

## Tesis de Maestría

# Impacto de la aplicación de luz pulsada de alta intensidad sobre compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de frutilla

Escobar Tovar, Alejandra

2017

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Escobar Tovar, Alejandra. (2017). Impacto de la aplicación de luz pulsada de alta intensidad sobre compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de frutilla. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6136\\_EscobarTovar](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6136_EscobarTovar)

Cita tipo Chicago:

Escobar Tovar, Alejandra. "Impacto de la aplicación de luz pulsada de alta intensidad sobre compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de frutilla". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6136\\_EscobarTovar](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6136_EscobarTovar)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Maestría en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de Alimentos

**“IMPACTO DE LA APLICACIÓN DE LUZ PULSADA DE ALTA  
INTENSIDAD SOBRE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE FRUTILLA”**

Tesis presentada para optar al título de Magister en Bromatología y Tecnología de la  
Industrialización de Alimentos.

**Autora: Alejandra Escobar Tovar**

Directora: Dra. Paula Luisina Gómez

Codirectora: Dra. Stella Maris Alzamora

Lugar de trabajo:

Departamento de Industrias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de  
Buenos Aires.

Buenos Aires, 2017.

## **Impacto de la aplicación de luz pulsada de alta intensidad sobre compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de frutilla**

La luz pulsada de alta intensidad (LP) ha sido estudiada en los últimos años como método alternativo para la descontaminación superficial de alimentos. En estudios previos se demostró que la aplicación de dosis de luz pulsada entre 11,9 J/cm<sup>2</sup> y 23,9 J/cm<sup>2</sup> permitían extender la vida útil de frutillas, reduciendo la incidencia de hongos y retardando el ablandamiento durante el almacenamiento en refrigeración.

El objetivo de esta tesis fue estudiar el efecto de la aplicación de pulsos de luz de alta intensidad en algunas propiedades fisicoquímicas y en la calidad funcional de frutillas (*Fragaria x ananassaDuch* variedad camarosa), con el fin de evaluar nuevas tecnologías de procesamiento que permitan extender la vida útil de los frutos sin provocar un impacto negativo en la calidad. En particular, se investigó el efecto de la dosis de LP y el almacenamiento refrigerado sobre el pH, la acidez, los sólidos solubles, el contenido de antocianinas, el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante.

Las frutillas expuestas a dosis de LP de 11,9 J/cm<sup>2</sup> y 23,9 J/cm<sup>2</sup> no presentaron cambios relevantes en la acidez, el pH y el contenido de sólidos solubles en relación a los frutos no tratados durante 8 días de almacenamiento a 6°C. En cuanto a la calidad funcional, del análisis de los resultados expresados en base seca, se observó un incremento en el contenido de antocianinas durante el almacenamiento tanto en las muestras tratadas como no tratadas. Sin embargo, la acumulación de este pigmento fue levemente menor en los frutos tratados con dosis de 23,9 J/cm<sup>2</sup>, lo que podría estar asociado a un retraso en la maduración de los frutos inducido por la LP. Las variaciones observadas en el contenido de antocianinas no se correlacionaron con el contenido de fenoles totales, ya que se observó una leve disminución significativa de los compuestos fenólicos en todas las muestras, no viéndose afectados por las diferentes dosis de LP aplicadas. Además, no se encontraron diferencias significativas en la actividad antioxidante (ORAC<sub>FL</sub>) ni por efecto del almacenamiento ni de los tratamientos.

Los resultados indican que la luz pulsada de alta intensidad podría ser utilizada para extender la vida poscosecha de frutillas sin afectar de manera relevante las propiedades fisicoquímicas, el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante.

**Palabras clave:** pulsos de luz, frutilla, antocianinas, compuestos fenólicos, actividad ORAC.

## **Impact of high intensity pulsed light on bioactive compounds content and antioxidant capacity of strawberry fruit**

Pulsed light (PL) treatment has emerged in recent years as an alternative method for surface decontamination of foods. In previous studies it was demonstrated that the application of fluencies between 11,9 J/cm<sup>2</sup> and 23,9 J/cm<sup>2</sup> could be able to extend the shelf life of strawberry fruit, reducing the incidence of postharvest molds and deleting the softening along cold storage.

The objective of this work was to analyze the impact of pulsed light treatments on some physicochemical properties and functional quality of strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* Duch camarosa cv.) To this end, the effect of PL fluence and refrigerated storage on pH, acidity, total soluble solid, total anthocyanin and phenolic contents and antioxidant capacity was investigated.

Strawberries exposed to PL fluencies of 11,9J/cm<sup>2</sup> and 23,9 J/cm<sup>2</sup> did not show significant changes in pH, soluble solids and acidity during 8 days of storage at 6°C. An increase in anthocyanin content along storage in all samples was observed. However, the content of this pigment in samples treated with 23,9 J/cm<sup>2</sup> was significantly lower than in non-treated samples, which could be associated with a delay in ripening induced by PL. The variations observed in anthocyanin content did not correlate with changes in total phenolic content (TPC), since TPC in all the samples slightly decrease throughout the storage. In addition, there were not significant differences in hydrophilic ORAC activity of samples neither due to treatments nor the storage time.

Results indicate that pulsed light treatment could help to extent the postharvest life of strawberries without impacting notoriously on physicochemical properties and total phenolic content and antioxidant capacity.

**Key words:** pulsed light, strawberry, anthocyanins, phenolic content, ORAC activity.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad y fortaleza para sacar este sueño adelante, por ponerme en el camino personas maravillosas que con su apoyo me ayudaron en el camino.

A Paula y Stella por su dedicación y enseñanzas en estos años, por la buena voluntad y disposición.

A mi familia por su apoyo y su amor incondicional, es por ellos que soy lo que soy y lo que he logrado.

A Priscilla, Tatiana, Angélica, Gabriela, Alondra, Sandra, que hicieron el camino más fácil y la distancia menos larga, por compartir momentos de estudio y momentos de diversión, sin ustedes no hubiera sido lo mismo.

A mis hermanas de Buenos Aires Mary, Juli y Natalia que estuvieron siempre en todos los momentos, muchas gracias.

A Leandro por su amor, paciencia y apoyo en cada momento, por enseñarme un mundo diferente por hacerme ver la vida con otros ojos y estar siempre a mi lado.

A todas las personas que de una manera u otra han sido una influencia en este tiempo.

Alejandra

## INDICE

1. OBJETIVOS.....	7
1.1. Objetivo general .....	8
1.2. Objetivos específicos.....	9
2. INTRODUCCIÓN.....	10
2.1. La Frutilla .....	11
2.1.1. Generalidades.....	11
2.1.2. Producción.....	11
2.1.3. Taxonomía.....	12
2.1.4. Composición .....	14
2.2. Compuestos bioactivos.....	17
2.2.1. Definición.....	17
2.2.2. Compuestos fenólicos .....	18
2.2.3. Antocianinas.....	22
2.2.4. Medición del contenido de compuestos fenólicos y antocianinas .....	26
2.3. Antioxidantes.....	27
2.3.1. Definición.....	27
2.3.2. Capacidad antioxidante .....	29
2.3.3. Métodos para la determinación de capacidad antioxidante.....	31
2.4. Pulsos de luz de alta intensidad.....	34
2.4.1. Generalidades.....	34
2.4.2. Susceptibilidad de los microorganismos.....	36
2.4.3. Mecanismo de inactivación.....	37
2.4.4. Aplicación de pulsos de luz en frutas y hortalizas .....	39
2.4.5. Ventajas y desventajas .....	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
3.1. Materia Prima .....	44
3.2. Reactivos .....	44
3.3. Aplicación de pulsos de luz de alta intensidad .....	45

3.3.1. Descripción del equipo.....	45
3.3.2. Determinación de la dosis .....	46
3.3.3. Tratamientos.....	47
3.4. Almacenamiento de las muestras .....	47
3.5. Determinación de pH, sólidos solubles y acidez titulable.....	48
3.5.1. Determinación de pH.....	48
3.5.2. Determinación de sólidos solubles.....	48
3.5.3. Determinación de acidez titulable.....	48
3.6. Extracción y medición de antocianinas .....	49
3.7. Extracción y medición de compuestos fenólicos.....	50
3.8. Determinación de capacidad antioxidante.....	51
3.9. Análisis estadístico .....	52
4. RESULTADOS .....	54
4.1. Efecto de la luz pulsada en el pH, la acidez titulable y los sólidos solubles .....	55
4.2. Efecto de la irradiación con luz pulsada en el contenido de antocianinas.....	58
4.2.1. Evaluación del tiempo de extracción de antocianinas.....	58
4.2.2. Contenido de antocianinas en frutillas tratadas con LP.....	60
4.3. Efecto de la irradiación con luz pulsada en el contenido de fenoles totales.....	64
4.4. Efecto de la irradiación con luz pulsada en la capacidad antioxidante .....	68
4.5. Selección de la dosis.....	74
5. CONCLUSIONES.....	77
6. BIBLIOGRAFÍA .....	79

# 1. OBJETIVOS





### 1.1. Objetivo general

En la actualidad, los consumidores, además de buscar productos de buena calidad microbiológica y organoléptica, también buscan productos con características nutricionales que tengan beneficios para la salud. Una dieta rica en frutas y vegetales está asociada con una baja incidencia de diversas patologías, incluidas la obesidad, infecciones, enfermedades neurológicas y cardiovasculares, y cáncer.

Las frutas son productos altamente perecederos, particularmente luego de la cosecha. Los factores determinantes de estas pérdidas son la rápida progresión de la maduración, la senescencia, el daño mecánico y la susceptibilidad a la infección por insectos, bacterias y hongos. El método más utilizado para reducir el crecimiento de microorganismos patógenos y de deterioro en frutas y vegetales frescos ha sido el uso de agroquímicos. Sin embargo, la aplicación de muchos de estos compuestos ha sido cuestionada debido a los riesgos potenciales de los residuos de estos químicos sobre la salud humana. Por ello, en las últimas décadas se encuentran en estudio nuevas estrategias para reducir las enfermedades postcosecha, dentro de las que se encuentran los métodos físicos como el uso de atmósferas controladas o modificadas, tratamientos térmicos leves, exposición a radiaciones ionizantes, luz UV-C y luz pulsada de alta intensidad. El desafío es lograr garantizar la inocuidad y, al mismo tiempo, la calidad sensorial, nutricional y/o funcional de productos de consumo directo o de materias primas.

El *objetivo general* de esta tesis fue estudiar la aplicación de pulsos de luz de alta intensidad en frutilla, con el fin de evaluar nuevas tecnologías de procesamiento que permitan extender la vida útil de los productos, con un mínimo impacto en las características nutricionales y/o funcionales, fisicoquímicas y organolépticas.

## **1.2. Objetivos específicos**

- 1) Evaluar el efecto de la dosis de luz pulsada sobre los compuestos bioactivos (antocianinas y compuestos fenólicos totales) y la capacidad antioxidante de la matriz estudiada, luego de aplicar los tratamientos y a lo largo del almacenamiento a 6 °C.
  
- 2) Evaluar el efecto de la dosis de luz pulsada sobre los sólidos solubles, el pH y la acidez titulable.
  
- 3) Establecer las dosis límites en que pueda aplicarse la tecnología estudiada sin provocar un impacto negativo en la calidad, integrando los resultados de la evaluación de la calidad funcional con estudios previos realizados en esta matriz frutal, en donde se evaluó el efecto sobre el crecimiento fúngico y otros aspectos de la calidad como el color y la textura.

## 2. INTRODUCCIÓN



## **2.1. La Frutilla**

### **2.1.1. Generalidades**

La frutilla pertenece a la familia Rosaceae, y es una fuente importante de compuestos con actividad antioxidante, especialmente antocianinas, ácidos fenólicos y vitamina C, los cuales son protectores de la oxidación de muchos componentes de las organelas.

Las frutillas han atraído la atención de consumidores e investigadores debido a que poseen mayor actividad antioxidante total comparada con otras frutas frescas como toronja, naranja, uva roja, kiwi, banano, manzana, tomate, pera y melón (Wang, 1996). La actividad antioxidante de extractos de frutilla se ha asociado fundamentalmente con el contenido de fenoles totales; adicionalmente, las antocianinas, que son los compuestos fenólicos predominantes, son las responsables del color brillante y atractivo de estos frutos (Rekika y col., 2005; Wang y col., 1997).

### **2.1.2. Producción**

La producción de frutilla en Argentina se extiende a lo largo del año y se concentra en las provincias de Santa Fe, Buenos Aires y Tucumán. Se producen alrededor de 35.000 toneladas anuales de frutillas, de las cuales el 30% corresponde a Coronda (provincia de Santa Fe), 40 % a la provincia de Tucumán y el resto a otras zonas productoras como Buenos Aires (15%), Corrientes (6%), Mendoza (1%) y provincias del sur del país (8%). La superficie total sembrada creció un 50% en el período 1997 a 2007, debido al aumento de la utilización de riego por goteo, incorporación de nuevos cultivares y mejoras en el manejo del cultivo (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina, 2008).

La mayor superficie sembrada se encuentra en las provincias de Tucumán y Santa Fe (Coronda), donde se realiza el cultivo a campo y en túneles bajo cubierta.

A continuación se describe brevemente la producción en las diferentes provincias y los períodos de cosecha.

- En la provincia de Santa Fe la producción es a campo de fines de Agosto a fines de Diciembre, y bajo protección de mediados de Junio hasta fin de año. En Tucumán, la producción en piedemonte comienza a fines de Marzo y se extiende hasta fines de Noviembre, y en los valles de altura desde inicio de Septiembre hasta fines de Marzo.
- En la provincia de Buenos Aires hay una producción a campo en la primera semana de Febrero, luego desde mediados de Marzo a mediados de Mayo, y finalmente desde mediados de Septiembre a fines de Diciembre. En Mar del Plata, la cosecha se presenta desde mediados de Noviembre hasta principios del mes de Mayo.
- En Neuquén y Río Negro desde comienzos de Diciembre hasta fines de Febrero.

### 2.1.3. Taxonomía

Nombre común: Fresa o Frutilla

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Género: *Fragaria*

Especie: *Fragaria x ananassa* Duch.

Existen numerosas especies silvestres o cultivadas que producen frutos comestibles del género *Fragaria*, que reciben la denominación común de fresa/fresón/frutilla, y que han dado origen a numerosas variedades, por cultivo o cruzamiento, destacando su amplia distribución en las zonas templadas y subtropicales con una temperatura media anual que varía de 12 a 20 °C. Las frutillas cultivadas actualmente de frutos grandes provienen de la especie *Fragaria x ananassa* Duch., reconocida como híbrido de dos especies nativas americanas, *F. chiloensis* (L) Duch. y *F. virginiana* Duch. (Debnath y Teixeira, 2007).

Existe una gran cantidad de variedades de frutilla, las más comercializadas son las de cultivo intensivo que, con la ayuda de invernaderos, consiguen tener presencia todo el año en el mercado. El ciclo vegetativo depende mucho del fotoperiodo, factor que clasifica las variedades en uníferas o de días cortos (menos de 12 horas de luz), reflorecientes o de día largo (más de 14 horas de luz) y remontantes o de día neutro (diferencia sus flores con cualquier duración del día). Las principales variedades cultivadas en el mundo son (Navarro, 2001):

- Camarosa: variedad de día corto, de origen californiano que presenta un fruto grande, muy precoz, de color rojo brillante, interior muy coloreado, con buen sabor y firmeza. Está adaptada a las condiciones agroclimáticas de la mayoría de las zonas frutícolas del mundo.
- Carisma: variedad de día corto, muy vigorosa y rústica, capaz de adaptarse a todo tipo de suelos y climas, precoz y muy productiva. El fruto tiene forma cónica, a veces apostillada, de color suave y de gran tamaño.
- Cartuno: presenta un fruto de forma cónica perfecta, calibre uniforme y color rojo brillante, de sabor azucarado y resistencia a la clorosis férrica.
- Chandler: variedad de día corto, precoz, presenta frutos cuneiformes, de tamaño grande, de color vivo intenso, sabor dulce y de gran calidad. Los aquenios son pequeños y están hundidos en la superficie del fruto, lo que les da un mejor sabor. En determinadas condiciones climáticas presenta una maduración incompleta, quedando el ápice de la fruta color verde o blanco.
- Douglas: presenta frutos de gran tamaño y apariencia muy atractiva, color rojo vivo y marcado diformismo, con frutos piramidales, cuneiformes (forma de cuña) y pulpa rosada.
- Oso grande: variedad de origen californiano, de color anaranjado, con forma de cuña achatada y tendencia a aparecer bilobulado, de calibre grueso y buen sabor. Presenta una tendencia al rajado del fruto, lo que supone un inconveniente.

- Pájaro: es una variedad de día corto, con frutos de forma cónica, de color rojo brillante, cuello blanco y grueso de pulpa consistente con un sabor muy apreciado. Utilizable tanto para la venta en fresco como para la industrialización.
- Reina de los valles: es una variedad de día neutro. Los frutos son pequeños, de forma cónica alargada, de color rojo blanquecino a rojo brillante, con succulenta pulpa de sabor dulce y aromática. Utilizable para consumo en fresco o congelación.
- Selva: variedad de día neutro muy productiva. El fruto presenta gran calibre, forma cónica acunada, algo alargada, color rojo intenso brillante y uniforme, la pulpa es de color rojo anaranjada, un poco más clara en la cercanía del corazón, poco jugosa y muy consistente. Se adapta bien a suelos de poca fertilidad pero es muy sensible a *Botrytis*, oídio (enfermedad fúngica) y viruela y, además, es atacada con facilidad por la arañita roja.

El fruto o frutilla es en realidad un “falso fruto” (infrutescencia), botánicamente denominado eterio, formado por el engrosamiento del receptáculo floral, en el que están insertos los verdaderos frutos, llamados aquenios (**Figura 2.1**). La parte central o corazón puede estar muy o poco desarrollada pudiendo haber frutos con corazón vacío (Navarro, 2001).

#### **2.1.4. Composición**

Las frutillas son frutas que aportan pocas calorías y cuyo componente más abundante después del agua son los hidratos de carbono (fructosa, glucosa y sacarosa). Destaca su aporte de fibra y el alto contenido en ácido cítrico y vitamina C. La ingesta diaria recomendada para esa vitamina (100-150 mg/día) puede ser satisfecha con un promedio de 200 g de frutilla por día (Kafkas y col., 2007). Comparado con otros



**Figura 2.1.** Partes de la frutilla, corte longitudinal.

frutos, las frutillas son una fuente importante de folatos. Contienen también ácido málico y ácido oxálico, potasio y, en menor proporción, vitamina E y vitamina B5 (niacina) (**Tabla 2.1**). Además de estos compuestos nutritivos, contienen una variedad de componentes no nutritivos, como los compuestos fitoquímicos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos y taninos).

#### 2.1.5. Vida útil

La frutilla se clasifica por su fisiología dentro de los frutos no climatéricos, debido a que la maduración se inicia y progresa sin que se produzca un pico en la producción de etileno ni un aumento en la respiración (Giovannoni, 2001).

Desde el punto de vista de la calidad, las principales características consideradas en las frutillas son el color, el brillo, el tamaño, la forma, la ausencia de defectos, la firmeza y el sabor (asociado con los niveles de sólidos solubles, la acidez y los niveles de compuestos aromáticos volátiles). Se recomienda para la cosecha un mínimo de 7 % de sólidos solubles y/o un máximo de 0,8 % de acidez titulable (DeEll y col., 2006).

Con respecto a su comportamiento durante el almacenamiento, la frutilla tiene una tasa relativamente alta de respiración ( $50\text{-}100 \text{ mL kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), por lo tanto es un fruto muy perecedero. Produce muy poco etileno ( $<0,1 \text{ } \mu\text{L kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ )



**Tabla 2.1.** Tabla de composición nutricional\* de la frutilla.

Componente		Componente	
Agua (g)	90,95	Almidón (g)	0,04
Ácidos Orgánicos (g)	1,0	Fructosa (g)	2,5 – 3,5
Ceniza (g)	0,4	Glucosa (g)	2,04 – 3,03
Energía (kcal)	32,0 – 34,0	Sacarosa (g)	0,12 – 0,35
Fibra (g)	2,0	Xilitol (g)	0,03
Hidratos de Carbono (g)	4,66 – 7,68	Sorbitol (g)	0,03
Lípidos(g)	0,3 – 0,5	Vitamina A IU	12,0
Proteína (g)	0,7	Tiamina (B <sub>1</sub> ) (mg)	0,024
Calcio (mg)	16,0	Riboflavina (B <sub>2</sub> ) (mg)	0,06
Cloro (mg)	14,0	Niacina (B <sub>3</sub> ) (mg)	0,386
Cobre (mg)	0,048	Acido Pantoténico (B <sub>5</sub> ) (mg)	0,125
Fósforo (mg)	24,0 – 26,0	Piridoxina (B <sub>6</sub> ) (mg)	0,047
Flúor (µg)	25,0	Folatos totales (µg)	24,0
Hierro (mg)	0,42 – 0,7	Vitamina C (mg)	58,8 – 60,0
Magnesio (mg)	13,0	Vitamina E (mg)	0,29
Manganeso (mg)	0,386	Vitamina K (µg)	2,2
Potasio (mg)	153,0	Ácido cítrico (mg)	870,0
Sodio (mg)	1,0 – 2,0	Ácido málico (mg)	140,0
Yodo (µg)	1,0	Ácido oxálico (mg)	16,0
Zinc (mg)	0,14	Ácido salicílico (mg)	1,4

\* Cantidades expresadas por 100 g de fruta fresca.  
Fuente: Nunes (2006).

y su sensibilidad a dicha hormona es baja (DeEll, 2011). La vida útil poscosecha de la frutilla destinada al consumo directo es muy breve, debido principalmente al marcado ablandamiento que sufre durante su maduración y a la elevada incidencia de hongos luego de varios días de almacenamiento.

La frutilla debe ser recolectada y manipulada con mucho cuidado. Es recomendable realizar la cosecha temprano en el día mientras que las temperaturas son bajas, pero evitando la presencia de rocío en la superficie del fruto, ya que favorecería el desarrollo de *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*, principales patógenos de poscosecha. Las estrategias más comunes para el control de enfermedades consisten en prevenir el daño mecánico y la contaminación cruzada (eliminando las bayas dañadas o con infecciones), y refrigerar rápidamente la fruta una vez cosechada, ya que en muchos países no se encuentran aprobados fungicidas para su uso en poscosecha. El

enfriamiento de las bayas elimina el calor de campo y extiende su vida útil (Demchak y col., 2011). Las condiciones recomendadas de almacenamiento son: 0 °C y 90-95 % de humedad relativa. Las atmósferas modificadas (15% CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub>) logran buenos resultados. Otras estrategias evaluadas han sido la irradiación, los tratamientos cortos con calor, la aplicación de productos químicos (sales de calcio, 1-metilciclopropeno), aplicación de inductores de respuesta de defensa de la planta, tratamientos con compuestos naturales antimicrobianos, entre otros. Los métodos físicos, tales como tratamientos con calor, la irradiación con luz UV-C y luz pulsada de alta intensidad, son estrategias de interés estudiadas para retrasar el deterioro de los frutos. El control biológico y otros tratamientos capaces de activar respuestas defensivas naturales de los frutos también han mostrado resultados alentadores, aunque sólo se han utilizado a nivel de laboratorio (Helbig, 2002; Karabulut y col., 2004; Peng y Sutton, 1991; Wisniewski y Wilson, 1992).

## **2.2. Compuestos bioactivos**

### **2.2.1. Definición**

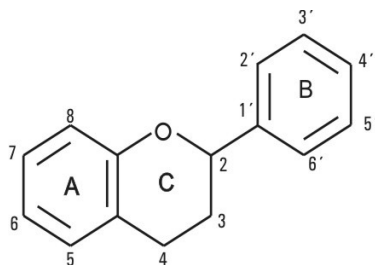
Los compuestos bioactivos se definen como sustancias no nutritivas que se encuentran en bajas concentraciones en los alimentos, intervienen en algunos casos en el metabolismo secundario de los vegetales, y pueden ejercer un efecto benéfico para alguna función corporal del individuo, produciendo una mejora en su salud y bienestar o reduciendo un riesgo de enfermedad. Recientemente, algunos nutrientes han sido incluidos como compuestos bioactivos por presentar, además de su función esencial en el organismo, un efecto beneficioso para la salud. En general, la mayoría de los compuestos bioactivos se caracterizan por tener una marcada actividad antioxidante. Dentro de este grupo de sustancias se encuentran los fitoquímicos, lípidos bioactivos, esteroides vegetales, proteínas y péptidos bioactivos, probióticos, prebióticos, minerales y vitaminas (Drago-Serranoy col., 2006; Jeffery y col., 2003; Khris-Etherton y col., 2002).

Los fitoquímicos son compuestos bioactivos presentes en vegetales e incluyen a los carotenoides, clorofilas, curcuminoides, fibra, fitoestrógenos, flavonoides e isotiocianatos (Drago-Serrano, 2006).

### **2.2.2. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son fitoquímicos que han despertado interés en los últimos años, ya que pueden detener la cadena de radicales libres de reacciones oxidativas por medio de la donación de átomos de hidrógeno de sus grupos hidroxilo, formando radicales libres relativamente estables que no inician o propagan la oxidación de lípidos (de la Torre, 2007). Por tal razón, su consumo se ha asociado con posibles beneficios para la salud, por ser agentes que pueden contrarrestar el deterioro del organismo (Velásquez y col., 2004), así como la incidencia de enfermedades de carácter crónico degenerativo como el mal de Parkinson, diabetes o cáncer. Es por esto que los compuestos fenólicos han sido objeto de múltiples investigaciones y desarrollos tecnológicos para cuantificar estas propiedades relacionadas con su capacidad de quelar metales, inhibir enzimas como la lipoxigenasa y la peroxidasa, además de capturar radicales libres (Artajo, 2006). En alimentos vegetales, han sido identificados varios cientos de polifenoles, los cuales son clasificados de acuerdo al número de anillos fenólicos y su enlace. Están presentes en su mayoría como glucósidos, y una parte también como ésteres. Su capacidad antioxidante depende del número y la posición del grupo OH y el pH. También contribuyen al color y sabor de varios tipos de fruta (Belitz y col., 2009). Los compuestos fenólicos de las plantas incluyen a los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos y, los menos comunes, estilbenos y lignanos. Entre los grupos de alimentos ricos en estos compuestos se encuentra la familia de las bayas o berries.

Los flavonoides son los polifenoles más abundantes de nuestras dietas. La estructura básica es el núcleo flavano que contiene 15 átomos de carbono reordenados en 3 anillos (C6-C3-C6) (**Figura 2.2**). A su vez, los flavonoides se dividen en seis subgrupos: flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianos, flavanoles e isoflavonas. La variación estructural en cada subgrupo se debe en parte al grado y patrón de

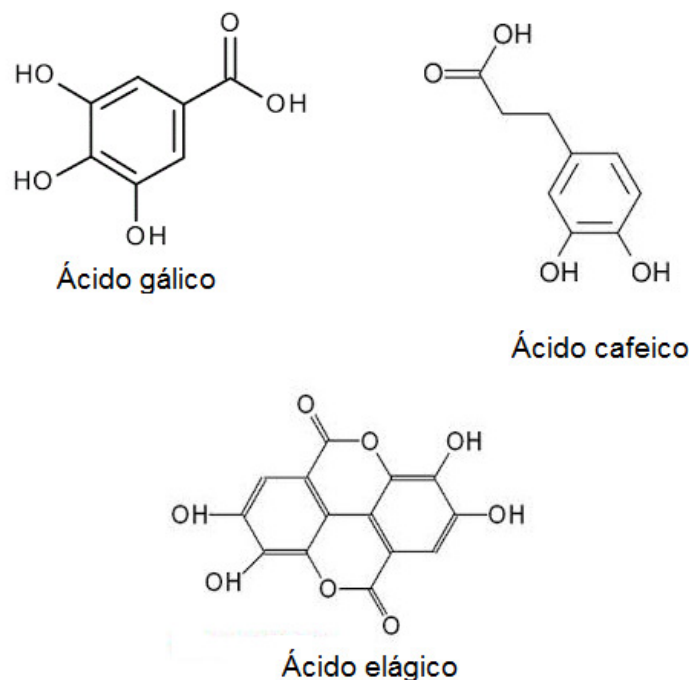


**Figura 2.2.** Estructura básica de los flavonoides.

hidroxilación, metoxilación, prenilación o glicosilación. Algunos de los flavonoides más comunes incluyen a la quercitina, un flavonol abundante en cebolla, brócoli y manzana; catequina, un flavonol encontrado en té y varias frutas; naringenina, la principal flavanona en el pomelo; cianidin-glucósido, una antocianina abundante en las bayas; daidzeina, genisteína y gliciteína, las principales isoflavonas presentes en la soja (Dai y Mumper, 2010; D'Archivio y col., 2007).

Los ácidos fenólicos se caracterizan por tener un ácido carboxílico terminal y pueden ser divididos en dos clases: los derivados del ácido benzoico como los ácidos gálico, p-hidroxibenzoico y elágico, y los derivados del ácido cinámico como los ácidos p-coumárico, cafeico y ferúlico (**Figura 2.3**). El ácido cafeico es el ácido fenólico más abundante en muchas frutas y vegetales, muchas veces esterificado con ácido quínico como en el ácido clorogénico. Otro ácido fenólico común es el ácido ferúlico, el cual se encuentra presente en cereales y está esterificado a las hemicelulosas en las paredes celulares (Dai y Mumper, 2010; D'Archivio y col., 2007).

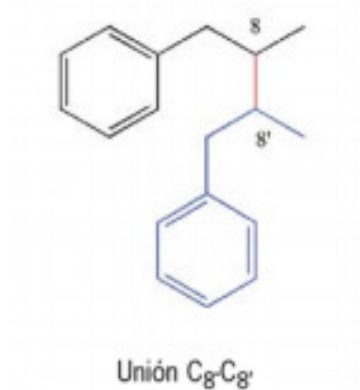
Los taninos son otro grupo importante de polifenoles y usualmente están divididos en dos grupos, los taninos hidrolizables y los taninos condensados. Los taninos hidrolizables son compuestos que contienen un núcleo central de glucosa u otro polirol esterificado con ácido gálico, también llamados galotaninos, o con ácido hexahidroxidifénico, también llamados elagitaninos. Los taninos condensados o proantocianidinas son oligómeros o polímeros que provienen de la esterificación de compuestos fenólicos flavonoides, como las catequinas o flavan-3-oles (D'Archivio y col., 2007; Vázquez-Flores y col., 2012). Esta clasificación actual es posible que pueda cambiar, ya que estudios recientes señalan, por ejemplo, que algunas



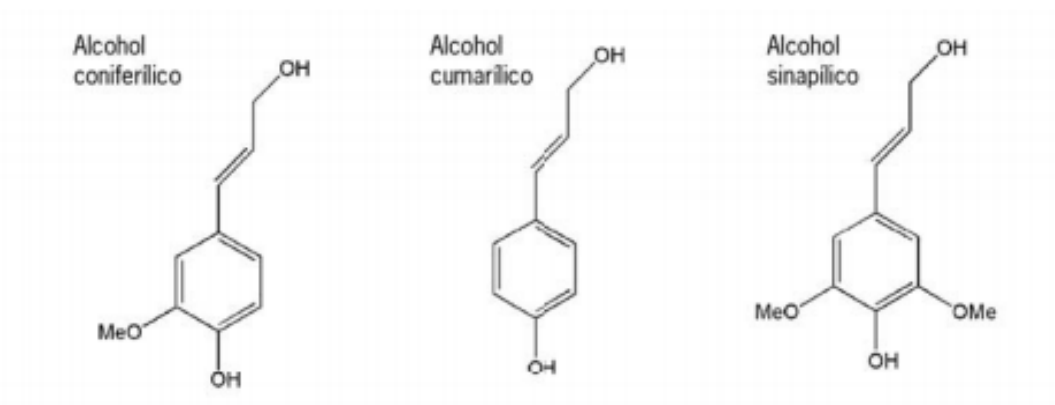
**Figura 2.3.** Estructura de algunos ácidos fenólicos.

proantocianidinas presentes en semillas de uvas pueden unirse a porciones monoméricas de taninos hidrolizables, como el ácido gálico (Fine, 2000; Vázquez-Flores y col., 2012). Si bien se han encontrado efectos benéficos de los taninos relacionados fundamentalmente a sus propiedades antioxidantes, en algunos estudios se han reportado efectos anti nutritivos, como la formación de complejos con proteínas, carbohidratos y minerales, así como un efecto pro-oxidante a altas concentraciones (Vázquez-Flores y col., 2012).

Los lignanos son polifenoles pertenecientes al grupo de fitoestrógenos. Están formados por dos unidades de fenilpropano enlazadas por el átomo central de sus cadenas laterales (**Figura 2.4**). Los lignanos son biosintetizados mediante el acoplamiento de los alcoholes coniferílico, cumarílico y sinapílico (**Figura 2.5**). Las funciones fisiológicas de estos compuestos están relacionadas con funciones defensivas: actividad antioxidante, fungicida, antibacteriana, insecticida, etc. (Boluda y col., 2005).

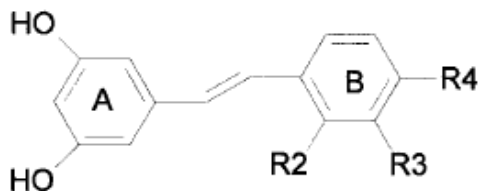


**Figura 2.4.** Estructura de los lignanos.



**Figura 2.5.** Monolignoles.

Los estilbenos son 1,2-diariletenos. El anillo A usualmente lleva dos grupos hidroxilo en la posición *m*, el anillo B es sustituido por grupos hidroxilo y metoxi en la posición *o-m* y *o-p*. Son sintetizados por derivados del ácido cinámico, y el patrón de sustitución del ácido determina el anillo B del estilbeno (**Figura 2.6** y **Tabla 2.2**) (Luckner, 1990). Los estilbenos están mayormente distribuidos en plantas hepáticas y plantas superiores en forma monomérica y como estilbenos diméricos, triméricos y poliméricos. Son sintetizados por una amplia variedad de plantas y son encontrados comúnmente en las raíces, cortezas, rizomas y hojas. Sin embargo, los estilbenos están a menudo en plantas que no son consumidas en la rutina, o se encuentran en los



**Figura 2.6.** Estructura representativa de estilbenos.

**Tabla 2.2.** Características estructurales de los estilbenos.

R2'	R3'	R4'	Ácido fenólico	Estilbeno
H	H	H	Ácido cinámico	Pinosilvina
H	H	OH	<i>p</i> -ácido cumárico	Resveratrol
OH	H	OH	2'-4'-ácido dihidroxicinámico	Hidroxi-resveratrol
H	OH	OH	Ácido cafeico	Piceatanol
H	OH	OCH <sub>3</sub>	Ácido isoferúlico	Raponticina

tejidos no comestibles. La mayor fuente en la dieta de estilbenos son uvas, jugo de uva y vino, también el maní y mantequilla de maní (Cassidy y col., 2000).

En la **tabla 2.3** se muestran los polifenoles encontrados en frutillas. La mayor clase de compuestos fenólicos en la frutilla son representados por los flavonoides (en su mayoría antocianinas), seguido por taninos hidrolizados (elagitaninos, galotaninos) y ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos y hidroxicinámicos), siendo los menores constituyentes los taninos condensados (proantocianidinas) (Aaby y col., 2005; Kähkönen y col., 2001).

### 2.2.3. Antocianinas

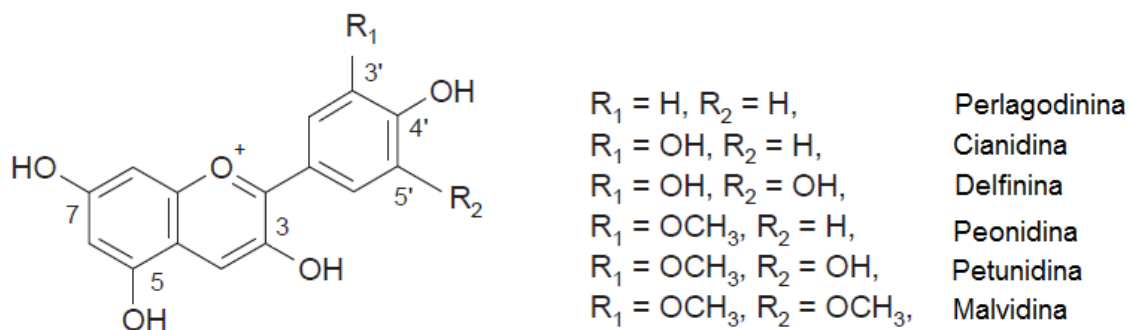
Son moléculas que pertenecen a la clase de los flavonoides. Las antocianinas confieren la mayoría de los tonos rojos, azules y púrpuras a frutas, granos, vegetales, hojas y flores, de donde deriva su nombre en griego *anthos* que significa flor y *kyanos* que significa azul (Delgado y col., 2000; Welch y col., 2008). Estructuralmente, estas moléculas están compuestas por una aglicona llamada antocianidina y residuos de carbohidratos. La estructura básica de las agliconas es el ión flavilio, también llamado 2-fenil benzopropilo (Oancea y col., 2012).

Tabla 2.3. Polifenoles reportados en frutilla.

Clase	Grupo	Compuesto
Flavonoides	Antocianinas	Cianidina-3-glucósido
		Cianidina-3-rutinósido
		Cianidina-3- malonil glucósido
		Cianidina-3- glucosil malonil-5-glucósido
		Pelargonidina-3-galactósido
		Pelargonidina-3-glucósido
		Pelargonidina-3-rutinósido
		Pelargonidina-3-arabinósido
		Pelargonidina-3,5-diglucósido
		Pelargonidina-3-malil glucósido
		Pelargonidina-3-malonil glucósido
		Pelargonidina-3-acetil glucósido
		Pelargonidina-disacárido (hexosa + pentosa) acetilado con ácido acético
		5-piranopelargonidina-3-glucósido
Quercetina-3-malonil glucósido		
Quercetina-rutinósido		
Quercetina-glucósido		
Quercetina-glucurónido		
Kaempferol-3-glucósido		
Kaempferol-3-malonil glucósido		
Kaempferol-cumaroil-glucósido		
Kaempferol-glucurónido		
	Flavanoles	
		Proantocianidina trimerica (EC-4,8-EC-4,8-C)
		Proantocianidina B3 (C-4,8-C) (+)-catequina
Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	<i>p</i> -cumaroil hexosa
Taninos hidrolizables	Elagitaninos	Elagitanino
		Bis-HHDP-glucosa
		Galoil-HHDP-glucosa
		HHDP-galoil-glucosa
		Galoil-bis-HHDP-glucosa
		Dímero de galoil-bis-HHDP
		Sanguin H-6
		Conjugados metil-EA-pentosa
		Ácido elágico pentósido
		Ácido elágico

Fuente: Giampieri y col. (2012)





**Figura 2.7.** Estructura química general de las antocianinas más comunes.

Fuente: Oancea y col. (2012).

De todas las antocianidinas que actualmente se conocen (aproximadamente 20), las más importantes son la pelargonidina, la delfinina, la cianidina, la petunidina, la peonidina y la malvidina, nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez; la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas que abundan en la naturaleza (Badui, 2006). La cianidina es la antocianina más abundante en todo el reino vegetal (Galvano y col., 2004). Es muy común que una misma antocianidina interaccione con más de un hidrato de carbono para formar diferentes antocianinas. Generalmente se encuentran en la cáscara o piel, como en el caso de las peras y las manzanas, pero también se pueden localizar en la parte carnosas, como en las fresas y las ciruelas.

Debido a que las antocianidinas no existen en estado libre en los alimentos, su presencia es indicio de una posible hidrólisis química o enzimática del enlace glicosídico del pigmento; esta reacción no necesariamente causa la pérdida del color pero la aglicona se vuelve más sensible a muchos factores externos e incluso puede precipitar; en ambos casos el color se ve fuertemente afectado después de algún tiempo (Badui, 2006).

Las antocianinas se encuentran en la vacuola de las células vegetales. Estas se van formando durante la síntesis de pigmentos en la membrana de la vacuola y, eventualmente, se dispersan para dar una vacuola enteramente teñida (Delgado y col., 2000; Galvano y col., 2004). Son pigmentos vegetales capaces de capturar radicales

libres por donación de átomos de hidrógeno del grupo fenol, por lo que se ha reportado una estrecha relación entre la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas de fresa (Castañeda y col., 2009).

El color de las antocianinas depende de varios factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el grupo flavilio; por ejemplo, si se aumentan los hidroxilos del anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que la introducción de metoxilos provoca la formación de los rojos (Badui, 2006).

Debido a la deficiencia electrónica (carga positiva) del núcleo flavilio, estos pigmentos funcionan como verdaderos indicadores de pH; es decir, su color también depende de las condiciones de acidez o alcalinidad del sistema en que se encuentran. A pH ácidos adquieren una estructura estable de catión flavilio rojo; cuando se incrementa el pH, la distribución electrónica se modifica hasta llegar a la forma quinoidal azul; la hidratación del flavilio produce la base carbinol incolora. Los cambios fisiológicos en la maduración de los frutos llevan consigo alteraciones en el pH y, por tanto, modificaciones en el color del tejido vegetal (Badui, 2006).

Los tratamientos térmicos también influyen en la destrucción de las antocianinas; se ha visto que en las fresas se presenta una relación logarítmica entre la pérdida del color y la temperatura. Se ha reportado que la degradación de las antocianinas va acompañada de la del ácido ascórbico, de tal manera que en muchos casos la oxidación de la vitamina C implica una decoloración. Estos pigmentos también se ven afectados por la presencia de azúcares reductores, sobre todo de la fructosa; esto se relacionaría con el hecho de que el monosacárido en condiciones ácidas y a altas temperaturas se descompone en hidroximetil-furfural y en furfural, y éstos compuestos son los que en realidad atacan a los pigmentos (Badui, 2006).

En general la luz y la temperatura son dos de los factores que mayormente afectan la estabilidad estructural de las antocianinas. Por lo tanto, la mejor opción para almacenar estos pigmentos es en lugares fríos y oscuros (Abdel-Aal y Hucl, 2003; Welch y col., 2008).

Las antocianinas se encuentran en altas concentraciones en la variedad Camarosa (García-Viguera y col., 1998; Lopes-da-Silva y col., 2007), lo cual explica la pigmentación más intensa en los tejidos internos. El pelargonidin-3-glucósido es la antocianina en mayor concentración en la frutilla (*Fragaria x ananassa*) (153–652 mg/kg de peso fresco) (García-Viguera y col., 1998). Otras antocianinas presentes en menor cantidad incluyen derivados acilados con los siguientes ácidos orgánicos: málico, malónico, succínico o acético (Lopes-da-Silva y col., 2007).

#### **2.2.4. Medición del contenido de compuestos fenólicos y antocianinas**

El método de Folin-Ciocalteu (FC) (Folin y Denis, 1915) es una técnica analítica conveniente con buena reproducibilidad para la determinación de polifenoles totales en materiales biológicos. La precisión de los resultados obtenidos usando este método está determinada por los estándares utilizados, el orden de adición de los reactivos, y el reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR), el cual contiene molibdeno VI (Folin y Ciocalteu, 1927). Los compuestos fenólicos son determinados basados en la reducción de  $\text{Mo}^{6+}$  a  $\text{Mo}^{5+}$ , obteniendo un color azul que puede ser medido ópticamente a 760 nm (Huang y col., 2005).

Este método tiene algunas desventajas, por ejemplo, puede carecer de especificidad. Aunque el método FC produce resultados predecibles en un amplio rango de fenoles, estos resultados pueden verse afectados por otros compuestos no-fenólicos (Rover y Brown, 2013). Otras sustancias también pueden interferir con el método como azúcares, aminas aromáticas, dióxido de azufre, ácido ascórbico, ácidos orgánicos y hierro (II). Debido a esto, es necesaria una corrección para las sustancias que interfieren y así evitar la influencia de las mismas (Prior y col., 2005).

La cantidad de polifenoles totales en la muestra es usualmente indicada por su equivalente con el contenido relativo de catequina o ácido gálico, los cuales son usados como estándares cuantitativos (Liang-Yu y col., 2013).

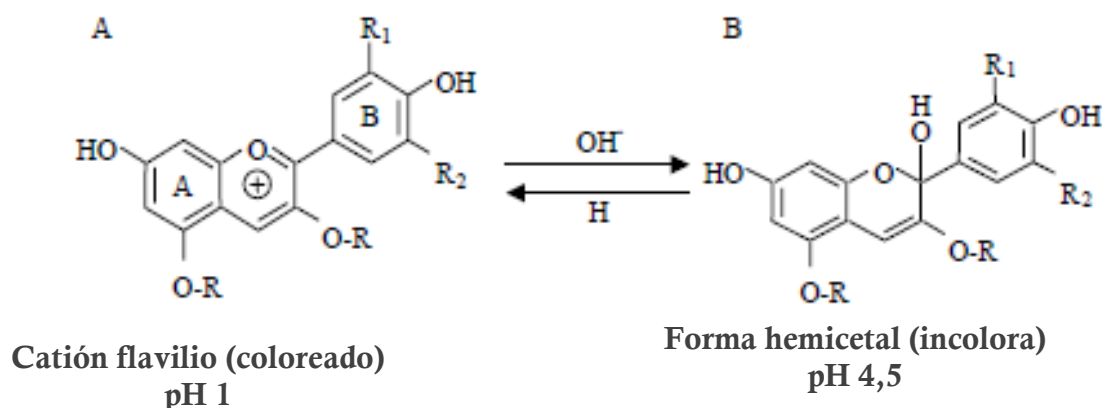
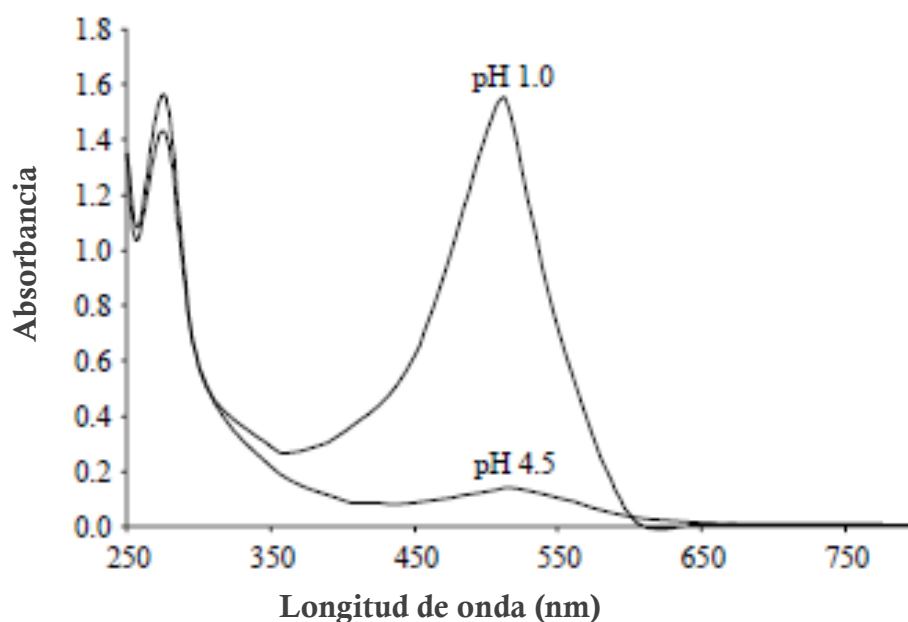
El método FC es conveniente y simple, no requiere de equipos particulares y puede ser útil en la caracterización y estandarización de muestras botánicas (Prior y col, 2005). Una de las ventajas del método es que tiene una respuesta equivalente para diferentes sustancias fenólicas en vino, haciéndolo adecuado para medir compuestos fenólicos totales (Waterhouse, 2001).

El método espectrofotométrico de pH diferencial es uno de las técnicas utilizadas para medir antocianinas totales. Las antocianinas cambian de color de forma reversible con el pH (**Figura 2.8**), lo cual limita su uso efectivo como colorante en alimentos, pero puede proveer un método fácil y conveniente para la medición total de la concentración del pigmento (Giusti y Wrolstad, 2001). Este método es una modificación de los métodos originales descritos por Fuleki y Francis (1968a, 1968b). Las muestras son diluidas con buffer de pH 1 y 4,5 y la absorbancia es medida a la longitud de onda de la máxima absorbancia de la solución de pH 1 (**Figura 2.8**). La diferencia entre la absorbancia de las dos soluciones de buffer es debido a los pigmentos de antocianinas monoméricas. Los pigmentos de antocianinas polimerizadas y pigmentos de pardeamiento no enzimático no presentan comportamiento reversible con el pH, por esto quedan excluidos del cálculo de la absorbancia. Es costumbre calcular el total de antocianinas usando el peso molecular y el coeficiente de extinción molar de la antocianina con mayor presencia en la muestra de la matriz (Wrolstad y col., 2005).

## **2.3. Antioxidantes**

### **2.3.1. Definición**

Un antioxidante es definido como “una molécula capaz de disminuir o prevenir la oxidación de otras moléculas” (Sies y Helmut, 1997), mientras que un antioxidante biológico ha sido definido como “cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de ese sustrato” (Halliwell, 1995).



**Figura 2.8.** Espectro UV-visible de antocianinas en soluciones amortiguadoras de pH 1 y pH 4,5, y estructura del catión flavilio (A) y de la forma hemicetal (B). R=H ó sustituyentes glicosídicos.

Fuente: Wrolstad y col. (2005).

Los antioxidantes neutralizan los radicales libres, cediéndoles el electrón que les falta y convirtiéndolos en moléculas estables. Existen diversas formas para clasificar los antioxidantes. Desde una perspectiva de su origen y presencia en el organismo, es posible distinguir entre aquellos antioxidantes que son normalmente bio-sintetizados por el organismo y aquellos que ingresan a este a través de la dieta. Entre los primeros se encuentran: i) los antioxidantes enzimáticos, como superóxido dismutasa, catalasa,

glutación peroxidasa, tioredoxina-reductasas y sulfoxi-metionina-reductasas, y ii) los antioxidantes no enzimáticos, como glutatión, ácido úrico, ácido dihidro-lipóico, metalotioneína, ubiquinol (Coenzima Q) y melatonina. Si bien i) y ii) son primariamente bio sintetizados por el organismo humano, la dieta también puede contener dichos antioxidantes. Respecto a los antioxidantes que ingresan al organismo solo a través de la dieta, estos se clasifican esencialmente en: i) vitaminas antioxidantes, como ácido ascórbico, alfa-tocoferol y betacaroteno, ii) carotenoides (como luteína, zeaxantina y licopeno), iii) polifenoles, en sus categorías de flavonoides y no flavonoides, y iv) compuestos que no caen en las tres categorías anteriores, como son algunos glucosinolatos (isotiocianatos) y ciertos compuestos órgano-azufrados (dialil-disulfido). También se pueden clasificar como antioxidantes primarios, los que impiden la formación de radicales libres y quelan metales de transición; secundarios, los que interrumpen la reacción de propagación por inactivación o desplazan a las especies reactivas de oxígeno; terciarios, los que reparan el daño causado a las moléculas o eliminan aquellas que se han afectado. Muchos de ellos pueden pertenecer a más de una clase (Medrano, 2005).

Muchas de las reacciones químicas de los antioxidantes primarios pueden ser agrupadas en la categoría de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y transferencia de un único electrón (ET). El mecanismo de HAT ocurre cuando un compuesto antioxidante extingue radicales libres mediante la donación de átomos de hidrógeno. El mecanismo ET describe los casos donde un antioxidante transfiere un único electrón para ayudar en la reducción de un compuesto (Craft y col., 2012).

### **2.3.2. Capacidad antioxidante**

La capacidad antioxidante de un producto o alimento está relacionada con los componentes capaces de proteger un sistema biológico del daño potencial debido a los procesos o reacciones incluyendo especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente).

En base a los mecanismos de reacción, los principales métodos para la medición de la capacidad antioxidante se han dividido en dos categorías: reacción de

transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y reacción de transferencia de un electrón (ET). La disociación de enlace y el potencial de ionización son dos de los principales factores que determinan el mecanismo y la efectividad de los antioxidantes. Los mecanismos ET y HAT casi siempre ocurren juntos en todas las muestras y diferenciarlos puede resultar difícil (Karadag y col., 2008).

Los métodos basados en HAT miden la capacidad de un antioxidante para atrapar radicales libres mediante la donación de hidrógeno para formar compuestos estables (Prior y col. 2005). Estos métodos son más relevantes para medir la capacidad antioxidante de antioxidantes que actúan mediante mecanismos de ruptura de cadena. La reactividad relativa en los métodos HAT está determinada por la entalpía de disociación del enlace de un antioxidante. Asimismo, cuanto mayor sea la entalpía de disociación necesaria, será menos activo el compuesto antioxidante en la participación de las reacciones de inactivación de radicales libres por medio del método HAT (Wright y col., 2001). Estos métodos están compuestos generalmente por un generador sintético de radicales libres como AAPH (2,2' azobis (2-amidinopropano) dihidroclorado), AMVN (2,2' azobis (2,4 dimetilvaleronitrilo) y ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfonato)) (Wolfe y Liu, 2007), también por una sonda molecular oxidable (diclorofluoresceína, DCFH (Adom y Lui, 2005) o fluoresceína, FL (Moore y col., 2006)), y finalmente por un antioxidante.

Los métodos basados en ET detectan la capacidad de un antioxidante para transferir un electrón para reducir cualquier compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales. La reactividad relativa de este método se basa en la desprotonación e ionización del grupo funcional reactivo, lo cual hace que las reacciones ET dependan del pH. En general, el valor del potencial de ionización disminuye con un aumento de pH, reflejando el aumento de la capacidad de donación de electrones con desprotonación (Prior y col. 2005). Este método incluye dos componentes en la reacción, antioxidante y oxidante (sonda). La sonda es un oxidante que extrae un electrón del antioxidante, resultando en un cambio de color de la sonda. El grado de cambio en el color es proporcional a la concentración del antioxidante. La reacción finaliza cuando no haya cambio de color (Huang y col., 2005).

### **2.3.3. Métodos para la determinación de capacidad antioxidante**

#### **2.3.3.1. Generalidades**

Algunos ensayos colorimétricos y fluorimétricos para la determinación de la capacidad antioxidante basados en el método HAT aplican una reacción de radicales pero sin un paso de propagación de cadena, el cual es un paso esencial en la autoxidación de lípidos. En general, el antioxidante adicionado compite con las sondas (sustratos) por el radical e inhibe o retarda la oxidación de la sonda. Los ensayos con estas características incluyen el ensayo del parámetro antioxidante total de captura de radicales (total radical trapping antioxidant parameter, TRAP), la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (oxygen radical absorbance capacity, ORAC) y el ensayo de blanqueamiento de crocina (TEAC-crocina) (Huang y col., 2005). Estos ensayos tienen los siguientes componentes: iniciador termolábil, el cual da radicales ( $R^{\cdot}$ ) que reaccionan rápido con  $O_2$  para dar un flujo constante de radicales  $ROO^{\cdot}$ ; una sustancia oxidable, como una sonda molecular (UV o fluorescente) para monitorear el proceso; un antioxidante, su presencia inhibe o retarda la oxidación de la sonda. Por lo tanto, en el comienzo del ensayo se observan cambios espectroscópicos insignificantes. Mientras la reacción continua, los antioxidantes son consumidos por los radicales y la oxidación de la sonda continua a una velocidad menor comparada con el control. Finalmente, cuando los antioxidantes están agotados, la velocidad de la reacción de la oxidación de la sonda será similar a la obtenida en el control (Huang y col., 2005; Magalhaes y col., 2008).

Los ensayos de capacidad antioxidante también están basados en el poder reductor de metales con poder antioxidante, hierro reductor (FRAP) (Benzie y col., 1999) y cobre reductor (CUPRAC) (Apak y col., 2004), captación de radicales hidroxilo como en el ensayo de la desoxirribosa (Caillet y col., 2007), captación de radicales orgánicos como ABTS $^{\cdot}$  (Miller y col., 1993) y DPPH $^{\cdot}$  (Rivero-Perez y col., 2007), o la cuantificación de productos formados durante la peroxidación de lípidos como sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (Chumark y col., 2008; Perez-Jimenez y Saura-Calixto, 2008) y oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL)



(Gheldof y Engeseth, 2002). La mayor diferencia entre los ensayos es el enfoque de cuantificación. Por ejemplo, el ensayo ORAC se enfoca en el área bajo la curva, TRAP depende del tiempo de retraso y el ensayo de blanqueamiento de crocina usa la velocidad inicial de reacción (Huang y col., 2005).

### **2.3.3.2. Método ORAC**

El método ORAC mide la capacidad de los antioxidantes de inhibir la oxidación inducida por radicales peroxilo y refleja la actividad antioxidante mediante la extinción de radicales por medio de la transferencia de un átomo de hidrógeno (Ou y col., 2001). En el ensayo, los radicales peroxilo generados por la descomposición térmica del AAPH en buffer acuoso o radicales hidroxilo generados de  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  (Cao y col., 1997), reaccionan con una sonda fluorescente, un sustrato de proteína oxidable, para formar un producto no fluorescente, el cual puede ser medido por fluorescencia. La reacción de la sonda con los radicales peroxilo se sigue por la pérdida de la intensidad de la fluoresceína en el tiempo.

El ensayo ORAC ha sido utilizado para evaluar la capacidad antioxidante de muestras de frutas y vegetales, suplementos dietarios, vinos, jugos y nutracéuticos. Este ensayo ha sido usado también en muestras de plasma y suero. La fracción de proteína en estas muestras afecta significativamente a la capacidad antioxidante medida, lo cual puede ocultar respuestas, particularmente si se trata de un antioxidante de peso molecular pequeño (Prior y col., 2003).

En el ensayo, una solución de fluoresceína es mezclada con la muestra, el control y un estándar (Trolox de cuatro o cinco concentraciones diferentes para la curva de calibración) e incubada a una temperatura constante de 37 °C antes de que sea añadida la solución de AAPH para iniciar la reacción (MacDonald-Wicks y col., 2006). En solución de aire saturado, el radical AAPH generado reacciona con  $\text{O}_2$  para formar un radical peroxilo más estable. La pérdida de fluorescencia de la sonda es un indicador de la magnitud del daño a partir de su reacción con el radical peroxilo. En presencia de un antioxidante la disminución de fluoresceína se impide (Ou y col., 2002).

### ***Ventajas***

El efecto protector de un antioxidante en el ensayo ORAC es medido por la integración neta del área bajo la curva del deterioro de la fluoresceína de la muestra comparada con un blanco ( $AUC_{\text{muestra}} - AUC_{\text{blanco}}$ ), y mide el tiempo de retardo, la velocidad inicial e inhibición total en un solo valor, para evitar subestimar la capacidad antioxidante y considerar posibles efectos de productos antioxidantes secundarios. El ensayo ORAC sigue la reacción por periodos de tiempo largos, mayor a 30 minutos (Prior y col., 2005).

La ventaja de la aproximación con el área bajo la curva es que opera de igual forma para antioxidantes que presentan fase de retraso y los que no. Particularmente, es muy útil para muestras que contienen varios compuestos y reacciones cinéticas complejas. La sonda de fluoresceína (FL) es económica y el uso de un lector de microplacas de fluorescencia totalmente automático hace al método accesible y eficiente (Huang y col., 2002).

Otra ventaja del método ORAC es que se puede emplear diferentes generadores de radicales libres u oxidantes. Esto es importante debido a que la medición de la capacidad antioxidante de un compuesto depende de los radicales libres u oxidantes que se utilicen en el ensayo. Por ejemplo, si se utiliza AAPH, un generador de radicales peroxilo, se mide la capacidad antioxidante de todos los antioxidantes tradicionales, incluyendo el ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, glutatión, bilirrubina, ácido úrico y melatonina, mientras que el ensayo ORAC que utiliza  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$ , mide compuestos como manitol, glucosa, ácido úrico y metales quelantes de transición pero no mide ácido ascórbico ni  $\alpha$ -tocoferol (Cao y col., 1997). El ensayo ORAC mide la capacidad antioxidante contra radicales peroxilo e hidroxilo pero no mide antioxidación contra las especies que reaccionan con el oxígeno como los radicales superóxidos y oxígeno singlete (Apak y col., 2004).

### ***Desventajas***

La fluoresceína utilizada en los ensayos ORAC es una sonda sintética no proteica, estable y poco reactiva. Sin embargo es sensible al pH, por lo que el mismo se

debe monitorear cuidadosamente a la hora del ensayo (MacDonald-Wicks y col., 2006).

El diseño original del ensayo ORAC está limitado a medir la capacidad antioxidante de compuestos hidrofílicos contra radicales peroxilo únicamente. Sin embargo, muchos antioxidantes son lipofílicos y son particularmente importantes contra la oxidación de lípidos en todos los sistemas así como también otros radicales que son activos fisiológicamente. La capacidad antioxidante de un compuesto depende del medio de la reacción; de esta manera, se ha adaptado un ensayo ORAC con un solvente orgánico para la medición de muestras lipofílicas. Huang y col. (2002) desarrollaron un ensayo para los compuestos lipofílicos usando  $\beta$ -ciclodextrina parcialmente metilada como potenciador de la solubilidad, lo cual permite la medición de la capacidad antioxidante de componentes lipofílicos en una muestra usando la misma fuente de radicales. Para tener una medición precisa del valor total ORAC deben ser medidas ambas fracciones, hidrofílica y lipofílica (Wu y col., 2004).

Además del problema mencionado anteriormente, FL no es lo suficientemente liposoluble y su intensidad de fluorescencia en solventes orgánicos no polares es baja. Para solucionar este problema se utilizó BODIPY (4,4 difluo-3,5 bis (4-fenil- 1,3 butadienil)-4-bora-3a, 4a diaza-s- indaceno) como sonda fluorescente y AMVN como generador de radicales peroxilo (Naguib, 2000). El AMVN tiene la ventaja de ser altamente soluble en tolueno, metanol, etanol y hexano (Laguerre y col., 2007). Realizando estos cambios se llevó a cabo un ensayo para la cuantificación de la capacidad antioxidante de varios carotenoides. Sin embargo, este ensayo resultó 100 veces menos sensible que el ensayo clásico, probablemente porque el generador de radicales AMVN es menos eficiente (Huang y col., 2005).

## **2.4. Pulsos de luz de alta intensidad**

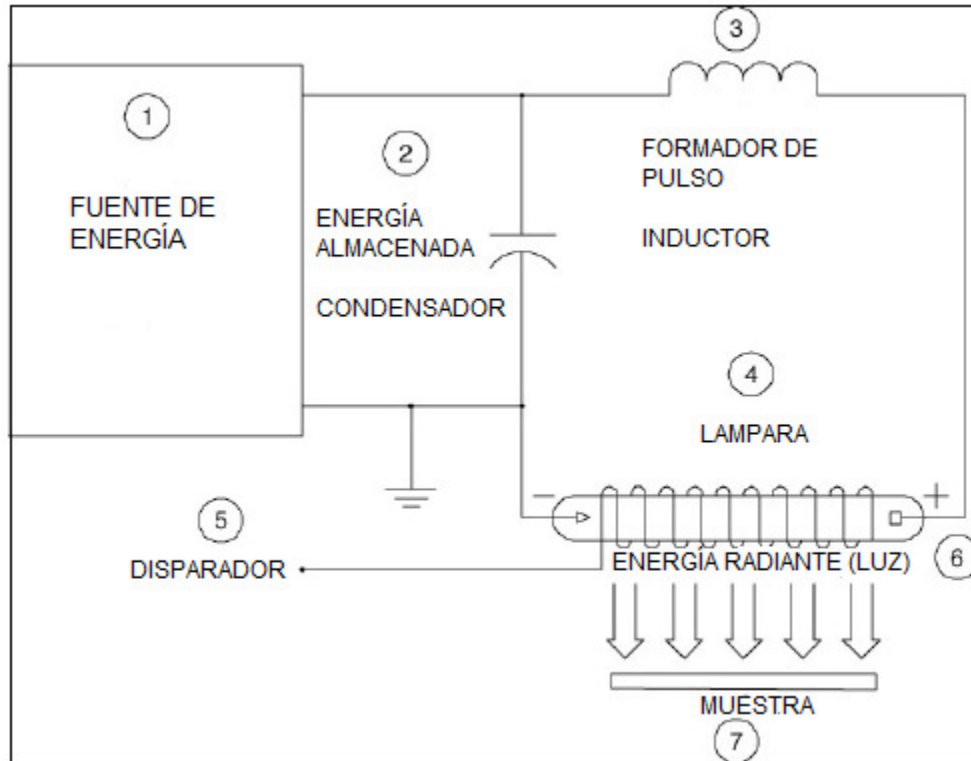
### **2.4.1. Generalidades**

La luz pulsada (LP) es una técnica aplicada para la descontaminación de alimentos que actúa sobre los microorganismos usando pulsos de corto tiempo y de

amplio espectro, rico en luz UV-C. La luz UV-C es la porción del espectro electromagnético que corresponde a la bandas comprendidas entre 200 y 280nm. La LP es producida usando tecnologías que multiplican la energía en varios órdenes. La potencia es aumentada almacenando electricidad en un capacitor por periodos de tiempo relativamente largos (fracciones de segundo) y liberándola en tiempos cortos (centenares de fracción de segundos). La luz emitida del flash de luz tiene un alto pico de potencia y consiste en longitudes de onda entre 200 y 1100 nm (Gómez-López y col., 2007).

En la **Figura 2.9** se ilustra los elementos funcionales de un sistema de luz pulsada. La fuente de alto voltaje (1) provee energía eléctrica al condensador de almacenamiento (2). El condensador almacena la energía eléctrica para la lámpara (4). El sistema de formación de pulsos (3) determina el tipo de pulso y las características del espectro. Una señal del disparador (5) inicia la descarga de la energía eléctrica a través de la lámpara. Esta energía ioniza el gas xenón de lámpara. La lámpara convierte la energía eléctrica a energía radiante pulsada (6), transmitiendo luz pulsada a la muestra (7) (Manual instructivo Xenon Corp.).

Cuando se quiere evaluar la energía de irradiación recibida por la muestra, generalmente se mide la “irradiancia” o la “tasa de fluencia”. La irradiancia es definida como la energía de radiación total incidente que llega en dirección perpendicular a un elemento infinitesimal de superficie de área  $dA$  que contiene el punto en consideración dividido por  $dA$ . Por otro lado, la tasa de fluencia se define como la energía de radiación total incidente que llega de todas direcciones a una esfera pequeña infinitesimal con un área de sección  $dA$ , dividido por  $dA$ . Este último término es más apropiado para la desinfección con lámparas de luz pulsada, ya que la muestra puede recibir la irradiación desde cualquier dirección (Bolton y col, 2003). Las unidades de irradiancia y de tasa de fluencia en el Sistema Internacional son  $W/m^2$ . El término “dosis” es utilizado universalmente en la literatura y se obtiene multiplicando la irradiancia o la tasa de fluencia, si se mantienen constantes, por el tiempo de exposición a la radiación. Sin embargo, “dosis” es un término que en otros contextos es usado para describir la energía total absorbida. En el caso de los



**Figura 2.9.** Diagrama funcional de un sistema de luz pulsada de alta intensidad.

Fuente: Manual instructivo Xenon Corp.

microorganismos casi toda la luz ultravioleta incidente pasa a través del organismo y sólo un porcentaje es absorbido. Por lo tanto, el concepto de fluencia es más apropiado ya que se relaciona con la energía UV “incidente” en vez de la energía UV “absorbida” (Bolton y col, 2003). En este trabajo se utilizará el término más común, dosis de luz pulsada, para referirnos al producto de la fluencia por el tiempo de exposición, expresada en  $J/m^2$ .

#### 2.4.2. Susceptibilidad de los microorganismos

El tipo de microorganismo, así como sus exigencias fisiológicas, bioquímicas y de cultivo presentan una gran influencia en el efecto de la inactivación mediante luz pulsada. Diversos estudios han reportado que las bacterias Gram positivas son más resistentes que las Gram negativas a los tratamientos por LP (Anderson y col., 2000;

Farrell y col., 2010; Rowan y col., 1999). Investigaciones llevadas a cabo tanto en sistemas *in vitro* como en alimentos reales han arrojado el siguiente orden decreciente, en referencia a la sensibilidad de los microorganismos frente a la radiación lumínica: bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas y esporas fúngicas. La distinción característica de las bacterias Gram positivas es la composición de su pared celular (Madigan y col., 2009). Por lo tanto, la estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas podría generar una protección extra frente a los tratamientos por LP. Además, se ha tratado de explicar la sensibilidad de las bacterias a la radiación ultravioleta tomando en cuenta el hábitat característico de estos microorganismos. Hobbs y Roberts (1987) señalaron que los enteropatógenos Gram negativos sensibles a la luz UV se encuentran esencialmente en los tractos alimentarios humano/animal y en consecuencia han desarrollado muy poca capacidad de resistencia a la radiación UV. Contrariamente, *L. innocua* y otras cepas de bacterias Gram positivas pueden desarrollarse en distintos ambientes expuestas a la radiación solar, lo que intrínsecamente implica una mejor adaptación a la radiación UV.

No obstante, dicha susceptibilidad puede verse condicionada por una gran número de factores, por lo que no siempre es fácil establecer patrones de inactivación en función del tipo de microorganismo. Gómez-López y col. (2005b) no pudieron establecer ningún patrón de sensibilidad claro entre diferentes grupos de microorganismos, después de evaluar el efecto de tratamientos con luz pulsada sobre 25 especies de bacterias, mohos y levaduras.

#### **2.4.3. Mecanismo de inactivación**

Como se mencionó anteriormente, las lámparas de xenón tienen un amplio espectro de emisión que abarca desde el campo ultravioleta hasta la región de luz infrarroja. Hasta el momento, se han señalado tres mecanismos de acción de la LP sobre los microorganismos: fotoquímico, fototérmico y fotofísico (Elmnasser y col., 2007; Krishnamurthy y col., 2007; Oms-Oliu y col., 2009; Wuytack y col., 2003). Aunque el mecanismo exacto responsable de la muerte celular aún no está completamente dilucidado, la mayoría de los estudios realizados sostienen que la

porción UV de la luz pulsada, especialmente la fracción de onda corta de dicha radiación (entre 220 a 290 nm), poseen una influencia decisiva sobre la inactivación microbiana (Anderson y col., 2000; Rowan y col., 1999; Wang y col., 2005; Woodling, y Moraru, 2007). El efecto germicida de la luz UV-C ha sido atribuido primeramente a una transformación fotoquímica de las bases de pirimidina (citosina y timina) en el ADN de las bacterias, virus y otros microorganismos para formar dímeros (principalmente dímeros de timina). La formación de tales bandas inhiben el entrecruzamiento del ADN para la replicación y el organismo es incapaz de reproducirse (muerte clonogénica). Sin suficientes mecanismos de reparación, tales daños resultan en mutaciones, perjudicando la replicación y la transcripción de genes, y finalmente la muerte del organismo (Bolton y Linden, 2003; McDonald y col., 2000; Panico, 2005; Wang y col., 2005). Sin embargo hay evidencia que la inactivación puede ocurrir por otros efectos. Wekhof (2000) propuso que utilizando una dosis superior a  $0,5 \text{ kJ/cm}^2$  la desinfección se logra mediante la ruptura de la bacteria por sobrecalentamiento momentáneo causado por la absorción de la luz emitida por la lámpara (efecto fototérmico). Fine & Gervais (2004) sugirieron que el sobrecalentamiento podría causar vaporización y generar un pequeño flujo de vapor que causaría destrucción de membranas. Takeshita y col. (2003) encontraron un incremento en la concentración de proteínas eluidas y daños en las membranas celulares en células de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas con luz pulsada. Ferrario *et al.* (2014) analizaron el daño inducido por la luz pulsada (dosis hasta  $71,6 \text{ J/cm}^2$ ) sobre células de *Saccharomyces cerevisiae* en agua peptona (pH 3,5 o 5,6) y jugo de manzana (pH 3,5) mediante citometría de flujo (FCM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). FCM reveló que la luz pulsada provocó la ruptura de la membrana citoplasmática y que además hubo una pérdida progresiva de la actividad de esterasa. En las micrografías de TEM se observó disrupción del material interno (vacuolas expandidas, coaguladas, disrupción de organelas). El daño fue más pronunciado con el aumento de la dosis de LP. Los cambios estructurales producidos en las células, como por ejemplo distorsión en la membrana celular, puede inducir también cambios en la forma de la célula (efecto fotofísico) (Elmnasser y col., 2007). Algunas investigaciones han demostrado tal efecto en diferentes microorganismos, como por ejemplo

deformación de esporas de *Aspergillus niger* (Wekhof, 2001), células de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Wuytack y col., 2003), células de bacterias enteropatógenas de origen alimentario (Anderson y col., 2000), células de *Staphylococcus aureus* (Krishnamurthy y col., 2008) y células de *Saccharomyces cerevisiae* (Ferrario y col., 2014; Takeshita y col., 2003). Estas evidencias de alteración física son el resultado del colapso estructural de las células microbianas, que pueden derivarse de los dos efectos anteriores (fotoquímico y fototérmico).

#### 2.4.4. Aplicación de pulsos de luz en frutas y hortalizas

En los estudios que se han realizado en frutas y hortalizas, es necesario mencionar que los diversos factores críticos del proceso, las diferencias en los equipos, las condiciones experimentales de los estudios realizados, incluido la variedad de matrices utilizadas, limitan la comparación de la efectividad de los pulsos de luz sobre los microorganismos. Sin embargo, las distintas investigaciones llevadas a cabo hasta el momento permiten arrojar diversas conclusiones útiles de cara a futuras investigaciones. **La Tabla 2.4** muestra un resumen de los resultados más relevantes con respecto a la inactivación microbiana mediante tratamientos con LP en frutas y hortalizas recopilados por Ramos-Villarreal y col. (2013). En estos estudios se concluyó que las diferencias en los valores de inactivación microbiana obtenidas para las diferentes frutas podrían atribuirse a los efectos sombra o protector, favorecidos por la distinta morfología de los frutos. La presencia de aquenios sobre fresas y los espacios entre drupas pequeñas sobre las frambuesas pueden proteger los microorganismos de la luz ocasionando sólo desinfección parcial. Esta problemática también ha sido descrita por otros autores (Gómez-López y col., 2005a; Lagunas-Solar y col., 2006). Ramos-Villarreal y col., (2011a) registraron reducciones logarítmicas significativas de *Listeria innocua* (2,61 y 2,97 log UFC/g) y *Escherichia coli* (2,90 y 3,33 log UFC/g) inoculadas en aguacate fresco cortado después del tratamiento con 6 y 12 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Las poblaciones de *E. coli* y *L. innocua* se inactivaron cuanto mayor fue la intensidad del tratamiento. Este estudio demostró que *E. coli* es más sensible a LP que *L. innocua*. Al respecto, resultados similares obtuvieron Gómez y col. (2012) quienes trataron



**Tabla 2.4.** Inactivación microbiana en frutas y hortalizas tratadas con pulsos de luz.

Sustrato Tratado	Microorganismo	Fluencia (J/cm <sup>2</sup> )	Número de pulsos	Inóculo Log UFC/mL	Reducción Log UFC/g
Manzanas, naranjas, Kiwi, limones, melocotón, peras, frambuesas, nectarinas y uvas de mesa	<i>Alternaria</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Monilinia</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Phytophthora</i>	0-10	-	3-5	> 5 Log
Fresas	<i>Botrytis cinerea</i>	7/pulso	3750	5,7	< 1 Log
Frambuesas	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	22,6	180	6	4,3
Frambuesas	<i>Salmonella</i>	22,6	180	6	2,9
Fresas	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	25,7	15-180	5	2,1
Fresas	<i>Salmonella</i>	34,2	15-180	5	2,8
Frambuesas	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	74	15-180	5	3,9
Frambuesas	<i>Salmonella</i>	59,4	15-180	5	3,4
Aguacate	<i>Listeria innocua</i>	6 y 12	15 y 30	8	2,61 y 2,97
	<i>Escherichia coli</i>	6 y 12	15 y 30	8	2,90 y 3,33
Aguacate	<i>Listeria innocua</i>	12	30	8	3
Repollo blanco, puerro, pimiento dulce, zanahorias y col rizada	Aerobios mesófilos	0,30	2	-	1,6-2,6 Log/cm <sup>2</sup>
Espinacas, apio, lechuga, repollo blanco, zanahorias,	Aerobios mesófilos	7	2700	6,5	0,21-2,04 Log
Zanahorias	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,7/pulso	24	5,28	~6

Fuente: Ramos-Villarroel y col. (2013).

manzanas cortadas durante 100 s (221,1 J/cm<sup>2</sup>) de tratamientos con LP, obteniendo reducciones de *E. coli* ATCC 11229 y *L. innocua* ATCC 33090 de 2,25 y 1,7 unidades logarítmicas, respectivamente.

Se ha demostrado la inactivación de microorganismos presentes naturalmente sobre la superficie de diferentes hortalizas usando LP. Hoornstra y col. (2002), evaluaron cinco hortalizas: repollo blanco, puerro, pimiento dulce, zanahorias y col rizada, los cuales se sometieron a una fluencia total de 0,30 J/cm<sup>2</sup>. La reducción en los recuentos aeróbicos varió de 1,6 log UFC/cm<sup>2</sup> para zanahorias a 2,6 log UFC/cm<sup>2</sup> para pimiento dulce. Este estudio indicó que el tipo de producto influye en la inactivación por LP.

Duarte-Molina y col. (2016) estudiaron el efecto de diferentes dosis de luz pulsada (2,4-47,8 J/m<sup>2</sup>) sobre el desarrollo fúngico, el color, las propiedades mecánicas y la estructura de frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch., var. Camarosa) almacenadas a

6°C. La incidencia de hongos durante la poscosecha, uno de los principales procesos de deterioro en este fruto, se redujo entre un 16 y 42 %, dependiendo de la dosis aplicada. Además, la aplicación de pulsos contribuyó en retardar el ablandamiento de las frutillas durante el almacenamiento sin provocar cambios significativos en el color (Duarte-Molina, 2015). Los cambios micro y ultraestructurales evaluados por microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión demostraron cambios inducidos por la luz pulsada asociados a un reforzamiento en las paredes tangenciales internas de las células epidérmicas y una mayor integridad de las células hipodérmicas luego de 8 días de almacenamiento.

En general, las investigaciones realizadas hasta el momento indican que tanto los factores del proceso como aquellos inherentes al producto tienen un efecto determinante en la efectividad de los tratamientos por LP. Por ello, es necesario ampliar los estudios sobre: dosis efectiva para cada alimento, tipo de producto a evaluar (específicamente su estructura y composición) y la microflora objeto de estudio, todo ello con la finalidad de obtener alimentos microbiológicamente seguros y de alta calidad (Ramos-Villarreal y col., 2013).

#### **2.4.5. Ventajas y desventajas**

Las lámparas de luz pulsada pueden tener algunas ventajas sobre las fuentes de UV-C continua convencionales, como por ejemplo en situaciones donde se necesita de una rápida desinfección, ya que los tratamientos de LP implican menor tiempo de procesamiento (menor a 100 s). Otra ventaja del tratamiento con LP es la escasez de compuestos residuales y la ausencia del uso de químicos que pueden causar problemas ecológicos y/o daños a los seres humanos. Las lámparas de xenón son más amigables con el ambiente que las lámparas UV-C debido a que no contienen mercurio (Gómez-López y col., 2007). Esta tecnología fue aprobada por la Food and Drug Administration para tratar alimentos (FDA, 1996) con dosis menores a 12 J/cm<sup>2</sup> y se sugiere para esterilizar/pasteurizar superficies de empaques y alimentos, y productos farmacéuticos transparentes, evitándose el uso de desinfectantes o conservadores.

Una de las principales desventajas que presenta la LP es el calentamiento de las muestras irradiadas a dosis de exposición elevadas. El calor se puede originar por la

absorción de la luz por el alimento o por el calentamiento de la lámpara. Otra de las desventajas es la posibilidad de que ocurra un efecto “sombra”, cuando los microorganismos se encuentran en niveles altos de contaminación y se forman agregados que atenúan la penetración de la luz, o bien cuando la superficie de la muestra presente irregularidades que pueden impedir el acceso de la irradiación sobre los microorganismos blanco. Para que el tratamiento con LP pueda inactivar microorganismos, debe producirse el contacto entre fotones y los microorganismos; si algún cuerpo que pueda absorber la luz se interpone entre el haz de luz y el microorganismo se impedirá el proceso de desinfección. Los sólidos opacos pueden ser descontaminados sólo superficialmente; la luz será absorbida en la superficie, entre más opaca y de mayor espesor sea la muestra a tratar, menor será la inactivación de los microorganismos presentes debajo de la superficie (Gardner y Shama, 2000).

Por otro lado, otro inconveniente es la no uniformidad de la dosis en la superficie de tratamiento de las muestras. Se requiere introducir en el diseño de los equipos de luz pulsada técnicas que permitan generar una radiación directa o reflejada multidireccional para proveer una dosis más uniforme (Gardner y Shama, 2000; Laguna-Solar y col., 2006).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Materia Prima**

Se utilizaron frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch.) variedad Camarosa (pH = 3,5 ± 0,3; °Brix = 7,4 ± 0,5) de un estadio de maduración 100 % color rojo, adquiridas en un comercio de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Las frutas fueron seleccionadas teniendo en cuenta tamaño, forma, color y peso para trabajar con un lote homogéneo. Además, se descartaron los frutos dañados y con presencia de hongos en la superficie. Finalizado el descarte y clasificación, las frutillas se distribuyeron aleatoriamente en bandejas plásticas con tapa. Para minimizar el incremento de temperatura de las muestras durante los tratamientos con luz pulsada, los frutos se mantuvieron almacenados a (6±1)°C hasta llevarlos a la cámara de tratamiento. Todos los frutos fueron procesados en el día.

#### **3.2. Reactivos**

- AAPH ((2,2'-Azobis (2-Amidino-Propano) Dihidroclorado) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- Acetato de sodio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) (Biopack, Argentina)
- Acetona ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) (Sintorgan, Argentina)
- Ácido clorhídrico (HCL) (Merck, Alemania)
- Ácido gálico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- Alcohol etílico (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) (Biopack, Argentina)
- Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Baker, México)
- Cloruro de potasio (KCL) (Mallinckroolt, Estados Unidos)
- Di-Potasio hidrógeno fosfato (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Merck, Alemania)

- Fluoresceína ( $C_{20}H_{12}O_5$ ) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- Hidróxido de sodio (NaOH) (Merck, Alemania)
- Potasio dihidrógeno fosfato ( $KH_2PO_4$ ) (Merck, Alemania)
- Reactivo Folin Ciocalteau (FCR) (Merck, Alemania)
- Solución buffer pH 4 (Biopack, Argentina)
- Solución buffer pH 7 (Biopack, Argentina)
- Trolox ( $C_{14}H_{18}O_4$ ) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)

### **3.3. Aplicación de pulsos de luz de alta intensidad**

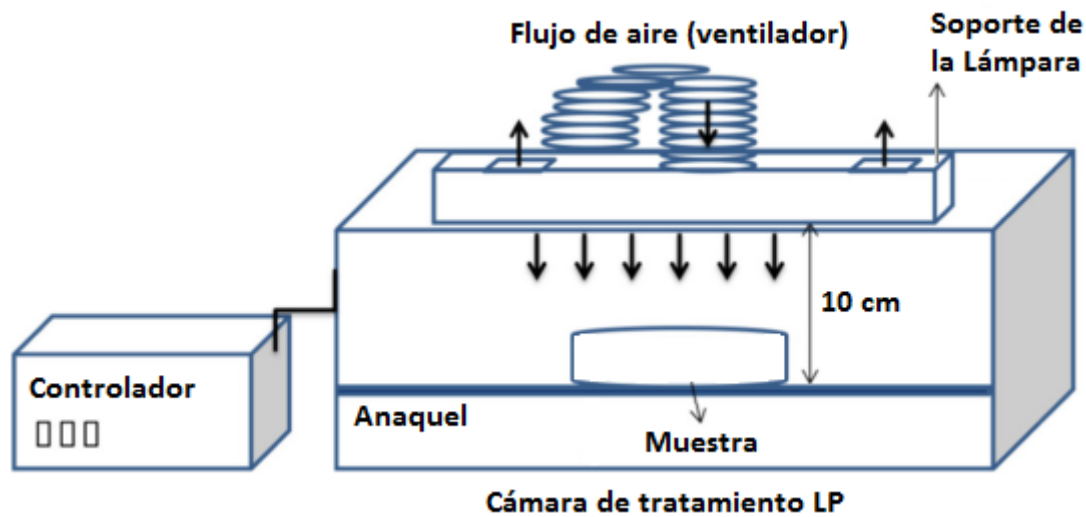
#### **3.3.1. Descripción del equipo**

Se utilizó un sistema de esterilización Steripulse-XL modelo RS-3000B (Xenon Corporation, Woburn, MA, EEUU), compuesto por un módulo controlador RC747 y una lámpara de xenón (no tóxica, libre de mercurio) que emite pulsos de luz de alta energía en un rango de longitud de onda entre 200 y 1100 nm (**Figura 3.1**). La lámpara (41 cm de largo) se encuentra montada dentro de una caja metálica (19 cm de alto x 76,2 cm de largo x 17,9 cm de ancho), la cual contiene una ventana de cuarzo en uno de sus lados para dejar pasar la luz emitida, un sistema de enfriamiento para evitar el sobrecalentamiento de la lámpara durante su uso y un sistema eléctrico de conexión de la lámpara al módulo controlador.

El sistema de enfriamiento consiste en un ventilador que suministra aire filtrado a través de un conducto metálico conectado a la caja de la lámpara y dos filtros, ubicados en la parte superior de la misma, por donde se remueve el aire suministrado sin permitir el paso de luz. A su vez, la caja está dispuesta en forma horizontal sobre una cabina de acero inoxidable (40 cm de alto x 76,2 cm de largo x 20 cm de ancho) herméticamente cerrada, que dispone de un estante que puede ubicarse a 5, 10 y 15 cm



**Figura 3.1.** Equipo de pulsos de luz de alta intensidad



**Figura 3.2.** Diagrama esquemático del sistema de luz pulsada de alta intensidad  
Fuente: Ferrario et al. (2013)

de la lámpara (**Figura 3.2**). El sistema libera pulsos de luz a una velocidad fija de 3 pulsos por segundo, siendo la energía de cada pulso de  $1,27 \text{ J/cm}^2$  a  $1,92 \text{ cm}$  de la lámpara (datos provistos por el fabricante). El ancho de pulso (duración de cada pulso) es de  $360 \mu\text{s}$ .

### 3.3.2. Determinación de la dosis

Los valores de fluencia fueron medidos con una cabezal piroeléctrico modelo ED500 (Gentec Electro-Optics, Québec, Canadá), con una superficie de medida de  $20,3 \text{ cm}^2$ , conectado a un osciloscopio modelo TDS 2014 (Tektronix, Beaverton, Estados Unidos). Las mediciones se realizaron por triplicado (Gómez y col., 2012).

### **3.3.3. Tratamientos**

Las frutillas frescas se colocaron en placas de Petri que se ubicaron sobre el estante dispuesto a 10 cm de distancia por debajo de la lámpara (**Figura 3.3**). Como la luz no incidía de manera homogénea sobre todo el estante, para asegurarse que la irradiación de las muestras en los tratamientos fuera uniforme, las placas fueron ubicadas siempre en la región central del estante y a una distancia no mayor de 10 cm del punto central de la lámpara (Gómez y col., 2012). Las muestras fueron expuestas a la luz pulsada durante 10 y 20 s, siendo las fluencias correspondientes de 11,9 J/cm<sup>2</sup> y 23,9 J/cm<sup>2</sup>. Durante los tratamientos los frutos fueron irradiados por una de las caras, luego se dieron vuelta, se colocaron en otra placa de Petri estéril, y se trataron durante el mismo periodo de tiempo por la cara opuesta. La temperatura registrada en la superficie de los frutos luego de 10 y 20 s de irradiación fue de (21±2)°C y (29±2)°C, respectivamente.



**Figura 3.3.** Frutillas en placa de Petri para tratamiento.

### **3.4. Almacenamiento de las muestras**

Las muestras sometidas a los tratamientos mencionados anteriormente y las muestras control (sin tratamiento) fueron almacenadas en bandejas plásticas de polietileno (PET) de alta densidad con tapa permeables al aire a (6±1)°C durante 8 días. Se decidió almacenar las muestras a temperaturas de refrigeración debido a que son las temperaturas usuales de almacenamiento de estos frutos en los comercios minoristas. A tiempos selectos del almacenamiento (inmediatamente después de ser expuestas a la LP (día 0), día 4 y 8) se recolectaron las diferentes muestras y se congelaron a -80 °C en un ultrafreezer modelo MDF-U55V (Panasonic, Japón) hasta su análisis. Se realizaron determinaciones de pH, acidez titulable, sólidos solubles,



contenido de antocianinas, contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. Para cada una de las determinaciones se analizaron un total de 90 frutos, procesándose 10 replicados para cada condición de tratamiento, muestras control y tiempo de almacenamiento.

### **3.5. Determinación de pH, sólidos solubles y acidez titulable**

Para llevar a cabo la determinación de los parámetros fisicoquímicos se trituró 10 g de fruta congelada en un mortero hasta obtener una pulpa.

#### *3.5.1. Determinación de pH*

Para la medición de pH se utilizó un pHmetro modelo 310 (Orion, Beverly, Estados Unidos). Previo a la medición, el pHmetro fue calibrado con soluciones buffer de pH 7,0 y pH 4,0. Se analizaron 10 muestras por cada condición y las mediciones se realizaron por duplicado.

#### *3.5.2. Determinación de sólidos solubles*

La concentración de sólidos solubles fue determinada en un refractómetro digital modelo PR-101 (ATAGO, Japón), calibrado previamente con agua destilada a 20 °C. Los resultados se expresaron en °Brix (gramos de sacarosa por 100 g de pulpa de fruta). Se analizaron 10 muestras por cada condición y las mediciones se realizaron por duplicado.

#### *3.5.3. Determinación de acidez titulable*

La acidez titulable fue determinada por el método de titulación potenciométrico (AOAC, 2005). Se titularon 5 gramos de muestra homogeneizada en 50 mL de agua destilada, previamente calentada a 80°C por 30 minutos. Luego se filtró eliminando la pulpa utilizando papel de filtro Whatman (#1). La solución remanente se tituló con NaOH (0,1N) hasta alcanzar un valor de pH final de  $8,2 \pm 0,1$ . La acidez titulable total de la muestra se calculó a partir de la **ecuación 3-1**:

$$\% \text{ Acidez} = \frac{V_{\text{NaOH}} * N_{\text{NaOH}} * P_{\text{Meq ácido cítrico}} * 100}{P_{\text{muestra}}} \quad (3-1)$$

Donde:

Acidez (%): mg de ácido cítrico por 100 g de pulpa de fruta.

$V_{\text{NaOH}}$  (mL) = volumen NaOH gastados para alcanzar un pH final de  $8,2 \pm 0,1$

$N_{\text{NaOH}}$  = normalidad del NaOH (0,1N)

$P_{\text{Meq}}$  de ácido cítrico = peso miliequivalente del ácido cítrico (ácido cítrico: 0,064)

$P_{\text{muestra}}$  (g) = peso de la muestra

Se analizaron 10 muestras por cada condición.

### 3.6. Extracción y medición de antocianinas

La extracción de antocianinas del tejido de frutilla se llevó a cabo con una mezcla de extracción que contenía etanol y HCL 0,1 N (85:15) (Oancea y col., 2012). Se maceró 10 g de muestra adicionando 100 mL de la solución de extracción y se dejó en reposo por 2 o 24 horas en refrigeración. Luego se realizó una filtración a vacío utilizando papel Whatman (#1). El extracto resultante se utilizó para medir el contenido de antocianinas totales.

La concentración de antocianinas se determinó de acuerdo al método espectrofotométrico de pH diferencial (Giusti & Wrolstad, 2001). Los extractos fueron diluidos (1/10) en soluciones amortiguadoras de cloruro de potasio (0,025 M, pH 1,0) y acetato de sodio (0,4 M, pH 4,5). Posteriormente se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro modelo V-630 (JASCO, Japón) a una longitud de onda de 510 nm y 700 nm. Se analizaron 10 muestras por cada condición y el contenido de antocianinas en el extracto de cada muestra se midió por triplicado. El contenido de antocianinas se determinó de acuerdo a la **ecuación 3-2** y los resultados fueron expresados en miligramos de pelargonidina-3-glucósido presentes en 100 g de fruta en base seca y base húmeda.

$$\text{Antocianinas} = \frac{[(A_{510} - A_{700})_{\text{pH}1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}4.5}] * MW * DF * 1000}{\epsilon * l} \quad (3-2)$$

Donde:

A = Absorbancia

MW = Peso molecular de pelargonidina-3-glucósido (433 g/mol)

DF = Factor de dilución (1/10)

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar de pelargonidina-3-glucósido disuelta en medio buffer pH 1,0 ( $15600 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) (Giusti y col., 1999)

l = longitud de la celda (1 cm)

### **3.7. Extracción y medición de compuestos fenólicos**

La extracción de los compuestos fenólicos de la frutilla se realizó mediante la metodología descrita por Shin y col. (2007). Se maceraron 10 g de muestra con 100 mL de una disolución acetona/agua (80:20) durante 15 min. La mezcla luego se filtró a vacío utilizando papel Whatman (#1) para eliminar cualquier sustancia sólida. Posteriormente, el extracto se llevó a sequedad en un rotaevaporador (Decalab, Argentina) a una temperatura de evaporación no superior a 45°C durante aproximadamente 35 min. Obtenido el extracto seco se resuspendió en 20 mL de agua deionizada. Estas muestras se dividieron en alícuotas y se almacenaron en frascos de vidrio color caramelo a -80 °C hasta su análisis.

El contenido de fenoles se determinó por el método colorimétrico de Singleton y col (1999) que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu. Para reducir costos, se utilizó una técnica microadaptada descrita por Slinkard y col (1977). Se mezclaron 0,2 mL del extracto diluido (1/10) con 2,6 mL de agua destilada y 0,2 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (FCR). Esta mezcla se dejó en reposo durante 6 min a temperatura ambiente, protegiendo las muestras de la luz y oxígeno. Luego se adicionó 2 mL de bicarbonato de sodio 7 % (p/v), se agitó y se dejó reposar nuevamente a temperatura ambiente y en oscuridad por 90 minutos. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia de la mezcla a 760 nm en un espectrofotómetro modelo V-630 (JASCO, Japón) y el contenido de fenoles en el extracto de cada muestra se midió por duplicado.

Las concentraciones de fenoles totales se obtuvieron mediante la comparación con curvas de calibración realizadas con ácido gálico. La curva de calibrado se construyó con 8 concentraciones de ácido gálico (1 – 8 mg/L), obteniéndose un  $R^2$  de

0,99. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico presentes en 100 g de fruta en base seca y base húmeda.

### **3.8. Determinación de la capacidad antioxidante**

La capacidad antioxidante se determinó por el método ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno), de acuerdo a la metodología descrita para la determinación de antioxidantes hidrofílicos (Ou y col., 2001, Huang y col., 2001). Este método usa la fluoresceína como sonda fluorescente. Las mediciones se realizaron sobre los mismos extractos obtenidos para la determinación de compuestos fenólicos, cuyo procedimiento de extracción fue descrito en la sección 3.7. Los extractos fueron diluidos en diferentes concentraciones (diluciones: 1/80, 1/160 y 1/320), utilizando una solución amortiguadora de fosfato de potasio (75 mM, pH 7,4). Se analizaron 10 muestras por cada condición y en cada muestra todas las diluciones se realizaron por duplicado.

Las determinaciones se llevaron a cabo en un luminómetro Victor<sup>3</sup> Multilabel-1420 (Perkin Elmer, Estados Unidos) sobre microplacas de poliestireno negras de 96 pocillos, de fondo plano y superficie sin tratamiento (Corning, Estados Unidos). En cada pocillo se adicionó 150  $\mu$ L de fluoresceína ( $8,16 \times 10^{-5}$  mM) disuelta en solución amortiguadora de fosfato de potasio (75 mM, pH 7,4) y 25  $\mu$ L de muestra diluida. La mezcla se incubó en agitación dentro del luminómetro durante 10 min a 37 °C. Posteriormente, se adicionó 25  $\mu$ L de AAPH ((2,2'-Azobis (2-Amidino-Propano) Dihidroclorado) (153 mM) disuelto en solución amortiguadora de fosfato de potasio (75 mM, pH 7,4). Se agitó la microplaca e inmediatamente se transfirió al lector donde se midió la fluorescencia de la mezcla a 37 °C durante 99 minutos, registrando lecturas en cada pocillo cada 1,25 min. Las lecturas se realizaron empleando filtros de emisión y excitación de 520 nm y 485 nm, respectivamente. El equipo fue programado para agitar automáticamente la microplaca durante el periodo de lectura. Para realizar el blanco, en vez de muestra se adicionó 25  $\mu$ L de una solución amortiguadora de fosfato de potasio (75 mM, pH 7,4). La curva de calibración fue realizada utilizando como estándar Trolox (ácido 6-hidroxi- 2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) en diferentes concentraciones (6,25, 12,5 y 25  $\mu$ M), obteniéndose en todas las curvas R<sup>2</sup> de

aprox. 0,99. Las mediciones para cada concentración de estándar se realizaron por triplicado.

Se calcularon los valores del área bajo la curva de fluorescencia (AUC) obtenida para el blanco, las muestras y los estándares, mediante el método de integración numérica del trapecio, de acuerdo a la **ecuación 3-3**:

$$AUC = \left( 0,5 \frac{f_0}{f_0} + \frac{f_1}{f_0} + \dots + \frac{f_{98}}{f_0} + \frac{0,5 f_{99}}{f_0} \right) * 1,25 \quad (3-3)$$

Donde:

1,25 es el tiempo en minutos que tardaba el equipo en medir todas las muestras y volver a medir la muestra en la primera celda.

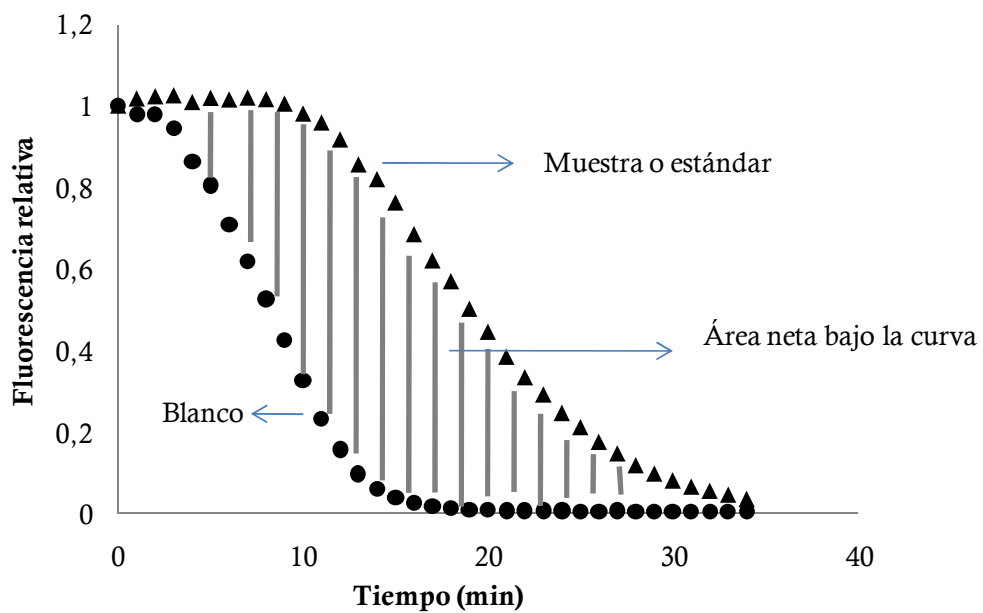
$f_0$  = lectura inicial de la fluorescencia

$f_i$  = lectura de la fluorescencia a tiempo  $i$

El área bajo la curva neta (AUC neta) de las muestras y los estándares se obtuvo sustrayendo la AUC de las mismas con el área bajo la curva del blanco (**Figura 3.4**). La curva de calibración se obtuvo graficando las concentraciones de Trolox con la correspondiente área bajo la curva neta (AUC), obtenida para cada concentración de estándar. Los valores finales ORAC se calcularon utilizando la ecuación de regresión de la curva de calibración, y se expresaron como equivalentes de Trolox por 100 g de fruta en base seca y base húmeda.

### 3.9. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de la media y sujetos al análisis estadístico utilizando el software Infostat v.2015 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Los resultados de cada una de las pruebas fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores (factores: tiempo de almacenamiento y dosis o tratamiento). En todos los casos, las diferencias significativas entre medias se establecieron aplicando el test de Tukey con un nivel de confianza del 95%.



**Figura 3.4.** Ilustración del cálculo del valor ORAC expresado como el área neta bajo la curva.

## 4. RESULTADOS



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efecto de la luz pulsada en el pH, la acidez titulable y los sólidos solubles

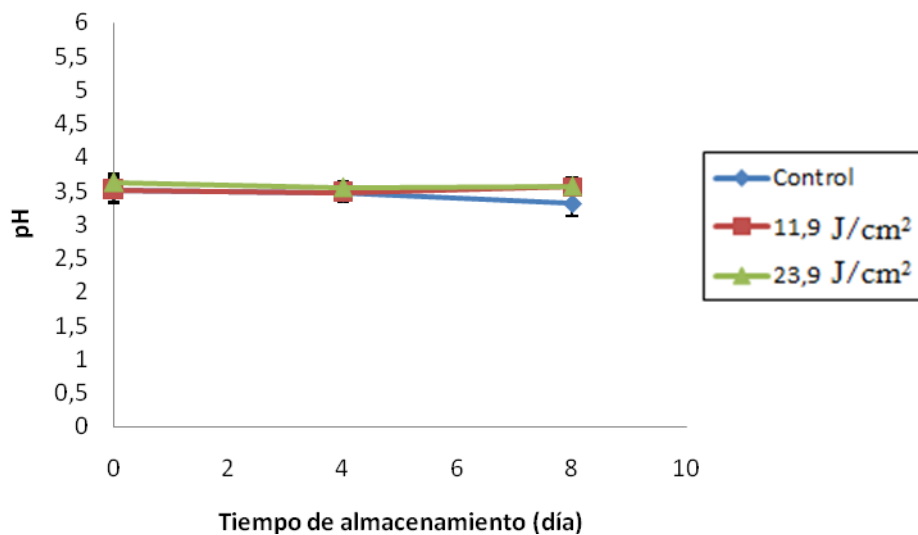
Las determinaciones de pH, acidez titulable y sólidos solubles fueron realizadas de acuerdo a lo establecido en la sección 3.5 de materiales y métodos.

Los resultados obtenidos en la determinación de pH en las muestras no tratadas (control) y en las expuestas a diferentes dosis de luz pulsada (11,9 J/cm<sup>2</sup> (10 s) y 23,9 J/cm<sup>2</sup> (20 s)), a los 0, 4 y 8 días del almacenamiento, se detallan en la **Figura 4-1** y **Tabla 4-1**. De acuerdo al análisis estadístico aplicado, los factores tiempo de almacenamiento y tratamiento no presentaron interacción significativa (ANOVA  $F_{4,81} = 2,34$ ;  $p = 0,0619$ ), por lo tanto, los resultados se analizaron por efectos principales. No hubo diferencias significativas en función del tiempo, lo que demuestra que las muestras tratadas y los controles no presentaron cambios significativos de pH durante el tiempo de almacenamiento analizado ( $F_{2,81} = 1,65$ ;  $p = 0,19$ ). En cuanto al efecto de los tratamientos, se encontraron diferencias significativas entre el control y las muestras irradiadas con dosis de 23,9 J/cm<sup>2</sup> ( $F_{2,81} = 7,95$ ;  $p = 0,0007$ ), siendo el pH de las muestras tratadas levemente superior al del control. Para la dosis de 11,9 J/cm<sup>2</sup> las diferencias con respecto al control no fueron significativas.

Moing y col. (2001) reportaron que el pH en la frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) estaba cercano a 5 10 días antes del florecimiento total, disminuía drásticamente a 3,7 en la etapa de transición, y luego permanecía constante durante la maduración. Esto se condice con los resultados de este trabajo, en donde no se encontraron variaciones significativas en el pH de los frutos a lo largo del almacenamiento.

Los valores de acidez titulable de las muestras analizadas se muestran en la **Figura 4-2** y **Tabla 4-2**; se encuentran expresados como miligramos de ácido cítrico por 100 gramos de fruta debido a que es el ácido orgánico con mayor presencia en la frutilla (Shamaila y col., 1992). No se encontró interacción significativa entre los factores analizados ( $F_{4,81} = 2,38$ ;  $p = 0,059$ ). Las muestras tratadas y no tratadas presentaron un leve aumento significativo de la acidez durante el almacenamiento



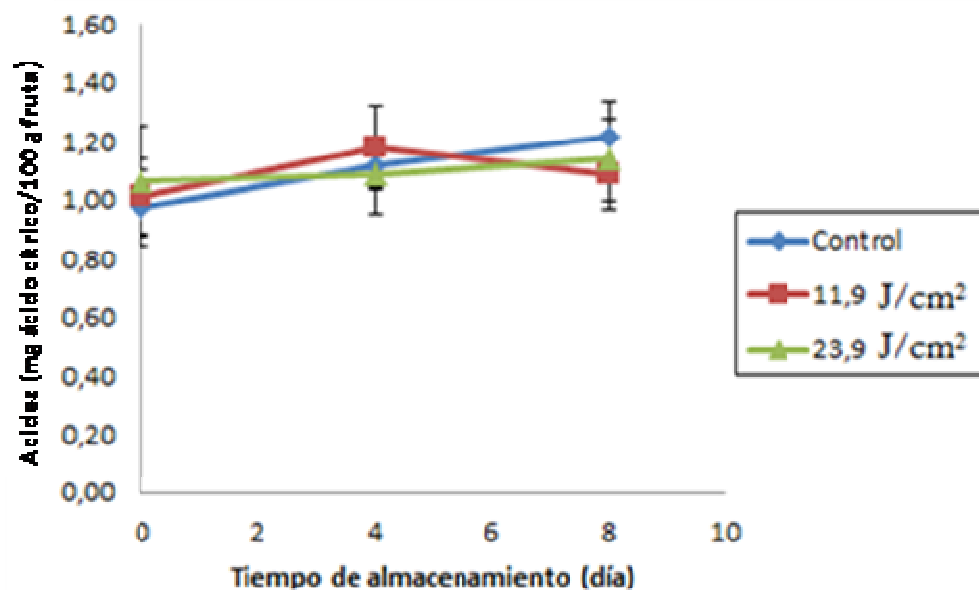


**Figura 4-1.** Valores promedio de pH en frutillas no tratadas y en frutillas expuestas a diferentes dosis de luz pulsada y almacenadas a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 4-1.** Valores promedio de pH en muestras no tratadas y expuestas a diferentes dosis de luz pulsada y almacenadas a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Tiempo de almacenamiento (día)	Control	11,9 J/cm <sup>2</sup>	23,9 J/cm <sup>2</sup>
0	3,5 ± 0,2	3,5 ± 0,2	3,6 ± 0,1
4	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1
8	3,3 ± 0,2	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar.



**Figura 4-2.** Valores promedio de acidez (mg ácido cítrico/100 g fruta) en frutillas control y en frutillas tratadas con luz pulsada y almacenadas a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 4-2.** Valores promedio de acidez (mg ácido cítrico/100 g fruta) en frutillas control y en frutillas tratadas con luz pulsada y almacenadas a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Tiempo de almacenamiento (día)	Control	11,9 J/cm <sup>2</sup>	23,9 J/cm <sup>2</sup>
0	0,97 ± 0,13	1,01 ± 0,08	1,06 ± 0,12
4	1,12 ± 0,13	1,18 ± 0,14	1,08 ± 0,12
8	1,22 ± 0,19	1,08 ± 0,13	1,14 ± 0,14

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar.

( $F_{2,81} = 8,36$ ;  $p = 0,0005$ ), no observándose cambios significativos por efecto de los tratamientos ( $F_{2,81} = 0,05$ ;  $p = 0,952$ ).

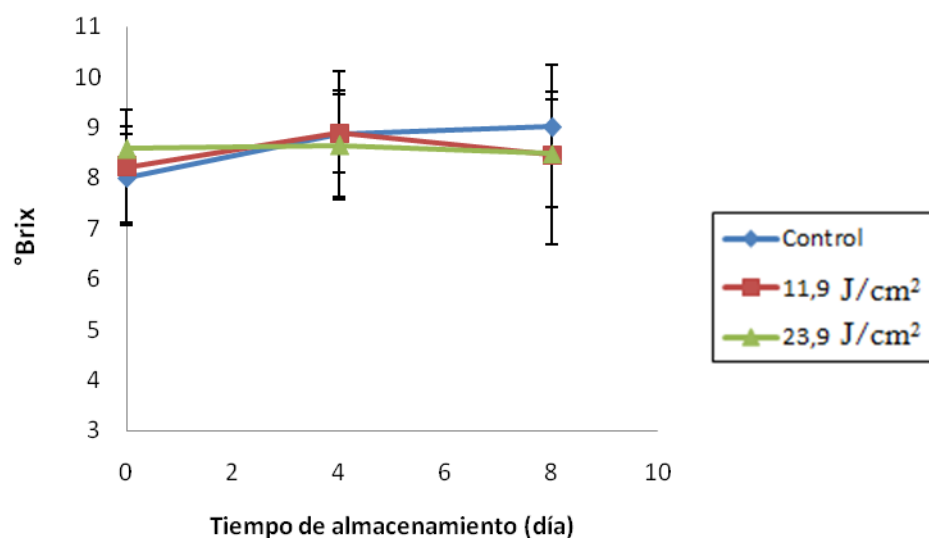
Estos valores de acidez son similares a valores reportados en frutillas por Kafkas y col. (2007). Durante la maduración hay un aumento en el total de ácidos orgánicos pero a partir del día 28 después de la fructificación hay una disminución en la concentración de estos ácidos. En concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo, Cote y col. (2013) también observaron un aumento de la acidez durante el almacenamiento en frutillas variedad Camarosa almacenadas 5 días a 10°C.

Los valores de sólidos solubles se muestran en la **Figura 4-3** y **Tabla 4-3**. Al analizar los datos estadísticamente se encontró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{2,81} = 0,07$ ;  $p = 0,9287$ ), al igual que en el tiempo de almacenamiento ( $F_{2,81} = 2,01$ ;  $p = 0,1403$ ); tampoco se encontró interacción entre las variables ( $F_{4,81} = 0,83$ ;  $p = 0,5071$ ), es decir que las muestras tratadas no mostraron ningún cambio en el tiempo de almacenamiento y tampoco se vieron afectadas con las diferentes dosis de irradiación con respecto al control en cuanto al contenido de sólidos solubles.

## **4.2. Efecto de la irradiación con luz pulsada en el contenido de antocianinas**

### **4.2.1. Evaluación del tiempo de extracción de antocianinas**

Para la extracción de antocianinas del tejido de frutilla se utilizó como solvente de extracción una solución de etanol y HCL (85:15) y una relación fruta/solvente de extracción de 10:100. Se analizaron dos tiempos de extracción teniendo en cuenta estudios reportados en la bibliografía. La primera extracción se realizó con un tiempo de extracción de 2 horas a 4°C de acuerdo a la metodología descrita por Oancea y col. (2012), y la segunda, con un tiempo de extracción de 24 horas a 4°C de acuerdo a Oancea y col. (2013). Los resultados obtenidos del contenido de antocianinas en estas extracciones se muestran en la **Tabla 4-4**; se expresaron como miligramos de pelargonidin-3-glucósido presentes en 100 gramos de muestra, ya que es la antocianina con mayor presencia en la frutilla (Wang y col., 2009). Como puede observarse, con el tiempo de extracción de 24 h se logró una recuperación mayor de antocianinas, por lo



**Figura 4-3.** Valores promedio de sólidos solubles (°Brix) en frutillas control y en frutillas tratadas con luz pulsada y almacenadas a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 4-3.** Valores promedio de sólidos solubles en frutillas control y en frutillas tratadas con luz pulsada y almacenadas a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Tiempo de almacenamiento (día)	Control	11,9 J/cm <sup>2</sup>	23,9 J/cm <sup>2</sup>
0	8,00 ± 0,87	8,21 ± 1,15	8,58 ± 0,44
4	8,87 ± 1,24	8,89 ± 0,78	8,65 ± 1,08
8	9,01 ± 0,70	8,46 ± 1,77	8,48 ± 1,07

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar.

**Tabla 4-4.** Valores promedio del contenido de antocianinas totales (mg/100 g fruta b.h.) en frutillas sometidas a diferentes tiempos de extracción.

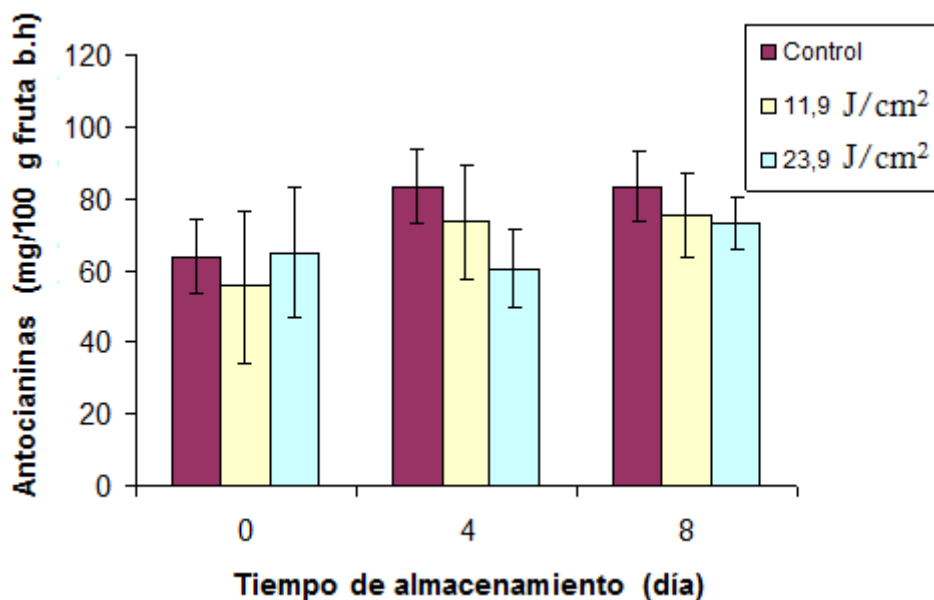
Tiempo de extracción (h)	Antocianinas (mg/100 g de fruta b.h.)
2	28,10±0,7
24	40,4±1,8

que se decidió utilizar este tiempo de extracción para las determinaciones posteriores.

#### 4.2.2. Contenido de antocianinas en frutillas tratadas con LP

Los resultados obtenidos del contenido de antocianinas en las muestras analizadas, expresados como miligramos de pelargonidin-3-glucósido presentes en 100 gramos de fruta en base húmeda, se muestran en la **Figura 4-4**. En la **Tabla 4-5** se presentan los resultados con el correspondiente análisis estadístico. La interacción entre el tiempo de almacenamiento y los tratamientos fue significativa ( $F_{4,81} = 2,59$ ;  $p = 0,043$ ). La presencia de interacción significativa indica que los factores no son independientes entre sí, es decir que la combinación tiempo de almacenamiento y dosis de luz pulsada tuvieron un efecto sobre el valor total de antocianinas.

Las frutillas tratadas con luz pulsada no presentaron variaciones significativas en el contenido de antocianinas en relación a las muestras control inmediatamente después de aplicar los tratamientos (día 0). En las frutillas control, el contenido de antocianinas aumentó significativamente al día 4 del almacenamiento, y luego permaneció sin cambios significativos hasta el día 8. Por el contrario, las frutillas expuestas a la LP, si bien presentaron un leve aumento en la concentración de antocianinas durante el almacenamiento, estas variaciones no fueron estadísticamente significativas. Al día 4 del almacenamiento, el contenido de antocianinas en las frutillas tratadas con una dosis de luz pulsada de  $23,9 \text{ J/cm}^2$  fue significativamente inferior al de las muestras control.



**Figura 4-4.** Valores promedio del contenido de antocianinas (mg/100 g fruta en base húmeda) en frutillas expuestas a diferentes dosis de luz pulsada y almacenadas a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 4-5.** Valores promedio del contenido de antocianinas (mg/100 g fruta en base húmeda) en frutillas control y tratadas con luz pulsada y almacenadas a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Dosis de LP (J/cm <sup>2</sup> )	Tiempo de almacenamiento (día)	Antocianinas (mg/100 g b.h.)
0		63,9 ± 10,8 <sup>a</sup>
11,9	0	63,8 ± 12,2 <sup>a</sup>
23,9		65,1 ± 18,3 <sup>a</sup>
0		83,6 ± 10,4 <sup>b</sup>
11,9	4	73,7 ± 15,9 <sup>a, b</sup>
23,9		60,7 ± 11,2 <sup>a</sup>
0		82,3 ± 7,1 <sup>b</sup>
11,9	8	73,4 ± 11,6 <sup>a, b</sup>
23,9		73,2 ± 7,2 <sup>a, b</sup>

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Medias identificadas con igual letra no presentaron diferencias significativas con un 95% de nivel de confianza.

En estudios simultáneos realizados en el grupo de investigación, donde se empleó la misma variedad de frutilla e idénticas condiciones de tratamiento, se registraron los porcentajes de pérdida de peso a lo largo del almacenamiento refrigerado de las diferentes muestras analizadas (**Tabla 4-6**). Dado que las muestras presentaron una disminución en el contenido de agua durante el almacenamiento, se calculó, teniendo en cuenta estos valores y la humedad inicial de las muestras, el contenido de antocianinas expresado en gramos de fruta en base seca, para poder evaluar si el porcentaje de deshidratación de los frutos influía en las variaciones observadas en el contenido de antocianinas a lo largo del almacenamiento.

**Tabla 4-6.** Porcentaje de pérdida de peso de frutillas expuestas a diferentes dosis de luz pulsada y almacenadas a  $6\pm 1$  °C.

Tiempo de almacenamiento (día)	Tiempo de almacenamiento		
	Control	11,9 J/cm <sup>2</sup>	23,9 J/cm <sup>2</sup>
0	0 <sup>aA</sup>	0,4± 0,1 <sup>aA</sup>	0,4±0,1 <sup>aA</sup>
4	1,6 ± 0,7 <sup>bA</sup>	1,6± 0,7 <sup>bA</sup>	2,1± 0,9 <sup>bA</sup>
8	3,5± 1,5 <sup>cA</sup>	2,5± 0,9 <sup>cA</sup>	3,1± 0,9 <sup>cA</sup>

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Para cada tratamiento, las medias seguidas por la misma letra minúscula no presentaron diferencias significativas a lo largo del almacenamiento ( $p < 0,05$ ). Para el mismo día de almacenamiento, las medias de los diferentes tratamientos seguidas por la misma letra mayúscula no presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Fuente: Duarte-Molina y col. (2016)

En la **Tabla 4-7** se presentan los valores expresados en base seca, ANOVA ( $F_{4,81} = 2,60$ ;  $p = 0,042$ ). Al igual que en los resultados anteriores presentados en base húmeda, el contenido de antocianinas en las muestras no tratadas aumentó significativamente al día 4 del almacenamiento y permaneció sin cambios significativos al día 8. Por lo que se puede concluir que el aumento de la concentración de antocianinas durante el almacenamiento de estos frutos se asociaría, además de un efecto de concentración por deshidratación, con un incremento en la biosíntesis de las

**Tabla 4-7.** Valores promedio del contenido de antocianinas (mg/100 g fruta en base seca) en frutillas control y frutillas tratadas con luz pulsada y almacenadas a  $6\pm 1^\circ\text{C}$ .

Dosis de LP (J/cm <sup>2</sup> )	Tiempo de almacenamiento (día)	Antocianinas (mg/100 g b.s.)
0		767,3 ± 129,1 <sup>a</sup>
11,9	0	765,3 ± 165,7 <sup>a</sup>
23,9		781,7 ± 219,4 <sup>a,b</sup>
0		1136,8 ± 140,9 <sup>d,e</sup>
11,9	4	1002,1 ± 215,8 <sup>b,c,d</sup>
23,9		861,4 ± 159,3 <sup>a,b,c</sup>
0		1295,6 ± 149,7 <sup>c</sup>
11,9	8	1093,1 ± 167,7 <sup>c,d,e</sup>
23,9		1061,6 ± 104,8 <sup>c,d</sup>

Los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar. Medias identificadas con igual letra no presentan diferencias significativas con un 95% de nivel de confianza.

mismas. Los frutos tratados con una dosis de 11,9 J/cm<sup>2</sup> no presentaron variaciones significativas con respecto al control. Por el contrario, las frutillas expuestas a la dosis de 23,9 J/cm<sup>2</sup> presentaron un contenido de antocianinas levemente menor al control al día 4 y 8 del almacenamiento.

La concentración de antocianinas en la frutilla aumenta a medida que transcurre su desarrollo y maduración (Ozawa y col., 1987). Esto se condice con el aumento observado en el contenido de antocianinas en las muestras control durante los primeros cuatro días del almacenamiento. En los días posteriores el contenido de antocianinas en las muestras control no siguió en aumento debido, probablemente, a que se utilizaron frutos en un estadio de maduración 100 % color rojo, por lo que en el transcurso del almacenamiento se encontraban en las etapas finales de la maduración e inicios de la senescencia. Por otro lado, la disminución en la biosíntesis de antocianinas observada en las muestras tratadas con una dosis de LP de 23,9 J/cm<sup>2</sup> en relación al control, podría estar relacionada a un retraso en la maduración de los frutos asociado a un efecto hormético inducido por la aplicación de dosis de luz pulsada



específicas. Este fenómeno concordaría con el menor ablandamiento observado en estudios previos en frutillas tratadas con la misma dosis de luz pulsada (Duarte-Molina, 2015; Duarte-Molina y col., 2016). Cote y col. (2013) también reportaron una disminución de la acumulación de antocianinas en frutillas tratadas con radiación UV-C (dosis 4 kJ/m<sup>2</sup>) y almacenadas durante 5 días a 10 °C. Por el contrario, Rodov y col. (2012) reportaron un efecto contrario en higos con bajo contenido inicial de antocianinas expuestos a la luz pulsada (fluencias comprendidas entre 2 y 18 kJ/m<sup>2</sup>), observando un aumento en la concentración de antocianinas en los frutos tratados, y como consecuencia también una mejora en el color del producto durante el almacenamiento. En el caso de las frutillas, de acuerdo a estudios previos llevados a cabo en el grupo de investigación, no se observó un cambio significativo en los parámetros de color del espacio CIE L\*a\*b\* para ninguna de las dosis de LP evaluadas (Duarte-Molina, 2015). Esto implica que la disminución en el contenido de antocianinas observada en las muestras tratadas con la dosis de 23,9 J/cm<sup>2</sup> no repercutió significativamente en el color superficial de las muestras.

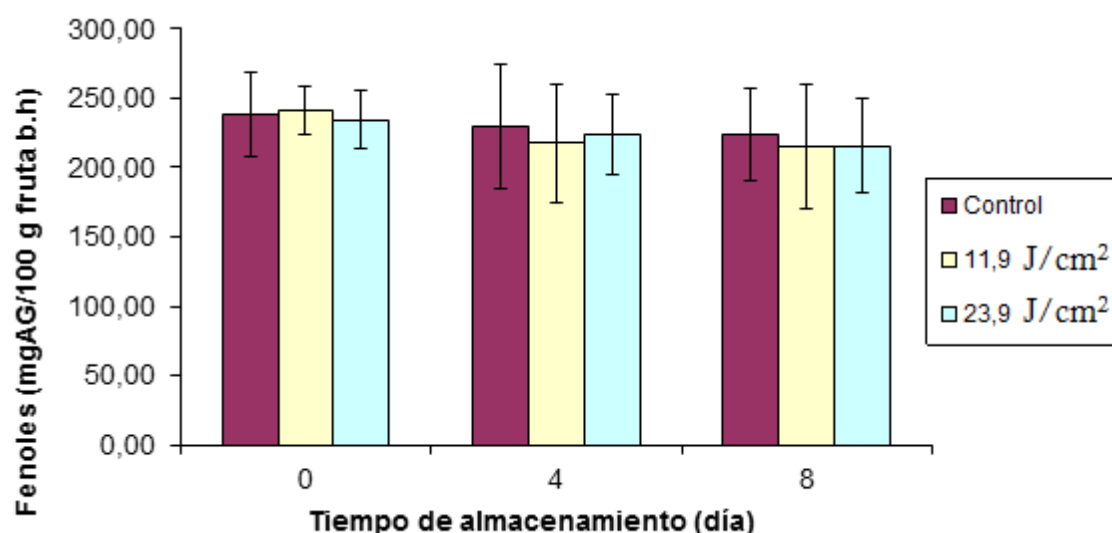
#### **4.3. Efecto de la irradiación con luz pulsada en el contenido de fenoles totales**

Un punto crítico al estudiar polifenoles en materiales vegetales, como así también otros compuestos bioactivos, es el procedimiento de extracción utilizado, ya que el mismo determina la naturaleza y la cantidad de polifenoles que serán transferidos al extracto y posteriormente caracterizados. Kajdžanoska y col. (2011) compararon diferentes mezclas de solventes de extracción para la caracterización de compuestos fenólicos en frutillas. Encontraron que las mezclas que contenían acetona resultaron en recuperaciones más altas de compuestos fenólicos totales comparadas con las que contenían metanol. En este trabajo se decidió utilizar como solvente de extracción una mezcla acetona:agua (80:20) (relación fruta/solvente: 10:100), teniendo en consideración reportes de diversos autores en donde esta mezcla fue seleccionada para la determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en frutilla (Boeing y col. , 2014; Meyers y col., 2003; Shin y col., 2007). Cabe señalar que la técnica de extracción utilizada permite la extracción de compuestos fenólicos libres,

que involucrarían el 95% de los compuestos fenólicos presentes en frutillas (Meyers y col., 2003).

En la **Figura 4-5** y **Tabla 4-8** se muestran los valores promedio del contenido total de fenoles expresados como mg de ácido gálico/100g de fruta en base húmeda (ANOVA  $F_{4,81} = 0,35$ ;  $p = 0,85$ ). Como puede observarse, el contenido de fenoles totales disminuyó levemente tanto en las frutillas tratadas como no tratadas, sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Al expresar estos valores en base seca (**Figura 4-6** y **Tabla 4-9**) (ANOVA  $F_{4,81} = 2,1$ ;  $p = 0,04$ ), se observó una disminución significativa en el contenido de fenoles de todas las muestras durante el transcurso del almacenamiento, no presentándose variaciones significativas entre las muestras control y tratadas.

En diversos estudios se ha reportado una disminución en el contenido de compuestos fenólicos totales durante la maduración de frutillas de diferentes variedades (Ferreyra y col., 2007; Montero y col., 1996; Nunes y col., 2006; Ornelas-Paz y col., 2013). El decrecimiento en el contenido de fenoles durante la maduración podría deberse a la conversión de fenoles en compuestos con mayor actividad antioxidante en una etapa particular de la fruta (Macheix y col., 1990). Por ejemplo, se ha encontrado que el ácido clorogénico y la quercetina se encuentran en concentraciones más altas en las primeras etapas del desarrollo del fruto, y luego disminuyen durante la maduración (Mandave y col., 2009). Montero y col. (1996) observaron un rápido decrecimiento de los compuestos fenólicos totales durante las primeras etapas del desarrollo de frutillas var. Chandler, y en las fases finales de la maduración, un leve incremento atribuido al aumento de la concentración de antocianinas. En nuestros estudios, el aumento observado durante el almacenamiento en la concentración de antocianinas en las muestras control no se correlacionó con un aumento en el contenido de fenoles totales. En concordancia con nuestros resultados, Cordenunsi y col. (2005) no encontraron una correlación del contenido de fenoles con el aumento en la concentración de antocianinas observado en diferentes cultivares de frutilla almacenados a diferentes temperaturas (6, 16 y 25 °C). Cabe tener en consideración que el solvente de extracción utilizado para la extracción de antocianinas fue diferente al utilizado para la extracción de fenoles, por lo que el

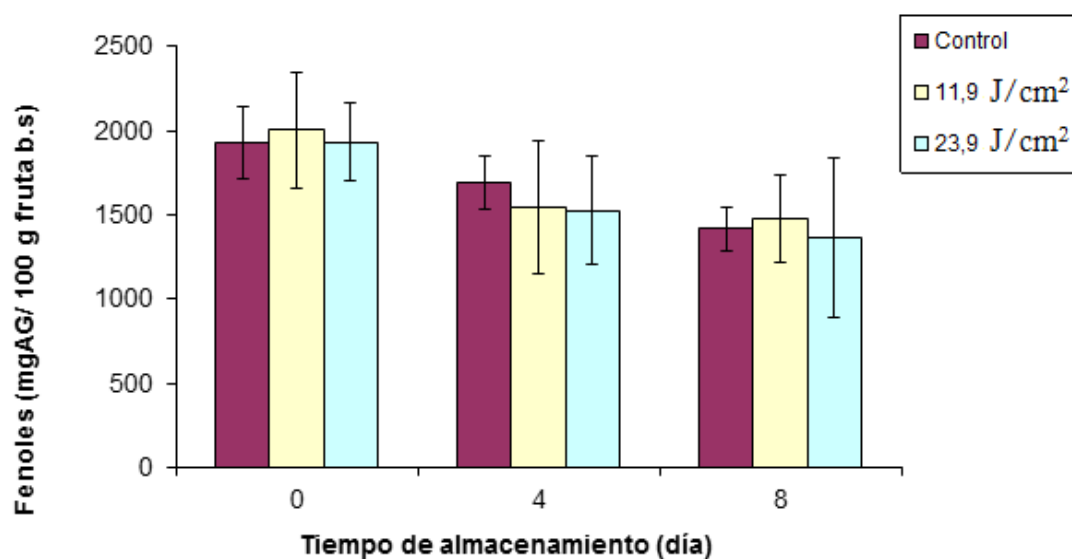


**Figura 4-5.** Valores promedio del contenido de fenoles totales libres (mg ácido gálico (AG)/100 g fruta en base húmeda) en frutillas con diferentes tratamientos y almacenadas a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 4-8.** Valores promedio del contenido de fenoles totales libres (mg ácido gálico (AG)/100 g fruta en base húmeda) en frutillas control y en frutillas tratadas con luz pulsada y almacenadas a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Tiempo de almacenamiento (día)	Control	11,9 J/cm <sup>2</sup>	23,9 J/cm <sup>2</sup>
0	238,46 ± 30,59	241,07 ± 17,70	234,72 ± 20,45
4	229,22 ± 45,08	217,71 ± 43,04	224,04 ± 29,27
8	223,47 ± 33,55	215,32 ± 44,5	215,6 ± 33,93

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar.



**Figura 4-6.** Valores promedio del contenido de fenoles totales (mg ácido gálico (AG)/100 g fruta en base seca) en frutillas con diferentes tratamientos y almacenadas a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 4-9.** Valores promedio del contenido de fenoles totales (mg ácido gálico (AG)/100 g fruta en base seca) en frutillas control y en frutillas tratadas con luz pulsada y almacenadas a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Dosis de LP (J/cm <sup>2</sup> )	Tiempo de almacenamiento (día)	Fenoles (mg AG/100 g b.s.)
0	0	1929,71 ± 215,85 <sup>a,b</sup>
11,9		2001,53 ± 154,15 <sup>a</sup>
23,9		1929,26 ± 128,08 <sup>a,b</sup>
0	4	1690,32 ± 341,29 <sup>a,b,c</sup>
11,9		1543,54 ± 394,37 <sup>b,c</sup>
23,9		1524,77 ± 261,42 <sup>c</sup>
0	8	1417,14 ± 229,13 <sup>c</sup>
11,9		1478,53 ± 321,64 <sup>c</sup>
23,9		1361,37 ± 471,23 <sup>c</sup>

Los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar. Medias identificadas con igual letra no presentan diferencias significativas con un 95% de nivel de confianza.

porcentaje de extracción de antocianinas podría haber sido diferente en los distintos solventes.

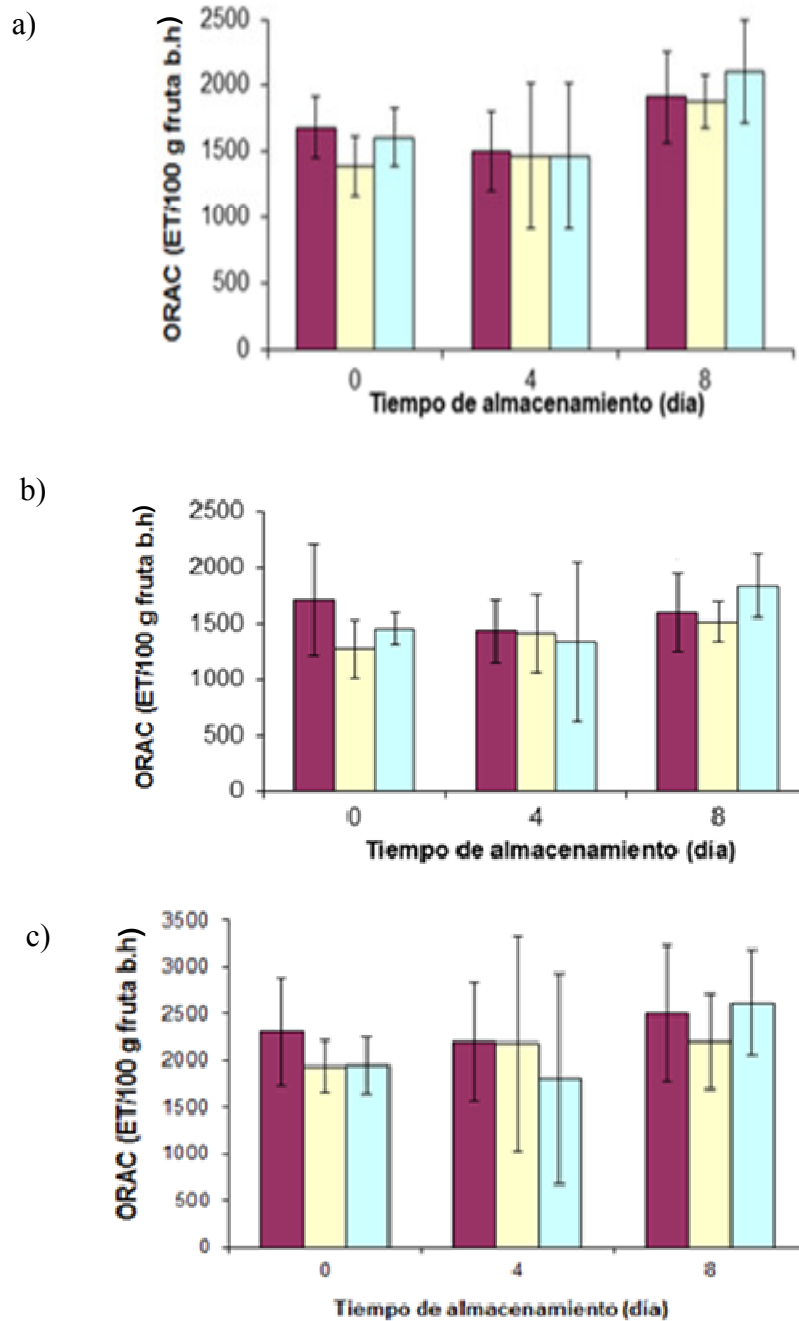
#### 4.4. Efecto de la irradiación con luz pulsada en la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de las diferentes muestras fue determinada mediante el método  $ORAC_{FL}$ , que utiliza la fluoresceína como sonda fluorescente. Debido a que la reacción es llevada a cabo en un sistema acuoso, esta técnica sólo permite la determinación de la actividad antioxidante de compuestos hidrofílicos, como lo son la mayoría de los compuestos polifenólicos y la vitamina C, que se encuentran presentes en altas concentraciones en la frutilla (Giampieri y col., 2012; Huang y col., 2002; Rekika y col., 2005).

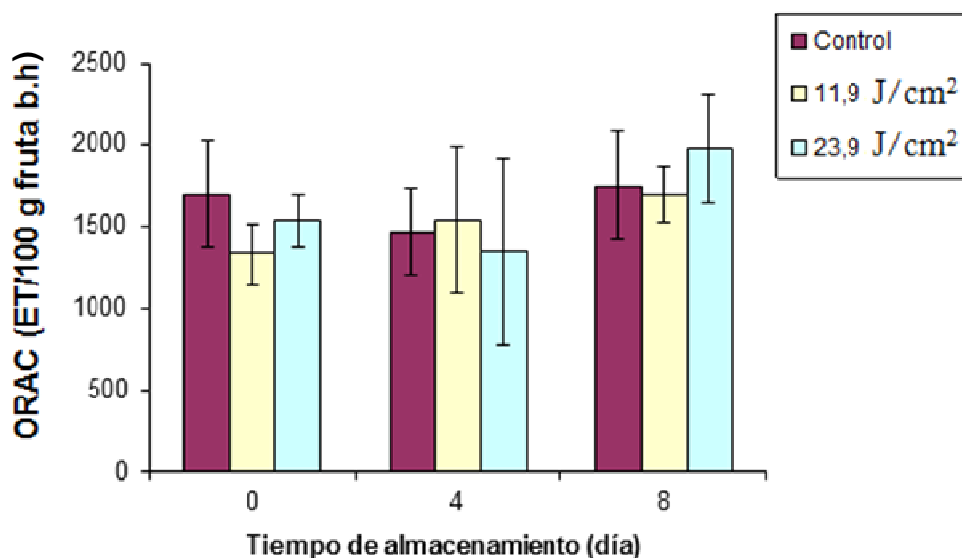
Para analizar la capacidad antioxidante de las muestras, como se mencionó en la sección 3.8, se realizaron 3 diluciones de los extractos (1/80, 1/160 y 1/320). En la **Figura 4-7** se presentan los valores ORAC obtenidos en las diferentes diluciones, expresados como equivalentes de trolox (ET) por 100 g de fruta en base húmeda. Se observó que los valores obtenidos con la dilución más alta presentaban una mayor dispersión, por lo tanto, se decidió descartarla y hacer un promedio con las primeras dos diluciones para analizar los datos estadísticamente.

En la **Figura 4-8** y **Tabla 4-10** se muestran los valores ORAC promedio de las diluciones 1/80 y 1/160, expresados sobre 100 g de fruta en base húmeda. No se encontró interacción significativa entre los factores tiempo de almacenamiento y tratamiento ( $F_{4,81} = 2.35$ ;  $p = 0,06$ ). Se observó un leve aumento en la capacidad antioxidante en el día 8 en todos los frutos, tanto control como tratados ( $F_{2,81} = 9,51$ ;  $p = 0,0002$ ), no observándose diferencias significativas entre las diferentes muestras ( $F_{2,81} = 1,02$ ;  $p = 0,365$ ). Al expresar los valores ORAC en base seca (**Figura 4-9** y **Tabla 4-11**) ( $F_{4,81} = 0,6$ ;  $p = 0,4$ ) no se encontraron diferencias significativas ni por efecto del almacenamiento ni de los tratamientos, por lo que el leve incremento en la capacidad antioxidante observado al día 8, se asociaría a un efecto de concentración debido a la pérdida de agua de los frutos.

La capacidad antioxidante total es debida a la combinación de actividades de diversos antioxidantes presentes en el alimento (Tabart y col., 2009). Estudios previos



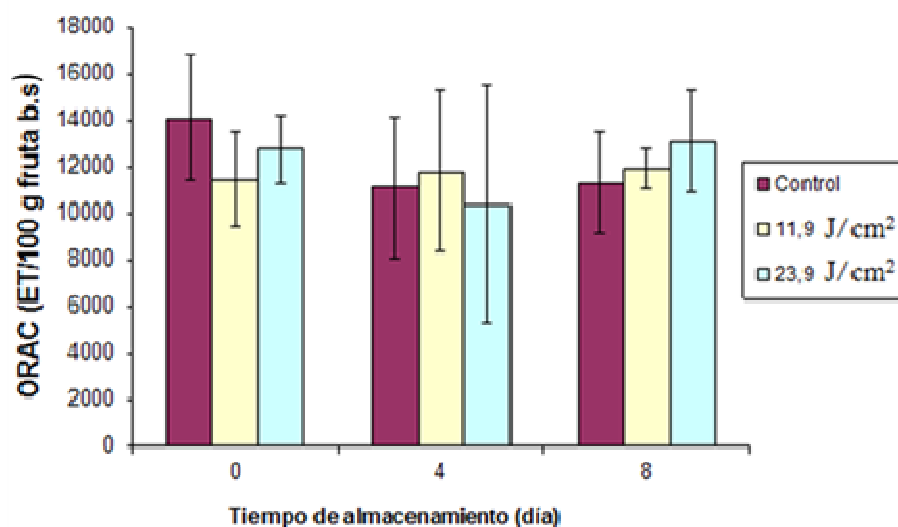
**Figura 4-7.** Valores promedio de capacidad antioxidante (Equivalentes de Trolox (ET)/100 g fruta en base húmeda) obtenidos para diferentes diluciones de los extractos de frutillas sometidas a diferentes tratamientos y almacenadas a  $6 \pm 1^\circ\text{C}$ . a) dilución 1/80; b) dilución 1/160; c) dilución 1/320. (●) Control; (●) 11,9 J/cm<sup>2</sup> LP; (●) 23,9 J/cm<sup>2</sup> LP.



**Figura 4-8.** Valores promedio finales de capacidad antioxidante (Equivalentes de Trolox (ET)/100 g fruta en base húmeda) en frutillas control y en frutillas tratadas con luz pulsada y almacenadas a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 4-10.** Valores promedio finales de capacidad antioxidante (Equivalentes de Trolox (ET)/100 g fruta en base húmeda) en frutillas control y en frutillas tratadas con luz pulsada y almacenadas a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Tiempo de almacenamiento (día)	Control	11,9 J/cm <sup>2</sup>	23,9 J/cm <sup>2</sup>
0	1697,04 ± 323,51	1331,45 ± 189,97	1533,94 ± 165,69
4	1468,42 ± 267,06	1540,20 ± 442,90	1350,07 ± 569,41
8	1751,06 ± 335,74	1698,99 ± 166,82	1974,24 ± 330,05



**Figura 4-9.** Valores promedio finales de capacidad antioxidante (Equivalentes de Trolox (ET)/100 g fruta en base seca) en frutillas control y en frutillas tratadas con luz pulsada y almacenadas a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 4-11.** Valores promedio finales de capacidad antioxidante (Equivalentes de Trolox (ET)/100 g fruta en base seca) en muestras control y tratadas con luz pulsada y almacenadas a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Dosis de LP (J/cm <sup>2</sup> )	Tiempo de almacenamiento (día)	ORAC (ET/100 g b.s.)
0		14074,93 ± 2670,04
11,9	0	11446,18 ± 2014,48
23,9		12744,92 ± 1478,68
0		11127,6 ± 3023,22
11,9	4	11800,2 ± 3431,2
23,9		10382,1 ± 5117,7
0		11297,15 ± 2166,08
11,9	8	11899,89 ± 861,85
23,9		13074,42 ± 2185,1

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar,



han correlacionado positivamente la cantidad de compuestos fenólicos con la capacidad antioxidante de algunos alimentos.

Cuanto mayor sea la cantidad de compuestos fenólicos puede ser mayor su capacidad antioxidante (Fan y col., 2012). A su vez, la cantidad y tipo de compuestos fenólicos presentes en las frutillas dependen del cultivar y de varios factores, como la etapa de maduración en las que fueron cosechadas, la temperatura del cultivo, condiciones de almacenamiento poscosecha, el uso de coberturas y el material de éstas, entre otros factores (Wang y Zheng, 2001; Wan y col, 2003). También las variaciones cualitativas y cuantitativas en la actividad antioxidante de la frutilla de una misma variedad dependen de antecedentes genéticos, grado de maduración, factores climatológicos y de almacenamiento postcosecha (Maatta y col., 2004; Lopes-da-Silva y col., 2007)

Mandave y col. (2014) reportaron valores de fenoles de la frutilla en cuatro etapas de maduración. A medida que la fruta iba madurando la cantidad de fenoles iba disminuyendo. También midieron actividad antioxidante con el método DPPH y FRAP, encontrando un aumento de la actividad antioxidante a medida que la frutilla maduraba. Atribuyeron este aumento en la capacidad antioxidante a que existen, además de los fenoles, otros compuestos con un papel importante en la actividad antioxidante.

En nuestros estudios, la disminución del contenido de fenoles en las frutillas control no se correlacionó con una disminución significativa en la capacidad antioxidante. Asimismo, el incremento en el contenido de antocianinas tampoco se asoció con un incremento en los valores ORAC. Esto también fue observado por Cordenunsi y col. (2005) al analizar frutillas almacenadas a 6, 16 y 25 °C. Meyers y col. (2003) y Rekika y col. (2005) tampoco encontraron correlación entre compuestos fenólicos individuales (especialmente antocianinas y ácido eláxico) y la capacidad antioxidante total (medida por TEAC y FRAP). Contrariamente, Kalt y col. (1999) reportaron un incremento en la capacidad antioxidante en frutillas almacenadas 8 días a 10, 20 y 30°C, lo que se correlacionó con un aumento en el contenido de antocianinas. Estas discrepancias entre estudios podrían deberse, en parte, a que los

compuestos fenólicos de las frutas pueden exhibir actividades antogónicas como también aditivas/sinérgicas o presentar interacciones con otros fenoles y fitoquímicos presentes en el fruto. Por lo tanto, la actividad antioxidante total podría verse afectada dependiendo de las proporciones relativas de los mismos y la presencia de compuestos fenólicos particulares (Meyers y col., 2003).

Además de los compuestos fenólicos, el contenido de ácido ascórbico puede influir en los valores ORAC. La contribución del mismo a la capacidad antioxidante total en la frutilla no sería tan importante como la de los compuestos fenólicos y estaría asociada a un 9-15 % del valor ORAC total (Kalt y col., 1999). En general, en frutas se considera que la concentración de ácido ascórbico permanece más estable durante el almacenamiento poscosecha en comparación con los vegetales de hoja debido a su alto contenido de ácidos. Kalt y col. (1999) no encontraron pérdidas de ácido ascórbico en frutillas almacenadas 8 días a temperaturas mayores a 0 °C. Cordenunsi y col. (2005) observaron que las variaciones en el contenido de ácido ascórbico durante el almacenamiento poscosecha dependía del cultivar y la temperatura de almacenamiento. En concordancia con Shin y col. (2007) no encontraron variaciones significativas en frutos almacenados a 10 °C, pero sí cuando eran almacenados a temperaturas superiores. En esta investigación no fue determinado el contenido de ácido ascórbico de las muestras durante el almacenamiento, por lo que no puede ser asociada su contribución a la capacidad antioxidante medida.

A diferencia de nuestros estudios en donde la actividad antioxidante de las frutillas no se vio afectada por los tratamientos de LP, Pataro y col. (2015) reportaron un aumento en la capacidad antioxidante en tomates en estadio verde inmaduro irradiados con dosis de LP entre 1-8 J/cm<sup>2</sup> y almacenados a 20 °C. También observaron un incremento en la acumulación de licopeno, carotenoides totales y compuestos fenólicos en la fase de maduración, siendo 6,2, 2,5 y 1,3 veces superior, respectivamente, en comparación con las muestras no tratadas. Aguiló-Aguayo y col. (2013) reportaron el mismo efecto en tomates rojos maduros expuestos a una dosis de LP de 30 J/cm<sup>2</sup>, aunque el incremento fue mucho menor. Este incremento en el contenido de compuestos bioactivos estaría asociado, como se mencionó anteriormente,

a la estimulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios de defensa con propiedades antimicrobianas y antioxidantes producidos en respuesta a la aplicación de un factor de estrés. Koyyalamudi y col. (2011) y Rodov y col. (2012) también reportaron efectos horméticos inducidos por la luz pulsada (dosis entre 0,2-10 J/cm<sup>2</sup>) en hongos y en higos respectivamente, observando un incremento en los niveles de vitamina D2 y en el contenido de antocianinas y fenoles totales.

En investigaciones realizadas en frutas mínimamente procesadas, Charles y col. (2013) observaron que los niveles de carotenos se mantuvieron en mangos cortados expuestos a una dosis de luz pulsada de 8 J/cm<sup>2</sup>, a diferencia del control que presentó una reducción de los mismos a lo largo del almacenamiento, mientras que el contenido de fenoles totales y ácido ascórbico no se vio afectado por el tratamiento. Por otra parte, Oms-Oliu y col. (2010) encontraron una mayor reducción a lo largo del almacenamiento en el contenido de compuestos fenólicos, vitamina C y capacidad antioxidante en hongos mínimamente procesados tratados con una dosis de LP de 28 J/cm<sup>2</sup>, en comparación con los hongos no tratados. Sin embargo, al aplicar dosis menores (4 y 12 J/cm<sup>2</sup>), las muestras tratadas presentaron variaciones menores en el contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante que los hongos no tratados.

De todo lo expuesto anteriormente puede concluirse que el efecto de la luz pulsada sobre los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante en frutas dependería del tipo de fruto, variedad, grado de maduración al momento de aplicar los tratamientos y dosis de luz pulsada aplicada, no pudiendo generalizarse un efecto específico.

#### **4.5. Selección de la dosis**

De acuerdo a la legislación vigente a nivel internacional sobre esta tecnología, no existen hasta el momento criterios comunes para establecer las dosis límites permitidas de aplicación de la luz pulsada en alimentos. En los Estados Unidos la FDA ha aprobado la aplicación de pulsos de luz en alimentos en dosis de hasta 12 J/cm<sup>2</sup> (FDA, 1996). Sin embargo, en la Unión Europea el estatus legal de esta

tecnología es considerado bajo otro enfoque. La legislación no es orientada a la tecnología sino orientada a cada alimento, por lo que la aplicación de la tecnología de luz pulsada sería aprobada para un producto específico, teniendo en cuenta los posibles efectos en las propiedades nutricionales, el metabolismo y los niveles de sustancias indeseables. En este trabajo de tesis, las dosis de LP evaluadas se seleccionaron teniendo en cuenta estudios previos en donde se evaluó el efecto de un amplio rango de dosis en el desarrollo microbiológico y algunos parámetros de calidad, superando en algunos casos los límites permitidos por la FDA.

Los resultados obtenidos indicaron que los tratamientos de LP con dosis de 11,9 J/cm<sup>2</sup> y 23,9 J/cm<sup>2</sup> no produjeron cambios significativos en la acidez, el pH y el contenido de sólidos solubles en frutillas almacenadas a 6°C durante 8 días. En cuanto a la calidad funcional, estas dosis no produjeron cambios significativos en el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante hidrofílica en relación a los frutos no tratados. Sin embargo, las muestras tratadas con una dosis de 23,9 J/cm<sup>2</sup> presentaron durante el almacenamiento un contenido de antocianinas significativamente menor que las muestras control.

Como se mencionó anteriormente, el efecto de la dosis de LP sobre el desarrollo fúngico, el color y las propiedades mecánicas fue evaluado en estudios previos (Duarte-Molina, 2015; Duarte-Molina y col., 2016). Los tratamientos redujeron la incidencia de hongos entre 30-35% al día 8 del almacenamiento, no presentándose diferencias significativas entre las dosis de 11,9 J/cm<sup>2</sup> y 23,9 J/cm<sup>2</sup>. Además, a diferencia de las muestras control que presentaron un marcado ablandamiento durante el almacenamiento, en los frutos tratados con una dosis de 11,9 J/cm<sup>2</sup> no se observaron variaciones significativas en los parámetros mecánicos luego de 8 días de almacenamiento, mientras que en los frutos expuestos a una dosis de 23,9 J/cm<sup>2</sup> la firmeza fue incluso mayor que al día 0. Por lo tanto, la aplicación de pulsos contribuyó en retardar el ablandamiento de los frutos durante el almacenamiento, uno de los principales procesos de deterioro que limitan la vida útil de frutillas. Por otro lado, el color de los frutos no se vio afectado significativamente por los tratamientos aplicados,

a pesar de observarse un menor incremento en el contenido de antocianinas durante el almacenamiento en las frutillas tratadas con una dosis de  $23,9 \text{ J/m}^2$ .

Teniendo en cuenta el efecto de la dosis sobre los atributos de calidad analizados se concluye que tanto los tratamientos con dosis de LP de  $11,9 \text{ J/cm}^2$  como de  $23,9 \text{ J/cm}^2$  podrían emplearse para reducir el desarrollo fúngico y mantener la firmeza de frutillas durante el almacenamiento refrigerado, sin impactar negativamente en la calidad funcional y las propiedades ópticas. En el caso de la dosis de  $23,9 \text{ J/cm}^2$ , a pesar de inducir una disminución de la biosíntesis de antocianinas durante el almacenamiento, su mayor impacto sobre el incremento de la firmeza sería un efecto muy importante para considerarla como una dosis útil para extender la vida útil de estos frutos.

## 5. CONCLUSIONES



## **5. CONCLUSIONES**

- Los tratamientos de luz pulsada con dosis de  $11,9 \text{ J/cm}^2$  y  $23,9 \text{ J/cm}^2$  no produjeron cambios significativos en la acidez, el pH y el contenido de sólidos solubles en frutillas almacenadas 8 días a  $6^\circ\text{C}$ .
- Los frutos tratados con la dosis de  $11,9 \text{ J/cm}^2$  no presentaron variaciones significativas en el contenido de antocianinas en comparación con los frutos no tratados. Sin embargo, el tratamiento de  $23,9 \text{ J/cm}^2$  redujo la acumulación de antocianinas durante el almacenamiento refrigerado, lo que podría estar asociado a un retraso en la maduración inducido por la luz pulsada.
- El contenido de fenoles totales libres y la actividad antioxidante hidrofílica no se vieron afectados por los tratamientos de luz pulsada.
- Para la variedad de frutilla estudiada en este trabajo se puede concluir, teniendo también en consideración resultados de estudios previos, que tanto los tratamientos con dosis de LP de  $11,9 \text{ J/cm}^2$  como de  $23,9 \text{ J/cm}^2$  podrían ser aplicados para reducir el desarrollo fúngico y mantener la firmeza de frutillas durante el almacenamiento refrigerado sin impactar negativamente en la calidad funcional y las propiedades ópticas. En el caso de la dosis de  $23,9 \text{ J/cm}^2$ , a pesar de inducir una disminución de la biosíntesis de antocianinas durante el almacenamiento, su impacto positivo sobre el incremento de la firmeza sería un efecto importante para considerarla como una dosis factible a aplicar para prolongar la vida poscosecha de estos frutos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA





Aaby, K., Skrede, G., & Wrolstad, R. E. (2005). Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4032–4040.

Abdel-Aal, E., & Hucl, P. (2003). Composition and stability of anthocyanins in bluegrained heat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2174-2180.

Artajo, L.S. (2006). Phenolic Compounds: Their role during olive oil extraction and in flaxseed transfer and antioxidant function. Tesis doctoral. University of Lleida, España.

Adom, K., & Liu, R. (2005). Rapid peroxy radical scavenging capacity (PSC) assay for assessing both hydrophilic and lipophilic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6572-6580.

Aguiló-Aguayo., I., Charles., F., Renard., C., Page. D., & Carlin., F. (2013). Pulsed light effects on surface decontamination, physical qualities and nutritional composition of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 29–36.

Anderson, J. G., Rowan, N. J., MacGregor, S. J., Fouracre, R. A., & Farish, O. (2000). Inactivation of food-borne enteropathogenic bacteria and spoilage fungi using pulsed-light. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28, 83-88.

Apak, R., Güclü, K., Ozyürek, M., & Karademir, S. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric iron reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.

Badui, S. (2006). Química de los alimentos. Ed. Alhambra Mexicana.

Belitz, H.D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*, 4th revised and extended ed., Editorial Springer, Alemania. Pg 867.

Benzie, I.F., Chung, W.Y., & Strain, J.J. (1999). Antioxidant (reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration. *Journal of Nutrition on Biochemistry*, 10, 146-150.

Boeing, J.S., Oliveira-Barizão, E., Costa e Silva, B., Fernandes-Montanher, P., Cinque-Almeida, V. & Visentainer, J.V. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8, 1-9.

Bolton, J.R., & Linden, K.G. (2003). Standardization of methods for fluence (UV dose) determination in bench-scale UV experiments. *Journal of Environmental Engineering*, 129, 209–215.

Boluda, C., Duque, B., & Aragon, Z. (2005). Lignanos: estructura y funciones en las plantas. *Revista de fitoterapia*, 5, 55-68.

Caillet, S., Yu, H., Lessard, S., Lamoureux, G., Ajdukovic, D., & Lacroix, M. (2007) Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. *Food Chemistry*, 100, 542-552.

Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure–activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. 22, 749-760

Cassidy, A., Bryan, H., Lamuela-Raventos, R. (2000). Review: Isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80,1044-1062.

Castañeda, A., Pacheco, M., Páez, M., Rodríguez, J., & Galan, C. (2009). Chemical studies of anthocyanins, a review. *Food Chemistry*, 113, 859-871.

Charles, F., Vidal, V., Olive, F., Filgueiras, H. & Sallanon, H. (2013). Pulsed light treatment as new method to maintain physical and nutritional quality of fresh-cut mangoes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 18, 190-195.

Chumark, P., Khunawat, P., Sanvarinda, Y., Phornchirasilp, S., Morales, N.P., & Phivthong-ngam, L. (2008) The in vitro and ex-vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. Leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 439-446.

Cordenunsi, B.R., Genovese, M.I., Oliveira do Nascimento, J.R., Hassimotto, N.M.A., Dos Santos, R.J., & Lajolo, F.M. (2005). Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. *Food Chemistry*, 91, 113-121.

Cote, S., Rodonia, L., Micelib, E., Concellón, A., Civello, P., & Vicente, A. (2013). Effect of radiation intensity on the outcome of postharvest UV-C treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 83, 83–89.

D'Archivio M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini C., & Masella R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanità*, 43, 348–361.

Dai, J. & Mumper, R. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.

Debnath, S., & Teixeira, J.A. (2007). Strawberry culture in vitro: applications in genetic transformation and biotechnology. *Fruit, Vegetable & Cereal Science Biotechnology*, 1, 1-12.

De Ell, J., Toivonen, P., Cornut, F., Roger, C., & Vigneault, C. (2006). Addition of sorbitol with  $\text{KMnO}_4$  improves broccoli quality retention in modified atmosphere packages. *Journal of Food Quality*, 29, 65-75.

De Ell, J. (2011). Fresh Market Quality Program Lead/OMAFRA.Ministry of agriculture food & rural affairs.Ontario. 2011. En: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/hort/news/hortmatt/2006/13hrt06a4.htm>. Acceso en marzo de 2014.

De la Torre, K. (2007). Efecto del consumo de aceite de oliva sobre la composición de las lipoproteínas de baja densidad en individuos de diferentes países europeos. Tesis, Universidad de Barcelona, España.

Delgado, F., Jiménez, A., & Paredes, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains, characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Food Science and Nutrition*, 40, 173-289.

Demchak, K., Harper J., Kime, L., & Lantz, W. (2011). Strawberry production.College of Agricultural Sciences Agricultural Research and Cooperative Extension.2011. In: <http://agalternatives.aers.psu.edu/Publications/Strawberries.pdf>. Acceso en abril de 2016.

Drago-Serrano, M.E., López-López, M. & Saínz-Espuñez, T. (2006). Componentes bioactivos de los alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37, 58-68.

Duarte- Molina, F. (2015). Efecto de la luz pulsada de alta intensidad en la calidad de frutos de *Fragaria x ananassa*Duch. Tesis de Maestría, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Duarte-Molina, F., Gómez, P.L., Castro, M.A. & Alzamora, S. M. (2016). Storage quality of strawberry fruit treated by pulsed light: fungal decay, water loss and mechanical properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 34, 267-274.

Elmnasser, N., Guillou, S., Leroi, F., Orange, N., Bakhrouf, A., & Federighi, M. (2007). Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: A review. *Journal of Microbiology*, 53, 813–821.

Fan, L, Dubé, C., Fang, C., Roussel, D., Charles, M., Desjardins, Y., & Khanizadeh, S. (2012). Effect of production systems on phenolic composition and oxygen radical absorbance capacity of 'Orléans' strawberry. *LWT - Food Science and Technology*, 45, 241-245.

Farrell, H.P., Garvey, M., Cormican, M., Laffey, J.G., & Rowan, N.J. (2010). Investigation of critical inter-related factors affecting the efficacy of pulsed light for inactivating clinically relevant bacterial pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1494–1508.

FDA (1996). Code of Federal Regulations (21CFR179.41)

Ferrario, M., Alzamora, S.M., & Guerrero, S. (2013). Inactivation kinetics of some microorganisms in apple, melon, orange and strawberry juices by high intensity light pulses. *Journal of Food Engineering*, 118, 302-311.

Ferrario, M., Guerrero, S., & Alzamora, S.M. (2014). Study of pulsed light-induced damage on *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice by flow cytometry and transmission electron microscopy. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1001-1011.

Ferreira, R. M., Viña, S. Z., Mugridge, A., & Chaves, A. R. (2007). Growth and ripening season effects on antioxidant capacity of strawberry cultivar Selva. *Scientia Horticulturae*, 112, 27–32.

Fine, A. (2000). Oligomeric proanthocyanidin complexes: History, structure, and phytopharmaceutical applications. *Alternative Medicine Reviews*, 55,144-151.

Fine, F. & Gervais, P. (2004). Efficiency of pulsed light UV light for microbial decontamination of food powders. *Journal of Food Protection*, 67, 787-792.

Folin, O., & Denis, W. (1915).A colorimetric method for the determination of phenol (and derivatives) in urine. *Journal of Biological Chemistry*, 22, 305–308.

Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927).On tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73, 627–650.

Fuleki, T., & Francis, F. J. (1968a).Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *Journal of Food Science*, 33, 72–77.

Fuleki, T., & Francis, F. J. (1968b).Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *Journal of Food Science*, 33, 78–83.

Galvano, F., La Fauci, L., Lazzarino, G., Fogliano, V., Ritieni, A., Ciappellano, S., Battistini, N., Tavazzi, B., & Galvano, G. (2004). Cyanidins: metabolism and biological properties. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 2-11.

García-Viguera, C., Zafrilla, P., & Tomás-Barberán, F. T. (1998).The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruits. *Phytochemical Analysis*, 9, 274–277.

Gardner, D. W. M., & Shama, G. (2000).Modeling UV-induced inactivation of microorganisms on surfaces. *Journal of Food Protection*, 63, 63-70.

Gheldof, N. & Engeseth, N.J. (2002). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3050-3055.

Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J., Quiles, J., Mezzetti, B. & Battino, M. (2012). The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28, 9-19.

Giovannoni, J. (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 725-749.

Giusti, M.M., Rodriguez-Saona, L.E. & Wrolstad, R.E. (1999). Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4631–4637.

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. En: Wrolstad, R. E. (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, New York, EEUU.

Gómez, P. L., Salvatori, D. M., García-Loredo, A., & Alzamora, S. M. (2012). Pulsed Light Treatment of Cut Apple: Dose Effect on Color, Structure, and Microbiological Stability. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2311-2322.

Gómez-López, V.M., Devlieghere, F., Bonduelle, V., & Debevere, J. (2005a). Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 79–89.

Gómez-López, V. M., Devlieghere, F., Bonduelle, V., & Debevere, J. (2005b). Factors affecting the inactivation of microorganisms by intense light pulses. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 460-470.

Gómez-López, V., Ragaert, P., Debevere J., & Devlieghere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 464-473.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology & Medicine*. 18, 125–126.

Helbig, J. (2002). Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry. *BioControl*, 47, 85–99.

Hobbs, B.C., & Roberts, D. (1987). Food poisoning and food-borne infection. En B.C. Hobbs, & D. Roberts (Eds.), *Food Poisoning and Food Hygiene* (pp. 3–120). London: E. Arnold.

Hoornstra, E., de Jong, G., & Notermans, S. (2002). Preservation of vegetables by light. En *Conference frontiers in microbial fermentation and preservation* (pp. 75–77).

Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., & Prior, R., (2001). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4437-4444.

Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., & Deemer, E. (2002a) Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1815-1821.



Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856.

Jeffery, E.H., Brown, A.F., Kurilich, A.C., Keck, A.S., Matusheshi, N., Klein, B.P., & Juvik, J.A. (2003). Variation in content of bioactive components in broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 323-330.

Kafkas, E., Kos, M., Paydas, S., Kafkas, S. & Baser, K. (2007). Quality characteristics of strawberry genotypes at different maturation stages. *Food Chemistry*, 100, 1229–1236.

Kähkönen, M., Hopia, A. & Heinonen, M. (2001). Berryphenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4076-4082.

Kajdžanoska, M., Petreska, J. & Stefova, M. (2011). Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5272-5278.

Kalt, W., Forney, C., Martin, A., & Prior, R. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4638-4644.

Karabulut, O., Tezcani, A., Daus, A., Cohen, L., Weiss, B., & Droby, S. (2004). Control of preharvest and postharvest fruit rot in strawberry by *Metschnikowia fructicola*. *Biocontrol Science and Technology*, 14, 513–521.

Karadag, A, Ozcelik, B & Saner, S. (2008). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41–60.

Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Pang, G., Teal, A., & Biggs, T. (2011) Concentration of vitamin D2 in white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) exposed to pulsed UV light. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 976-979.

Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonamone, A., Coval, S.M., Binkoshi, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., Etherton, T.D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 113, 71-83.

Krishnamurthy, K., Demirci, A., & Irudayaraj, J.M. (2007). Inactivation of *Staphylococcus aureus* in milk using flow-through pulsed UV-light treatment system. *Journal of Food Science*, 72, 233–239.

Krishnamurthy, K., Tewari, J.C., Irudayaraj, J., & Demirci, A. (2008). Microscopic and spectroscopic evaluation of inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV light and infrared heating. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 93–104.

Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-282.

Lagunas-Solar, M.C., Piña, C., MacDonald, J.D., & Bolkan, L. (2006). Development of pulsed UV light processes for surface fungal disinfection of fresh fruits. *Journal of Food Protection*, 69, 376–384.

Liang-Yu, C., Chien-Wei, C. & Ji-Yuan L. (2013). Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chemistry*, 170, 10–15.

Lopes-da-Silva, F., Escribano-Bailón, M. T., Pérez Alonso, J. J., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (2007). Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT – Food Science and Technology*, 40, 374–382.

Luckner M. (1990). *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals*. Springer 3rd ed., Alemania. Pg. 405.

Maatta, K., Kamal-Eldin, A., & Torronen, A. (2004). Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (Family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6178–6187.

Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990). Fruit Phenolics. CRC Press, Boca Raton, EEUU.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., & Clark, D.P. (2009). *Brock Biology of the microorganisms*. CA: Pearson Education S.A. 12th ed, San Francisco, EEUU.

MacDonald-Wicks, L., Wood, L. & Garg, M. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046-2056.

Magalhaes, L., Segundo, M., Reis, S. & Lima, J. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613, 1-19.

Mandave, P., Pawarb, P., Ranjekara, P., Mantric, N., Kuvalekar, A. (2014). Comprehensive evaluation of in vitro antioxidant activity, total phenols and chemical profiles of two commercially important strawberry varieties. *Scientia Horticulturae*, 172, 124–134.

McDonald, K.F., Curry, R.D., Clevenger, T.E., Unklesbay, K., Eisenstark, A., & Golden, J. (2000). A comparison of pulsed & continuous ultraviolet light sources for the decontamination of surfaces. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28, 1581– 1587.

Medrano, F. (2005). Capacidad antioxidante, contenido de vitamina "C" y carotenoides en plantas comestibles silvestres del departamento de chiquimula. Tesina, Universidad de San Carlos, Guatemala.

- Meyers, K., Waltkins, C., Pritts, M. & Liu, R.H. (2003).Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Food Chemistry*, 51, 6887-6892.
- Miller, N., Rice-Evans, C., Davies, M., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993).A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412.
- Moing, A., Renaud, C., Gaudillere, M., Raymond, P., Roudeillac, P., & Denoyes-Ruthan, B. (2001). Biochemical changes during fruit development of four strawberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126, 394–403.
- Montero, T., Molló, E., Esteban, R. & López-Andréu, F. (1996). Quality attributes of strawberry during ripening. *Scientia Horticulturae*, 65, 239-250.
- Moore, J., Yin, J., & Yu L. (2006).Novel fluorometric assay for hydroxyl radical scavenging capacity (HOSC) estimation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 617-626.
- Naguib, Y.M.A. (2000). Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1150-1154.
- Navarro, J. (2001). Guía de las plantas cultivadas: identificación y cultivo. Ediciones *Mundi-Prensa*, Madrid, España.
- Nunes, M., Brecht, J. K., Morais, A.M.M.B., & Sargent, S.A. (2006). Physicochemical changes during strawberry development in the field compared with those that occur in harvested fruit during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 180–190.
- Oancea, S., Grosu,C., Ketney, O. & Stoia, M. (2013) Conventional and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from blackberry and sweet cherry cultivars. *Acta Chimica Slovenica*, 60, 383-389.

- Oancea, S., Stoia, M., & Coman, D. (2012). Effects of extraction conditions on bioactive anthocyanin content of *Vaccinium corymbosum*. En *The perspective of food Applications. Procedia Engineering*, 42, 489 – 495.
- Oms-Oliu, G., Martín-Belloso, O., & Soliva-Fortuny, R. (2009). Pulsed light treatments for food preservation. A review. *Food and Bioprocess Technology*, 3(1), 13–23.
- Ornelas-Paz, J. J., Yahia, E. M., Ramírez-Bustamante, N., Pérez-Martinez, J. D., Escalante-Minakata, M. P. & Ibarra-Junquera, V. (2013). Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chemistry*, 138, 372–381.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.
- Ozawa, T., Lillas, T. & Haslam, E. (1987). Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry*, 26, 2937-2942.
- Panico, L. (2005). Instantaneous sterilization with pulsed UV Light. En *Workshop: Emerging food processing technologies. USDA, CSREES* (pp. 26–27), Washington, EEUU.
- Pataro, G., Sinik, M., Capitoli, M.M., Donsi, G. & Ferrari, G. (2015). The influence of post-harvest UV-C and pulsed light treatments on quality and antioxidant properties of tomato fruits during storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 30, 103-111.
- Peng, G., & Sutton, J. (1991). Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 13, 247–257.

Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2008). Anti-oxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. *International Journal of Food Science & Technology*, 48, 185-191.

Prior, R., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., & Jacob, R. (2003) Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3273-3279.

Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.

Ramos-Villaruel, A.Y., Martí'n-Belloso, O., & Soliva-Fortuny, R. (2011). Bacterial inactivation and quality changes in fresh-cut avocado treated with intense light pulses. *European Food Research and Technology*, 233, 395–402.

Ramos-Villaruel, A.Y., Aron-Maitei, N., Martín-Belloso, O., & Soliva-Fortuny, R. (2012). The role of pulsed light spectral distribution in the inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on fresh-cut mushrooms. *Food Control*, 24, 206– 213.

Ramos-Villaruel, A.Y., Martín-Belloso, O. & Soliva-Fortuny, R. (2013). Pulsos de luz intensa: inactivación microbiana en frutas y hortalizas, *CyTA - Journal of Food*, 11, 234-242.

Rekika, D., Khanizadeh, S., Deschenes, M., Levasseur, A., Charles, T. & Tsao, R. (2005). Antioxidant capacity and phenolic content of selected strawberry genotypes. *HortScience*, 40, 1777-1781.

Rivero-Perez, M., Muniz, P., & Gonzalez-San José, M. (2007). Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5476-5483.

Rodov, V., Vinokur, Y. & Horev, B. (2012). Brief postharvest exposure to pulsed light stimulates coloration and anthocyanin accumulation in fig fruit (*Ficus carica*L.). *Postharvest Biology and Technology*, 68, 43–46.

Rover, M. R., & Brown, R. C. (2013). Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104, 366–371.

Rowan, N., MacGregor, S., Anderson, J., Fouracre, R., McIlvaney, L., & Farish, O. (1999). Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1312-1315.

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina (2008). [http://www.minagri.gob.ar/dimeagro/newsletters/nro37/newsletter\\_frutilla\\_0102.php](http://www.minagri.gob.ar/dimeagro/newsletters/nro37/newsletter_frutilla_0102.php). Acceso marzo de 2015.

Shamaila, M., Baumann, T.E., Eaton, G.W., Powrie, W.D. & Skura, B.J. (1992). Quality attributes of strawberry cultivars grown in British Columbia. *Journal of Food Science*, 57, 696-699.

Shin, Y., Liu, R.H., Nock, J., Holliday, D. & Waltkins, C. (2007). Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 349-357.

Sies, H. (1997). "Oxidative stress: Oxidants and antioxidants". *Experimental physiology*, 82 (2), 291–295.

Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

Slinkard, K., & Singleton, V.L. (1977). Total phenol analyses: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.

Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J., & Dommese, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113, 1226–1233.

Takeshita, K., Yamanaka, H., Sameshima, T., Fukunaga, S., Isobe, S., Arihara, K., & Itoh, M. (2003). Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 151–158.

Velázquez M, Prieto B y R Contretas. (2004). El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias*, 36-43.

Vázquez-Flores, A., Alvarez-Parrilla, E., López-Díaz, J.A., Wall-Medrano, A. & De la Rosa, L. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia Chihuahua*, 7, 84-93.

Wang, H., Cao, G. & Prior, R.L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 701-705.

Wang, H., Cao, G. & Prior, R. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal and Agricultural Food Chemistry*, 45, 304-9.



Wang, S. Y., & Zheng, W. (2001). Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4977-4982.

Wang, S., Bunce, J. A., & Maas, J. L. (2003). Elevated carbon dioxide increases contents of antioxidant compounds in field-grown strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4315-4320.

Wang, S., & Millner, P. (2009). Effect of different cultural systems on antioxidant capacity, phenolic content, and fruit quality of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), 9651-9657.

Wang, T., MacGregor, S.J., Anderson, J.G., & Woolsey, G.A. (2005). Pulsed ultraviolet inactivation spectrum of *Escherichia coli*. *Water Research*, 39, 2921–2925.

Waterhouse, A. (2001). Folin–Ciocalteu micro method for total phenol in wine. (<<http://www.waterhouse.ucdavis.edu/phenol/foLinmicro.htm>>). Acceso en marzo de 2015.

Wekhof, A. (2000). Disinfection with flash lamps PDA. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 54, 264-276.

Wekhof, A. (2001). Pulsed UV disintegration (PUVD): A new sterilisation mechanism for packaging and broad medical hospital applications. En Libro de Proceeding *The First International Conference on Ultraviolet Technologies* (pp. 1–15), Washington, EEUU.

Welch, C., Wu, Q., & Simon, J. (2008). Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Current Analytical Chemistry*, 4, 75-101.

Wisniewski, M. & Wilson, C. (1992). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *HortScience*, 27, 94–98.

Wolfe, K.L. & Liu, R.H. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods and dietary supplements. *Journal Agricultural Food and Chemistry*, 55, 8896-8907.

Wright, J., Johnson E, & DiLabio G. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 1173–1183.

Woodling, S.E., & Moraru, C.I. (2007). Effect of spectral range in surface inactivation of *Listeria innocua* using broad-spectrum pulsed light. *Journal of Food Protection*, 70, 909–916.

Wu, X., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., & Prior, R. (2004) Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 4026-4037.

Wuytack, E., Phuong, L., Aertsen, A., Reyns, K., Marquenie, D., & De-Ketelaere, B. (2003). Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium* by heat and by different nonthermal treatments. *Journal of Food Protection*, 66, 1–37.