S.
- Roberta RE, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, and Catherine RE (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization Assay. *Free Radic Biol Med* 26,1231-1237.
- Rößle, C., Brunton, N., Gormley, R. T., Ross, P. R., & Butler, F. (2010). Development of potentially synbiotic fresh-cut apple slices. *Journal of Functional Foods*, 2(4), 245-254.
- Salvatori, D.; Andrés, A.; Chiral, A.; Fito, P. (1998). The response of some properties of fruits to vacuum impregnation. *Journal of Food Process Engineering* 21 (1998) 59-73.
- Samona, A.; Robinson, R.K. (1991). Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 44: 64-66.
- Sanchez-Moreno C, Plaza L, De Ancos B, Cano MP (2003) Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *J Scie Food Agric*. 83: 430–439.
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic. ,* 16, 144-158.
- Sokhansanj, S., & Jayas, D. S. (1995). Drying of food stuffs. In A. S. Mujumdar (Ed.), *Handbook of industrial drying*. 589–625.
- Talens, P., Martínez-Navarrete, N., Fito, P., Chiralt, A., 2002. Changes in optical and mechanical properties during osmodehydrofreezing of kiwifruit. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3: 191-199
- Timoumi, S., Mihoubi, D., & Zagrouba, F. (2007). Shrinkage, vitamin C degradation and aroma losses during infra-red drying of apple slices. *LWT - Food Science and Technology*, 40(9), 1648-1654.
- Tomomatsu, H. (1994). Health effects of oligosaccharides. *Food Technol*. 48:61-65.
- Turkmen Nihal, Sari Ferda, y Velioglu Sedat. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*. 93, 713–718
- Vega-Gálvez, A., Ah-Hen, K., Chacana, M., Vergara, J., Martínez-Monzó, J., García-Segovia, P. Di Scala, K. (2012). Effect of temperature and air velocity on drying kinetics, antioxidant capacity, total phenolic content, colour, texture and microstructure of apple (var. granny smith) slices. *Food Chemistry*, 132(1), 51-59.
- Vesterlund, S., Salminen, K., & Salminen, S. (2012). Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with lactobacillus rhamnosus GG in flaxseed. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 319-321.
- Wakai, K.; Date, C.; Fukui, M.; Tamakoshi, K.; Watanabe, Y.; Hayakawa, N.; Kojima, M.; Kawado, M.; Suzuki, K.; Hashimoto, S.; Tokudome, S.; Ozasa, K.; Suzuki, S.; Toyoshima, H.; Ito, Y.; Tamakoshi, A.; JACC (2007) Study Group Dietary fiber and risk of colorectal cancer in the Japan collaborative cohort study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 16, 668-675.
- Weinbreck, F., Bodnár, I., & Marco, M. L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 364-367.