
FRUTICULTURA

Nueva tecnología postcosecha de desinfección por nebulización con ácido peracético en frutillas

Van de Velde, F.^{1,2}; Vaccari, M.C.³; Piagentini, A.M.¹ y Pirovani, M.E.^{1(*)}

¹Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA), Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Santiago del Estero 2829, Santa Fe, 3000, Argentina. E-mail: mpirovan@fiq.unl.edu.ar.

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina.

³Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral. Argentina.

Recibido: 25/10/2016

Aceptado: 13/12/2016

RESUMEN

Van de Velde, F.; Vaccari, M.C.; Piagentini, A.M. y Pirovani, M.E. 2016. Nueva tecnología postcosecha de desinfección por nebulización con ácido peracético en frutillas. Horticultura Argentina 35 (88): 36 - 49.

La desinfección postcosecha mediante la aplicación de sanitizantes por nebulización podría ser una tecnología promisorio para extender el periodo de almacenamiento de frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch.) frescas. El objetivo de este trabajo fue modelar y optimizar la operación de desinfección de frutillas frescas por nebulización con un desinfectante comercial ecológico basado en ácido peracético (APA) procurando alcanzar reducciones microbiológicas y no alterar la calidad general, el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante del fruto. Se estudió la operación de desinfección de frutos de la variedad 'Camarosa' en una cámara especialmente diseñada, variando la concentración (3.4, 20.0, 60.0, 100.0 y 116.6 µL APA 5% por litro de aire) y tiempo de tratamiento (5.7, 15.0, 37.5, 60 y 69.3 min). La reducción de los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos

totales y de levaduras y mohos de los frutos nebulizados fue mayor a medida que aumentaban la concentración de APA y el tiempo de tratamiento. Sin embargo, las propiedades oxidantes del APA afectaron negativamente el contenido de antocianinas y fenoles totales, vitamina C, capacidad antioxidante y color de los frutos, en diversos grados, dependiendo de las condiciones de nebulización. La optimización de la operación basada en una reducción microbiológica objetivo de 2.0 ciclos log, retenciones máximas de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante, sin cambios en el color, permitió determinar condiciones de tratamiento óptimas: 10.1 µL APA/L de aire y 29.6 min. Experiencias posteriores de nebulización en esas condiciones validaron la metodología. Este tratamiento de desinfección postcosecha permitiría obtener frutillas con calidad microbiológica hasta 7 días a 2 °C, sin afectar su calidad sensorial y propiedades bioactivas.

Palabras clave adicionales: calidad microbiológica, fenoles totales, antocianinas totales, capacidad antioxidante, calidad de fruta.

ABSTRACT

Van de Velde, F.; Vaccari, M.C.; Piagentini, A.M. y Pirovani, M.E. 2016. New posharvest technology of strawberries disinfection by peracetic acid fogging. *Horticultura Argentina* 35 (88): 36 - 49.

The postharvest disinfection by applying sanitizers by nebulization could be a promising technology to extend the storage period of fresh strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) The objective of this work was to model and optimize the operation of disinfection of fresh strawberries by nebulization with an ecological commercial disinfectant based on peracetic acid (PAA), aiming to reach microbiological reductions and not to alter the general quality, the content of bioactive compounds and the antioxidant capacity of the fruit. The disinfection of fruits of the 'Camarosa' variety was studied in a specially designed chamber, varying the concentration (3.4, 20.0, 60.0, 100.0 and 116.6 μ L APA 5% per liter of air) and treatment time (5.7, 15.0, 37.5, 60 and 69.3 min). The count reduction of total mesophilic aerobic microorganisms and

yeast and molds of nebulized strawberries was greater as PAA concentration and treatment time increased. However, PAA oxidizing properties negatively impacted on anthocyanins and total phenols, vitamin C, antioxidant capacity and color of the fruits, to varying degrees, depending on the spraying conditions. The optimization of fogging operation based on a microbiological reduction target of 2.0 log cycles, maximum retention of bioactive compounds and antioxidant capacity and no change in color, allowed to determine conditions of optimal treatment: 10.1 μ L PAA / L air and 29.6 min. Additional experiments at these conditions validated the methodology. This postharvest disinfection treatment would allow obtaining strawberries with microbiological quality up to 7 days at 2°C without affecting their sensory quality and bioactive properties.

Additional keywords: microbiological quality, bioactive compounds, total phenols, total anthocyanins, antioxidant capacity, fruit quality.

1. Introducción

Las frutillas son frutas popularmente consumidas debido a su atractivo color y sabor, y por ser una fuente muy rica de compuestos antioxidantes tales como compuestos fenólicos y vitamina C (Alexandre *et al.*, 2014). El período de vida útil de esta fruta es muy corto debido a su perecibilidad y susceptibilidad al crecimiento de fitopatógenos causantes de podredumbre. Las enfermedades de postcosecha de la frutilla más graves son el moho gris (*Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr.) y la pudrición por *Rhizopus* (*Rhizopus stolonifer* Ehrenb. Fr. Vuill) (Vardar *et al.*, 2012). La aplicación del frío a través del preenfriamiento y el almacenamiento refrigerado es el sistema más usado para preservar la fruta (Guimaraes Baboza *et al.*, 2014, Nalbandi *et al.*, 2016, Sreedharan, *et al.*, 2015). Sin embargo, este tratamiento no elimina totalmente los cambios que ocurren durante el almacenamiento, por lo que generalmente se complementan con atmósferas modificadas con 15-20 % de dióxido de carbono (Blanch *et al.*, 2012, Vicente *et al.*, 2003). Paralelamente, la aplicación de procedimientos de descontaminación inicial que puedan mejorar la calidad microbiológica, preservando los atributos de calidad, resultaría crucial para este tipo de fruta. La operación tradicional de lavado-desinfección, utilizada en frutos de otras especies y en frutilla para industria no se recomienda en frutilla para el mercado fresco, ya que la fruta se puede dañar fácilmente en contacto con el agua en una línea de procesamiento, y el período de secado

puede retrasar el pre-enfriamiento, lo que puede facilitar la infección de patógenos (Vardar *et al.*, 2012). Por lo tanto, la aplicación de agentes desinfectantes por nebulización puede ser una tecnología promisorio ya que la manipulación y la generación de humedad en la superficie de las frutas están minimizadas (Oh *et al.*, 2005; Vardar *et al.*, 2012.). El nebulizado o la aerosolización es la dispersión de un agente desinfectante como una fina niebla en el aire y su aplicación en los productos. Esta operación ya ha sido utilizada con éxito para la descontaminación y el control de enfermedades de postcosecha de frutilla empleando dióxido de cloro, hipoclorito de sodio, ácido cítrico y etanol como agentes desinfectantes (Vardar *et al.*, 2012.); y en higos con el uso de dióxido de cloro (Karabulut *et al.*, 2009).

La nebulización de ácido peracético (APA) puede ser una opción promisorio para el control de la población microbiana y extender la vida útil de frutillas. El APA, disponible comercialmente, es una mezcla cuaternaria en equilibrio de ácido acético, peróxido de hidrógeno, APA y agua, y sus productos de descomposición son solamente oxígeno y ácido acético, por lo que se considera seguro para el medio ambiente (Silveira *et al.*, 2008) . Las ventajas de la utilización de este desinfectante sobre otros agentes, tales como el cloro, incluyen la ausencia o insignificante formación de compuestos tóxicos o cancerígenos, que su actividad es poco influenciada por la presencia de materia orgánica y que la misma no depende de factores tales como el pH y la temperatura (Vandekinderen *et al.*, 2009). Sin embargo, es escasa la bibliografía sobre la aplicación de este desinfectante por nebulización. Oh *et al.*, (2005) estudiaron la nebulización de ácido peracético sobre hojas de lechuga inoculadas con *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes* durante 10 a 60 min. Los autores reportaron reducciones altas (cerca de 4 ciclos log) en las poblaciones inoculadas a los tiempos máximos. Sin embargo, los resultados sobre el impacto de estos tratamientos en el contenido de los nutrientes y los compuestos bioactivos del material vegetal no son reportados por los autores. Por lo tanto, sería necesario un estudio completo de la aplicación de APA por nebulización.

El objetivo de este trabajo fue modelar y optimizar la operación de desinfección de frutillas frescas por nebulización con un desinfectante comercial basado en APA, procurando alcanzar reducciones microbiológicas y no alterar la calidad general, el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante del fruto.

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal

Se utilizaron frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch.) variedad 'Camarosa' obtenidas de una plantación en Arroyo Leyes (31° 27'0"S, 60° 40'0"W), Santa Fe, Argentina. Las frutas se cosecharon con 90 % de superficie color rojo por la mañana, se transportaron 20 kilómetros desde el campo al laboratorio, se pre-enfriaron por aire (22 a 2 °C) y se almacenaron a 2 °C hasta el día siguiente.

2.2. Ácido peracético

Oxilac Plus (Indaquim S.A., Santa Fe, Argentina) se utilizó en la operación de desinfección por nebulización. Oxilac Plus es una mezcla en equilibrio de ácido peracético (5 %), peróxido de hidrógeno (20 %) y agua.

2.3. Procedimiento de nebulización

Los tratamientos de nebulizado se realizaron en una cámara modelo hermética de plástico de 16 l de capacidad, especialmente diseñada para este experimento. La nebulización se realizó

utilizando un nebulizador ultrasónico (Respirex, Accme, SRL, Córdoba, Argentina), el cual cuenta con un reservorio que contiene el líquido (30 mL) a ser nebulizado y produce una niebla de partículas entre 0.5-8 µm de diámetro. Las partículas pequeñas son arrastradas por el flujo de aire y distribuidas dentro de la cámara de nebulizado. Seis bandejas PET (270 mL) con 150 g de frutilla cada una (8 - 10 frutas) se colocaron dentro de la cámara con las tapas abiertas y se nebulizaron a diversas concentraciones de APA y tiempos de tratamiento, de acuerdo al diseño experimental. La unidad de nebulización se encendió durante el tiempo necesario para nebulizar todo el líquido del reservorio (5 a 10 min), el nebulizador se apagó y las muestras se dejaron en la cámara en contacto con la niebla hasta cumplirse el tiempo de contacto propuesto. A continuación, las muestras tratadas se retiraron de la cámara, se cerraron las tapas de las bandejas y tres de estas bandejas se almacenaron a 2 °C por 7 días (muestras día 7). El contenido de las tres bandejas restantes se analizó inmediatamente (muestras día 0) en cuanto a la eficacia en la reducción microbiológica y los efectos de los tratamientos sobre la retención de los compuestos bioactivos, capacidad antioxidante y color. Luego de los 7 días de almacenamiento a 2 °C, las muestras correspondientes se analizaron de la misma manera.

Muestras de fruto sin tratar (muestras testigo) se utilizaron como referencia.

2.4. Diseño experimental y procedimiento de optimización

Para estudiar la operación de nebulización se utilizó la metodología de Superficie de Respuesta, utilizando un diseño central compuesto a dos factores en cinco niveles en 11 corridas experimentales. Se supuso que existe una ecuación matemática para cada respuesta estudiada que es función de los dos variables implicadas en el proceso de nebulización (Ecuación 1): $Y = f(C, T)$ (1) donde C = concentración de APA (µL APA por l de aire) y t = tiempo de tratamiento (min), siendo los cinco niveles los siguientes: C = 3.4, 20.0, 60.0, 100.0 y 116.6 µL/L y t = 5.7, 15.0, 37.5, 60.0 y 69.3 min.

Las respuestas estudiadas (Y) fueron las reducciones en los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales y levaduras y mohos, las retenciones en los contenidos (%) de antocianinas y fenoles totales, vitamina C y capacidad antioxidante y los cambios en los parámetros de color (%). Todas las respuestas se evaluaron inmediatamente después de la nebulización en el día 0, y luego de 7 días de almacenamiento a 2°C.

Las reducciones en los recuentos de los microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMTi) y levaduras y mohos (RLyMi) se expresaron como $-\log_{10} N_i/N_{ci}$, donde N_i es el recuento de microorganismos viables en las muestras nebulizadas en el día i , N_{ci} es el recuento de microorganismos viables de las muestras control en el día i , e i es el día de análisis, 0 o 7.

Las retenciones de antocianinas totales (RAT), fenoles totales (RFT), vitamina C (RVitC) y capacidad antioxidante (RCA) se expresaron como $(Q_i/Q_{ci}) \times 100$, donde Q_i y Q_{ci} representan los atributos medidos en las frutillas nebulizadas y control en el día i (0 o 7), respectivamente.

Los cambios en los parámetros de color (δL_i^* , δa_i^* y δb_i^*) se expresaron como el porcentaje de la diferencia entre los valores de los parámetros de color de los frutos nebulizadas (L_i^* , a_i^* y b_i^*) y los frutos testigo (L_{ci}^* , a_{ci}^* y b_{ci}^*), dividido por estos últimos (Ecuación 2) al día i (0 o 7 d).

$$\delta L_i^* (\%) = (L_i^* - L_{ci}^*) / L_{ci}^* \times 100 \quad (2)$$

Para modelar la Ecuación 1 para cada respuesta estudiada se propuso una ecuación polinómica de segundo grado (Ecuación 3):

$$Y = \beta_o + \beta_C \times C + \beta_t \times t + \beta_{CC} \times C^2 + \beta_{tt} \times t^2 + \beta_{tC} \times t \times C \quad (3)$$

donde β_0 , β_C , β_t , β_{CC} , β_{tt} y β_{tC} son los coeficientes de regresión, y C y T son las variables estudiadas.

La función de deseabilidad de Derringer se utilizó para la optimización numérica de respuestas múltiples de acuerdo a Derringer & Suich, (1980).

2.5. Análisis de microorganismos aerobios mesófilos totales y levaduras y mohos

Diez gramos de frutilla se homogeneizaron con 90 ml de agua de peptona al 0.1 % durante 2 min. Luego se realizaron diluciones decimales de las muestras homogeneizadas con agua de peptona al 0.1%. Se cuantificaron los microorganismos aerobios mesófilos totales, por duplicado, utilizando Agar Plate Count (PCA, Merck, EE.UU.). Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 horas y los resultados se expresaron como log de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de fruta fresca (FF). Las levaduras y mohos se cuantificaron por duplicado utilizando agar extracto de levadura glucosa cloranfenicol (YGC, Merck, EE.UU.). Las placas se incubaron a 28°C durante 5 días. Los resultados se expresaron como log UFC/g FF.

2.6. Análisis de antocianinas totales (AT), fenoles totales (FT), vitamina C (VitC) y capacidad antioxidante (CA)

2.6.1. Preparación del extracto

Para analizar los contenidos de AT, FT y CA, la extracción consistió en 5 g de frutillas homogeneizadas con 75 mL de solvente de extracción (acetona 80 %/agua 20 %). Para el contenido de VitC, 5 g de frutillas homogeneizadas se mezclaron de 25 mL de solución de extracción (ácido metafosfórico 3 % y ácido acético 8 %). Ambas mezclas se homogeneizaron durante 1 min, se sonicaron por 15 min y se centrifugaron a 12,000 g durante 20 min a 4 °C. Los sobrenadantes se separaron y se utilizaron para los análisis (triplicados).

2.6.2. Antocianinas totales (AT)

El contenido de AT se analizó utilizando un espectrofotómetro Génesis 10S UV-Vis (Thermo Scientific, Alemania) por el método diferencial de pH de acuerdo a Heo & Lee (2005). Los resultados se convirtieron en mg pelargonidin-3-glucósido/100 g FF.

2.6.3. Fenoles totales (FT)

El contenido de FT se determinó espectrofotométricamente utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu según Singleton & Rossi, (1965). Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalentes/ 100 g FF.

2.6.4. Vitamina C (VitC)

El contenido de VitC se determinó por HPLC de acuerdo a Van de Velde *et al.*, (2012). Los resultados se expresaron como mg VitC/100 g FF.

2.6.5. Capacidad antioxidante (CA)

La CA de las muestras se estimó espectrofotométricamente mediante la determinación de la capacidad de neutralización de radicales libres utilizando el radical DPPH, de acuerdo con Sánchez Moreno *et al.*, (2003). La capacidad antioxidante de los extractos de frutilla se expresó como mg de ácido ascórbico (AA) equivalente/100 g FF.

2.6.6. Medición de color

El color se determinó utilizando un espectrofotómetro Minolta 508d (Minolta Co., LTD, Japón), evaluando los parámetros del sistema CIE: L^* , a^* , y b^* . Se realizaron cinco mediciones por muestra.

2.6.7. Análisis estadístico

Statgraphics Centurion XV 15.2.06 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, EE.UU.) se utilizó para realizar el ANOVA, ajustar las ecuaciones polinomiales de segundo orden a los datos experimentales y obtener los coeficientes de las ecuaciones. La significancia de cada término de los modelos se evaluó en referencia al error puro y la eliminación de los términos no significativos se realizó por medio del procedimiento de regresión lineal "stepwise". Para la verificación de la adecuación del modelo se calcularon la falta de ajuste, el coeficiente de determinación (R^2) y la desviación media absoluta (AAD) (Bas & Boyaci, 2007). Statgraphics se utilizó también para el procedimiento de optimización numérica a través de la función de deseabilidad de Derringer.

3. Resultados y discusión

3.1. Efecto de la nebulización de APA sobre la carga microbiológica de frutillas frescas

El recuento inicial de los microorganismos aerobios mesófilos totales en las frutillas frescas (muestras testigo) fue en promedio 4.5 ciclos log UFC/g. Después de 7 días de almacenamiento a 2 °C, el recuento de estos microorganismos no cambió, indicando que la carga total de bacterias no incrementó durante el período de almacenamiento refrigerado. Por su parte, los recuentos de levaduras mohos en los días 0 y 7 fueron 3.4 y 5.0 ciclos log UFC/g, respectivamente. Estos resultados mostraron un aumento de 1.6 log en esta población microbiana luego de 7 d de almacenamiento refrigerado (sin tratamiento de desinfección). De acuerdo a Vardar *et al.*, (2012), las levaduras y mohos son los responsables de las enfermedades postcosecha más severas de las frutillas. Por lo tanto, es importante reducir el desarrollo de estos microorganismos en estas frutas.

Los resultados de las rAMTi y rLyMi, se muestran en la Tabla 1. A mayores concentraciones de APA nebulizado y tiempos de tratamiento, mayores fueron las reducciones en los recuentos de los microorganismos aerobios mesófilos totales y de levaduras y mohos.

Tabla 1. Resultados experimentales de las reducciones microbiológicas de las frutillas nebulizadas con APA al día 0 y luego de 7 días de almacenamiento a 2 °C.

Corrida	APA (µL/L)	Tiempo (min)	<i>i</i> (día)	rAMT _{<i>i</i>}	rLyM _{<i>i</i>}
1	100	15.0	0	1.1	1.1
			7	0.9	1.2
2	20	15.0	0	1.0	1.2
			7	1.0	1.4
3	20	60.0	0	1.8	1.5
			7	2.4	4.1
4	60	5.7	0	0.8	0.7
			7	1.7	0.4
5	60	37.5	0	1.0	1.6
			7	0.4	3.4
6	60	37.5	0	1.3	1.7
			7	1.0	3.7
7	3.4	37.5	0	0.7	0.3
			7	0.6	0.4
8	60	37.5	0	1.0	1.3
			7	0.6	2.9
9	60	69.3	0	1.2	0.8
			7	0.9	3.2
10	100	60.0	0	2.7	3.1
			7	2.6	4.1
11	116.6	37.5	0	3.0	1.3
			7	3.0	4.0

rAMT_{*i*}: reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales en el día *i*; rLyM_{*i*}: reducción de levaduras y mohos en el día *i*.

La Figura 1 muestra el incremento en la rAMT₀ a medida que la concentración de APA y el tiempo de tratamiento aumentan.

Los ANOVAS de los modelos de las reducciones microbiológicas no presentaron falta de ajuste ($P > 0,05$) y los valores de R² y AAD fueron aceptables (datos no mostrados). Los modelos reducidos obtenidos mediante el procedimiento de regresión “stepwise” se muestran en las ecuaciones 6, 7, 8 y 9.

$$rAMT_0 = 0.61 - 0.019C + 0.017t + 0.0003C^2 \quad (6)$$

$$rAMT_7 = 1.5 - 0.027C + 0.0003C^2 \quad (7)$$

$$rLyM_0 = 0.24 + 0.009C + 0.014t \quad (8)$$

$$rLyM_7 = -0.34 + 0.015C + 0.054t \quad (9)$$

Las valores predichos de las rAMT_{*i*} en las condiciones máximas de nebulizado estudiadas en el diseño experimental (116.6 µL APA/L y 69.3 min) son 3.6 y 2.4 ciclos log a los 0 y 7 días, respectivamente. De acuerdo a estos resultados, la rAMT es menor después de 7 días de almacenamiento, manteniéndose en buenos niveles de reducción. Por otro lado, las predicciones para las rLyM_{*i*} en las mismas condiciones son 2.3 y 5.2 ciclos log a los 0 y 7

días, respectivamente. Estos resultados muestran reducciones más altas en el recuento de levaduras y mohos después de 7 días de almacenamiento, lo que indicaría una acción residual del desinfectante nebulizado, ya que las muestras testigo no mostraron ninguna reducción en este recuento microbiano durante el almacenamiento refrigerado.

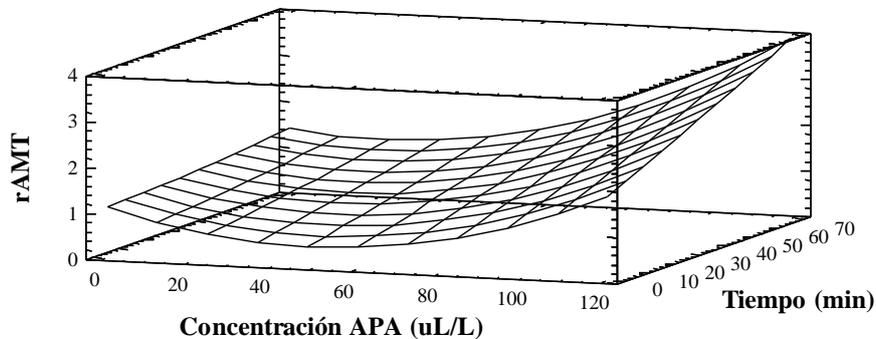


Figura 1. Gráfico de superficie de respuesta de la rAMT₀ en función de la concentración de APA y el tiempo de tratamiento.

3.2. Efecto de la nebulización de APA sobre los atributos de calidad generales y la retención de compuestos bioactivos de frutillas frescas

Los atributos de calidad generales de las frutillas frescas fueron: sólidos solubles: 6.2 ± 0.2 °Brix, pH: 3.4 ± 0.02 , y acidez total: 0.8 ± 0.1 mg de ácido cítrico anhidro 100/g FF. Los tratamientos de nebulización con APA no produjeron cambios significativos en estos atributos de calidad generales (datos no mostrados).

Los contenidos de AT, FT, VitC y CA de la fruta testigo en el día 0 fueron 39 ± 1 , 187 ± 11 , 72 ± 2 , y 431 ± 3 mg/100 g FF, respectivamente, pero luego de 7 días de almacenamiento refrigerado, estos fueron 37 ± 1 , 199 ± 5 , 66.1 ± 0.5 y 419 ± 3 mg 100/g FF, respectivamente. Estos valores están de acuerdo con los reportados para frutos de 'Camarosa' por otros autores (da Silva-Pinto *et al.*, 2008). Las RAT_i (%), RFT_i (%), RVitC_i (%) y RCA_i (%) resultaron afectadas tanto por la concentración de APA como por el tiempo de tratamiento a los 0 y 7 días (Tabla 2). El aumento en la magnitud de ambas variables experimentales produjo menores retenciones de compuestos bioactivos. Los modelos obtenidos para las retenciones de compuestos bioactivos describieron los datos experimentales de manera adecuada. La falta de ajuste no fue significativa ($P > 0.05$), y los valores de R² y AAD fueron aceptables (datos no mostrados).

Tabla 2. Resultados experimentales de las retenciones de compuestos bioactivos de frutillas nebulizadas con APA el día 0 y luego de 7 días de almacenamiento a 2 °C.

Corrida	APA (µL/L)	Tiempo (min)	<i>i</i> (día)	RAT _{<i>i</i>} (%)	RFT _{<i>i</i>} (%)	RVitC _{<i>i</i>} (%)	RCA _{<i>i</i>} (%)
1	100	15.0	0	72.5	84.6	84.0	96.1
			7	73.7	82.1	68.6	82.8
2	20	15.0	0	94.1	92.0	88.0	90.0
			7	85.7	93.6	78.0	88.8
3	20	60.0	0	80.1	90.0	78.9	85.5
			7	76.9	90.0	70.5	83.5
4	60	5.7	0	92.7	101.0	94.7	90.8
			7	92.5	99.6	94.8	100.9
5	60	37.5	0	68.2	92.1	87.9	92.7
			7	65.0	88.2	75.6	79.8
6	60	37.5	0	60.8	91.0	83.9	88.3
			7	57.9	91.9	72.5	82.5
7	3.4	37.5	0	91.7	99.8	94.4	100.4
			7	89.5	98.3	90.1	97.3
8	60	37.5	0	62.2	88.0	85.6	90.4
			7	72.1	91.6	71.1	75.2
9	60	69.3	0	53.3	84.9	83.8	84.9
			7	54.2	85.9	73.1	75.7
10	100	60.0	0	58.0	85.3	76.8	80.8
			7	60.2	82.9	78.6	70.9
11	116.6	37.5	0	31.6	82.6	70.8	78.5
			7	29.1	75.3	72.6	72.6

RAT_{*i*} (%): retención de antocianinas totales al día *i*; RFT_{*i*} (%): retención de fenoles totales al día *i*; RVitC_{*i*} (%): retención de vitamina C al día *i*; RCA_{*i*} (%): retención de capacidad antioxidante al día *i*.

La Figura 2 muestra la reducción en la RAT₀ (%) a medida que la concentración de APA y el tiempo del tratamiento aumentan.

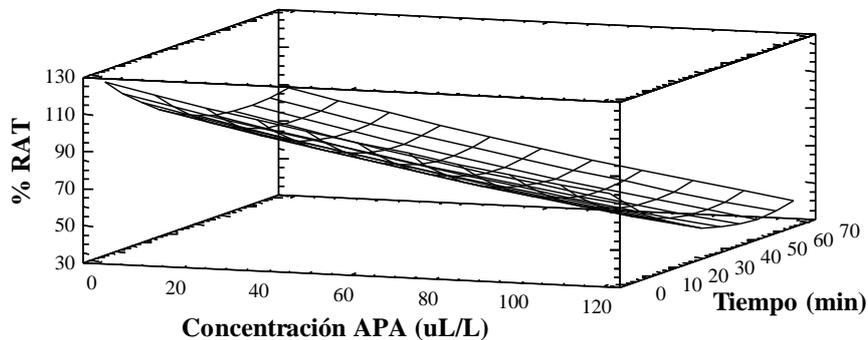


Figura 2. Gráfico de superficie de respuesta de la RAT₀ (%) en función de la concentración de APA y el tiempo de tratamiento.

Los modelos reducidos para RTA_{*i*} (%) se muestran en las ecuaciones 10 y 11, para los días 0 y 7, respectivamente.

$$\text{RAT}_0 = 111.3 - 0.40C - 0.47t \quad (10)$$

$$\text{RAT}_7 = 107.1 - 0.36C - 0.43t \quad (11)$$

Las ecuaciones 12 y 13 muestran los modelos reducidos obtenidos para RFT_i (%) en los días 0 y 7, respectivamente.

$$\text{RFT}_0 = 96.9 - 0.11C \quad (12)$$

$$\text{RFT}_7 = 98 - 0.16C \quad (13)$$

Los modelos reducidos para RVitC_i (%) se presentan en las ecuaciones 14 y 15, para los días 0 y 7, respectivamente.

$$\text{RVitC}_0 = 98.5 - 0.12C - 0.18t \quad (14)$$

$$\text{RVitC}_7 = 82.7 - 0.16t \quad (15)$$

Finalmente, los modelos reducidos de RAC_i (%) se presentan en las ecuaciones 16 y 17, para los días 0 y 7, respectivamente.

$$\text{RCA}_0 = 100.4 - 0.09C - 0.16t \quad (16)$$

$$\text{RCA}_7 = 103.7 - 0.16C - 0.29t \quad (17)$$

Las retenciones predichas de los compuestos bioactivos a la máxima concentración de APA nebulizada (116.6 $\mu\text{L/L}$) y tiempo de tratamiento (69.3 min) son 32.1 y 18.4 % para RAT_i , 84.1 y 79.3 % para RFT_i , 72.0 y 71.6 % para RVitC_i y 78.8 y 65.0 % para RAC_i , a los 0 y 7 días, respectivamente. De acuerdo a las predicciones obtenidas trabajando en estas condiciones de procesamiento, pueden lograrse retenciones de compuestos bioactivos superiores al 65 % para FT, VitC y AC, luego de 7 días de almacenamiento a 2°C. Sin embargo, estas condiciones de nebulización podrían ocasionar pérdidas de alrededor del 70% en el contenido de AT del fruto.

Las antocianinas son compuestos muy inestables y susceptibles a la degradación durante el procesamiento y almacenamiento de las frutas. Los efectos oxidantes del ácido peracético y el peróxido de hidrógeno sobre las antocianinas y otros compuestos bioactivos de las frutas finas se describieron por otros autores (Özkan *et al.*, 2005; Alexandre *et al.*, 2014). Por lo tanto, teniendo en cuenta la alta sensibilidad de las antocianinas, su relevancia en el color del fruto y su contribución a la capacidad antioxidante total, su retención debería ser priorizada. El APA nebulizado tuvo un efecto menos oxidante sobre el contenido de VitC de las frutillas. El ácido L-ascórbico es la principal forma biológicamente activa de la VitC, siendo oxidado reversiblemente para formar ácido L-dehidroascórbico. La oxidación adicional genera de manera irreversible ácido dicetogulónico, el cual no tiene ninguna función biológica (Hernández *et al.*, 2006), lo que significa una pérdida de VitC. Por lo tanto, el nebulizado de las frutillas en las condiciones máximas de tratamiento (116,6 $\mu\text{L/L}$ y 69,3 min) más 7 días de almacenamiento a 2 °C podría disminuir el contenido de VitC inicial en aproximadamente un 30% (RVitC_7 predicha = 71.6%).

3.3. Efecto de la nebulización de APA sobre los parámetros de color de frutillas frescas

Los valores de L_{c0}^* , a_{c0}^* y b_{c0}^* (parámetros de color de frutos testigo en el día 0) fueron 28.5 ± 0.6 , 29.3 ± 0.5 y 13.1 ± 0.4 , respectivamente, mientras que en el día 7 fueron 29.5 ± 0.4 , 28.0 ± 0.3 , y 12.2 ± 0.3 , respectivamente.

Según los resultados, el efecto del almacenamiento a 2 °C por 7 días produjo cambios leves pero significativos en los atributos de color del fruto. El aumento del valor de L^* y la disminución en los valores de a^* y b^* , indicaron que los frutos testigo resultaron más claros, menos rojos y menos amarillos, respectivamente, luego de 7 días de almacenamiento. Estos pequeños cambios pueden estar relacionados con la propia senescencia del fruto luego de una semana de almacenamiento refrigerado y con la ligera disminución observada en las antocianinas.

Dependiendo de las condiciones de tratamiento, se obtuvieron valores positivos y negativos en δL_i^* (datos no mostrados), indicando que los frutos nebulizados fueron más claros o más oscuros que los no tratados, respectivamente. Los más claros se obtuvieron luego de una nebulización a una concentración baja de APA (20 $\mu\text{L/L}$), tanto a tiempos cortos (15 min) como largos (60 min). La oxidación de las antocianinas observada luego de la nebulización de APA podría justificar la aparición de frutos más claros en este campo experimental. Por otro lado, cuando las frutas se nebulizaron con altas concentraciones de APA (superior a 20 $\mu\text{L/L}$), estos se volvieron más oscuros ($\delta L_i^* < 0$) que los no tratados, a pesar del hecho de que las antocianinas se continuaron degradando en este dominio experimental. Esta situación fue posiblemente causada por un fenómeno de pardeamiento que tuvo lugar en la superficie del fruto después de la nebulización con APA en concentraciones altas. En cuanto a los cambios en a^* y b^* , los valores negativos obtenidos en todo el dominio experimental para δa_0^* y δb_0^* (datos no mostrados) indican frutos menos rojos y menos amarillos luego del tratamiento de nebulización. Estos resultados se correlacionan con las mayores pérdidas de AT observadas a medida que la concentración de APA aumentaba.

Los ANOVAS de los modelos de los cambios en los parámetros de color (δL_i^* , δa_i^* y δb_i^*) no presentaron falta de ajuste ($P > 0.05$) y los valores de R^2 y AAD fueron aceptables (datos no mostrados). Los modelos reducidos para δL_i^* se presentan en las Ecuaciones 18 y 19, para los días 0 y 7, respectivamente.

$$\delta L_0^* = 3.6 - 0.06C \quad (18)$$

$$\delta L_7^* = 13.1 - 0.14C - 0.7t - 0.008t^2 \quad (19)$$

Los modelos para δa_i^* se muestran en las ecuaciones 20 y 21 para los días 0 y 7, respectivamente.

$$\delta a_0^* = -2.9 - 0.03C + 0.06t \quad (20)$$

$$\delta a_7^* = 20.8 - 0.13C - 0.9t + 0.01t^2 \quad (21)$$

Las ecuaciones 22 y 23 muestran los modelos reducidos a los días 0 y 7 para δb_i^* .

$$\delta b_0^* = 2.4 - 0.3C + 0.002C^2 \quad (22)$$

$$\delta b_7^* = 26.4 - 1.8t + 0.02t^2 \quad (23)$$

Las predicciones de δLi^* usando los modelos reducidos a la máxima concentración de APA (116.6 $\mu\text{L/L}$) y tiempo de tratamiento (69.3 min) son -3.4 y -13.3 % a los 0 y 7 días, respectivamente, indicando un oscurecimiento ulterior de los frutos tratados en esas condiciones luego del período de almacenamiento. Por su parte, las predicciones de δai^* usando los modelos reducidos en estas condiciones son -2.2 y -8.7 %, a los días 0 y 7, respectivamente. Para el caso de δbi^* , las predicciones son -0,4 y -2,3 %, a los 0 y 7 días, respectivamente. Como se puede observar, las pérdidas en los colores rojo y amarillo se intensificarían en el almacenamiento de los frutos nebulizados en esas condiciones.

3.4. Optimización y validación del procedimiento de nebulización

Se realizó una optimización numérica de respuestas múltiples mediante la función de deseabilidad de Derringer. Para el procedimiento de optimización se incluyeron todas las respuestas estudiadas que fueron afectadas significativamente por las variables de procesamiento en el día 0. Los criterios de optimización fueron: maximizar las retenciones de compuestos bioactivos ($RAT_0\%$, $RFT_0\%$, $RVitC_0\%$ y $RCA_0\%$), sin diferencias en los cambios de los parámetros de color (δL_0^* , δa_0^* , y δb_0^* , valores objetivos = 0) y una reducción microbiológica aceptable ($rAMT_0$ y $rLyM_0$, valor objetivo de 2 ciclos log UFC/g). El valor de la función deseabilidad global fue de 0.8 y las condiciones óptimas obtenidas fueron: 10.1 $\mu\text{L APA/L}$ aire y 29.6 min. Se realizaron experimentos de nebulización de frutillas frescas en las condiciones óptimas previamente establecidas. De acuerdo a los resultados obtenidos (datos no mostrados), se pueden obtener frutillas frescas con buenas reducciones microbiológicas, con más del 92% de retención en los compuestos bioactivos, sin cambios en los atributos de color. Además, es posible mantener niveles de reducción microbiológica remanente apropiados, buenas retenciones de compuestos bioactivos, sin cambios importantes en el color durante el almacenamiento a 2 °C por 7 días.

4. Conclusiones

La nebulización del desinfectante ecológico APA como tratamiento postcosecha de frutillas frescas en una cámara modelo demostró ser adecuada para reducir la carga microbiológica nativa de los frutos y preservar su calidad a 2 °C por 7 días. Las propiedades oxidantes del APA resultaron perjudiciales en cierta medida para algunos compuestos bioactivos y el color del fruto. La optimización de la operación de nebulización basada en reducciones microbiológicas adecuadas, máximas retenciones de compuestos bioactivos y mínimos cambios en los parámetros de color permitió establecer valores de las variables de procesamiento óptimos. La operación de nebulizado de frutillas frescas en esas condiciones optimizadas se validó en el día del tratamiento y luego de 7 días de almacenamiento a 2 °C. Si bien el nebulizado de APA resultó exitoso a nivel de laboratorio, estudios adicionales son necesarios con otras variedades y luego verificar si esta tecnología experimental es viable en la práctica.

5. Bibliografía

- Alexandre EMC, Silva, CLM, Brandão TRS (2014) Traditional and Emerging Technologies for Strawberry Processing. In: Malone N (ed.) *Strawberries: Cultivation, Antioxidant Properties and Health Benefits*. New York, USA: Nova Science Publishers, Inc., pp. 73-92.
- Baş D & Boyacı IH (2007) Modelling and optimization I: usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 78: 836-845.
- Blanch M, Sanchez-Ballesta MT, Escribano M, Merodio C, (2012) Water distribution and ionic balance in response to high CO₂ treatments in strawberries (*Fragaria vesca* L. cv. Mara de Bois). *Postharvest Biology and Technology* 73: 63-71.
- da Silva Pinto M, Lajolo F, Genovese M (2008) Bioactive compounds and quantification of ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chemistry* 107: 1629-1635.
- Derringer G & Suich J (1980) Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology* 12: 214 – 219.
- Guimaraes Barboza HT, Nunes Mamede A, Gomes Soares A, do Carmo Motta LC, Vasques Pacheco E (2014) Postharvest Technologies for fresh and minimally processed strawberry conservation. En: Malone N (ed.) *Strawberries: Cultivation, Antioxidant Properties and Health Benefits*. New York, USA: Nova Science Publishers, Inc., pp. 283-308.
- Heo JH & Lee CJ (2005) Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 1984-1989.
- Hernández Y, Gloria-Lobo M, González M (2006) Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chemistry* 96: 654-664.
- Karabulut OA, Lihan K, Arslan U, Vardar C (2009) Evaluation of the use of chlorine dioxide by fogging for decreasing postharvest decay in fig. *Postharvest Biology and Technology* 52: 313-315.
- Nalbandi H, Seiedlou S, Ghasemzadeh HR, Rangbar R (2016) Innovative Parallel Airflow System for forced-air cooling of strawberries. *Food and Bioproducts Processing* 100: Part A, 440-449.
- Oh SW, Gray PM, Dougherty RH, Kang HD (2005) Aerosolization as novel sanitizer delivery system to reduce food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 56– 60.
- Özkan M, Yemenicioglu A, Cemeroglu B (2005) Degradation of various fruit juice anthocyanins by hydrogen peroxide. *Food Research International*, 38: 1015-1021.
- Sánchez-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. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 430- 439.
- Silveira AC, Conesa A, Aguayo E, Artés F (2008) Alternative sanitizers to chlorine for use on fresh-cut “Galia” (*Cucumis melo* var. catalupensis) melon. *Journal of Food Science* 73: 405- 411.
- Singleton VL & Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology and Viticulture* 16: 144- 158.
- Sreedharan A, Tokarsky O, Sargent S, Schneider KR (2015) Survival of *Salmonella* spp. on surface-inoculated forced-air cooled and hydrocooled intact strawberries, and in strawberry puree. *Food Control* 51: 244-250.

- Van de Velde F, Pirovani ME, Cámara MS, Güemes D, Bernardi CMH (2012) Optimization and validation of a UV-HPLC method for vitamin C determination in strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.), using experimental designs. *Food Analytical Methods* 5: 1097-1104.
- Vandekinderen I, Devlieghere F, Van Camp J, Denon Q, Sanchez-Alarcon S, Ragaert P, De Meulenaer B. (2009) Impact of a decontamination step with peroxyacetic acid on the shelf-life sensory quality and nutrient content of grated carrots packed under equilibrium modified atmosphere and stored at 7 °C. *Postharvest Biology and Technology* 54: 141-152.
- Vardar C, Lhan K, Karabulut A. (2012). The application of various disinfectants by fogging for decreasing postharvest diseases of strawberry. *Postharvest Biology Technology* 66, 20-34.
- Vicente AR, Martínez G A, Chaves AR, Civello PM (2003) Influence of self-produced CO₂ on postharvest life of heat-treated strawberries. *Postharvest Biology and Technology* 27 (3): 265-275.