

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRONÓMICAS
Y DE LOS ALIMENTOS



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO

TALLER DE TÍTULO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Evaluación de recubrimiento comestible con aditivo antimicrobiano
extraído de *Juglans regia*, para comercialización de berries nativos
chilenos

DANIELA COLIPÍ VERGARA

QUILLOTA, CHILE

2018

Contenido

| | |
|---|----|
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Descripción del problema | 2 |
| 3. Hipótesis | 4 |
| 4. Objetivo general..... | 4 |
| 5. Objetivos específicos | 5 |
| 6. Marco Teórico | 5 |
| 6.1. Berries nativos vs introducidos..... | 5 |
| 6.2. Vida poscosecha | 6 |
| 6.3. Recubrimientos comestibles | 8 |
| 6.4. Compuestos fenólicos antimicrobianos..... | 9 |
| 6.5. Residuos de la agroindustria | 9 |
| 7. Materiales y métodos..... | 10 |
| 7.1. Caracterizar el perfil y la concentración de compuestos fenólicos presentes en el exocarpo de nogal var. Chandler | 10 |
| 7.2. Evaluar in vitro el potencial antimicrobiano de diferentes concentraciones de extracto de exocarpo de nuez | 11 |
| 7.3. Elaborar y evaluar diferentes formulaciones de recubrimientos sobre la preservación de atributos de calidad organoléptica y microbiológica deseables en berries nativos (calafate, murta y maqui) durante el almacenamiento prolongado | 13 |
| 7.4. Evaluar sensorialmente la aceptabilidad organoléptica de las mejores cubiertas comestibles aplicadas en berries nativos después del almacenamiento prolongado en poscosecha | 15 |
| 8. Análisis estadístico | 15 |
| 9. Resultados esperados..... | 16 |
| 10. Plan de trabajo | 18 |
| 11. Organización | 19 |
| 11.1. Cargos y funciones | 19 |
| 11.2. Organigrama..... | 19 |
| 12. Presupuesto | 20 |
| 12.1. Presupuesto total por cuenta (MM\$) | 20 |
| 12.2. Presupuesto total por año (MM\$)..... | 20 |
| 13. Bibliografía | 21 |

1. Resumen

El desarrollo de enfermedades asociadas a una baja calidad alimentaria ha ido en aumento dentro de las últimas décadas y junto con esto, han aumentado las superficies cultivadas con plantas que poseen propiedades nutraceuticas. Uno de los componentes bioactivos de las plantas son los antioxidantes, los cuales se han estudiado y comprobado como los principales responsables en la prevención del estrés oxidativo combatiendo la formación de células cancerosas en el cuerpo humano. Dentro de los frutos con elevada capacidad antioxidante se encuentran los clasificados como bayas carnosas o berries, tales como el arándano y la frambuesa, berries tradicionales introducidos y propagados en Chile. Por otro lado, existen otros tipos de berries menos estudiados y con 4-5 veces mayor capacidad antioxidante que los mencionados, los cuales corresponden a berries nativos de las zonas centro-sur de Chile, tales como maqui (*Aristotelia chilensis*), murta (*Ugni molinae*) y calafate (*Berberis buxifolia*).

El objetivo principal de este proyecto de investigación es generar conocimiento sobre las propiedades nutraceuticas de los berries nativos chilenos a nivel mundial, mediante la formulación de un film comestible o *edible coating* con adición de extractos antimicrobianos, que preserve los atributos organolépticos y fisicoquímicos de los berries en el almacenamiento poscosecha.

Para la obtención del film, se utilizarán compuestos fenólicos con propiedades antimicrobianas extraídos del exocarpo de la nuez, un subproducto desechable de la industria frutícola, junto con goma arábica como polisacárido, los cuales serán homogenizados y aplicados a través de un pulverizador sobre los berries nativos. Posteriormente, se almacenarán en clamshells plásticos para llevarlos a condiciones de frío y embalaje que emulen viajes de exportación. Se realizarán análisis cada 7 días evaluando parámetros como contenido total de sólidos solubles, acidez titulable, pH, firmeza y color. Para la aceptabilidad de los frutos cubiertos, se realizarán pruebas de carácter sensorial mediante panelistas semi-entrenados.

Este trabajo proyecta obtener resultados similares a los obtenidos por estudios que han desarrollado el tema *in vivo*, los cuales se traducen principalmente en obtener fruta con la mínima pérdida de firmeza posible, mantención en los niveles de antioxidantes y sólidos solubles y sobre todo, una aceptación sensorial por parte del mercado demandante.

2. Descripción del problema

Chile es el principal exportador de berries del hemisferio sur, en volumen y valor, y el quinto en volumen exportado a nivel mundial. En la última década, sus exportaciones han crecido sostenidamente, tanto en valor como en volumen, siendo los principales destinos EE.UU., Canadá y algunos países de Europa. En 2017, el total exportado de berries fue de 210.544 toneladas, con valores sobre los 650 millones de dólares. Esto incluye arándanos, frambuesas, frutillas, moras, zarzaparrillas, grosellas, murtas, mirtilos y otros. El 70% se exporta como congelado, mientras que el 20% se exporta en fresco y el 10% restante como jugo (ODEPA, 2018). Según lo expuesto, los arándanos junto con las frambuesas y las frutillas son los berries más exportados en Chile, sin embargo, los dos primeros son originarios de Estados Unidos y Grecia, respectivamente.

Los berries endémicos de Chile tales como el Calafate (*Barberis buxifolia*), Murta (*Ugni molinae*) y Maqui (*Aristotelia chilensis*) han cobrado relevancia e interés por la comunidad científica, la cual ha expuesto evidencia del elevado contenido en antioxidantes, polifenoles y fibra dietética de estos frutos en comparación con los más exportados (arándanos y frambuesas). A pesar de que, internacionalmente los berries nativos del hemisferio sur son considerados *superberries*, en Chile esta ventaja está poco explotada. La comercialización de estos frutos depende de las preferencias de los consumidores, lo que conllevaría a expandir o reducir las superficies cultivadas y de la vida útil después de la cosecha, lo que permitiría su exportación y almacenamiento tanto en mercado externo como interno. La mayoría de los berries poseen cubiertas delgadas las cuales presentan alta sensibilidad al daño mecánico, incidencia de patógenos y pérdida de firmeza, lo que se traduce en un detrimento de las propiedades fisicoquímicas y organolépticas del fruto. En la temporada 2014, *Botrytis cinerea* afectó a los productores de arándanos en la Región del Biobío causando pérdidas por US \$80 millones.

Actualmente, las tecnologías disponibles para la poscosecha de arándanos se enfocan en mantener las cualidades organolépticas y calidad nutritiva, con el fin de ayudar a alcanzar destinos cada vez más lejanos sin perjudicar su condición. El método más comúnmente utilizado para conservar las bayas frescas después de la cosecha es manteniéndolas en refrigeración a bajas temperaturas. La mayoría de los berries duran varios días, incluso semanas cuando se mantienen en temperaturas cercanas a 0°C, pero este método no es siempre el más óptimo ni tampoco posee un bajo costo (Forney, 2009). Ante este escenario, es que en los últimos años se han desarrollado tecnologías innovadoras para extender aún más la vida poscosecha de las bayas. Algunas de estas tecnologías incluyen: la atmósfera modificada, las bolsas perforadas, uso de ozono, aplicación de luz UV y tecnologías tales como los recubrimientos o películas comestibles con acción antimicrobiana. Esta última alternativa, ha sido uno de los métodos innovadores más estudiados para mantener la calidad de los berries en poscosecha, la cual se posiciona como una tecnología prometedora para extender la vida útil de los alimentos frescos durante su conservación.

En Chile se producen más de 50 mil toneladas de residuos agroindustriales provenientes del procesamiento de actividades agrícolas de cosecha, poda, pérdidas de materia prima y descartes del procesamiento de vegetales (ODEPA, 2017). A consecuencia de lo anterior, la generación de residuos agroindustriales es una gran oportunidad si se consideran enfoques relacionados con el aprovechamiento de estos recursos, como la reutilización y la recuperación. En la región de Valparaíso, se encuentra la segunda mayor producción de nogales con 6.786 ha cultivadas según el Catastro Frutícola de CIREN (2017) y junto a esto, toneladas de residuos agrícolas como lo es la cáscara o *pelón* de la nuez.

Estudios recientes han comprobado la existencia de variados compuestos fenólicos y antioxidantes en este desecho tales como ácido gálico, catequinas, miricetina, ácido ferúlico y juglona principalmente en dos especies de nogal, *Juglans sigillata* y *Juglans regia* (Shi et al., 2017). Dichos compuestos presentan una alta capacidad antioxidante y antimicrobiana que no ha sido explotada en su totalidad y obedece a las características

deseables dentro de lo que se ha estudiado como un recubrimiento comestible de alta calidad y funcionalidad.

Aprovechando las propiedades de la cáscara o pelón de la nuez como materia prima, es posible extraer compuestos con capacidad antioxidante y antimicrobiana para ser adicionados a una película comestible por ejemplo, a base de goma arábica, la cual se ha demostrado que posee altos índices de efectividad al crear una cubierta protectora e impermeable, que podría ser utilizada en la poscosecha de berries nativos, con el fin de prolongar su vida útil, mejorar las cualidades organolépticas y así comercializar productos diferenciados con alto valor, no solo organoléptico sino también funcional, el cual ha sido poco indagado en los berries nativos de zonas australes de Chile.

3. Hipótesis

Considerando las altas demandas del mercado por productos con elevada capacidad antioxidante, el detrimento físico-químico en la poscosecha de berries nativos y los residuos ricos en compuestos antimicrobianos y antioxidantes producto de la industria del nogal, se plantea como hipótesis:

El desarrollo de una película comestible basada en desechos de nogal y goma arábica, disminuirá la pérdida de firmeza, la incidencia microbiana y protegerá las cualidades organolépticas durante el almacenamiento poscosecha de berries nativos chilenos.

4. Objetivo general

Evaluar el efecto de cubiertas comestibles desarrolladas con diferentes dosis de extractos de exocarpo de nuez (*Juglans regia* var. Chandler), adicionado a una base de goma arábica establecida, sobre los atributos de calidad organoléptica y microbiológica de berries nativos chilenos durante el almacenamiento prolongado en poscosecha.

5. Objetivos específicos

- Caracterizar el perfil y la concentración de compuestos fenólicos presentes en el exocarpo de nogal var. Chandler.
- Evaluar *in vitro* el potencial antimicrobiano contra *Botrytis cinerea*, de diferentes concentraciones de extracto fenólico de exocarpo de nuez.
- Evaluar las diferentes formulaciones desarrolladas a base de extractos de nuez y goma arábica sobre la preservación de atributos de calidad organoléptica y microbiológica deseables en berries nativos como Calafate, Murta y Maqui durante el almacenamiento prolongado en poscosecha.
- Evaluar sensorialmente la aceptabilidad organoléptica de las mejores cubiertas comestibles desarrolladas después del almacenamiento prolongado en poscosecha.

6. Marco Teórico

6.1. Berries nativos vs introducidos

Los berries en Chile pueden clasificarse en dos grupos: aquellos de especies introducidas y que se cultivan a nivel comercial y los berries nativos chilenos que se obtienen principalmente mediante recolección silvestre. Dentro de las especies introducidas se encuentra la frutilla, la frambuesa, la mora y el arándano y dentro de las nativas el calafate, la frutilla chilena, la murta y el maqui, principalmente (FIA, 2009). Todos estos frutos son muy apreciados nutricionalmente debido a su sabor único y alto contenido en compuestos antioxidantes y bioactivos, son ricos en compuestos fenólicos, principalmente flavonoides y antocianinas, los cuales son responsables del color de la fruta y pueden ejercer efectos antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorios, anticancerígenos y cardioprotectores. Sin embargo, tienen una vida de almacenamiento corta, como resultado de su alta respiración, alta tasa transpiratoria, velocidad de ablandamiento, susceptibilidad a daños mecánicos y descomposición fúngica (Horvitz, 2017). Según ODEPA (2018), Chile es el principal exportador de berries del hemisferio sur y dentro de las principales bayas exportadas se encuentran los arándanos, las frambuesas y las frutillas. Últimamente, en conjunto con una mayor demanda por estos frutales menores

introducidos, se ha observado también un aumento en la demanda por los berries nativos de zonas australes de Chile. Desde el punto de vista de la recuperación y manejo productivo de las especies nativas, nuevas alternativas de desarrollo agroindustrial para maqui, murtila y frutilla silvestre aportarían a la conservación del patrimonio genético chileno. Sin embargo, el desarrollo que ha presentado en general la producción de berries en Chile, no ha considerado suficientemente a las especies nativas, cuya producción comercial y exportación podría ser una nueva fuente de desarrollo (FIA, 2009). Aunque especies como maqui (*Aristotelia chilensis*), murtila (*Ugni molinae*) y calafate (*Barberis buxifolia*), han sido foco de numerosas investigaciones realizadas en el país y se han realizado avances en su desarrollo agroindustrial, no se ha profundizado en el sentido de sus propiedades funcionales antioxidantes y/o valor nutricional. De acuerdo a investigaciones realizadas por Halvorsen *et al.*, (2007) en Estados Unidos, muchos berries nativos de nuestro país presentan mayores contenidos de polifenoles en relación a especies cultivadas. En estudios chilenos, se encontró que el jugo concentrado de maqui presenta mayores contenidos de fenoles y mayor capacidad antioxidante, en comparación con la mora, arándano, cranberry, frambuesa y frutilla (Rottmann *et al.*, 2002). Los frutos de maqui y de calafate tienen un contenido de polifenoles significativamente superiores a otros berries como frutilla y frambuesas. Una comparación de la actividad antioxidante y polifenoles totales del calafate con respecto al maqui y arándano muestra que el calafate tiene una actividad antioxidante muy superior al arándano y similar al maqui, con valores ORAC entre 52.734 y 105.384 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ de peso de fruta fresca (Pino *et al.*, 2014). En este contexto, numerosos proyectos comienzan a avanzar en el desarrollo de las especies de berries nativos chilenos con el fin de ampliar la base de producción nacional; recopilar e informar a las personas sobre sus beneficios nutricionales y también desarrollar tecnologías que permitan su exportación a nivel mundial, pues a pesar de no ser consideradas hasta el momento plantas cultivadas sino silvestres, los frutos que producen requieren de las mismas precauciones y suministros para obtener una cosecha productiva y comercializable.

6.2. Vida poscosecha

En la mayoría de las frutas, la maduración se desencadena una vez que el crecimiento ha terminado, pero las bayas (frutillas, arándanos, moras, frambuesas, etc) continúan creciendo en tamaño simultáneamente junto al proceso de maduración (Sozzi y Vicente, 2008). Es en este punto donde la fruta presenta los atributos organolépticos más apropiados para consumo, pero también puede volverse más delicada, sensible al daño mecánico y susceptible al ataque microbiano. Por ende, es crucial ser extremadamente cuidadoso en la precosecha y utilizar manejos poscosecha adecuados que permitan extender la vida útil de las bayas.

El principal factor que afecta la vida útil de almacenamiento y la calidad de las frutas y verduras es la temperatura, pues regula la velocidad de todos los procesos metabólicos que ocurren en estos productos. Las bajas temperaturas ralentizan el crecimiento de hongos y al mismo tiempo reducen la tasa de respiración y pérdida de agua y, por ende, retrasan los procesos de maduración y senescencia (Tanase *et al.*, 2013). El enfriamiento rápido es esencial en frutas pequeñas para mantener la calidad. La mayoría de los cultivos de bayas, incluidas las moras, los arándanos y las frambuesas, son tolerantes al frío y se pueden almacenar de -0.5 a 0°C, o ligeramente por encima de sus puntos de congelación, para mantener su calidad (Giacalone y Chiabrando, 2012). Sin embargo, la vida útil de los berries se reduce a menudo por la pérdida de peso y la infección por hongos en condiciones de alta humedad. El segundo factor que dificulta el manejo poscosecha de estos frutos denominados *soft fruits* es la alta susceptibilidad a la descomposición fúngica y/o bacteriana. Las enfermedades de los berries en poscosecha pueden ser causadas por diferentes hongos tales como *Botrytis cinerea*, *Aspergillus spp*, *Alternaria spp*, *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum spp* y *Cladosporium spp*. Los dos últimos organismos son los menos comunes y la pudrición por *R. stolonifer* se puede controlar fácilmente almacenando la fruta a 0°C, pues el hongo no se desarrolla a esta temperatura. Sin embargo, ninguno de los mencionados es el caso de *B. cinerea* que continúa creciendo y causando deterioro incluso a 0°C. *Botrytis* es una de las enfermedades de mayor impacto en la fruticultura chilena y sus daños se asocian a una pudrición blanda y acuosa en las bayas, que se manifiesta principalmente en la poscosecha y por tanto, causa una gran cantidad de rechazos en las exportaciones (Pérez *et al.*, 2011). Estudios previos han propuesto técnicas para preservar la calidad de las bayas mediante el control de la actividad del agua, el pH, la temperatura, la

concentración de oxígeno o la adición de conservantes. Varios métodos de conservación, incluido el almacenamiento a bajas temperaturas, envasado en atmósfera modificada, calor, radiación UV, ozono, irradiación con electrones, así como revestimientos comestibles, se han empleado para retrasar los cambios fisicoquímicos y el deterioro, extendiendo la vida útil de los berries frescos (Jiang *et al.*, 2016).

6.3. Recubrimientos comestibles

Bastante atención han recibido estos últimos años los recubrimientos comestibles, los cuales están constituidos por finas películas de polímeros naturales biodegradables (polisacáridos, lípidos, proteínas animales y vegetales y compuestos activos), lo que convierte a esta tecnología en una alternativa respetuosa con el medioambiente, que responde a la demanda creciente por parte de los consumidores de alimentos naturales, seguros, saludables y obtenidos mediante un procesado mínimo (De Ancos *et al.*, 2015).

Estos recubrimientos tienen la capacidad de controlar la transferencia de agua y gases como oxígeno y dióxido de carbono, controlar la tasa de crecimiento microbiano y conservar las propiedades organolépticas de los alimentos (Velásquez y Guerrero, 2014). Los polisacáridos más utilizados en la fabricación de recubrimientos corresponden a las pectinas de alto y bajo metoxilo, la celulosa y sus derivados, el alginato, el quitosano, la dextrina, el carragenato, la goma arábiga, entre otros. Sin embargo, una desventaja que presentan estos polisacáridos es que constituyen una pobre barrera a la pérdida de humedad (Fernández *et al.*, 2015). Para evitar este problema se adicionan lípidos, los cuales se caracterizan por ser hidrofóbicos, presentando excelentes propiedades de barrera frente a la humedad (ceras, resinas, mono y diglicéridos, ácidos grasos, entre otros).

Poco se ha estudiado la influencia de componentes antimicrobianos como aditivo a las películas comestibles, así como la aplicación de éstos en el almacenamiento de berries. Amplia es la gama de estudios basados en el quitosano, el polímero más utilizado en los recubrimientos. Esta sustancia es un biopolímero extraído del exoesqueleto de algunos crustáceos e insectos, por lo cual, suele reaccionar con otras sustancias alterando algunos caracteres organolépticos además del color, tales como el aroma y el sabor, los cuales provocan rechazo por parte del consumidor (Mármol *et al.*, 2011). Otro bio-

polímero ampliamente utilizado desde la antigüedad por sus diversas características como formadoras de películas, emulsivas y como agente de textura corresponde a la goma arábica, extraída de la resina de ciertas variedades de Acacia. Esta goma, además de presentar un olor y sabor neutro, posee fracciones responsables de la excelente capacidad para estabilizar las emulsiones de aceite en agua (Williams y Phillips, 2003). Estudios recientes en China demostraron que la goma arábica como película al 15% retuvo el color, mantuvo la firmeza e incrementó la capacidad antioxidante de frutillas que, comparadas con el control, mostraron una mantención total de los compuestos fenólicos, antocianinas y sólidos solubles, además retrasó la actividad de la enzima polifenol oxidasa, redujo la pérdida de peso e inhibió completamente el ataque microbiano. De esta forma, se considera la goma arábica como alternativa base de un recubrimiento comestible para ser desarrollado y utilizado en la poscosecha de berries nativos.

6.4. Compuestos fenólicos antimicrobianos

Se han investigado los agentes antimicrobianos de origen natural como alternativas a los sintéticos para garantizar la seguridad y la calidad de los alimentos. El deterioro de los frutos y la contaminación por patógenos generalmente comienza en la superficie de los alimentos (Guo *et al.*, 2017). El desarrollo de sistemas de cubiertas bioactivas mediante la incorporación de agentes antimicrobianos, podría contribuir significativamente a la conservación de la vida útil y la preservación de frutas y hortalizas en la poscosecha. Además de su eficacia como barrera selectiva a los gases, humedad y migración de solutos, las películas comestibles desarrolladas con sustancias antifúngicas pueden reducir efectivamente el crecimiento microbiano en productos alimenticios sólidos y semisólidos, al disminuir la velocidad de difusión de los agentes patológicos en la superficie del producto por un largo tiempo (Aloui y Khwaldia, 2016).

6.5. Residuos de la agroindustria

Los frutos del nogal son ricos en compuestos fenólicos (Prasad, 2003). En Chile, se producen más de 50 mil toneladas de residuos agroindustriales provenientes del procesamiento de actividades agrícolas de cosecha, poda, pérdidas de materia prima y descartes del procesamiento de vegetales (ODEPA, 2017). En la región de Valparaíso se encuentra la segunda mayor producción de nogales a nivel nacional con 6.786 ha

cultivadas según el Catastro Frutícola de CIREN (2017) y junto a esto, toneladas de residuos agrícolas como lo es la cáscara o *pelón* de la nuez.

Fakuda *et al.*, (2007) caracterizaron e identificaron trece compuestos fenólicos en el pelón de la nuez, entre ellos el ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido elágico, catequina, epicatequina, miricetina y juglona. Estudios de Pereira *et al.* (2012) comprobaron la actividad antimicrobiana y antioxidante de extractos acuosos extraídos del exocarpo de la nuez sobre bacterias gram positivas comprobando el efecto antimicrobiano del tejido. De esta manera, los subproductos de la nuez podrían ser valorizados como fuentes económicas de antioxidantes naturales y agentes antimicrobianos. Hasta la fecha, no hay registros de un recubrimiento comestible desarrollado a base de compuestos fenólicos extraídos del exocarpo de la nuez, lo cual según los antecedentes expuestos, podría mejorar las características organolépticas y evitar el deterioro por microorganismos en los berries nativos chilenos, de esta forma se prolongaría la vida útil de las bayas siendo posible alcanzar destinos lejanos sin perder calidad y funcionalidad.

7. Materiales y métodos

- 7.1. Caracterizar el perfil y la concentración de compuestos fenólicos presentes en el exocarpo de nogal var. Chandler

Obtención del material vegetal

Se recolectará 1 kg de cáscaras verdes de nueces caídas de nogales en la localidad de San Esteban, en la provincia de Los Andes, V Región. Posterior a la recolección, la muestra será seleccionada descartando aquellas cáscaras necrosadas o con presencia de microorganismos. Una vez apartado el material definitivo a muestrear, las cáscaras serán lavadas con agua, congeladas y pulverizadas con nitrógeno líquido para almacenarlas a -80°C hasta su utilización.

Determinación del contenido total de polifenoles (PFT)

Para la extracción, se liofilizará el extracto congelado y se pesarán 500 mg de muestra, a la cual se adicionará una mezcla de metanol: agua (50:50) que, según Fernández *et al.*, (2012), corresponde a la proporción con la que se obtiene la mayor cantidad de extracción de fenoles del exocarpo de nuez.

Para determinar la composición fenólica total del exocarpo de nuez se utilizará el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). El principio de este método se basa en la reacción de los polifenoles y agentes reductores con el reactivo Folin-Ciocalteu (tungstofosfato y molibdofosfato), dando lugar a una coloración azul susceptible de determinación espectrofotométrica a 750 nm. La determinación de los compuestos fenólicos totales será cuantificada a través de una curva de calibrado desarrollada con soluciones estándar de ácido gálico (Sigma-Aldrich, EE.UU). Los resultados obtenidos se expresarán como mg de ácido gálico equivalentes (GAE: Gallic Acid Equivalents) por 100 g de peso seco.

Caracterización de compuestos fenólicos

Para la determinación de moléculas específicas, se utilizará la técnica por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa HPLC-RP (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography) mediante el método de elución isocrático, donde la fase estacionaria corresponderá a una columna de tipo C18 basada en partículas de sílice y la fase móvil, la cual estará conformada por agua y una fase orgánica (acetonitrilo y metanol 1:1). El método de detección de los analitos se realizará mediante el detector de arreglo de diodos DAD (Diode Array Detector) a una longitud de onda entre 300 y 700 nm, considerando que, Cosmulescu (2010) detectó juglona a 420 nm en hojas de nogal. Los resultados se obtendrán mediante un gráfico cromatográfico de absorbancia realizado por un programa computarizado integrado en la maquinaria HPLC, los cuales se expresarán en nm/tiempo de retención para cada uno de los analitos.

- 7.2. Evaluar in vitro el potencial antimicrobiano de diferentes concentraciones de extracto de exocarpo de nuez

Obtención de cepas fitopatógenas

Según Latorre *et al.*, (2015) el hongo más predominante en la pos cosecha de berries corresponde a *Botrytis cinerea*. Dicho fitopatógeno será importado mediante la ATCC (American Type Culture Collection), organismo internacional que recolecta, almacena y distribuye microorganismos liofilizados de referencia estándar, líneas celulares y otros materiales para investigación y desarrollo.

Ensayos preliminares de actividad antimicrobiana

Los análisis *in vitro* se realizarán en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agronómicas y de los Alimentos de la PUCV.

Para el estudio de la actividad antimicótica del extracto de pelón, se realizarán pruebas de inhibición micelial en placas mediante la difusión del hongo. Se evaluarán distintas concentraciones, tomando como referencia la dosis mínima utilizada en estudios de Wianowska *et al.*, (2016) para controlar *Alternaria alternata* en ensayos *in vitro*. Se analizarán 4 concentraciones distintas de extracto fenólico: $1,4 \times 10^5$, $1,7 \times 10^5$, 2×10^5 y $2,3 \times 10^5$ μM de ácido gálico. Cada dosis se integrará a un medio de cultivo de Agar Papa Dextrosa (PDA), resultando 4 réplicas independientes por dosis obteniendo 16 réplicas totales.

El patógeno liofilizado se diluirá en agua peptonada y posteriormente se sembrará en los medios de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) desarrollados con los extractos, los cuales serán incubados a 23°C en oscuridad durante cinco días. Los resultados del antibiograma se expresarán en porcentaje de inhibición los cuales se adecuarán a resultados estandarizados como Sensible, Intermedio o Resistente, según la actividad antimicótica de los extractos dosificados.

- 7.3. Elaborar y evaluar diferentes formulaciones de recubrimientos sobre la preservación de atributos de calidad organoléptica y microbiológica deseables en berries nativos (calafate, murta y maqui) durante el almacenamiento prolongado

Obtención del material vegetal

Para los ensayos in vivo, se obtendrá de productores y recolectores locales de la X Región, 4 kg de cada berrie nativo en época de cosecha y 4 kg de arándanos para análisis comparativos. Una vez adquiridos, serán pesados y distribuidos en clamshells de 170 g y almacenados en cámara de frío para su traslado al laboratorio experimental.

Desarrollo de formulaciones y fases experimentales

La goma arábica se obtendrá mediante la compra de 1 kg a la empresa importadora y distribuidora de ingredientes de alimentos, Dimerco, localizada en Santiago de Chile.

Una vez adquirida, se secarán 500 g de goma arábica a 50°C durante 2 horas. Luego del secado, la muestra será molida y tamizada siguiendo el protocolo de Tahir *et al.*, (2018). Para la preparación del film, el porcentaje de goma arábica tomará un valor predeterminado según estudios preliminares por parte de Tahir *et al.*, (2018), el cual corresponde a 15%. Se diluirán 15 g del polvo obtenido por tamizado en 100 ml de agua destilada. La solución obtenida se calentará, filtrará y homogenizará individualmente con cada una de las dosis anteriormente determinadas: $1,4 \times 10^5$, $1,7 \times 10^5$, 2×10^5 y $2,3 \times 10^5$ μM de ácido gálico, siguiendo la metodología de preparación de soluciones filmogénicas de Andrade *et al.*, (2016).

La aplicación de los recubrimientos formulados se realizará mediante aspersion con un atomizador para obtener uniformidad en los berries.

Los tratamientos a evaluar serán:

- Testigo: fruta no cubierta

- Film 1: (GA 15% p/p + EF de $1,4 \times 10^5$ μM de ácido gálico)
- Film 2: (GA 15% p/p + EF de $1,7 \times 10^5$ μM de ácido gálico)
- Film 3: (GA 15% p/p + EF de $2,0 \times 10^5$ μM de ácido gálico)
- Film 4: (GA 15% p/p + EF de $2,3 \times 10^5$ μM de ácido gálico)

El factor de estudio corresponderá a las dosis fenólicas antimicrobianas, el cual tendrá 4 niveles y por ende, se realizarán 4 tratamientos. La unidad experimental corresponderá a 1 clamshell de 170 g y se realizarán 4 réplicas/ dosis/ berrie nativo, es decir, 64 réplicas totales (incluyendo testigo) y también, 4 réplicas/ dosis/ arándanos, para considerarlo como estándar de comparación, resultando en 80 réplicas totales.

Una vez aplicadas las formulaciones a cada unidad experimental, los clamshells serán almacenados en condiciones de poscosecha estándares para arándano; a 0°C en bolsas de atmósfera modificada durante 42 días y se cuantificarán parámetros fisicoquímicos cada 7 días.

Evaluación de atributos

Las propiedades fisicoquímicas se evaluarán cada 7 días durante el almacenamiento. El color se medirá con un colorímetro. En cuanto a la actividad antimicrobiana de los extractos, se realizará un test no paramétrico que contendrá dos niveles: (1) presencia o (2) ausencia de patógenos. La firmeza será determinada con FirmTec, el cual mide la fuerza que se necesita para deformar la epidermis de la baya, los resultados se expresarán en N/mm^2 . La pérdida de agua será cuantificada como pérdida total de agua después de los 42 días de almacenamiento.

La capacidad antioxidante será evaluada mediante el método ORAC, la cual da cuenta de la capacidad global que poseen todos los antioxidantes presentes en un alimento. El protocolo será realizado siguiendo la metodología de Zapata *et al.*, (2014). Los resultados se expresarán en micromoles de equivalentes Trolox/ 100 g de muestra en base fresca.

Para la medición de sólidos solubles (SS) particularmente azúcares de la fruta, se utilizará un refractómetro manual cuyos resultados se expresarán en grados Brix.

El pH será determinado por la medición del jugo homogeneizado de cada muestra con un peachímetro manual digital. La acidez titulable (AT) se obtendrá por titulación, se determinará para cada muestra el volumen de NaOH 0.1N consumido por 10 ml de jugo de berries previamente filtrado y homogeneizado diluido en 150 mL de agua destilada hasta pH 8.2, leído con peachímetro manual. Los resultados de la titulación serán expresados en % de ácido cítrico por 100 g de peso fresco.

- 7.4. Evaluar sensorialmente la aceptabilidad organoléptica de las mejores cubiertas comestibles aplicadas en berries nativos después del almacenamiento prolongado en poscosecha

Para el análisis sensorial de apariencia y aceptabilidad, se contará con 15 panelistas no entrenados. Se dispondrán para el análisis 100 g de cada berrie nativo estudiado cubierto y 100 g de cada berrie nativo no cubierto. La escala hedónica de aceptabilidad a utilizar contemplará los siguientes niveles: 1 no me gusta, 2 me gusta poco, 3 no me gusta ni me disgusta, 4 me gusta, 5 me gusta mucho. La escala hedónica de dulzor será evaluada en 3 grados: 1 muy dulce, 2 parcialmente dulce, 3 sin dulzor. Para la firmeza, se evaluará la crocancia en dos niveles: crocante y no crocante.

8. Análisis estadístico

En lo que respecta a variables de respuesta paramétricas (ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro* y tratamientos filmogénicos *in vivo*) se utilizará el modelo estadístico ANDEVA seguido por un test de Tukey considerando resultados estadísticamente significativos aquellos con p -value <0.05 . Para el caso de las variables no paramétricas (análisis sensorial y evaluación de atributos) se utilizará el test Kruskal-Wallis con un p -value <0.05 .

9. Resultados esperados

| Objetivo específico | Resultado esperado |
|---|--|
| Caracterizar el perfil y la concentración de compuestos fenólicos presentes en el exocarpo de nogal var. Chandler. | Se espera que el compuesto fenólico juglona se encuentre en cantidades mayores a 20.0 mg/100 g de peso seco. |
| Evaluar <i>in vitro</i> el potencial antimicrobiano contra <i>Botrytis cinerea</i> , de diferentes concentraciones de extracto fenólico de exocarpo de nuez | Se espera que la mínima concentración de compuestos fenólicos determinados ($1,4 \times 10^5 \mu\text{M}$ de ácido gálico) inhiba la proliferación de <i>Botrytis cinerea in vitro</i> al final del experimento. |
| Evaluar las diferentes formulaciones desarrolladas a base de extractos de nuez y goma arábiga sobre la preservación de atributos de calidad organoléptica y microbiológica deseables en berries nativos (calafate, murta y maqui) durante el almacenamiento prolongado en poscosecha. | Se espera que la formulación realizada con $2,3 \times 10^5 \mu\text{M}$ de extracto fenólico (film 4) preserve los atributos organolépticos y microbiológicos de cada berrie al término de la evaluación. En cuanto a los atributos, se espera una firmeza superior a los 200N/mm^2 , un aumento máximo de 10% en °Brix, una disminución del 20% de AT y un aumento del 30% en capacidad antioxidante y PFT. |
| Evaluar sensorialmente la aceptabilidad organoléptica de las mejores cubiertas comestibles desarrolladas después del almacenamiento prolongado en | Se espera que los panelistas no sean capaces de discernir entre fruta cubierta y no cubierta. |

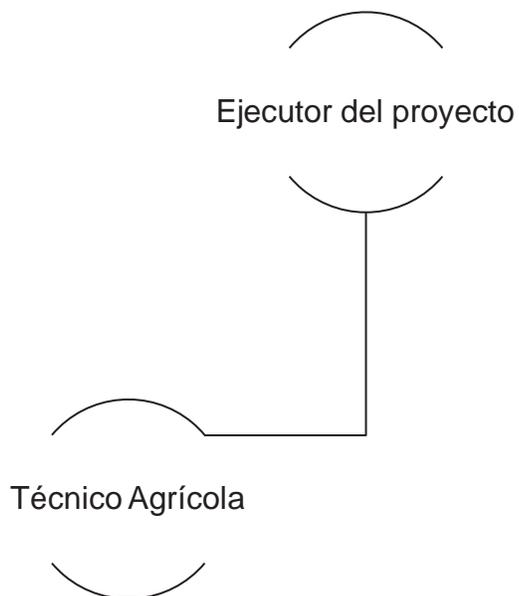
| | |
|-------------|--|
| poscosecha. | |
|-------------|--|

11. Organización

11.1. Cargos y funciones

| Nombre del profesional | Grado académico | Cargo en el proyecto | Funciones | Costo del personal (\$MM) | Aporte fondo concursable (\$MM) |
|------------------------|--------------------|--|---|---------------------------|---------------------------------|
| Daniela Colipí | Ingeniera Agrónoma | Investigadora y ejecutora del proyecto | Dirigir, analizar y ejecutar procesos y actividades del proyecto. Responsabilidad en la toma de decisiones | 18 | 18 |
| Por determinar | Técnico Agrícola | Técnico Agrícola | Apoyo en labores de muestreo y análisis de datos | 7,5 | 7,5 |

11.2. Organigrama



12. Presupuesto

12.1. Presupuesto total por cuenta (MM\$)

| Cuenta | Fondo Concursable | Aporte Empresa | | Total (\$) |
|--------------------------------|-------------------|----------------|------------------|-------------------|
| | | Pecuniario | No pecuniario | |
| | FONDECYT | | | |
| Total Recursos Humanos | 25.500.000 | | | 25.500.000 |
| Total Subcontratos | 2.286.695 | | | 2.286.695 |
| Total Capacitación | 157.374 | | | 157.374 |
| Total Gastos de Inversión | 6.675.969 | | | 6.675.969 |
| Total Gastos en Viajes | 548.000 | | | 548.000 |
| Total Gastos de Operación | 2.171.550 | | 227.000 | 2.398.550 |
| Total Gastos de Administración | | | 3.100.000 | 3.100.000 |
| Total (\$) | 37.231.304 | | 3.327.000 | 40.666.588 |

12.2. Presupuesto total por año (MM\$)

| Cuenta | Año 1 | Año 2 | Año 3 | Total (\$) |
|--------------------------------|-----------|------------|-----------|------------|
| Total Recursos Humanos | 6.500.000 | 10.000.000 | 9.000.000 | 25.500.000 |
| Total Subcontratos | 222.807 | 1.003.384 | 1.060.504 | 2.286.695 |
| Total Capacitación | | 78.687 | 78.687 | 157.374 |
| Total Gastos de Inversión | | 6.655.969 | 20.000 | 6.675.969 |
| Total Gastos en viajes | 75.000 | 274.000 | 199.000 | 548.000 |
| Total Gastos de Operación | 300.038 | 1.030.532 | 840.980 | 2.171.550 |
| <i>Pecuniario</i> | | | | |
| <i>No pecuniario</i> | 3.000 | 112.000 | 112.000 | 227.000 |
| Total Gastos de Administración | 900.000 | 1.100.000 | 1.100.000 | 3.100.000 |
| <i>Pecuniario</i> | | | | |

| | | | | |
|----------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <i>No Pecuniario</i> | 900.000 | 1.100.000 | 1.100.000 | 3.100.000 |
| Total (\$) | 8.000.845 | 20.254.572 | 12.411.171 | 40.666.588 |

13. Bibliografía

- Aloui, H., Khwaldia, K. 2016. Natural antimicrobial edible coatings for microbial safety and food quality enhancement. *Food Science and Food Safety*. 15:1080-1103.
- Andrade P., D. Richards, P. Cervera, E. Carmen, E. David. 2016. Development and application of edible coatings in minimally processed fruit. *VITAE*. 23:9-10
- CIREN. 2017. Catastro frutícola por año. Disponible en <https://www.odepa.gob.cl/estadisticas-del-sector/catastros-fruticolas/catastro-fruticola-ciren-odepa>. Leído el 15 de mayo de 2018.
- Cosmulescu, S. 2010. Phenolics of green husk in mature walnut fruits. *Notulae Botanicae*. 38:53-56
- De Ancos, B., González-Peña, D., Colina-Coca, C., Sánchez-Moreno. 2015. Uso de recubrimientos comestibles en los productos de IV y V gama. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 17 (2):162-174.
- Fakuda, T., H. Ito, T. Hatano and T. Yoshida. 2007. Walnut polyphenols: their structures and functions. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 126:32-35.
- Fernández V., Baños S., Ocampo R., Pereira A., Falcón R, Alejandro. 2015. Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 24(3):52-57.
- FIA. 2009. Productos agroindustriales ricos en antioxidantes a base de berries nativos. Disponible en: http://www.pfnm.cl/paqtecnologicos/maqui/antioxidantes_berries_nativos.pdf
- Forney, C. 2009. Postharvest issues in blueberry and cranberry and methods to improve market-life. *Acta Horticulturae*. 810(2):785-798.

- Giacalone, G., Chiabrando, V. 2012. Properties, consumption and nutrition problems and methods to improve the market-life of berry fruit. N°18 p.179-196.
- Guo, M., Yadav., MP., Jin, TZ. 2017. Antimicrobial edible coatings and films from micro-emulsions and their food applications. International Journal of Food Microbiology. 263:9-16.
- Halvorsen, B., Holtek, K., Myhrstad, W., Barikmo, L., Hvattum, E., Fagertum Remberg, S., Wold, A. 2007. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. Institute for Nutrition Research. 132(3):461-71
- Horvitz, S. 2017. Postharvest handling of berries. p. 422-443. In Ibrahim Kahramanoglu (ed). Postharvest Handling. Intechopen. Lefka, Chipre.
- Jiang, H., Zhimin, R., Xiangyang, W., Huang, J. 2016. Effect of Chitosan as an Antifungal and Preservative Agent on Postharvest Blueberry. Journal of Food Quality. 39:516-523.
- Latorre, B., Elfar, K., Ferrada, E. 2015. Gray mold caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile. Ciencia e Investigación Agraria, 42(3):305-330.
- Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Chandler, C., Gutiérrez, E. 2011. Quitina y quitosano polímeros amigables. Revista Tecnocientífica URU. N°1 p.53-58.
- ODEPA. 2017. Pérdida y desperdicios de alimentos. Disponible en <https://goo.gl/QTCWAW>. Leído el 28 de mayo de 2018.
- ODEPA. 2018. Reporte N°1 Agrimundo. Perspectivas para los berries nativos en el mercado internacional.
- Pereira, JA., Estevinho, L., Bento, A., Ferreira, I., Sousa, A., Oliveira I. 2008. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. Food and Chemical Toxicology. 46:2326-2331.
- Pérez F., Enrique Ferrada Q., Jaime Guerrero C., Emma Bensch T. 2011. Hongos frecuentes en arándano en poscosecha. Revista frutícola del sur de Chile, Disponible en: <http://revista.berriesandcherries.cl> Leído el 3 de agosto de 2018
- Pino, M.T; González, M; McLeod, C. 2014. Aspectos relevantes de la producción de zarzaparrilla roja (*Ribes rubrum*) bajo túnel. Capítulo XII. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín INIA N°286 p.141-152. Punta Arenas, Chile.

- Prasad, R. 2003. Walnuts and pecans. Encyclopedia of food sciences and nutrition. p6071-6079. Academic Press, Londres.
- Rottmann, M. S., Aspillada, A., Pérez, R., Vásquez, L., Martínez, F. Leighton, F. 2002. Juice and phenolic fractions of the berry *Aristotelia chilensis* inhibit LDL oxidation in vitro and protect human endothelial cells against oxidative stress. J. Agric. Food Chem. 50:7542-7547.
- Seeram, NP. 2008. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. Food Chemistry. 56(3):627-629.
- Singleton, V. L., Rossi, Joseph, A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16:144-158.
- Shi, B., Wene Z., Xue L., Xuejun P. 2018. Seasonal variations of phenolic profiles and antioxidant activity of walnut (*Juglans sigillata* D.) green husks. International Journal of Food Properties, 20:2635-2646.
- Song, J., Fan, L., Forney, C.F., Jordan, M.A., Hildebrand, P.D., Kalt, W. and Ryan, D.A.J. 2003. Effect of ozone treatment and controlled atmosphere storage on quality and phytochemicals in highbush blueberries. Acta Hort. 600:417-423.
- Sozzi, G., Vicente, A. 2008. Ripening and postharvest storage of soft fruits. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology. 1:95-103
- Tahir, HE., Xiaobo, Z., Jiyong, S., Mahunu, GK., Zhai, X. 2018. Quality and postharvest-shelf life of cold-stored strawberry fruit as affected by gum arabic (*Acacia senegal*) edible coating. Journal of Food Biochemistry. 42:12527.
- Tanase, E., Popescu, P., Popa, V., Popa, M. 2013. New techniques used to improve berries shelf life. University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine, Faculty of Biotechnology Bucharest, Romania.
- Velásquez Moreira A., Guerrero Beltrán J. A. 2008. Recubrimientos comestibles aplicados en alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos p5-12.
- Wianowska, D., Garbaczewska, S., Cieniecka-Roslonkiewicz, A., Dawidowicz, A.L., Jankowska, A. 2016. Comparison of antifungal activity of extracts from different *Juglans regia* cultivars and juglone. Microbial Pathogenesis.100:263-267.

- Williams, P.A., Phillips, G.O. 2003. Functional characteristics of gum Arabic. *Food Hydrocolloids*. 1:291-300.
- Zapata, S., Piedrahita, A., Rojano, B. 2014. Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 16(1):25-36.