

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de Magister en
Ciencia y Tecnología de Alimentos

**DESINFECCIÓN DE FRUTILLAS Y ZARZAMORAS FRESCAS
POR NEBULIZACIÓN CON ÁCIDO PERACÉTICO**

Bioqca. Maria Celia Vaccari

Director de Tesis: Mg. María Elida Pirovani

Co-Director de Tesis: Mg. Andrea M. Piagentini

Instituto de Tecnología de Alimentos. Facultad de Ingeniería Química

2017

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	ii
TABLAS	v
FIGURAS	vii
RESUMEN	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades sobre frutas finas	1
1.2. Producción de berries en Argentina	2
1.3. Características generales de las frutillas	5
1.4. Características generales de las zarzamoras	6
1.5. Microbiología de las frutas	8
1.5.1. Microbiota inicial.....	9
1.5.2. Alteración y Enfermedades de las frutas.....	10
1.5.3. Riesgos microbiológicos asociados al consumo de frutas	11
1.5.4. Epidemiología de los brotes causados por frutas	12
1.5.5. Agentes patógenos causantes de brotes alimentarios asociados al consumo de berries	14
1.6. Aspectos tecnológicos en cosecha y postcosecha de frutillas y zarzamoras	16
1.6.1 Recolección y cosecha.....	16
1.6.2 Manejo postcosecha	17
1.7. Tratamientos de desinfección de frutas	19
2. OBJETIVOS	25
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Materia prima	26
3.2 Ensayos de Desinfección	26
3.2.1 Acido peracético.....	26
3.2.2 Sistema y procedimiento de nebulización	27
3.3 Determinaciones realizadas	28
3.3.1 Análisis microbiológicos de las frutas	28
3.3.1.1 Microorganismos aerobios mesófilos	28

3.3.1.2 Mohos y levaduras	28
3.3.1.3 Bacterias coliformes totales	29
3.3.2 Análisis microbiológico de <i>Escherichia coli</i> inoculada experimentalmente.....	29
3.3.3 Parámetros instrumentales de color	29
3.4 Experiencias preliminares.....	30
3.4.1 Estudio de la materia prima frutilla y zarzamora	30
3.4.2 Determinación del dominio experimental	31
3.5- Ensayos de desinfección por nebulización con ácido peracético de frutillas y zarzamoras frescas enteras.....	35
3.5.1 Diseño experimental.....	35
3.5.2 Tratamiento de desinfección	37
3.5.3 Análisis microbiológicos	39
3.5.4 Determinación de los parámetros de color.....	39
3.6 Análisis estadístico.....	39
3.7 Optimización del tratamiento de desinfección.....	40
3.8 Validación de los modelos propuestos de desinfección en las condiciones establecidas a partir de la optimización de las respuestas.	41
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1 Carga microbiana inicial de frutillas frescas	43
4.2 Efecto de la nebulización de ácido peracético sobre la reducción de la carga microbiana de frutillas	44
4.2.1 Efecto de la nebulización de ácido peracético sobre la reducción de la carga microbiana de frutillas en el día de aplicación (Día 0).	44
4.2.2 Efecto de la nebulización de ácido peracético sobre la reducción de la carga microbiana de frutilla luego de 7 días de almacenamiento a 2°C (Día 7).	52
4.3 Efecto de la nebulización de APA sobre los parámetros de color de la frutilla.....	59
4.3.1 Efecto de la nebulización de APA sobre los parámetros de color de la frutilla en el día de aplicación (Día 0).....	59
4.3.2 Efecto de la nebulización de APA sobre los parámetros de color en las frutillas luego de 7 días de almacenamiento a 2°C (Día 7)	66
4.4 Efecto de la nebulización de APA sobre la reducción de <i>E.coli</i> inoculada en frutillas en el día de la aplicación (Día 0) y luego de 7 días de almacenamiento a 2°C (Día 7)...	73
4.5 Carga microbiana inicial de zarzamoras frescas	81
4.6 Efecto de la nebulización de ácido peracético sobre la reducción de la carga microbiana de zarzamoras.....	82
4.6.1 Efecto de la nebulización de ácido peracético sobre la reducción de la carga microbiana de zarzamora en el día de aplicación (Día 0)	82

4.6.2 Efecto de la nebulización de ácido peracético sobre la reducción de la carga microbiana de zarzamora luego de 7 días de almacenamiento a 2°C (Día 7).....	88
4.7 Efecto de la nebulización de APA sobre los parámetros de color de la zarzamora	93
4.7.1 Efecto de la nebulización de APA sobre los parámetros de color de la zarzamora en el día de aplicación (Día 0).	93
4.7.2 Efecto de la nebulización de APA sobre los parámetros de color en las zarzamosas luego de 7 días de almacenamiento a 2°C (Día 7.).....	97
4.8 Efecto de la nebulización de APA sobre la reducción de E.coli inoculada en zarzamosas en el día de la aplicación (Día 0) y luego de 7 días de almacenamiento a 2°C (Día 7)	101
4.9 Optimización del modelo de desinfección.....	104
4.10 Validación de los modelos propuestos de desinfección en las condiciones establecidas a partir de la optimización de las múltiples respuestas.	107
5. CONCLUSIONES.....	109
6. BIBLIOGRAFÍA.....	114
7. ANEXO	127

TABLAS

Tabla 1.1.Regiones y provincias cultivadas con *berries* en la Argentina.

Tabla 1.2.Valores de pH correspondientes a frutas frescas.

Tabla 3.1. Reducción microbiológica de frutillas nebulizadas con APA en ensayos preliminares de desinfección.

Tabla 3.2. Reducción microbiológica de frutillas nebulizadas con APA en ensayos preliminares de desinfección.

Tabla 3.3. Reducción microbiológica de *E.coli* en frutillas nebulizadas con APA en ensayos preliminares de desinfección.

Tabla 3.4. Variables independientes y niveles del diseño experimental central compuesto

Tabla 4.1. Carga microbiana inicial de frutillas frescas.

Tabla 4.2. Resultados experimentales de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT₀) y de mohos y levaduras (RML₀) de frutillas nebulizadas con APA.

Tabla 4.3. Análisis ANOVA de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT₀) y de mohos y levaduras (RML₀) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0.

Tabla 4.4. Resultados experimentales de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT₇) y de mohos y levaduras (RML₇) de frutillas nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C

Tabla 4.5. Análisis ANOVA de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT₇) y de mohos y levaduras (RML₇) de frutillas nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C.

Tabla 4.6. Resultados experimentales de los cambios en los parámetros de color (δL_0^* δa_0^* δb_0^* δC^*_{ab0} y δh_{ab0}) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0.

Tabla 4.7. Análisis ANOVA de los cambios en los parámetros de color (δL_0^* ; δa_0^* ; δb_0^* ; δC^*_{ab0} ; δh_{ab0}) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0.

Tabla 4.8. Resultados experimentales de los cambios en los parámetros de color (δL_7^* δa_7^* δb_7^* δC^*_{ab7} δh_{ab7}) de frutillas nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C.

Tabla 4.9. Análisis ANOVA de los cambios en los parámetros de color (δL_7^* δa_7^* δb_7^* δC^*_{ab7} y δh_{ab7}) de frutillas nebulizadas después de 7 días de conservación a 2°C.

Tabla 4.10. Resultados experimentales de la reducción de *E.coli*(REC₀ y REC₇)en frutillas nebulizadas con APA en el día 0 y después de 7 días de conservación a 2°C

Tabla 4.11. Análisis ANOVA de la reducción de *E.coli*(REC₀) en frutillas nebulizadas con APA en el día 0.

Tabla 4.12 Carga microbiana inicial de zarzamoras frescas.

Tabla 4.13. Resultados experimentales de la reducción microorganismos mesófilos totales (AMT₀)y de mohos y levaduras (RML₀) de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0.

Tabla 4.14. Análisis ANOVA de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT₀) y de mohos y levaduras (RML₀) de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0.

Tabla 4.15. Resultados experimentales de la reducción de microorganismos mesófilos totales (RAMT₇) y de mohos y levaduras (RML₇) de zarzamoras nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C.

Tabla 4.16. Análisis ANOVA de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT₇) y de mohos y levaduras (RML₇) de zarzamoras nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C.

Tabla 4.17. Resultados experimentales de los cambios en los parámetros de color (δL_0^* , δa_0^* , δb_0^* , δC_{ab0}^* y δh_0^*) de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0

Tabla 4.18. Análisis ANOVA de los cambios en los parámetros de color (δL_0^* ; δa_0^* ; δb_0^* ; δC_{ab0}^* ; δh_{ab0}^*) de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0

Tabla 4.19. Resultados experimentales de los cambios en los parámetros de color (δL_7^* , δa_7^* , δb_7^* , δC_{ab7}^* , δh_{ab7}^*) de zarzamoras nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C

Tabla 4.20. Análisis ANOVA de los cambios en los parámetros de color (δL_0^* , δa_0^* , δb_7^* , δC_{ab0}^* y δh_{ab7}^*) de zarzamoras nebulizadas después de 7 días de conservación a 2°C

Tabla 4.21. Valores promedios de las corridas experimentales de los parámetros de color de las muestras control y de las muestras tratadas en el día 0 y día 7.

Tabla 4.22. Recuentos microbiológicos de *E.coli* en zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0 y luego de 7 días de conservación a 2°C

Tabla 4.23. Rangos obtenidos y criterios utilizados en la optimización de la desinfección de frutillas usando la función de Derringer.

Tabla 4.24. Rangos obtenidos y criterios utilizados en la optimización de la desinfección de zarzamoras usando la función de Derringer.

Tabla 4.25. Valor de deseabilidad y valores óptimos de concentración de APA y tiempo de tratamiento para frutillas.

Tabla 4.26. Valor de deseabilidad y valores óptimos de concentración de APA y tiempo de tratamiento para zarzamoras.

Tabla 4.27. Valores de las respuestas predichas y experimentales en la optimización de la desinfección de frutillas.

FIGURAS

Figura 3.1. Sistema de nebulización empleado en los tratamientos de desinfección: Unidad generadora de aerosol y Cámara de nebulización

Figura 3.2. Etapas de procesamiento y análisis realizados en las frutas.

Figura 4.1. Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT₀) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0.

Figura 4.2. Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para la reducción de mohos y levaduras (RML₀) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0.

Figura 4.3. Superficie de respuesta y gráfico de contorno para la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT₀) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0.

Figura 4.4. Superficie de respuestas y gráfico de contorno para la reducción de mohos y levaduras (RML₀) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0.

Figura 4.5. Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT₇) de frutillas nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C.

Figura 4.6. Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para la reducción de mohos y levaduras (RML₇) de frutillas nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C.

Figura 4.7. Superficie de respuesta y gráfico de contorno para la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT₇) de frutillas nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C.

Figura 4.8. Superficie de respuesta y gráfico de contorno para la reducción de mohos y levaduras (RML₇) de frutillas nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C.

Figura 4.9. Efectos estimados y efectos principales de las variables independientes sobre las respuestas cambios en los parámetros de color (δL_0^* , δa_0^* , δb_0^* y δC_{ab0}^*) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0.

Figura 4.10. Superficie de respuestas y gráficos de contorno para los cambios en los parámetros de color (δL_0^* , δa_0^* , δb_0^* y δC_{ab0}^*) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0.

Figura 4.11. Efectos estimados y efectos principales de las variables independientes sobre las respuestas cambios en los parámetros de color (δL_7^* , δa_7^* , δb_7^* y δC_{ab7}^*) de frutillas nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C.

Figura 4.12. Superficie de respuestas y gráficos de contorno para los cambios en los parámetros de color (δL_7^* , δa_7^* , δb_7^* y δC_{ab7}^*) de frutillas nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C.

Figura 4.13. Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para la reducción de *E.coli* (REC₀) inoculada experimentalmente en frutillas nebulizadas con APA en el día 0.

Figura 4.14. Superficie de respuesta y gráfico de contorno para la reducción de *E.coli* (REC₀) inoculada experimentalmente en frutillas nebulizadas con APA en el día 0.

Figura 4.15. Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para las respuestas la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT₀) de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0.

Figura 4.16. Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para las respuestas la reducción de mohos y levaduras (RML₀) de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0.

Figura 4.17. Superficie de respuestas y gráfico de contorno para la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT₀) de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0.

Figura 4.18. Superficie de respuestas y gráfico de contorno para la reducción de mohos y levaduras (RML₀) de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0.

Figura 4.19. Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para las respuestas de la reducción de mohos y levaduras (RML₇) de zarzamoras nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C.

Figura 4.20. Superficie de respuestas y gráfico de contorno para la reducción de mohos y levaduras (RML₇) de zarzamoras nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C.

Figura 4.21. Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para el cambio en el parámetro de color δb_0^* de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0.

Figura 4.22. Superficie de respuesta y gráfico de contornos para el cambio en el parámetro de color δb_0^* de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0.

Figura 4.23. Recuento microbiológico de *E.coli* en zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0 y luego de 7 días de conservación a 2°C.

Figura 4.24. Gráfico de deseabilidad obtenido para la optimización de la desinfección de frutillas.

Figura 4.25. Gráfico de deseabilidad obtenido para la optimización de la desinfección de zarzamoras.

Figura 7.1. Gráficos de diagnóstico para los modelos RAMT₀ y RML₀ de frutillas nebulizadas con ácido peracético en el día 0.

Figura 7.2. Gráficos de diagnóstico para los modelos RAMT₇ y RML₇ para frutillas nebulizadas con ácido peracético después de 7 días de conservación a 2°C.

Figura 7.3. Gráficos de diagnóstico para los modelos cambio en los parámetros de color de frutillas nebulizadas con ácido peracético en el día 0.

Figura 7.4. Gráficos de diagnóstico para los modelos cambio en los parámetros de color de las frutillas luego de 7 días de conservación a 2°C.

Figura 7.5. Gráficos de diagnóstico para los modelos REC₀ y REC₇ para frutillas nebulizadas con ácido peracético en el día 0 y luego de 7 días de conservación a 2°C.

Figura 7.6. Gráficos de diagnóstico para los modelos RAMT₀ y RML₀ para zarzamoras nebulizadas con ácido peracético en el día 0.

Figura 7.7. Gráficos de diagnóstico para los modelos RAMT₇ y RML₇ para zarzamoras nebulizadas con ácido peracético después de 7 días de conservación a 2°C.

Figura 7.8. Gráficos de diagnóstico para los modelos cambio en los parámetros de color de zarzamoras nebulizadas con ácido peracético en el día 0.

Figura 7.9. Gráficos de diagnóstico para los modelos cambio en los parámetros de color de zarzamoras nebulizadas con ácido peracético luego de 7 días de conservación a 2°C.

RESUMEN

Las frutillas y zarzamoras, como el resto de las *berries*, se caracterizan por su pequeño tamaño, sabor acidulado, atractivo color y aspecto y por ser altamente perecederas. La desinfección por nebulización (*fogging*) podría ser una tecnología de postcosecha de utilidad en estas frutas de textura delicada, para minimizar el deterioro microbiano, el daño mecánico y prolongar la vida útil. En este trabajo de tesis se propuso desarrollar aspectos básicos y aplicados de la tecnología de desinfección por nebulización con ácido peracético (APA) aplicado como tratamiento postcosecha. Para esto se evaluaron los cambios producidos, tanto sobre la carga microbiana nativa alterante y un microorganismo modelo inoculado como *Escherichia coli*, como en el color de frutillas y zarzamoras debido a la desinfección. Las evaluaciones se realizaron tanto en el día del tratamiento como luego de 7 días de almacenamiento bajo refrigeración a 2°C. Además se optimizó la operación de desinfección de frutillas y zarzamoras. La carga microbiana inicial de las frutillas estuvo comprendida entre 4,0 – 4,8 log UFC/g para microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT) y 3,7 – 4,7 log UFC/g para mohos y levaduras (ML). Los resultados mostraron que tanto el aumento en la concentración de APA como del tiempo de tratamiento reducen significativamente los niveles de AMT y de ML en frutillas. Para una concentración de 80 µL/L de APA y tiempos de 60 min se obtiene una reducción de 2 ciclos logarítmicos para ambas poblaciones microbianas. Las máximas reducciones corresponden a la máxima concentración de APA y tiempos aplicados. La desinfección fue eficaz para inhibir el crecimiento de los microorganismos estudiados luego de 7 días de almacenamiento a 2°C. Con respecto a la calidad sensorial, los parámetros de color estudiados (L^* , a^* , b^* y C^*ab) fueron afectados por las variables de proceso. La nebulización con bajas concentraciones de APA produjo frutillas más claras y luminosas y con concentraciones superiores a 20 µL/L, más oscuras. Las frutillas nebulizadas fueron menos rojas, menos amarillas y por lo

tanto, de colores menos intensos. Luego del almacenamiento, se produjo un mayor oscurecimiento y se intensificó la pérdida del color rojo. El valor inicial de *E.coli* en las frutillas inoculadas fue, en promedio, 5,5 log UFC/g. La reducción de *E.coli* predicha con el modelo obtenido para la más alta concentración del diseño (116,6 µL/L) y 30 minutos de tratamiento, fue de 4,5 órdenes logarítmicos. Luego del periodo de almacenamiento se produjo una reducción de este microorganismo hasta valores no detectables. La carga microbiana inicial de las zarzamoras estuvo comprendida entre 2,2 – 2,8 log UFC/g para AMT y 3,5 – 4,7 log UFC/g para ML. Los modelos predictivos desarrollados indican que el aumento en la concentración de APA reduce significativamente los niveles de AMT y de ML. El parámetro de color b* se vio afectado por las variables del proceso, el aumento en la concentración de APA produjo pérdida de tono azul, tanto a tiempos largos como cortos de tratamiento. El resto de los parámetros no mostraron cambios significativos, tanto en el día de aplicación como luego del almacenamiento. En las zarzamoras inoculadas, el valor inicial de *E.coli* fue, en promedio, 5,8 log UFC/g. Se obtuvo una importante reducción del microorganismo inoculado. El empleo de concentraciones de APA superiores a 20 µL/L fueron suficientes para conseguir una reducción hasta valores no detectables en el día del tratamiento y luego del almacenamiento. La optimización de múltiples respuestas permitió encontrar las condiciones óptimas de desinfección, para cada fruta, maximizando la reducción microbiológica sin cambios en el color. La aplicación de esta tecnología, sumada a la conservación en refrigeración, produce un control satisfactorio de la contaminación microbiana superficial presente en las frutillas y zarzamoras frescas con cambios mínimos en la calidad sensorial de la fruta.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades sobre frutas finas

Las “frutas finas” comprenden un conjunto de especies que se caracterizan por su pequeño tamaño en comparación con las frutas de pepita o las cítricas. Su denominación está vinculada al aspecto comercial y no al botánico de las mismas.

Se pueden clasificar en dos subgrupos, claramente identificados por sus nombres en inglés:

- *Berries*, de sabores acidulados y rápida perecibilidad: frutillas, arándanos, frambuesas rojas, moras y zarzamoras arbustivas y grosellas.
- *Cherries*, que son los de menor tamaño entre las frutas de carozo: cerezas y guindas. (Newsletter PAA, 2009)

Las *berries*, llamadas comúnmente “frutos del bosque”, constituyen una de las cadenas productivas de mayor importancia en la agroindustria alimentaria argentina, teniendo en cuenta las estructuras de producción y comercio mundial. En nuestro país, las especies de mayor relevancia económica son la frutilla, el arándano, la frambuesa y la zarzamora. (Bocchetto Dellarda *et al.* 2014).

Se caracterizan por poseer propiedades benéficas para la salud: son ricas en vitaminas, carbohidratos, fibras, azúcares y antioxidantes tales como antocianinas, ácidos fenólicos, flavonoides y ácido ascórbico. Éstos están presentes en elevadas concentraciones, otorgando características sensoriales especiales como sabor, aroma y color.

La preferencia cada vez mayor por productos alimentarios antioxidantes y de bajas calorías abre un panorama importante en la demanda de estas frutas (SAGPyA, 2006).

1.2. Producción de berries en Argentina

Las superficies cultivadas con *berries* se distribuyen en diversas áreas del país. En la Tabla 1.1 se muestran las regiones y provincias en las que se cultivan estas frutas.

*Tabla 1.1. Regiones y provincias cultivadas con berries en la Argentina**

<i>Fruta</i>	<i>Región/Provincia</i>
Arándanos 	Tucumán Entre Ríos Región andino-patagónica
Frambuesa 	Tucumán Buenos Aires Santa Fe Región andino-patagónica
Frutilla 	Tucumán Buenos Aires Entre Ríos Santa Fe
Grosella 	Tucumán Entre Ríos Región andino-patagónica
Zarzamora 	Tucumán Buenos Aires Entre Ríos Santa Fe Región andino-patagónica

*Elaboración propia a partir de SAGPyA(2006) y Bruzone (2012).

Con excepción de las frutillas que lleva varias décadas de producción, el desarrollo de las *berries* en Argentina es reciente. Sin embargo, en los últimos años se ha registrado un aumento en la superficie cultivada, producción y posicionamiento de mercado. Se trata de producciones intensivas en mano de obra y capital, que generan alta rentabilidad en pequeñas superficies y son movilizadoras de las economías locales y regionales. Además, las características de perecibilidad de estas frutas imponen requerimientos muy específicos con relación a la postcosecha y el transporte (SAGPyA, 2006).

En cuanto a la demanda de estas frutas finas, el principal canal de comercialización es la industria de alimentos, que demanda *berries* congeladas para la elaboración de dulces, mermeladas, jaleas, conservas, jugos y licores. También se incorporan a alimentos como sucede con los lácteos, golosinas, cereales en barra, bebidas sin alcohol.

Por su parte, el sector gastronómico (restaurantes, repostería, heladerías) demanda fruta fresca y congelada.

Aproximadamente el 70 % del cultivo de arándanos, frambuesas y grosellas se concentra en el territorio patagónico, ya que los valles cordilleranos cuentan con claras ventajas climáticas para el cultivo de estas frutas. La adaptación a las condiciones agroclimáticas de otras provincias como Tucumán, Santa Fe y Entre Ríos ha permitido también su producción. Estas frutas se comercializan, casi en su totalidad, como fruta congelada, mediante la tecnología del congelado individual (Bruzzone, 2012).

La **producción de frutillas** en nuestro país está concentrada en 3 provincias: Santa Fe, Buenos Aires y Tucumán, donde cada una produce aproximadamente el 30% del total nacional. La provincia de Entre Ríos aporta una pequeña proporción (Mercado Central de Buenos Aires, 2014).

En las provincias de Santa Fe y Tucumán la producción es invernal, con cosechas periódicas que abarcan desde junio hasta fines de noviembre, mientras que en la provincia de Buenos Aires se produce en distintos períodos del año. Esta amplia distribución hace que el consumidor se abastezca de frutos frescos prácticamente durante todo el año (Kirschbaum y Mamana, 2008).

En particular, en la provincia de Santa Fe, la principal y tradicional zona de producción se encuentra en la ciudad de Coronda y localidades vecinas, tales como Arocena y Desvío Arijón; en la actualidad también existe un área de siembra importante en Santa Rosa de Calchines, Arroyo Leyes y San José del Rincón. Además, las frutillas de estas áreas, son de calidad destacada y se destinan fundamentalmente al mercado de fruta fresca. Sin perjuicio de esto, un porcentaje considerable de la producción se destina a las industrias: láctea, de helados, panificadoras y producción de dulces, mermeladas y pulpas. Actualmente, tiene una importancia cada vez mayor la industria del congelado individual de frutillas (sistema IQF) como una opción que busca la conservación de las propiedades sensoriales y nutritivas de las mismas (Saccone, 2013).

La **producción de zarzamoras** se concentra principalmente en la región andino patagónica en las provincias de Chubut (El Hoyo, Lago Puelo), Río Negro (El Bolsón) y Neuquén (San Martín de los Andes). También existen plantaciones en Tucumán (Tafi Viejo), Santa Fe (Santa Isabel y Coronda), norte de Buenos Aires. (Arrecifes, Baradero, Zárate, y Tandil) y Entre Ríos (Concordia y Nogoyá) (Bruzzone, 2012).

El 90% de la producción se comercializa congelado, con destino a la industria para la incorporación en distintos productos alimenticios y elaboración de dulces y mermeladas. El consumo de fruta fresca podría mejorar mediante campañas de promoción del

consumo para estas *berries*, que aún no están incorporadas a los hábitos del consumidor argentino.

La zarzamora tiene buenas perspectivas de cultivo, porque tiene menores costos y requiere menos mano de obra que otras *berries* como el arándano, además es una planta más rústica que se adapta a diversos suelos, tanto húmedos como arenosos (Gomez Riera *et al.* 2014).

1.3. Características generales de las frutillas

Las frutillas pertenecen a la familia de las Rosáceas (*Rosaceae*) y al género *Fragaria* (del latín: fragancia).

La frutilla cultivada actualmente se reconoce como un híbrido entre las especies *Fragaria virginiana* y *Fragaria chiloensis*, y se designa como *Fragaria x ananassa* Duch. (Branzanti, 1989).

La planta de frutilla es perenne, de bajo crecimiento y presenta raíces de aspecto fibroso, una corona próxima a la superficie del suelo, tallos cortos y lignificados y hojas trifoliadas. Las flores de las variedades cultivadas son hermafroditas y se encuentran constituidas por 5 sépalos, 5 pétalos y numerosos estambres dispuestos en tres verticilos. Los frutos son carnosos, compuestos y monotalámicos. Se los considera falsos frutos dado que la mayor parte de la fracción comestible proviene del desarrollo del receptáculo, siendo los verdaderos frutos, desde el punto de vista botánico, los aquenios constituidos por la semilla y sus coberturas, que se ubican en la superficie del receptáculo expandido (Branzanti, 1989).

El receptáculo maduro mide hasta 5 cm de diámetro y presenta diferentes formas (achatada, globosa, cónica, reniforme, redondeada, alargada). En la base del fruto se

encuentra el cáliz con sépalos adherentes, libres o reflexos y de color verde, aunque en ciertos casos pueden presentar tintes rojizos (Vicente, 2004).

Para su cultivo, las plantas se ubican a una distancia aproximada de 30 cm en lomos que se cubren con una película plástica (cultivo de cobertura o “*mulching*”) para minimizar el contacto con el suelo y con ello las podredumbres, controlar malezas y reducir la pérdida de agua. Los frutos deben cosecharse una vez completada la maduración, para lograr el sabor característico ya que los azúcares simples que se acumulan provienen principalmente de la planta madre.

Como otras frutas, las frutillas pueden ser consumidas “*in natura*”, lo cual representa una ventaja para los consumidores debido a que no se producen pérdidas de nutrientes tal como sucedería si fueran procesadas (Cordenunsi *et al.* 2002).

Contienen altos niveles de vitamina C, folato y compuestos fenólicos, los cuales presentan altos efectos antioxidantes beneficiosos para el mantenimiento de la salud (Cordenunsi *et al.* 2002; Odriozola Serrano *et al.* 2010; Giampieri *et al.* 2012).

Como contrapartida, las frutillas poseen una vida postcosecha extremadamente corta, susceptibles al daño mecánico, deterioro fisiológico y microbiológico y a la pérdida de agua; si no son consumidas frescas, deben ser rápidamente procesadas en mermeladas, jugos, vinos, o congeladas para el uso en postres o yogures (Del Valle *et al.* 2004; Terefe *et al.* 2009).

1.4. Características generales de las zarzamoras

Las zarzamoras pertenecen a la familia de las rosáceas (*Rosaceae*) y al género *Rubus*. Este género comprende numerosas especies, pero 3 de ellas se destacan por la calidad de sus frutos. Del entrecruzamiento de las mismas, se originaron los híbridos y variedades actuales, que poseen características distintivas entre ellos.

La planta de zarzamora es un arbusto trepador, de crecimiento rápido que puede reproducirse vegetativamente y puede alcanzar los dos metros de altura. El tallo es recto, herbáceo y con numerosas ramas que presentan espinas. Sus hojas presentan forma ovalada con borde serrado y el revés es más claro que el anverso. Las flores son pentámeras, al igual que las de la frutilla, tienen unos 2 cm y crecen en racimos en el ápice de las ramas y van desde el blanco al rosa (Rieger, 2006).

Las zarzadoras tienen características cualitativas que las distinguen de otras frutas: son apreciadas por su color, aroma, sabor y textura suave y crujiente. El fruto es una polidrupa, lo que significa que está formado por la agregación de varias frutas pequeñas, llamadas drupeolas. Consiste en un material pulposo, carnoso o jugoso, formado de múltiples ovarios provenientes de una sola flor, que contienen una pequeña semilla en su interior. Las drupeolas están dispuestas alrededor de un núcleo central fibroso, agrupadas en un receptáculo en forma de racimo. Durante la maduración en el fruto se observa un crecimiento del receptáculo lo que origina una mayor separación de las drupeolas y menor adherencia a éste (Green, 1971). Primero son de color verde, después rojos y cuando están maduros adquieren un color negro brillante o morado.

El fruto contiene un elevado porcentaje de agua, alrededor del 80% de su peso total, por lo que tiende a ser más jugoso que carnoso. Posee azúcares, fibras, vitaminas, especialmente vitaminas A, C y E, sales de calcio, potasio, hierro, manganeso y ácidos orgánicos (málico, cítrico, láctico, succínico, oxálico y salicílico).

El alto contenido en compuestos fenólicos, principalmente antocianinas, es una característica de estas *berries*, siendo estos pigmentos los responsables del color rojo intenso a colores azules o morados (Wang *et al.* 2008). El interés en estos pigmentos se ha intensificado debido a sus efectos terapéuticos y benéficos, tales como su potencial

antioxidante, anticancerígeno, antitumoral, antiinflamatorio y antidiabético (Wang y Jiao, 2000; Halvorsen *et al.* 2002).

Cabe destacar además que, entre las frutas finas, la zarzamora es la fuente más rica en antocianinas (Connor *et al.* 2002; Wang y Jiao, 2000).

Para consumir la fruta en fresco, debe presentar ciertas características que son atribuibles a adecuadas condiciones de calidad, como por ejemplo, la presencia del brillo del fruto, textura firme y uniformidad de color de las drupeolas (Rieger, 2006).

En la industria alimentaria son utilizadas para consumo en fresco o para preparados alimenticios como mermeladas, zumos o jaleas. Debido a sus propiedades medicinales (antiinflamatorias, astringentes, antibacterianas, depurativas y diuréticas) también tiene uso terapéutico en infusiones y zumos para combatir colesterol, artritis, estreñimiento, diarrea, diabetes, cáncer, problemas bucales y de piel (Wang *et al.* 2008).

1.5. Microbiología de las frutas

La composición general promedio de las frutas incluye un alto contenido de agua (85%), y en menor proporción, carbohidratos (13%), proteínas (0,9%) y lípidos (0,5%). Como ya se comentó, poseen un considerable valor nutritivo como fuente de vitaminas, tiamina y niacina y proporcionan niveles importantes de potasio, calcio y magnesio.

La mayoría de las frutas son ricas en ácidos orgánicos (ácido cítrico, málico, tartárico, láctico, succínico, oxálico) por lo que presentan un pH bajo (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Valores de pH correspondientes a frutas frescas^(*)

<i>Fruta</i>	<i>Rango de pH</i>
Cítricos	2,2-3,4
Frambuesa	2,9-3,5
Frutilla	3,0-3,6
Manzana	2,9-3,6
Zarzamora	3,0-4,0

*Adaptado de ICMSF(2006)

Existen numerosos factores que intervienen en la microbiología de las frutas y hortalizas frescas. Así, factores externos como el ambiente en el que las plantas crecen, la localización geográfica, el tipo de riego, las especies de fauna autóctona en contacto con las frutas y verduras o el modo de cosechado juegan un papel muy importante en el tipo y cantidad de microorganismos que se van a encontrar en la superficie externa de los productos vegetales (Brackett, 1999).

Por otra parte, ciertos parámetros intrínsecos como la naturaleza del epitelio vegetal y su cubierta protectora, el pH interior de la planta y la presencia de sustancias naturales con potencial efecto antimicrobiano condicionan la cantidad y diversidad de la microbiota endógena (Burnett y Beuchat, 2001).

También influyen considerablemente en el patrón microbiano, la cosecha, el transporte, el procesamiento ulterior y la manipulación de los productos.

1.5.1. Microbiota inicial

La microbiota de hortalizas y frutas se compone de bacterias de diversos géneros, tales como *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Enterobacter* y bacterias acidolácticas, tales como *Leuconostoc* sp. y *Lactobacillus* sp.

Burnett y Beuchat (2001) y Tournas (2005) determinaron que, en general, en la microbiota asociada con la mayoría de las hortalizas, predominan las bacterias gram-negativas mientras que las levaduras y los mohos constituyen, a menudo, la mayoría de la microbiota de las frutas crudas.

Entre los mohos, los géneros más frecuentes son *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus* (Pianetti *et al.* 2008; Ramos *et al.* 2013).

Los géneros de las levaduras *Torulopsis*, *Saccharomyces* y *Candida*, se destacan como microorganismos dominantes en las frutas debido al alto contenido en azúcar que las mismas poseen (Pianetti *et al.* 2008; Caponigro *et al.* 2010; Ramos *et al.* 2013).

1.5.2. Alteración y enfermedades de las frutas

El elevado contenido en nutrientes, ya descrito, en las frutas sustenta el crecimiento de bacterias y hongos. Sin embargo, los valores de pH (Tabla 1.2) son menores que los pH que favorecen el desarrollo de las bacterias, lo que explicaría la ausencia de las mismas en la alteración incipiente de las frutas.

Debido a que los hongos, tanto levaduras como mohos, pueden desarrollar con un rango de pH más amplio, estos microorganismos se encuentran entre los agentes principales en la alteración de las frutas (ICMSF, 2006; Jay, 2009).

Por otra parte, los mohos son capaces de degradar los componentes de elevado peso molecular, tales como polisacáridos complejos estructurales y de corteza, y transformarlos en compuestos más simples que serán utilizados por otros microorganismos con menor capacidad enzimática de degradación.

Unos pocos géneros y especies fúngicas son capaces de invadir un determinado tipo de fruta y provocar pérdidas graves. Algunos son sumamente especializados y atacan

solamente a uno o dos tipos de fruta mientras que otros invaden a varios tipos de ellas (ICMSF, 2006).

La enfermedad más importante que se produce en la mayoría de las cosechas de *berries*, se debe a *Botrytis cinerea*. Esta especie produce la llamada “podredumbre gris”. Es una podredumbre blanda en frambuesas y zarzamoras, y dura y seca en frutillas. En ambos casos, el fruto se cubre con un crecimiento de moho gris característico (Samson, 2004; ICMSF, 2006).

En frutillas, las pérdidas económicas que se producen pueden ser elevadas cuando el hongo se propaga por contacto y forma nidos de fruta en descomposición. El desarrollo fúngico se ve favorecido por la humedad del ambiente (humedad relativa mayor a 80%), presencia de rocío y temperaturas óptimas de crecimiento e infección de 9 a 21°C. También puede desarrollar a 2°C, aunque con menor rapidez.

Otra especie de hongo que produce una elevada pérdida en todos los frutos de baya es *Rhizopus stolonifer*. La fruta afectada se contrae completamente exudando jugo y se cubre con un micelio algodonoso. Temperaturas mayores a 20°C y elevada humedad ambiente propician que el hongo se propague rápidamente (Samson, 2004; ICMSF, 2006).

1.5.3. Riesgos microbiológicos asociados al consumo de frutas

En general, las frutas carecen de microorganismos en la profundidad de sus tejidos y la microbiota natural superficial depende de diversos factores externos, como se mencionó anteriormente.

No obstante, durante el crecimiento de la planta, la cosecha, el transporte y el posterior procesado pueden contaminarse con patógenos de origen humano o animal.

El principal problema reside en la posible presencia de patógenos debido a contaminación de origen fecal.

En la mayoría de los casos, esta contaminación se debe a factores previos a la cosecha como puede ser el uso de agua de deficiente calidad microbiológica para riego y lavado de las frutas, el riego con aguas residuales y el uso de estiércol no tratado como abono (Cepeda Saez *et al.* 2012).

También pueden ser fuentes potenciales de contaminación el uso de herramientas contaminadas y/o la mala higiene del personal de campo.

En las frutas y hortalizas que se consumen con una mínima manipulación y/o procesamiento postcosecha, el riesgo de contaminación aumenta por contaminación cruzada en etapas posteriores a la recolección (Cepeda Saez *et al.* 2012).

Procesos como el lavado y envasado son prácticas habituales en la mayoría de las frutas y hortalizas para consumo en fresco y representan puntos críticos en lo que se refiere a contaminación microbiológica (Lynch *et al.*, 2009).

De acuerdo a diferentes estudios (FAO/OMS, 2009; EFSA, 2013) los principales microorganismos asociados a enfermedades que afectan al ser humano como resultado del consumo de productos frescos de origen no animal, entre los que se encuentran las frutas y hortalizas, son: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes*, diversos virus entéricos, como norovirus y el virus de la hepatitis A y protozoarios como *Cryptosporidium* spp. y *Cyclospora* spp.

1.5.4. Epidemiología de los brotes causados por frutas

El consumo per cápita de frutas y hortalizas en los países desarrollados ha experimentado un importante incremento en los últimos años lo que se debe, en gran parte, a las

recomendaciones de los expertos en nutrición, que aconsejan aumentar el consumo de estos alimentos por los comprobados beneficios para la salud (Lynch et al. 2009).

Por estos motivos, los consumidores perciben estos alimentos como sanos y saludables, pero a menudo no son conscientes de los riesgos derivados de la presencia de microorganismo patógenos en los mismos.

En la cadena alimentaria de las frutas y hortalizas, los puntos que implican un mayor riesgo de contaminación por agentes patógenos son el cultivo, su procesamiento inicial y la preparación gastronómica final de los mismos (Lynch *et al.*, 2009).

Las bacterias están adaptadas para sobrevivir en el intestino de los animales y también son capaces de sobrevivir y proliferar con cierta facilidad en algunos tipos de plantas. Algunos patógenos pueden persistir durante semanas en la superficie vegetal, como por ejemplo las bacterias del género *Salmonella* (Lynch *et al.*, 2009). Hirneisen *et al.* (2012), sostienen que algunas bacterias y algunos virus, pueden penetrar por la raíz y localizarse en el interior de las plantas, no siendo afectados por el lavado y/o la desinfección superficial.

Los aspectos a considerar en la epidemiología de los brotes alimentarios causados por productos vegetales son:

- temperatura de almacenamiento inadecuada, especialmente durante el transporte desde el lugar de origen al de consumo, que favorece no sólo el deterioro de los productos, sino también la proliferación de las posibles bacterias patógenas.
- el lavado y/o desinfección superficial poco eficaz. Como norma general, el lavado de frutas y hortalizas reduce la contaminación microbiana superficial y de este modo prolonga la vida útil de las mismas y potencia su seguridad alimentaria. No obstante, debe tenerse en cuenta que el lavado sólo reduce el número de

microorganismos presentes pero no asegura la total eliminación de los mismos, entre los que podrían estar algunos patógenos (Burnett y Beuchat, 2001).

- El hecho de que este tipo de alimentos habitualmente se consume crudo, sin un tratamiento que asegure su inocuidad, como podría ser la cocción.

1.5.5. Agentes patógenos causantes de brotes alimentarios asociados al consumo de berries

Los frutos de *Fragaria* spp. y *Rubus* spp. se han señalado como alimentos involucrados en la aparición de brotes de gastroenteritis por virus, *E. coli* O157:H7 y protozoarios.

En la Tabla 1.3, se presentan los brotes alimentarios documentados causados por el consumo de frutillas, zarzamoras y otras frutas finas como frambuesas y arándanos producidos en los últimos años.

De la observación de la Tabla 1.3, surge que la mayoría de los brotes denunciados se debe a gastroenteritis producidas por virus, pero no debe minimizarse el riesgo de que sean ocasionados por patógenos bacterianos, ya que las vías de contaminación de estas frutas por virus entéricos y por *Salmonella* o *Escherichia coli* O157:H7 son, en términos globales, las mismas (Bialka y Demirci, 2008). Además trabajos experimentales demostraron que cualquiera de esos agentes pueden sobrevivir en la superficie de frutillas durante al menos siete días (Knudsen *et al.* 2001).

Para el caso de los virus entéricos las frutas sirven como vehículo de transmisión, ya que no se pueden multiplicar en el interior o sobre las mismas (Beuchat, 1998).

Tabla 1.3. Brotes alimentarios documentados causados por el consumo de berries

<i>Alimento implicado</i>	<i>Agente infeccioso</i>	<i>País</i>	<i>Referencia</i>
Frambuesas	Norovirus	Francia	Cotterelle <i>et al.</i> 2005
Frambuesas	Norovirus	Suecia	Hjertqvist <i>et al.</i> 2006
Frutillas	<i>E.coli</i> O157:H7	Estados Unidos	CDC, 2006
Frambuesas	Norovirus	Europa, varios países	Butot <i>et al.</i> 2007
Zarzamoras	Norovirus	Alemania	Fell <i>et al.</i> 2007
Arándanos	Virus de hepatitis A	Nueva Zelanda	Calder <i>et al.</i> , 2003
Frutillas	<i>E.coli</i> O157:H7	Estados Unidos	CDC, 2006
Mezcla de frutas finas	Virus hepatitis A	Canadá	CFIA, 2012
Frutillas	Norovirus	Alemania	Bernard <i>et al.</i> 2014
Frutillas	Virus de hepatitis A	Estados Unidos	CDC, 2016

El principal reservorio de *Escherichia coli* O157:H7 es el ganado vacuno (Doyle *et al.* 1997), por lo que es un riesgo para aquellas *berries* que se cultivan a nivel del suelo, a las que la bacteria puede acceder a través de la fertilización con estiércol no tratado o a través de aguas de riego contaminadas. Adicionalmente, tampoco debe descartarse que en el futuro se produzcan enfermedades causadas por otras especies bacterianas como *Listeria monocytogenes* o *Bacillus cereus*, que han provocado brotes a través de la ingestión de otros tipos de vegetales frescos (Beuchat, 1998).

Para la prevención de los brotes alimentarios causados por el consumo de *berries* deben considerarse cruciales las medidas profilácticas encaminadas a evitar la contaminación de las mismas.

1.6. Aspectos tecnológicos en cosecha y postcosecha de frutillas y zarzamoras

1.6.1 Recolección y cosecha

Las frutillas y zarzamoras pertenecen al grupo de frutos no climatéricos, son aquellos cuya maduración no presenta variaciones sustanciales en la tasa de respiración o en la síntesis de etileno (White, 2002).

La maduración es un proceso gradual y continuo donde se producen cambios composicionales que dan como resultado el desarrollo del color, del sabor y aroma y cambios en la firmeza.

Los frutos no climatéricos carecen de la capacidad de continuar su maduración una vez separados de la planta, por lo cual debe asegurarse que hayan alcanzado un estado apropiado de madurez para su consumo en el momento de la cosecha.

En las frutillas, el índice de madurez es el color superficial, su recolección debe comenzar cuando el fruto ha adquirido color rojo en al menos las 2/3 a 3/4 partes de su superficie.

Las zarzamoras se deben cosechar considerando el índice de madurez, una vez que el fruto ha alcanzado un color morado oscuro, con suficiente firmeza que evita que el producto se deteriore.

La recolección y cosecha de ambas *berries* se efectúa manualmente, debiendo ser manipulados con mucho cuidado para evitar los daños mecánicos.

El magullamiento baja significativamente su calidad y el tiempo disponible para su comercialización porque como ya se comentó, el ablandamiento, la decoloración y el derrame de jugos favorecen el crecimiento de mohos.

Es conveniente efectuar la recolección a la temperatura lo más baja posible (durante la noche o a primeras horas de la mañana), ya que resulta más ventajosa para mantener la calidad de la fruta (López Camelo, 2003).

Efectuada la cosecha, la fruta debe colocarse en la sombra para evitar el aumento de su propia temperatura, ya que el control de la misma es primordial para el manejo postcosecha; lo adecuado es un enfriamiento inicial de los productos a temperaturas cercanas a las óptimas para el almacenamiento.

En los casos en que se cuente con personal recolector entrenado, la fruta que se cosecha puede colocarse en el envase definitivo (empaque de campo) evitando así un manipuleo adicional (López Camelo, 2003).

1.6.2 Manejo postcosecha

Las frutillas para consumo en fresco, si se almacenan a temperaturas comprendidas entre 0-1°C, una humedad relativa del 90- 95% y en atmósfera de hasta 20% de dióxido de carbono, tienen una vida útil promedio de 7 días a partir de la cosecha hasta su comercialización (Mercado Central de Buenos Aires, 2014).

Las zarzamoras son más perecederas. Para consumo en fresco requieren una conservación en las condiciones citadas anteriormente para lograr una vida útil de 3 a 4 días (López Camelo, 2003; Bruzone, 2012).

La refrigeración es una tecnología ampliamente utilizada para el almacenamiento y transporte de los productos vegetales. Permite retrasar la pérdida de calidad de los

alimentos perecederos ya que disminuye la actividad biológica del producto y la velocidad de crecimiento de los microorganismos (Kader *et al.*, 2002).

El uso de atmósferas modificadas y controladas proporciona distintos beneficios para la conservación de productos frutihortícolas, incluyendo el retardo de los procesos metabólicos como lo son la maduración y senescencia, el retardo en la pérdida de componentes nutricionales, el control del decaimiento y de insectos y la disminución de algunos desórdenes fisiológicos como el desarrollo de daño por frío (Yahia, 2007).

Como se mencionara anteriormente, las *berries*, una vez que han sido cosechadas, son productos altamente perecederos. Entre las diversas causas que provocan pérdidas en el periodo postcosecha de un fruto se incluyen factores precosecha, variedad, técnicas inadecuadas de recolección, manipulación incorrecta, almacenamiento con otros productos incompatibles, incremento en la concentración de etileno durante el almacenamiento, senescencia, infecciones causadas por bacterias y hongos.

En el caso de las frutillas y zarzamoras, su abundante disponibilidad de nutrientes y agua constituyen condiciones favorables para el crecimiento de distintos tipos de microorganismos, siendo más sensibles a sufrir alteraciones por hongos que por bacterias debido a su acidez. Esta característica sumada a su alta tasa de respiración origina que el período de almacenamiento y la vida útil sea muy corto. También son susceptibles al ataque de algunas especies fúngicas, incluso en frutos almacenados a temperaturas de 0 a 10 °C.

Entre las enfermedades fúngicas más importantes que se presentan en frutillas en la etapa de postcosecha, se pueden citar:

- la “podredumbre gris”, causada por *Botrytis cinerea*. Este hongo es capaz de desarrollar aún a 0°C, aunque lo hace más lentamente; no sólo ataca el fruto sino

también los pecíolos de las hojas y las flores. Es la mayor causa de pérdidas postcosecha.

- La “podredumbre de transporte”, cuyo agente etiológico es *Rhizopus stolonifer*. Como este hongo no desarrolla a temperaturas inferiores a 4°C, el método más simple de control es el buen manejo de la temperatura.
- La antracnosis, ocasionada por *Colletotrichum gloeosporioides*, provoca manchas marrones, hundidas y secas en los frutos (ICMSF, 2006).

Entre las enfermedades más frecuentes de las zarzadoras se encuentran:

- La “podredumbre gris”, que es una de las principales enfermedades de la fruta y se debe a la especie *Botrytis cinerea*. También pueden infectarse las flores y hojas.
- El mildew polvoso, que ataca a los frutos y hojas y es ocasionado por el género *Oidium* (ICMSF, 2006).

Las enfermedades son la principal causa de pérdidas postcosecha en las frutas finas. Es fundamental respetar las condiciones ya nombradas para prevenir o dilatar la aparición de los daños por hongos. Además, durante su cosecha, se debe tener la precaución de eliminar las frutas dañadas o con infecciones ya que los agentes etiológicos se propagan de las frutas enfermas a las sanas formando verdaderos nidos de pudrición.

1.7 Tratamientos de desinfección de frutas

Como se ha expuesto anteriormente, en frutillas y zarzadoras se utilizan diversas estrategias para mantener la calidad y controlar enfermedades de postcosecha: aplicación de prácticas adecuadas durante el cultivo y la cosecha, inmediato enfriamiento luego de la misma y almacenamiento a 0°C y en atmósfera con dióxido de carbono (Mercado Central de Buenos Aires, 2014).

Si bien resultan efectivas para mantener la calidad de la fruta, las pérdidas son importantes y es de interés la utilización de tratamientos complementarios que permitan una mejor conservación del fruto desde que es cosechado hasta el momento de su consumo.

En este aspecto, en el manejo postcosecha de las frutas en general, se han propuesto diversos tratamientos de desinfección con el objetivo de reducir las poblaciones de microorganismos y controlar el deterioro durante el almacenamiento.

Estos métodos se basan en procesos físicos, como radiación ultravioleta y ultrasonido, y en procesos químicos que involucran el uso de agentes químicos como desinfectantes superficiales de las frutas.

Existen otras tecnologías más recientes, a saber, luz pulsada, procesos de alta presión, agua electrolizada, control biológico, bacteriocinas y aceites esenciales (Goodburn y Wallace, 2013; Ramos *et al.* 2013).

En particular, para el caso de las frutillas, Alexandre *et al.*, (2012) estudiaron el efecto de tecnologías físicas (ultrasonido y radiación ultravioleta) y químicas (ozono en solución acuosa, hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno) evaluando el impacto de estos tratamientos de desinfección sobre la carga microbiana (mesófilos totales, y levaduras y mohos) y algunos atributos de calidad (color, firmeza, pH, antocianinas totales y contenido de ácido ascórbico). Sus resultados permitieron demostrar una retención satisfactoria de las características de calidad analizadas, con eficiencia en el control de la contaminación. Sin embargo, el peróxido de hidrógeno produjo importantes pérdidas en los atributos de calidad, como el color y contenido de antocianinas totales.

Los agentes antimicrobianos químicos empleados son de distinta estructura química: cloro, dióxido de cloro, ácidos orgánicos, ácido peracético, peróxido de hidrógeno, ozono. En general, se utilizan en soluciones acuosas, sin embargo existen algunos de tipo gaseoso.

La desinfección de frutas y vegetales con agentes químicos ha sido ampliamente evaluada por distintos autores, (Sapers y Sites, 2003; Rodgers *et al.* 2004; Wu y Kim, 2007; Vandekinderen *et al.* 2009; Abadias *et al.* 2011; Alexandre *et al.* 2012; Van de Velde *et al.* 2012). El alcance del tratamiento puede variar según los diversos factores que afectan la eficacia del procesos de desinfección, tales como la carga microbiana inicial en la superficie de los productos, la superficie a tratar, el tipo de desinfectante, ubicación de microorganismos contaminantes, concentración y tiempo y temperatura de exposición al desinfectante (Beuchat *et al.* 2004; Erickson, 2012).

La desinfección con cloro es el método más utilizado en las industrias. Debido al riesgo de formación de subproductos indeseables, Abadias *et al.* (2011) probaron,entre distintos antimicrobianos alternativos, el ácido peracético para reducir la población de *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* spp. y *Listeria* spp. en manzanas inoculadas experimentalmente.

El ácido peracético logró reducciones bacterianas significativas. Además, las poblaciones bacterianas se mantuvieron en niveles bajos durante el almacenamiento de 6 días a 10°C.

El ácido peracético (APA) o ácido peroxiacético, es un germicida efectivo; presenta ventajas importantes para su selección, ya que es soluble en agua, requiere bajas concentraciones de uso con un costo moderado (aunque mayor que el hipoclorito de sodio), no afecta el medio ambiente, no deja residuos tóxicos, es activo en presencia de materia orgánica y aguas duras, el almacenamiento de la solución concentrada es estable durante largo tiempo y no mancha (Baldry, 1983; Kunigk y Almeida, 2001).

Se trata de un agente oxidante fuerte que se consigue comercialmente como una mezcla líquida concentrada equilibrada de ácido acético, peróxido de hidrógeno, APA y agua (Kitis, 2004). Se descompone dejando como residuo agua, oxígeno y ácido acético.

Debido a su naturaleza química, de ácido débil, es más efectivo en un rango de pH bajo (Baldry, 1983) Puede usarse en un amplio espectro de pH (3,0 – 7,5) y el proceso de desinfección puede llevarse a cabo a temperatura ambiente, siendo activo aun a temperaturas tan bajas como 0°C (Kunigk y Almeida, 2001).

Es activo contra un amplio espectro de microorganismos (bacterias gram positivas, gram negativas, hongos, virus y parásitos) y también actúa sobre esporos bacterianos, por lo que puede considerarse agente esterilizante.

Se usa como desinfectante principalmente en plantas de efluentes industriales, en la industria médica y farmacéutica y en las industrias procesadoras de alimentos y bebidas (Kitis, 2004).

Debido a las ventajas de uso antes descritas, la FDA (Food and Drug Administration) aprobó, a partir del 2001, el uso del ácido peracético para la desinfección directa de frutas y hortalizas (FDA/CFSAN, 2001).

Van de Velde *et al.* (2012) trabajaron con las variedades de frutillas *Camarosa* y *Selva* ensayando la operación de lavado y desinfección por inmersión con diferentes concentraciones de ácido peracético (0 – 120 ppm), tiempos variables (10 – 120 segundos) y temperaturas (4 – 40°C). En todos los casos, la calidad sensorial (especialmente el color) y el contenido de compuestos bioactivos se vieron reducidos por el tratamiento (en algunos casos hasta el 30-40 %) ya que durante la operación por inmersión la pérdida de pigmentos, vitaminas y otros compuestos se da por oxidación, lixiviación (fenómenos de transferencia de masa al medio de lavado) o por ambas simultáneamente.

Diferentes autores han discutido los beneficios y eficacia de la inclusión de ácido peracético en el agua de lavado de diversas frutas y hortalizas frescas, enteras o cortadas (Kim *et al.* 2006; Silveira *et al.*, 2008; Artés *et al.*, 2009; Vandekinderen *et al.*, 2009).

Generalmente los compuestos antimicrobianos químicos se aplican mediante inmersión de la fruta en la solución.

Para la descontaminación de las *berries* que se comercializan como frutas frescas enteras, la técnica de lavado por inmersión podría ser de aplicación limitada debido a las características propias de estas frutas. La piel, de textura delicada, se puede dañar con facilidad durante el lavado y durante el período de secado y preenfriamiento lo que puede facilitar la infección por microorganismos (FDA/CFSAN, 2001; Vardaret *al.*, 2012).

De este modo, resultaría apropiada la aplicación del agente químico mediante un tratamiento donde la manipulación y la humectación de la fruta sean mínimas; en este aspecto la desinfección por nebulización (*fogging*) puede resultar una tecnología satisfactoria.

La nebulización (*fogging*) es una técnica de aplicación donde la solución de antimicrobiano se dispersa en partículas muy pequeñas. Oh *et al.* (2005a), investigaron la eficacia del ácido peracético y del peróxido de hidrógeno aerosolizados, sobre microorganismos inoculados en medios de cultivos y colocados en una cámara de almacenamiento. Reportaron que ambos productos aerosolizados al difundir como desinfectantes gaseosos, lograron reducciones significativas de los microorganismos ensayados.

En la misma línea de investigación, se ensayó la eficacia del ácido peracético aerosolizado como desinfectante de hojas de lechuga inoculadas con *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium. Con este tratamiento se logró la reducción significativa de estas bacterias con respecto a las muestras utilizadas como control, que fueron inoculadas de la misma forma pero no recibieron el tratamiento desinfectante (Ohet *al.*, 2005b).

La nebulización aplicada sobre diversos productos como tecnología de postcosecha, demostró ser efectiva, por ejemplo, la aplicación de dióxido de cloro ha controlado de manera significativa las enfermedades de higo (Karabulut *et al.* 2009).

Los tratamientos con un sistema de nebulización que se aplican en la etapa de postcosecha ofrecen una alternativa interesante para extender la vida útil de los mismos. Delele *et al.* (2012) desarrollaron y validaron un modelo de dinámica de fluidos computacional (CFD) para investigar la eficacia del sistema de nebulización con fungicidas en el almacenamiento de frutas. Este modelo contempló la circulación del aire y el flujo de partículas fungicidas para predecir el comportamiento de deposición de las mismas sobre los productos.

De la misma manera, la aplicación de diversos desinfectantes por nebulización sobre frutillas logró una reducción del número total de microorganismos en su superficie y en el aire de la cámara de almacenamiento (Vardar *et al.* 2012).

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar aspectos básicos y aplicados de la tecnología de desinfección por nebulización con soluciones de ácido peracético aplicable como tratamiento postcosecha para mejorar la calidad microbiológica, preservando la calidad sensorial en frutillas y zarzamoras frescas enteras.

Objetivos específicos

- Evaluar y modelar los cambios sobre la carga microbiana y el color de frutillas y zarzamoras debido a la desinfección por nebulización con ácido peracético.
- Evaluar y modelar la eficacia de la desinfección por nebulización con ácido peracético sobre *Escherichia coli* en frutillas y zarzamoras inoculadas experimentalmente.
- Estudiar la efectividad del tratamiento de desinfección en el almacenamiento postcosecha bajo refrigeración y modelar, en esa situación, los cambios de las poblaciones de microorganismos contaminantes (nativos e inoculados) y la calidad sensorial.
- Optimizar la operación de desinfección preservando la inocuidad y la calidad sensorial de frutillas y zarzamoras.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materia prima

En la presente tesis se trabajó con dos especies de frutas finas:

- Frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch.) variedad *Camarosa* oriundas de una plantación en Arroyo Leyes, Santa Fe, Argentina. Las frutillas fueron cosechadas por trabajadores calificados, con 3/4 partes de su superficie de color rojo. Se transportaron directamente desde el campo al laboratorio y se almacenaron en cámara frigorífica a 2°C y 95% HR. Para su uso en los experimentos, se seleccionaron las frutillas por uniformidad de tamaño, color (90% de color rojo) y ausencia de defectos.
- Zarzamoras (*Rubus fruticosus*) oriundas de la ciudad de Coronda, Santa Fe, Argentina. Las zarzamoras fueron cosechadas por la propietaria de la plantación de Coronda, la productora Angelina García, con un color morado oscuro uniforme. En el laboratorio, se almacenaron en cámara frigorífica a 2°C y 95% HR hasta el momento de su uso. Las frutas fueron elegidas por uniformidad de tamaño, ausencia de defectos y adecuada firmeza antes de su uso en los experimentos.

3.2 Ensayos de Desinfección

3.2.1 Acido peracético

Se utilizó un desinfectante comercial a base de ácido peracético (APA) llamado Oxilac Plus (Indaquim SA Santa Fe, Argentina) para la operación de desinfección por nebulización. Oxilac Plus es una mezcla estabilizada de 5% APA, peróxido de hidrógeno 20% y agua. La densidad de la APA es 1,107 g/mL. La concentración de APA se verificó mediante valoración yodométrica según APHA-AWWA-WEF (1989).

3.2.2 Sistema y procedimiento de nebulización

Los tratamientos se realizaron en un sistema de nebulización o *foggings* especialmente diseñado para los experimentos.

Este sistema consiste en una unidad generadora de aerosol conectada a una cámara hermética plástica de 16 L de capacidad (Figura 3.1).

La unidad generadora de aerosol es de tipo ultrasónico (Respirex, ACCME, SRL, Córdoba, Argentina) y presenta un depósito de 30 ml de capacidad que contiene el líquido a nebulizar (ácido peracético). Este equipo produce una niebla cuyas gotas poseen entre 0,5-8 μm de diámetro. Las gotas producidas se transportan por el flujo de aire hacia el interior de la cámara.

Figura 3.1. Sistema de nebulización empleado en los tratamientos de desinfección: (A) Unidad generadora de aerosol (B) Cámara de nebulización



Las frutas a nebulizar (frutillas o zarzamoras, según corresponda) se colocaron en recipientes redondos de plástico rígidos de 270 cm^3 de capacidad. Las características de los mismos, fueron: PET 0,42 mm de espesor, con una superficie de 0,036 m^2 , las tasas de transmisión de 29 a 59 [$\text{cm}^3 / \text{m}^2 \cdot \text{día} \cdot \text{atm}$] de O_2 (a 23 ° C y 0% de humedad relativa) y 12 a 18 [$\text{g} / \text{m}^2 \cdot \text{día}$] para el vapor de agua (a 38 ° C y 90% HR).

Para realizar los tratamientos de nebulización, los recipientes conteniendo las frutas se ubicaron dentro de la cámara con las tapas abiertas. Se nebulizaron a diversas concentraciones de APA y tiempos de contacto, previamente definidos de acuerdo a la experiencia a realizar. Transcurrido el tiempo de tratamiento se cerraron los recipientes y se conservaron para realizar las diferentes determinaciones.

3.3 Determinaciones realizadas

3.3.1 Análisis microbiológicos de las frutas

3.3.1.1 Microorganismos aerobios mesófilos

Para la determinación de microorganismos aerobios mesófilos (AMT) se tomaron asépticamente muestras de frutas de 10 g y se homogeneizaron durante 2 minutos en un homogeneizador de muestras sólidas (Stomacher, Seward Ltd.) con 90 mL de agua de peptona 0,1%. A partir de esta suspensión, se realizaron diluciones decimales con agua de peptona 0,1%.

De cada dilución se sembraron 1 mL en profundidad, por duplicado, usando como medio de cultivo Agar para Recuento en Placa (APC, Britania, Argentina). Las placas se incubaron a 30°C durante 48 h. El resultado se expresó como UFC/gfrutilla o zarzamora según corresponda (ISO, 2013; ReNaLOA, 2014).

3.3.1.2 Mohos y levaduras

Para la determinación de mohos y levaduras (ML) se tomaron asépticamente muestras de frutas de 10 g y se homogeneizaron durante 2 minutos en stomacher con 90 mL de agua de peptona 0,1%. Se realizaron diluciones decimales con agua de peptona 0,1%.

El recuento se llevó a cabo, por duplicado, usando el medio de cultivo Agar H y L (Britania, Argentina). Se sembraron 1 mL de cada dilución, en profundidad. Las placas se

incubaron a 28°C durante 5 días. El resultado se expresó como UFC/g frutilla o zarzamora según corresponda (APHA, 2001; ReNaLOA, 2014).

3.3.1.3 Bacterias coliformes totales

Para la determinación de bacterias coliformes totales se tomaron asépticamente muestras de frutas de 10 g y se homogeneizaron durante 2 minutos en stomacher con 90 mL de agua de peptona 0,1%. Se realizaron diluciones decimales con agua de peptona 0,1% a partir de las cuales se realizó el recuento en Agar Violeta Rojo Bilis Lactosa (VRBL, Britania, Argentina), sembrando 1 mL en profundidad por duplicado. Las placas se incubaron a 37° durante 24 h. El resultado se expresó como UFC/gfrutilla o zarzamora según corresponda (APHA, 2001).

3.3.2 Análisis microbiológico de Escherichia coli inoculada experimentalmente

Para la determinación de *E.colise* tomó asépticamente cada fruta inoculada entera, frutilla o zarzamora, y se homogeneizó durante 2 minutos en stomacher, utilizando agua de peptona 0,1% en la cantidad adecuada para obtener la dilución 10^{-1} .

A partir de las diluciones decimales seriadas en agua de peptona 0,1% se realizó el recuento en Agar Violeta Rojo Bilis Lactosa (VRBL, Britania, Argentina). Se sembraron 1 mL de cada dilución, en profundidad, por duplicado. Las placas se incubaron a 37° durante 24 h. El resultado se expresó como UFC.g⁻¹ frutilla o zarzamora según corresponda.

3.3.3 Parámetros instrumentales de color

Se homogeneizaron 50 g frutillas por muestra y alícuotas de las mismas se colocaron en celdas blancas de plástico de profundidad de 1 cm para las mediciones de color. El color se determinó utilizando un espectrofotómetro Minolta 508d (Minolta Co., LTD, Japón.) bajo las siguientes condiciones: iluminante D65, ángulo de observación de 10°, SCE

(componente especular excluido), mediante la evaluación de los parámetros del sistema CIE: L^* , a^* , b^* , C_{ab}^* y h_{ab} . Se realizaron cinco mediciones en cada muestra.

El parámetro L^* mide el grado de luminosidad ($L^*= 100$: blanco; $L^*= 0$: negro), el a^* , el grado de componente rojo o verde ($a^*> 0$: rojo; $a^*< 0$: verde) y el b^* el grado de componente amarillo o azul ($b^*> 0$: amarillo $b^*< 0$: azul). Por otro lado, el espacio $L^*C_{ab}^*h_{ab}$, usa el mismo diagrama que el espacio $L^*a^*b^*$, pero en coordenadas cilíndricas. La luminosidad es la misma en ambos sistemas, y por su parte C_{ab}^* (croma) y h_{ab} (ángulo de tono) son definidos a partir de a^* y b^* donde $C_{ab}^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0,5}$ y $h_{ab} = \arctg (b^*/a^*)$ (0° : rojo; 90° : amarillo; 180° : verde; 270° : azul).

3.4 Experiencias preliminares

3.4.1 Estudio de la materia prima frutilla y zarzamora

Se realizaron determinaciones microbiológicas a 12 muestras de materia prima frutilla y 5 muestras de zarzamora para estudiar la carga microbiana naturalmente presente en la fruta.

Se determinó:

- Recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales
- Recuento de mohos y levaduras
- Recuento de bacterias coliformes.

Es importante realizar un estudio microbiológico preliminar de la fruta teniendo en cuenta que la microbiota inicial presente está influenciada, entre otros factores, por las condiciones climáticas y se requiere contar con una materia prima de características uniformes en los distintos ensayos realizados.

Estos estudios preliminares incluyeron también los análisis microbiológicos luego de 7 días de conservación a 2°C a fin de conocer la microbiota inicialmente presente que puede desarrollar bajo las condiciones de almacenamiento utilizadas durante los ensayos.

En particular para el recuento de mohos y levaduras, se validó la equivalencia de resultados comparando el método de siembra, de las diluciones de la muestra, en profundidad con el de inoculación en superficie (APHA, 2001).

Esta validación resulta necesaria en los casos en que el recuento estimado de mohos y levaduras es menor a 100 UFC/g, donde no puede emplearse la inoculación en superficie de 0,1 mL de cada dilución de la muestra.

El recuento se realizó paralelamente utilizando los 2 métodos de siembra: en superficie, donde se inocularon 1 mL de cada dilución sobre el medio de cultivo dividiendo este volumen en 4 placas (tres con 0,3mL y una con 0,1 mL) y en profundidad, donde se colocó 1 mL de cada dilución y luego el vertido del medio de cultivo.

Los resultados fueron equivalentes con ambas técnicas. Por razones operativas, se seleccionó la técnica en profundidad para realizar los recuentos durante el desarrollo de la tesis.

3.4.2 Determinación del dominio experimental

En una primera etapa se realizaron, sobre frutillas, ensayos preliminares para determinar los límites de las variables operativas. Se trabajó con distintas condiciones de concentración de APA y tiempos de tratamiento, considerando estudios realizados por Oh *et al.* (2005a y 2005b) y experiencias previas del grupo de investigación dentro del cual se enmarca la presente tesis.

En estos ensayos se consideró la reducción microbiológica obtenida sobre la microbiota naturalmente presente en las frutillas evaluando, además, los daños en la calidad visual considerando que la calidad sensorial (color) es una característica que impacta fuertemente en la aceptación del producto por el consumidor. Estos daños se evaluaron estableciendo tres categorías (ninguno-moderado-severo).

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.1:

Tabla 3.1. Reducción microbiológica de frutillas nebulizadas con APA en ensayos preliminares de desinfección

<i>APA ($\mu\text{L/L}$)</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>Reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales ($-\log N/N_0$)</i>	<i>Reducción de mohos y levaduras ($-\log N/N_0$)</i>	<i>Daño de calidad visual</i>
50	15	0,60	0,90	ninguno
100	15	1,20	0,60	ninguno
100	60	1,51	1,55	moderado
50	60	0,50	0,50	ninguno
300	15	2,54	3,65	severo

APA: ácido peracético; N: número de microorganismos luego del tratamiento; N_0 : número inicial de microorganismos.

En función de los resultados logrados en los ensayos anteriores, se estableció como límites superiores una concentración de APA de 100 $\mu\text{L/L}$ y 60 minutos de tiempo de aplicación, ya que se observó una aceptable reducción microbiológica sin daños severos en la calidad visual. Se amplió el límite inferior de concentración de APA a 20 $\mu\text{L/L}$.

Posteriormente, se realizaron ensayos de desinfección utilizando las concentraciones de APA de 50 y 100 $\mu\text{L/L}$ y 15 min de exposición al agente activo. Estos ensayos se realizaron con el objetivo de lograr buena reproducibilidad en los resultados. En la Tabla 3.2 se muestran los resultados obtenidos en esta etapa.

Finalmente, y considerando la complejidad operativa para realizar el desarrollo experimental completo, se determinó como límites para las variables operativas: concentración de ácido peracético (APA): 20 - 100 $\mu\text{L/L}$ y tiempo (t): 15 - 60 min.

Tabla 3.2. Reducción microbiológica de frutillas nebulizadas con APA en ensayos preliminares de desinfección

APA ($\mu\text{L/L}$)	Tiempo (min)	Reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales ($-\log N/N_0$)	Reducción de mohos y levaduras ($-\log N/N_0$)
50	15	0,85	1,15
100	15	1,82	1,85

APA: ácido peracético; N: número de microorganismos luego del tratamiento; N_0 : número inicial de microorganismos. Las reducciones corresponden al promedio de 5 ensayos.

3.4.3 Puesta a punto de la metodología de inoculación

Microorganismo

Se utilizó la cepa *Escherichia coli* compatible con *E.coli* ATCC 25922 cedida por el cepario de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL.

Preparación de la suspensión a inocular

Se utilizó la metodología propuesta por Abadias *et al.* (2011) y FDA/CFSAN (2001).

Se realizó un cultivo en 50 mL de Caldo Soya Tripticasa (CST) que se incubó a 37°C durante 18 h. Para la preparación del inóculo, se transfirió un volumen de este cultivo a CST hasta ajustar la turbidez con el estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland, por comparación visual. Esta suspensión contiene aproximadamente $1,0-2,0 \cdot 10^8$ UFC/mL para *E.coli* ATCC 25922 y se utilizó para la inoculación de las frutas.

Se comprobó la concentración del inóculo mediante un recuento microbiológico en placa donde la suspensión de *E.coli* obtenida presentó una concentración de células entre $6,3 \cdot 10^7$ a $7,5 \cdot 10^7$ UFC/mL. Este recuento se realizó paralelamente en dos medios de cultivo: Agar Soya Tripticasa (AST) y Agar Violeta Rojo Bilis Lactosa (VRBL) para corroborar la eficacia del uso de un medio selectivo y diferencial como es el VRBL en la recuperación

de las bacterias para su posterior uso en los ensayos, con respecto a AST, medio basal y sin inhibidores. En ambos medios de cultivo se obtuvieron los mismos valores de recuento microbianos.

Método de inoculación

El objetivo de la inoculación es obtener una carga microbiana importante en los productos a ser tratados posteriormente, para poder valorar el efecto de los tratamientos de desinfección a los que serán sometidos. (FDA/CFSAN, 2001).

Para la inoculación se colocó 100µL de la suspensión de *E.coli* sobre la superficie de las frutas enteras. Se dejaron secar durante 1 h en condiciones de esterilidad.

Para evaluar el nivel de inoculación inicial alcanzado se procesaron las frutillas según la técnica descrita en 3.3.2. Se obtuvo una recuperación de las bacterias en el orden de 10^5 UFC/g. Este procedimiento se realizó en todos los ensayos de desinfección y se utilizó como control para evaluar en nivel de inoculación inicial alcanzado.

En las zarzamoras, utilizando esta metodología de inoculación, el número de bacterias recuperadas fue, en promedio 10^2 UFC/g, considerablemente inferior al necesario para realizar los ensayos de desinfección.

Por este motivo se realizó una modificación de la técnica, que consistió en una inoculación en dos etapas colocando 50 µL por vez y dejando secar entre cada deposición de la suspensión de bacterias. De esta manera se obtuvo una recuperación de las bacterias en el orden de 10^5 UFC/g.

Ensayos preliminares de desinfección

Se realizó la puesta a punto del procedimiento de desinfección sobre las frutillas inoculadas utilizando las concentraciones de APA de 50 y 100 µL/L y 15 min de

exposición al agente activo de acuerdo a los resultados previos como de mencionó en el punto 3.4.2. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.3.

Los resultados obtenidos permitieron comprobar que se produjo la inactivación del microorganismo inoculado experimentalmente en la superficie de las frutillas. Luego de la acción del APA aplicado por *fogging* permanecen bacterias remanes para ser cuantificadas. Se obtuvo buena reproducibilidad en los resultados obtenidos.

Tabla 3.3. Reducción microbiológica de E.coli en frutillas nebulizadas con APA en ensayos preliminares de desinfección

<i>APA (μL/L)</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>N° inicial E.coli (log UFC/g)</i>	<i>N° final E.coli (log UFC/g)</i>	<i>Reducción obtenida (log)</i>
50	15	5,38	1,90	2,68
100	15	5,38	2,51	2,88
50	15	5,11	2,26	2,86
100	15	5,11	2,70	3,21

APA: ácido peracético; UFC: unidades formadoras de colonias.

3.5- Ensayos de desinfección por nebulización con ácido peracético de frutillas y zarzamoras frescas enteras.

3.5.1 Diseño experimental

Para estudiar la operación de nebulización se utilizó la metodología de superficie de respuesta aplicando un diseño experimental central compuesto (2 factores en 5 niveles) de 11 corridas experimentales. Los 5 niveles se muestran en la Tabla 3.4.

Se asumió que hay una función matemática para cada respuesta de acuerdo a dos variables independientes relacionadas con el procesamiento:

$$Y = f(C, t)$$

Donde C es la concentración de APA (μL APA 5% por L de aire de la cámara) y t es el tiempo del tratamiento (min).

Tabla 3.4. Variables independientes y niveles del diseño experimental central compuesto

Variables Independientes	Símbolos	Niveles
Concentración de ácido peracético ($\mu\text{L/L}$)	C	3,4
		20,0
		60,0
		100,0
		116,6
Tiempo (min)	t	5,7
		15,0
		37,5
		60,0
		69,3

Para las frutillas y zarzamoras las respuestas (Y) evaluadas fueron:

- Reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT)
- Reducción de mohos y levaduras (RML)
- Reducción *Escherichia coli* inoculada experimentalmente (REC)
- Cambios en los parámetros de color (δQ_i)

La RAMT_i se expresó como $-\log_{10} N_i / N_{C_i}$ donde,

N_i es el recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales de las frutas tratadas en el día i; N_{C_i} es el recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales de las frutas control en el día i; i es el día de análisis, 0 ó 7.

La RML_i se expresó como $-\log_{10} N_i / N_{C_i}$ donde,

N_i es el recuento de mohos y levaduras de las frutas tratadas en el día i; N_{C_i} es el recuento de mohos y levaduras de las frutas control en el día i; i es el día de análisis, 0 ó 7.

La REC_i se expresó como $-\log_{10} N_i / N_{C_i}$ donde,

N_i es el recuento de *E.coli* de las frutas tratadas en el día i ; N_{Ci} es el recuento de *E.coli* de las frutas control en el día i ; i es el día de análisis, 0 ó 7.

El cambio de parámetro de color (δL_i^* , δa_i^* , δb_i^* , δC^*_{abi} , δh_{abi}) se expresó como un porcentaje de la diferencia entre el valor del parámetro de fruta nebulizada (L_i^* , a_i^* , b_i^* , C^*_{abi} y h_{abi}) y el valor del parámetro de fruta control (L_{ci}^* , a_{ci}^* , b_{ci}^* , C^*_{abci} y h_{abci}), dividido por éste último en el día i (0 o 7).

$$\delta Q_i^* (\%) = (Q_i^* - Q_{ci}^*) / Q_{ci}^* \times 100$$

La ecuación polinómica de segundo orden del modelo ajustado para cada respuesta es:

$$Y = \beta_0 + \beta_C \times C + \beta_t \times t + \beta_{CC} \times C^2 + \beta_{tt} \times t^2 + \beta_{tC} \times t \times C$$

Donde β_0 , β_C , β_t , β_{CC} , β_{tt} y β_{tC} son los coeficientes de regresión, C es la concentración de APA ($\mu\text{L/L}$) y t es el tiempo (min).

3.5.2 Tratamiento de desinfección

Las frutas a nebulizar, 100 a 120 g de frutillas o zarzamoras, según corresponda, se dispusieron en seis contenedores plásticos. Éstos se colocaron en la cámara del sistema de *fogging* (ver punto 3.2.2.)

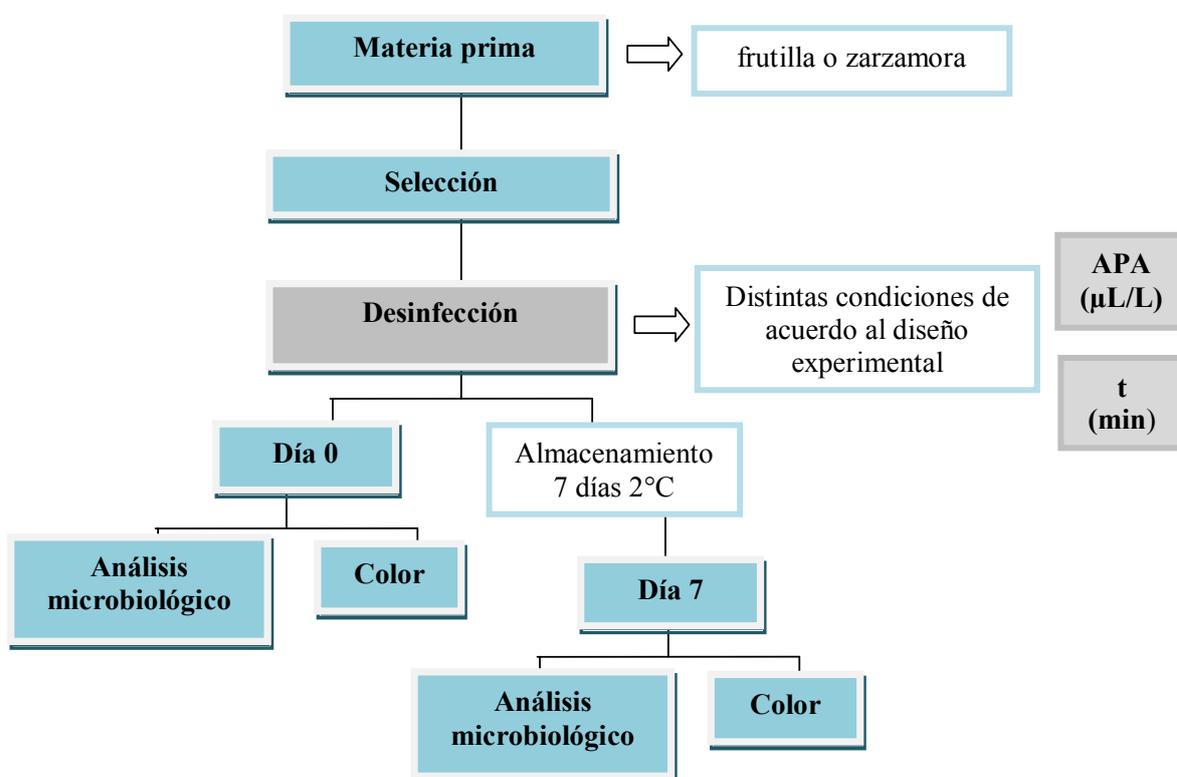
Se nebulizó con diferentes concentraciones de APA durante determinados períodos de tiempo, de acuerdo al diseño experimental, mediante el procedimiento que se describe a continuación.

Se colocó en el depósito de la unidad generadora de aerosol, la cantidad de solución de APA necesaria para lograr la concentración deseada. Esta unidad se mantiene encendida durante el tiempo necesario para nebulizar todo el APA contenido en el depósito, proceso que tiene un tiempo de duración entre 5 a 10 minutos. Luego la unidad se apaga, y las muestras permanecen dentro de la cámara en contacto con la niebla hasta que se llega al

tiempo de contacto prefijado. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las frutas de tres de los contenedores se analizaron inmediatamente (muestras día 0) y los restantes se almacenaron a 2° C durante 7 días (muestras día 7).

En la Figura 3.2 se resumen las etapas de procesamiento y los análisis realizados en las frutas.

Figura 3.2. Etapas de procesamiento y análisis realizados en las frutas.



APA: ácido peracético, t: tiempo.

3.5.3 Análisis microbiológicos

3.5.3.1 Microorganismos aerobios mesófilos y mohos y levaduras

Se realizó el recuento de AMT y de ML (según la metodología descrita en el punto 3.3.1) en la materia prima previo a cada tratamiento, en las muestras luego de cada tratamiento (muestras día 0) y luego del almacenamiento durante 7 días a 2°C (muestras día 7).

3.5.3.2 E.coli inoculada experimentalmente

Se realizó el recuento de *E.coli*(según la metodología descrita en el punto 3.3.2) en la fruta sin inocular, en la fruta inoculada previo al tratamiento (control de inoculación), luego de cada tratamiento (muestras día 0) y luego del almacenamiento durante 7 días a 2°C (muestras día 7).

En la materia prima frutilla y zarzamora, se realizó el recuento de bacterias coliformes totales. En todos los casos el recuento fue <10 UFC/g, lo que comprueba la ausencia de *E.coli* en las frutas sin inocular.

3.5.4 Determinación de los parámetros de color

Se realizó la medición de los parámetros instrumentales de color (según la metodología descrita en el punto 3.3.3) en la materia prima previo a cada tratamiento, en las muestras luego de cada tratamiento (muestras día 0) y luego del almacenamiento durante 7 días a 2°C (muestras día 7).

3.6 Análisis estadístico

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) para modelar los datos experimentales en ecuaciones polinómicas de segundo orden.

Se realizaron las pruebas de diagnóstico basadas los residuos para la aplicación del ANOVA: normalidad, homogeneidad, independencia y observados vs. predichos.

Para analizar el efecto de cada una de las variables independientes (concentración de APA y tiempo de tratamiento) sobre cada una de las respuestas Y se realiza un análisis de variancia ANOVA. La significancia de cada término de los modelos se refirió al error puro.

Para evaluar la bondad de ajuste del modelo a cada respuesta, se calcularon la falta de ajuste, el coeficiente de determinación (R^2) y la desviación media absoluta (DMA).

El modelo se expresó como un modelo reducido con los coeficientes estimados, eliminando los términos no significativos por el método de regresión lineal “*stepwise*”.

Se utilizó STATGRAPHICS Centurion XV (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, EE.UU.)

3.7 Optimización del tratamiento de desinfección

Se realizó la optimización de los tratamientos de desinfección de frutillas y zarzamoras aplicando la metodología de optimización por respuestas múltiples de Derringer.

Se usaron los modelos polinomiales de 2º orden de las respuestas expresadas como reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT), reducción de mohos y levaduras (RML) y porcentajes de los cambios de color con respecto a la materia prima sin tratar (δL^* y δa^* para las frutillas y δb^* para zarzamoras).

Como escenario de optimización se propuso lograr máxima reducción microbiológica de la carga inicial (AMT y ML), manteniendo sin cambios el color de la fruta ($\delta L^*=0\%$, $\delta a^*=0\%$ para frutillas y $\delta b^*=0\%$ para zarzamoras).

La Función de deseabilidad de Derringer se utiliza para la optimización de respuestas múltiples, de acuerdo con Derringer y Suich (1980). El método implica la transformación de cada respuesta predicha, Y , a una función de conveniencia parcial adimensional, d_i . Los

valores d_i por cada respuesta se obtienen mediante la especificación de los objetivos, es decir, minimizar, maximizar o dirigir la respuesta, y los límites necesarios para cada uno. Las funciones de deseabilidad parciales se combinan en una sola respuesta compuesta, la función de deseabilidad global de D , definido como la media geométrica de los diferentes valores de d_i : $D = [d_1^{p_1} x d_2^{p_2} x \dots x d_n^{p_n}]^{1/n}$, donde p_1, p_2 y p_n son la importancia relativa de las respuestas. Un valor de D diferente de cero implica que todas las respuestas están en un intervalo deseable de forma simultánea y, por consiguiente, para un valor de D cercano a 1, la combinación de los criterios es globalmente óptima.

Con este procedimiento se podrá conocer las condiciones operativas del tratamiento de nebulización que satisface los criterios propuestos.

3.8 Validación de los modelos propuestos de desinfección en las condiciones establecidas a partir de la optimización de las respuestas.

Para realizar la validación del modelo de desinfección de frutilla se utilizó la variedad *Camino Real*. Esto fue debido a que en nuestra región, en el momento de realizar este ensayo, esta variedad reemplazó gran parte de la variedad *Camarosa* lo que dificultó la adquisición de materia prima de la misma variedad utilizada en los tratamientos de desinfección realizados en esta tesis.

Una vez obtenidas las condiciones que optimizaban las respuestas según los objetivos planteados, se realizó un nuevo ensayo de desinfección.

La muestra se procesó según se indica en los puntos 3.2.2 y 3.5.2. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Las respuestas (Y) evaluadas fueron Reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT), Reducción de mohos y levaduras (RML) y Cambios en los parámetros de color (δQ_i).

Las condiciones experimentales para la validación del modelo fueron las determinadas en el punto 3.7(Concentración de APA y tiempo de tratamiento).

Posteriormente, para validar los modelos, se compararon estadísticamente con un *test t* los resultados experimentales y los predichos por los modelos para evaluar la existencia de diferencias significativas.

Para las zarzamoras, no pudieron llevarse a cabo los ensayos de validación correspondientes debido a la estacionalidad que presenta esta fruta. En nuestra región la cosecha es muy breve y se dispone de materia prima fresca durante un breve periodo, lo que excede al tiempo de realización del presente trabajo de tesis.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Carga microbiana inicial de frutillas frescas

La población microbiana presente sobre las frutas es variable. La microbiota inicial proviene del campo: tierra, insectos, aire y/o agua de riego. La cosecha, el transporte y el procesamiento influyen en el tipo y cantidad de microorganismos presentes en la superficie de las frutas (Burnet y Beuchat, 2001). En el caso de la frutilla, que se cultiva cerca del suelo sobre un plástico o *mulching*, la contaminación proviene fundamentalmente de los microorganismos de la tierra.

En general, las bacterias en las frutas sólo se encuentran en escasas cantidades. Específicamente, en el caso de las frutillas que tienen un pH ácido (3,0 a 3,6) presentan mejores condiciones para el desarrollo de hongos que para bacterias (ICMSF, 2006). Dentro de éstos, se encuentran las levaduras (hongos de formas muy simples, unicelulares) y los mohos (hongos de formas filamentosas, multinucleados).

Los estudios microbiológicos realizados en las diversas muestras de frutillas frescas provenientes de una plantación de Arroyo Leyes, permitieron obtener datos sobre la microbiota naturalmente presente en las frutillas con las que se trabajó en la presente tesis la cual se muestra en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Carga microbiana inicial de frutillas frescas*

Grupo microbiano	UFC/g	Log UFC/g
Microorganismos aerobios mesófilos totales	$1,1 \times 10^4 - 5,7 \times 10^4$	4,04 – 4,76
Hongos (mohos y levaduras)	$4,6 \times 10^3 - 5,3 \times 10^4$	3,66 – 4,72

*variedad *Camarosa*, provenientes de una plantación de Arroyo Leyes. UFC: unidades formadoras de colonias

Los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales resultaron algo inferiores a los informados en otros estudios; Vardar *et al.* (2012) y Alexandre *et al.* (2012) reportaron valores en el rango de $10^5 - 10^6$ UFC/g.

Con respecto a la microbiota fúngica, los recuentos obtenidos coinciden con los datos aportados por otros autores (Alexandre *et al.* 2012; Vardar *et al.* 2012).

La microbiota fúngica de los frutos puede estar compuesta predominantemente por mohos, por levaduras o ambos. En particular, la población de mohos se encuentra más influenciada por las condiciones climáticas, la proximidad al suelo y el tiempo transcurrido desde la cosecha. Los valores de recuento varían entre $10^4 - 10^6$ UFC/g aunque a veces puede alcanzar las 10^9 UFC/g (Jay, 2009).

En las frutillas analizadas, esta población está compuesta por ambos tipos de hongos. Esta distinción se basó en la observación de las características macroscópicas de las colonias desarrolladas sobre medios de cultivo sólidos: las colonias de mohos son distinguibles por su aspecto aterciopelado, algodonoso o pulverulento mientras que, en general, las de levaduras son húmedas, cremosas y no tienen hifas aéreas debido a su crecimiento unicelular.

Las levaduras son colonizadoras normales de las frutillas hallándose en cantidades de incluso 10^5 UFC/g (Jay, 2009). Cabe mencionar que las colonias de levaduras encontradas en las muestras fueron tanto blanquecinas como con pigmentos carotenoides. Los exudados de la fruta proveen nutrientes para el desarrollo de levaduras, especialmente levaduras pigmentadas como las especies de *Rhodotorula* (ICMSF, 2006).

4.2 Efecto de la nebulización de ácido peracético sobre la reducción de la carga microbiana de frutillas

4.2.1 Efecto de la nebulización de ácido peracético sobre la reducción de la carga microbiana de frutillas en el día de aplicación (Día 0).

El lote de frutillas usadas en las 11 corridas experimentales tuvieron una carga microbiana inicial de 4,5 log UFC/g para microorganismos aerobios mesófilos totales y 3,4 log UFC/g para mohos y levaduras (muestras control).

Los resultados experimentales de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales y de mohos y levaduras para las muestras en el día 0, en las condiciones del diseño de nebulización se muestran en la Tabla 4.2.

Las pruebas de diagnóstico basadas en los residuos demuestran que se cumple adecuadamente con las suposiciones de normalidad, homogeneidad de la variancia e independencia de los datos experimentales. Las pruebas de diagnóstico se presentan en la Figura 7.1 del Anexo para $RAMT_0$ y RML_0 .

Tabla 4.2. Resultados experimentales de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales ($RAMT_0$) y de mohos y levaduras (RML_0) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0

<i>APA</i> ($\mu\text{L/L}$)	<i>Tiempo</i> (min)	<i>RAMT₀</i> ($-\log N_0/N_{C0}$)	<i>RML₀</i> ($-\log N_0/N_{C0}$)
100	15	1,11	1,11
20	15	0,96	1,17
20	60	1,84	1,53
60	5,7	0,80	0,70
60	37,5	1,01	1,58
60	37,5	1,32	1,66
3,4	37,5	0,68	0,32
60	37,5	0,96	1,27
60	69,3	1,24	0,82
100	60	2,72	3,13
116,6	37,5	3,06	1,32

APA: ácido peracético; $RAMT_0$ = reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales en el día 0; RML_0 = reducción de mohos y levaduras en el día 0; N_0 : número de microorganismos (UFC/g) luego del tratamiento en el día 0; N_{C0} : número de microorganismos (UFC/g) de las muestras control en el día 0.

En la Tabla 4.3 se muestra el análisis ANOVA correspondiente al modelo predictivo de $RAMT_0$ y RML_0 para las muestras en el día 0.

Tabla 4.3. Análisis ANOVA de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales ($RAMT_0$) y de mohos y levaduras (RML_0) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0

Fuente	Gl	$RAMT_0$		RML_0	
		Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P
A:Concentración APA ($\mu\text{L/L}$)	1	2,4	0,0154	1,1	0,0368
B:Tiempo (min)	1	1,2	0,0300	0,8	0,0485
AA	1	1,1	0,0331	0,06	0,3480
AB	1	0,1	0,2022	0,7	0,0564
BB	1	0,001	0,8736	0,1	0,2587
Falta de ajuste	3	1,2	0,0875	2,3	0,0508
Error puro	2	0,08		0,08	
R^2		0,79		0,52	
DMA (%)		14,4		13,4	

Términos significativos $p \leq 0,05$

Gl: grados de libertad; APA: ácido peracético; DMA: desviación media absoluta; $RAMT_0$ = reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales en el día 0; RML_0 = reducción de mohos y levaduras en el día 0.

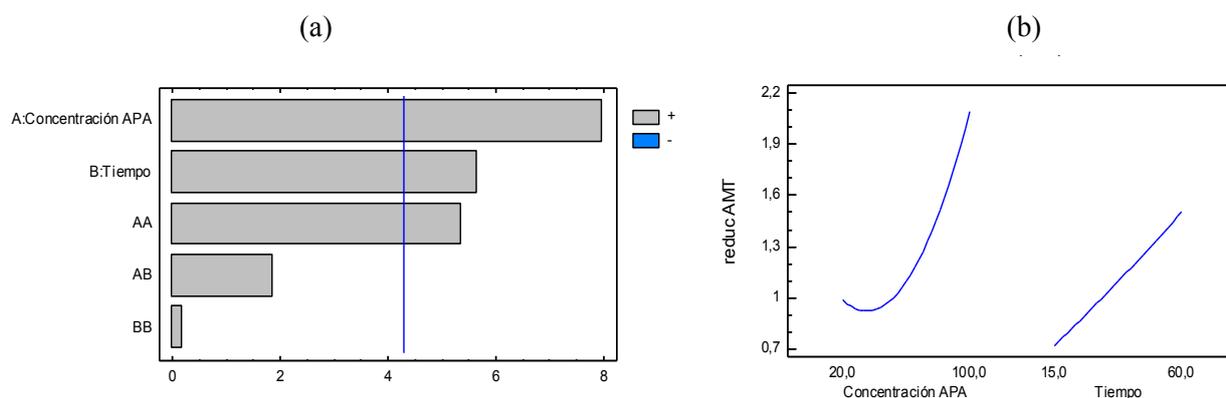
Para evaluar la bondad de ajuste del modelo, se calculó el coeficiente de determinación (R^2) y se determinó el error estándar de las medias (DMA). Los valores de R^2 deberían estar cerca de 1 y los valores de DMA entre los valores predichos y observados deben ser lo más pequeños posibles (Bas y Boyaci, 2007).

En este caso, el valor-P para la falta de ajuste es mayor que 0,05 en ambos modelos. El coeficiente de determinación R^2 fue adecuado para $RAMT_0$ ya que explica el 79% de la variabilidad de los datos. La DMA fue aceptable. Para RML_0 , el R^2 sólo explica el 52% de la variabilidad de los datos, pero el valor de DMA es bajo. Basado entonces en ambos

parámetros de ajuste de los modelos, se propone aceptar los mismos para representar los datos experimentales.

Los efectos estimados de las variables independientes sobre la respuesta $RAMT_0$ en orden decreciente de importancia se presentan en la Figura 4.1 mediante el Diagrama de Pareto y el gráfico de efectos principales. La concentración de ácido peracético y el tiempo de tratamiento aplicado afectan significativamente la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales. Como era de esperar, a medida que aumenta tanto la concentración de APA como el tiempo de nebulización se produce un aumento de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos en el día de procesamiento.

Figura 4.1. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales (b) para la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales ($RAMT_0$) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0

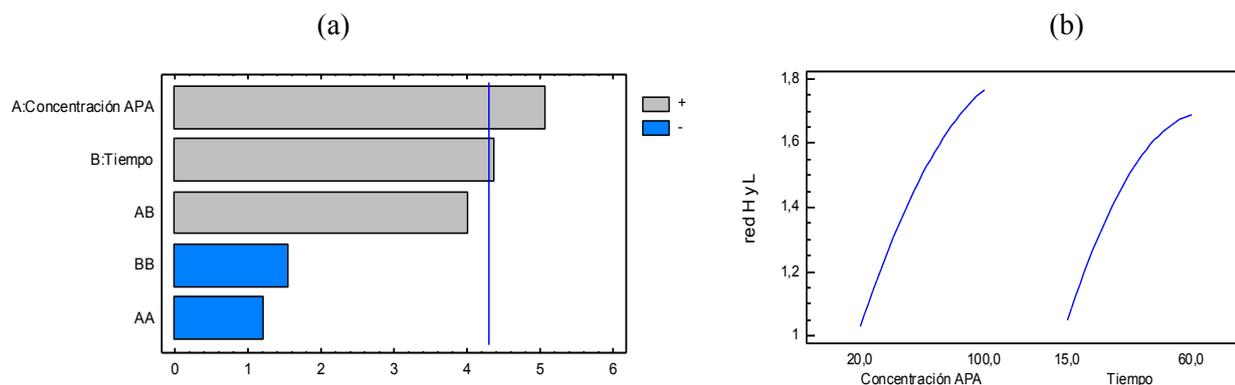


En la Figura 4.2 se presentan el Diagrama de Pareto de las variables independientes y el gráfico de efectos principales sobre la respuesta RML_0 .

La concentración de ácido peracético y el tiempo de tratamiento aplicado afectan significativamente la reducción de mohos y levaduras.

Como puede apreciarse, la variable independiente Concentración (C), presentó un efecto de mayor magnitud e importancia que el tiempo tanto para $RAMT_0$ como para RML_0 (Fig. 4.1 y 4.2).

Figura 4.2. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales (b) para la reducción de mohos y levaduras (RML) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0



Los modelos reducidos, eliminando los términos no significativos, se presentan en las Ecuaciones 4.1 y 4.2 para $RAMT_0$ y RML_0 , respectivamente.

$$RAMT_0 = 0,618 - 0,019 C + 0,017 t + 0,0003 C^2 \quad (4.1)$$

$$RML_0 = 0,24 + 0,009 C + 0,014 t \quad (4.2)$$

Donde C es la concentración de ácido peracético ($\mu\text{L/L}$) y t es el tiempo de tratamiento (min).

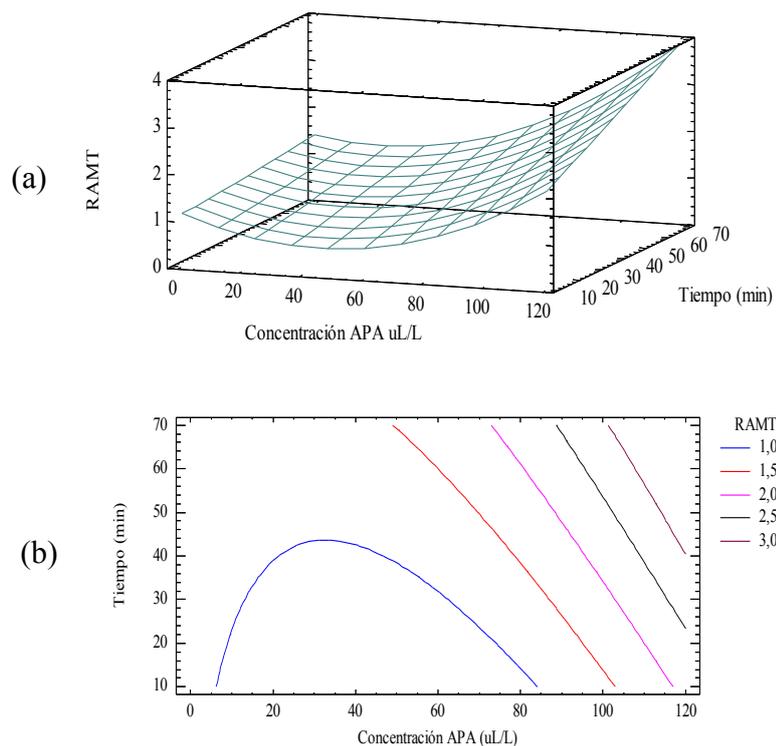
El modelo $RAMT_0$ es función de la concentración (C) a través de su término lineal y cuadrático (C^2) y del tiempo (t) a través de su término lineal. Para el modelo RML_0 , éste se vio afectado por la concentración (C) y el tiempo (t) a través de los términos lineales.

Las superficies de respuestas y gráficos de contorno para $RAMT_0$ y RML_0 se muestran en la Figura 4.3 y Figura 4.4, respectivamente.

En las mismas puede apreciarse que tanto el aumento en la concentración de APA como del tiempo de tratamiento reducen significativamente los niveles de microorganismos aerobios mesófilos totales y de mohos y levaduras. Se observa que las máximas reducciones de la carga microbiana corresponden a la máxima concentración de APA y tiempos aplicados (Fig. 4.3a y Fig 4.4a).

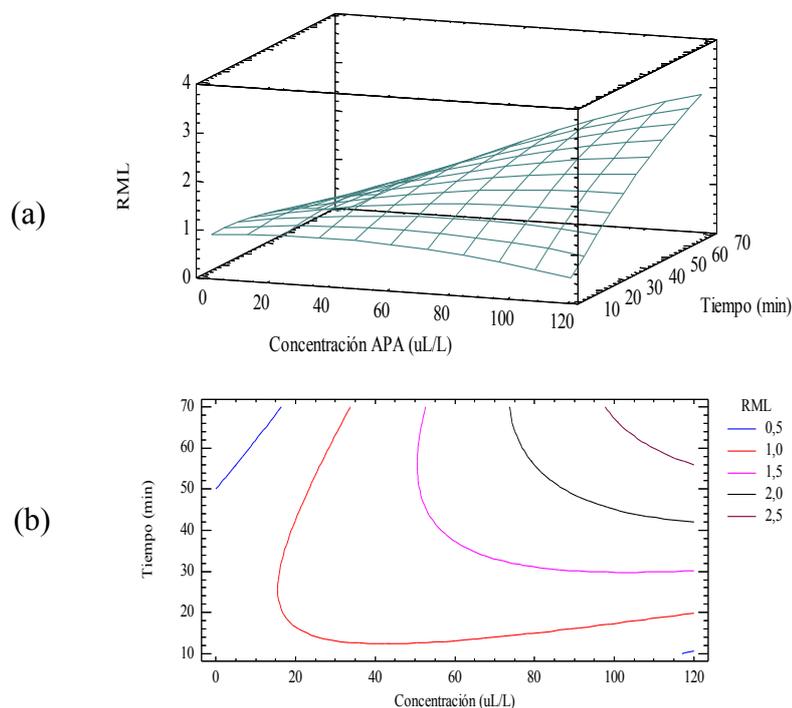
Para el caso de $RAMT_0$, con el incremento del tiempo de tratamiento, se observa menor reducción con bajas concentraciones de APA, sin embargo a altas concentraciones de APA el aumento del tiempo incrementa significativamente la reducción que puede lograrse.

Figura 4.3. Superficie de respuesta (a) y gráfico de contorno (b) para la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales ($RAMT_0$) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0



En el caso de RML_0 se puede observar que, para cualquier concentración APA y tiempos de aplicación cortos, se mantiene prácticamente constante (aproximadamente 1 ciclo log). Además, para concentraciones de APA bajas, la RML_0 es constante para todos los tiempos de tratamiento. Sin embargo, el tratamiento aumenta su capacidad de desinfección (mayor a 2,0 ciclos log) si se emplean altas concentraciones y altos tiempos de tratamiento.

Figura 4.4. Superficie de respuestas (a) y gráfico de contorno (b) para la reducción de mohos y levaduras (RML_0) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0



Vardar *et al.* (2012) estudiaron la aplicación por nebulización de dióxido de cloro, hipoclorito de sodio, peróxido de hidrogeno, ácido cítrico y etanol por nebulización para disminuir las enfermedades postcosecha de frutilla. Este estudio demostró la eficacia de los desinfectantes aplicados por nebulización debido a que redujeron significativamente el porcentaje de frutas infectadas con mohos, el número total de microorganismos en la superficie de la fruta y en el aire de la cámara de almacenamiento. La aplicación de peróxido de hidrógeno con una concentración de $2000 \mu\text{L/L}$ durante 60 min redujo aproximadamente en 1,5 y 2 órdenes logarítmicos la población de bacterias y hongos de la superficie de la fruta, respectivamente.

En el presente trabajo de tesis, estas reducciones se alcanzan con una concentración de $80 \mu\text{L/L}$ de APA durante 45 min para aerobios mesófilos totales y en igual concentración de APA pero durante 60 min para mohos y levaduras.

La máxima reducción predicha de microorganismos aerobios mesófilos totales obtenida por la nebulización con APA en el día 0, se produce en la más alta concentración del diseño (116,6 $\mu\text{L/L}$) y mayor tiempo de aplicación (69,3 min), alcanzando 3,6 órdenes logarítmicos.

La mayor eficacia lograda en el presente trabajo de tesis, podría deberse a que el ácido peracético es un agente antimicrobiano más potente que el peróxido de hidrógeno (Baldry, 1983), siendo efectivo a bajas concentraciones contra un amplio espectro de microorganismos. Es eficaz en presencia de materia orgánica, aspecto importante en el caso de frutas que no fueron sometidas a un lavado previo a la desinfección. Por otro lado, presenta gran actividad a pH ácido (Baldry, 1983). Además, como se mencionó, la solución utilizada en nuestro caso de 5% APA, contiene peróxido de hidrógeno 20% y ácido acético, y ambos también tienen propiedades antimicrobianas (Vandekinderen *et al.* 2009).

Van de Velde *et al.* (2012) trabajaron con frutillas variedad *Camarosa* ensayando la operación de lavado y desinfección por inmersión con diferentes concentraciones de ácido peracético (0 – 120 ppm), tiempo (10 – 120 s) y temperatura (4 – 40°C). Según este estudio se puede predecir una reducción de microorganismos mesófilos totales de 2,6 órdenes logarítmicos en las condiciones extremas del diseño de lavado-desinfección (100 mg/L APA, 40°C y 120 s).

Los resultados obtenidos en la presente tesis muestran que mediante la aplicación del ácido peracético por nebulización, se logró una reducción mayor del número de microorganismos presentes sobre las frutillas. La inactivación del microorganismo se logra mediante el contacto directo entre éste y el desinfectante; si los microorganismos se ubican en sitios lesionados o en irregularidades presentes en la superficie de las frutas, los desinfectantes acuosos pueden ser ineficaces para destruirlos. La ubicación en sitios inaccesibles puede ser uno de los factores limitantes de la eficacia del lavado (Saperset *al.*2001; Ohet *al.*2005a) y la aplicación de un desinfectante por nebulización podría mejorar esta limitación.

4.2.2 Efecto de la nebulización de ácido peracético sobre la reducción de la carga microbiana de frutilla luego de 7 días de almacenamiento a 2°C (Día 7).

Tal como se mencionó, el recuento inicial de microorganismos mesófilos aerobios totales en las muestras no tratadas (muestras control) fue 4,5 log UFC/g. Luego de 7 días de almacenamiento a 2°C este recuento fue del mismo orden que en el día 0, es decir que la carga total de este grupo microbiano no aumentó durante el período de conservación refrigerado a esa temperatura.

Para el caso de mohos y levaduras, en cambio, los recuentos fueron 3,4 log UFC/g y 5 log UFC/g para el día 0 y 7, respectivamente. Estos resultados muestran un incremento de 1,6 log en esta población microbiana después del almacenamiento en frío en las muestras sin tratamiento desinfectante (muestras control).

Los hongos son los principales responsables del deterioro postcosecha de las frutillas. Son capaces de crecer a temperaturas bajas de hasta 0°C, por lo que la refrigeración retarda pero no previene el deterioro de la fruta (ICMSF, 2006). Por lo tanto, es importante reducir su presencia en productos frescos.

En función de esta situación, resulta importante estudiar la efectividad de la nebulización inicial del APA luego de 7 días de realizado el tratamiento. Abadías *et al.* (2011) señala que la eficacia de los métodos de descontaminación se refleja en la reducción microbiológica obtenida y, lo que es más importante, en el mantenimiento durante el almacenamiento.

Los resultados experimentales de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales y de mohos y levaduras de las frutillas nebulizadas, luego de 7 días de conservación a 2°C se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Resultados experimentales de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales ($RAMT_7$) y de mohos y levaduras (RML_7) de frutillas nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C

APA (uL/L)	Tiempo (min)	$RAMT_7$ (- log N_7/N_{C7})	RML_7 (- log N_7/N_{C7})
100	15	0,87	1,18
20	15	0,97	1,36
20	60	2,42	4,13
60	5,7	1,66	0,39
60	37,5	0,38	3,35
60	37,5	0,98	3,65
3,4	37,5	0,58	0,37
60	37,5	0,59	2,91
60	69,3	0,92	3,18
100	60	2,55	4,13
116,6	37,5	2,98	4,00

APA: ácido peracético; $RAMT_7$ = reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales en el día 7; RML_7 = reducción de mohos y levaduras en el día 7; N_7 : número de microorganismos (UFC/g) de las frutillas tratadas en el día 7; N_{C7} : número de microorganismos (UFC/g) de las muestras control en el día 7.

Las pruebas de diagnóstico basadas en los residuos se presentan en la Figura 7.2 del Anexo para $RAMT_7$ y RML_7 después de 7 días de conservación a 2°C. De ellas se concluye que se cumple adecuadamente con las suposiciones de normalidad, homogeneidad de la variancia e independencia de los datos experimentales necesarias para la aplicación del ANOVA.

En la Tabla 4.5 se muestra el análisis ANOVA correspondiente a los modelos predictivos de $RAMT_7$ y RML_7 para las muestras en el día 7.

Tabla 4.5. Análisis ANOVA de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales ($RAMT_7$) y de mohos y levaduras (RML_7) de frutillas nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C

Fuente	Gl	$RAMT_7$		RML_7	
		Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P
A:Concentración APA ($\mu\text{L/L}$)	1	1,5	0,0578	3,1	0,0423
B:Tiempo (min)	1	0,5	0,1367	11,7	0,0117
AA	1	2,1	0,0418	0,8	0,1358
AB	1	0,01	0,7420	0,008	0,8315
BB	1	0,7	0,1058	1,9	0,0657
Falta de ajuste	3	3,7	0,0716	4,9	0,0785
Error puro	2	0,2		0,3	
R^2		0,52		0,76	
DMA (%)		13,2		15,0	

Términos significativos $p \leq 0,05$

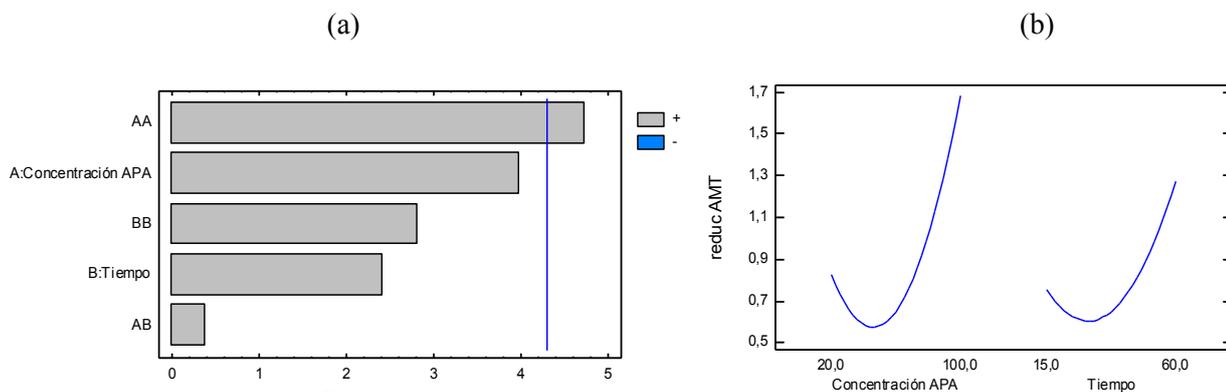
Gl: grados de libertad; APA: ácido peracético; DMA: desviación media absoluta; $RAMT_7$ = reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales en el día 7; RML_7 = reducción de mohos y levaduras en el día 7.

El valor-P para la falta de ajuste es mayor que 0,05 por lo que los modelos obtenidos describen en forma adecuada los datos observados al nivel de confianza del 95,0%.El coeficiente de determinación (R^2) para RML_7 fue aceptable. Con respecto a las DMA resultaron aceptables (13%) para $RAMT_7$ y para RML_7 (15%).

En la Figura 4.5 se observan los efectos estimados de las variables independientes sobre las respuestas, mediante el diagrama de Pareto, y el grafico de efectos principales para la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales. La concentración de ácido peracético utilizada en el día del tratamiento continúa afectando significativamente la

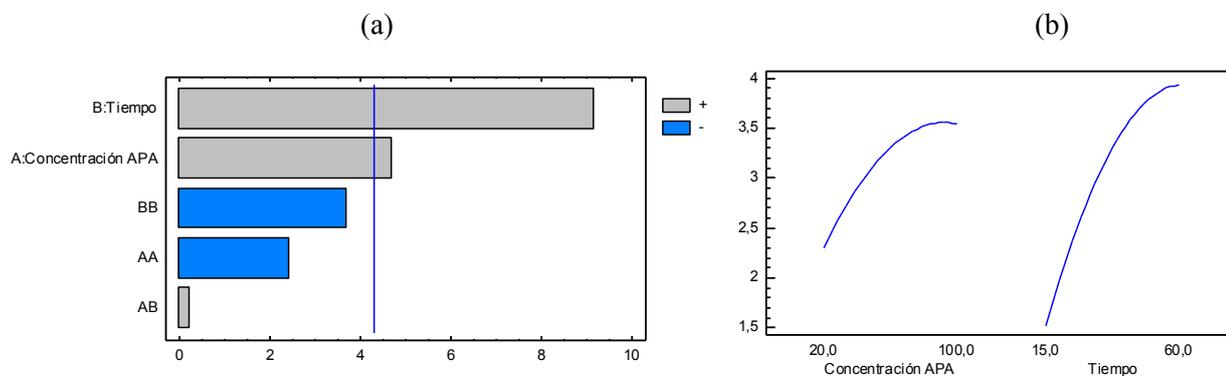
reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales que estarán presentes luego de 7 días de almacenamiento.

Figura 4.5. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales (b) para la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales ($RAMT_7$) de frutillas nebulizadas con APA a los 7 días de conservación a 2°C



En la Figura 4.6 se muestran los efectos estimados de las variables independientes mediante el Diagrama de Pareto, y el gráfico de efectos principales para la reducción de mohos y levaduras. La concentración de ácido peracético y el tiempo de tratamiento aplicado inicialmente afectan significativamente su reducción, siendo el tiempo el factor de mayor importancia y luego, la concentración.

Figura 4.6. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales (b) para la reducción de mohos y levaduras (RML_7) de frutillas nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C



Las ecuaciones de los modelos reducidos, sólo los términos significativos, para las muestras día 7 se presentan en las Ecuaciones 4.3 y 4.4 para $RAMT_7$ y RML_7 , respectivamente.

$$RAMT_7 = 1,5 - 0,027 C + 0,0003 C^2 \quad (4.3)$$

$$RML_7 = -0,34 + 0,015 C + 0,054 t \quad (4.4)$$

Donde C es la concentración de ácido peracético ($\mu\text{L/L}$) y t es el tiempo de tratamiento (min).

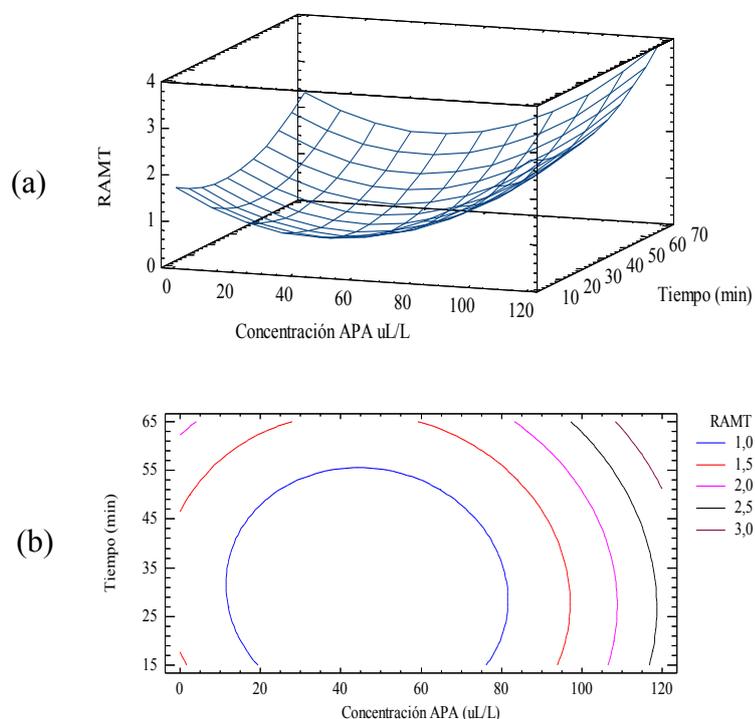
El modelo $RAMT_7$ se vio afectado por la concentración (C) a través de los términos lineal y cuadrático (C^2). Para el modelo RML_7 , éste se vio afectado por la concentración (C) y el tiempo (t) a través de los términos lineales.

La más alta $RAMT_i$ predicha, usando los modelos reducidos (Ec.4.1 y Ec.4.3), son 3,6 y 2,4 log en el día 0 y 7, respectivamente, obtenidos en las máximas condiciones de diseño de nebulización estudiado (116,6 $\mu\text{L/L}$ y 69,3 min). Como se puede observar, la $RAMT_7$ es menor después de 7 días de almacenamiento, pero se mantiene en adecuados niveles de reducción.

Las predicciones para RML_i (Ec.4.2 y Ec.4.4) en las mismas condiciones, son 2,3 y 5,2 log en el día 0 y 7, respectivamente. Los últimos resultados mostraron mayores reducciones en mohos y levaduras con respecto a la muestra control, después de 7 días de almacenamiento, indicando una acción residual del APA en las frutas nebulizadas, ya que las muestras control mostraron un aumento del recuento microbiano de 1,6 log durante el almacenamiento en frío.

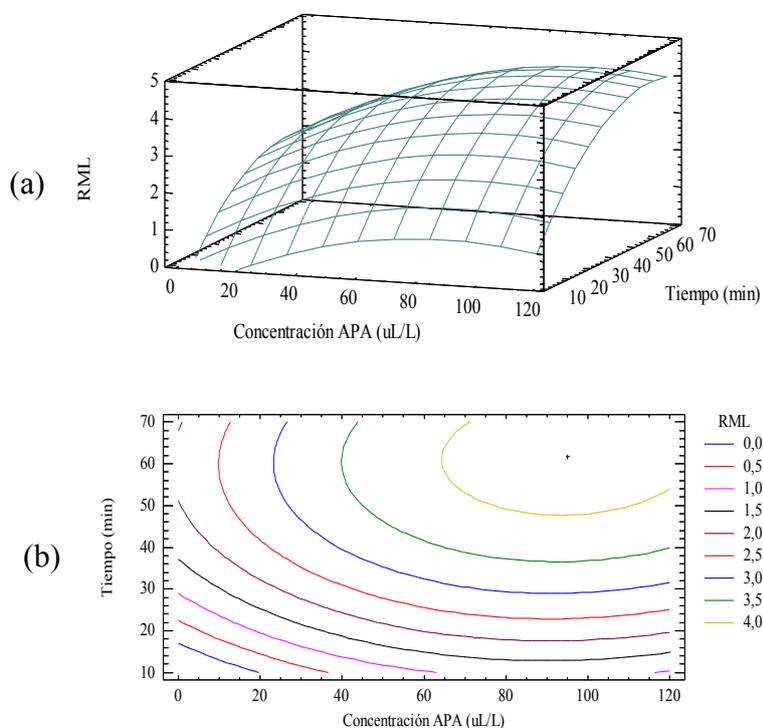
Las superficies de respuesta y gráficos de contorno para $RAMT_7$ y RML_7 se muestran en la Figura 4.7 y Figura 4.8, respectivamente.

Figura 4.7. Superficie de respuesta (a) y gráfico de contorno (b) para la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales ($RAMT_7$) de frutillas nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C



A medida que se aplica una mayor concentración de ácido peracético en el tratamiento inicial, se inhibe de manera más significativa el crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos totales durante el período de almacenamiento refrigerado. Además, la gráfica de contornos (Figura 4.8b) permite observar el conjunto de valores de concentración y tiempo que permiten lograr determinadas reducciones en el proceso de desinfección. Por ejemplo, reducciones mayores a 4,5 log.

Figura 4.8. Superficie de respuesta (a) y gráfico de contorno (b) para la reducción de mohos y levaduras (RML_7) de frutillas nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C



Otros autores informaron acerca de la capacidad del ácido peracético de mantener en bajos niveles la carga microbiana de frutas y vegetales frescos. Silveira *et al.* (2008) comprobaron que el ácido peracético aplicado por inmersión (concentración 68 mg/L) logró una reducción de microorganismos aerobios mesófilos de 0,9 ordenes logarítmicos más que el cloro en melones luego de 10 días de almacenamiento a 5°C . En el trabajo citado, el recuento de mohos y levaduras no presentó diferencias en el recuento luego del tratamiento con ácido peracético y luego del almacenamiento, permaneciendo en bajos niveles.

En una investigación realizada por Martínez-Sánchez *et al.* (2006) en hojas de rúcula fresca, se demostró que el ácido peracético incorporado al agua de lavado en 300mL/L, redujo en 1 orden logarítmico el número de mohos y levaduras el día del tratamiento y resultó eficaz para inhibir el crecimiento durante el período de almacenamiento de 12 días a 4°C .

4.3 Efecto de la nebulización de APA sobre los parámetros de color de la frutilla

Se determinaron los parámetros de color L^* (luminosidad), a^* (rojo / verde), b^* (amarillo / azul), C^*_{ab} (cromaticidad) y h_{ab} (tonicidad) para describir los cambios de color de la frutilla.

4.3.1 Efecto de la nebulización de APA sobre los parámetros de color de la frutilla en el día de aplicación (Día 0)

Los parámetros de color de las frutillas frescas el día 0 (muestras control) fueron $27,5 \pm 0,3$; $31,6 \pm 0,4$; $13,1 \pm 0,4$; $34,8 \pm 0,6$ y $24,0 \pm 0,2$ para L^*_{c0} , a^*_{c0} , b^*_{c0} , C^*_{abc0} y h_{abc0} respectivamente.

Las pruebas de diagnóstico basadas en los residuos demuestran que se cumple adecuadamente con las suposiciones de normalidad, homogeneidad de la variancia e independencia de los datos experimentales. Las pruebas de diagnóstico se presentan en la Figura 7.3 del Anexo para los cambios en los parámetros de color de las frutillas en el día 0.

Los resultados experimentales de los cambios en los parámetros de color (δL_0^* , δa_0^* , δb_0^* , δC^*_{ab0} y δh_{ab0}) obtenidos después de la desinfección por nebulización con APA en el día 0 se muestran en la Tabla 4.6 y el análisis ANOVA de los modelos correspondientes, en la Tabla 4.7.

Tabla 4.6. Resultados experimentales de los cambios en los parámetros de color (δL_0^* , δa_0^* , δb_0^* , δC_{ab0}^* y δh_{ab0}) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0

APA ($\mu\text{L/L}$)	Tiempo (min)	δL_0^*	δa_0^*	δb_0^*	δC_{ab0}^*	δh_{ab0}
100	15	-1,5	-6,9	-7,1	-8,4	-8,80
20	15	3,5	-3,9	1,6	-2,6	6,70
20	60	9,2	0,6	-3,3	-0,7	-7,13
60	5,7	-0,7	-3,5	-7,2	-4,8	-4,32
60	37,5	-1,0	-2,4	-8,3	-3,8	-11,35
60	37,5	-3,5	-1,7	-9,6	-4,6	-3,74
3,4	37,5	-0,8	-0,6	0,3	-0,4	0,38
60	37,5	-1,2	-2,8	-7,4	-4,0	-5,16
60	69,3	0,2	-0,7	-4,5	-1,6	-1,31
100	60	-0,3	-3,9	-5,6	-5,3	-8,08
116,6	37,5	-4,2	-3,0	-6,0	-3,7	-2,58

APA: ácido peracético; δL_0^* : cambio en el parámetro L^* ; δa_0^* : cambio en el parámetro a^* ; δb_0^* : cambio en el parámetro b^* ; δC_{ab0}^* : cambio en el parámetro C_{ab}^* ; δh_{ab0} : cambio en el parámetro h^* en el día 0.

Tabla 4.7. Análisis ANOVA de los cambios en los parámetros de color (δL_0^* ; δa_0^* ; δb_0^* ; δC_{ab0}^* ; δh_{ab0}) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0

Fuente	Gl	δL_0^*		δa_0^*		δb_0^*		δC_{ab0}^*		δh_{ab}	
		Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P
A:Concentración APA ($\mu\text{L/L}$)	1	46,6	0,0390	14,8	0,0203	49,5	0,0238	28,3	0,0061	53,2	0,2132
B:Tiempo (min)	1	8,3	0,1730	16,4	0,0184	0,02	0,9059	11,3	0,0149	9,8	0,5201
AA	1	2,9	0,3407	0,1	0,6020	50,1	0,0235	2,3	0,0683	28,1	0,3201
AB	1	5,0	0,2467	0,5	0,3103	10,2	0,1016	0,4	0,2863	52,9	0,2140
BB	1	19,3	0,0870	0,5	0,3366	12,4	0,0864	0,02	0,7631	10,7	0,5042
Falta de ajuste	3	49,3	0,1069	8,6	0,0988	8,2	0,3245	9,4	0,0528	67,7	0,4465
Error puro	2	3,7		0,6		2,4		0,3		32,7	
R ²		0,60		0,78		0,91		0,81		0,60	
DMA (%)		3,0		3,5		0,6		17,7		19,6	

Términos significativos $p \leq 0,05$

Gl: grados de libertad; APA: ácido peracético; DMA: desviación media absoluta; δL_0^* : cambio en el parámetro L*; δa_0^* : cambio en el parámetro a*; δb_0^* : cambio en el parámetro b*; δC_{ab0}^* : cambio en el parámetro C*_{ab}; δh_{ab0} : cambio en el parámetro h_{ab} en el día 0.

Los modelos presentaron una falta de ajuste no significativa ($P > 0,05$) y el R^2 y los valores DMA fueron aceptables.

El análisis ANOVA prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En el caso de δh_{ab0} , se observa que ningún efecto tiene un valor-P menor que 0,05, indicando que ni el tiempo de nebulización ni la concentración de ácido peracético afectan significativamente los cambios en el ángulo de tono.

En la Figura 4.9 se presentan los efectos estimados de las variables independientes en orden decreciente de importancia y los efectos principales sobre las respuestas para los cambios en los parámetros de color (δL_0^* , δa_0^* , δb_0^* y δC_{ab0}^*).

Las ecuaciones del modelo reducido para δL_0^* , δa_0^* , δb_0^* y δC_{ab0}^* para las frutillas en el día 0 se presentan en las Ecuaciones 4.5, 4.6, 4.7 y 4.8, respectivamente.

$$\delta L_0^* = 3,6 - 0,06 C \quad (4.5)$$

$$\delta a_0^* = -2,9 - 0,03 C + 0,06 t \quad (4.6)$$

$$\delta b_0^* = 2,4 - 0,3 C + 0,002 C^2 \quad (4.7)$$

$$\delta C_{ab0}^* = -2,8 - 0,05 C + 0,05 t \quad (4.8)$$

El modelo δL_0^* se vio afectado por la concentración (C) de APA a través del término lineal. Para los modelos δa_0^* y δC_{ab0}^* , éstos se vieron afectados por la concentración (C) y el tiempo (t) a través de los términos lineales mientras que para el modelo δb_0^* , por la concentración a través del término lineal (C) y cuadrático (C^2).

Las superficies de respuestas y gráficos de contorno para los cambios en los parámetros de color (δL_0^* , δa_0^* , δb_0^* y δC_{ab0}^*) se muestran en la Figura 4.10

Figura 4.9. Efectos estimados(a) y efectos principales (b) de las variables independientes sobre las respuestas cambios en los parámetros de color (δL_0^* , δa_0^* , δb_0^* y δC_{ab0}^*) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0

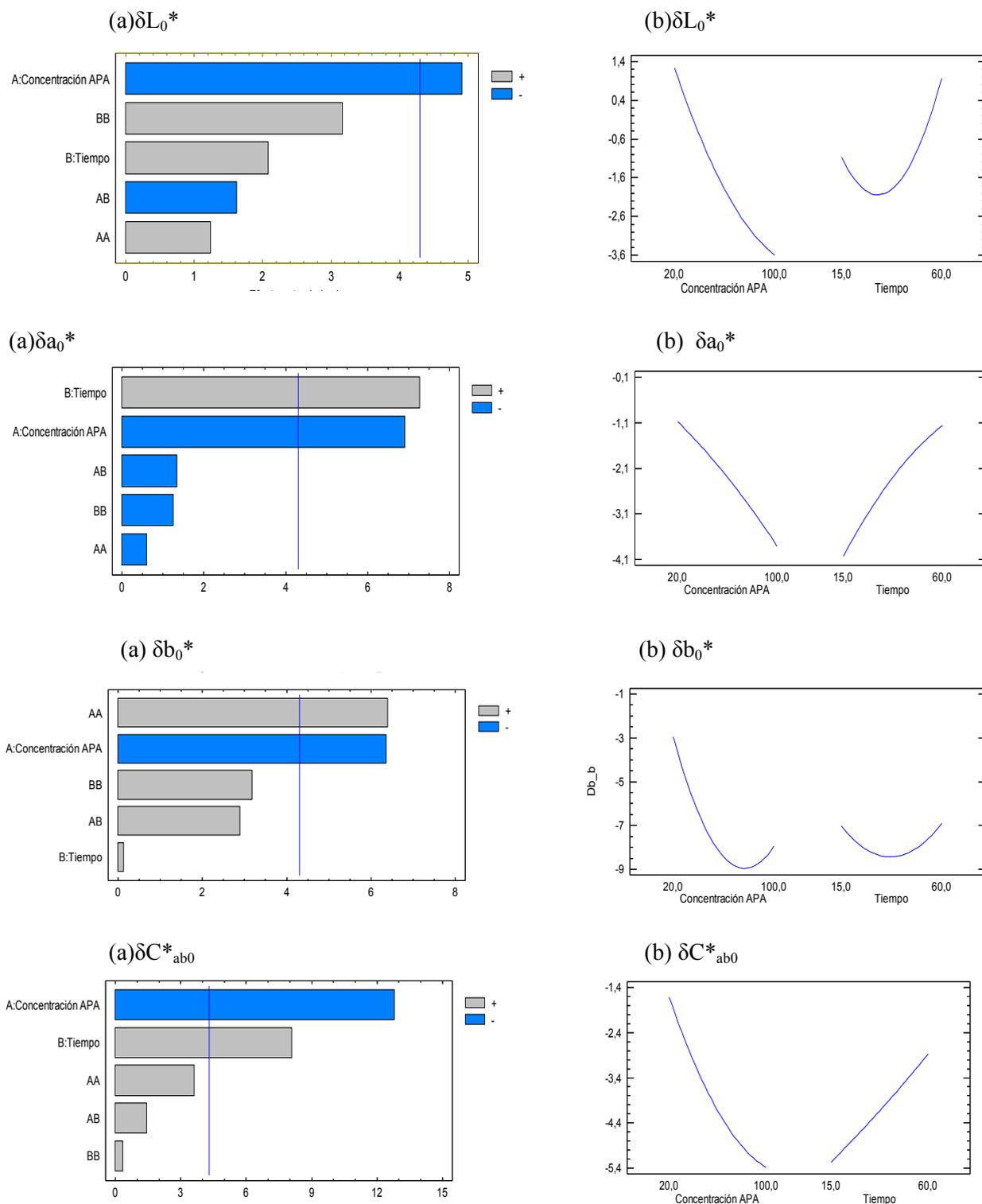
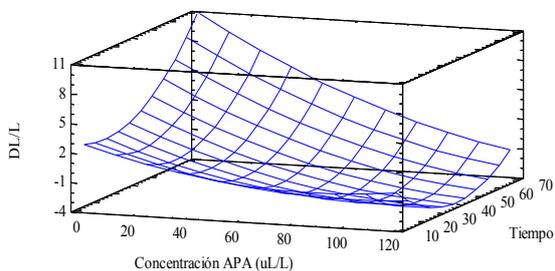
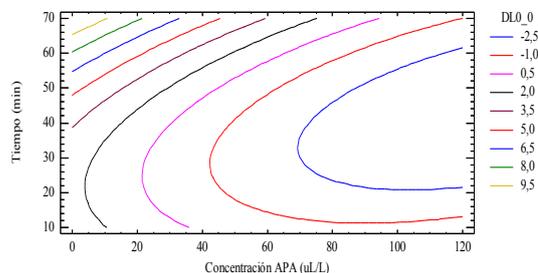


Figura 4.10. Superficie de respuestas (a) y gráficos de contorno(b) para los cambios en los parámetros de color (δL_0^* , δa_0^* , δb_0^* y δC^*_{ab0}) de frutillas nebulizadas con APA en el día 0

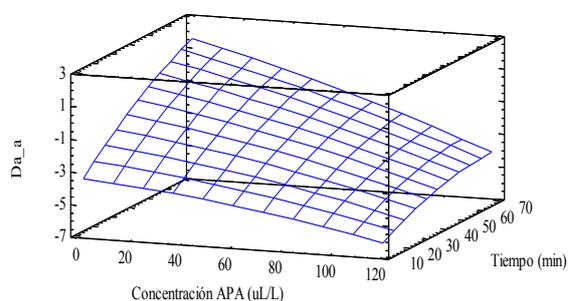
(a) δL_0^*



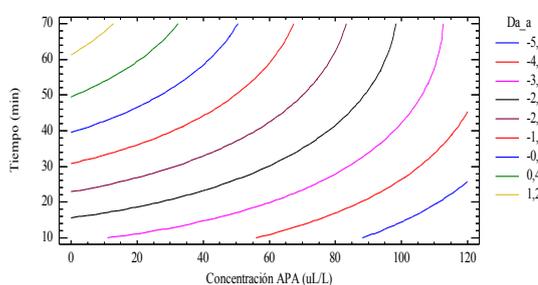
(b) δL_0^*



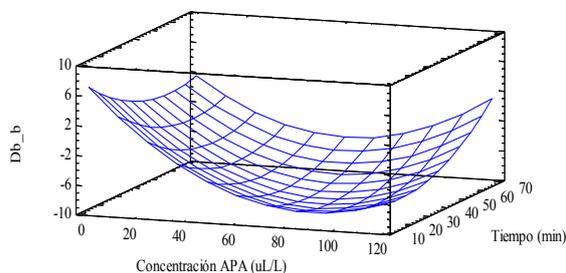
(a) δa_0^*



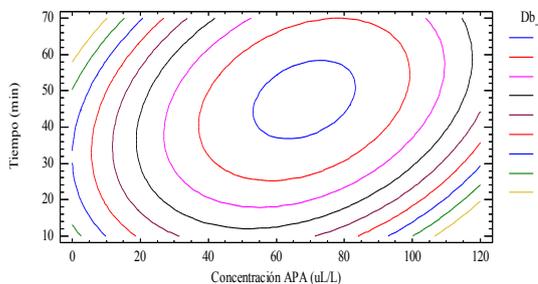
(b) δa_0^*



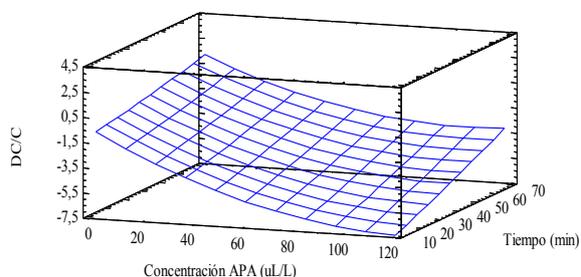
(a) δb_0^*



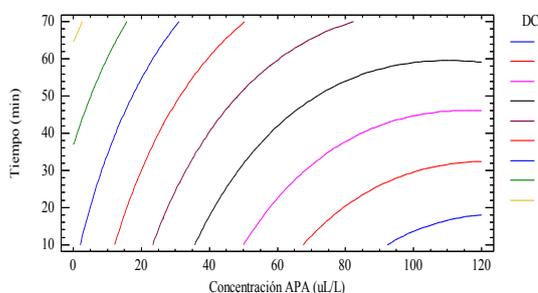
(b) δb_0^*



(a) δC^*_{ab0}



(b) δC^*_{ab0}



Dependiendo de las condiciones de tratamiento, se obtuvieron valores positivos y negativos de δL_0^* , lo que indica que las frutillas nebulizadas fueron más claras o más

oscuras que las muestras no tratadas, respectivamente. En la figura 4.10 se observa que δL^*_0 disminuye a medida que aumenta la concentración de APA.

Se obtuvieron frutas más claras y luminosas cuando se trataron con APA a una concentración baja (20 $\mu\text{L/L}$), tanto en tiempos cortos (15 min) como largos (60 min). La oxidación de las antocianinas totales como consecuencia de la aplicación de APA por nebulización podría justificar los frutos más claros y luminosos obtenidos en este dominio experimental. Según Castañeda Ovando *et al.* (2009) las antocianinas son pigmentos responsables del color brillante de las frutillas frescas.

Por el contrario, Van de Velde *et al.* (2013) comprobaron que el lavado-desinfección con APA mediante inmersión de frutillas recién cortadas produjo frutos más claros cuando se lavaron con concentraciones superiores a 80 mg/L durante tiempos mayores a 100 segundos, correlacionándolo con menores retenciones de antocianinas totales determinadas en esas condiciones.

Por otro lado, cuando las frutas se nebulizaron con concentraciones de APA superiores a 20 $\mu\text{L/L}$ las frutillas se volvieron más oscuras ($\delta L^* < 0$). Esta situación fue probablemente causada por un fenómeno de oscurecimiento que tuvo lugar en la superficie de la fruta después de la nebulización con APA. La aplicación de antimicrobianos que poseen fuertes propiedades oxidantes, como el APA, pueden causar efectos nocivos sobre el color de las frutas y hortalizas mediante la inducción de oscurecimiento o decoloración del tejido vegetal (Vandekinderen *et al.* 2008).

En cuanto a los cambios de a^* , b^* y C^*_{ab} , de la figura 4.10 se ve que δa^* aumenta cuando aumenta el tiempo de aplicación y disminuye cuando disminuye la concentración de APA. Con respecto a δb^* , se observa que disminuye cuando aumenta la concentración hasta un valor de 80 $\mu\text{L/L}$ de APA, y luego permanece constante. El cambio en el parámetro C^*_{ab}

disminuye con el aumento de la concentración de APA, pero aumenta con el tiempo de aplicación.

Los valores negativos obtenidos en δa_0^* , δb_0^* y δC_{ab0}^* en todo el dominio experimental después de los tratamientos, revelan que las frutas son menos rojas, menos amarillas y con colores menos intensos. Estos resultados se correlacionarían con las mayores pérdidas en el contenido total de antocianinas cuando aumenta la concentración de ácido peracético en la nebulización, como está demostrado en los resultados obtenidos por Van de Velde *et al.* (2016).

4.3.1 Efecto de la nebulización de APA sobre los parámetros de color en las frutillas luego de 7 días de almacenamiento a 2°C (Día 7)

Los parámetros de color de las frutillas de control en el día 7 fueron $29,5 \pm 0,4$; $28,0 \pm 0,3$; $12,2 \pm 0,3$; $30,6 \pm 0,4$ y $26,25 \pm 0,3$ para L_{C7}^* , a_{C7}^* , b_{C7}^* , C_{abc7}^* y h_{ab7} , respectivamente.

De acuerdo a los resultados, el efecto del almacenamiento de las frutillas a 2 ° C durante 7 días induce cambios leves en los atributos de color. El aumento del valor de L^* y h_{ab} y la disminución de los valores de a^* , b^* y C_{ab}^* después de 7 días indican que las frutas fueron más claras, menos rojas, menos amarillas y con colores menos intensos.

Estos cambios pueden estar relacionados con la propia senescencia de la fruta después de una semana de almacenamiento refrigerado y con la ligera disminución en el contenido de antocianinas totales (Van de Velde *et al.* 2016).

Los resultados experimentales de los cambios en los parámetros de color obtenidos después de la desinfección de nebulización con APA en el día 7 se muestran en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Resultados experimentales de los cambios en los parámetros de color (δL_7^* , δa_7^* , δb_7^* , δC_{ab7}^* , δh_{ab7}) de frutillas nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C

APA ($\mu\text{L/L}$)	Tiempo (min)	δL_7^*	δa_7^*	δb_7^*	δC_{ab7}^*	δh_{ab7}
100	15	-17,7	-3,2	-3,6	-3,3	23,4
20	15	3,2	17,7	28,1	19,4	25,4
20	60	1,1	12,7	10,9	12,4	23,2
60	5,7	5,8	3,6	9,9	4,6	22,5
60	37,5	-5,5	-8,5	-13,6	-9,3	22,3
60	37,5	-9,0	-5,0	-10,2	-6,0	21,9
3,4	37,5	-6,8	-6,5	-20,7	9,1	22,7
60	37,5	-6,2	-10,2	-18,4	-11,5	21,5
60	69,3	-8,0	-4,4	-10,4	-5,3	22,2
100	60	-6,8	-2,7	0,1	-2,2	24,1
116,6	37,5	-19	-9,3	-12,8	-10	25,4

APA: ácido peracético; δL_7^* : cambio en el parámetro L^* ; δa_7^* : cambio en el parámetro a^* ; δb_7^* : cambio en el parámetro b^* ; δC_{ab7}^* : cambio en el parámetro C_{ab}^* ; δh_{ab7} : cambio en el parámetro h_{ab} , en el día 7.

Las pruebas de diagnóstico basadas en los residuos demuestran que se cumple adecuadamente con las suposiciones de normalidad, homogeneidad de la variancia e independencia de los datos experimentales. Las pruebas de diagnóstico se presentan en la Figura 7.4 del Anexo para los cambios en los parámetros de color de las frutillas en el día 7.

En la tabla 4.9 se presenta el análisis ANOVA de los modelos correspondientes a los cambios en los parámetros de color (δL_7^* , δa_7^* , δb_7^* , δC_{ab7}^* y δh_{ab7}). Todos presentaron una falta de ajuste no significativa ($P > 0,05$) y el R^2 y valores DMA fueron aceptables.

La respuesta δh_{ab7} presentó el mismo comportamiento que en el día de aplicación del APA, ningún efecto tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que las variables operativas estudiadas no afectan significativamente este parámetro de color.

En la Figura 4.11 se presentan los efectos estimados de las variables independientes en orden decreciente de importancia mediante el Diagrama de Pareto y los efectos principales, sobre las respuestas para los cambios en los parámetros de color (δL_7^* , δa_7^* , δb_7^* y δC_{ab7}^*) respectivamente.

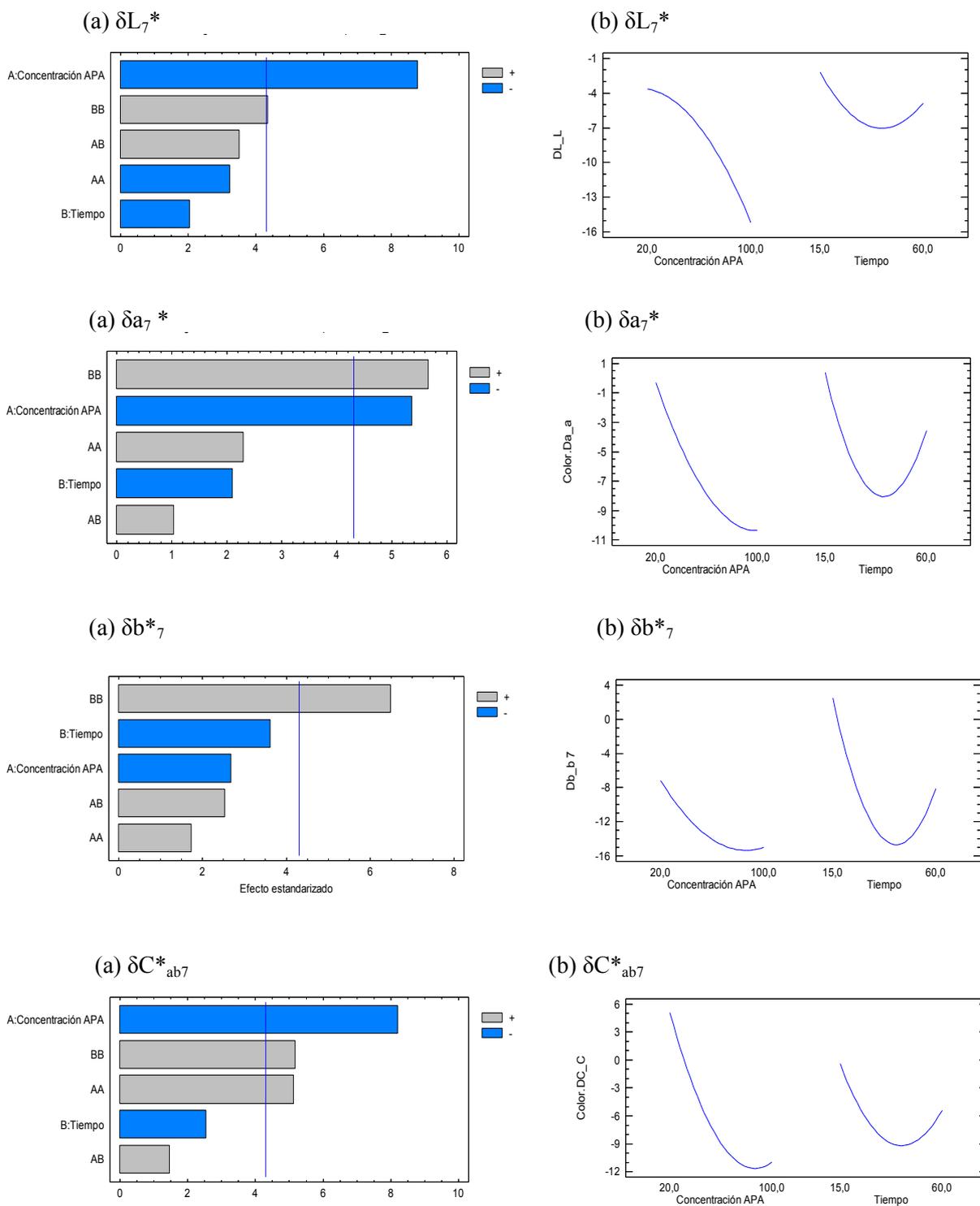
Tabla 4.9. Análisis ANOVA de los cambios en los parámetros de color (δL_7^* , δa_7^* , δb_7^* , δC_{ab7}^* y δh_{ab7}) de frutillas nebulizadas después de 7 días de conservación a 2°C

Fuente	Gl	δL_0^*		δa_0^*		δb_0^*		δC_{ab0}^*		δh_{ab}	
		Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P
A:Concentración APA($\mu\text{L/L}$)	1	265,1	0,0127	202,6	0,0330	122,9	0,1150	517,0	0,0145	0,4	0,2513
B:Tiempo (min)	1	14,4	0,1774	31,2	0,1695	223,8	0,0685	49,5	0,1262	0,5	0,2311
AA	1	35,6	0,0842	37,2	0,1479	52,2	0,2255	202,3	0,0359	2,6	0,0560
AB	1	42,2	0,0725	7,5	0,4086	109,3	0,1266	16,4	0,2810	2,1	0,0684
BB	1	64,8	0,0491	225,4	0,0298	718,2	0,0229	205,7	0,0353	2,3	0,0643
Falta de ajuste	3	124,5	0,0773	347,7	0,0577	991,4	0,0592	118,7	0,1665	5,4	0,0821
Error puro	2	6,9		14,1		35,7		15,3		0,3	
R ²		0,78		0,56		0,50		0,87		0,40	
DMA (%)		9,6		4,9		4,0		16,8		2,3	

Términos significativos $p \leq 0,05$

Gl: grados de libertad; APA: ácido peracético; DMA: desviación media absoluta; δL_7^* : cambio en el parámetro L*; δa_7^* : cambio en el parámetro a*; δb_7^* : cambio en el parámetro b*; δC_{ab7}^* : cambio en el parámetro C*_{ab}; δh_{ab7} : cambio en el parámetro h_{ab}, en el día 7

Figura 4.11. Efectos estimados(a) y efectos principales (b) de las variables independientes sobre las respuestas cambios en los parámetros de color (δL_7^* , δa_7^* , δb_7^* y δC_{ab7}^*) de frutillas nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C



Las ecuaciones del modelo ajustado para δL^*_7 , δa^*_7 , δb^*_7 y δC^*_{ab7} para las frutillas en el día 7 se observan en las Ecuaciones 4.8, 4.9, 4.10 y 4.11, respectivamente.

$$\delta L^*_7 = 13,1 - 0,14C - 0,7t - 0,008t^2 \quad (4.8)$$

$$\delta a^*_7 = 20,8 - 0,13C - 0,9t + 0,01t^2 \quad (4.9)$$

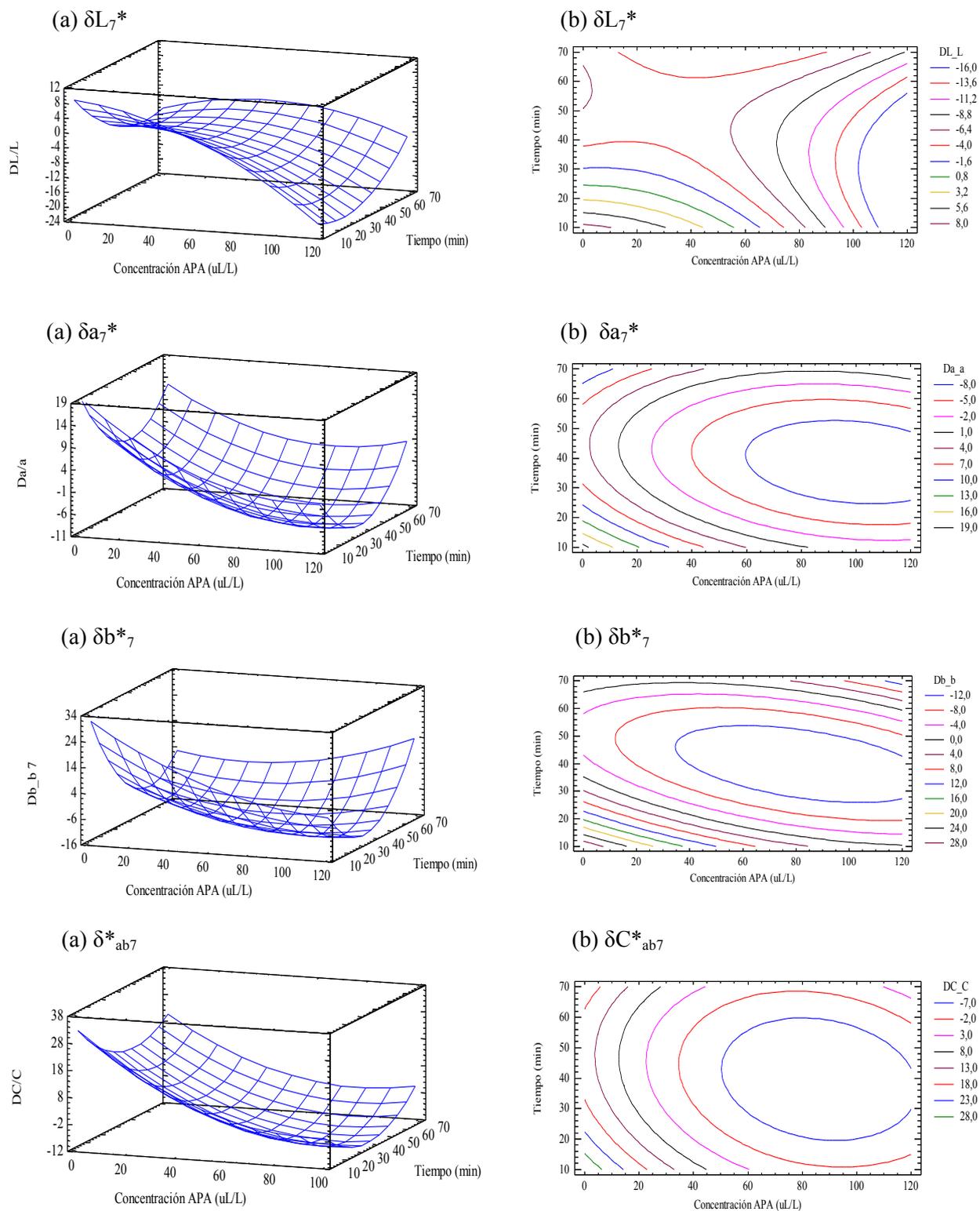
$$\delta b^*_7 = 26,4 - 1,8 t + 0,02 t^2 \quad (4.10)$$

$$\delta C^*_{ab7} = 22,7 - 0,12C - 1,1t - 13t^2 \quad (4.11)$$

Los modelos δL^*_7 , δa^*_7 y δC^*_{ab7} se vieron afectados por la concentración de ácido peracético (C) y el tiempo (t) a través de los términos lineales y también por el tiempo a través del término cuadrático (t^2). El modelo δb^*_7 se vio afectado por el tiempo a través del término lineal (t) y cuadrático (t^2).

Las superficies de respuestas y gráficos de contorno para los cambios en los parámetros de color (δL^*_7 , δa^*_7 , δb^*_7 y δC^*_{ab7}) se muestran en la Figura 4.12. En las mismas se observa que δL^* y δa^* disminuyen a medida que aumenta la concentración de APA. El cambio en el parámetro b^* aumenta con tiempos de aplicación largos y altas concentraciones de APA y δC_{ab}^* disminuye con el aumento de la concentración de APA.

Figura 4.12. Superficie de respuestas(a) y gráficos de contorno(b) para los cambios en los parámetros de color (δL^*_{7} , δa^*_{7} , δb^*_{7} y δC^*_{ab7}) de frutillas nebulizadas con APA en el día 7



Los predicciones de δL_i^* usando los modelos reducidos a la concentración máxima de nebulización APA (116,6 $\mu\text{L/L}$) y tiempo (69,3 min) son -3,4 y -13,3 en el día 0 y 7, respectivamente, lo que indica un mayor oscurecimiento de las frutillas tratadas en estas condiciones, con respecto a las muestras control, después del período de almacenamiento.

Las predicciones de δa^* usando los modelos reducidos en los máximos niveles de las variables de procesamiento (116,6 $\mu\text{L/L}$ y 69,3 min) son -2,2 y -8,7 en el día 0 y 7, respectivamente. Para el caso de δC_{ab}^* , las predicciones son -5,2 y -5,1 en el día 0 y 7, respectivamente. Como se puede observar, la pérdida en el color rojo se intensifica en el almacenamiento de frutas nebulizadas en estas condiciones. Sin embargo, la diferencia en la intensidad del color (croma) de las frutas tratadas y control después del almacenamiento refrigerado se mantiene, al menos en esta situación, debido al equilibrio de la pérdida de color rojo con el desarrollo de pardeamiento.

4.4 Efecto de la nebulización de APA sobre la reducción de E.coli inoculada en frutillas en el día de la aplicación (Día 0) y luego de 7 días de almacenamiento a 2°C (Día 7)

Como se mencionó anteriormente en el punto 3.4.3, los ensayos de descontaminación requieren el uso de un alto número de células en el inóculo que permita alcanzar, también, un número de células adecuado en la materia prima inoculada, de forma de permitir la medición de células viables después del tratamiento y determinar la reducción producida (FDA/CFSAN, III, 2001).

En este experimento, se ajustó la población de *E. coli* para obtener un inóculo cuyo recuento en las frutillas inoculadas sea igual o superior a 10^5 UFC / g. El valor inicial de *E.coli* en las frutillas inoculadas en el día 0 fue, en promedio, 5,5log UFC/g.

Luego de 7 días de almacenamiento a 2°C, el recuento de *E.coli* fue, en promedio, de 4,8 log UFC/g. Estos resultados muestran una disminución de 0,7 log de este microorganismo después del almacenamiento en frío en las muestras sin tratamiento desinfectante.

Este microorganismo detiene su crecimiento a temperaturas de refrigeración, el valor límite de crecimiento es de 5°C (ICMSF, 2006). Knudsen *et al.* (2001) informó que la población de *E.coli* inoculada en la superficie de la frutilla disminuyó de 1 a 2 ciclos log cuando se almacenaron a 5 °C durante 7 días.

Los resultados experimentales de la reducción de *E.coli* para las muestras en el día de la aplicación de APA y luego de 7 días de conservación a 2°C, en las condiciones del diseño de nebulización se muestran en la Tabla 4.10.

Las pruebas de diagnóstico basadas en los residuos se presentan en la Figura 7.5 del Anexo para REC₀ y REC₇. Se cumple adecuadamente con las suposiciones de normalidad, homogeneidad de la variancia e independencia de los datos experimentales necesarias para la aplicación del ANOVA.

Tabla 4.10. Resultados experimentales de la reducción de *E.coli* (REC_0) en frutillas nebulizadas con APA en el día 0 y luego de 7 días de conservación a 2°C

APA ($\mu\text{L/L}$)	Tiempo (min)	REC_0 ($-\log N_0/N_{C0}$)	REC_7 ($-\log N_7/N_{C7}$)
100	15	3,71	1,41
20	15	3,19	0,61
20	60	5,56	3,11
60	5,7	1,55	0,76
60	37,5	4,36	5,36
60	37,5	4,9	5,36
3,4	37,5	2,21	1,29
60	37,5	4,7	5,36
60	69,3	5,66	5,36
100	60	5,56	4,90
116,6	37,5	4,75	5,36

APA: ácido peracético; REC_0 : reducción de *E.coli* en el día 0; REC_7 : reducción de *E.coli* en el día 7; N_{Ci} : número de *E.coli* de las muestras inoculadas control en el día i ; N_i : número de *E.coli* luego del tratamiento en el día i ; i : día de análisis, 0 ó 7.

En el caso de REC_7 , no se recuperaron células viables del microorganismo inoculado en algunas de las corridas experimentales realizadas. Esto impidió determinar la reducción producida y valorar, de esta manera, el efecto del tratamiento de desinfección a que fue sometido. El efecto del frío durante la conservación a 2°C sumado a la acción antimicrobiana del ácido peracético aplicado durante la nebulización, serían las causas de la inactivación de microorganismo luego de 7 días.

Los resultados obtenidos luego del periodo de conservación, impidieron generar un modelo predictivo para el estudio de la desinfección sobre la reducción de *E.coli* inoculada en frutilla.

En la Tabla 4.11 se muestra el análisis ANOVA correspondiente al modelo predictivo de reducción de *E.coli* para las frutillas en el día 0.

Tabla 4.11. Análisis ANOVA de la reducción de *E.coli* en frutillas nebulizadas con APA en el día 0

Fuente	Gl	REC ₀	
		Suma de Cuadrados	Valor-P
A: Concentración APA (μL/L)	1	2,1	0,0335
B: Tiempo (min)	1	12,6	0,0059
AA	1	0,7	0,0948
AB	1	0,07	0,4414
BB	1	0,4	0,1323
Falta de ajuste	3	3,3	0,0632
Error puro	2	0,1	
R ²		0,82	
DMA (%)		13,0	

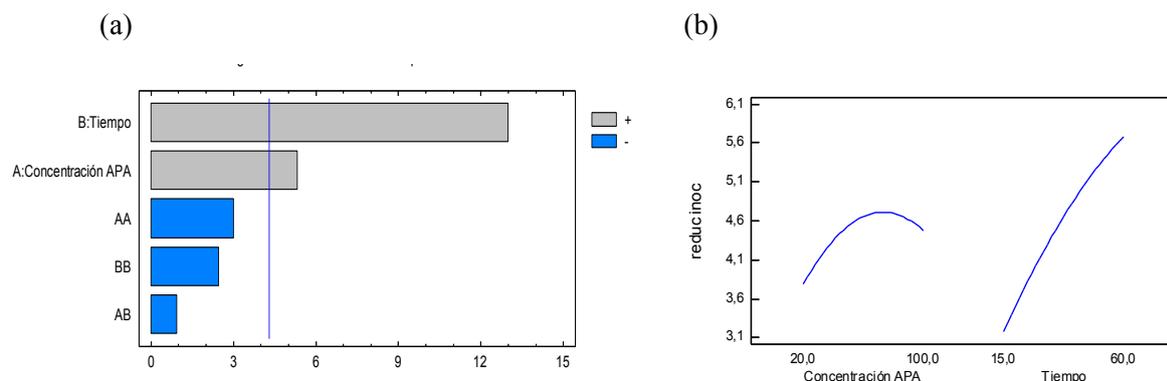
Términos significativos $p \leq 0,05$

Gl: grados de libertad; APA: ácido peracético; DMA: desviación media absoluta; REC₀: reducción de *E.coli* en el día 0.

El valor-P de la falta de ajuste es mayor que 0,05, por lo que el modelo obtenido describe en forma adecuada los datos observados al nivel de confianza del 95,0%. El coeficiente de determinación R² y la DMA fue aceptable.

Los efectos de las variables independientes sobre la respuesta REC₀ evaluada mediante el diagrama de Pareto y el gráfico de efectos principales, se presentan en la Figura 4.13.

Figura 4.13. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales (b) para la reducción de *E.coli* (REC_0) inoculada experimentalmente en frutillas nebulizadas con APA en el día 0.



El modelo predictivo reducido se presenta en la Ecuación 4.11 para la reducción de *E. coli* en el día 0.

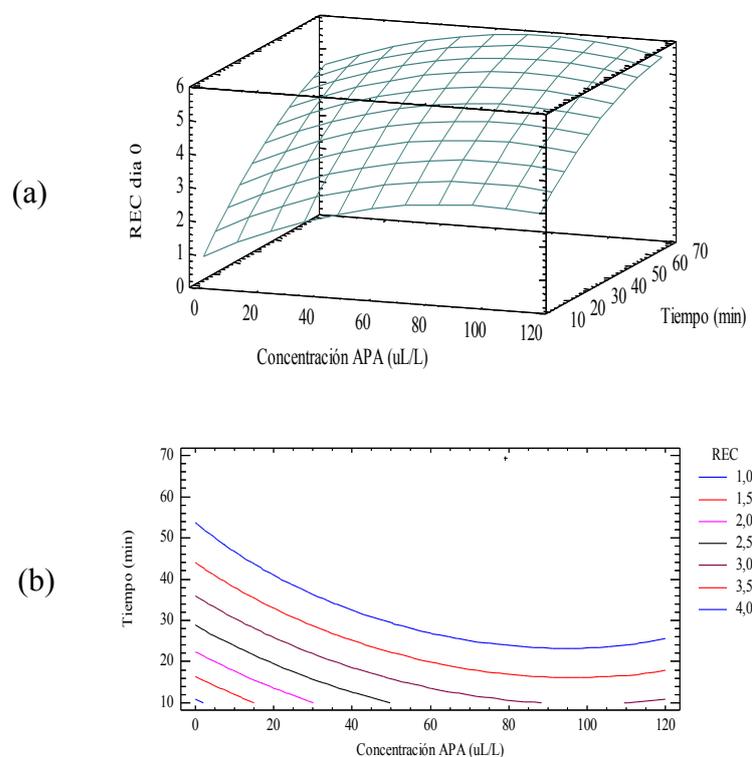
$$REC_0 = 1,334 + 0,013 C + 0,056 t \quad (4.11)$$

Donde C es la concentración de ácido peracético ($\mu\text{L/L}$) y t es el tiempo de tratamiento (min).

El modelo REC_0 se vio afectado por la concentración (C) y el tiempo (t) a través de los términos lineales.

En la Figura 4.14 se presenta la superficie de respuesta y gráfico de contorno para REC_0 .

Figura 4.14. Superficie de respuesta(a) y gráfico de contorno (b) para la reducción de *E.coli* (REC_0) inoculada experimentalmente en frutillas nebulizadas con APA en el día 0.



Se observa que el aumento en la concentración de APA en la cámara de nebulización, como del tiempo de tratamiento reducen significativamente los niveles de *E.coli*. La predicción para la más alta concentración del diseño (116,6 $\mu L/L$) y 30 min de tiempo de aplicación en el día 0 es de 4,5 órdenes logarítmicos (Ec. 4.11). Se puede observar gráficamente (Fig. 4.14b) las combinaciones de concentración de ácido peracético y tiempo de tratamiento que se pueden utilizar, para obtener una reducción del microorganismo hasta valores no detectables.

La información sobre la aplicación de antimicrobianos por nebulización sobre frutas y hortalizas inoculadas es limitada. Sin embargo, algunos trabajos como el de Oh *et al.* (2005b) estudiaron la eficacia del ácido peracético aerosolizado como desinfectante de hojas de lechuga inoculadas con *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium. Con este tratamiento se logró la reducción de estas bacterias con

respecto al control, en un rango de 0,3 a 3,8 log dependiendo del tiempo de aplicación del tratamiento. En particular, cuando se trataron hojas de lechuga inoculadas con una solución de 40 ppm de APA en aerosol, la población de *E. coli* O157: H7 se redujo en 0,8; 2,2 y 3,4 log después de 10, 30, y 60 minutos de tratamiento, respectivamente. En el presente trabajo de tesis, con una aplicación de 40 µL/L de APA y los mismos tiempos, se logra una reducción de 2,4; 3,5 y 5,2 ciclos logarítmicos.

Por otro lado, varios investigadores comprobaron los beneficios y la eficacia del APA en tratamientos de lavado por inmersión para lograr la inactivación de microorganismos inoculados en frutas y hortalizas. En un trabajo realizado por Sapers *et al.* (1999) se estudió la eficacia del APA para la inactivación de *Escherichia coli* ATCC 25922 en manzanas inoculadas experimentalmente. Se obtuvo una reducción de 2 log con un tratamiento de lavado de 1 minuto con una solución de 100 ppm de APA. En las frutillas inoculadas y tratadas con APA por nebulización, en el presente trabajo de tesis, se logra esta reducción de 2 ciclos logarítmicos, con una aplicación de 20 µL/L de APA durante 15 min.

Además, Abadias *et al.* (2011) probaron sustancias antimicrobianas alternativas al cloro para reducir la población de *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* spp. y *Listeria* spp. en manzanas, peladas y cortadas, inoculadas experimentalmente. Entre los distintos antimicrobianos ensayados aplicados a través de lavados por inmersión durante 1 min, utilizaron ácido peracético. El APA en concentraciones de 80 y 120 ppm logró reducciones de la población de *E. coli* O157:H7 de 2 log. Además, esta población bacteriana se mantuvo a niveles bajos durante el almacenamiento de 6 días a 10 °C. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis resultaron similares, se logra una reducción de *E. coli* mayor a 3 log durante el almacenamiento de 7 días a 2°C con un tratamiento de 60 µL/L o mayor de APA durante un mínimo de 40 min en el día de aplicación.

Rodgers *et al.* (2004) estudiaron la acción desinfectante del APA sobre frutilla con *E.coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*. El tratamiento con 80 ppm de ácido peracético aplicado por inmersión durante 5 min produjo una reducción de 4,4 log en la población de *E.coli* O157:H7. Después del tratamiento, las muestras se almacenaron a 4°C durante 9 días y las poblaciones de ambos patógenos se mantuvieron cuantitativamente sin cambios.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, el tratamiento de desinfección por nebulización realizado utilizando concentraciones intermedias de APA y períodos cortos de tiempo (por ej., 60 µL/L, 30 min) logra reducir la población de *E.coli* en 4 ciclos logarítmicos (Fig 4.14) y mantener esa reducción luego del almacenamiento refrigerado.

Los resultados de inactivación de *E.coli* ATCC 25922 (no patógena) podrían ser considerados válidos para el patógeno *E. coli* O157:H7 por las similitudes que presentan estos microorganismos en lo que respecta a sus características de crecimiento, tolerancia al frío, fijación a superficie de productos frescos e inactivación por calor y por antimicrobianos (Saper *et al.* 1999; Sapers *et al.* 2003, Briñez *et al.* 2006, Kim y Harrison, 2010).

Teniendo en cuenta esta situación puede sugerirse que los resultados obtenidos para *E.coli* pueden ampliarse a *E.coli* O157:H7 en la evaluación del producto desinfectante estudiado.

Esto representa un aspecto interesante a considerar si tenemos en cuenta que las frutillas son alimentos involucrados en brotes alimentarios causados por *E. coli* O157:H7 (CDC, 2006). Además, trabajos experimentales de inoculación con *E. coli* O157:H7 (Knudsen *et al.* 2001), demostraron que esta bacteria puede sobrevivir en la superficie de frutilla fresca almacenada a 5°C durante al menos siete días y los resultados de esta tesis han mostrado una inactivación del microorganismo ensayado luego del período de almacenamiento refrigerado.

4.5 Carga microbiana inicial de zarzamoras frescas

Las frutas frescas presentan una microbiota muy variable, encontrándose una amplia gama de microorganismos. Los microorganismos se incorporan durante el cultivo, cosecha, transporte, procesamiento y manipulación posterior.

En particular, las zarzamoras utilizadas en el presente trabajo de tesis se procesaron inmediatamente luego de cosechadas en la plantación de Coronda. En la Tabla 4.12, se presentan los resultados del estudio de la carga microbiana inicial de las zarzamoras frescas.

Tabla 4.12 Carga microbiana inicial de zarzamoras frescas*

<i>Grupo microbiano</i>	<i>UFC/g</i>	<i>Log UFC/g</i>
Microorganismos aerobios mesófilos totales	$1,5 \cdot 10^2 - 5,9 \cdot 10^2$	2,18 – 2,80
Hongos (mohos y levaduras)	$3,0 \cdot 10^3 - 5,3 \cdot 10^4$	3,48 – 4,72

*provenientes de una plantación de Coronda. UFC: unidades formadoras de colonias

El grupo de microorganismos aerobios mesófilos totales está conformado por bacterias, mohos y levaduras, pero es interesante destacar que en el caso de las zarzamoras estudiadas, este grupo microbiano se caracterizó por presentar un bajo número de colonias de morfología bacteriana, correspondiendo, en su mayor parte, a mohos y levaduras. Este grupo microbiano constituye la mayoría de la microbiota de las frutas (Tournas, 2005).

Esta observación puede deberse a que la planta de zarzamora es un arbusto que presenta un crecimiento alejado de la tierra, siendo ésta una fuente importante de la contaminación por bacterias.

Además, la cosecha de las zarzamoras de nuestra región utilizadas en esta tesis, se produce durante el mes de enero donde las condiciones climáticas de la estación corresponden a altas temperaturas y humedad. Éstos constituyen factores importantes que favorecen el

crecimiento de los microorganismos, influyendo principalmente sobre la población de mohos (Jay, 2009).

La microbiota fúngica de las zarzamoras analizadas estuvo compuesta por mohos y levaduras, caracterización realizada en base al aspecto macroscópico de las colonias.

Mendes Furlan *et al.* (2011), en un estudio realizado en zarzamoras, hallaron valores promedio de $2,2 \cdot 10^4$ UFC/g de mohos y levaduras como contaminantes superficiales de estas frutas, resultados coincidentes con los de este trabajo de tesis.

4.6 Efecto de la nebulización de ácido peracético sobre la reducción de la carga microbiana de zarzamoras

4.6.1 Efecto de la nebulización de ácido peracético sobre la reducción de la carga microbiana de zarzamora en el día de aplicación (Día 0)

La carga microbiana inicial de las zarzamoras frescas (muestras control) utilizadas en los ensayos de desinfección, fue en promedio, 3,0 log UFC/g para microorganismos aerobios mesófilos totales y 3,5 log UFC/g para mohos y levaduras.

Los resultados experimentales de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos ($RAMT_0$) y de mohos y levaduras (RML_0) para las muestras día 0, en las condiciones del diseño de nebulización se muestran en la Tabla 4.13.

Las pruebas de diagnósticos basadas en los residuos demuestran que se cumple adecuadamente con las suposiciones de normalidad, homogeneidad de la variancia e independencia de los datos experimentales necesarias para la aplicación del ANOVA. Estas pruebas se presentan en la Figura 7.6 del Anexo.

Tabla 4.13. Resultados experimentales de la reducción microorganismos mesófilos totales ($RAMT_0$) y de mohos y levaduras (RML_0) de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0

APA ($\mu\text{L/L}$)	Tiempo (min)	$RAMT_0$ ($-\log N_0/N_{C0}$)	RML_0 ($-\log N_0/N_{C0}$)
100	15	1,98	2,48
20	15	1,13	1,22
20	60	1,68	1,57
60	5,7	1,02	1,27
60	37,5	1,20	1,44
60	37,5	1,02	1,70
3,4	37,5	0,33	0,60
60	37,5	1,38	1,78
60	69,3	1,38	1,70
100	60	1,68	2,48
116,6	37,5	1,90	2,00

APA: ácido peracético; $RAMT_0$: reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales en el día 0; RML_0 : reducción de mohos y levaduras en el día 0; N_0 : número de microorganismos (UFC/g) luego del tratamiento en el día 0; N_{C0} : número de microorganismos (UFC/g) de las muestras control en el día 0.

El análisis ANOVA correspondiente al modelo predictivo de $RAMT_0$ y RML_0 para las zarzamoras en el día 0, se muestran en la Tabla 4.14.

De acuerdo al análisis de varianza, los modelos propuestos para $RAMT_0$ y RML_0 no presentaron falta de ajuste ($p > 0,05$) y explican el 53% y 78% de la variabilidad de los datos, respectivamente. Las DMA fueron aceptables. Se propone aceptar estos modelos para representar los datos experimentales.

Tabla 4.14. Análisis ANOVA de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales ($RAMT_0$) y de mohos y levaduras (RML_0) de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0

Fuente	Gl	$RAMT_0$		RML_0	
		Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P
A:Concentración APA ($\mu\text{L/L}$)	1	0,5	0,0469	2,1	0,0144
B:Tiempo (min)	1	0,07	0,2458	0,1	0,1970
AA	1	0,02	0,5203	0,006	0,6960
AB	1	0,2	0,1237	0,03	0,4287
BB	1	0,2	0,1427	0,02	0,5145
Falta de ajuste	3	0,8	0,0908	0,6	0,1381
Error puro	2	0,05		0,06	
R^2		0,53		0,78	
DMA (%)		15,7		12,3	

Términos significativos $p \leq 0,05$

Gl: grados de libertad; APA: ácido peracético; DMA: desviación media absoluta; $RAMT_0$: reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales en el día 0; RML_0 : reducción de mohos y levaduras en el día 0.

Para ambos modelos se observa que la concentración de APA presentó un valor-P menor que 0,05, indicando que esta variable operativa afecta significativamente la reducción del número de microorganismo de ambos grupos microbianos.

En la Figura 4.15y 4.16se observan los efectos estimados de las variables independientes sobre las respuestas $RAMT_0$ y RML_0 mediante el Diagrama de Pareto y los efectos principales, respectivamente.

Figura 4.15. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales(b) para la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT₀)de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0.

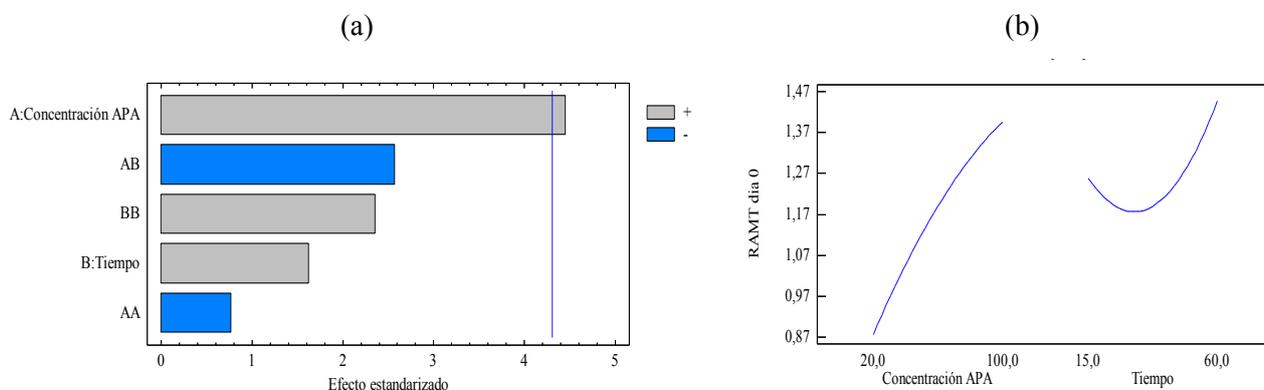
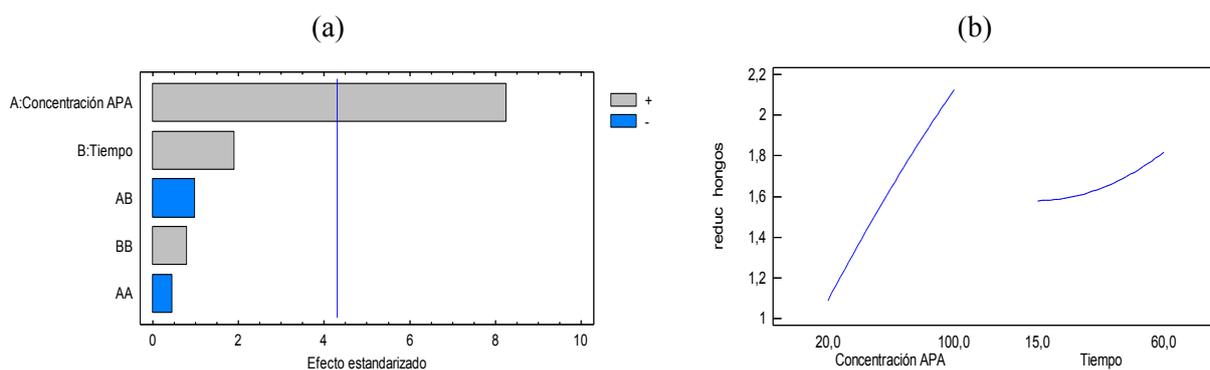


Figura 4.16. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales(b) para la reducción de mohos y levaduras (RML₀) de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0.



Como puede apreciarse a medida que aumenta la concentración de APA se produce un aumento de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos y de mohos y levaduras.

Los modelos obtenidos mediante el procedimiento de regresión para RAMT₀ y RML₀ se muestran en la Ecuación 4.13 y 4.14, respectivamente.

$$RAMT_0 = 0,88 + 0,0065 C \quad (4.13)$$

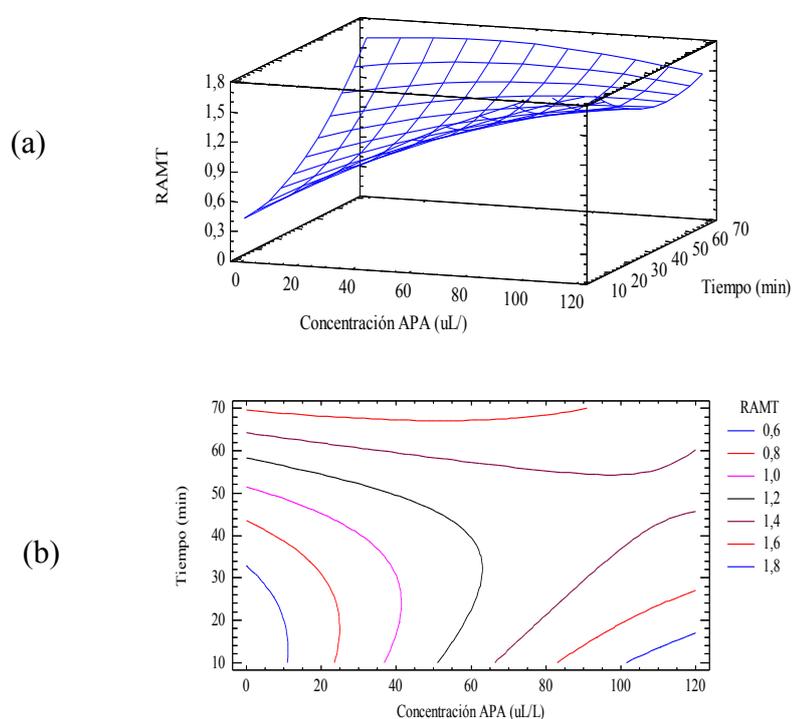
$$RML_0 = 0,88 + 0,013 C \quad (4.14)$$

Donde C es la concentración de ácido peracético (μL/L) y t es el tiempo de tratamiento (min).

Tanto el modelo $RAMT_0$ como el modelo RML_0 para zarzamoras en el día 0 se vieron afectados por la concentración (C) a través del término lineal.

La superficie de respuesta y gráfico de contornos para $RAMT_0$ se muestran en la Figura 4.17.

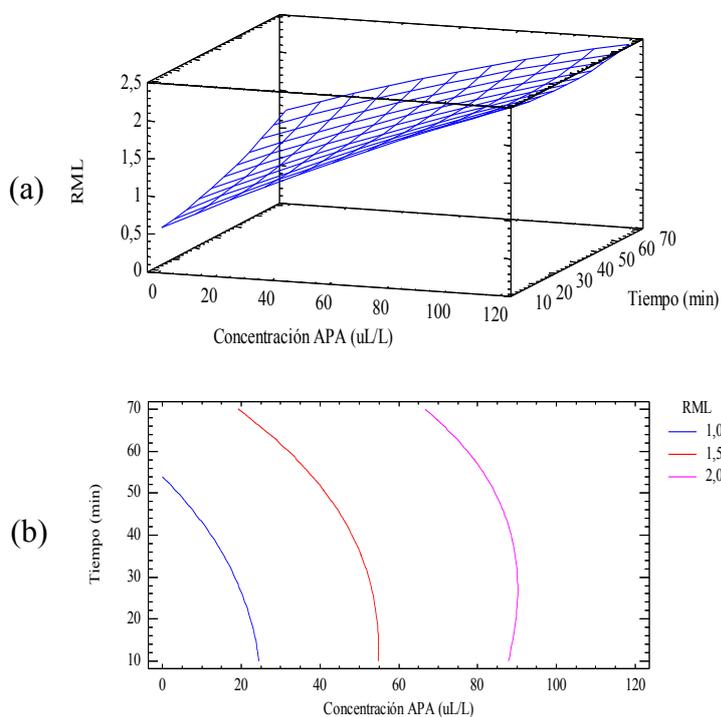
Figura 4.17. Superficie de respuesta (a) y gráfico de contorno (b) para la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales ($RAMT_0$) de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0



Para todas las concentraciones de APA, el tratamiento presenta una capacidad de desinfección de microorganismos aerobios mesófilos totales de 2 ciclos logarítmicos tanto para tiempos cortos como largos.

La superficie de respuesta y gráfico de contornos para RML_0 se muestran en la Figura 4.18. En la misma puede observarse que el aumento en la concentración de APA reduce significativamente los niveles de mohos y levaduras, además, las máximas reducciones corresponden a la máxima concentración de APA y tiempos aplicados.

Figura 4.18. Superficie de respuesta (a) y gráfico de contorno (b) para la reducción de mohos y levaduras (RML_0) de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0



La aplicación por nebulización de sustancias antimicrobianas para lograr reducir el número de microorganismos presentes en la superficie de las frutas fue utilizada con éxito por diversos investigadores. Vardar *et al.* (2012), citado anteriormente, comprobaron que la aplicación de peróxido de hidrógeno por nebulización, con una concentración de $2000 \mu\text{L/L}$ durante 60 min redujo aproximadamente en 1,5 y 2 órdenes logarítmicos la población de bacterias y hongos de la superficie de frutillas, respectivamente.

Karabulut *et al.* (2009) estudiaron la eficacia de la nebulización con dióxido de cloro para el control de enfermedades postcosecha de higo negro. La aplicación de dióxido de cloro en una concentración de 1000 ppm durante 60 min fue efectiva para reducir la población de microorganismos mesófilos totales y hongos en la superficie de la fruta en 1,7 y 1,6 ciclos logarítmicos, respectivamente.

En el presente trabajo de tesis, la aplicación de una concentración de 80 $\mu\text{L/L}$ de APA durante 60 min de logra una reducción de 2 ciclos logarítmicos tanto para microorganismos aerobios mesófilos totales como para mohos y levaduras.

En una investigación realizada en zarzamoras, Mendes Furlan *et al.* (2011) evaluaron el efecto del cloro y del agua ozonizada como agentes desinfectantes para disminuir la carga fúngica de las frutas. Con tratamientos de desinfección por inmersión en soluciones de hipoclorito de sodio de 200 ppm durante 10 min y de agua ozonizada de 0,6 ppm durante 3 min, lograron una reducción de 0,7 y de 0,8 ciclos logarítmicos, respectivamente, sobre los hongos presentes en la superficie de las zarzamoras. Para lograr un nivel de reducción equivalente mediante la nebulización con ácido peracético investigada en la presente tesis, se requiere una concentración de 6,2 $\mu\text{L/L}$ del antimicrobiano para cualquier tiempo de tratamiento.

4.6.2 Efecto de la nebulización de ácido peracético sobre la reducción de la carga microbiana de zarzamora luego de 7 días de almacenamiento a 2°C (Día 7).

El recuento microbiano inicial en las muestras no tratadas (muestras control) fue en promedio 3,0 log UFC/g para microorganismos mesófilos totales y 4,3 log UFC/g para mohos y levaduras. Las muestras no tratadas mostraron un aumento en la población fúngica durante el almacenamiento en frío de 0,8 ciclos log, mientras que los microorganismos aerobios mesófilos totales se mantuvieron en los mismos niveles. Este comportamiento fue observado también en el caso de las frutillas, lo que se revalida la importancia de reducir los niveles de esta población, para minimizar el deterioro producido por los microorganismos en las frutas y en particular en las zarzamoras.

Los resultados experimentales de la reducción microorganismos aerobios mesófilos totales y de mohos y levaduras de las zarzamoras en las condiciones del diseño de nebulización, luego de 7 días de conservación a 2°C se muestran en la Tabla 4.15.

Tabla 4.15. Resultados experimentales de la reducción de microorganismos mesófilos totales ($RAMT_7$) y de mohos y levaduras (RML_7) de zarzamoras nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C

APA ($\mu\text{L/L}$)	Tiempo (min)	$RAMT_7$ ($-\log N_7/N_{C7}$)	RML_7 ($-\log N_7/N_{C7}$)
100	15	2,96	2,68
20	15	1,66	2,07
20	60	2,96	0,80
60	5,7	1,06	2,07
60	37,5	2,96	2,50
60	37,5	1,96	2,58
3,4	37,5	0,40	0,77
60	37,5	2,96	2,68
60	69,3	1,36	2,24
100	60	2,96	4,28
116,6	37,5	2,96	2,50

APA: ácido peracético; $RAMT_7$ = reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales en el día 7; RML_7 = reducción de mohos y levaduras en el día 7; N_7 : número de microorganismos (UFC/g) luego del tratamiento en el día 7; N_{C7} : número de microorganismos (UFC/g) de las muestras control en el día 7.

Las pruebas de diagnósticos basadas en los residuos demuestran que se cumple adecuadamente con las suposiciones de normalidad, homogeneidad de la variancia e independencia de los datos experimentales necesarias para la aplicación del ANOVA. Estas pruebas se presentan en la Figura 7.7 del Anexo.

El análisis ANOVA correspondiente al modelo predictivo de $RAMT_7$ y RML_7 para las zarzamoras en el día 7, se muestran en la Tabla 4.16.

Tabla 4.16. Análisis ANOVA de la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT₇) y de mohos y levaduras (RML₇) de zarzamoras nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C

Fuente	Gl	RAMT ₇		RML ₇	
		Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P
A:Concentración APA (μL/L)	1	3,0	0,0948	5,3	0,0059
B:Tiempo (min)	1	0,4	0,4017	0,04	0,3743
AA	1	0,2	0,5444	0,4	0,0728
AB	1	0,4	0,3772	2,1	0,0150
BB	1	1,0	0,2329	0,00002	0,9823
Falta de ajuste	3	3,6	0,2249	1,0	0,0902
Error puro	2	0,67		0,06	
R ²		0,53		0,88	
DMA (%)		19,4		10,0	

Términos significativos $p \leq 0,05$

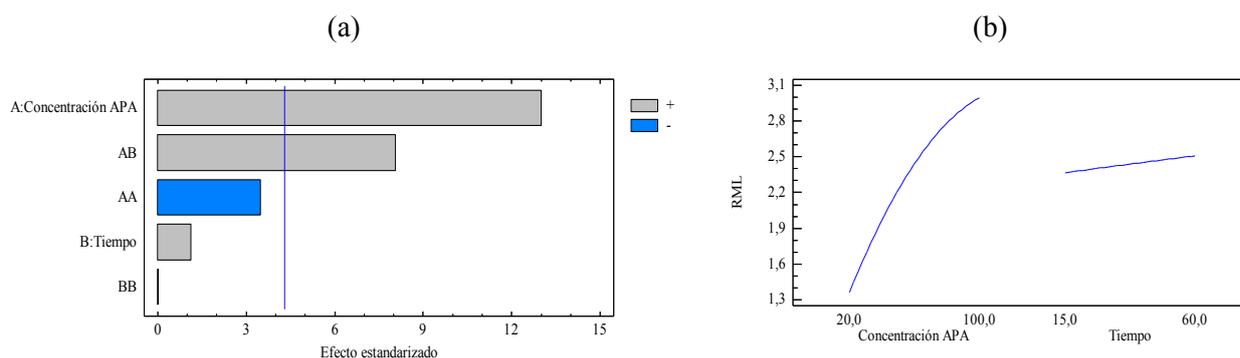
Gl: grados de libertad; APA: ácido peracético; DMA: desviación media absoluta; RAMT₇: reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales en el día 7; RML₇: reducción de mohos y levaduras en el día 7.

El valor-P para la falta de ajuste es mayor que 0,05 en ambos modelos. Para la respuesta RAMT₀ se observa que ningún efecto presentó un valor-P menor que 0,05, por lo tanto, ni la concentración de APA ni el tiempo de tratamiento afectan significativamente la reducción de este grupo microbiano. Para el caso de RML₀ el coeficiente de determinación R² fue adecuada ya que explica el 88% de la variabilidad de los datos y la DMA fue aceptable, por lo tanto se propone aceptar este modelo para representar los datos experimentales.

En la Figura 4.19 se observan los efectos de las variables independientes sobre la respuesta RML₇ evaluados mediante el Diagrama de Pareto y el gráfico de efectos principales. Como

puede observarse, a concentración de ácido peracético utilizada en el día del tratamiento y el tiempo de aplicación afecta significativamente la reducción de mohos y levaduras presentes luego de 7 días de almacenamiento.

Figura 4.19. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales (b) para la reducción de mohos y levaduras (RML_7) de zarzamoras nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C



El modelo reducido obtenido, se muestra en la Ecuación 4.15.

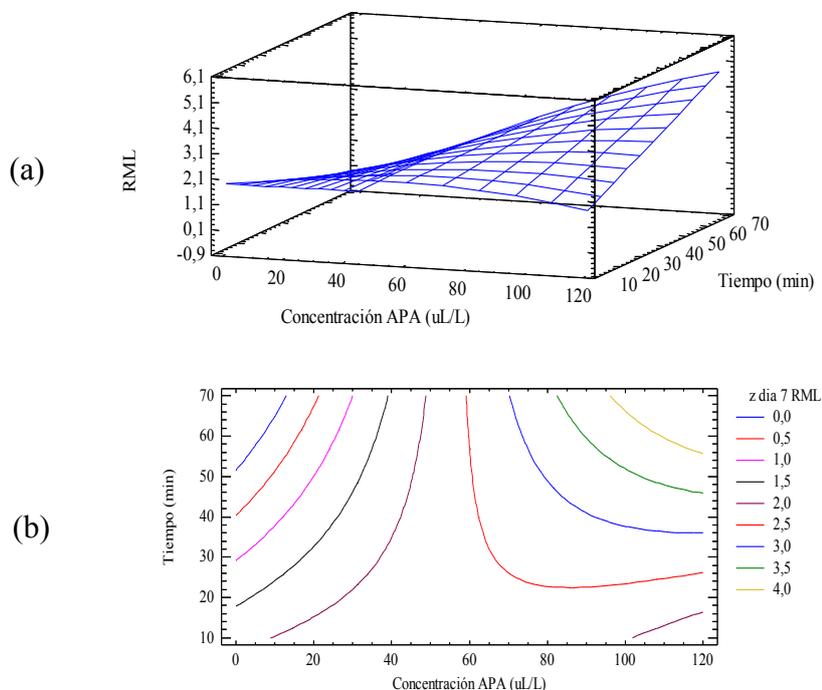
$$RML_7 = 2,70 - 0,0095C - 0,044 t + 0,0008 C.t \quad (4.15)$$

Donde C es la concentración de ácido peracético ($\mu\text{L/L}$) y t es el tiempo de tratamiento (min).

El modelo RML_7 para zarzamoras en el día 7 se vio afectado por la concentración (C) y tiempo (t) a través de los términos lineales y por el término combinado concentración y tiempo (C.t).

Las superficies de respuestas y gráficos de contorno para RML_7 se muestran en la Figura 4.20.

Figura 4.20. Superficie de respuesta (a) y gráfico de contorno (b) para la reducción de mohos y levaduras (RML_7) de zarzamoras nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a $2^{\circ}C$



Las predicciones para RML_i (Ec. 4.15 y Ec.4.14) obtenidas en las máximas condiciones de diseño de nebulización estudiado ($116,6 \mu\text{L/L}$ y $69,3 \text{ min}$), son $1,7$ y $4,8 \text{ log}$ en el día 0 y 7, respectivamente. Estos resultados muestran una importante reducción en mohos y levaduras, después de 7 días de almacenamiento indicando una acción residual del APA en las frutas nebulizadas.

Este aspecto resulta de especial importancia considerando que las muestras control (sin tratamiento de desinfección), mostraron un aumento del recuento fúngico de $0,8 \text{ log}$ durante el almacenamiento en frío y que la zarzamora, por su pH bajo, presenta condiciones adecuadas para el desarrollo de hongos responsables del deterioro postcosecha.

4.3 Efecto de la nebulización de APA sobre los parámetros de color de la zarzamora

Se determinaron los parámetros de color L^* (luminosidad), a^* (rojo / verde), b^* (amarillo / azul), C^*_{ab} (cromaticidad) y h_{ab} (tonicidad) para describir los cambios de color de la zarzamora.

4.3.1 Efecto de la nebulización de APA sobre los parámetros de color de la zarzamora en el día de aplicación (Día 0).

Los parámetros de color de las zarzamorras frescas el día 0 (muestras control) fueron $22,21 \pm 2,32$; $1,00 \pm 0,77$; $-2,12 \pm 0,42$; $2,44 \pm 0,54$ y $324,51 \pm 16,25$ para L_{C0}^* , a_{C0}^* , b_{C0}^* , C_{abC0}^* y h_{abC0}^* , respectivamente.

Los resultados experimentales de los cambios en los parámetros de color (δL_0^* , δa_0^* , δb_0^* , δC^*_{ab0} y δh_{ab}^*) obtenidos después de la desinfección de nebulización con APA en el día 0 se muestran en la Tabla 4.17 y el análisis ANOVA de los modelos correspondientes, en la Tabla 4.18.

Los modelos presentaron una falta de ajuste no significativa ($P > 0,05$) y el R^2 y los valores DMA fueron aceptables.

De las respuestas mostradas en la Tabla 4.17, sólo para la variación en el parámetro de color b^* (δb_0^*) resultó significativamente afectado por las variables de nebulización estudiadas (Tabla 4.18).

Tabla 4.17. Resultados experimentales de los cambios en los parámetros de color (δL_0^* , δa_0^* , δb_0^* , δC_{ab0}^* y δh_0^*) de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0

APA ($\mu\text{L/L}$)	Tiempo (min)	δL_0^*	δa_0^*	δb_0^*	δC_{ab0}^*	δh_0^*
100	15	-19,50	133,18	-20,66	22,94	9,81
20	15	-26,81	64,84	15,65	26,12	2,94
20	60	-17,84	126,13	-4,21	29,90	7,74
60	5,7	-10,37	99,77	-0,06	24,41	6,13
60	37,5	-11,78	138,37	-14,89	27,82	9,36
60	37,5	-3,50	36,70	-9,58	0,52	3,48
3,4	37,5	-8,94	147,54	-7,03	35,27	8,89
60	37,5	-20,72	93,80	-13,70	13,90	7,25
60	69,3	-19,48	87,86	-10,13	14,32	6,56
100	60	-11,76	151,94	-41,68	20,09	13,07
116,6	37,5	-21,63	83,26	-25,40	20,98	5,11

APA: ácido peracético; δL_0^* : cambio en el parámetro L*; δa_0^* : cambio en el parámetro a*; δb_0^* : cambio en el parámetro b*; δC_{ab0}^* : cambio en el parámetro C*; δh_{ab}^* : cambio en el parámetro h* en el día 0.

Tabla 4.18. Análisis ANOVA de los cambios en los parámetros de color (δL_0^* ; δa_0^* ; δb_0^* ; δC_{ab0}^* ; δh_{ab0}^*) de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0

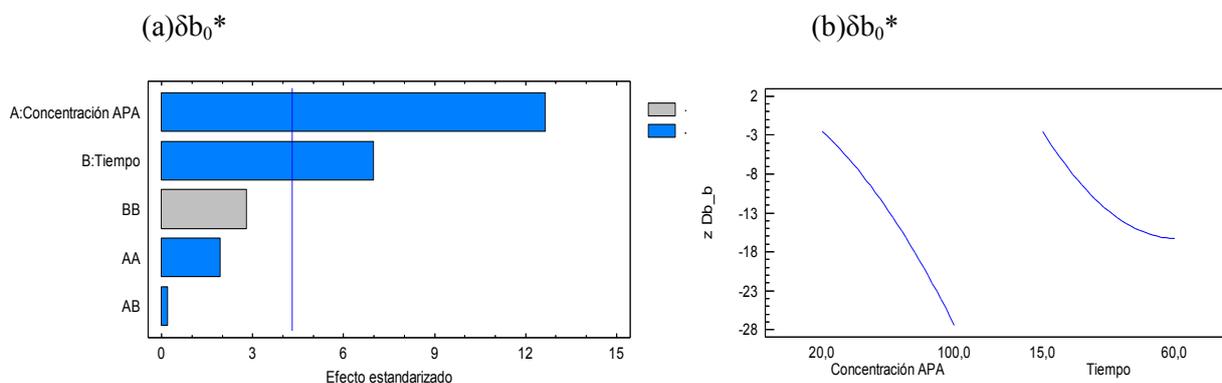
Fuente	Gl	δL_0^*		δa_0^*		δb_0^*		δC_{ab0}^*		δh_{ab}^*	
		Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P
A:Concentración APA	1	2,6	0,8689	1,3	0,9841	1244,0	0,0062	137,8	0,4805	5,9	0,5014
B:Tiempo	1	1,8	0,8896	499,4	0,7039	379,8	0,0198	22,2	0,7627	9,4	0,4117
AA	1	38,5	0,5461	1535,9	0,5223	28,9	0,1934	299,0	0,3328	1,9	0,6886
AB	1	0,4	0,9496	452,2	0,7170	0,3	0,8544	11,0	0,8308	0,6	0,8202
BB	1	33,4	0,5715	183,4	0,8153	61,4	0,1067	47,4	0,6641	0,4	0,8584
Falta de ajuste	3	262,2	0,4896	5869,9	0,6136	382,9	0,0579	37,5	0,9724	51,3	0,3595
Error puro	2	148,3		5194,6		15,5		372,7		17,7	
R ²		0,13		0,18		0,82		0,54		0,21	
DMA (%)		16,7		16,6		16,7		11,4		18,4	

Términos significativos $p \leq 0,05$

Gl: grados de libertad; APA: ácido peracético; DMA: desviación media absoluta; δL_0^* : cambio en el parámetro L*; δa_0^* : cambio en el parámetro a*; δb_0^* : cambio en el parámetro b*; δC_{ab0}^* : cambio en el parámetro C_{ab}^* ; δh_{ab} : cambio en el parámetro h_{ab} en el día 0.

En la Figura 4.21 se presentan el diagrama de Pareto de las variables independientes sobre la respuesta para el cambio en el parámetro de color b^* (δb_0^*) y los efectos principales.

Figura 4.21. Diagrama de Pareto(a) y gráfico de efectos principales (b) para el cambio en el parámetro de color δb_0^* de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0



La concentración de ácido peracético y el tiempo de tratamiento afectan significativamente el cambio del parámetro b^* , siendo la concentración el efecto de mayor importancia.

La ecuación del modelo reducido para δb_0^* para las zarzamoras en el día 0 se presenta en la ecuación 4.16.

$$\delta b_0^* = 18,21 - 0,312 C - 0,306 t \quad (4.16)$$

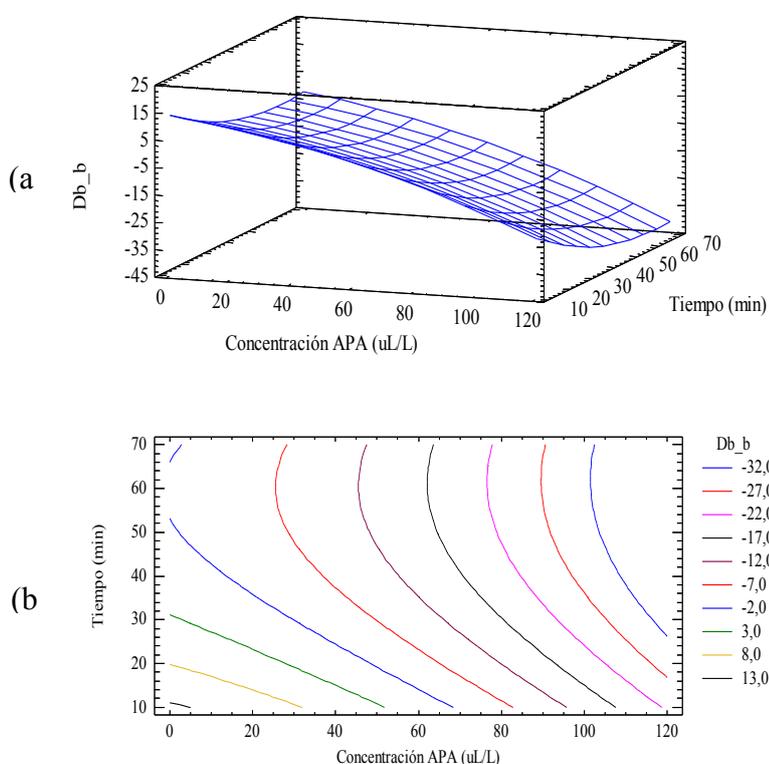
Donde C es la concentración de ácido peracético ($\mu\text{L/L}$) y t es el tiempo de tratamiento (min).

El modelo δb_0^* se vio afectado por la concentración (C) de APA y el tiempo (t) a través de los términos lineales.

La superficie de respuesta y el gráfico de contornos para el cambio en el parámetro de color δb_0^* en función de la concentración de APA y tiempo de tratamiento, se muestran en la Figura 4.22.

Como puede observarse en la misma, a medida que aumenta la concentración de ácido peracético, disminuye δb^* , es decir, las zarzamoras son menos azules, a tiempos de tratamientos tanto largos como cortos. Como b_C es menor a 0, si $b_m < b_C$ la muestra es más azul que control, por lo tanto $(b_m - b_C) < 0$ y $\delta b^* > 0$. Para el caso en que $b_m > b_C$ la muestra es menos azul que el control, ya que $(b_m - b_C) > 0$ y $\delta b^* < 0$.

Figura 4.22. Superficie de respuesta (a) y gráfico de contornos(b) para el cambio en el parámetro de color δb_0^* de zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0



4.3.1 Efecto de la nebulización de APA sobre los parámetros de color en las zarzamoras luego de 7 días de almacenamiento a 2°C (Día 7.)

Los parámetros de color de las zarzamoras de control en el día 7 fueron $24,83 \pm 3,57$; $0,80 \pm 0,71$; $-1,76 \pm 0,76$; $2,07 \pm 0,70$ y $294,35 \pm 21,24$ para L^*_{C7} , a^*_{C7} , b^*_{C7} , C^*_{abc7} y h_{ab7} , respectivamente.

Los resultados de los cambios en los parámetros de color (δL_7^* , δa_7^* , δb_7^* , δC_{ab7}^* y δh_{ab7}) y el análisis ANOVA de los modelos correspondientes obtenidos después de la desinfección por nebulización con APA en el día 7 se muestran en la Tabla 4.19 y 4.20, respectivamente.

Tabla 4.19. Resultados experimentales de los cambios en los parámetros de color (δL_7^* , δa_7^* , δb_7^* , δC_{ab7}^* , δh_{ab7}) de zarzamoras nebulizadas con APA después de 7 días de conservación a 2°C

APA ($\mu\text{L/L}$)	Tiempo (min)	δL_7^*	δa_7^*	δb_7^*	δC_{ab7}^*	δh_{ab7}
100	15	-3,29	132,67	-38,38	11,08	12,00
20	15	-21,45	289,33	-5,76	81,92	12,74
20	60	-35,23	69,22	33,86	40,49	1,84
60	5,7	-37,28	121,38	29,63	49,23	4,53
60	37,5	-18,71	176,44	11,47	52,59	8,13
60	37,5	-21,66	246,28	21,21	80,40	9,49
3,4	37,5	-32,33	177,97	26,14	62,24	6,99
60	37,5	-25,02	275,03	1,72	80,16	11,79
60	69,3	-29,41	131,46	15,45	41,98	6,07
100	60	-27,59	182,44	1,03	48,36	9,28
116,6	37,5	-24,52	177,08	-3,30	44,19	9,52

APA: ácido peracético; δL_0^* : cambio en el parámetro L*; δa_0^* : cambio en el parámetro a*; δb_7^* : cambio en el parámetro b*, δC_{ab0}^* : cambio en el parámetro C*_{ab}; δh_{ab7} : cambio en el parámetro h_{ab}, en el día 7.

Tabla 4.20. Análisis ANOVA de los cambios en los parámetros de color (δL_0^* , δa_0^* , δb_7^* , δC_{ab0}^* y δh_{ab7}^*) de zarzamoras nebulizadas después de 7 días de conservación a 2°C

Fuente	Gl	δL_0^*		δa_0^*		δb_0^*		δC_{ab0}^*		δh_{ab}^*	
		Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P
A:Concentración APA	1	169,7	0,0540	249,7	0,7848	1433,4	0,0603	978,9	0,1895	13,2	0,1885
B:Tiempo	1	90,8	0,0945	3045,3	0,3901	434,8	0,1658	25,9	0,7803	16,4	0,1603
AA	1	6,4	0,5067	3097,0	0,3869	132,6	0,3588	553,9	0,2788	0,3	0,7978
AB	1	27,7	0,2376	18208,8	0,1169	0,01	0,9924	1548,8	0,1329	16,7	0,1576
BB	1	70,2	0,1175	13542,6	0,1486	2,9	0,8779	1061,4	0,1785	16,4	0,1600
Falta de ajuste	3	491,7	0,0579	5022,5	0,6526	2042,5	0,1249	211,1	0,8420	42,0	0,2027
Error puro	2	19,9		5141,4		189,9		511,2		6,8	
R ²		0,41		0,78		0,47		0,84		0,56	
DMA (%)		15,1		15,6		18,9		16,7		19,8	

Términos significativos $p \leq 0,05$

Gl: grados de libertad; APA: ácido peracético; DMA: desviación media absoluta; δL_7^* : cambio en el parámetro L*; δa_7^* : cambio en el parámetro a*; δb_7^* : cambio en el parámetro b*; δC_{ab7}^* : cambio en el parámetro C*; δh_{ab7}^* : cambio en el parámetro h*, en el día 7

Los modelos presentaron una falta de ajuste no significativa ($P > 0,05$) y el R^2 y los valores DMA fueron aceptables.

Como puede observarse en la Tabla 4.20, la evaluación instrumental del color no presentó cambios significativos en ninguna de los parámetros evaluados luego de la conservación de las zarzamoras a 2°C durante 7 días.

Para todos aquellos parámetros de color en los que los modelos no muestran términos significativos en el ANOVA, se analizó si las muestras control y tratadas eran significativamente diferentes tanto en el día 0 como luego de 7 días a 2°C . También se determinó si los parámetros de color evaluados en cada muestra se modificaron significativamente durante el almacenamiento. En la Tabla 4.21 se muestran los valores promedios de los parámetros de color de todas las corridas experimentales.

Según los resultados, por efecto del tratamiento de desinfección se observan cambios en los atributos de color, las frutas son menos luminosas, de color más intenso ($C_{ab \text{ tratadas}} > C_{ab \text{ control}}$), más rojas que las frutas sin tratar, tanto al día 0 como 7. En cuanto al ángulo de tono, se observa que para el día 0 y luego de 7 días, las frutas son menos azules que las frutas sin tratar.

El efecto del almacenamiento a 2°C durante 7 días no provoca cambios importantes en los atributos de color de las zarzamoras control y tratadas.

Tabla 4.21. Valores promedios de las corridas experimentales de los parámetros de color de la muestras control y de las muestras tratadas en el Día 0 y Día 7.

Parámetro	Día	Promedio de muestras control	Promedio de muestras tratadas
L*	0	22,21 ± 2,32 ^{Aa}	18,73 ± 1,52 ^{Ab}
	7	24,83 ± 3,57 ^{Aa}	18,59 ± 2,32 ^{Ab}
a*	0	1,00 ± 0,77 ^{Aa}	2,06 ± 0,37 ^{Ab}
	7	0,80 ± 0,71 ^{Aa}	2,23 ± 0,54 ^{Ab}
b*	0	-	-
	7	-1,76 ± 0,76	-1,91 ± 0,36
C* _{ab}	0	2,44 ± 0,54 ^{Aa}	2,84 ± 0,22 ^{Ab}
	7	2,07 ± 0,70 ^{Aa}	2,98 ± 0,41 ^{Ab}
h _{ab}	0	293,48 ± 16,05 ^{Aa}	316,93 ± 8,71 ^{Aa}
	7	294,35 ± 21,24 ^{Aa}	319,05 ± 9,85 ^{Ab}

Valores con diferente letra mayúscula en la misma columna son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Valores con diferente letra minúscula en la misma fila son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

4.8 Efecto de la nebulización de APA sobre la reducción de *E.coli* inoculada en zarzamoras en el día de la aplicación (Día 0) y luego de 7 días de almacenamiento a 2°C (Día 7)

Para evaluar la eficacia del tratamiento de desinfección aplicado, en este caso sobre las zarzamoras, se llevaron a cabo ensayos de inoculación según lo descrito en el punto 3.4.3. De esta manera, los microorganismos inoculados en la fruta se recuperaron y enumeraron luego del tratamiento para determinar la reducción producida por acción de la nebulización con APA.

Para realizar este experimento se preparó una suspensión de *E.coli* para obtener un recuento en las zarzamoras inoculadas igual o superior a 10^5 UFC/g.

El valor inicial de *E.coli* en las zarzamoras inoculadas estuvo comprendido entre 5,6 y 6,0 log UFC/g.

Los resultados experimentales de la desinfección de zarzamoras inoculadas experimentalmente con *E.coli* para el día 0 y día 7, en las condiciones del diseño de nebulización se muestran en la Tabla 4.22.

Tabla 4.22. Recuentos microbiológicos de *E.coli* en zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0 y después de 7 días de conservación a 2°C

APA (uL/L)	Tiempo (min)	Recuento de <i>E.coli</i> (log UFC/g)	
		Día 0	Día 7
100	15	0,00	0,00
20	15	1,00	0,00
20	60	1,80	0,00
60	5,7	0,00	0,00
60	37,5	0,00	0,00
60	37,5	0,00	0,00
3,4	37,5	5,53	2,26
60	37,5	0,00	0,00
60	69,3	0,00	0,00
100	60	0,00	0,00
116,6	37,5	0,00	0,00

APA: ácido peracético; UFC/g: unidades formadoras de colonias por gramo de zarzamora.

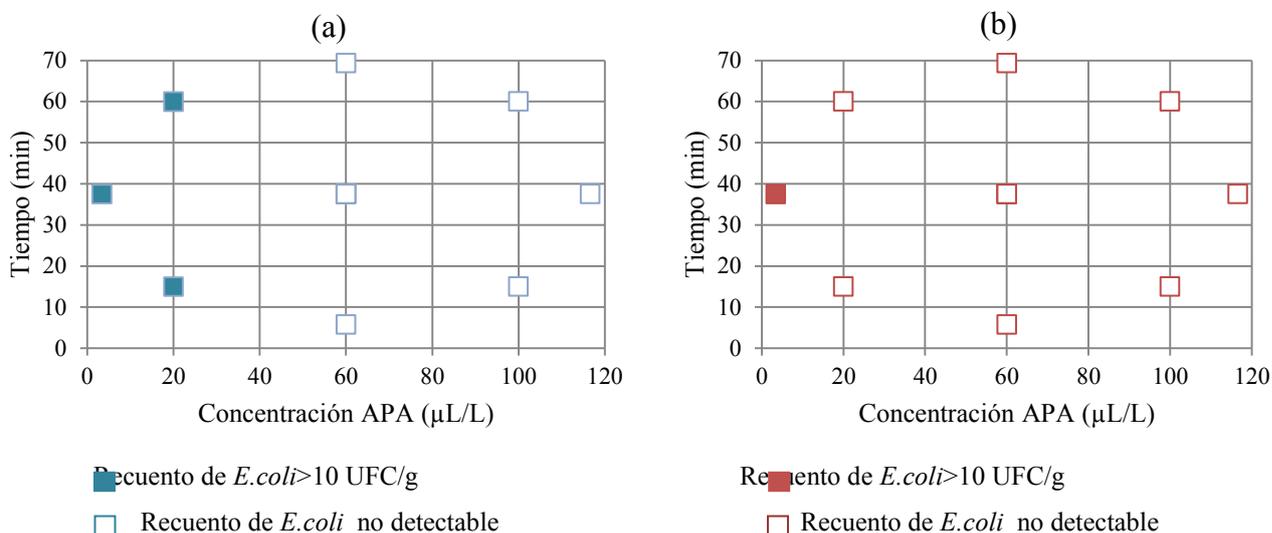
Los resultados obtenidos en la nebulización con APA en el día de aplicación (día 0) mostraron una considerable inactivación de *E.coli*.

La supervivencia de este microorganismo se evidenció cuando se aplicaron los tratamientos de desinfección con las menores concentraciones de ácido peracético utilizadas (en el rango de 3,4 a 20 $\mu\text{L/L}$ de APA) independientemente del tiempo de tratamiento aplicado.

En el día 7, luego del período de conservación a 2°C , se mantuvo la inactivación de *E.coli*, este microorganismo no se recuperó en las diferentes corridas experimentales, con excepción del tratamiento con menor concentración de APA (3,4 $\mu\text{L/L}$ y 37,5 min), que corresponde al máximo valor de recuento obtenido luego de la aplicación en el día 0.

En la Figura 4.23 se resumen los resultados de la desinfección con APA de zarzamoras inoculadas con *E.coli* en el día 0 y luego de 7 días de conservación a 2°C

Figura 4.23. Recuento microbiológico de *E.coli* en zarzamoras nebulizadas con APA en el día 0 (a) y después de 7 días de conservación a 2°C (b)



El análisis de los resultados obtenidos, imposibilita generar un modelo predictivo para estudiar la operación de desinfección sobre la reducción de *E.coli* inoculada en zarzamora.

Sin embargo, se sugiere que concentraciones de APA superiores a 20 μ L/L serían suficientes para conseguir la reducción hasta valores no detectables de este microorganismo en el día del tratamiento y luego del período de conservación refrigerado.

Un aspecto importante a considerar en la inactivación alcanzada en este ensayo de desinfección incluye el potencial efecto de compuestos antimicrobianos de origen natural presentes en las zarzamoras (Sofos *et al.*1998).

Cuando las células microbianas de la superficie de las frutas entran en contacto con ácidos orgánicos u otros antimicrobianos durante el proceso de homogeneización en *stomacher*, se produce la liberación de fluidos tisulares que pueden haber causado la inhibición o lesión subletal de las células de *E.coli*, efecto que se adiciona a la acción del ácido peracético (Sofos *et al.*1998; Zia-UI-Haq *et al.* 2014).

4.9 Optimización del modelo de desinfección

Se procedió a realizar una optimización múltiple de los tratamientos de desinfección de frutillas y zarzamoras. Esta se realizó con las respuestas expresadas como reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT), reducción de mohos y levaduras (RML) y porcentajes de los cambios de color en el día 0 con respecto a la materia prima sin tratar (% δ L* y % δ a* para las frutillas y % δ b* para las zarzamoras).

En esta optimización, realizada mediante la función de deseabilidad de Derringer, se planteó encontrar condiciones de las variables en donde se maximice la reducción microbiológica manteniendo sin cambios el color de la fruta, aspecto relacionado con la aceptación organoléptica por los consumidores. La elección de estas respuestas se hizo en base a que los cambios en los parámetros L* y a* fueron respuestas significativas y resultaron apropiados para comprobar el color de las frutillas, de la misma manera que el parámetro b* lo fue para las zarzamoras.

Los criterios usados en la función deseabilidad de Derringer se muestran en la Tabla 4.23 y 4.24 para frutillas y zarzamoras, respectivamente.

Tabla 4.23. Rangos obtenidos y criterios utilizados en la optimización de la desinfección de frutillas usando la función de Derringer.

Respuesta	Valor inferior	Valor superior	Criterios	
			Objetivo	π
RAMT	0,68	3,06	maximice	3
RML	0,32	3,13	maximice	3
δL^*	-4,16	9,18	acierto 0	3
δa^*	-6,94	0,62	acierto 0	3

π : importancia relativa, RAMT: reducción de microorganismos mesófilos totales, RML: reducción de mohos y levaduras, δL^* : cambios en el parámetro L^* y δa^* : cambios en el parámetro a^* .

Tabla 4.24. Rangos obtenidos y criterios utilizados en la optimización de la desinfección de zarzamoras usando la función de Derringer.

Respuesta	Valor inferior	Límite superior	Criterios	
			Objetivo	π
RAMT	0,33	1,98	maximice	3
RML	0,6	2,48	maximice	3
δb^*	-41,68	15,65	acierto 0	3

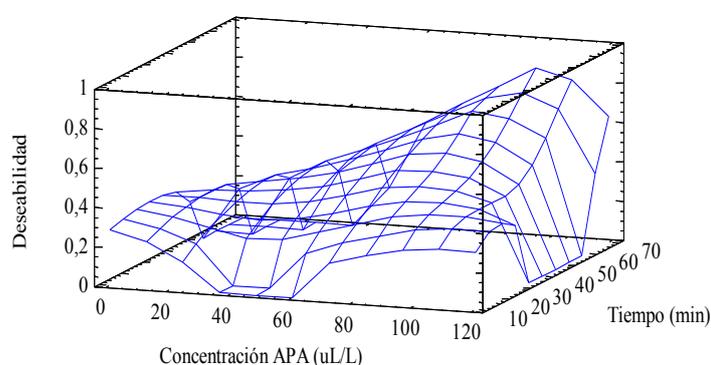
π : importancia relativa, RAMT: reducción de microorganismos mesófilos totales, RML: reducción de mohos y levaduras, δb^* : cambios en el parámetro b^* .

El valor de deseabilidad alcanzado y los valores de la concentración y tiempo óptimos para alcanzar máxima reducción microbiológica sin cambios en el color de las frutillas, se muestran en la Tabla 4.25. En la Figura 4.24 se muestra el gráfico de deseabilidad obtenido en esas condiciones.

Tabla 4.25. Valor de deseabilidad y valores óptimos de concentración de APA y tiempo de tratamiento para frutillas

<i>Deseabilidad</i>	<i>Factor</i>	<i>Valor Óptimo</i>
0,86	Concentración APA ($\mu\text{L/L}$)	96,9
	Tiempo (min)	69,3

Figura 4.24. Gráfico de deseabilidad obtenido para la optimización de la desinfección de frutillas

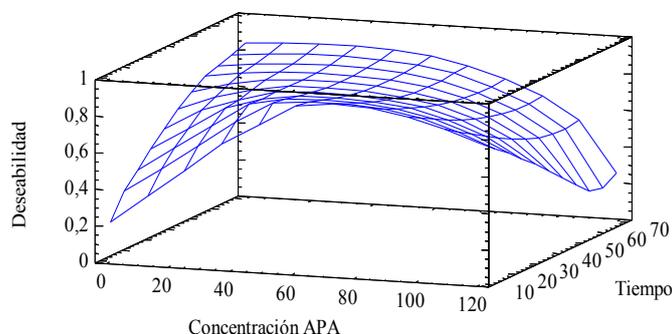


En la Tabla 4.26 y en la Figura 4.25 se muestran el valor de deseabilidad alcanzado y los valores de la concentración y tiempo óptimos para alcanzar máxima reducción microbiológica sin cambios en el color de las zarzamoras y el gráfico de deseabilidad obtenido en esas condiciones, respectivamente.

Tabla 4.26. Valor de deseabilidad y valores óptimos de concentración de APA y tiempo de tratamiento para zarzamoras

<i>Deseabilidad</i>	<i>Factor</i>	<i>Valor Óptimo</i>
0,96	Concentración APA ($\mu\text{L/L}$)	74,2
	Tiempo (min)	5,7

Figura 4.25. Gráfico de deseabilidad obtenido para la optimización de la desinfección de zarzamoras



4.10 Validación de los modelos propuestos de desinfección en las condiciones establecidas a partir de la optimización de las múltiples respuestas.

En las condiciones experimentales que optimizaban las respuestas se procedió a la validación de los modelos.

Para las frutillas, se realizaron las experiencias posteriores de nebulización en las condiciones determinadas en la Tabla 4.25.

Los valores predichos de las respuestas y los valores experimentales obtenidos luego de la desinfección se muestran en la Tabla 4.27.

Tabla 4.27. Valores de las respuestas predichas y experimentales en la optimización de las desinfección de frutillas

Respuesta	Valor predicho	Valor experimental
RAMT	2,8 ^a	2,4 ± 0,3 ^a
RML	2,5 ^b	1,8 ± 0,2 ^a
δL^*	0,0 ^b	14,7 ± 2,2 ^a
δa^*	-1,3 ^b	9,8 ± 2,9 ^a

Media ± desviación estándar. (n=3). Valores en la misma fila con diferente letra son estadísticamente significativos (p≤0,05).

Los resultados obtenidos validaron el modelo del tratamiento de desinfección a partir de la optimización de las respuestas.

No se observan diferencias significativas entre los valores predichos de las respuestas y los resultados experimentales para la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (RAMT) pero sí hubo diferencia para la reducción en la población de mohos y levaduras (RML). La diferencia observada, desde el punto de vista microbiológico, es de pequeña magnitud (0,7 ciclos logarítmicos) por lo que se considera que el ensayo de validación resultó satisfactorio.

Con respecto a los parámetros de color analizados, los resultados experimentales fueron estadísticamente diferentes. Como resultado del tratamiento de desinfección realizado, se obtuvieron frutillas algo más claras y más rojas que las esperadas, siendo esto un aspecto que resultó beneficioso para la calidad sensorial (color).

Una de las posibles causas las diferencias obtenidas, puede deberse a la utilización, en estos ensayos, de la variedad de frutilla *Camino Real*, variedad diferente a la utilizada en los ensayos de desinfección realizados en la presente tesis.

Las características de las distintas variedades de frutillas podrían tener un comportamiento diferente frente al ácido peracético.

5. CONCLUSIONES

Respecto de la carga microbiana de las frutillas y zarzamoras frescas enteras.

- Se conoció la microbiota inicial naturalmente presente en la materia prima, frutillas y zarzamoras, de nuestra región. Se determinó la carga microbiana inicial de microorganismos aerobios mesófilos totales y hongos.

En ambas frutas la microbiota estuvo constituida por bacterias, levaduras y mohos, reconocidas por las características macroscópicas de las colonias desarrolladas sobre medios de cultivo. En las zarzamoras se observaron en mayor proporción, colonias correspondientes a levaduras y mohos, diferencia relacionada con las características de cultivo propias de cada fruta.

Respecto de los cambios sobre la carga microbiana y el color de frutillas y zarzamoras debido a los tratamientos de desinfección por nebulización.

- Los resultados obtenidos de la desinfección por nebulización con ácido peracético de frutillas y de zarzamoras en el espacio experimental ensayado (3,4 – 116,6 $\mu\text{L/L}$ ácido peracético, 5,7 – 69,3 min), indicaron que las variables del proceso y los niveles utilizados lograron la reducción de la carga microbiana presente naturalmente en las frutas.

Para las frutillas, la concentración de ácido peracético y el tiempo aplicado en el día del tratamiento de desinfección, incidieron significativamente en la reducción tanto de microorganismos aerobios mesófilos totales como de mohos y levaduras. Se obtuvieron los modelos predictivos para cuantificar dichas reducciones.

En el caso de las zarzamoras, la concentración de ácido peracético fue el único factor significativo para la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales y de

mohos y levaduras, en el día de aplicación del tratamiento. Se obtuvo el modelo matemático predictivo para cada grupo microbiano.

- Los resultados obtenidos el día de aplicación de la nebulización indican que el tratamiento de desinfección produce cambios en la calidad sensorial de frutillas y zarzamoras, modificando el color original de ambas frutas.

En frutillas, se obtuvieron modelos para los cambios en los parámetros de color δL_0^* , δa_0^* , δb_0^* y δC_{ab0}^* . Éstos fueron afectados por las variables del proceso, concentración de APA y tiempo de tratamiento. No se obtuvo modelo predictivo para los cambios en el ángulo de tono, δh_{ab0}^* . Se encontró que la nebulización provoca una pérdida del color rojo en todo el dominio experimental ensayado, el parámetro de color a^* se modifica en un 9%, en promedio, con respecto al parámetro a^* correspondiente a la materia prima. Además, la aplicación de altas concentraciones de APA ocasiona un oscurecimiento de las frutillas.

Para las zarzamoras, las variables de la desinfección, en el día de aplicación del tratamiento, afectaron sólo uno de los parámetros estudiados, δb_0^* . Para este caso se obtuvo un modelo predictivo en función de la concentración de APA. Si bien el resto de los parámetros de color no mostraron cambios significativos con las variables del proceso, el aumento en la concentración de APA aplicado en la nebulización produce pérdida de tono azul, tanto a tiempos largos como cortos de tratamiento. El parámetro de color b^* se modificó en un 12% con respecto a la materia prima.

Respecto a la eficacia del tratamiento sobre Escherichia coli en frutillas y zarzamoras inoculadas experimentalmente.

- En las frutillas, la concentración de ácido peracético y el tiempo de nebulización en el día de aplicación, afectaron significativamente la reducción de *E.coli* inoculada. Se obtuvo un modelo matemático predictivo que permite cuantificar dicha reducción.
- En las zarzamoras se produjo una alta reducción del número de *E.coli* en el día del tratamiento de desinfección. Si bien la inoculación experimental fue satisfactoria, la acción del APA sumada a las características antimicrobianas propias de la zarzamora, ocasionaron la inactivación del microorganismo, lo que imposibilitó generar un modelo predictivo.

Respecto a la efectividad del tratamiento luego del almacenamiento postcosecha bajo refrigeración sobre las poblaciones de microorganismos contaminantes (nativos e inoculados) y la calidad sensorial.

- Los resultados obtenidos luego del almacenamiento de 7 días a 2°C muestran que el tratamiento de desinfección con APA permitió mantener cuantitativamente las poblaciones de microorganismos en los niveles logrados luego de la desinfección en frutillas y zarzamoras.

En frutillas, la concentración de ácido peracético y el tiempo de tratamiento incidieron significativamente en la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales y de mohos y levaduras lograda con los tratamientos de desinfección iniciales, luego de 7 días de almacenamiento a 2°C. En este escenario, se obtuvieron sendos modelos predictivos que permitieron cuantificar las reducciones que se alcanzan en ese momento.

Para las zarzamoras, la concentración de ácido peracético aplicada en la desinfección, fue el único factor significativo que influyó en la reducción de mohos y levaduras luego de 7 días de almacenamiento refrigerado a 2°C. En este escenario, se obtuvo un modelo matemático que permite cuantificar dicha reducción.

- Tanto en las frutillas como en las zarzamoras se obtuvo una alta inactivación de *E.coli* luego del periodo de almacenamiento refrigerado, lo que imposibilitó generar los modelos predictivos correspondientes. pero que sugerirían un escenario favorable desde el punto de vista de la inocuidad del producto, que se orientaría hacia una mayor inactivación con el transcurso del tiempo.
- En las frutas control, sin tratamiento, y luego del almacenamiento de 7 días a 2°C, se observan cambios leves en la calidad sensorial de las frutillas y zarzamoras. Se verifican cambios propios de la senescencia, como son la pérdida del color rojo y azul en frutillas y zarzamoras respectivamente, y colores menos intensos.
- Luego del almacenamiento de 7 días a 2°C, el tratamiento de desinfección produce efectos diferentes en el color de las frutillas y zarzamoras.

En las frutillas, se obtuvieron modelos para los parámetros de color δL_7^* , δa_7^* , δb_7^* y δC_{ab7}^* . No se obtuvo modelo para los cambios en el ángulo de tono, δh_{ab7}^* .

La nebulización con APA provocó cambios en la calidad sensorial, se intensificó la pérdida del color rojo y produjo el oscurecimiento de las frutas.

En zarzamoras, la aplicación de APA en cualquier condición de las variables elegidas en el rango ensayado, no produjo cambios importantes en la calidad sensorial después del almacenamiento refrigerado. Los parámetros de color no mostraron cambios significativos con las variables del proceso, aunque las zarzamoras tratadas resultaron menos azules que las frutas sin tratar, el parámetro de color b^* se modifica en un 10% con respecto a la materia prima sin tratamiento.

Respecto a la optimización de la operación de desinfección de frutillas y zarzamoras.

- La metodología de optimización de múltiples respuestas permitió determinar las condiciones óptimas de desinfección para maximizar la reducción microbiológica y minimizar los cambios en el color, tanto en frutillas como en zarzamoras. Las condiciones óptimas obtenidas para frutillas fueron 96,9 $\mu\text{L/L}$ de APA y 69,3 min y para zarzamoras 74,2 $\mu\text{L/L}$ de APA y 5,7 min.
- Para las frutillas, la validación de los modelos obtenido en las condiciones óptimas, resultó satisfactorio y permitió demostrar la eficacia del mismo preservando su calidad microbiológica y sensorial.

Los microorganismos aerobios mesófilos totales no presentaron diferencias significativas entre los resultados experimentales y los predichos por el modelo, no así para la población fúngica, donde se obtuvo una diferencia de pequeña magnitud. Las frutillas sometidas al tratamiento de desinfección resultaron más rojas y más claras que lo predicho por el modelo, por lo que, si bien hubo diferencias significativas, resultó una característica favorable para la calidad sensorial.

Los resultados obtenidos en esta tesis implican una contribución relevante en lo que respecta a la desinfección de frutillas y zarzamoras con ácido peracético, un antimicrobiano amigable con el ambiente, aplicado mediante la técnica de nebulización. Esto demostraría que dicha operación podría ser una tecnología postcosecha adecuada para reducir y controlar la carga microbiológica presente y preservar la calidad sensorial de las frutas incluso luego de 7 días de almacenamiento a 2°C.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abadias M., Alegre, I.; Usall, J., Torres R., Viñas I. (2011) Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apple. *Postharvest Biology and Technology*. 59, 289–297
- Alexandre E., Brandão T., Silva C. (2012) Efficacy of non-thermal technologies and sanitizer solutions on microbial load reduction and quality retention of strawberries. *Journal of Food Engineering*. 108, 417–426.
- APHA-AWWA-WEF. (1989) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th 7 Ed., Washington, D.C., E.E.U.U.
- APHA (2001) *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 Ed., American Public Health Association. Washington, D.C., E.E.U.U.
- Artés F., Gómez P., Aguayo E., Escalona V., Artés Hernández, F. (2009) Review: Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biology and Technology*. 51, 287-296.
- Baldry M.G.C. (1983) The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogenperoxide and peracetic acid. *Journal of Applied Microbiology*. 54, 417-423.
- Baş D., Boyacı I.H. (2007) Modelling and optimization I: usability of response surface methodology. *Journal Food Engineering*. 78, 836-845.
- Bernard H., Faber M., Wilking H., Haller S., Höhle M., Schielke A., Ducomble T., Siffczyk C., Merbecks S., Fricke G., Hamouda O., Stark K., Werber D. (2014) Large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany, 2012. *EuroSurveillance*. 19, 20719.

- Beuchat L.R. (1998). Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. In: Food Safety Issues, Food Safety Unit. World Health Organization. 1–42.
- Beuchat L.R., Adler B.B., Lang M.M. (2004) Efficacy of chlorine and a peroxyacetic acid sanitizer in killing *Listeria monocytogenes* on iceberg and Romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. *Journal of Food Protection*. 67, 1238-42.
- Bialka K.L. y Demirci A. (2008) Efficacy of pulsed UV-light for the decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on raspberries and strawberries. *Journal of Food Science*. 73, 201-207.
- Bocchetto Dellarda *et al.* (2014) Trayectoria y prospectiva de la agroindustria alimentaria argentina: agenda estratégica de innovación. 1º ed. - Buenos Aires: Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.
- Brackett R.E. (1999) Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens on produce. *Postharvest Biology and Technology*. 15, 305-311.
- Branzanti E.C. (1989). *La Fresa*. (Ed. Mundi-Prensa). Madrid, España.
- Burnett S.L., Beuchat L.R. (2001) Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 27, 104-110.
- Briñez W., Roig Sagués A., Hernández Herrero M., López Pedemonte T., Guamis B. (2006) Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli*. *Food Control*. 17, 516-521.
- Bruzzone I. (2012) 13º Reunión del Foro Federal de Frutas Finas - Región Patagonia. El

Hoyo (Chubut), Argentina. SAGPyA. Disponible en:

http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/revista/ediciones/42/articulos/r4_2_20_ForoFrutasFinas.pdf

Butot S., Putallaz T., Sánchez G. (2007) Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 186-192

Calder L., Simmons G., Thorley C., Taylor P., Pritchard K., Greening G., Bishop J. (2003) An outbreak of hepatitis A associated with consumption of raw blueberries. *Epidemiology and Infection*. 131, 745-751.

Caponigro V., Ventura M., Chiancone I., Amato L., Parente E., Piro F. (2010) Variation of microbial load and visual quality of ready-to-eat salads by vegetable type, season, processor and retailer. *Food Microbiology*. 27, 1071–1077.

Castañeda Ovando A., Pacheco Hernández M., Paéz Hernández M.E., Rodríguez J.A., Galán Vidal C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 113, 859-871.

CDC. Centre for Disease Control and Prevention (2006) Non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) outbreaks. CDC Foodborne Outbreak Online Database, USA.

CDC Centre for Disease Control and Prevention(2016) Multistate outbreak of hepatitis A linked to frozen strawberries. CDC Foodborne Outbreak Online Database, USA

Cepeda Sáez A., Herrera Marteache A., Martín de Santos M.R., Martínez López A., Pintó Solé R. (2012) Riesgos microbiológicos asociados al consumo de frutos obtenidos de *Fragaria* spp. y *Rubus* spp. Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) 16, 57-69.

- CFIA Canadian Food Inspection Agency. (2012) Certain western family brand pomeberry blend berries may contain hepatitis A virus. *HealthHazardAlert*.
- Connor A. M., Luby J.J., Hancock J.F., Berkheimer S., Hanson E.J. (2002) Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 893-898.
- Cordenunsi B.R., Nascimento J.R.O., Genovese M.I., Lajolo F.M. (2002). Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 2581- 2586.
- Cotterelle B., Drougard C., Rolland J., Becharel M., Boudon M., Pinede S., Traoré O., Balay K., Pothier P., Espié E. (2005) Outbreak of norovirus infection associated with the consumption of frozen raspberries, France, March 2005. *EuroSurveillance*. 10, 2690.
- Delele M., Vorstermans B., Creemers P., Tsige A., Tijskens E., Schenk A., Opara U., Nicolai B., Verboven P. (2012) CFD model development and validation of a thermonebulisation fungicide fogging system for postharvest storage of fruit. *Journal of Food Engineering*. 108, 59–68.
- Del Valle V., Hernandez-Muñoz P., Guarda, A., Galotto M. J. (2004) Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. *Food Chemistry*. 91, 751- 756.
- Derringer G., Suich J. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*. 12, 214 – 219.
- Doyle M.P., Zhao T., Meng J., Zhao S. (1997) *Escherichia coli* O157:H7. En: Food Microbiology: Fundamental and Frontiers. Washington D.C. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J. eds. American Society for Microbiology. 171-191.

EFSA (2013). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). *The EFSA Journal*. 11, 3025.

Erickson, M.C. (2012). Internalization of Fresh Produce by Foodborne Pathogens. *Annual Review of Food Science and Technology*. 3, 283-310

FAO/OMS (2009) Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. Benefits and Risks of the Use of chlorine containing disinfectants in Food Production and Food Processing Report of a Joint. FAO/WHO Expert Meeting Ann Arbor, MI, USA.

FDA/CFSAN (2001) Chapter III. Standardization of a Method to Determine the Efficacy of Sanitizers in Inactivating Human Pathogenic Microorganisms on Raw Fruits and Vegetables. En: Analysis and Evaluation of Preventive control measures for the Control and Reduction /Elimination of Microbial Hazards on Fresh & Fresh Cut Produce. Disponible en:
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091363.htm>.

FDA/CFSAN (2001) Chapter V. Methods to Reduce/Eliminate Pathogens from Produce and Fresh-Cut Produce. En: Analysis and Evaluation of Preventive control measures for the Control and Reduction /Elimination of Microbial Hazards on Fresh & Fresh Cut Produce. Disponible en:
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091363.htm>.

Fell G., Boyens M., Baumgarte S. (2007) Frozen berries as a risk factor for outbreaks of norovirus gastroenteritis. Results of an outbreak investigation in the summer of

- 2005 in Hamburg. *Bundesgesundheitsblatt–Gesundheitsforschung–Gesundheitsschutz*. 50, 230-236.
- Giampieri F., Tulipani S., Alvarez-Suarez A.M., Quiles J.L., Mezzetti B., Battino M. (2012) The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*. 28, 9- 19.
- Gómez Riera P., Bruzone I., Kirschbaum D. (2014) Visión prospectiva de la cadena de frutas finas al 2030. 1° ed. Buenos Aires, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.
- Goodburn C., Wallace C.A. (2013) The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: a review. *Food Control*. 32, 418–427.
- Green A. (1971) Soft Fruits. In: *The biochemistry of fruit and their Products*. Vol. 2. Hulme, A.C. (Ed) Academic Press, New York 375-410.
- Halvorsen B.L., K. Holte M.C., Myhrstad I., Barikmo E., Hvattum S.F., Remberg A.B., Wold K., Haffner H., Baugerod L.F., Andersen J.O., Moskaug D.R., Jacobs J., Blomhoff R. (2002) A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal of Nutrition*. 132, 461-471.
- Hirneisen K.A., Sharma M., Kniel K.E. (2012) Human enteric pathogen internalization by root uptake into food crops. *Foodborne pathogens and disease*. 5, 396-405.
- Hjertqvist M., Johansson A., Svensson N., Abom P., Magnusson C., Olsson M., Hedlund K.O., Andersson, Y. (2006) Four outbreaks of norovirus gastroenteritis after consuming raspberries, Sweden, June-August 2006. *EuroSurveillance*. 11, 3038.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications) (2006) Frutas y productos de fruta. En: *Microorganismos de los Alimentos 6. Ecología microbiana*

- de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- ISO (International Standart) (2013) Microbiology of food chain. Horizontal method for the enumeration of microorganisms ISO 4833-2.
- Jay J.M. (2009) Microbiología moderna de los alimentos. 5° Ed. Editorial Acribia.Zaragoza, España.
- Kader A., Adaskaveg J., Arpaia M., Barret D., Bruhn C., Cantwell M., Cook R., Crisosto C., Edwards D., Forster H., Fortlage R., Gorny J., Harris L., Kitinoja L., Mitcham E., Mitchell F., Mitchell J., Reid M., Sommer N., Suslow T., Thompson J., Zagory D. (2002) *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. 3° Ed. University of California. Agriculture and Natural Resources.
- Karabulut O.A., Ilhan K., Arslan, U., Vardar, C. (2009) Evaluation of the use of chlorine dioxide by fogging for decreasing postharvest decay of fig.*Postharvest Biology and Technology*.52, 313–315.
- Kim H., Tyu J.H., Beuchat L.R., (2006) Survival of *Enterobacter sakazakii* on fresh produce as affected by temperature, and effectiveness of sanitizers for its elimination. *International Journal of Food Microbiology*. 111, 134–143.
- Kim J.K., Harrison M.A. (2009) Surrogate selection for *Escherichia coli* O157:H7 based on cryotolerance and attachment to romaine lettuce. *Journal of Food Protection*. 72, 1385–1391.
- Kirschbaum D.S., Mamana R. (2008) Present and future of the strawberry industry in Argentina. En: VI International Strawberry Symposium, Huelva, España. ISHS, 429.
- Kitis M. (2004) Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Enviromental Institute*. 30, 47-55.

- Knudsen D.M., Yamamoto S.A., Harris L.J. (2001) Survival of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 on fresh and frozen strawberries. *Journal of Food Protection*. 64, 1438–1488.
- Kunigk L., Almeida M.C. (2001) Action of peracetic acid on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in suspension or settled on stainless steel surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32, 38- 41.
- Lynch M.F., Tauxe R.V., Hedberg C.W. (2009) The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiology and Infection*. 137, 307-315.
- López Camelo A. (2003) Manual para la Preparación y Venta de Frutas y Hortalizas del campo al Mercado. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en:
<http://www.fao.org/docrep/006/Y4893S/y4893s00.htm#Contents>
- Martínez-Sánchez A., Allende A., Bennett R.N., Ferreres F., Gil M.I. (2006) Microbial, nutritional and sensory quality of rocket leaves as effected by different sanitizers. *Postharvest Biology and Technology*. 42, 86–97.
- Mendes Furlan V., Antunes Correa A., Carbonera N., Pinho M., Zambiasi R., Mello Luvielmo M. (2011) Total phenols, antioxidant activity and microbiological quality of ozone sanitized blackberry (*Rubus* spp. L.) *Advance Journal of Food Science and Technology*. 3, 436 -441
- Mercado Central de Buenos Aires. (2014) Mercado, manejo postcosecha y enfermedades de la frutilla. Gerencia de Calidad y Tecnología. Disponible en:
<http://www.mercadocentral.gob.ar/zip tecnicas/frutilla.pdf>.
- Newsletter PAA. (2009) Programa de Agronegocios y Alimentos de la Facultad de

Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Disponible en:<http://www.agro.uba.ar/agronegocios/newsletterpaa/2009/326>

- Odriozola-Serrano I., Soliva-Fortuny R., Martín-Belloso O. (2010) Changes in bioactive composition of fresh-cut strawberries stored under superatmospheric oxygen, low-oxygen or passive atmospheres. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23, 37–43
- Oh S.W., Gray P.M., Dougherty R.H., Kang H.D. (2005a). Aerosolization as novel sanitizer delivery system to reduce foodborne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 41, 56–60.
- Oh S.W., Dancer G.I., Kang H.D. (2005b) Efficacy of Aerosolized Peroxyacetic Acid as a Sanitizer of Lettuce Leaves. *Journal of Food Protection*. 68, 1743–1747.
- Pianetti A., Sabatini L., Citterio B., Pierfelici L., Ninfali P., Bruscolini E. (2008) Changes in microbial populations in ready-to-eat vegetable salads during shelflife. *Italian Journal of Food Science*. 20, 245–254.
- Ramos B., Miller F.A., Brandão T.R., Teixeira, P., Silva C.L. (2013) Fresh fruits and vegetables. An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 20, 1-15
- ReNaLOA (Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos) (2014) Análisis microbiológico de los alimentos. Metodología analítica oficial. ANMAT.
- Rieger M. (2006). Blackberries and Raspberries (*Rubus* spp.). Introduction to Fruit Crop. University of Georgia (UGA). 89-103.
- Rodgers S.L., Cash J.N., Siddiq M., Ryser E.T. (2004) A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries and cantaloupe.

Journal of Food Protection. 4, 636-848

Saccone K. (2013) Caracterización de la zona de Coronda como productora de frutillas.

Disponible

en:http://64.76.123.202/SAGPYA/economias_regionales/_frutas/_informes/Produccion_de_frutillas_en_coronda.pdf.

SAGPyA (2006) Economías regionales. Disponible en:

http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/economias_regionales/_frutas/_cadenas/Frutas_finas_berrie_11_07.htm.

Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. (2004) Introduction to food and airborne fungi. 7 Ed. CBS, Centraalbureauvoor. Schimmelcultures. Netherlands.

Sapers G.M., Miller R.L., Mattrazzo A.M. (1999) Effectiveness of sanitizing agents in inactivating *Escherichia coli* in Golden Delicious Apples. *Journal of Food Science*. 64, 734-737.

Sapers G.M. (2001). Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. *Food Technology and Biotechnology*. 39, 305- 311.

Sapers G.M., Sites J.E. (2003) Efficacy of 1% Hydrogen Peroxide Wash in Decontaminating Apples and Cantaloupe Melons. *Journal of Food Science*. 68, 1793-1797.

Sofos J., Beuchat L., Davidson P., Johnson E. (1998) Naturally occurring antimicrobials in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 28, 71- 77.

Silveira A.C., Conesa A., Aguayo E., Artés F. (2008) Alternative sanitizers to chlorine for use on fresh-cut “Galia” (*Cucumis melo* var. *catalupensis*) melon. *Journal of Food Science*. 73, 405- 411.

- Terefe N. S., Matthies K., Simons L., Versteeg C. (2009) Combined high pressure-mild temperature processing for optimal retention of physical and nutritional quality of strawberries (*Fragaria* × *ananassa*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10, 297–307.
- Tournas V. H. (2005). Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. *International Journal of Food Microbiology*. 99, 71–77.
- Van De Velde F., Pirovani M., Güemes D., Piagentini A. (2012) Effect of washing-disinfection conditions on total anthocyanins and color of fresh cut strawberries. En: *Color in food: Technological and psychophysical aspects*. (ISBN: 9781439876930) Ed: Buera y Caivano. CRC Press. 219-226.
- Van de Velde F., Piagentini A., Güemes D.R., Pirovani M.E. (2013) Modelling changes in anthocyanins, total vitamin C, and colour as a consequence of peracetic acid washing disinfection of two cultivars of strawberries for fresh-cut processing. *International Journal of Food Science and Technology*. 48, 954–961.
- Van de Velde F., Vaccari M.C., Piagentini A.M., Pirovani M.É. (2016) Optimization of strawberry disinfection by fogging of a mixture of peracetic acid and hydrogen peroxide based on microbial reduction, color and phytochemicals retention. *Food Science and Technology International*. 22, 485-95.
- Vandekinderen I., Van Camp J., Devlieghere F., Veramme K., Denon Q., Ragaert P., De Meulenaer B. (2008). Effect of decontamination agents on the microbial population, sensorial quality, and nutrient content of grated carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 5723-5731.
- Vandekinderen I., Devlieghere F., Van Camp J., Denon Q., Sanchez Alarcon S., Ragaert P., De Meulenaer B. (2009). Impact of a decontamination step with peroxyacetic

- acid on the shelf-life sensory quality and nutrient content of grated carrots packed under equilibrium modified atmosphere and stored at 7°C. *Postharvest Biology and Technology*.54, 141-152.
- Vardar C., Ilhan K., Karabulut O. (2012) The application of various disinfectants by fogging for decreasing postharvest diseases of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*. 66, 30–34.
- Vicente A.R. (2004) Efecto de tratamientos térmicos de alta temperatura sobre calidad y fisiología postcosecha de frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch.). Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Wang S.Y., Jiao H. (2000) Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 5677-5684.
- Wang S.Y., Bowman L., Ding M. (2008) Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus sp.*) and promotes antiproliferation of human cancer cells. *Food Chemistry*. 107, 1261-1269.
- White P.J. (2002) Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *Journal of Experimental Botany*.53, 1995- 2000.
- Wu V, Kim B. (2007) Effect of a simple chlorine dioxide method for controlling five foodborne pathogens, yeast and molds on blueberries. *Food Microbiology*. 24, 794-800.
- Yahia E.M. (2007) Modified and controlled atmospheres. En: Recent advances in alternatives postharvest technologies to control fungal diseases in fruits and vegetables. Transworld Research Network. 103-125
- Zia-Ul-Haq M., Riaz M., De Feo V., Jaafar H., Moga M. (2014) *Rubus Fruticosus*L.:

Constituents, Biological Activities and Health Related Uses. *Molecules* 19,
10998-11029

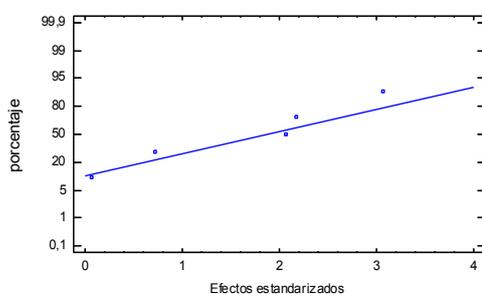
7. ANEXO

Figura 7.1. Gráficos de diagnóstico para los modelos $RAMT_0$ y RML_0 de frutillas nebulizadas con ácido peracético en el día 0

 $RAMT_0$

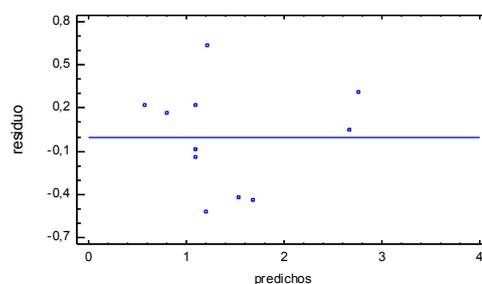
Distribución normal de los errores

Gráfico de Probabilidad Normal para reducir AMT

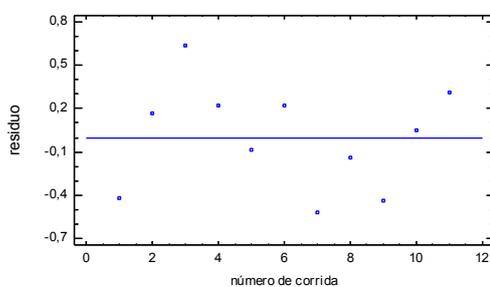


Variancia

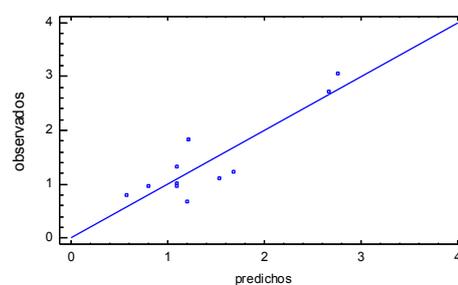
Gráfica de Residuos para reducir AMT



Independencia

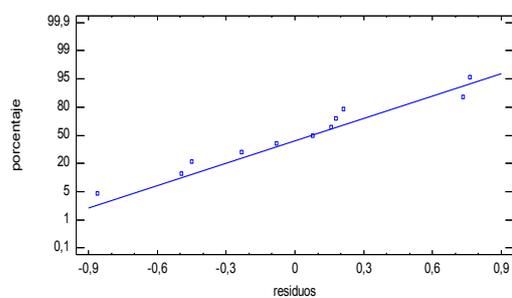


Observados vs. predichos

 RML_0

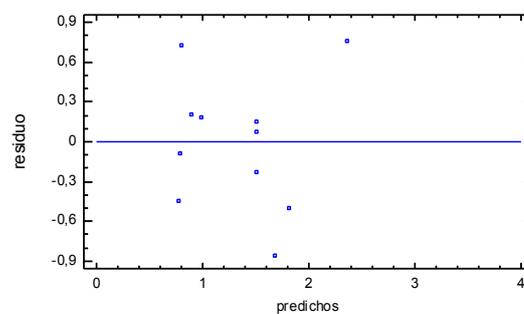
Distribución normal de los errores

Gráfico de Probabilidad Normal para Residuos



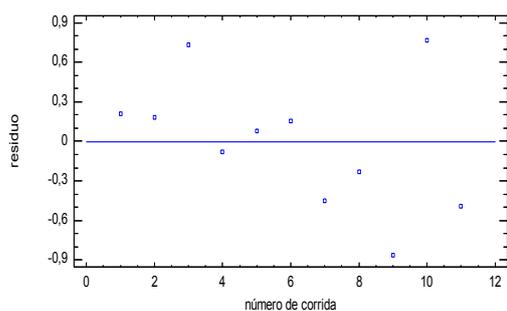
Variancia

Gráfica de Residuos para red H y L



Independencia

Gráfica de Residuos para red H y L



Observados vs. predichos

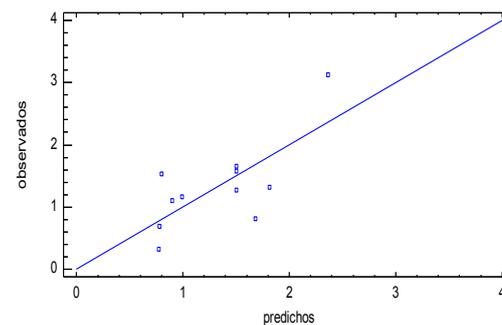
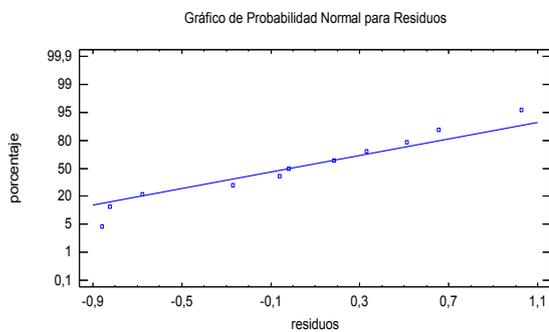


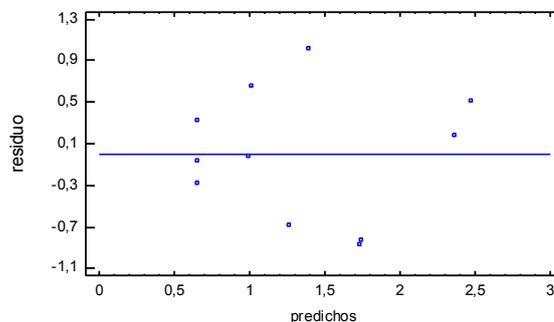
Figura 7.2. Gráficos de diagnóstico para los modelos $RAMT_7$ y RML_7 para frutillas nebulizadas con ácido peracético después de 7 días de conservación a 2°C

$RAMT_7$

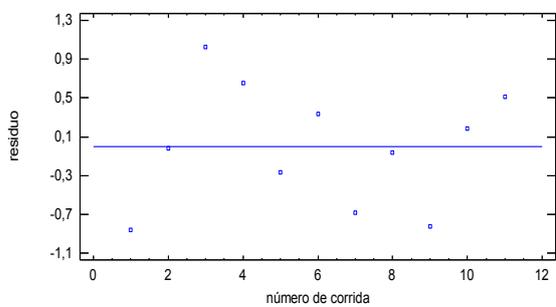
Distribución normal de los errores



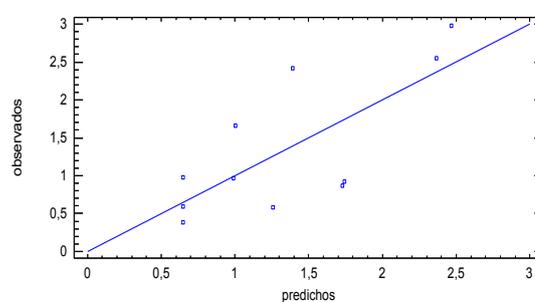
Variancia



Independencia

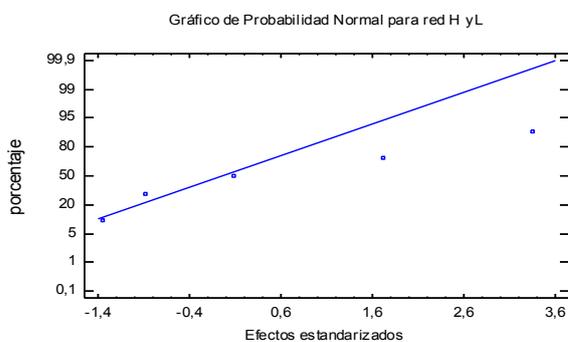


Observados vs. predichos

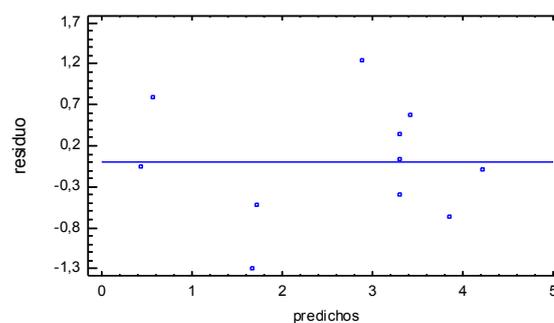


RML_7

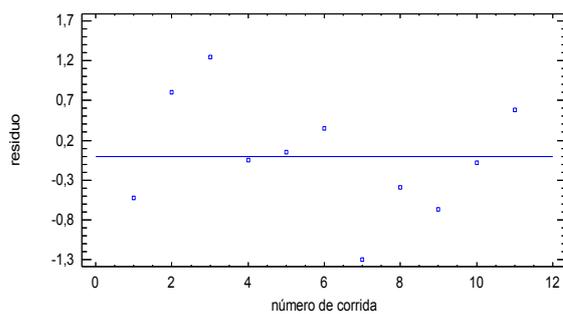
Distribución normal de los errores



Variancia



Independencia



Observados vs. predichos

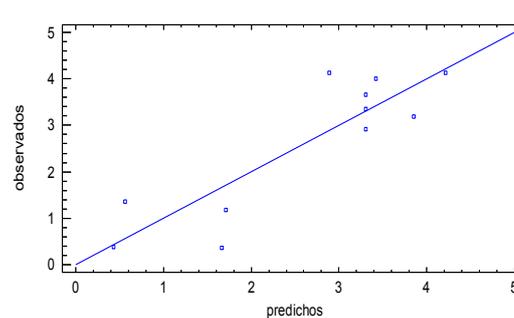
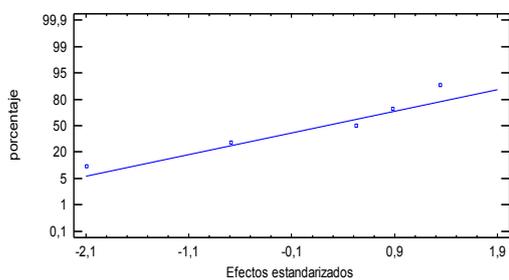


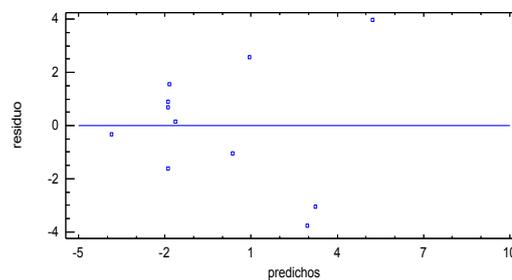
Figura 7.3. Gráficos de diagnóstico para los modelos cambio en los parámetros de color de frutillas nebulizadas con ácido peracético en el día 0

δL_0^*

Distribución normal de los errores

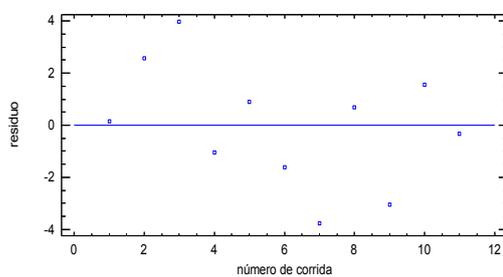


Variancia



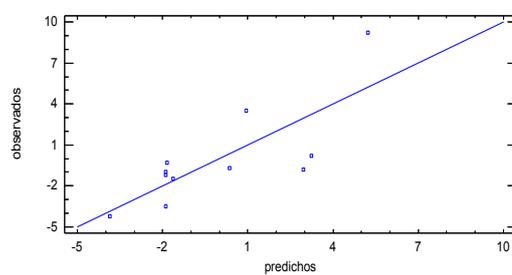
Independencia

Gráfica de Residuos para DL0_0



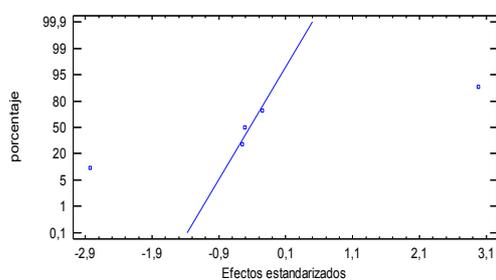
Observados vs. predichos

Gráfica de DL0_0

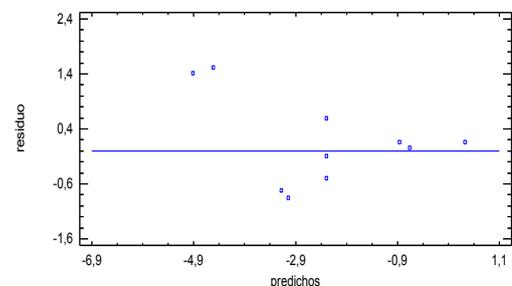


δa_0^*

Distribución normal de los errores

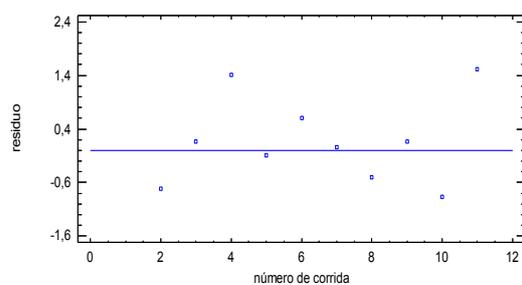


Variancia



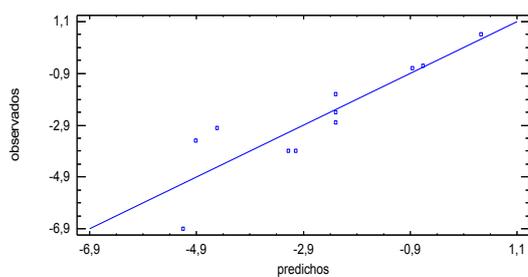
Independencia

Gráfica de Residuos para Da_a



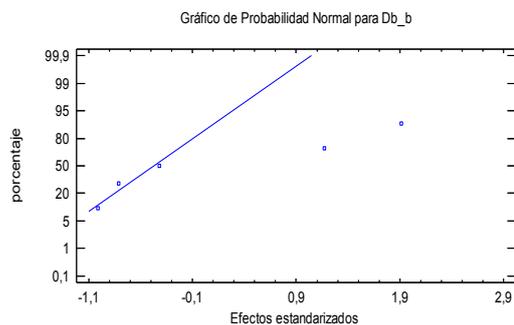
Observados vs. predichos

Gráfica de Da_a

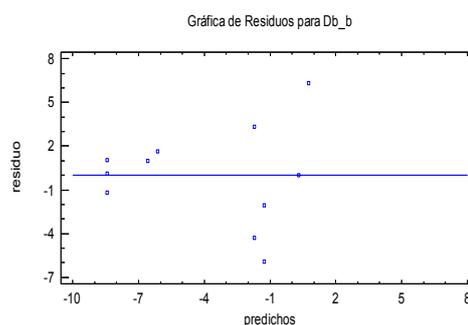


δb_0^*

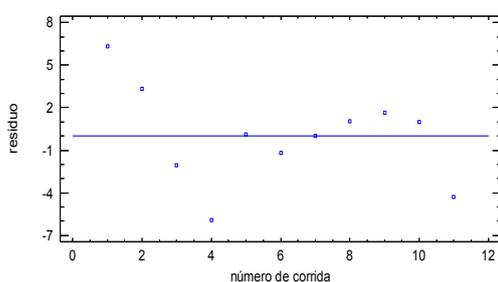
Distribución normal de los errores



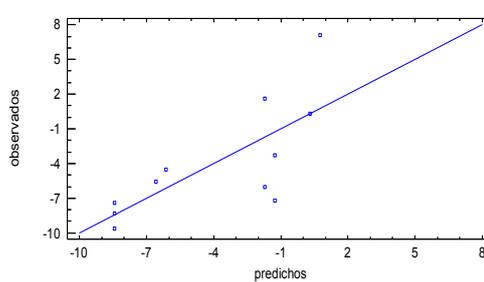
Variancia



Independencia

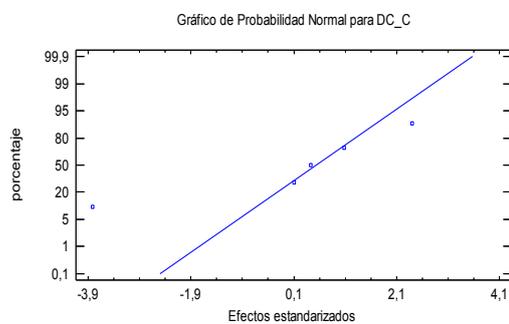


Observados vs. predichos

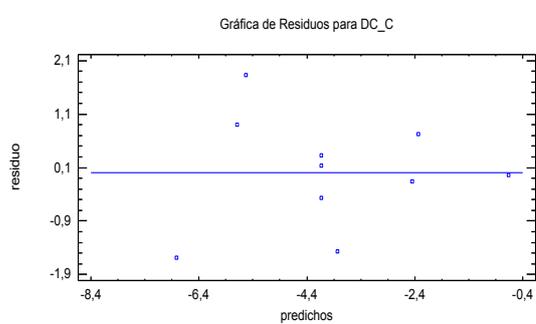


δC_0^*

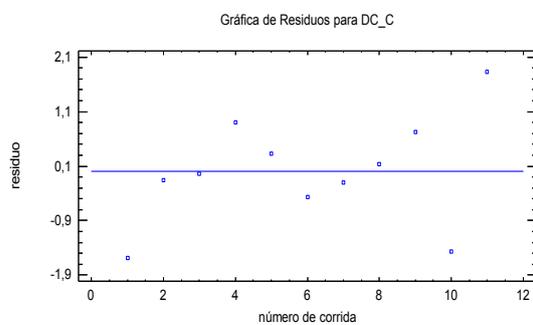
Distribución normal de los errores



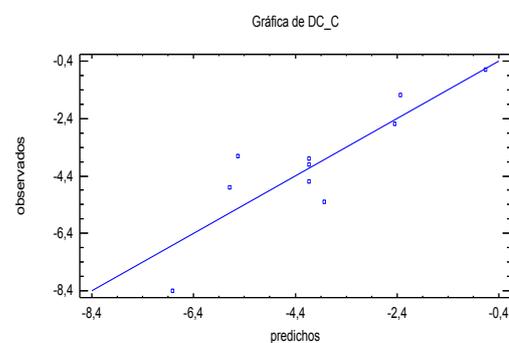
Variancia



Independencia



Observados vs. predichos



$$\delta h_0^*$$

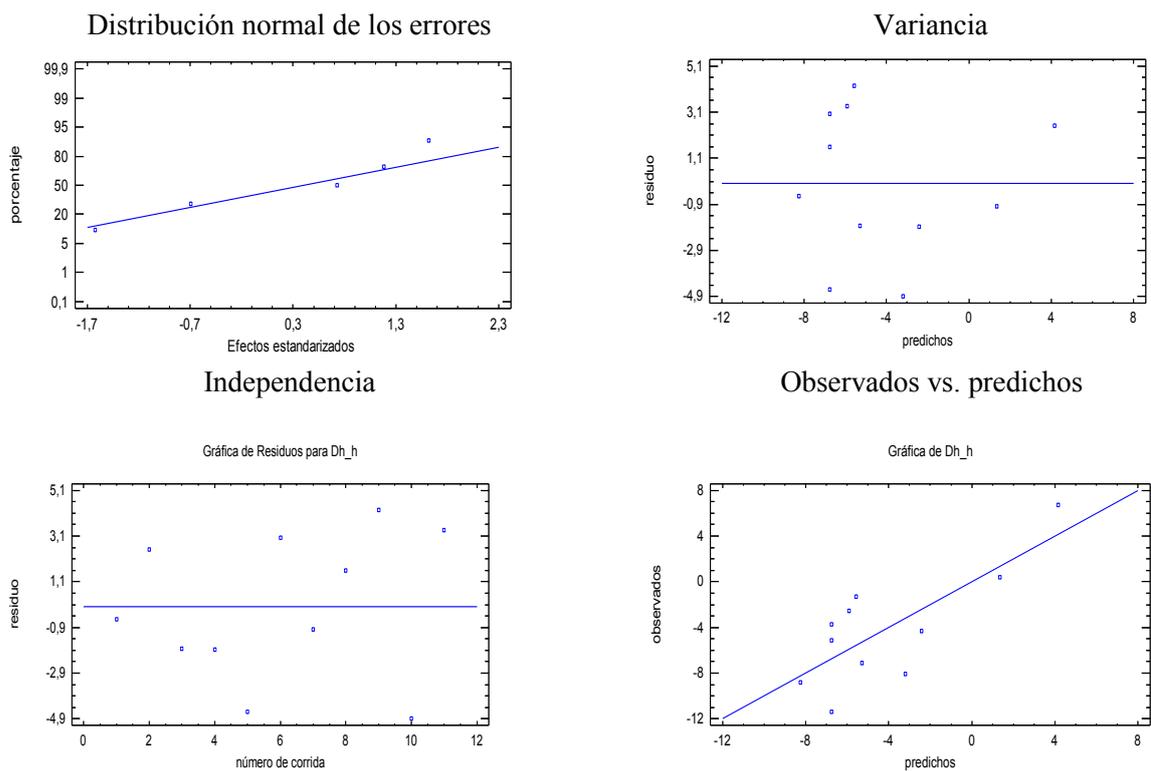
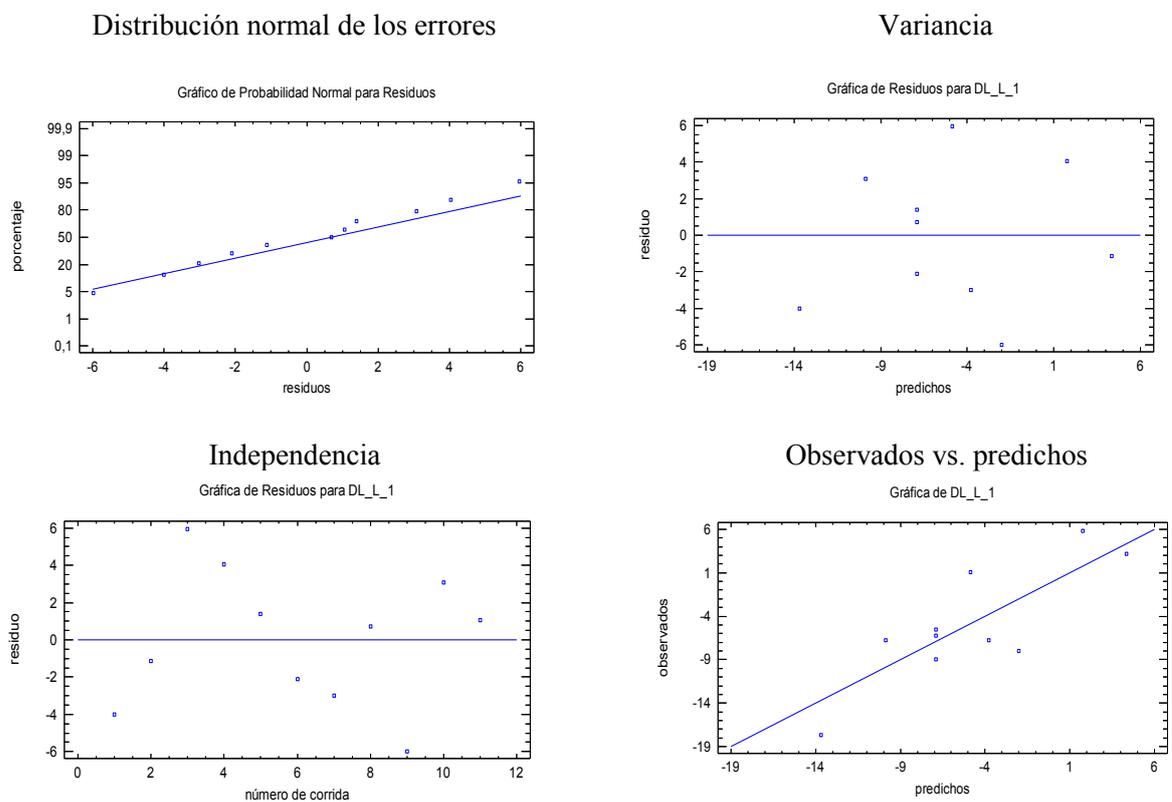


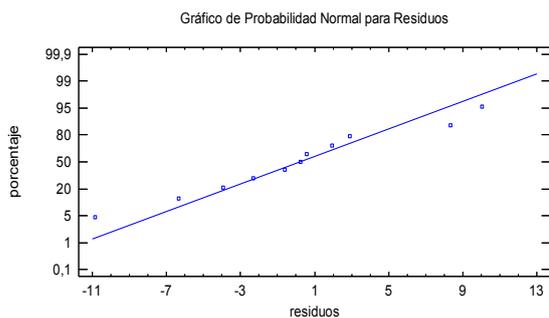
Figura 7.4. Gráficos de diagnóstico para los modelos cambio en los parámetros de color de las frutillas luego de 7 días de conservación a 2°C

$$\delta L_7^*$$

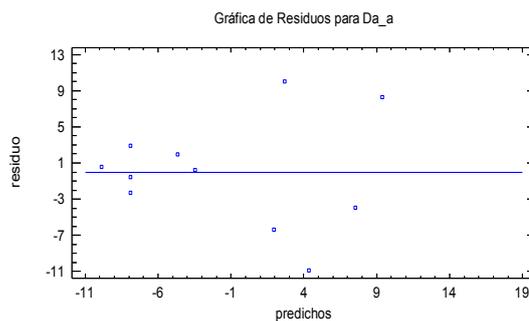


δa_7^*

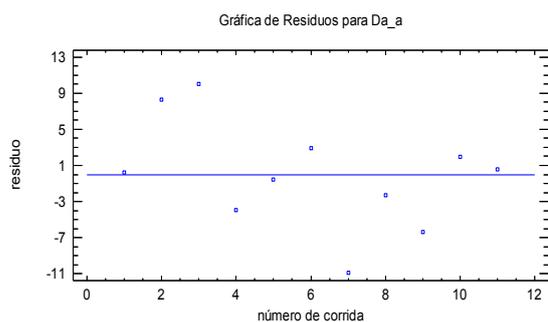
Distribución normal de los errores



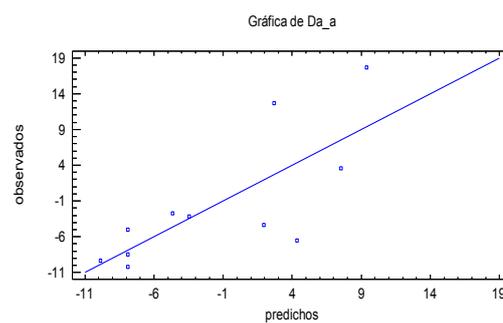
Variancia



Independencia

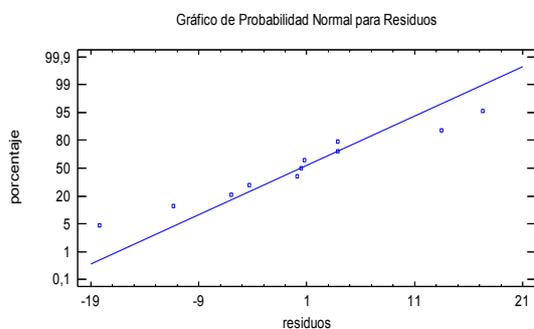


Observados vs. predichos

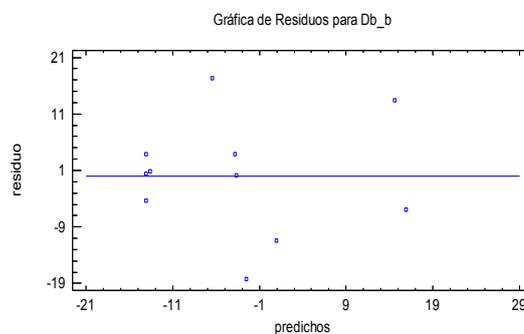


δb_7^*

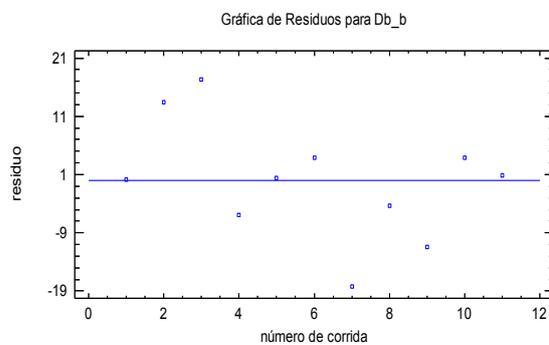
Distribución normal de los errores



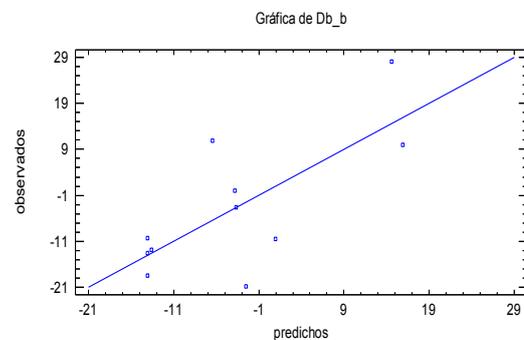
Variancia



Independencia

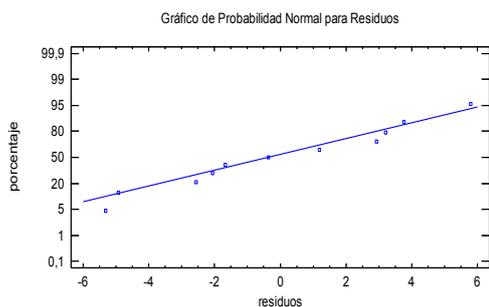


Observados vs. predichos

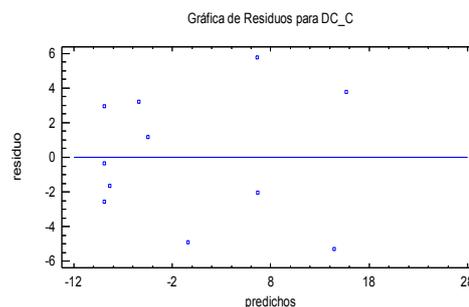


δC_7^*

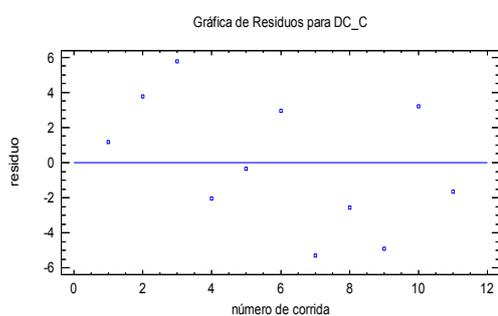
Distribución normal de los errores



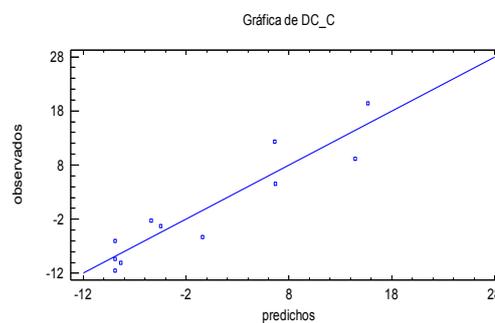
Variancia



Independencia

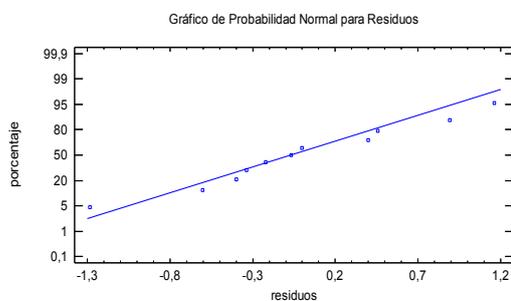


Observados vs. predichos

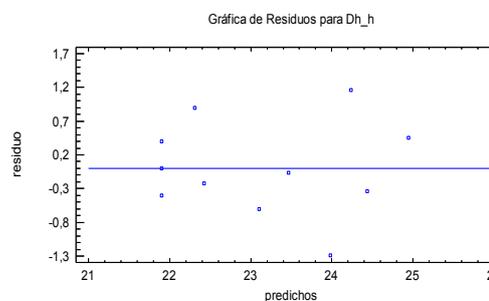


δh_7^*

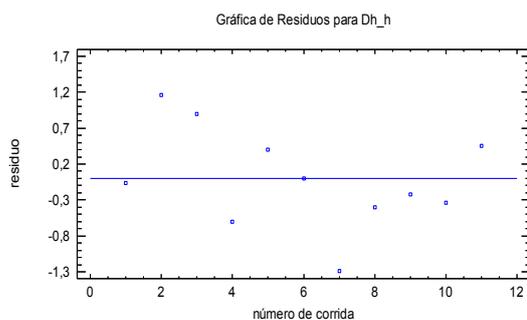
Distribución normal de los errores



Variancia



Independencia



Observados vs. predichos

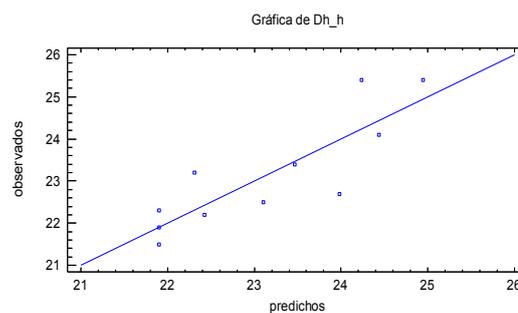
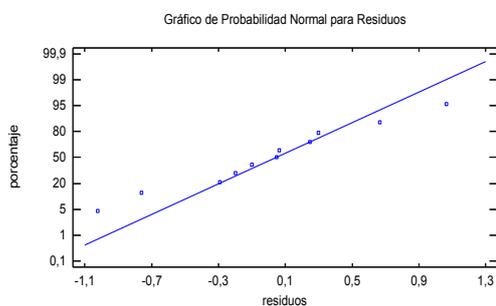


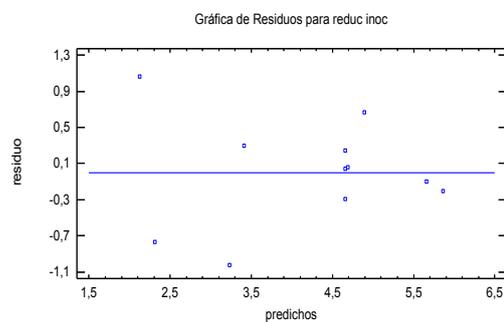
Figura 7.5. Gráficos de diagnóstico para los modelos REC_0 y REC_7 para frutillas nebulizadas con ácido peracético en el día 0y luego de 7 días de conservación a 2°C

REC_0

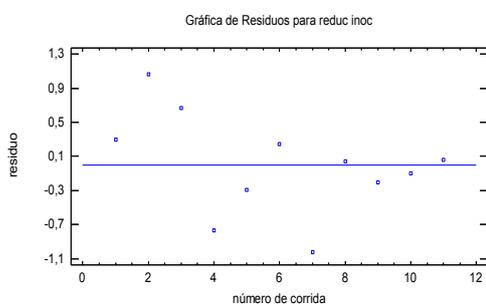
Distribución normal de los errores



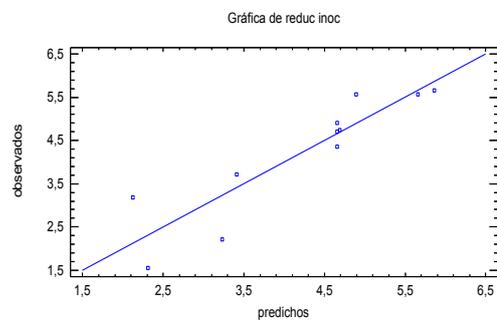
Variancia



Independencia

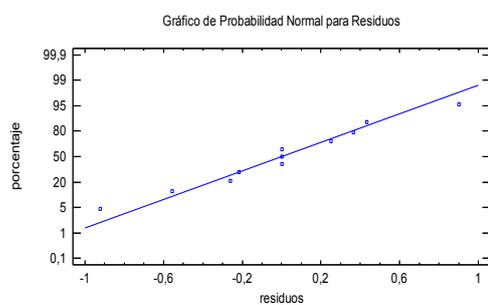


Observados vs. predichos

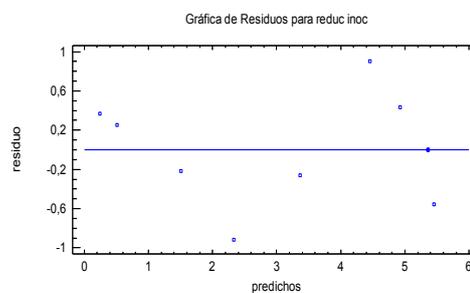


REC_7

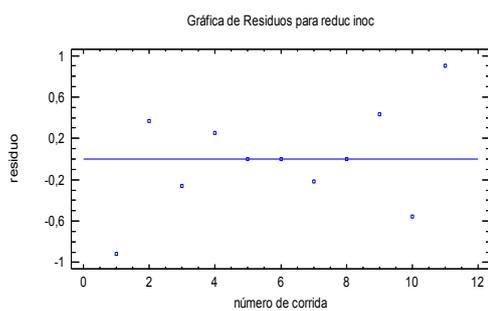
Distribución normal de los errores



Variancia



Independencia



Observados vs. predichos

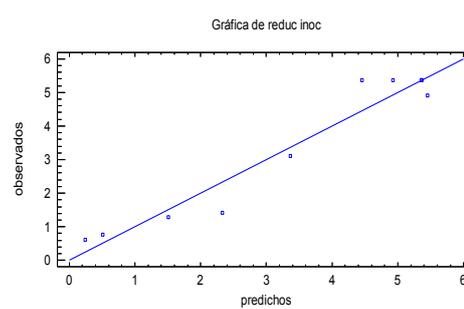
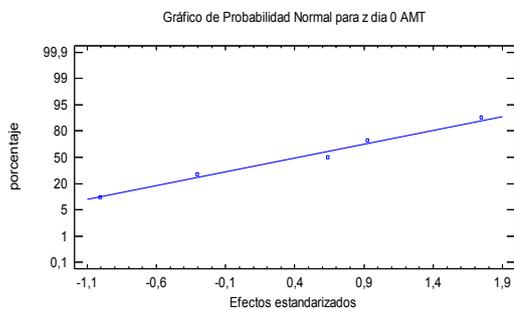


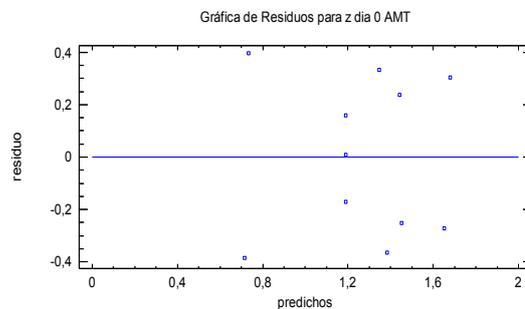
Figura 7.6. Gráficos de diagnóstico para los modelos $RAMT_0$ y RML_0 para zarzamoras nebulizadas con ácido peracético en el día 0

$RAMT_0$

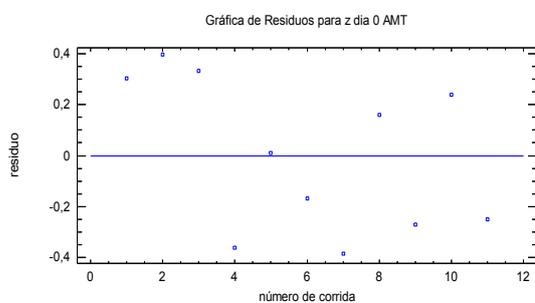
Distribución normal de los errores



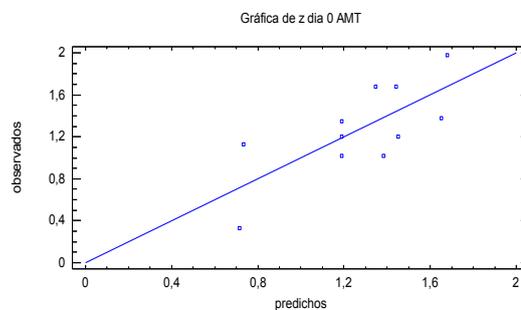
Variancia



Independencia

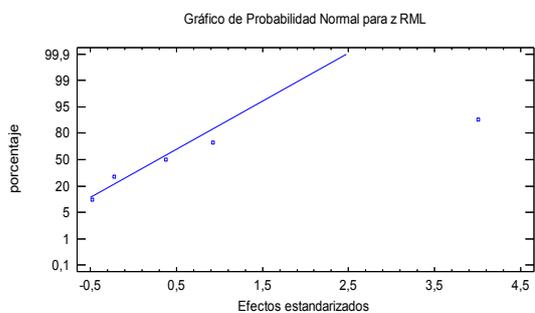


Observados vs. predichos

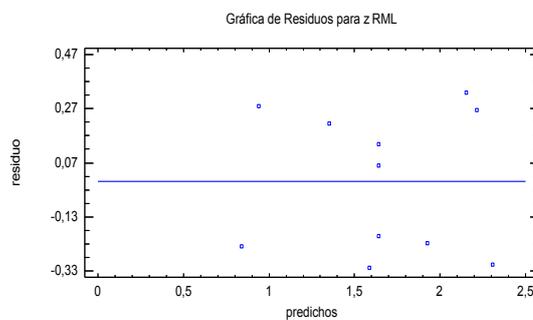


RML_0

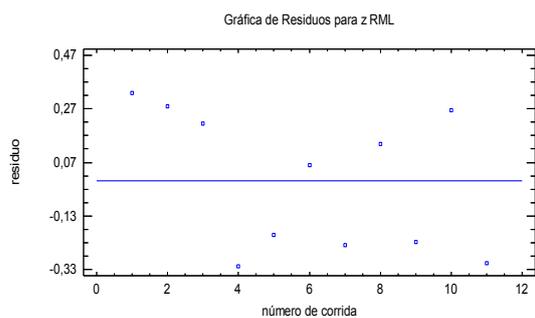
Distribución normal de los errores



Variancia



Independencia



Observados vs. predichos

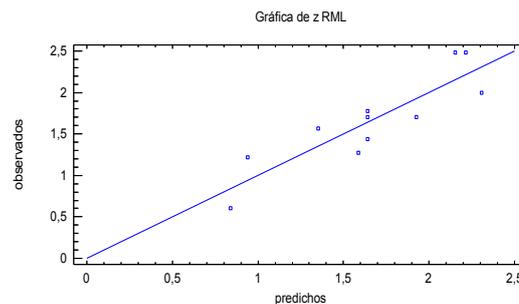
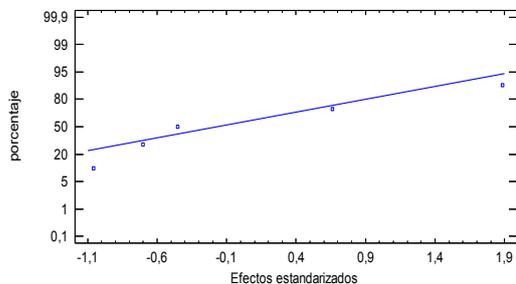


Figura 7.7. Gráficos de diagnóstico para los modelos $RAMT_7$ y RML_7 para zarzamoras nebulizadas con ácido peracético después de 7 días de conservación a 2°C

$RAMT_7$

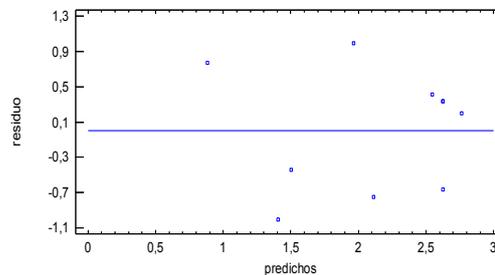
Distribución normal de los errores

Gráfico de Probabilidad Normal para z AMT



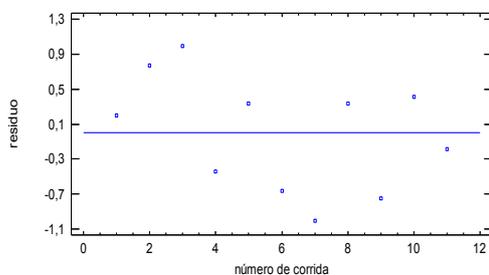
Variancia

Gráfica de Residuos para z AMT



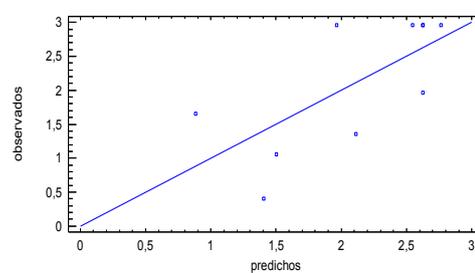
Independencia

Gráfica de Residuos para z AMT



Observados vs. predichos

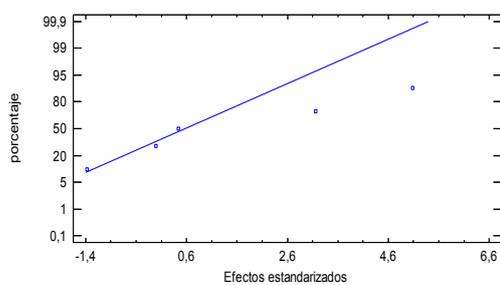
Gráfica de z AMT



RML_7

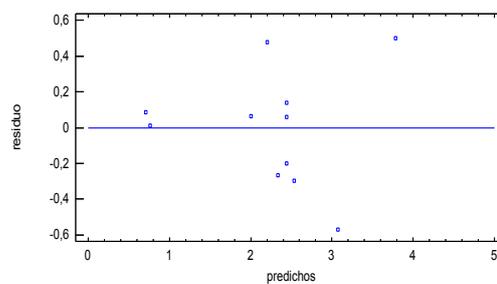
Distribución normal de los errores

Gráfico de Probabilidad Normal para z día 7 RML



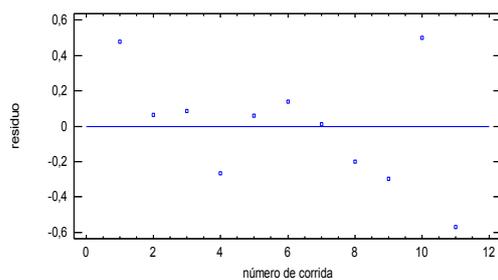
Variancia

Gráfica de Residuos para z día 7 RML



Independencia

Gráfica de Residuos para z día 7 RML



Observados vs. predichos

Gráfica de z día 7 RML

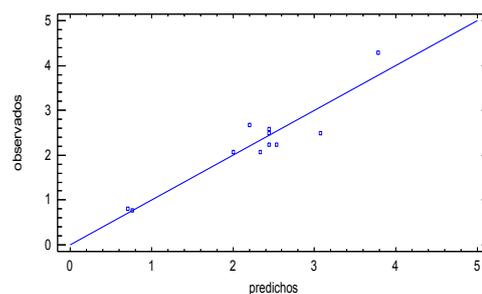
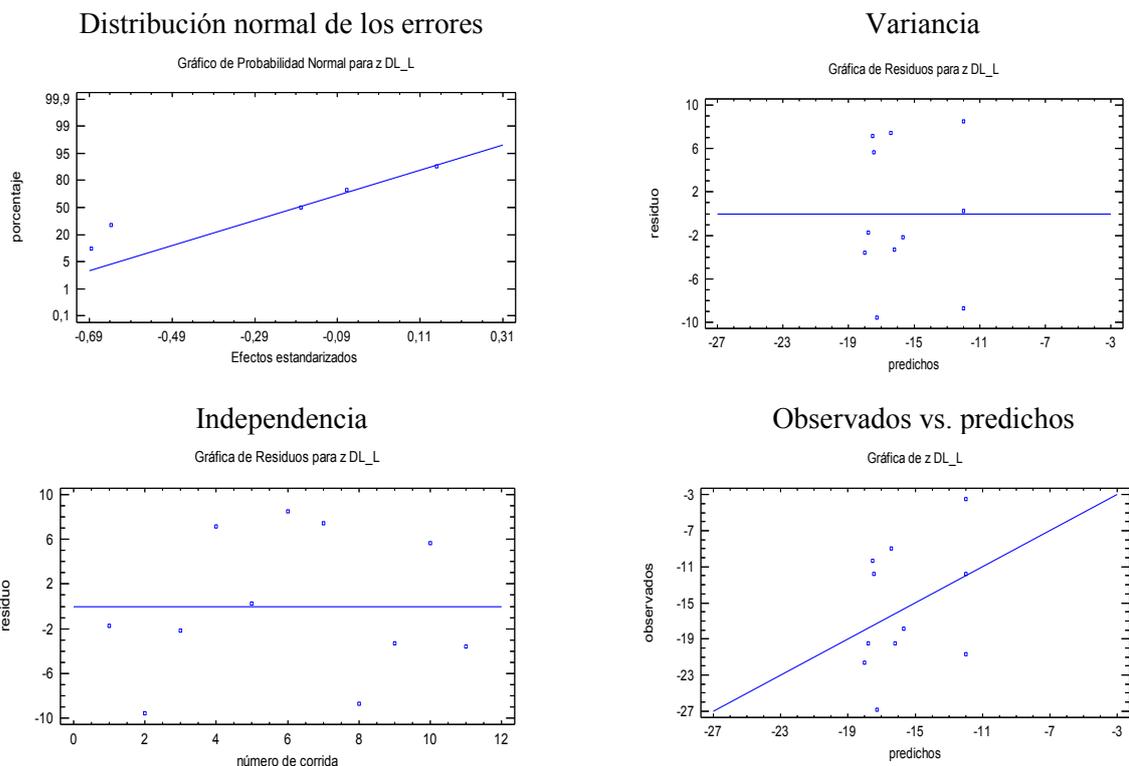
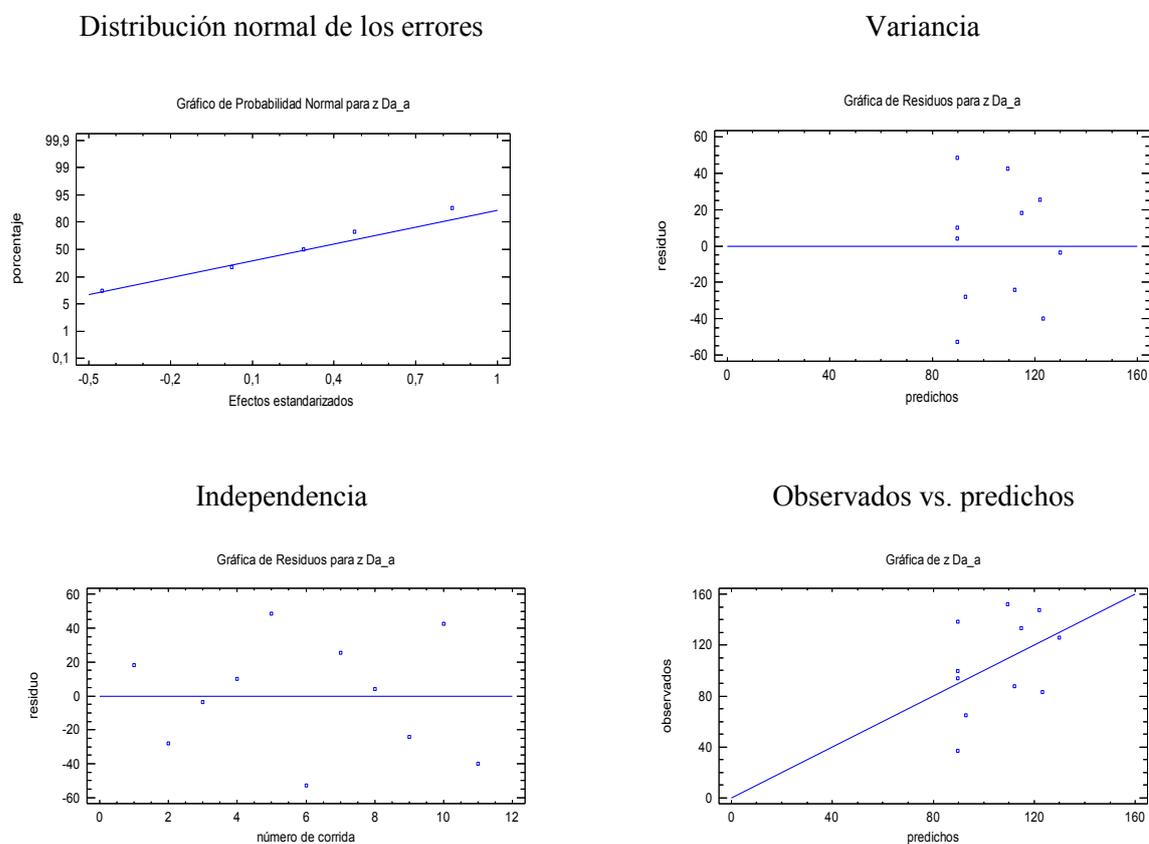


Figura 7.8. Gráficos de diagnóstico para los modelos cambio en los parámetros de color de zarzamoras nebulizadas con ácido peracético en el día 0

δL_0^*

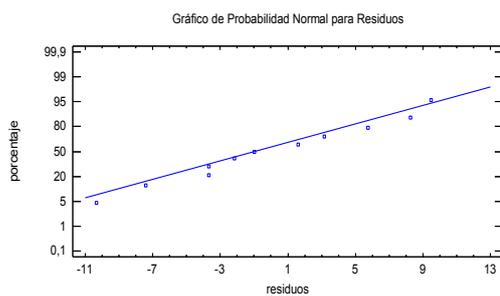


δa_0^*

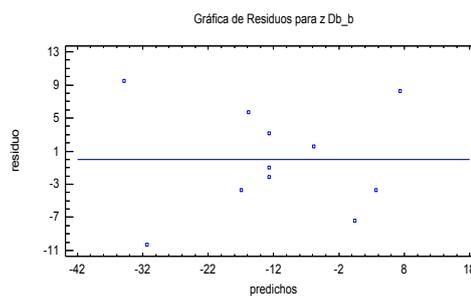


δb_0^*

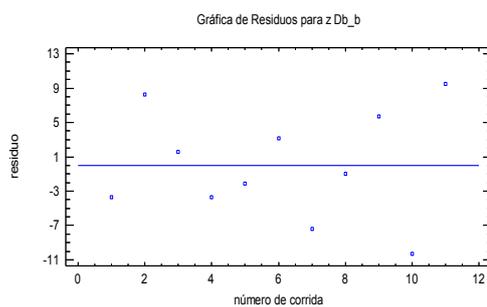
Distribución normal de los errores



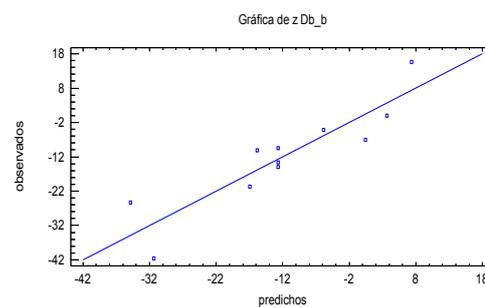
Variancia



Independencia

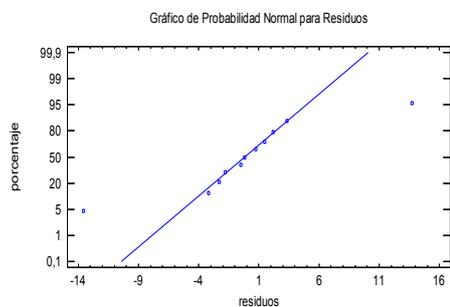


Observados vs. predichos

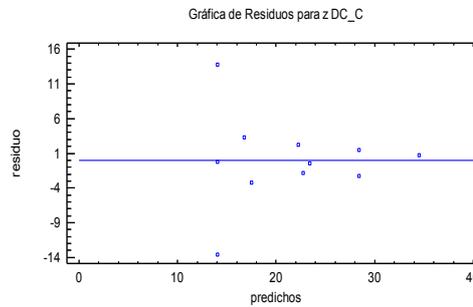


δC_0^*

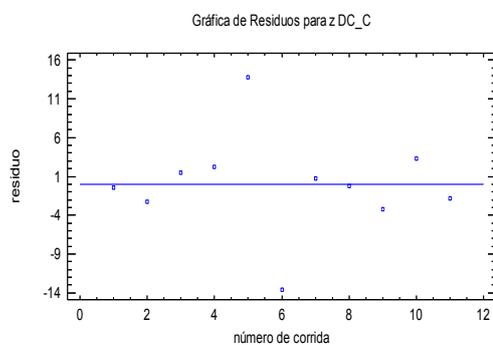
Distribución normal de los errores



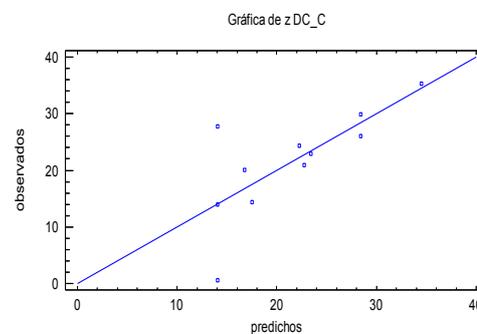
Variancia



Independencia

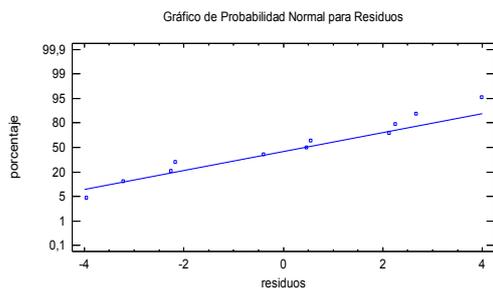


Observados vs. predichos

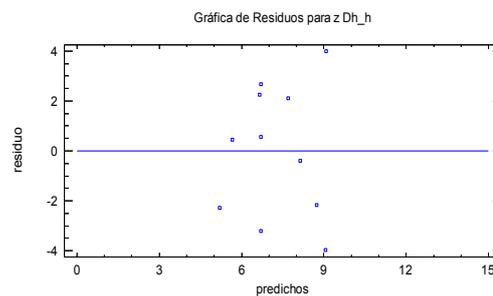


δh_0^*

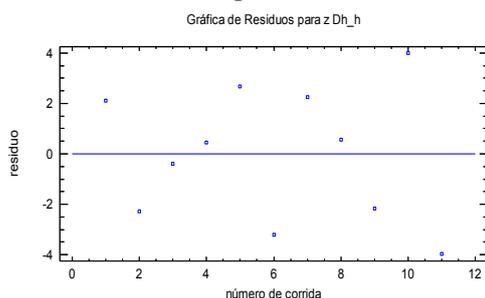
Distribución normal de los errores



Variancia



Independencia



Observados vs. predichos

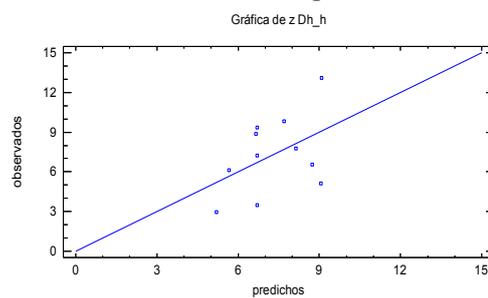
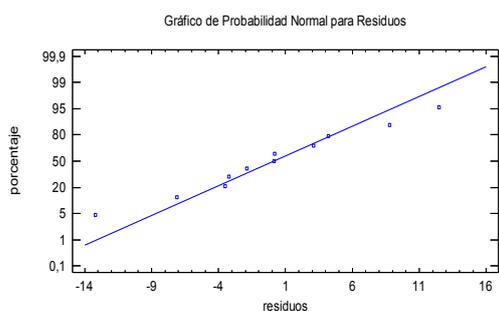


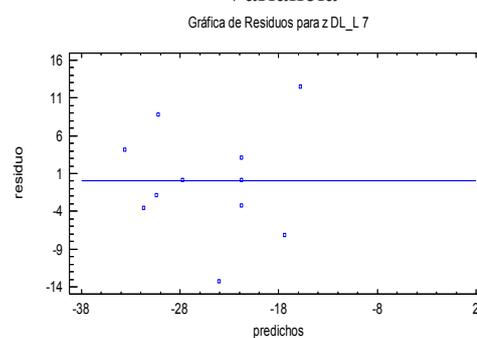
Figura 7.9. Gráficos de diagnóstico paralos modelos cambio en los parámetros de color de zarzamoras nebulizadas con ácido peracético luego de 7 días de conservación a 2°C

 δL_{7}^*

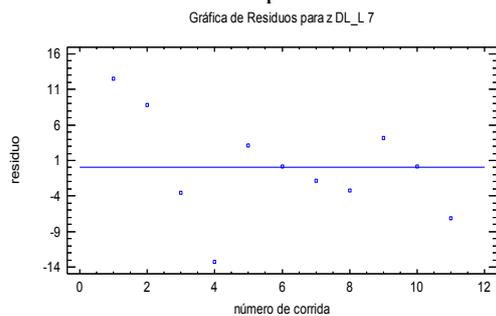
Distribución normal de los errores



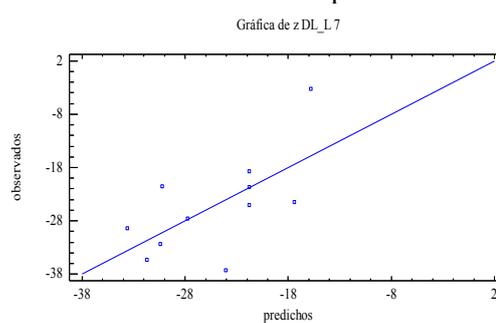
Variancia



Independencia



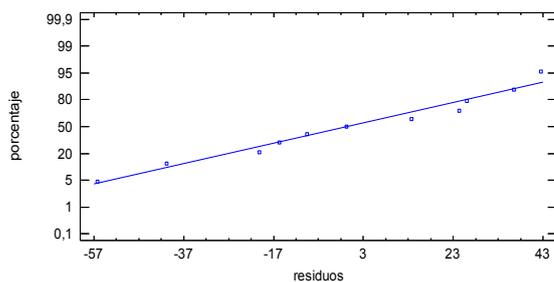
Observados vs. predichos



δa_7^*

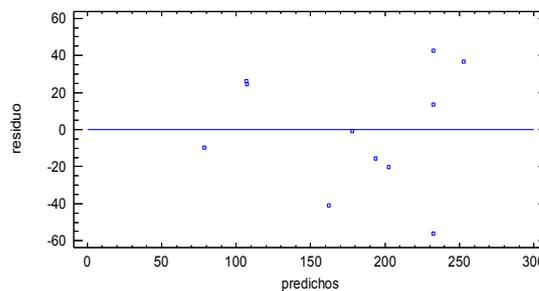
Distribución normal de los errores

Gráfico de Probabilidad Normal para Residuos



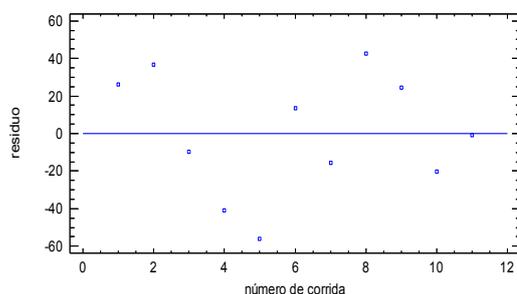
Variancia

Gráfica de Residuos para z Da_a 7



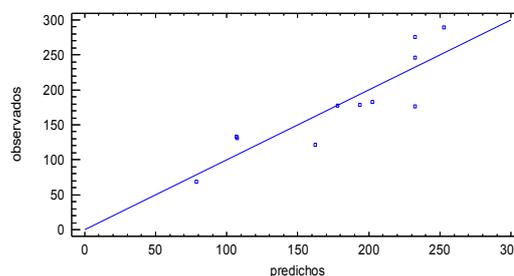
Independencia

Gráfica de Residuos para z Da_a 7



Observados vs. predichos

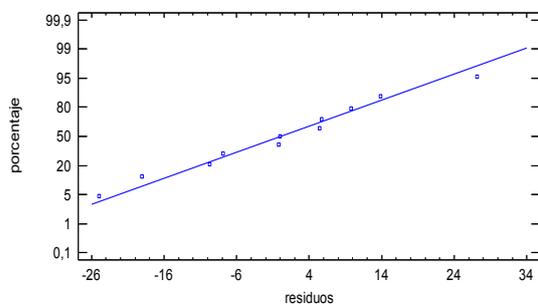
Gráfica de z Da_a 7



δb_7^*

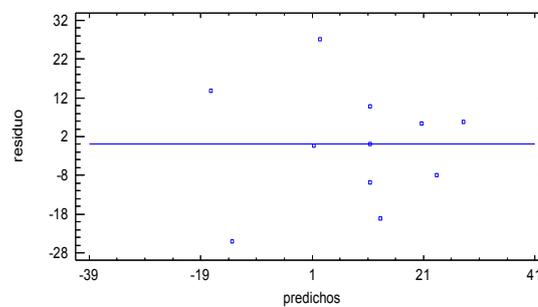
Distribución normal de los errores

Gráfico de Probabilidad Normal para Residuos



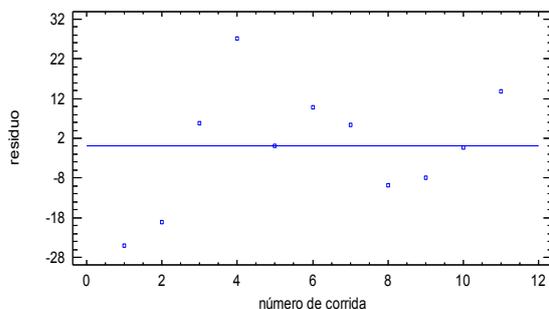
Variancia

Gráfica de Residuos para z 7 Db_b



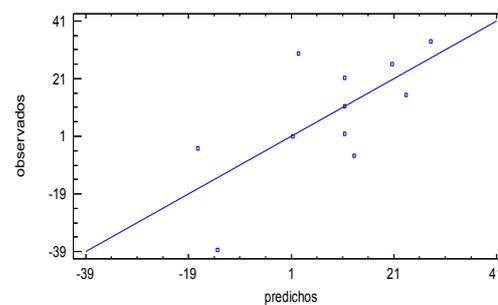
Independencia

Gráfica de Residuos para z 7 Db_b



Observados vs. predichos

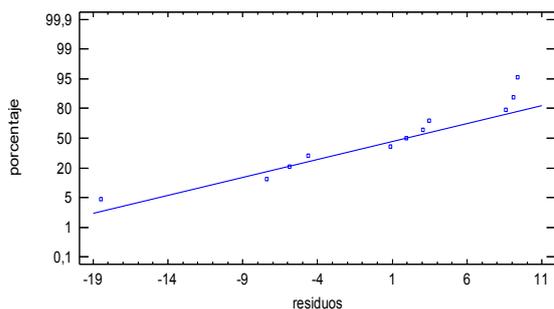
Gráfica de z 7 Db_b



δC_7^*

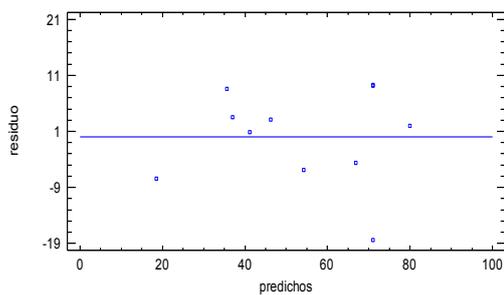
Distribución normal de los errores

Gráfico de Probabilidad Normal para Residuos



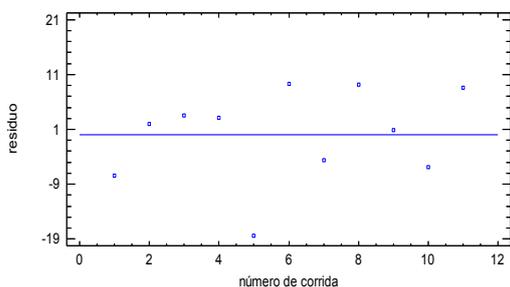
Variancia

Gráfica de Residuos para z 7 DC_C



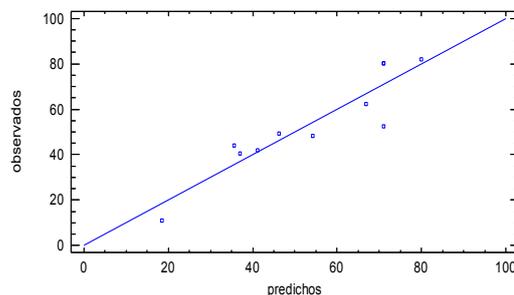
Independencia

Gráfica de Residuos para z 7 DC_C



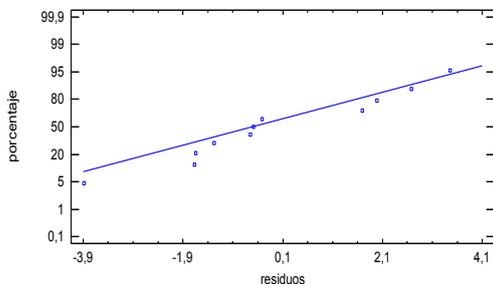
Observados vs. predichos

Gráfica de z 7 DC_C



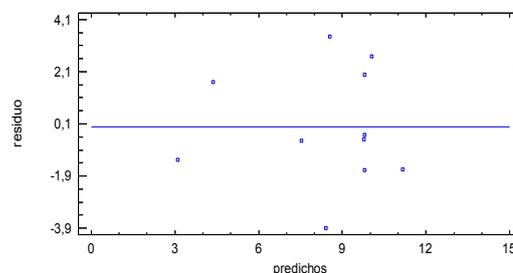
Distribución normal de los errores

Gráfico de Probabilidad Normal para Residuos



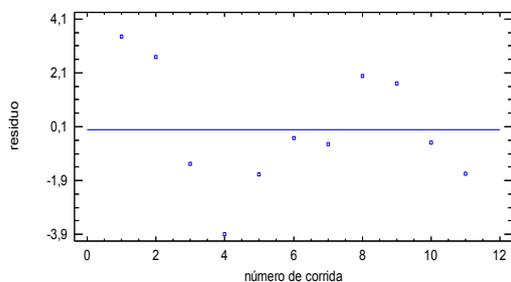
Variancia

Gráfica de Residuos para z 7 Dh_h



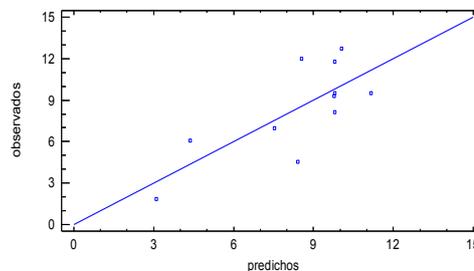
Independencia

Gráfica de Residuos para z 7 Dh_h



Observados vs. predichos

Gráfica de z 7 Dh_h



δh_7^*