

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



**Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas**

**“CAMBIOS EN EL POTENCIAL SALUDABLE Y LA CALIDAD  
NUTRICIONAL Y SENSORIAL DE FRUTILLAS  
MÍNIMAMENTE PROCESADAS COMO CONSECUENCIA DE  
LAS CONDICIONES DE PROCESAMIENTO, LA  
TEMPERATURA Y EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO”**

**Bioq. Franco VAN DE VELDE**

**Director de Tesis: Ing. Daniel R. GÜEMES**

**Co-director: Mag. María Élica PIROVANI**

**Área Conservación de Alimentos  
Instituto de Tecnología de Alimentos  
Facultad de Ingeniería Química**

**2012**

*No dejes que termine el día sin haber crecido un poco,  
sin haber sido feliz, sin haber aumentado tus sueños...  
... No dejes nunca de soñar,  
porque en sueños es libre el hombre.*

***No te detengas.*** Walt Whitman

A mi familia querida.  
En memoria de mis abuelas Laura y Ángela.

**La presente tesis dio lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a reuniones científicas:**

***Publicaciones:***

- Van de Velde, F.; Tavella A.; Piagentini, A.; Güemes D. y Pirovani, M. (2010). *Retención de compuestos bioactivos en el lavado-desinfección de frutillas mínimamente procesadas con ácido peracético*. Rev. Iberoam. Tec. Post. 11, 162-170.
- Van de Velde, F.; Pirovani, M.E.; Cámara, M.S.; Güemes, D.R. y Bernardi, C. (2012). *Optimization and validation of a UV-HPLC method for vitamin C determination in strawberries (Fragaria ananassa Duch.), using experimental designs*. Food Anal. Methods. 5, 1097-1104.
- Van de Velde, F.; Güemes D.; Pirovani, M. y Piagentini, A. (2012). *Effect of Washing-Disinfection Conditions on Total Anthocyanins Retention and Color of Fresh-Cut Strawberries*. En: *Color in Food: Technological and Psychophysical Aspects*. (Eds.: Maria del Pilar Buera; Jose Luis Caivano), p. 219-227.
- Tarolla, A.M.; Van de Velde, F.; Salvagni, L. y Pretti, R. (2012). *Determination of phenolic compounds in strawberries (Fragaria ananassa Duch) by high performance liquid chromatography with diode array detection*. Food Anal. Methods. DOI: 10.0007/s12161-012-9431-5.
- Van de Velde, F.; Piagentini, A.; Güemes, D. and Pirovani M. (2012). *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*. Int. J. Food Sci. Tech. (aceptado).

***Presentaciones a reuniones científicas:***

- Van de Velde, F.; Güemes, R.; Piagentini, A.; Bernardi, C. y Pirovani, M. *Desarrollo y validación de un método analítico UV-HPLC para la determinación de vitamina C en frutillas*. XII Congreso de Ciencia y Tecnología de Alimentos. CYTAL. Entre Ríos, Argentina. 7 al 9 de Octubre de 2009. Póster.
- Van de Velde, F.; Bernardi, C.; Güemes, D.; Pirovani, M. y Cámara, M. *Desarrollo y validación de un método UV-HPLC para la determinación de vitamina C en*

- frutillas, utilizando diseños experimentales para la optimización y el estudio de robustez. 6° Congreso Argentino de Química Analítica. Santa Fe, Argentina, 26 al 29 de Setiembre de 2011. Póster.
- Van de Velde, F.; Tabella, A.; Piagentini, A.; Güemes, D. y Pirovani, M. *Retención de compuestos bioactivos en el lavado desinfección de frutillas mínimamente procesadas con ácido peracético*. VI Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. Mérida, México, 22 al 26 de junio de 2010. Exposición oral.
- Pirovani, M; Van de Velde, F.; Piagentini, A. y Güemes, D. *Desinfección de vegetales frescos cortados, técnicas convencionales y emergentes*. V Simposio Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos Dr. Mario Yanes García CYTA 2010. Tabasco, México, 27 de setiembre al 1 de octubre de 2010. Exposición oral.
- Van de Velde, F.; Pirovani, M.; Güemes, D. y Piagentini, A. Effect of washing-disinfection conditions on total anthocyanins retention and color of fresh-cut strawberries. AIC 2010 Interim Meeting. Mar del Plata, Argentina, 12 al 15 de Octubre de 2010. Exposición oral.
- Van de Velde, F.; Piagentini, A.; Carvajal, F.; Garrido, D.; Güemes, D. y Pirovani, M. *Estrategias en el lavado-desinfección con ácido peracético para controlar la actividad enzimática de frutillas frescas cortadas*. XIII Congreso de Ciencia y Tecnología de Alimentos. CYTAL. Buenos Aires, Argentina. 19 al 21 de Octubre de 2011. Póster
- Van de Velde, F.; Güemes, D.; Piagentini, A. y Pirovani, M. *Efecto de la variedad sobre la retención de los compuestos bioactivos y el color de frutillas cortadas en el lavado desinfección con ácido peracético*. Congreso latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas CLICAP. Mendoza, Argentina, 28 al 30 de Marzo de 2012. Exposición oral.

## **Agradecimientos**

A mis directores de tesis: Ing. Daniel R. Güemes y Mag. María Élica Pirovani. Por su gran predisposición para el trabajo, por enseñarme a diario el oficio de la ciencia, y por generar un ambiente laboral responsable pero distendido. Agradezco especialmente a Mariel por el esfuerzo hecho en este último tiempo.

A todos mis compañeros del Instituto de Tecnología de Alimentos, por sus colaboraciones en el trabajo de tesis y por estar siempre dispuestos a ayudar. Agradezco especialmente a los grupos de Microbiología de Alimentos, Análisis Fisicoquímicos de Alimentos y Evaluación Sensorial.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Conservación con los que compartí el trabajo desde el principio (Daniel, Mariel, Andrea, Cecilia, Bochi, Mariela, Maillen, Agostina, Leyla, Guillermina y Mariana), por sus colaboraciones y por hacer el trabajo diario más ameno y divertido.

Para mis compañeros de los almuerzos laborales (Raúl, Mica, Gime, Silvina, Ana, Meli, Sole y Emi), por las charlas de las buenas, y de las malas también, por su amistad y por hacer de ese momento, el mejor del día.

A la empresa Indaquim S.A., por la donación de ácido peracético realizada.

A la Educación Pública y Gratuita.

A la Universidad Nacional del Litoral, la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y el Instituto de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química por la calidad de la enseñanza recibida y por la posibilidad de continuar formándome.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Conicet), por las becas internas Tipo 1 y 2 recibidas, con las cuales pude realizar la siguiente tesis.

A la Comisión Europea a través de su programa de intercambio EADIC, por la beca de doctorado sándwich otorgada, con la cual pude viajar a España y fortalecer mi trabajo. A la Dra. Dolores Garrido de la Universidad de Granada, la cual me abrió las puertas de su laboratorio, por su confianza y el gran apoyo y dedicación brindada durante los 6 meses de

trabajo compartido. A Fátima por enseñarme todo, y a todos mis compis españoles (las “niñas”: Alba y Maribel, Miguel, Rocío, Diego, Fran y Amaranta), por haber hecho de esta experiencia un recuerdo inolvidable para mi vida.

Al Instituto Italo-Latinoamericano (IILA) por la beca de formación recibida, con la cual pude viajar a Italia, a la Dra. Anna Maria Tarola, por recibirme en su laboratorio y por su predisposición para mi formación. A mis compañeras de laboratorio, Lucila y Raffa, fundamentales en esta experiencia, por las horas dedicadas.

A Dios, Jesús y María por haberme dado todo lo que tengo y tanto agradezco.

A mi familia querida, a la que debo mi vida, a mis padres por su amor y gran esmero para mi educación y a mis hermanos por su amor y compañía. A mis abuelas, por su ternura y protegerme desde el cielo.

A todos mis amigos adorados, pilares de mi vida, especialmente a los que compartieron esta etapa. A Jorgito por su incondicionalidad desde siempre. A Félix, Emo, Chichi, Nati y Juan, por haber estado siempre desde que empecé la facultad, por las miles de anécdotas compartidas, a Nacho por las horas de deporte compartidas y por ser un gran ejemplo para mi vida.

A mis adorados Elena Patricia y Raulito. Agradezco a la vida por este sentimiento fraterno que nos une. Por los miles de kilómetros recorridos. Por la compañía que me brindaron viviendo en España y en cada rincón del mundo que nos encontró juntos. Por ser parte de la “familia”, por blue, yellow, el marketona, nuestro exquisito Itaño!, las titas madrinas, y las innumerables anécdotas que guardaré en mi corazón.

A mi Ayelén, por su amor y comprensión.

A todos, MUCHAS GRACIAS!

## Índice de contenidos

<b>Índice de contenidos</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Índice de Tablas</b> .....	<b>XII</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Abreviaturas y Símbolos</b> .....	<b>XXI</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>23</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>28</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>32</b>
<i>1.1</i> <b>Consideraciones generales sobre las frutillas</b> .....	<b>33</b>
<i>1.2</i> <b>Generalidades sobre el cultivo de frutillas en Argentina</b> .....	<b>34</b>
<i>1.3</i> <b>Composición nutricional de frutillas</b> .....	<b>35</b>
1.3.1 <b>Macronutrientes</b> .....	36
1.3.2 <b>Micronutrientes</b> .....	39
1.3.2.1 <b>Vitaminas</b> .....	39
1.3.2.2 <b>Minerales</b> .....	42
<i>1.4</i> <b>Compuestos fitoquímicos</b> .....	<b>43</b>
1.4.1. <b>Efectos antioxidantes del ácido ascórbico</b> .....	45
1.4.2 <b>Efectos antioxidantes de la Vitamina E</b> .....	46
1.4.3 <b>Compuestos fenólicos</b> .....	46
1.4.3.1 <b>Biosíntesis de compuestos fenólicos</b> .....	49
1.4.3.2 <b>Flavonoides</b> .....	51
1.4.3.3 <b>Ácidos fenólicos</b> .....	55
1.4.3.4 <b>Taninos</b> .....	57
1.4.3.5 <b>Estilbenos y lignanos</b> .....	58
1.4.4 <b>Compuestos fenólicos en frutillas</b> .....	59
<i>1.5</i> <b>Vegetales mínimamente procesados</b> .....	<b>61</b>
1.5.1 <b>Factores que afectan la calidad de las frutas frescas cortadas</b> .....	62
1.5.1.1 <b>Variedad</b> .....	62
1.5.1.2 <b>Grado de madurez</b> .....	63
1.5.1.3 <b>Prácticas de cosecha</b> .....	64
1.5.2 <b>Procesamiento de VMP</b> .....	65
1.5.2.1 <b>Primeras etapas de procesamiento de VMP</b> .....	66
1.5.2.2 <b>Tratamientos sanitizantes</b> .....	67
1.5.2.3 <b>Escurreado, envasado y almacenamiento</b> .....	71
1.5.3 <b>Efectos del procesado mínimo y almacenamiento refrigerado sobre el valor nutricional y potencial saludable de los alimentos vegetales</b> .....	72
<i>1.6</i> <b>Objetivos</b> .....	<b>75</b>
1.6.1 <b>Respecto a la caracterización de las frutillas</b> .....	75
1.6.2 <b>Respecto a la preparación de frutillas frescas cortadas. Objetivos relacionados con el estudio de la operación de lavado-desinfección</b> .....	75
1.6.3 <b>Respecto a la preparación de frutillas frescas cortadas. Objetivos relacionados con el estudio de la operación de corte y la conservación del producto</b> .....	76
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>77</b>
<i>2.1</i> <b>Material vegetal utilizado</b> .....	<b>78</b>

2.1.1 Acondicionamiento del material vegetal .....	79
<b>2.2 Desarrollo y puesta a punto de métodos y técnicas analíticas .....</b>	<b>79</b>
2.2.2 Determinación de vitamina C en frutillas: optimización y validación de un método de cromatografía líquida de alta performance con detección ultravioleta (HPLC-UV) usando diseños experimentales .....	79
2.2.1.1 Aparatos y Software .....	79
2.2.1.2 Condiciones cromatográficas .....	80
2.2.1.3 Preparación solución madre de AA.....	80
2.2.1.4 Preparación de las muestras de frutilla.....	80
2.2.1.5 Procedimiento de optimización.....	81
2.2.1.6 Procedimiento de validación .....	81
2.2.2 Determinación de compuestos fenólicos en frutillas: desarrollo y validación de un método de cromatografía líquida de alta performance con detección por arreglo de diodos (HPLC-DAD).....	83
2.2.2.1 Aparatos y Software .....	84
2.2.2.2 Condiciones cromatográficas .....	84
2.2.2.3 Preparación solución madre de compuestos fenólicos.....	85
2.2.2.4 Elección del sistema de extracción para las muestras de frutillas.....	85
2.2.2.5 Preparación de la muestras de frutilla .....	86
2.2.2.6 Hidrólisis de los extractos de frutillas .....	87
2.2.2.7 Hidrólisis de los compuestos fenólicos estándares .....	87
2.2.2.8 Procedimiento de validación .....	87
2.2.3 Capacidad antioxidante.....	88
2.2.4 Fenoles totales.....	90
2.2.5 Antocianinas totales.....	90
2.2.6 Elección del sistema de extracción para la determinación de la capacidad antioxidante, fenoles y antocianinas totales.....	91
2.2.7 Sólidos solubles, pH y acidez total .....	92
2.2.8 Determinaciones enzimáticas .....	92
2.2.8.1 Fenilalanina amonioliasa (PAL; EC 4.3.1.3) .....	92
2.2.8.2 Polifenol oxidasa (PPO; EC 1.14.18.1).....	93
2.2.8.3 Pectinmetil esterasa (PME; EC 3.1.1.11).....	93
2.2.8.4 Poligalacturonasa (PG; EC 3.2.1.15) .....	94
2.2.8.5 Determinación de proteínas.....	94
2.2.9 Color .....	94
2.2.10 Análisis microbiológico .....	95
<b>2.3 Estudio de la operación de lavado-desinfección de frutillas frescas cortadas con ácido peracético (APA).....</b>	<b>96</b>
2.3.1 Diagrama de procesamiento para la obtención de frutillas frescas cortadas .....	96
2.3.2 Lavado-desinfección .....	97
2.3.2.1 Preparación de soluciones de ácido peracético .....	97
2.3.3 Diseños experimentales .....	98
2.3.3.1 Límites del dominio experimental.....	99
2.3.3.2 Diseño de lavado-desinfección N° 1 .....	100
2.3.3.3 Diseño de lavado-desinfección N° 2 .....	102

2.3.3.4 Validación del modelo en diferentes condiciones del proceso de lavado-desinfección establecidas a partir de la optimización de las múltiples respuestas simultáneamente.....	103
<b>2.4 Estudio de las operaciones de corte y el almacenamiento de frutillas frescas cortadas. ....</b>	<b>108</b>
2.4.1 Diagrama de procesamiento para la obtención de frutillas frescas cortadas .....	108
2.4.2 Toma de muestra y análisis.....	109
2.4.3 Modelado matemático de los cambios en los atributos estudiados .....	110
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>112</b>
<b>3.1 Desarrollo y puesta a punto de métodos y técnicas analíticas .....</b>	<b>113</b>
3.1.1 Determinación de vitamina C en frutillas: optimización y validación de un método de cromatografía líquida de alta performance con detección ultravioleta (HPLC-UV) usando diseños experimentales .....	113
3.1.1.1 Determinación de ácido ascórbico (AA) y ácido ascórbico total (AAT) o vitamina C: optimización del método HPLC usando metodología de superficie respuesta.....	113
3.1.1.2. Validación del método de HPLC para la determinación de AA y AAT en frutillas .....	118
3.1.1.3 Determinación de vitamina C en frutillas .....	125
3.1.2 Determinación de compuestos fenólicos en frutillas: optimización y validación de un método de cromatografía líquida de alta performance con detección por arreglo de diodos (HPLC-DAD).....	125
3.1.2.1 Estudio de las condiciones de hidrólisis sobre compuestos fenólicos estándares .....	126
3.1.2.2 Optimización de la separación de los compuestos fenólicos .....	127
3.1.2.3 Validación del método HPLC para la determinación de los principales compuestos fenólicos en frutillas .....	129
<b>3.2 Estudio de la operación de lavado-desinfección de frutillas frescas cortadas con ácido peracético (APA).....</b>	<b>139</b>
3.2.1 Diseño de lavado-desinfección N° 1.....	139
3.2.1.1 Compuestos bioactivos, parámetros de calidad y actividades enzimáticas de las frutillas frescas cortadas sin lavar .....	139
3.2.1.2. Efecto de las condiciones de lavado-desinfección sobre los compuestos bioactivos y los parámetros de calidad de frutillas frescas cortadas .....	139
3.2.1.3 Efecto de las condiciones de lavado-desinfección sobre las actividades enzimáticas de frutillas frescas cortadas .....	146
3.2.2 Diseño de lavado-desinfección N° 2.....	151
3.2.2.1 Compuestos bioactivos, parámetros de calidad y microorganismos aerobios mesófilos totales de las frutillas frescas cortadas sin lavar .....	151
3.2.2.2 Efecto de las condiciones de lavado-desinfección sobre los compuestos bioactivos, los parámetros de calidad y los microorganismos aerobios mesófilos totales de frutillas frescas cortadas .....	153
3.2.3 Validación del modelo en diferentes condiciones del proceso de lavado-desinfección establecidas a partir de la optimización de las múltiples respuestas simultáneamente .....	173
3.2.3.1 Optimización 1 .....	173

3.2.3.2 Optimización 2 .....	175
3.2.4 Evaluación Sensorial.....	176
<b>3.3 Estudio de las operaciones de corte y el almacenamiento de frutillas frescas cortadas .....</b>	<b>178</b>
3.3.1 Resultados de los efectos del tipo de corte practicado sobre las frutillas frescas ..	178
3.3.2 Resultados de los efectos del almacenamiento a distintas temperaturas sobre las frutillas frescas con distintos tipos de cortes.....	180
3.3.2.1 Cambios en el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante.....	180
3.3.2.2 Modelado matemático de los cambios de ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico, vitamina C, sólidos solubles, pH, parámetros de color y antocianinas totales. ....	195
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>206</b>
<b>4.1 “Desarrollo y puesta a punto de métodos y técnicas analíticas” .....</b>	<b>207</b>
<b>4.2 “Estudio de la operación de lavado-desinfección de frutillas frescas cortadas con ácido peracético (APA)”.....</b>	<b>208</b>
<b>4.3 “Estudio de las operaciones de corte y el almacenamiento de frutillas frescas cortadas” .....</b>	<b>210</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>213</b>

## Índice de Tablas

Tabla 1.1. Calendario de cosecha de frutilla en Argentina. Fuente: Kirschbaum y Hancock (2000).

Tabla 1.2. Perfil nutricional de frutillas frescas.

Tabla 1.3. Desinfectantes para el agua de lavado de productos frescos cortados.

Tabla 2.1. Corridas experimentales del diseño de Box-Behnken para tres variables.

Tabla 2.2. Resultados de capacidad antioxidante, fenoles y antocianinas totales utilizando dos sistemas de extracción distintos ( $n = 2$ ).

Tabla 2.3. Niveles de las variables y número de corridas experimentales.

Tabla 2.4. Diseño experimental de Box-Behnken, variables y niveles codificados y sin codificar para el lavado-desinfección N° 1.

Tabla 2.5. Diseño experimental de Box-Behnken, variables y niveles codificados y sin codificar para el lavado-desinfección N° 2.

Tabla 3.1. Resultados experimentales para áreas, tiempos de retención ( $t_R$ ) y anchos de pico ( $w$ ) de ácido ascórbico (AA) y ácido ascórbico total (AAT) en las condiciones del diseño.

Tabla 3.2. Criterios utilizados en la optimización usando la función de Derringer.

Tabla 3.3. Análisis estadístico para la linealidad de las curvas de calibración de ácido ascórbico (AA) y ácido ascórbico total (AAT).

Tabla 3.4. Resultados de los estudios de precisión (repetibilidad o variación intra-diaria) del método con muestras de frutillas.

Tabla 3.5. Resultados de los estudios de recuperación.

Tabla 3.6. Resultados obtenidos del diseño experimental de robustez.

Tabla 3.7. Resultados de vitamina C en frutillas en distintos periodos de análisis.

Tabla 3.8. Resultado de hidrólisis ácida ( $4 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ , 50 min a  $90^\circ\text{C}$ ) en compuestos fenólicos estándares.

Tabla 3.9. Tiempos de retención ( $t_R$ ), absorbancia máxima ( $\lambda_{max}$ ), y absorbancia de cuantificación ( $\lambda$ ) de los compuestos fenólicos.

Tabla 3.10. Resultados evaluación de linealidad de las curvas de calibración de compuestos fenólicos, sensibilidad y límites de detección (LOD y cuantificación (LOQ).

Tabla 3.11. Precisión (repetibilidad o variación intra-diaria) del método antes y después de la hidrólisis ácida ( $4 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ , 50 min a  $90^\circ\text{C}$ ).

Tabla 3.12. Concentración de compuestos fenólicos en muestras de frutillas antes y después de la hidrólisis ácida.

Tabla 3.13. Compuestos bioactivos, parámetros de calidad y actividades enzimáticas en frutillas frescas cortadas sin lavar.

Tabla 3.14. Factores experimentales estudiados y sus niveles correspondientes.

Tabla 3.15. Resultados experimentales del diseño de Box-Benhken de lavado-desinfección N°1 en frutillas *Camarosa*.

Tabla 3.16. Análisis de variancia de los resultados del diseño de lavado-desinfección N° 1 en frutillas variedad *Camarosa*.

Tabla 3.17. Porcentaje de retención promedio luego de los ensayos de lavado-desinfección con ácido peracético ( $0\text{-}80 \text{ mg L}^{-1}$ ), tiempo ( $10\text{-}60 \text{ s}$ ) y temperatura ( $4\text{-}40^\circ\text{C}$ ).

Tabla 3.18. Correlaciones entre los cambios de los parámetros de color y el porcentaje de retención de antocianinas totales en el diseño de lavado-desinfección.

Tabla 3.19. Resultados experimentales de la actividad relativa (%) para la PME, PAL, PPO y PG, luego del lavado-desinfección con ácido peracético ( $0\text{-}80 \text{ mg L}^{-1}$ ), tiempo ( $10\text{-}60 \text{ s}$ ) y temperatura ( $4\text{-}40^\circ\text{C}$ ), respecto a las frutillas frescas cortadas sin tratar.

Tabla 3.20. Análisis de variancia de las actividades reativas PME. PAL. PPO y PG.

Tabla 3.21. Compuestos bioactivos, parámetros de calidad y carga inicial de microorganismos aerobios mesófilos totales en frutillas frescas cortadas sin lavar.

Tabla 3.22. Factores experimentales estudiados y sus niveles correspondientes.

Tabla 3.23. Resultados experimentales del diseño de Box-Benhken de lavado desinfección N° 2 en la variedad *Camarosa*.

Tabla 3.24. Resultados experimentales del diseño de Box-Benhken de lavado-desinfección en la variedad *Selva*.

Tabla 3.25. Análisis de variancia de los resultados del diseño de lavado-desinfección N° 2 en frutillas variedad *Camarosa* y *Selva*.

Tabla 3.26. Análisis de variancia de los resultados del diseño de lavado-desinfección N° 2 en frutillas variedad *Camarosa*.

Tabla 3.27. Análisis de variancia de los resultados del diseño de lavado-desinfección N° 2 en frutillas variedad *Selva*.

Tabla 3.28. Criterios utilizados en la optimización usando la función de Derringer.

Tabla 3.29. Valores para las variables operativas en el lavado desinfección y sus respuestas predichas y experimentales en la optimización N° 1.

Tabla 3.30. Criterios utilizados en la optimización usando la función de Derringer.

Tabla 3.31. Valores para las variables operativas en el lavado desinfección y sus respuestas predichas y experimentales en la optimización N° 2.

Tabla 3.32. Resultados de los atributos sensoriales de las muestras de frutillas frescas cortadas control y en los puntos de optimización.

Tabla 3.33. Compuestos bioactivos y parámetros de calidad de las frutillas variedad *Camarosa* a diferentes grados de corte.

Tabla 3.34 a. Compuestos bioactivos y atributos de calidad de las frutillas frescas cortadas almacenadas a 2°C por 15 días.

Tabla 3.34 b. Compuestos bioactivos y atributos de calidad de las frutillas frescas cortadas almacenadas a 6°C por 10 días.

Tabla 3.34 c. Compuestos bioactivos y atributos de calidad de las frutillas frescas cortadas almacenadas a 13°C por 8- 9 días.

Tabla 3.34 d. Compuestos bioactivos y atributos de calidad de las frutillas frescas cortadas almacenadas a 20°C por 2- 3 días.

Tabla 3.35 a. Coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de las regresiones para los compuestos bioactivos y parámetros de calidad de frutillas frescas enteras despedunculadas almacenadas a distintas temperaturas.

Tabla 3.35 b. Coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de las regresiones para los compuestos bioactivos y parámetros de calidad de frutillas frescas cortadas en mitades almacenadas a distintas temperaturas.

Tabla 3.35 c. Coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de las regresiones para los compuestos bioactivos y parámetros de calidad de frutillas frescas cortadas en cuartos almacenadas a distintas temperaturas.

Tabla 3.36. Constantes de reacción ( $K$ ) y funcionalidad con la temperatura ( $Ea$ ) de compuestos bioactivos y parámetros de calidad en frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

Tabla 3.37. Constantes de reacción ( $K$ ) y funcionalidad con la temperatura ( $Ea$ ) de parámetros de color en frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

Tabla 3.38. Valores de  $Q_{10}$  a 10°C para compuestos bioactivos y parámetros de calidad en frutillas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

Tabla 3.39. Constantes de reacción ( $K$ ) y funcionalidad con la temperatura ( $Ea$ ) de antocianinas totales (Ant T) en frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

## Índice de Figuras

Figura 1.1. Estructura de la frutilla.

Figura 1.2. Estructura del ácido ascórbico (AA) y sus productos de degradación. ADHA: ácido dehidroascórbico, ADCG: ácido dicetogulónico.

Figura 1.3. Principales fuentes de radicales libres. DNA: ácido desoxirribonucleico.

Figura 1.4 a. Clasificación de los compuestos fenólicos: flavonoides

Figura 1.4 b. Clasificación de los compuestos fenólicos: ácidos fenólicos.

Figura 1.5. Biosíntesis de compuestos fenólicos.

Figura 1.6. Estructura química general de los flavonoides.

Figura 1.7. Estructura química de las antocianinas.

Figura 1.8. Estructura química de las flavonas.

Figura 1.9. Estructura química de las isoflavonas.

Figura 1.10. Estructura química de las flavanonas.

Figura 1.11. Estructura química de los flavanoles.

Figura 1.12. Estructura química de los flavonoles.

Figura 1.13. Estructura química de los ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxicinámico.

Figura 1.14. Estructura química de los ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxibenzoico.

Figura 1.15. Estructura química de elagitaninos. HDDP, galoilbis-hexahidroxidifenoil.

Figura 1.16. Estructura química del resveratrol.

Figura 1.17. Diagrama de flujo del procesado de productos vegetales cortados.

Figura 1.18. Interrelaciones entre las lesiones producidas en un vegetal y los cambios subsecuentes en el metabolismo de los compuestos fenólicos que terminan en el amarronamiento de los tejidos.

Figura 2.1 a. Frutillas variedad *Camarosa*.

Figura 2.1 b. Frutillas variedad *Selva*.

Figura 2.2. Cinética de degradación del radical libre DPPH\* luego del agregado de alícuotas de extracto de frutillas.

Figura 2.3. Diagrama de procesamiento seguido para obtener frutillas frescas cortadas. APA: ácido peracético, T: temperatura, t: tiempo.

Figura 2.4. Gráfico ilustrativo del dispositivo empleado para lavar las frutillas frescas cortadas.

Figura 2.5. Diagrama de procesamiento seguido para obtener frutillas frescas cortadas, y toma de muestras para microbiología.

Figura 2.6. Modelo de planilla utilizada para el análisis sensorial.

Figura 2.7. Diagrama de procesamiento seguido para obtener frutillas frescas cortadas. APA: ácido peracético.

Figura 3.1. Efectos del pH y la velocidad de flujo de la fase móvil sobre las áreas de AA (a), el tiempo de retención (b) y el ancho de pico (c) a una longitud de onda de 255 nm.

Figura 3.2. Deseabilidad global de Derringer obtenida para la optimización simultánea (a una longitud de onda de 251 nm) de todas las respuestas (áreas, tiempo de retención y anchos de picos de AA y AAT).

Figura 3.3. Cromatograma típico obtenido para ácido ascórbico (línea punteada) y ácido ascórbico total o vitamina C (línea continua), a 251 nm, y una fase móvil de pH 5.8 y una velocidad de flujo de  $1.15 \text{ ml min}^{-1}$ .

Figura 3.4. Resultados prueba OLS EJCR para AA (a) y AAT (b), las elipses muestran el punto ideal (1, 0).

Figura 3.5. Separación de la mezcla de estándares de compuestos fenólicos por HPLC con DAD a 280 nm. Identificación de los picos: 1: ácido gálico, 2: catequina, 3: (-)-

epicatequina, 4: ácido ferúlico, 5: ácido *p*-cumárico, 6: cianidina, 7: pelarginidina, 8: rutina, 9: ácido cinámico, 10: ácido elágico, 11: quercitina y 12: kaempferol.

Figura 3.6. Espectro de absorción de ácido gálico (a), ácido ferúlico (b), ácido elágico (c) y pelargonidina (d) obtenidas con el detector DAD.

Figura 3.7. Cromatograma HPLC-DAD de extractos de frutillas *Camarosa* antes (a) y luego (b) de la hidrólisis ácida (4 mol L<sup>-1</sup>, a 90°C por 50 min) a 280 nm. Identificación de los picos: 1: ácido gálico, 2: catequina, 3: (-)-epicatequina, 4: ácido ferúlico, 5: ácido *p*-cumárico, 6: cianidina, 7: pelarginidina, 8: rutina (no se distingue a 280 nm), 10: ácido elágico, 11: quercitina y 12: kaempferol.

Figura 3.8. Cromatograma HPLC-DAD de extractos de frutillas *Selva* antes (a) y luego (b) de la hidrólisis ácida (4 mol L<sup>-1</sup>, a 90°C por 50 min) a 280 nm. Identificación de los picos: 1: ácido gálico, 2: catequina, 3: (-)-epicatequina, 4: ácido ferúlico, 5: ácido *p*-cumárico, 6: cianidina, 7: pelarginidina, 8: rutina (no se distingue a 280 nm), 10: ácido elágico, 11: quercitina y 12: kaempferol.

Figura 3.9. Contenido de ácido elágico libre (■) y ácido elágico total (■) en frutillas variedad *Camarosa* y *Selva*.

Fig. 3.10 a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el porcentaje de retención de ácido ascórbico (% RAA) en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a T= 22°C.

Figura 3.11. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para la actividad relativa PME en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a T= 22°C.

Figura 3.12. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para la actividad relativa PPO en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a T= 22°C.

Figura 3.13. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el porcentaje de retención de ácido ascórbico en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a T= 22°C.

Figura 3.14. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el porcentaje de retención de antocianinas totales en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a T= 22°C.

Figura 3.15. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el porcentaje de retención de fenoles totales en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T= 22^{\circ}\text{C}$ .

Figura 3.16. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el porcentaje de retención de capacidad antioxidante en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T= 22^{\circ}\text{C}$ .

Figura 3.17. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el porcentaje de retención de vitamina C en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T= 22^{\circ}\text{C}$  en la variedad *Selva*.

Figura 3.18. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el cambio de  $L^*$  en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T = 22^{\circ}\text{C}$  en la variedad *Selva*.

Figura 3.19. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el cambio de  $C_{ab}^*$  en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T = 22^{\circ}\text{C}$  en la variedad *Selva*.

Figura 3.20. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el cambio de  $h_{ab}$  en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T = 22^{\circ}\text{C}$  en la variedad *Selva*.

Figura 3.21. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para la reducción de aerobios mesófilos totales en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T = 22^{\circ}\text{C}$  en la variedad *Camarosa*.

Figura 3.22. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para la reducción de aerobios mesófilos totales en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T = 22^{\circ}\text{C}$  en la variedad *Selva*.

Figura 3.23. Gráfico de deseabilidad obtenido para la optimización simultánea N° 1 para el proceso de lavado-desinfección en frutillas variedad *Camarosa*.

Figura 3.24. Gráfico de deseabilidad obtenido para la optimización simultánea N° 2 para el proceso de lavado-desinfección en frutillas variedad *Camarosa*.

Figura 3.25 a. Evolución de los fenoles totales con el tiempo de almacenamiento a  $2^{\circ}\text{C}$  de frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

Figura 3.25 b. Evolución de los fenoles totales con el tiempo de almacenamiento a 6°C de frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

Figura 3.25 c. Evolución de los fenoles totales con el tiempo de almacenamiento a 13°C de frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

Figura 3.25 d. Evolución de los fenoles totales con el tiempo de almacenamiento a 20°C de frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

Figura 3.26 a. Evolución de la capacidad antioxidante con el tiempo de almacenamiento a 2°C de frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

Figura 3.26 b. Evolución de la capacidad antioxidante con el tiempo de almacenamiento a 6°C de frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

Figura 3.26 c. Evolución de la capacidad antioxidante con el tiempo de almacenamiento a 20°C de frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

Figura 3.26 d. Evolución de la capacidad antioxidante con el tiempo de almacenamiento a 13°C de frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

## Abreviaturas y Símbolos

- %R:** porcentaje de retención
- AA:** ácido ascórbico
- AAD:** error estándar de las medias
- AAT:** ácido ascórbico total
- ADCG:** ácido dicetogulónico
- ADHA:** ácido dehidroascórbico
- AEAC:** actividad antioxidante equivalente al ácido ascórbico
- AG:** ácido gálico
- AM:** atmósfera modificada
- Ant T:** antocianinas totales
- APA:** ácido peracético
- AT:** acidez total
- C:** concentración ácido peracético
- CA:** capacidad antioxidante
- CC:** cortadas en cuartos
- CM:** cortadas en mitades
- D:** deseabilidad global
- Ea:** energía de activación
- ED:** enteras despedunculadas
- FAM:** microorganismos aerobios mesófilos totales
- FF:** fruta fresca
- FT:** fenoles totales
- $L^*$ ,  $L_0^*$**  valor de parámetro  $L^*$  de la muestra lavada y sin lavar
- LOD:** límite de detección
- LOQ:** límite de cuantificación
- P3G:** pelargonidín-3-glucósido
- PAL:** fenilalanina-amonio liasa
- PG:** poligalacturonasa
- PME:** pectinmetil esterasa
- PPO:** polifenoloxidasas

**SEN:** sensibilidad de calibración  
**SS:** sólidos solubles  
**T:** temperatura  
**t:** tiempo  
 **$t_R$ :** tiempo de retención  
**UFC:** unidades formadoras de colonia  
**Vit C:** vitamina C  
**VMP:** vegetales mínimamente procesados  
**w:** ancho de pico  
 **$\gamma$ :** sensibilidad analítica  
 **$\delta a^*$ :** cambio parámetro  $a^*$   
 **$\Delta A$ :** cambio de absorbancia  
 **$\delta b^*$ :** cambio parámetro  $b^*$   
 **$\delta C_{ab}^*$ :** cambio parámetro  $C_{ab}^*$   
 **$\delta h$ :** cambio parámetro  $h$   
 **$\delta L^*$ :** cambio parámetro  $L^*$   
 **$\lambda$ :** longitud de onda  
 **$\lambda_{max}$ :** longitud de onda máxima

## Resumen

Las frutillas son frutas de amplio consumo popular con atractivo color, sabor y aroma. Representan una fuente relevante de compuestos bioactivos debido a sus altos niveles de vitamina C y compuestos fenólicos, los cuales presentan efectos antioxidantes beneficiosos para el mantenimiento de la salud.

El consumo de frutas y hortalizas en la dieta diaria es todavía muy bajo con respecto a las recomendaciones hechas por los profesionales de la salud. La introducción en el mercado de los vegetales mínimamente procesados (VMP) o frescos cortados, es una forma de incrementar el consumo de frutas y hortalizas dentro de la población, debido a su atractiva presentación, apariencia, sabor, y comodidad para el consumidor. Los VMP son alimentos naturales preparados mediante varias operaciones unitarias sobre los vegetales enteros, envasados, conservados a bajas temperaturas y listos para ser consumidos. La creciente demanda de los productos mínimamente procesados con la consiguiente garantía de inocuidad y de buena calidad sensorial, nutricional, y de potencial saludable, ha llevado a los investigadores a redoblar esfuerzos en el estudio de nuevas tecnologías, o mejoramiento de las existentes, que permitan extender la vida útil de los mismos. La industria de los VMP, y particularmente de las frutas frescas cortadas, se encuentra poco desarrollada en Argentina, razón que hace necesario investigar en lo referente a diferentes formas de procesamiento y conservación.

El pelado, cortado y lavado del producto vegetal son algunas de las etapas del mínimo procesamiento que podrían modificar el aporte de nutrientes y compuestos bioactivos en los vegetales frescos cortados. Sin embargo, los daños producidos por algunas de estas operaciones, favorecerían la activación de la enzima fenilalanina-amonioliasa, clave en la síntesis de los compuestos fenólicos, favoreciendo su síntesis, con un consecuente aumento en la capacidad antioxidante de estos productos. Por otra parte, el lavado-desinfección usando ácido peracético como sanitizante está siendo promocionado en la industria de los vegetales frescos cortados debido a que, a diferencia de los productos clorados, no reacciona con la materia orgánica y por lo tanto no causa la formación de compuestos halogenados cancerígenos.

El objetivo general de la presente tesis fue el estudio y la optimización de tecnologías de procesamiento y conservación en la elaboración de frutillas frescas cortadas, con el fin de

evitar pérdidas de compuestos bioactivos, como así también, en lo posible, de aumentar su potencial saludable para brindar al consumidor un producto natural con un posible o ampliado efecto protector sobre su salud.

En el desarrollo de la presente tesis se realizó una caracterización de frutillas variedad *Camarosa*, de origen regional y *Selva*, proveniente de la provincia de Buenos Aires, en cuanto a su contenido de compuestos bioactivos, y otros parámetros de calidad. Se desarrolló y optimizó un método UV-HPLC rápido y conveniente para la cuantificación de ácido ascórbico (AA), ácido dehidroascórbico (ADHA) y vitamina C en frutillas, utilizando diseños experimentales y optimización simultánea a través de la función deseabilidad de Derringer. Además, se desarrolló un método DAD-HPLC para la identificación y cuantificación de los principales compuestos fenólicos en frutillas en una sola corrida cromatográfica. Para ambos métodos se realizó una validación exhaustiva, la cual demostró que las metodologías propuestas son lineales en los rangos de concentración estudiados, sensibles, precisas, exactas y para el caso de la determinación de Vitamina C, el método optimizado resultó ser también robusto.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la variedad *Camarosa* es la que presentaría menor variabilidad en el contenido de vitamina C con el año de cosecha, comparada con la variedad *Selva*. Por otra parte, se detectaron diferencias en la ocurrencia y concentración de compuestos fenólicos para ambos cultivares. En las frutillas *Camarosa* se encontró un mayor contenido en antocianidinas, sobre todo pelargonidina, lo cual explicaría el color rojo más vívido detectado en este cultivar.

Se realizó un estudio de los cambios en la calidad nutricional, potencial saludable (compuestos bioactivos) y calidad microbiológica de frutillas frescas cortadas en cuartos como consecuencia de la operación de lavado-desinfección con ácido peracético (APA), variando la concentración del agente activo, el tiempo de exposición y la temperatura de la solución de lavado. Para estudiar esta operación se empleó la Metodología de Superficie de Respuesta, usando un diseño de Box-Behnken de 15 corridas experimentales.

En la primer experiencia (diseño de lavado-desinfección N° 1) se lavaron frutillas variedad *Camarosa* en las condiciones: 0 - 80 mg L<sup>-1</sup> APA, 4 - 40°C, y 10 - 60 s; siendo las respuestas estudiadas: porcentajes de retención (% R) de AA, Vit C, antocianinas totales (Ant T), fenoles totales (FT), capacidad antioxidante (CA), sólidos solubles (SS), cambios

en la acidez total, pH y parámetros de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$ ) y cambios en las actividades de las enzimas fenilalanina-amoniya liasa (PAL), poligalacturonasa (PG), pectinmetilesterasa (PME) y polifenoloxidasa (PPO) en las muestras lavadas en relación a las muestras sin lavar. Los resultados del ANOVA indicaron que las variables de proceso y los niveles utilizados en la operación afectaron la retención de AA, y las actividades de PME y PPO. Esto pudo cuantificarse a través de los modelos desarrollados. Además, las retenciones de compuestos bioactivos (Vit C, Ant T y FT), CA, parámetros de calidad (SS, pH, AT y parámetros de color) y cambios en las actividades de PAL y PG no fueron afectados por las variables del proceso en el espacio experimental estudiado. Sin embargo, se observaron pequeños cambios en todos estos parámetros luego de la operación de lavado-desinfección.

Ampliando el espacio experimental (0 - 100 mg L<sup>-1</sup>APA, 4 - 40°C, y 10 - 120 s), el lavado-desinfección se estudió sobre los dos cultivares de frutillas (*Camarosa* y *Selva*). En este caso se investigaron las mismas respuestas que en el diseño N° 1 y se agregó la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (red FAM). El análisis de varianza, en principio, se realizó empleando los resultados obtenidos en las 30 corridas experimentales, teniendo en cuenta, el factor bloque: variedad. Cuando este factor no era significativo, la respuesta se analizó en conjunto para las dos variedades, de lo contrario el análisis se llevó a cabo por separado para cada variedad. Los ANOVAS de % R AA, % R Ant T, % R FT, y % R CA se vieron afectados por las variables del proceso, principalmente por la concentración de APA y el tiempo. Al no observarse diferencias entre los cultivares, los resultados se modelaron conjuntamente. Las predicciones realizadas con los modelos obtenidos, trabajando a las máximas condiciones del diseño (100 mg L<sup>-1</sup> ácido peracético, 40°C y 120 s), arrojaron retenciones superiores al 60 % en la mayoría de ellos.

El % R Vit C y los cambios de color no se vieron afectados por las variables de procesamiento dentro del dominio experimental ensayado para el cultivar *Camarosa*. Sin embargo, las variables de la operación afectaron el % R Vit C y los cambios de color en la variedad *Selva*. Por otra parte, la red FAM fue afectada por las variables del proceso en ambos cultivares de manera diferente y se obtuvieron modelos predictivos para cada uno de ellos.

Una optimización simultánea de las respuestas estudiadas en el diseño de lavado-desinfección N°2 permitió encontrar condiciones de lavado en dos escenarios: a) maximizando la reducción microbiológica con retenciones en los compuestos bioactivos del 90% y b) priorizando la retención de compuestos bioactivos con una buena reducción microbiológica. Experiencias adicionales de validación usando frutillas *Camarosa* permitieron demostrar la eficacia de los modelos obtenidos y el análisis sensorial aportó información complementaria sobre la calidad de los productos obtenidos en las condiciones de optimización estudiadas.

Por otra parte se estudió el efecto del corte y la temperatura de almacenamiento de frutillas frescas sobre la retención de su potencial bioactivo (AA, ADHA; Vit C, Ant T, FT y CA), y otros atributos de calidad (SS; pH y parámetros de color). Las frutillas se cortaron o acondicionaron como frutillas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC), almacenándose a 2, 6, 13 y 20°C, por un periodo de 15, 10, 8-9 y 2-3 días, respectivamente. El efecto del corte en el día cero en frutillas ED, y cortadas CM y CC incluyendo el subsiguiente lavado con APA, en las condiciones de optimización que priorizaban la retención de compuestos bioactivos, ocasionaron pequeñas pérdidas de AA, Vit C, Ant T, FT y SS, que se incrementaron con el grado de corte practicado en el tejido vegetal. El estudio del posterior almacenamiento de las frutillas frescas cortadas mostró, en general, un desmejoramiento en los atributos estudiados a medida que aumentaba el grado de corte y la temperatura de la conservación. La evolución de los atributos (ADHA, SS, pH y parámetros de color) en función del tiempo pudo ser modelada con cinéticas de orden cero en todos los tipos de corte practicado, a todas las temperaturas ensayadas. La dependencia de las constantes de reacción con la temperatura mostró un buen ajuste con la ecuación de Arrhenius. Las energías de activación para los distintos atributos mostraron, como tendencia general, una mayor sensibilidad a la temperatura de las frutillas frescas cortadas que las ED.

La evolución del contenido de ácido ascórbico solo pudo modelarse con cinética de orden cero en las frutillas CC. El contenido de ácido ascórbico de las frutillas ED y CM no mostraron cambios con la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Por su parte, la vitamina C se mantuvo prácticamente invariable en todas las temperaturas, a lo largo de la conservación para todos los cortes estudiados.

Se observó una disminución del contenido de antocianinas totales con el tiempo de almacenamiento, hecho más marcado en las muestras almacenadas a 20°C.

El efecto del estrés abiótico ocasionado por el corte provocó la acumulación de compuestos fenólicos en las frutillas frescas cortadas. Se registraron aumentos significativos a días específicos de la conservación para cada tipo de corte ensayado, comparado con el día 0. Cuanto mayor fueron el grado de corte y la temperatura de conservación, más rápido ocurrió el aumento. Además los mayores aumentos (23 % del basal) se dieron en las frutillas frescas cortadas en cuartos, las de mayor grado de injuria. Al final de la conservación, los contenidos de fenoles totales en las frutillas frescas ED, CM y CC se mantuvieron prácticamente constantes respecto de los valores iniciales. El mayor estrés producido por el corte de las frutillas frescas en cuartos, induciría un incremento en el contenido de fenoles totales con un consecuente aumento en su capacidad antioxidante, siendo este aumento acelerado al incrementar la temperatura de conservación. Por lo tanto, se podrían preparar frutillas frescas cortadas en cuartos y conservarse a temperaturas bajas (2°C), obteniéndose de este modo productos con un mayor nivel en compuestos fenólicos, lo que significaría un potencial bioactivo aumentado.

## Abstract

Strawberries are fruits of frequent human consumption with an attractive color, flavor and aroma. Strawberries represent an important source of bioactive compounds due to their high levels of vitamin C and phenolics compounds, which present high antioxidant effects, beneficial for the maintenance of consumer's health.

In many countries, fruits and vegetables daily intake is still low compared to recommendations by health professionals. The introduction of minimally processed vegetables (VMP) in the market is a way to increase fruits and vegetables consumption, due to their attractive presentation, appearance, taste, and convenience for consumers. VMP or fresh-cut fruits and vegetables are natural foods obtained after unit operations on whole vegetables, packaged, stored at low temperatures and ready to eat. The increased demand on VMP with safety assurance, sensory and nutritional quality, and healthy potential, has led researchers to redouble efforts in the study of new or improved traditional technologies to extend their shelf-life. The VMP industry, and particularly, the fresh-cut fruit industry, is not well developed in Argentina, and for this reason the investigation of different processing and preservation techniques is necessary.

The peeling, cutting and washing are operations that could modify nutrients and bioactive compounds content of VMP. However, the abiotic stress caused by some of these operations could activate phenylalanine-ammonia lyase, a key enzyme in the phenolic compounds synthesis. The increased activity of this enzyme could result in higher antioxidant capacity of the product.

On the other hand, the washing-disinfecting with peracetic acid is being promoted for fresh-cut vegetables processing because, unlike to chlorinated compounds, it does not react with organic matter and not cause the formation of carcinogenic halogenated compounds.

The overall objective of the present thesis was to study and optimize the processing and preservation technologies in the preparation of fresh-cut strawberries, in order to minimize bioactive compounds losses, or furthermore, to increase their potential health.

The characterization with respect to bioactive compounds and other quality attributes of two strawberry varieties: *Camarosa*, grown at Santa Fe, and *Selva* from Buenos Aires, was achieved.

A convenient and rapid UV-HPLC method for the quantification of ascorbic acid (AA), dehydroascorbic acid (ADHA) and vitamin C in strawberries was developed using experimental design and was simultaneously optimized through Derringer's desirability function. Furthermore, a DAD- HPLC method for the identification and quantification of the main phenolic compounds in strawberries in a single chromatographic run was developed. For both methods, an exhaustive validation was performed, and results indicated that the proposed methodologies are linear in the studied concentration ranges, sensible, precise, and accurate. Additionally, for Vitamin C determination, the proposed methodology has demonstrated to be robust.

According to results, *Camarosa* strawberries presented less variability in Vitamin C content within crop year, compared to *Selva* cultivar. Moreover, there were differences in the occurrence and concentration of phenolic compounds for both cultivars. In *Camarosa* strawberries higher content of anthocyanidins were found, mainly pelargonidin, which would explain the more vivid red color detected in this cultivar.

A study of changes in nutritional quality, bioactive compounds and microbiological quality of fresh-cut strawberries into quarters was performed as a consequence of the washing-disinfection with peracetic acid (APA) at different concentration, contact times and temperatures. The Response Surface Methodology using a 15 experimental runs Box-Behnken design was used to study this operation. In the first experiment (design 1), *Camarosa* strawberries were washed under the following ranges of variables conditions according to experimental design: 0 - 80 mg L<sup>-1</sup> PAA, 4 - 40° C, and 10 - 60 s. The responses were: retention percentages (% R) of ascorbic acid (AA), Vitamin C (Vit C), total anthocyanins (Ant T), total phenols (FT), antioxidant capacity (CA), and soluble solids (SS), percentage changes of total acidity (AT), pH, color parameters ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  and  $h_{ab}$ ), and changes in activities of the enzymes phenylalanine-ammonia lyase (PAL), polygalacturonase (PG), pectinmethyl esterase (PME) and polyphenoloxidase (PPO) in washed samples relative to samples without washing.

ANOVA results indicated that processing variables used in the washing-disinfection operation affected AA retention and PME and PPO activities. Changes were quantified through the developed predictive models. On the other hand, the retention of bioactive compounds (Vit C, Ant T and FT), CA, quality parameters (SS, pH, AT and color

parameters), and PAL and PG activities were not affected by the process variables in the experimental region. However, if each response or attribute before and after washing were compared slight changes were observed.

In the second experiment (washing-disinfection design 2: 0 - 100 mg L<sup>-1</sup> APA, 4 - 40° C, and 10 - 120 s) the operation was studied on two strawberry cultivars (*Camarosa* and *Selva*). In this case, the responses were the same as in washing-disinfection design 1, but the reduction of total mesophilic aerobic microorganisms (red FAM) was also investigated. ANOVA analysis with 30 runs was performed for each response (considering cultivars as a block factor). When a statistically significant block factor was observed on a response, ANOVA analysis for this response was done for each cultivar in a separate way.

The RAA (%), R T Ant (%), R FT (%) and R CA (%) were affected by process variables, mainly APA concentration and time, and there were not affected by cultivar (the block factor was not significant). Predictions using the obtained models, at maximum design conditions (100 mg L<sup>-1</sup> peracetic acid, 40° C and 120 s) showed retentions greater than 60% in most cases.

Vit C retention and color changes were not affected by processing variables within the experimental domain investigated for *Camarosa* cultivar. However, operation variables affected Vit C R (%) and color changes in *Selva* cultivar. Moreover, the FAM reduction was affected differently by process variables in both cultivars and predictive models were obtained for each one.

Simultaneous optimization of responses in washing-disinfecting design 2 allowed finding the conditions of the variables which satisfy different situations, for example: a) maximizing microbiological reduction with 90% bioactive compounds retentions, and b) maximizing bioactive compounds retention with acceptable microbiological reduction. Additional validation experiments, using *Camarosa* strawberries, demonstrated the efficacy of the models and the sensory analysis provided complementary information about product quality in the studied optimizing conditions.

Furthermore, the effect of cutting and the storage temperature on strawberries retention of bioactive compounds (AA, ADHA, Vit C, T Ant, TP and AC), and other quality attributes (SS, pH and color parameters) were studied. The strawberries were cut or conditioned as whole strawberries without stem (ED), halved (CM) and cut into quarters (CC) and stored

at 2, 6, 13 and 20 °C during 15, 10, 8-9 and 2-3 days, respectively. The effect of cutting and the subsequent washing-disinfection with APA on strawberries produced slight losses in AA, Vit C, Ant T, FT and SS contents when conditions that maximized the bioactive compounds retention were used. However, higher degree of cutting resulted in greater losses on the processing day. The fresh-cut strawberries during storage showed, in general, a decrease in attributes with increasing cutting degree and storage temperature. The evolution of the attributes (ADHA, SS, pH and color parameters) as a function of the time was modeled with zero-order kinetic in all degree of cutting and temperatures investigated. The dependence of constant reaction with temperature showed a good fit with the Arrhenius equation. The activation energies for the attributes showed, as a general trend, higher sensitivity to temperature for CM and CC strawberries than ED ones.

The ascorbic acid content evolution could only be modeled with zero order kinetics in the case of CC strawberries. The ascorbic acid content of ED and CM strawberries showed no changes with temperature and storage time. Meanwhile, Vitamin C remained almost constant during the storage at all temperatures and degree of cutting.

A decrease in total anthocyanins content during storage was observed, and the effect was more pronounced in samples stored at 20° C.

The abiotic stress caused by cutting produced the accumulation of phenolic compounds in fresh-cut strawberries. There were significant increases at specific days of storage for each degree of cutting compared with day 0. The higher degree of cutting and storage temperature, the faster the increase occurred. Besides, the largest increase (23% of the initial content) occurred in fresh-cut strawberries into quarters, whose degree of injury was the highest. At the end of storage, the total phenolic content in ED, CM and CC strawberries remained almost constant with respect to the initial values. The biggest stress produced when cutting strawberries into quarters, would induce an increase in the total phenolic content with a consequent increment in their antioxidant capacity; and that increase would happen quickly when increasing storage temperature. Therefore, fresh-cut strawberries with an enhanced bioactive potential can be prepared into quarters and stored at low temperatures (2°C).

# **1. Introducción**

---

### 1.1 Consideraciones generales sobre las frutillas

Las frutillas pertenecen al grupo de frutas *no climatéricas*, aquellas cuya maduración no presenta variaciones sustanciales en la tasa de respiración o en la síntesis de etileno (White, 2002). Las frutillas son frutas de consumo popular con atractivo color, sabor y aroma (da Silva Pinto y col., 2008).

Las frutillas pertenecen a la familia de las Rosáceas y al género *Fragaria* (en 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). Es un fruto múltiple denominado botánicamente "eterio", cuyo receptáculo constituye la parte comestible, y que sostiene a los aquenios o verdaderos frutos, llamados vulgarmente semillas. Los aquenios son frutos secos indehiscentes, uniseminados, de aproximadamente 1 mm de largo, que se encuentran insertados en la superficie del receptáculo o en pequeñas depresiones más o menos profundas denominadas criptas. Un fruto mediano suele tener de 150 a 200 aquenios, pudiendo llegar hasta 400 en los frutos de gran tamaño. Después de la fecundación, los óvulos al convertirse en aquenios estimulan el engrosamiento del receptáculo que finamente constituirá la parte comestible. El receptáculo maduro tiene hasta 5 cm de diámetro de forma achatada, globosa, cónica, reniforme, redondeada, alargada, etc. 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 (Figura 1.1) (Vicente 2004).

Como otras frutas, las frutillas pueden ser consumidos "in natura", lo cual representa una ventaja para los consumidores debido a que no se producen pérdidas de nutrientes debido al procesamiento (Cordenunsi y col., 2005). Son una fuente relevante de compuestos bioactivos debido a sus altos niveles de vitamina C, folato y compuestos fenólicos, los cuales presentan altos efectos antioxidantes beneficiosos para el mantenimiento de la salud (Cordenunsi y col., 2005; Odriozola Serrano y col., 2010; Giampieri y col., 2012). Las frutillas poseen una vida postcosecha extremadamente corta, son susceptibles al daño mecánico, deterioro fisiológico y microbiológico y a la pérdida de agua; por lo que si no son consumidas frescas, deben ser rápidamente procesadas en mermeladas, jugos, vinos, o congeladas para el uso en postres o yogures (Del Valle y col., 2004, Terefe y col., 2009).

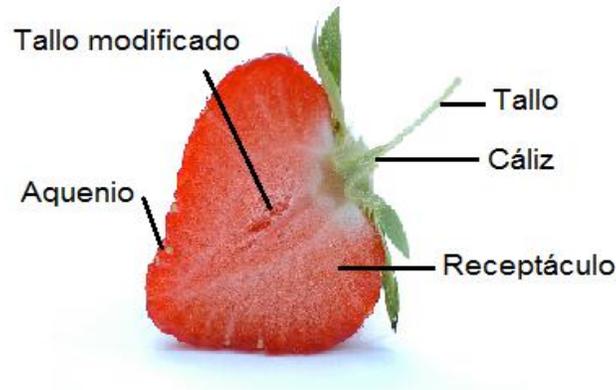


Figura 1.1. Estructura de la frutilla.

### 1.2 Generalidades sobre el cultivo de frutillas en Argentina

En Argentina se cultivan 1.100 hectáreas de frutillas, de las cuales 290 se encuentran en la zona norte, mayoritariamente en la provincia de Tucumán. La zona tradicional de producción de frutillas en esta provincia es Lules, con 230 hectáreas. La otra región productora es Tafí del Valle, donde existen 60 hectáreas en los valles de altura. En la provincia de Santa Fe, región central, la principal zona productora tradicionalmente se concentra en Coronda y localidades vecinas como Arocena y Desvío Arijón, aunque actualmente, el área de siembra se está proyectando a Santa Rosa de Calchines, Arroyo Leyes y San José del Rincón. Coronda comenzó a producir frutillas en la década de 1920, verificándose una llamativa expansión en la superficie plantada que la asoció a este cultivo de manera inmediata, a partir del reconocimiento de las posibilidades comerciales que el mismo presentaba. Actualmente Coronda cultiva aproximadamente 400 hectáreas, con una producción anual de 10.000 toneladas, un 50% de la producción nacional. El resto de la producción se distribuye en Salta, Jujuy, Misiones y Corrientes en la zona norte; y la Provincia de Buenos Aires y Río negro, en la zona sur (Kirschbaum y Hancock, 2000, Saccone, 2006). Esta amplia distribución de los cultivos permite tener frutillas durante todo el año (Tabla 1.1).

La mayor parte de las frutillas cultivadas en Argentina son de la variedad “*Camarosa*”, originada en la Universidad de California en Estados Unidos. Se trata de frutos con destacada adaptación climatológica, excepcional calidad y sabor y con una buena tolerancia a las enfermedades (Saccone, 2006). Otras variedades cultivadas preferentemente en el

norte y centro de Argentina son “Chandler” y “Sweet Charlie”. Las variedades “Selva” y “Seascape” son más comunes de la región sur.

Específicamente en Coronda y zonas aledañas, las variedades cultivadas representan un 80 % de *Camarosa*, 10% de *Chandler*, un 8% de *Sweet Charlie* y el restante 2 % corresponde a otras variedades que no son determinantes ni representativas de la zona (Saccone, 2006).

Tabla 1.1. Calendario de cosecha de frutilla en Argentina.

Regiones	Meses del año											
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
<i>Norte</i>												
Tucumán												
Salta – Jujuy												
Corrientes - Misiones												
<i>Central</i>												
Santa Fe (Coronda)												
Norte de Buenos Aires												
<i>Sur</i>												
Sur de Buenos Aires												
Río Negro – Neuquén												

Fuente: Kirschbaum y Hancock, 2000.

### 1.3 Composición nutricional de frutillas

En la Tabla 1.2 se presenta el perfil nutricional típico de frutillas frescas. De acuerdo a este perfil, las frutillas representarían una opción alimenticia saludable (Giampieri y col., 2012). En general, las frutas son productos ricos en agua, pobres en proteínas (de 1 a 4%) y lípidos (entre el 0,5 – 0,6%), y en lo referente a carbohidratos, se encuentran entre el 7 y 18%. Son alimentos de escasa importancia desde el punto de vista plástico y energético; sin embargo, tienen gran interés por su contenido de micronutrientes como vitaminas, minerales y compuestos bioactivos beneficiosos para la salud (compuestos fenólicos, fibra, compuestos organosulfurados, glucosinolatos, etc.). Son alimentos con bajo contenido en sodio, calorías y grasa saturada y carecen de colesterol.

Estudios epidemiológicos han señalado que un aumento en la dieta de productos vegetales, resulta en un mejor manejo de la diabetes y una reducción del riesgo a la obesidad, debido a sus altas cantidades de fibra y menor contenido calórico (Steinmetz y Potter, 1996). La

Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el consumo de al menos cinco raciones de frutas y hortalizas al día (equivalentes a 400 g por día) (FAO/OMS, 2003).

### **1.3.1 Macronutrientes**

El agua es el componente más abundante en frutas y hortalizas, constituyendo más del 75% de su peso e incluso en las frutillas supera el 90% (Tabla 1.2). El consumo de frutas y hortalizas, bien en su estado sólido o en forma de jugos, es una de las principales fuentes de agua que tiene el ser humano en su dieta (Cano y col., 2005).

Los hidratos de carbono son el principal componente de las frutas después del agua y representan más del 90% de su materia seca. Los hidratos de carbono se clasifican en tres grupos: monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos pueden ser pentosas (arabinosa, xilosa y ribosa) y hexosas (glucosa, fructosa y galactosa). Los principales monosacáridos que se encuentran en las frutas son glucosa y fructosa, y su composición varía de una fruta a otra. Por ejemplo en duraznos y ciruelas es más abundante la glucosa que la fructosa; mientras que en manzanas, frambuesas, kiwis y peras ocurre lo contrario (Cano y col., 2005). La glucosa y la fructosa se encuentran en proporciones similares en frutillas maduras y constituyen un 83% del total de los azúcares de estas frutas (Tabla 1.2) (Vicente, 2004). Los oligosacáridos son sacarosa, maltosa, lactosa, rafinosa y estafiosa. La sacarosa es el oligosacárido más importante en las frutas y es el único hallado en frutillas (Tabla 1.2). Los polisacáridos incluyen el almidón (constituido por amilosa y amilopectina, polímeros de la glucosa), y polisacáridos que forman parte de la fibra que serán más adelante descriptos. El almidón se halla en las frutas en estado inmaduro, su concentración disminuye con la maduración del fruto, con excepción de las bananas que presentan una concentración de almidón del 3% (Cano y col., 2005).

En cuanto a la energía, el aporte calórico aportado por las frutas es muy bajo, normalmente inferior a 70 Kcal 100 g de parte comestible. Como puede observarse en la Tabla 1.2, el aporte calórico de 100 gramos de frutillas frescas es la mitad de ese valor.

El contenido de grasas de las frutas y hortalizas suele ser inferior al 1% de su peso. Existen excepciones como la palta con un contenido entre 12 y 14% (Cano y col., 2005).

Tabla 1.2. Perfil nutricional de frutillas frescas<sup>1</sup>.

Tipo	Nutriente	Por 100g FF <sup>2</sup>
<b>Macronutrientes</b>		
	Agua (g)	90,95
	Energía (Kcal)	32
	Proteínas (N x 6,25) (g)	0,67
	Cenizas (g)	0,40
	Lípidos totales (g)	0,30
	<i>Grasas saturadas (g)</i>	0,015
	<i>Grasas monoinsaturadas (g)</i>	0,043
	<i>Grasas poliinsaturadas (g)</i>	0,155
	Carbohidratos (por diferencia) (g)	7,68
	Fibra dietaria (g)	2,0
	Azúcares totales (g)	4,89
	<i>Sacarosa (g)</i>	0,47
	<i>Glucosa (g)</i>	1,99
	<i>Fructosa (g)</i>	2,44
	Almidón	0,04
<b>Micronutrientes</b>		
<b>Minerales</b>		
	Calcio (mg)	16
	Hierro (mg)	0,41
	Magnesio (mg)	13
	Fósforo (mg)	24
	Potasio (mg)	153
	Sodio (mg)	1
	Cinc (mg)	0,15
	Cobre (mg)	0,048
	Manganeso (mg)	0,386
	Selenio (µg)	0,4
<b>Vitaminas</b>		
	Vitamina C (mg)	58,8
	Tiamina (B1) (mg)	0,024
	Riboflavina (B2) (mg)	0,022
	Niacina (B3) (mg)	0,386
	Ácido pantoténico (mg)	0,125
	Vitamina B6 (mg)	0,047
	Folato (µg)	24
	Colina (mg)	5,7
	Betaína (mg)	0,2
	Vitamina B12 (µg)	0
	Vitamina A, EAR <sup>3</sup> (µg)	1
	<i>Retinol (µg)</i>	0
	<i>B-caroteno (µg)</i>	7
	<i>A-caroteno (µg)</i>	0
	Luteína + zeaxantina (µg)	26
	Vitamina E, (α-tocoferol) (mg)	0,29
	β-tocoferol (mg)	0,01
	γ-tocoferol (mg)	0,08
	δ-tocoferol (mg)	0,01
	Vitamina K, filoquinona (µg)	2,2

<sup>1</sup>Fuente: USDA, 2012; <sup>2</sup>FF: fruta fresca; <sup>3</sup>EAR: equivalente de la actividad de retinol.

Estudios epidemiológicos indican que la reducción del consumo de grasas saturadas es un pilar fundamental de las recomendaciones dietarias internacionales para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. La sustitución del aporte dietario de grasas saturadas por grasas insaturadas provenientes de aceites vegetales ha sido encontrado como un factor beneficioso en la prevención de estos tipos de enfermedades (Micha y Mozaffarian, 2010).

En este sentido, las frutillas presentan muy poca cantidad de lípidos, de los cuales, la mayoría corresponden a grasas polinsaturadas (Tabla 1.2). El aceite de los aguenuos es rico en ácidos grasos insaturados (aproximadamente 72% de ácidos grasos polinsaturados) (Giamperi y col., 2012).

Las frutas tienen un bajo contenido en compuestos nitrogenados, entre el 0,1 y 5% de su peso, por lo que no son consideradas importantes fuentes de proteínas (Cano y col. 2005). La frutilla es una fruta que no es la excepción y presenta un bajo contenido de proteínas (Tabla 1.2).

El término fibra incluye a aquellos constituyentes de los vegetales que son resistentes a la digestión por las enzimas del tubo digestivo humano, por lo que llegan al colon sin degradarse. Aunque no tiene valor energético, posee efectos hipocolesterolémicos y efectos preventivos frente al cáncer de colon. Además disminuye el riesgo de formación de cálculos biliares, es un regulador de la absorción de glucosa, produce un incremento del volumen fecal y disminuye el tiempo de tránsito intestinal (Saura-Calixto, 1997).

La fibra puede clasificarse en dos fracciones, una insoluble y otra soluble en agua y en los fluidos intestinales. La celulosa, hemicelulosa y lignina constituyen una fibra insoluble capaz de atravesar el intestino sin sufrir alteración por la fermentación bacteriana. Las gomas, mucílagos, algunas hemicelulosas y pectinas son fibras solubles que pueden ser descompuestas por las bacterias del colon y se transforman en compuestos más sencillos (Cano y col., 2005). Las frutas son importante fuente de fibra soluble. Los buenos contenidos en fibra conjuntamente con el bueno contenido en fructosa que poseen las frutillas podrían contribuir en la regulación de la glucemia, por enlentecimiento de la digestión (Giampieri y col., 2012).

### 1.3.2 Micronutrientes

La importancia del consumo de frutas y hortalizas, como parte de dietas saludables, radica principalmente en su aporte de vitaminas y minerales (Robles-Sánchez y col., 2009).

#### 1.3.2.1 Vitaminas

En la actualidad se conocen trece vitaminas, cada una con una función específica. Las vitaminas no son sintetizadas por el organismo humano y deben ser suministradas mediante la dieta, ya que son esenciales para su buen funcionamiento (Cano y col., 2005). Las frutas son ricas en vitaminas hidrosolubles como la vitamina C y el ácido fólico. También contienen pequeñas cantidades de otras vitaminas como las del grupo B (vitaminas B1, B2, B3 y B6). Destaca su alto contenido de carotenoides, algunos de los cuales presentan actividad de provitamina A ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y  $\gamma$ -caroteno), sustancias que en el organismo se transforman en la vitamina liposoluble A. Algunos productos vegetales presentan otras vitaminas liposolubles, como la vitamina K y la E. Las frutas y las hortalizas no contienen vitaminas D, B12 y A preformada (retinol) (Villarino-Rodriguez y col., 2003).

##### 1.3.2.1.1 Vitamina C

El ácido L-ascórbico (AA) es la principal forma biológicamente activa de la Vitamina C. El ácido D-ascórbico (ácido isoascórbico o eritórbico) es un aditivo legalmente usado como antioxidante, pero cuya capacidad vitamínica es solo del 5% (Fontannaz y col., 2006). El AA puede ser reversiblemente oxidado a la forma ácido L-dehidroascórbico (ADHA) debido a la presencia de dos grupos hidroxilos en su estructura (Figura 1.2). La reacción de oxidación puede ser inducida por la exposición a temperaturas o pH altos, presencia de luz, oxígeno o metales y a la acción enzimática (Nováková y col., 2008). El ADHA presenta actividad vitamínica pero en menor porcentaje que su forma reducida. Una oxidación subsiguiente genera ácido dicetogulónico (ADCG), el cual no presenta actividad vitamínica y cuya formación es irreversible (Figura 1.2), lo que se traduce en una pérdida de capacidad vitamínica (Hernández y col., 2006).

El término vitamina C se usa como un descriptor general de todos los compuestos que exhiben actividad biológica de vitamina C, tales como ésteres del ácido ascórbico, formas

sintéticas como el ácido 6-deoxi-L-ascórbico y compuestos oxidados (Davey y col., 2000). Sin embargo, en las frutas se considera que es la suma de los ácidos ascórbico (AA) y dehidroascórbico (ADHA) y en general, el contenido de vitamina C de frutas y hortalizas depende de la especie, cultivar, estado de madurez, y de la manipulación postcosecha (Combs, Lee y Kader, 2000, Nováková y col., 2008).

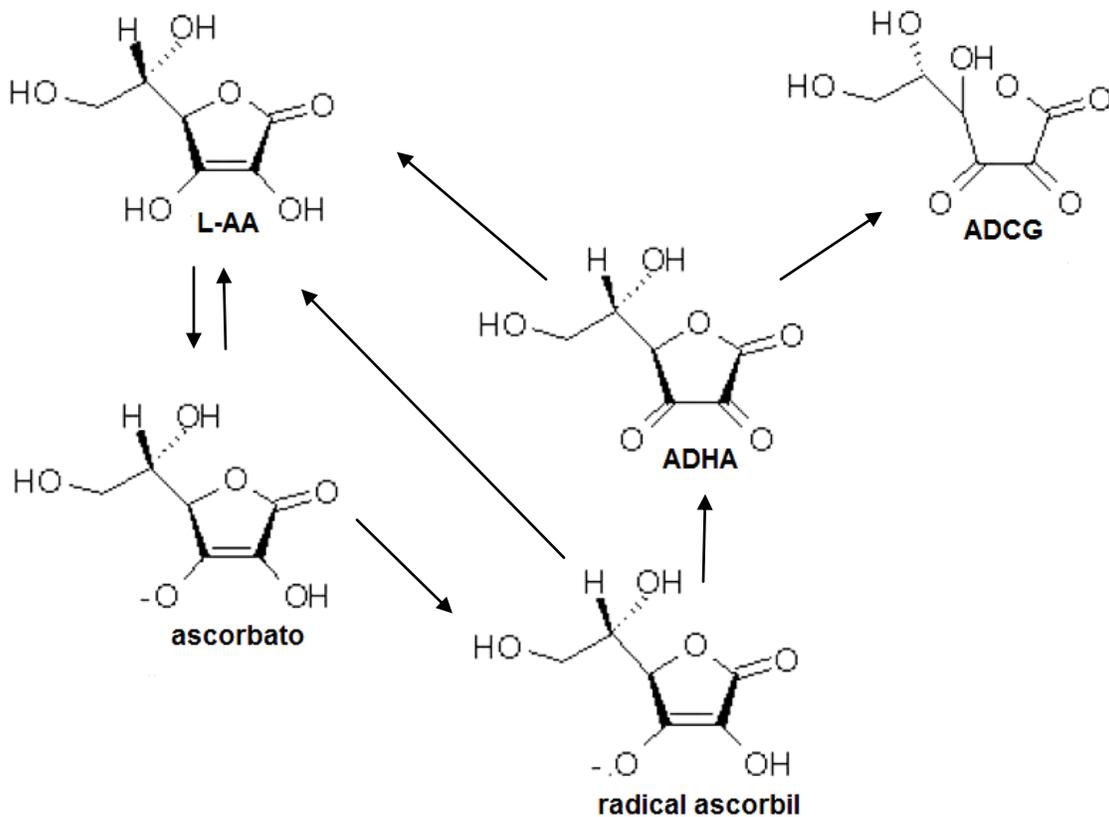


Figura 1.2. Estructura del ácido ascórbico (L-AA) y sus productos de degradación. ADHA: ácido dehidroascórbico, ADCG: ácido dicetogulónico.

En general las frutas tienden a ser la mejor fuente alimenticia de vitamina C (Davey y col., 2000, Odriozola-Serrano y col., 2007). Las frutas que más aportan son la grosella negra ( $200 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FF}$ ), las frutillas ( $60 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FF}$ ) y las frutas cítricas ( $30 - 50 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FF}$ ). Las manzanas, peras y ciruelas poseen solo una cantidad modesta ( $3 \text{ a } 5 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FF}$ ). Si bien no todas las frutas contienen niveles altos de vitamina C, la mayoría son consumidas crudas y el pH bajo de las mismas estabiliza la vitamina durante el almacenamiento (Davey y col., 2000).

La Vitamina C es un cofactor para la actividad de 8 enzimas que participan en las siguientes reacciones:

- a) Hidroxilación de prolina y lisina, aminoácidos constituyentes del colágeno. El escorbuto es una enfermedad resultante de una insuficiencia de vitamina C (Nováková y col., 2008); lo que produce una inadecuada formación del colágeno en las membranas basales capilares, que se refleja con fragilidad capilar y varias alteraciones hemorrágicas. Los síntomas incluyen fatiga leve, debilidad, irritabilidad, hemorragias gingivales, dolor muscular y articular.
- b) Hidroxilación de la dopamina a noradrenalina.
- c) Biosíntesis de carnitina.
- d) Oxidación de la fenilalanina y tirosina.

Por otro lado participa como donante de electrones o agente reductor en varias reacciones:

- a) Reducción del  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ , aumentando su biodisponibilidad.
- b) Reducción del ácido fólico a tetrahidrofólico.
- c) Reducción de radicales libres y efectos antioxidantes (tópicos que serán abordados en la sección correspondiente).

Los requerimientos diarios son:

Ingesta mínima para evitar síntomas de escorbuto:  $10 \text{ mg día}^{-1}$

Requerimiento promedio: Hombres:  $75 \text{ mg día}^{-1}$ ; Mujeres:  $60 \text{ mg día}^{-1}$

Recomendación Dietética: Hombres:  $90 \text{ mg día}^{-1}$ ; Mujeres:  $75 \text{ mg día}^{-1}$

Nivel superior de ingesta:  $2000 \text{ mg día}^{-1}$

En fumadores el requerimiento es más alto por aumento en el catabolismo de la vitamina ( $35 \text{ mg}$  extras por día).

Cabe señalar que con  $150$  a  $200 \text{ g}$  de frutillas se alcanzarían los valores diarios recomendados.

### 1.3.2.1.2 Otras vitaminas

Existen ocho compuestos naturales con actividad de vitamina E, los  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -tocoferoles y los correspondientes tocotrienoles. La forma predominante de los tejidos humanos es el  $\alpha$ -tocoferol, aunque éste no es sintetizado por los mamíferos (Sen y col., 2006). Esta vitamina protege a las membranas de las células contra la oxidación causada por los

radicales libres. Su actividad fisiológica primaria en los animales parece ser la de antioxidante (Huang y col., 2002).

En las frutillas el contenido de vitamina E es bajo ( $0,29 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FF}$ ) comparado con los aceites vegetales (aproximadamente  $60 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FF}$ ), las hortalizas de hojas verde como la espinaca ( $2,0 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FF}$ ) o la palta ( $2,1 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FF}$ ); aunque actualmente se considera que una ingesta entre 15 y 30 mg de  $\alpha$ -tocoferol diarios son suficientes para conseguir los niveles plasmáticos asociados a efectos antioxidantes (Bramley y col., 2000, Cano y col., 2005).

Las frutillas, en menor medida, son fuente de otras vitaminas como tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6, vitamina K, y vitamina A (Giampieri y col., 2012). En la Tabla 1.2 se muestran contenidos medios en estas vitaminas en frutillas frescas.

La vitamina B1 o tiamina, B2 o riboflavina, B3 o niacina y B6 o piridoxina, tienen un papel importante como coenzimas en numerosos procesos metabólicos en el ser humano. Participan en el metabolismo de los ácidos grasos, carbohidratos y proteínas. Son esenciales para la conversión de glucosa en energía. También intervienen en la estructura y función del sistema nervioso y de los músculos, incluido el músculo cardíaco (Lukaski, 2004).

El ácido fólico, también conocido como folato, es una vitamina muy lábil que se encuentra fundamentalmente en hortalizas de hojas verdes (espinaca:  $194 \text{ } \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FF}$ ). Además de proteger contra la anemia y de malformaciones fetales a la mujer embarazada, una ingesta adecuada de folato disminuye los niveles de homocisteína en la sangre, aminoácido que representa un factor de riesgo cardiovascular. La cantidad diaria recomendada es de  $1,6 \text{ mg día}^{-1}$  (Cano y col., 2005).

Si bien su contenido es menor en frutas, las frutillas son una fuente rica de folato, en el rango de 20 a  $25 \text{ } \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  de fruta fresca (Giampieri y col., 2012). Según Tulipani y col. 2008, las frutillas pueden ser una fuente importante de folato dietario, 250 g de frutillas (aproximadamente  $60 \text{ } \mu\text{g}$  de folato) pueden suplir 30% de la ingesta diaria recomendada por Europa y Estados Unidos.

### 1.3.2.2 Minerales

Los minerales son sustancias químicas que el organismo humano necesita para que tengan lugar determinados procesos metabólicos esenciales como la formación de huesos y

glóbulos rojos, el crecimiento, el desarrollo de los dientes y para regular determinadas reacciones químicas a nivel celular. En general las frutas y las hortalizas son ricas en potasio y magnesio y pobres en sodio. Otros minerales presentes en menor cantidad son calcio, hierro, cobre, cinc y selenio, que tienen un gran valor como cofactores enzimáticos (Cano y col., 2005).

En la Tabla 1.2 se presentan los principales minerales encontrados en frutillas. Las frutillas son ricas en manganeso, 150 gramos de frutillas frescas pueden proveer más del 20% de la ingesta diaria de este mineral (cantidad diaria recomendada: 1-10 mg día<sup>-1</sup>). La misma cantidad de frutillas pueden proveer el 5% de la ingesta adecuada de potasio (cantidad diaria recomendada: 2000 mg día<sup>-1</sup>) (Giampieri y col., 2012).

#### **1.4 Compuestos fitoquímicos**

Estudios epidemiológicos han descrito una asociación entre el consumo de dietas ricas en frutas y vegetales y un menor riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles derivadas del estrés oxidativo, tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades inflamatorias (Block y col., 1992, Steinmetz y Potter, 1996, Joshipura y col., 2001, Hannum, 2004). Esto es debido a que las frutas y las hortalizas presentan en su composición sustancias conocidas como compuestos fitoquímicos o bioactivos (carotenoides, compuestos fenólicos, vitaminas A, C y E) (Cano y col., 2005).

Los compuestos fitoquímicos se definen como *“sustancias químicas, constituyentes de alimentos de origen vegetal que proporcionan al alimento propiedades fisiológicas que van más allá de las nutricionales”*. La mayoría de estas sustancias fitoquímicas se caracterizan por su capacidad antioxidante. Un compuesto antioxidante se define como *“aquel que presente en baja concentración con respecto a un sustrato oxidable, retrasa o inhibe la oxidación de dicho sustrato, y por lo tanto previene de los efectos adversos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales en los seres humanos”* (Halliwell, 1997, Huang y col., 2005, Karadag y col., 2009).

A nivel fisiológico, las sustancias reactivas que actúan sobre los sustratos oxidables son los radicales libres. Un radical libre es cualquier molécula o átomo que tiene en su última capa uno o más electrones desapareados (número impar). Estos electrones desapareados confieren al radical una enorme reactividad química que lo conducirá a interactuar

rápidamente con otras moléculas con las que entra en contacto (Ramón, 1993). Esta interacción puede ser con otros radicales o bien con una especie química estable, resultando en la génesis de otro radical químicamente agresivo. Cuando los substratos oxidables son lípidos, proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN), los productos de esas interacciones son productos oxidados que terminan dañando membranas celulares, alterando conformaciones espaciales y funcionalidad de proteínas, y alterando estructuras de ADN, lo que puede llevar al desarrollo de enfermedades producto del estrés oxidativo (Cian, 2009; Karadag y col., 2009).

Los radicales libres pueden provenir de tres fuentes (Figura 1.3):

- a) Metabolismo celular (Actividad mitocondrial): en los procesos de respiración normales se producen radicales libres, como el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), el hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que si bien no es radical libre, es un producto fuertemente oxidante (Ramon, 1993).
- b) Reacciones inflamatorias: formación de radicales libres generadas en el metabolismo de las células inmunes (Dávalos y col., 2004).
- c) Agentes externos: radicales libres generados por acción de agentes oxidantes que pueden proceder del exterior, como la contaminación ambiental, la luz solar, las radiaciones ionizantes, y otros agentes (alcohol, tabaco, alimentos grasos, pesticidas, metales pesados, etc.) (Christen y col., 2000).

Los compuestos antioxidantes actúan como agentes reductores de los radicales libres, generando compuestos más estables (Ramón, 1993). Los antioxidantes pueden ser de origen endógeno y exógeno (dieta).

- a) Antioxidantes endógenos: se clasifican en enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, y glutatión oxidasa), y no enzimáticos (como la albúmina, ciertos ácidos grasos, nicotinamida, ceruloplasmina, ácido úrico, etc.) (Ramón, 1993).
- b) Antioxidantes exógenos: pueden ser artificiales (BHA, BHT,  $\eta$ -propil galato, etc) y naturales (compuestos fenólicos, tocoferoles, vitamina C y E, péptidos producidos a partir de proteínas dietarias, etc) (Cian, 2009, de Ancos y col., 2009).

Los diversos compuestos fitoquímicos que posee una fruta específica poseen diferentes capacidades antioxidantes y en conjunto colaboran con la capacidad antioxidante total de la misma (Giampieri y col., 2012).

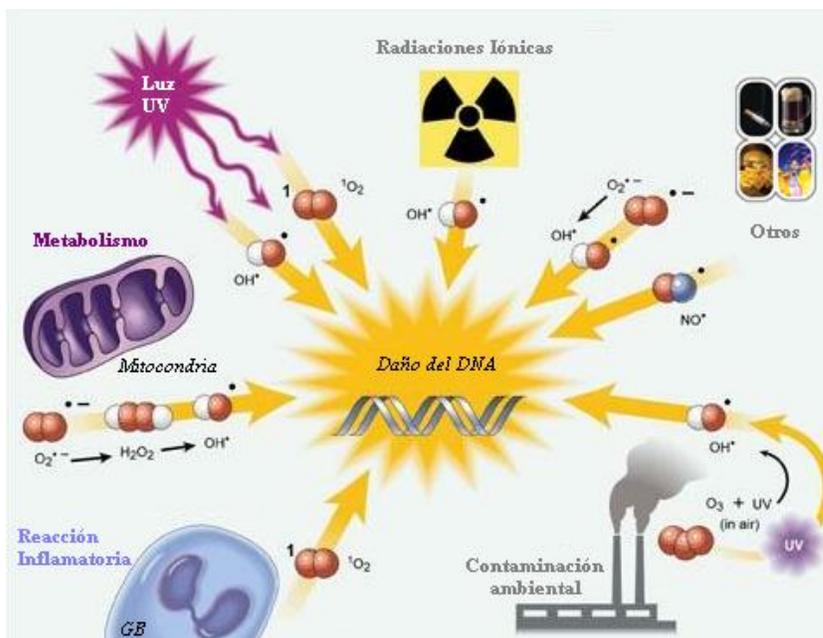


Figura 1.3. Principales fuentes de radicales libres. DNA: ácido desoxirribonucleico.  
Fuente: Cian, 2009.

En frutillas, la vitamina C es responsable entre el 15 y 30% de la capacidad antioxidante total, entre los compuestos fenólicos, las antocianinas colaboran entre el 25 y 40%, y el resto se ha adjudicado a los derivados del ácido elágico y los flavonoles (Tulipani y col., 2008, Giamperi y col., 2012).

#### 1.4.1. Efectos antioxidantes del ácido ascórbico

El ácido ascórbico es un donador de electrones (agente reductor o antioxidante) y probablemente toda su función bioquímica se concentre en esta función (Robles-Sánchez y col., 2009). El AA atrapa especies reactivas en los sistemas acuosos del cuerpo, protegiendo del daño oxidativo a las proteínas y al ADN. El AA puede reciclar la vitamina E, el principal antioxidante del organismo de origen lipofílico, y puede prevenir la iniciación de la peroxidación lipídica. El daño oxidativo a las proteínas y los lípidos está asociado con enfermedades crónicas degenerativas, incluidas cataratas, cáncer y enfermedades cardíacas, al respecto hay mucha evidencia epidemiológica del rol del AA en la disminución de las enfermedades crónicas degenerativas (Block y col., 1992; Gey, 1998, Davey y col., 2000).

El AA contribuye entre el 10 y 15% de la capacidad antioxidante total del plasma y hasta un 30% luego de una ingesta grande de vitamina C (Benzie y Strain, 1997). Algunas células, incluidas monocitos y células adrenales, tienen concentraciones de AA cien veces mayores que el plasma sanguíneo, y varios fluidos, tales como el humor acuoso, el fluido seminal y el jugo gástrico, tienen niveles de AA diez veces mayores que el plasma. Esto implica que estas áreas tienen un elevado requerimiento antioxidante (Davey y col., 2000).

#### **1.4.2 Efectos antioxidantes de la Vitamina E**

Como se mencionó anteriormente, la actividad fisiológica primaria de la vitamina E en los animales parece ser la de antioxidante (Huang y col., 2002). La función antioxidante lleva a una consecuente oxidación de la vitamina E formando el radical tocoferoxilo, el cual a su vez, puede ser reducido por acción de la vitamina C para generar nuevo tocoferol, como se mencionó anteriormente (Carr y col., 2000). De ahí la importancia de estas dos vitaminas en el organismo, por su efecto sinérgico y la regeneración del radical en tocoferol (Robles-Sánchez y col., 2009).

#### **1.4.3 Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos comprenden una amplia variedad de compuestos formados por uno o varios anillos aromáticos unidos a uno o más grupos hidroxilos. Pueden existir como moléculas simples o grandes macromoléculas (Hannum, 2004).

Generalmente, las frutas y las hortalizas son buena fuente de compuestos fenólicos y su contenido depende de varios factores, tales como diferencias genotípicas, condiciones climáticas en la cosecha y procedimientos de manejo postcosecha (Cano y col., 2005, da Silva Pinto y col., 2008)

Los compuestos fenólicos están divididos en varias clases, y las más importantes son: los flavonoides, los ácidos fenólicos, los taninos (hidrolizables y condensados), los estilbenos y los lignanos (D'Archivio y col., 2007, Ignat y col., 2011).

Los flavonoides y los ácidos fenólicos son los compuestos fenólicos más importantes encontrados en los vegetales (Rodrigo-García y col., 2009). De acuerdo a Scalbert y Williamson, 2000, existen cientos de diferentes compuestos fenólicos en los alimentos

vegetales, pero dos tercios de los más comúnmente consumidos son flavonoides y el tercio restante corresponde a ácidos fenólicos.

Los flavonoides pueden ser clasificados en antocianidinas, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanoles y flavonoles y los ácidos fenólicos se pueden dividir en derivados del ácido hidroxibenzoico e hidroxicinámico (Ignat y col., 2011). En la Figura 1.4 a y b se muestran algunos compuestos fenólicos típicos dentro de esta sub-clasificación.

Los flavonoides tienen importancia biológica en el crecimiento y en el desarrollo de las plantas, participan en la polinización del tubo germinativo y en la formación de pigmentos atractivos para los polinizadores, brindan protección y resistencia al ataque de insectos, patógenos y luz ultravioleta, y actúan como moléculas transductoras de señales (Du y col., 2009).

Los compuestos fenólicos son importantes determinantes de la calidad nutricional y sensorial de los alimentos vegetales (Tarola y col., 2012). En este sentido, participan en la apariencia visual de los alimentos, los pigmentos antocianos son responsables de los colores azul, púrpura, rojo y tonos intermedios de los alimentos derivados de vegetales, y en algunos productos hasta aparecen en tonos negruzcos (Tomás-Barberán y Espín, 2001).

Los compuestos fenólicos son importantes en el sabor de los alimentos, son responsables de los sabores amargo, dulce, pungente o astringente y pueden también contribuir en el aroma. Algunos compuestos fenólicos son extremadamente amargos como las flavanonas de algunos cítricos como los pomelos o las naranjas agrias. En el caso del lúpulo, sus compuestos fenólicos le brindan el sabor amargo característico a la cerveza (Tomás-Barberán y Espín, 2000). Algunos fenoles, especialmente aquellos que son volátiles, pueden contribuir al aroma de las comidas, algunos ejemplos incluyen vainillina, isoeugenol, eugenol, siringol, etc. (Crouzet y col., 1997). Los taninos son responsables de la astringencia de algunas frutas como las frutillas y frambuesas y de algunos productos derivados de vegetales como el vino (Tomás-Barberán y Espín, 2001).

Los compuestos fenólicos, como se mencionó anteriormente, presentan propiedades bioactivas que favorecen la salud humana que les confiere su poder antioxidante y su capacidad de atrapar radicales libres. Las características antioxidantes de los compuestos fenólicos se basan en su capacidad de donar hidrógenos y ceder electrones a los radicales libres, estabilizando el radical fenoxilo formado (Rice-Evans y col., 1996).

Existen estudios epidemiológicos que relacionan la ingesta de los alimentos ricos en compuestos fenólicos, y muy especialmente en flavonoides, con una baja incidencia de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cánceres. Los flavonoides han mostrado actividad antiinflamatoria, antialérgica, antiviral, hipocolesterolemica, y anticancerígena (Hannum y col., 2004, Cano y col., 2005, Rodrigo-García y col., 2009).

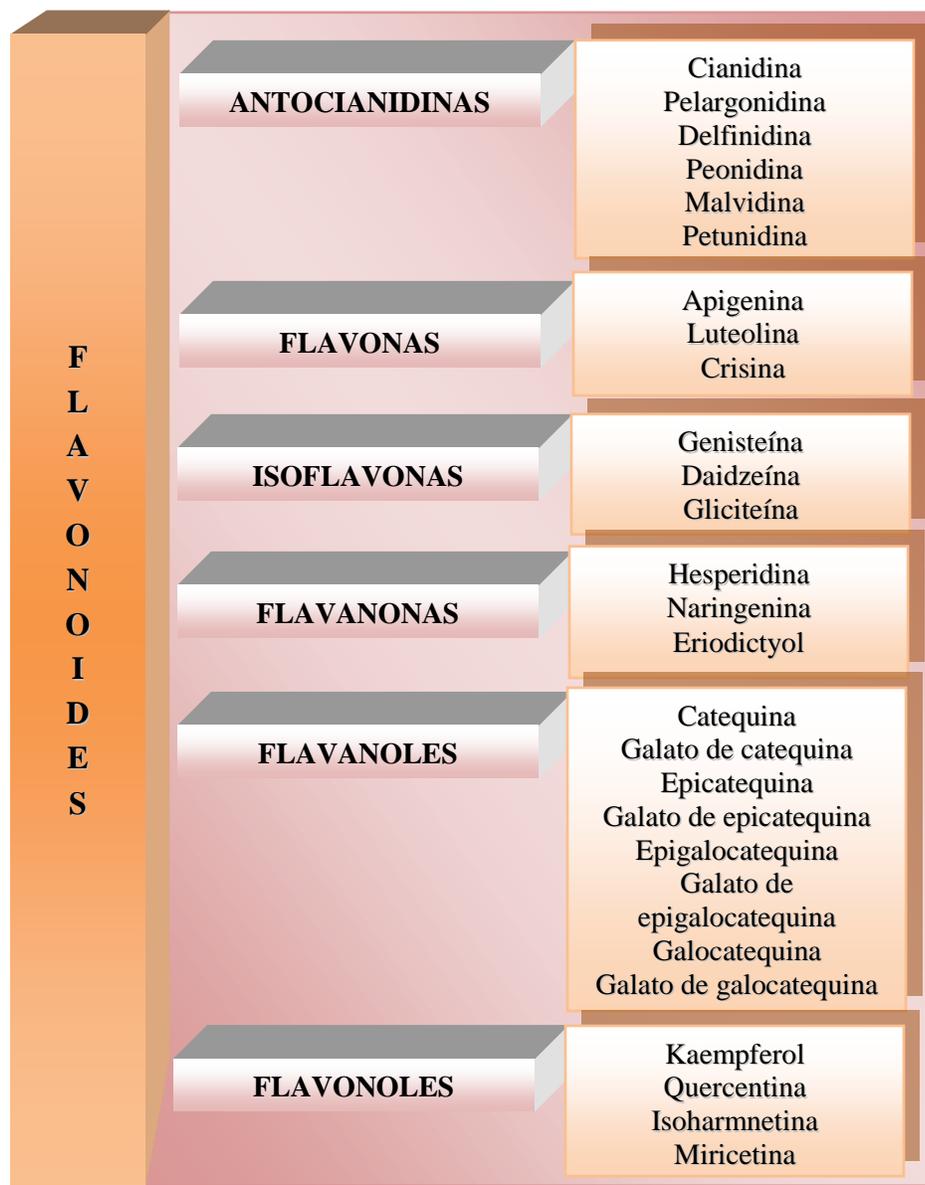


Figura 1.4 a. Clasificación de los compuestos fenólicos: flavonoides.

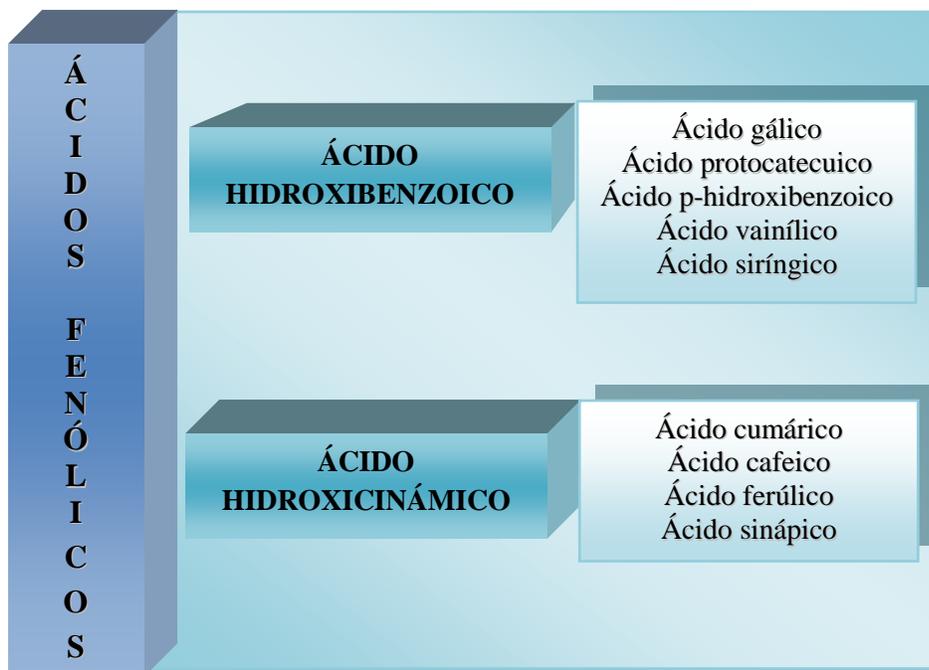


Figura 1.4 b. Clasificación de los compuestos fenólicos: ácidos fenólicos.

#### 1.4.3.1 Biosíntesis de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados en las plantas a partir del aminoácido fenilalanina, producido en la vía biosintética de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) conocida como “vía del ácido shikímico” (Dixon y Paiva, 1995, Herrmann, 1995). La fenilalanina amonioliasa (PAL) es la enzima clave en el la síntesis de los compuestos fenólicos, la cual conecta el metabolismo primario de la vía del ácido shikímico con el metabolismo secundario de la vía de los fenilpropanoides. La fenilalanina es inicialmente deaminada por intermedio de la PAL, la cual cataliza la deaminación no oxidativa de L-fenilalanina a la forma ácido *trans*-cinámico. Este ácido tiene forma C6-C3 (fenilpropanoide) del esqueleto de la fenilalanina, y de él derivan todos los compuestos fenólicos (Dixon y Paiva, 1995). Este ácido es hidroxilado a ácido 4-cumárico por la cinamato-4-hidroxilasa (C4H), el cual luego es activado a 4-cumaroil-coenzima A (CoA) por la acción de la 4-cumarato-CoA liasa (4CL).

En este punto, la vía de síntesis se bifurca hacia la biosíntesis de lignina y la biosíntesis de flavonoides. Tras varias reacciones sucesivas en estas vías biosintéticas, se producen los distintos ácidos fenólicos y flavonoides (Figura 1.5) (Tomas-Barberán y Espín, 2001).

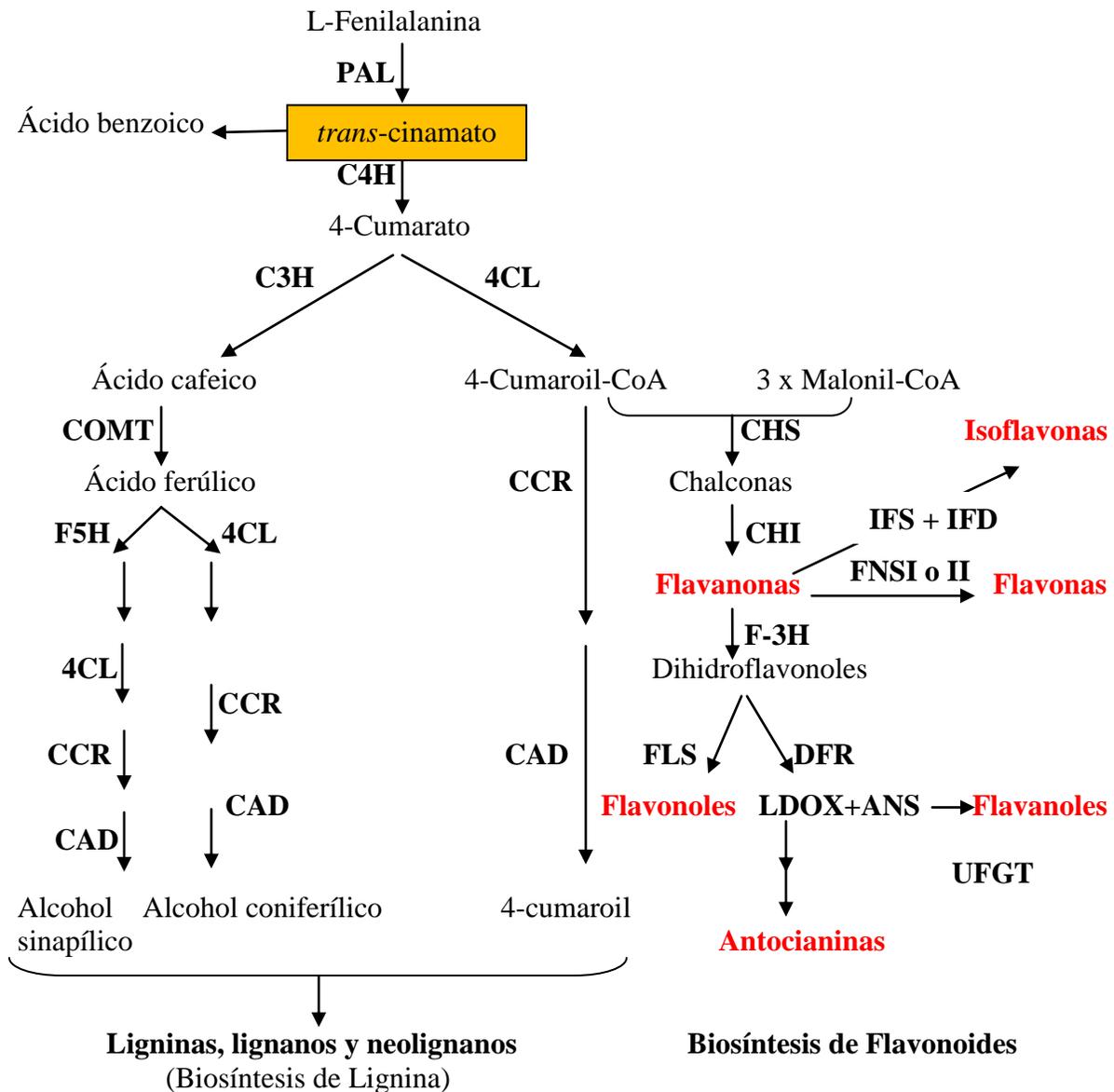


Figura 1.5. Biosíntesis de compuestos fenólicos. Fuente: Dixon y Paiva, 1995.

**PAL**, fenilalanina amonioliasa; **4CL**, 4-cumarato-CoA liasa, **C4H**, cinamato-4-hidroxilasa, **CHS**, chalcona sintasa, **CHI**, chalcona isomerasa; **F3H**, flavonona-3-hidroxilasa; **FLS**, flavonol sintasa; **DFR**, dihidroflavonol reductasa; **ANS**, antocianidin sintasa, **LDOX**, leucoantocianidin dioxigenasa; **C3H**, cumaroil-quinasa/shikimato-3-hidroxilasa; **COMT**, ácido cafeico:ácido 5-hidroxiferúlico O-metiltransferasa; **CCR**, cinamoil-CoA reductasa; **CAD**, cinamil alcohol deshidrogenasa; **F5H**, ferulato 5-hidroxilasa; **UFTG**, UDP-glucosa:flavonoide 3-O-glucosiltransferasa; **IFS**, isoflavona sintasa, **IFD**, isoflavona deshidratasa, **FNS**, flavona sintasa.

### 1.4.3.2 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos de bajo peso molecular formados por dos anillos aromáticos (A y B), como estructura genérica, unidos por tres carbonos, generalmente formando parte de un anillo oxigenado heterocíclico, o anillo C, en configuración C6-C3-C6 (Figura 1.6). Por las diferencias en la estructura general del anillo C se clasifican en antocianidinas, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanoles y flavonoles (Liu y Felice, 2007; Ignat y col., 2011).

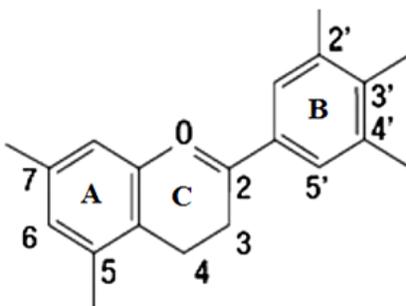


Figura 1.6. Estructura química general de los flavonoides. Fuente: Ignat y col., 2011.

#### 1.4.3.2.1 Antocianidinas

Las antocianidinas son las bases estructurales de las antocianinas (del griego *anthos*: flor y *kianos*: azul). Cuando las antocianidinas se encuentran esterificadas con azúcares reciben el nombre de antocianinas (Ignat y col., 2011). En la Figura 1.7 se muestra un esqueleto de antocianidina y los lugares de sustitución (R1 y R2) y de esterificación con residuos de azúcares. Las diferencias entre las distintas antocianinas están relacionadas con el número y la naturaleza de los grupos sustituyentes y azúcares unidos a la molécula. Seis antocianidinas son las más comunes en la naturaleza, pelargonidina (Pg), peonidina (Pn), cianidina (Ci), malvidina (Mv), petunidina (Pt) y delphinidina (Dp). Los glucósidos de las tres antocianidinas no metiladas (Ci, Dp y Pg) son los más ampliamente distribuidos en la naturaleza, estando presentes un 80% en las hojas pigmentadas, 69% en frutas y 50% en flores (Kong y col., 2003). Los azúcares comúnmente unidos a las antocianidinas son monosacáridos (glucosa, galactosa, ramnosa y arabinosa), y di o trisacáridos formados por la combinación de los cuatro monosacáridos (Bureau y col., 2009).

Algunas antocianinas tienen residuos de azúcares acetilados con ácidos aromáticos o alifáticos (Mazza y Miniati, 1993).

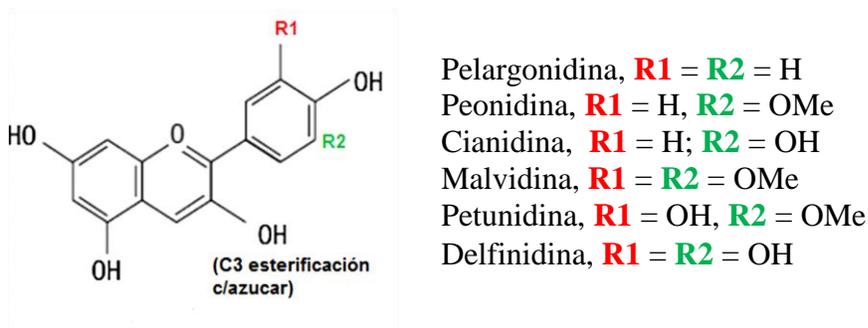


Figura 1.7. Estructura química de las antocianinas.

Las antocianinas se pueden encontrar en diferentes formas químicas de acuerdo al pH del medio en que se encuentran. A pH 1, predomina el cation flavylium (color rojo), el cual contribuye a los colores púrpuras y rojos. A pH entre 2 y 4, predominan las especies azules quinoidales; y a pH entre 5 y 6, predominan dos especies químicas incoloras (una pseudobase carbinol y una chalcona). A pH mayores a 7 las antocianinas son degradadas (Castañeda-Ovando y col., 2009). Además de brindar el color a las flores, plantas y frutas, las antocianinas, como el resto de los compuestos fenólicos, participan aportando capacidad antioxidante.

#### 1.4.3.2.2 Flavonas

Las flavonas se caracterizan por poseer un grupo cetónico en posición 4, y un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo heterocíclico (Rodrigo-García y col., 2009). Las flavonas más comunes en los alimentos son luteolina y apigenina, sus estructuras se muestran en la Figura 1.8. Los alimentos fuentes de estos compuestos fenólicos son las manzanas, arándanos, uvas y cítricos (Cano y col., 2005).

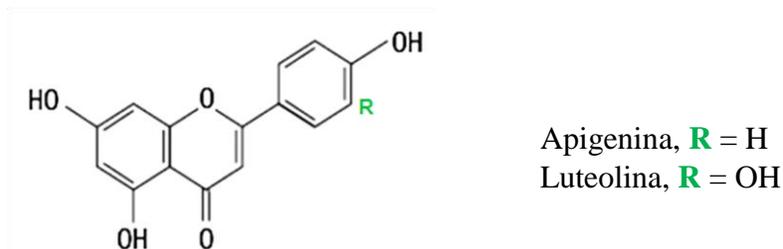


Figura 1.8. Estructura química de las flavonas.

### 1.4.3.2.3 Isoflavonas

Las isoflavonas tienen estructuras químicas parecidas a los estrógenos, con grupos hidroxilos en los C7 y C4, como en la molécula de estradiol. Se encuentran en muchos vegetales y alimentos derivados de ellos, siendo una alta fuente los productos derivados de la soja (Cano y col., 2005, Ignat y col., 2011). En la Figura 1.9 se muestran las estructuras químicas de las isoflavonas más comunes. Se ha sugerido que las isoflavonas pueden prevenir algunas enfermedades, como arteriosclerosis o cáncer. Algunos efectos fisiológicos son atribuidos a sus similitudes estructurales con los  $\beta$ -estradiolos (Ignat y col., 2011)

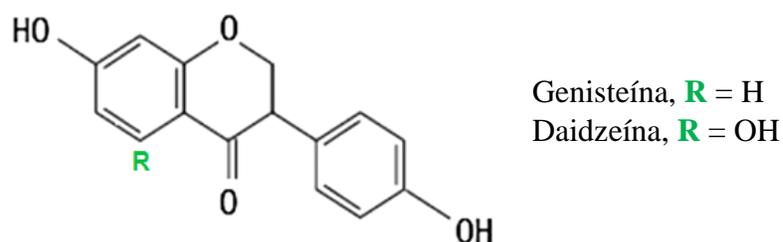


Figura 1.9. Estructura química de las isoflavonas.

### 1.4.3.2.4 Flavanonas

Las flavanonas se caracterizan por poseer en su estructura una cadena saturada de tres carbonos y un átomo de oxígeno en C4. Están generalmente glicosiladas por un disacárido en el C7. Las flavanonas están en altas concentraciones solo en las frutas cítricas, aunque se han reportado en tomates, y ciertas plantas aromáticas como la menta. Las principales flavanonas (Figura 1.10) son naringenina encontrada en pomelos, hesperedina en naranjas, y eriodictiol en limones (Ignat y col., 2011).

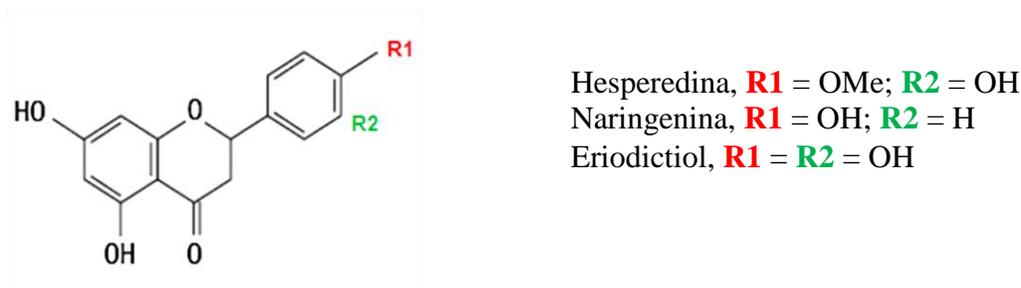


Figura 1.10. Estructura química de las flavanonas.

### 1.4.3.2.5 Flavanoles

Se trata de flavonoides estructuralmente similares a las antocianidinas, poseen un hidroxilo en C3, pero ningún doble enlace en el anillo heterocíclico. Se los puede encontrar formando parte de las proantocianidinas o taninos condensados (Rodrigo-García y col., 2009). En la Figura 1.11 se muestran las estructuras de los flavanoles más comunes. En las frutas, al contrario de otras clases de flavonoides, los flavanoles monoméricos se encuentran, por lo general, más en forma libre que en forma glicosilada o esterificada (Murkovic, 2003). Las principales fuentes son las manzanas, frutos rojos, uvas y naranjas (Cano y col., 2005).

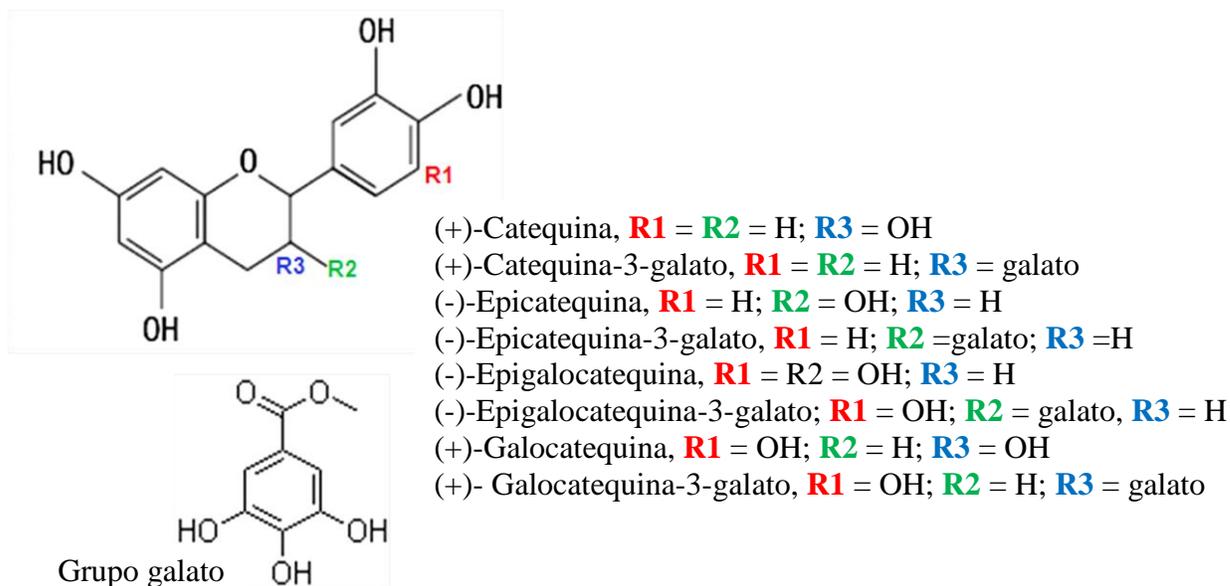


Figura 1.11. Estructura química de los flavanoles.

### 1.4.3.2.6 Flavonoles

Los flavonoles, al igual que las flavonas, se caracterizan por poseer un grupo cetónico en C4 y un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo heterocíclico. La diferencia entre las flavonas es que los flavonoles poseen un grupo hidroxilo en posición 3, lo cual parece tener importantes consecuencias en la biogénesis, y en los papeles fisiológicos y farmacológicos que desempeñan (Rodrigo-García, y col., 2009).

Los flavonoles son los flavonoides más distribuidos en las frutas y los vegetales, y la quercitina es uno de los más comunes, siendo las manzanas las que presentan mayores concentraciones (Murkovic, 2003, Caridi y col., 2007). En la Figura 1.12 se muestran las

estructuras de los principales flavonoles. Las fuentes de estos compuestos son las manzanas, los frutos rojos, uvas y ciruelas (Cano y col., 2005).

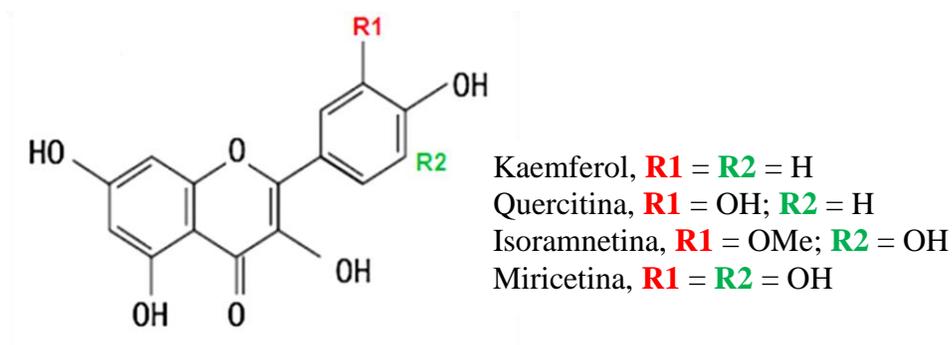


Figura 1.12. Estructura química de los flavonoles.

### 1.4.3.3 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos pueden estar en las plantas libres o conjugados con varios componentes de las mismas a través de enlaces éster, éter o acetal (Zadernowski y col., 2009). Los ácidos fenólicos se dividen en dos grupos: derivados del ácido hidroxibenzoico y derivados del ácido hidroxicinámico (Ignat y col., 2011).

#### 1.4.3.3.1 Ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxicinámico

Estos compuestos fenólicos tienen la forma general C6-C3 del esqueleto de la fenilalanina, la forma general de su estructura se muestra en la Figura 1.13. Dentro de los fenoles de las frutas, los ácidos hidroxicinámicos desempeñan un papel importante debido a su abundancia y diversidad. Existen cuatro estructuras derivadas del ácido cinámico: ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico (Figura 1.13). Las formas libres de éstos ácidos son muy raras, por lo que se encuentran normalmente formando derivados glicosilados o esterificados de los ácidos fenólicos quínico, shikímico y tartárico. El ácido cafeico y sus derivados esterificados, predominan en muchas frutas con más del 75% del total de los ácidos hidroxicinámicos encontrados en ciruelas, manzanas y arándanos (Rodrigo-García y col., 2009). Dentro de los derivados esterificados, el ácido clorogénico, que ha sido identificado en numerosas frutas, es el éster de los ácidos cafeico y quínico. Entre las frutas señaladas por su aporte en ácidos hidroxicinámicos se encuentran los arándanos (200 a 220 mg 100 g<sup>-1</sup> FF), cerezas (180 a 1150 mg 100 g<sup>-1</sup> FF), manzanas (5 a 60 mg 100 g<sup>-1</sup> FF) y peras (1,5 a 60 mg 100 g<sup>-1</sup> FF) (Manach y col., 2004).

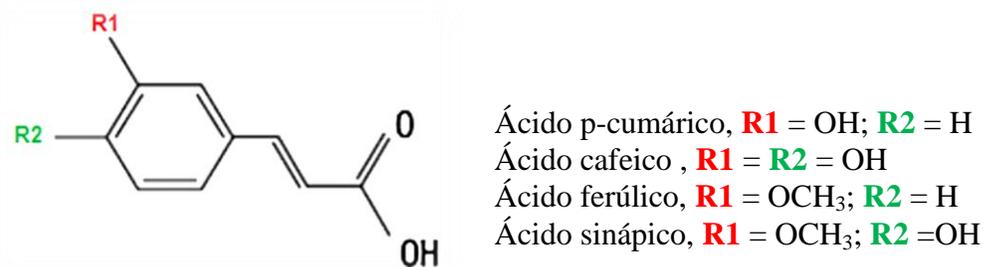


Figura 1.13. Estructura química de los ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxicinámico.

#### 1.4.3.3.2 Ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxibenzoico

Estos ácidos fenólicos no poseen estrictamente la forma fenilpropanoide (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) debido a que en su síntesis pierden la cadena de tres carbonos, pero como el resto de los compuestos fenólicos derivan del *trans*-cinamato y 4-cumarato (Figura 1.5). La Figura 1.14 muestra la estructura básica de estos compuestos. Las variaciones de la estructura están basadas en hidroxilación y metilación del anillo aromático. Los principales son ácido *p*-hidroxibenzoico, vainílico, sirínico y gálico. Estos compuestos pueden aparecer en forma libre en las frutas, pero normalmente se encuentran formando parte estructural de otros compuestos fenólicos como las ligninas y los taninos hidrolizables. Su contenido en frutas es por lo general bajo, salvo en frutos rojos como las zarzamoras (8 a 27 mg 100 g<sup>-1</sup> FF), grosellas (6 a 10 mg 100 g<sup>-1</sup> FF), grosellas negras (4 a 13 mg 100 g<sup>-1</sup> FF) y frutillas (2 a 9 mg 100g<sup>-1</sup> FF) (Manach y col., 2004).

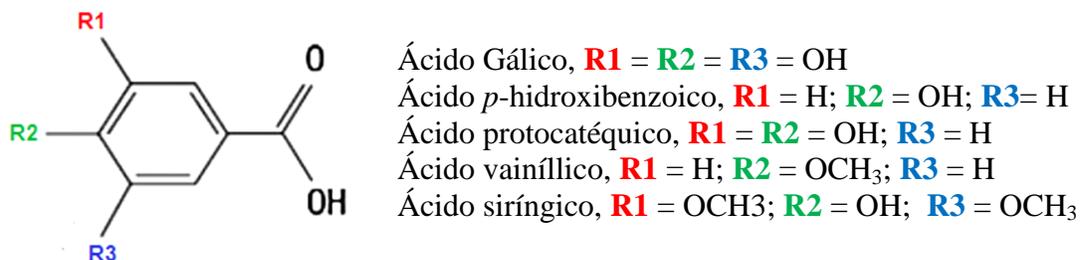


Figura 1.14. Estructura química de los ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxibenzoico.

#### 1.4.3.4 Taninos

Son compuestos de alto peso molecular que constituyen el tercer grupo en importancia de compuestos fenólicos. Los taninos pueden dividirse en taninos hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables son derivados del ácido gálico. En su formación, el ácido gálico es esterificado a un núcleo poliol, al cual se van uniendo grupos galoilos por esterificación o por entrecruzamientos cruzados oxidativos, dando lugar a la formación de taninos hidrolizables complejos (Hagerman, 2002).

Los elagitaninos y los galotaninos son taninos hidrolizables. Los elagitaninos al hidrolizarse liberan ácido elágico (Giampieri y col., 2012). El ácido elágico es una dilactona del ácido hexahidroxidifénico, que en definitiva es un producto de condensación dimérica del ácido gálico (Amakura y col., 2000). El ácido elágico puede existir en las matrices que lo contienen en forma libre (generalmente en concentraciones muy bajas), como glicósido o condensado en elagitaninos esterificados con glucosa (da Silva Pinto y col., 2008). En la Figura 1.15 se muestran estructuras de ellagitaninos y ácido elágico. Los elagitaninos solo han sido detectados en frutas de la familia Rosaceae (mora de los pantanos, frambuesas, rosa mosqueta y frutillas) en una concentración entre 21,7 a 83,2 mg 100 g<sup>-1</sup> FF (Koponen y col., 2007). Existe evidencia sobre los posibles efectos antimutagénicos y anticancerígenos del ácido elágico debido a su potencial antioxidante (Hannum, 2004).

Los taninos condensados o proantocianidinas son flavonoides poliméricos. Si bien la vía de síntesis de flavonoides está bien estudiada, los pasos de condensación y polimerización de los flavonoides no están bien elucidados. Los taninos condensados más ampliamente estudiados se basan en los flavanoles, (+)-catequina y (-)-epicatequina (Ignat y col., 2011). Los taninos condensados, al igual que los taninos hidrolizables, tienen diversos efectos en los sistemas biológicos, son potenciales quelantes de iones metálicos, agentes precipitantes de proteínas y poseen poder antioxidante (Hagerman, 2002).

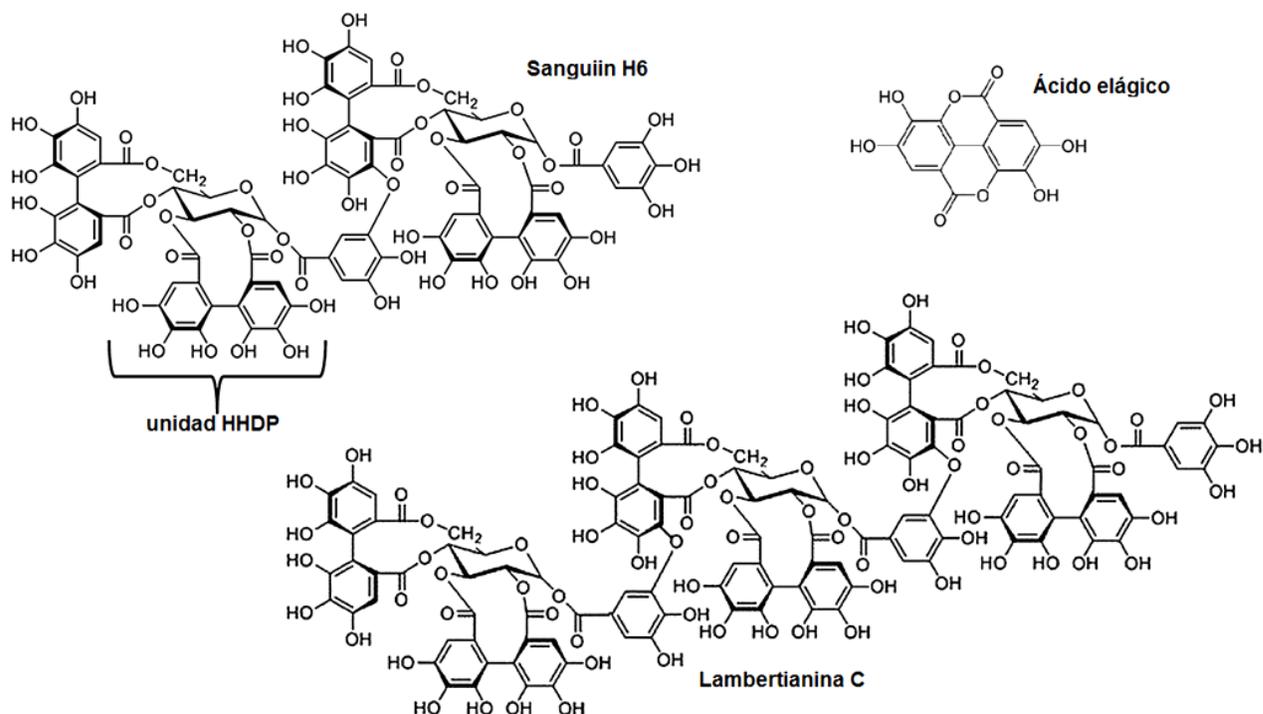


Figura 1.15. Estructura química de elagitaninos. HDDP, galoilbis-hexahidroxidifenol.  
Fuente: Giampieri y col., 2012.

#### 1.4.3.5 Estilbenos y lignanos

Los estilbenos se encuentran en baja concentración en la dieta humana, el más representativo es el resveratrol, que existe en las formas isoméricas *cis* y *trans*, preferentemente en forma glicosilada (Delmas y col., 2006). El resveratrol (Figura 1.16) es producido por las plantas en respuesta a infecciones por patógenos o a condiciones estresantes (Bavaresco, 2003). El resveratrol ha sido detectado en más de 70 especies, incluyendo uvas, frutos rojos y maníes (Ignat y col., 2011).

Los lignanos son producidos por dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano; existen en la naturaleza preferentemente en forma libre que glicosilados (Ignat y col., 2011). El interés en los lignanos y sus derivados sintéticos está creciendo debido a sus potenciales aplicaciones en quimioterapia contra el cáncer y algunos otros efectos farmacéuticos (Saleem y col., 2005).

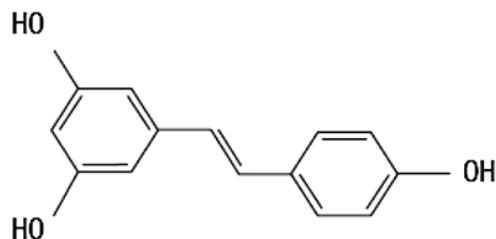


Figura 1.16. Estructura química del resveratrol.

#### 1.4.4 Compuestos fenólicos en frutillas

Los frutos rojos, en las cuales se hallan incluidas las frutillas, son una fuente muy rica en compuestos fenólicos. Las antocianinas son los compuestos fenólicos más importantes de las frutillas, responsables del color de las frutas, con concentraciones aproximadas de 65 mg 100 g<sup>-1</sup> FF. Las antocianinas más comúnmente encontradas en las frutillas están basadas en pelargonidina y cianidina, siendo pelargonidin-3-glucosido la principal antocianina encontrada (Lopes da Silva y col., 2002 y 2007). Entre las variedades de frutillas, *Camarosa* es uno de los cultivares con concentraciones de antocianinas más altas (Lopes da Silva y col., 2007).

Los flavonoles representan aproximadamente el 11% de los compuestos fenólicos de las frutillas, encontrándose quercitina, kaempferol y rutina como los más predominantes (Häkkinen y Törrönen, 2000). Otros flavonoides comúnmente encontrados en las frutillas son catequina y epicatequina (flavanoles). Existe actualmente un interés creciente en la determinación en frutos rojos de ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxibenzoico e hidroxicinámico, entre los más abundantes están el ácido elágico, seguido de los ácidos gálico, cumárico y ferúlico (Häkkinen y Törrönen, 2000, Tomas-Barberán y col., 2000). El ácido elágico se encuentra en altas concentraciones en frutillas como glicósidos y formando ellagitaninos, y en pequeña proporción en forma libre, siendo su concentración alrededor de tres veces más alta que en otras frutas y frutos secos. Algunos estudios han reportado contenidos de elagitaninos en frutillas frescas en concentraciones de 25 a 59 mg 100 g<sup>-1</sup> FF, siendo sanguin H-6 (Figura 1.14) el elagitanino más representativo de las mismas (Clifford y Scalbert, 2000, Williner y col., 2003, da Silva Pinto y col., 2008).

En cuanto a los taninos condensados o proantocianidinas, Kajdžanoska y col., (2011), reportaron la presencia de oligómeros (dímeros, trímeros y tetrameros) de proantocianidinas en muestras de frutillas.

### 1.5 Vegetales mínimamente procesados

Como se mencionó anteriormente, el consumo de frutas y hortalizas en la dieta diaria tiene efectos beneficiosos para la salud. Sin embargo, este consumo es todavía muy bajo con respecto a las recomendaciones hechas por los profesionales de la salud. En Argentina se consume la mitad de los 400 g por día recomendados por la FAO-OMS (FAO-OMS, 2003; Anónimo, 2012).

La introducción en el mercado de los vegetales mínimamente procesados (VMP), también denominadas Frescos Cortados o de IV Gama, es una forma de incrementar el consumo de frutas y hortalizas dentro de la población, debido a su atractiva presentación, apariencia, sabor, y comodidad para ser consumido (Martín-Belloso y Rojas-Graü, 2005). Gran parte del trabajo desarrollado en el área de los VMP se ha llevado a cabo en Europa Occidental, Japón y E.E.U.U. como respuesta a una fuerte demanda por parte del consumidor, tanto individual como institucional, de alimentos de conveniencia pero de alta calidad y semejantes a los productos frescos (Wiley, 1997, Soliva-Fortuny y Martín-Belloso, 2003).

Los VMP son alimentos naturales preparados mediante una única o varias operaciones unitarias sobre el vegetal entero, tales como pelado, cortado, lavado, exprimido, etc., envasados, y conservados a bajas temperaturas (Pirovani y col. 2006). La Asociación Internacional de Productos Frescos Cortados (IFPA) los define como “cualquier fruta u hortaliza o combinación de estos que han sido físicamente alterados de su forma original, pero permanecen en estado fresco” (IFPA y MPA, 1999). Estos productos proporcionan al consumidor un producto frutícola y hortícola muy parecido al fresco con una vida útil prolongada y, al mismo tiempo garantizan la seguridad de los mismos, manteniendo una sólida calidad nutritiva y sensorial (Wiley, 1997).

Los tejidos de los VMP no exhiben las mismas respuestas fisiológicas que los tejidos vivos intactos de los productos vegetales sin tratar. Las operaciones de preparación, además de cambios físicos, estimulan el desarrollo de determinadas reacciones químicas (Reyes, 2007).

La creciente demanda de los productos frescos cortados con la consiguiente garantía de inocuidad y de buena calidad sensorial, nutricional, y de potencial bioactivo, ha llevado a los investigadores a redoblar esfuerzos en el estudio de nuevas tecnologías, que permitan extender la vida útil de los vegetales mínimamente procesados. La industria de los VMP, y

particularmente de las frutas frescas cortadas, se encuentra poco desarrollada en Argentina, razón que hace necesario investigar en lo referente a diferentes formas de procesamiento y conservación; como así también, encontrar variedades específicas de fruta para obtener productos de calidad.

### **1.5.1 Factores que afectan la calidad de las frutas frescas cortadas**

La variedad de la fruta, el estado de madurez al momento de la recolección, la manipulación postcosecha y el mínimo procesamiento de la materia prima, son algunos de los factores iniciales que intervienen directamente en la calidad final de los productos frescos cortados.

#### **1.5.1.1 Variedad**

Un cultivar o variedad se distingue por una característica significativa de tipo morfológico, fisiológico, citológico, químico u otro, a efectos de la horticultura, además de retener sus características distintivas cuando se reproduce (Wiley, 1997).

Cada cultivar confiere distintos atributos de calidad al alimento, tales como color, sabor, olor, textura, valor nutritivo y potencial bioactivo. De allí que resulte especialmente importante una adecuada selección de la variedad que se va a procesar en los VMP, con el fin de obtener productos aceptables para los consumidores (Martín-Belloso y Rojas-Graü, 2005).

En el caso de frutillas, algunos trabajos han estudiado atributos de calidad como firmeza, contenido de sólidos solubles, pH, acidez total, contenido de ácido ascórbico, etc., sobre distintas variedades (Castro y col., 2002, Cordenunsi y col., 2002, da Silva Pinto y col., 2008). Específicamente da Silva Pinto y col., 2008, estudiaron el contenido de vitamina C, flavonoides, fenoles totales y contenido de ácido elágico libre y total en siete variedades brasileras (*Dover*, *Camp Dover*, *Camarosa*, *Sweet Charlie*, *Toyonoka*, *Oso Grande* y *Piedade*). Los resultados indicaron que hubo considerables diferencias en los contenidos de compuestos bioactivos entre los cultivares. *Camp Dover* mostró el contenido de antocianinas y fenoles totales más bajo pero el contenido de flavanoles más alto entre los cultivares. *Dover* presentó el contenido de antocianinas más alto, habiendo sido elevados también su contenido de fenoles totales, ácido elágico y capacidad antioxidante. Los

autores concluyen en la selección de este cultivar en relación a los efectos beneficiosos para la salud. Pincemail y col., (2012), estudiaron las diferencias en el potencial bioactivo (contenido de fenoles totales, ácido ascórbico y capacidad antioxidante) de doce variedades de frutillas comerciales cultivadas en Bélgica. Los autores marcaron la importancia de la carga genética de cada cultivar en su contenido de fenoles y en su capacidad antioxidante. El uso de variedades específicas diseñadas para productos frescos cortados, con alguna característica beneficiosa adicional (por ejemplo un mayor potencial bioactivo), sería muy valioso. Sin embargo, en países como Argentina, donde la industria del procesado de frutas y hortalizas no está bien desarrollada, es poco frecuente encontrar en el mercado variedades diseñadas específicamente para tal fin, sino que generalmente se usan las ya existentes para mercado en fresco (Reyes, 2007).

#### **1.5.1.2 Grado de madurez**

Un adecuado grado de madurez es uno de los factores más importantes a tener en cuenta en el momento de la recolección de los vegetales destinados a la industria de los frescos cortados, ya que tiene una gran influencia sobre la calidad del producto final.

La maduración se considera un complejo fenómeno de diferenciación bioquímica controlado esencialmente por cuatro mecanismos reguladores: a) un aumento de la síntesis de enzimas y ácidos nucleicos; b) la regulación de sistemas enzimáticos; c) cambios de permeabilidad de membranas y en la ultraestructura celular, y d) una modificación de los mecanismos hormonales (Romojaro y col., 1996). El etileno parece ser una de las hormonas responsable de la síntesis de enzimas involucradas en cambios físicos, químicos y metabólicos en los tejidos vegetales que tienen una importante influencia en las características sensoriales relacionadas con el sabor y la firmeza del fruto.

Es aconsejable que se realice la recolección antes que se alcance la plena madurez organoléptica, ya que así la textura es más firme y se minimizan los daños mecánicos durante la manipulación. No debe olvidarse que una recolección demasiado anticipada al punto óptimo de la cosecha, pone en juego características tan importantes en estos productos como sabor, olor y color (Martín-Belloso y Rojas-Graü, 2005).

Por lo tanto, para frutillas destinadas a “fresca cortada”, se debe elegir un grado de madurez (<75% superficie de color rojo) tal que permita una aceptable vida útil, pero priorizando el que haya alcanzado óptimas características sensoriales (sabor y aroma) (Reyes, 2007).

### **1.5.1.3 Prácticas de cosecha**

Los productos vegetales que serán destinados a procesamiento deberán ser recolectados sanos para evitar los daños mecánicos durante la manipulación y el procesado, además limitar el posterior crecimiento microbiano (Martín-Belloso y Rojas-Graü, 2005). Los productos vegetales enteros deben llegar a las fábricas con la carga microbiana mínima, ya que ésta determina la contaminación final en el producto procesado, por lo que debe prestarse especial atención a los aspectos de contaminación microbiana durante el cultivo, recolección y transporte a la industria (Allende y col., 2003). La recolección a la temperatura lo más baja posible (durante la noche o a primeras horas de la mañana) es más ventajosa para mantener la calidad de la fruta durante la manipulación o el almacenamiento. La estación del año en la que se recolectan los productos vegetales también juega un rol importante, ya que la modificación de las condiciones climáticas (temperatura, humedad relativa, etc.) afecta directamente a los frutos. En este sentido, Pincemail y col., 2012 indicaron la importancia de la época de la cosecha de un cultivar de frutilla con el mismo grado de madurez, en el contenido de compuestos bioactivos y su capacidad antioxidante. Asimismo, Williner y col. (2003) reportaron que el contenido de ácido elágico resultó más alto en las frutillas verdes, intermedio en frutas semi-maduras y más bajo en las frutillas maduras.

### 1.5.2 Procesamiento de VMP

El procesado mínimo comprende distintas operaciones unitarias que pueden resumirse en las siguientes: selección, clasificación, acondicionamiento, lavado, pelado, cortado y desinfectado (Figura 1.17).

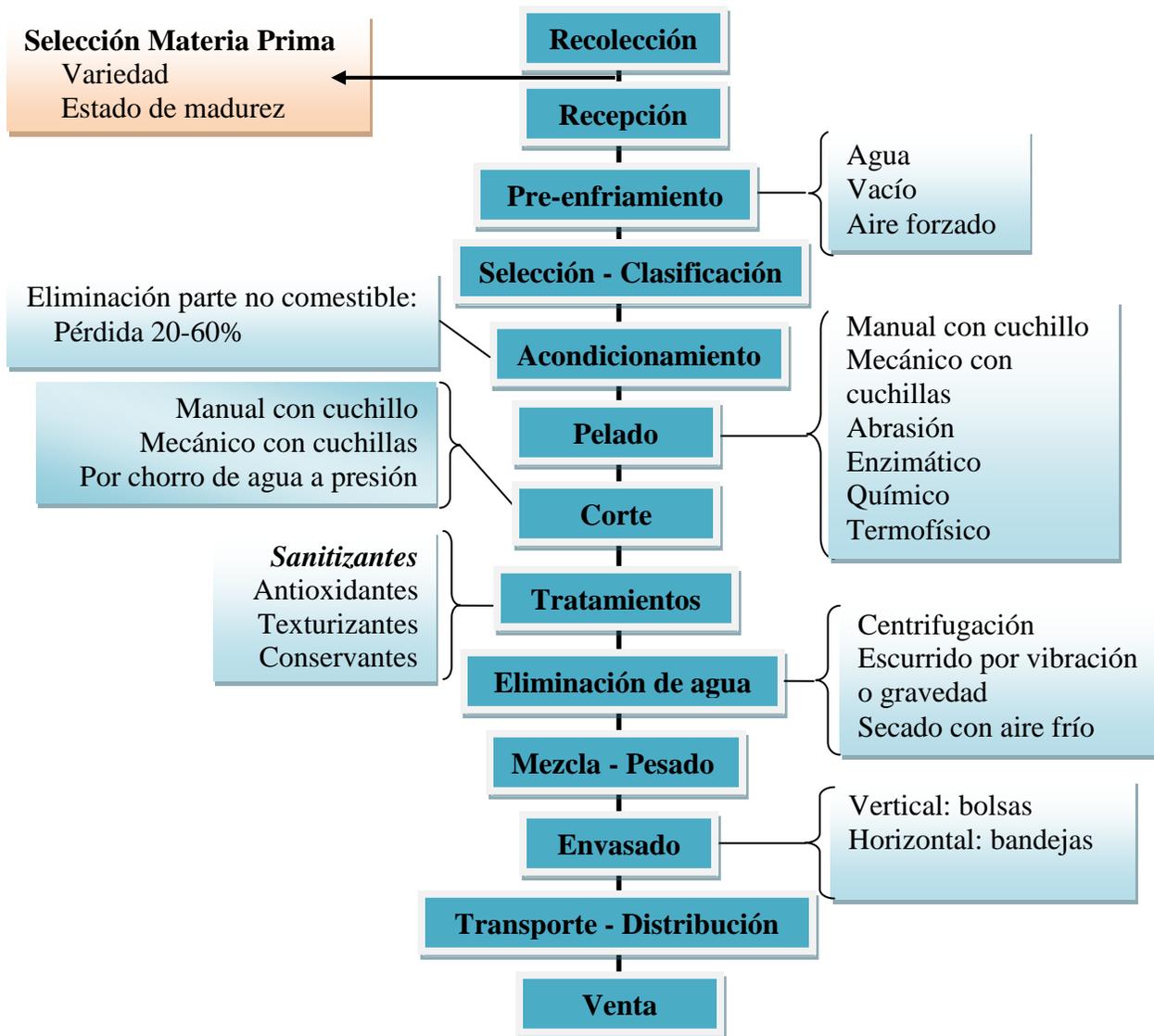


Figura 1.17. Diagrama de flujo del procesamiento de productos vegetales cortados.

Como se mencionó anteriormente, la calidad de los productos vegetales cortados depende considerablemente de la calidad del producto entero que se procesa. En consecuencia, su recolección debe llevarse a cabo en condiciones de higiene óptimas, minimizando al máximo los daños mecánicos y cuidando que estén sanos y sin defectos. Asimismo, el

transporte a la industria ha de realizarse en el menor tiempo posible, evitando movimientos bruscos y golpes, y en condiciones higiénicas que impidan contaminaciones microbiológicas (González y Lobo, 2005).

### **1.5.2.1 Primeras etapas de procesamiento de VMP**

Una vez que el producto llega a la planta de procesado, en el grado de madurez adecuado, la primera operación que generalmente se realiza es el *pre-enfriamiento*, que ha de efectuarse con la mayor rapidez. Esta operación se hace con el fin de reducir la temperatura de campo hasta 1-2°C, retrasando los procesos metabólicos, reduciendo el desarrollo de daños y retrasando la senescencia.

Las operaciones de *selección* y *clasificación* tienen por objeto asegurar la homogeneidad y calidad de la materia prima. Se descartan aquellos productos que presentan defectos físicos o hayan sufrido daño mecánico durante la recolección o transporte.

En el  *acondicionamiento* se procede a eliminar la parte del producto que no es comestible (hojas, pedúnculos, etc.). Normalmente se realiza a mano, con cuchillos muy afilados que deben higienizarse periódicamente por inmersión en un desinfectante. Es parte de esta operación un lavado por inmersión en agua, en el que el producto queda libre de restos de tallos, hojas o tierra que pudieran encontrarse adheridos a la superficie.

El *pelado*, en la mayoría de las industrias, se lleva a cabo mecánicamente, con cuchillas o abrasión. Otros métodos de pelado pueden ser el termofísico a alta presión, agua caliente o infrarrojos, químico o cáustico o enzimático. Sin embargo, el método ideal es el pelado manual con cuchillos afilados, ya que es el que menos daños causa al producto. La elección de uno u otro método de pelado, depende del tipo y variedad de los productos a procesar (González y Lobo, 2005).

En la etapa de *cortado* se procede a la reducción del tamaño o troceado de los productos frutihortícolas. Se deben obtener trozos más pequeños que sean uniformes en forma y tamaño. Este proceso puede ser esencial para mejorar la digestibilidad y conveniencia de consumo. Existen diferentes formatos: rodajas, cubos, tiras, esferas, y mitades o cuartos para frutas pequeñas, como en el caso de las frutillas (Reyes, 2007). Los procesos de troceado aceleran la respiración, producen daño mecánico y ablandamiento vegetal, por lo

que resulta conveniente seleccionar adecuadamente el tipo de corte y el instrumento para llevarlo a cabo.

### 1.5.2.2 Tratamientos sanitizantes

De los tratamientos aplicados a los VMP (Figura 1.17), abordaremos los tratamientos higienizantes, la etapa de *lavado-desinfección* será objeto de estudio de esta tesis.

Esta etapa es una de las más críticas del proceso de producción de vegetales frescos cortados, es la única etapa del proceso capaz de reducir la carga microbiana del producto, afectando la calidad, seguridad y vida útil de los mismos (González y Lobo, 2005, Piagentini, y col. 2005, Gil y col., 2009).

El lavado estaría indicado para remover fluidos celulares producidos por las operaciones de pelado y corte, como así también para remover otras suciedades, residuos de pesticidas y microorganismos responsables de la pérdida de calidad del producto como posibles microorganismos patógenos que podrían suponer un riesgo en la salud de los consumidores (Brackett, 1994, Gil).

Un simple lavado con agua prolonga la vida útil de la mayoría de las hortalizas frescas cortadas al remover mecánicamente parte de los microorganismos presentes en su superficie (Buck, y col., 2003).

El uso de sanitizantes químicos tiene por objetivo eliminar o al menos reducir significativamente la presencia de células vegetativas de organismos de importancia para la salud pública, así como otros microorganismos alterantes naturalmente presentes en la superficie de los VMP y garantizar la calidad del agua de lavado para evitar la contaminación cruzada. Entre los organismos patógenos aislados de frutas y hortalizas asociadas a brotes de enfermedades se encuentran *Escherichia coli* O157:H7, varias especies de *Salmonella* y *Shigella*, *Cyclospora cayetanensis*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, y algunos virus como el de la hepatitis A y los norovirus (González y col., 2005).

Un producto lavado con agua sin sanitizante requerirá mayor cantidad de agua para alcanzar los mismos niveles de descontaminación que uno lavado con una solución sanitizante (Gil y col., 2009). De acuerdo a Ölmez y Kretzschmar, 2009, el desafío ecológico de las industrias alimenticias es la reducción del consumo y desperdicio de agua

potable, siendo una alternativa para lograrlo la introducción de un sanitizante en el agua de lavado.

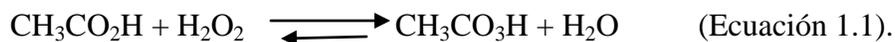
Los sanitizantes químicos aprobados por la FDA para el agua de lavado de vegetales mínimamente procesados son: hipoclorito de sodio, calcio o cloro gaseoso, dióxido de cloro, ácido peracético, peróxido de hidrógeno y ozono (IFPA, 2003). En la Tabla 1.3 se resumen sus propiedades, desventajas y límites de concentraciones permitidos.

El cloro y sus derivados son los desinfectantes más ampliamente usados en la industria de los vegetales frescos cortados (Ölmez y Kretzschmar, 2009). El hipoclorito de sodio es un desinfectante con poderosas propiedades oxidantes, siendo el sanitizante más comúnmente usado en la industria alimenticia tanto en la desinfección de productos como de equipamientos usados en el área de procesamiento (Nieuwenhuijsen y col., 2000, Artés y col., 2009). Actualmente, existe una tendencia de eliminar al cloro de los procesos de desinfección, debido a que la reacción del cloro con la materia orgánica no solo le resta poder desinfectante, sino que produce la formación de compuestos halogenados cancerígenos como son los trihalometanos y ácidos haloacéticos (Ölmez y Kretzschmar, 2009).

Existen tratamientos de origen físico que pueden usarse para reducir la carga microbiana e inactivar enzimas responsables del deterioro de los VMP. Entre algunos ejemplos podemos citar: los tratamientos térmicos suaves (Orsat y col., 2001), las radiaciones ionizantes gamma (Gunes y col., 2001) y las radiaciones no ionizantes, como el tratamiento con radiofrecuencia (Orsat y col., 2001), o con luz UV-C (Allende y col., 2003).

A continuación se describirán más detalladamente las características y propiedades del ácido peracético, sanitizante que será usado en la presente tesis.

El ácido peracético (APA) es un agente oxidante fuerte que se consigue comercialmente como una mezcla líquida concentrada equilibrada de ácido acético, peróxido de hidrógeno, APA y agua (Ecuación 1.1) (Kitis, 2004, Reyes, 2007).



El APA se produce en la reacción de ácido acético o anhídrido acético con peróxido de hidrógeno en presencia de ácido sulfúrico, que actúa como catalizador (Kitis, 2004, Vandekinderen y col., 2009).

El APA es usado principalmente como desinfectante en plantas de efluentes industriales, en la industria médica y farmacéutica y en las industrias procesadoras de alimentos y bebidas (Kitis, 2004). Su uso en la industria de los vegetales frescos cortados está siendo promocionado debido a que, a diferencia de los sanitizantes clorados, no reacciona con la materia orgánica y por lo tanto no causa la formación de compuestos halogenados cancerígenos. Sus productos de descomposición son ácido acético y oxígeno, por lo que se lo considera ecológicamente seguro (Hilgren y col., 2007, Vandekinderen y col., 2009). El APA puede usarse en un amplio espectro de pH (3,0 – 7,5) y el proceso de desinfección puede llevarse a cabo bajo condiciones frías o a temperatura ambiente, siendo activo aun a temperaturas bajas como 0°C (Kunigk y Almeida, 2001).

Las soluciones de APA contienen peróxido de hidrógeno, el cual también posee propiedades antimicrobianas, lo cual brinda mayor poder desinfectante a la solución (Suttley, 2008).

El Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos (CFR) permite el uso de APA en el agua de lavado de frutas y vegetales hasta en una concentración de 80 mg L<sup>-1</sup> (CFR, 2007). Sin embargo, algunos estudios indicaron que esta concentración de APA en el agua de lavado, no fue suficiente para obtener una reducción sustancial en la carga microbiológica inicial de VMP (Nascimento y col., 2003, Hellstrom y col., 2006). La eficiencia del APA contra los microorganismos es: bacterias > virus > bacterias esporuladas > protozoos (Kitis, 2004, Oh y col., 2005). También se ha reportado la efectividad del APA en el control de hongos que causan putrefacción de frutas y hortalizas (Kyanko y col. 2010).

Luego del lavado de VMP con APA no es necesario un enjuague, aunque podría realizarse un simple procedimiento de enjuagado con agua fría (IFPA, 2003, Suttley, 2008).

Las desventajas del APA son su inestabilidad a las concentraciones usadas comúnmente, por lo que se vende en concentraciones del 5 y 15%, y sus costos mayores comparados con otros sanitizantes usados tradicionalmente como el hipoclorito de sodio (Kunigk y Almeida, 2001, Suttley, 2008).

Tabla 1.3. Desinfectantes para el agua de lavado de productos frescos cortados. Fuente: adaptada de IFPA, 2003.

Sustancia	Ventajas	Desventajas	Limitaciones/ concentración máxima	¿Necesita enjuague final?
<b>Hipoclorito de sodio/ calcio o cloro (gas)</b>	Actúan rápidamente. Eliminan eficazmente bacterias, levaduras, esporas fúngicas, hongos y muchos virus.	Se disipan rápidamente cuando se expone al aire o a elevada temperatura (82,2°C). Reaccionan con la materia orgánica del agua. Pueden ocasionar trastornos respiratorios a los trabajadores. Sensibles al pH (rango óptimo 6,5-7)	No se excederá de 200 mg L <sup>-1</sup> en el agua de lavado	Sí.
<b>Peróxido de hidrógeno</b>	Tan eficaz como el cloro en la reducción de las cargas microbianas en la superficie de los productos vegetales.	No es eficaz para la reducción de la carga bacteriana en algunos vegetales frescos cortados. Se produce gran cantidad de espuma.	Empleo limitado en frutas y hortalizas que no se consumen crudas.	No, cuando se emplea según las limitaciones indicadas.
<b>Ácido peracético</b>	Efectivo contra coliformes reductores y otros microorganismos que causan deterioro.	Costos 50-100% más elevados que los compuestos clorados. Corrosivo frente a metales (hierro, cobre, cromo)	No se excederá 80 mg L <sup>-1</sup> en el agua de lavado	No, cuando se emplea según las limitaciones indicadas.
<b>Dióxido de cloro</b>	Potente agente oxidante. No reacciona tan rápidamente como los compuestos clorados con compuestos orgánicos. Es menos sensible a los cambios de pH que los compuestos clorados. Tiene mayor efectividad a pH entre 6 y 10. Gran solubilidad en agua fría.	Generación <i>in situ</i> . Recientemente se puede adquirir en formulaciones estables.	Empleo limitado en frutas y hortalizas que no se consumen crudas.	No.
<b>Ozono</b>	Eficaz en la eliminación de las contaminaciones microbianas. El rango de pH es 6-8 para lograr su efecto óptimo.	Más caro que los compuestos clorados. Peligro por exposición de los trabajadores al ozono.	Los valores máximos no están limitados por el producto sino por la exposición de los trabajadores al ozono.	No.

### 1.5.2.3 Ecurrido, envasado y almacenamiento

Luego de la etapa de lavado, se recomienda eliminar el exceso de agua que el vegetal haya podido adquirir con el lavado y envasar un producto seco, factor muy importante para prolongar la vida útil del vegetal cortado. La eliminación de agua se puede realizar por escurrido, centrifugado o secado por aire (Yildiz, 1994).

Algunos productos frescos cortados se comercializan mezclados, como es el caso de las ensaladas, por lo que la *mezcla* se lleva a cabo después de que cada uno de los componentes haya seguido el tratamiento adecuado a sus características. En esta etapa es importante asegurar la homogeneidad de la mezcla.

Finalmente, el proceso termina con las operaciones de *pesado* y *envasado*.

El envasado de los VMP se realiza bajo atmósfera modificada (AM). Este envasado se considera, después de la disminución de la temperatura del producto, la etapa más determinante para prolongar la vida comercial de las frutas y hortalizas cortadas. Esta técnica implica la modificación de la atmósfera en el entorno del alimento dentro del envase. Esta modificación se produce por la acción conjunta del producto vegetal (el cual respira) y el intercambio de gases con la atmósfera exterior del envase a través del *film*, de forma tal que se establece un equilibrio dinámico a través de la película, hasta que se alcanza una atmósfera estacionaria. Las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono que se alcanzan en la AM dependen de: el peso y tamaño del producto, su actividad respiratoria, la carga microbiana, la permeabilidad del *film*, y volumen y espacio de cabeza del envase (González y Lobo, 2005). Los bajos niveles de oxígeno y los altos niveles de dióxido de carbono utilizados en este tipo de envasado reducen la intensidad respiratoria del tejido vegetal, produciendo un retraso en su senescencia (Kader, 1997).

Finalizado el envasado, las bolsas o bandejas se introducen en cajas, que se paletizan y se colocan en cámaras de temperatura controlada. En estas cámara de refrigeración (a temperaturas entre 0 – 1°C) se preparan las cargas, normalmente mixtas, que van a ser distribuidas a los diferentes supermercados o cualquiera sea su destino final. Durante la *distribución* es importante mantener la cadena de frío, la temperatura de conservación controla el desarrollo de microorganismos y frena los cambios fisiológicos que dan lugar a los procesos químico-bioquímicos que repercuten en la pérdida de calidad del producto (González y Lobo, 2005).

### **1.5.3 Efectos del procesado mínimo y almacenamiento refrigerado sobre el valor nutricional y potencial saludable de los alimentos vegetales**

El pelado, cortado y lavado del producto vegetal son algunas de las etapas del procesamiento que pueden favorecer la pérdida de nutrientes y compuestos fitoquímicos en los vegetales mínimamente procesados por eliminación de alguna parte del vegetal, o por lixiviación o solubilidad en el agua de lavado (Cano y col., 2005).

El pelado y troceado de las frutas y hortalizas da lugar a un incremento en la tasa respiratoria, en la producción de etileno y en el metabolismo de los compuestos fenólicos (Rocha y col., 2002). El incremento en la intensidad respiratoria provoca una pérdida de azúcares, ácidos orgánicos y de otros metabolitos que intervienen en el ciclo de la respiración, afectando directamente al sabor del producto procesado y a la calidad sensorial del mismo (Tovar y col., 2001).

Tanto el pelado como el cortado de los VMP provocan en las células y tejidos la liberación de distintos tipos de enzimas facilitando el contacto con los sustratos sobre los que actúan. Al entrar en contacto la enzima polifenol oxidasa (PPO) con sus sustratos, los compuestos fenólicos, y en presencia de oxígeno, se produce una oxidación de los fenoles que lleva a una polimerización de los productos oxidados, dando lugar a la formación de melaninas (Tomás-Barberán y Espín, 2001). Las peroxidasas (POD) son otras enzimas que pueden producir la oxidación de compuestos fenólicos en presencia de peróxido de hidrógeno. Se ha postulado que la PPO podría actuar como promotor de la actividad de la POD debido a la generación de peróxido de hidrógeno durante la oxidación de los compuestos fenólicos (Tomás-Barberán y Espín, 2001). Los productos de estas reacciones, las melaninas, son pigmentos heterogéneos negros, marrones o rojos, que son responsables del oscurecimiento provocado por el cortado de frutas de pulpa blanca como las manzanas (Ayala-Zavala y González-Aguilar, 2009). Además, la polimerización y síntesis de estos compuestos puede dar lugar a la aparición de sabores y olores extraños y a la pérdida de la capacidad antioxidante aportada por los compuestos fenólicos (Tomás-Barberán y Espín, 2001, González y Lobo, 2005).

Contrariamente, los daños producidos por el pelado y cortado de los vegetales mínimamente procesados favorecen la activación de la enzima fenilalanina-amonio liasa (PAL) (Figura 1.18), clave en la síntesis de los compuestos fenólicos, favoreciendo su

síntesis (Cantos y col., 2001). De acuerdo a Cisneros-Zevallos, (2003), las lesiones provocadas en los vegetales (cortado, troceado, rallado) podrían usarse como herramientas de estrés abiótico para generar un aumento en la síntesis de compuestos fenólicos y de su capacidad antioxidante. En este sentido, algunas investigaciones han demostrado como el cortado incrementa la capacidad antioxidante de zanahorias (Reyes y col. 2007), lechuga (Kang y Saltveit, 2002) y papas moradas (Reyes y Cisneros-Zevallos, 2003); presentando una correlación con el aumento de fenoles totales observado luego del corte.

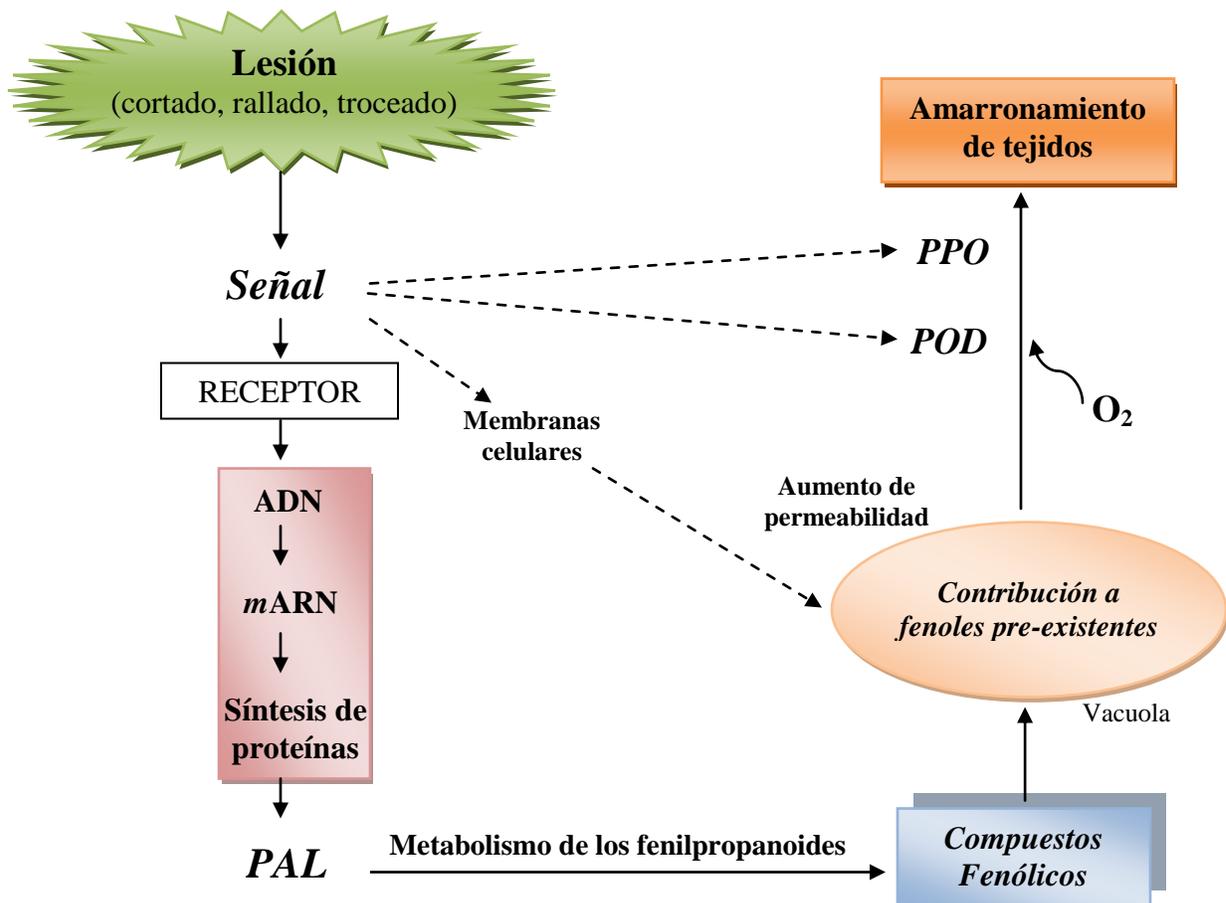


Figura 1.18. Interrelaciones entre las lesiones producidas en un vegetal y los cambios subsecuentes en el metabolismo de los compuestos fenólicos que terminan en el amarronamiento de los tejidos. Fuente: Saltveit, 2000.

Por otra parte, los procesos de lavado-desinfección pueden favorecer la pérdida de nutrientes y compuestos bioactivos por lixiviación o solubilidad en el agua de lavado o por oxidación producida por los distintos sanitizantes (Ayala-Zavala y González-Aguilar,

2009). Según Wright y Kader, (1997), el lavado con hipoclorito de sodio ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) influye en el contenido de vitamina C de la fruta cortada (frutillas), produciendo la oxidación del ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico, no modificando el contenido de vitamina C.

Vandekinderen y col., 2008, reportaron pérdidas en el nivel de vitamina E del 37,5 y 75,1% en zanahoria rallada lavada con ácido peracético 80 y  $250 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, en cinco minutos; no observándose cambios en el contenido de carotenos en ninguno de los dos lavados.

Por lo tanto, un estudio profundo sobre el efecto de todas las etapas de un mínimo procesamiento y posterior conservación sobre los constituyentes de los productos vegetales se hace imprescindible para conocer la verdadera composición nutricional y potencial saludable de los VMP, tal y como van a ser ingeridos por los consumidores (Cano y col., 2005).

## 1.6 Objetivos

El *objetivo general* de la presente tesis será el estudio y la optimización de tecnologías de procesamiento y conservación en la elaboración de frutillas frescas cortadas, con el fin de evitar pérdidas de compuestos bioactivos y antioxidantes, como así también, en lo posible, de aumentar su potencial saludable para brindar al consumidor un producto natural con un posible o ampliado efecto protector sobre su salud.

Para cumplir con este objetivo se plantearán los siguientes *objetivos específicos*:

### 1.6.1 Respecto a la caracterización de las frutillas:

1.6.1.1 Realizar una caracterización de las frutillas regionales en cuanto a su contenido de compuestos bioactivos, y otros parámetros de calidad.

1.6.1.2 Para ello será necesario desarrollar y validar técnicas HPLC UV/DAD para la determinación de compuestos bioactivos en frutillas (ácido ascórbico, vitamina C y compuestos fenólicos).

### 1.6.2 Respecto a la preparación de frutillas frescas cortadas. Objetivos relacionados con el estudio de la operación de lavado-desinfección:

1.6.2.1 Estudiar los cambios en la calidad nutricional, microbiológica y potencial saludable (compuestos bioactivos) de frutillas frescas cortadas como consecuencia de la operación de lavado-desinfección variando la concentración del agente activo, el tiempo de exposición y la temperatura de la solución de lavado.

1.6.2.2 Estudiar los cambios en las actividades de enzimas relacionadas con el metabolismo de los compuestos fenólicos (fenilalanina-amonía liasa y polifenoloxidasas) y las que actúan sobre los compuestos poliuronidos de la pared celular, (poligalacturonasa y pectinmetilesterasa), como consecuencia de la operación de lavado-desinfección, variando la concentración del agente activo, el tiempo de exposición y la temperatura de la solución de lavado.

1.6.1.3 Desarrollar modelos predictivos que permitan maximizar calidad microbiológica y minimizar pérdida de potencial saludable (compuestos bioactivos) y calidad nutricional y sensorial con las condiciones de lavado.

**1.6.3 Respecto a la preparación de frutillas frescas cortadas. Objetivos relacionados con el estudio de la operación de corte y la conservación del producto:**

1.6.3.1 Estudiar los posibles cambios en el potencial saludable y la calidad nutricional del producto como consecuencia del efecto del corte, la temperatura y el tiempo de almacenamiento.

1.6.3.2 Determinar la cinética de cambio de los distintos atributos y parámetros de calidad estudiados y su funcionalidad con la temperatura para los distintos grados de corte practicados, aplicando un enfoque cinético simplificado.

## **2. Materiales y Métodos**

---

## 2.1 Material vegetal utilizado

En la presente tesis se emplearon dos variedades de frutillas:

- Frutillas (*Fragaria x Ananassa* Duch), cultivar *Camarosa* (Figura 2.1a), oriundas de Arroyo Leyes, Santa Fe, Argentina. Las frutas fueron adquiridas directamente del productor, con un 90% de superficie de color rojo. Las frutillas se trasladaron hasta el ITA-FIQ-UNL y se almacenaron en cámara frigorífica a 3°C y 95% HR, por menos de 12 horas, hasta su procesamiento.
- Frutillas (*Fragaria x Ananassa* Duch), cultivar *Selva* (Figura 2.1b), oriundas de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Las frutas, comercializadas bajo la marca “Tamara” por la Compañía Industrial Frutihortícola S.A., fueron adquiridas en un comercio local. Durante la compra se eligieron las frutas con 90% de color rojo en la superficie. Las frutillas se trasladaron hasta el ITA-FIQ-UNL y se almacenaron en cámara frigorífica a 3°C y 95% HR, por menos de 12 horas, hasta su procesamiento.



Figura 2.1 a. Frutillas variedad *Camarosa*



Figura 2.1 b. Frutillas variedad *Selva*.

### **2.1.1 Acondicionamiento del material vegetal**

Las frutas fueron inspeccionadas, eliminando aquellas con signos de podredumbre, como así también las partes de la planta acompañantes. Los cálices y pedúnculos se eliminaron, las frutillas se pre-lavaron con agua de red por 2 min y se escurrieron por gravedad sobre papel absorbente.

## **2.2 Desarrollo y puesta a punto de métodos y técnicas analíticas**

### **2.2.2 Determinación de vitamina C en frutillas: optimización y validación de un método de cromatografía líquida de alta performance con detección ultravioleta (HPLC-UV) usando diseños experimentales**

La vitamina C o ácido ascórbico total (AAT) en las frutas es la suma del contenido de ácido ascórbico (AA) más el contenido de ácido dehidroascórbico (ADHA) (Combs, 1998). Por lo tanto, resulta importante conocer las concentraciones tanto de AA como de ADHA para conocer la actividad vitamínica total de una fruta específica.

En la literatura se reportan numerosos métodos analíticos para la determinación de AA y ADHA en matrices alimentarias. Los métodos de cromatografía líquida de alta performance (HPLC), son los preferidos, debido a que son más rápidos y eficaces que los métodos de espectrofotometría, volumetría o enzimáticos, y por lo general no necesitan derivatization (Nováková y col., 2008).

Se procedió a optimizar y validar la determinación de vitamina C en frutillas por HPLC-UV, usando diseños experimentales: una nueva estrategia analítica.

#### **2.2.1.1 Aparatos y Software**

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida KONIK KNK-500-A series, unido a un detector UV de longitud de onda variable (UVIS 200 Konik Instruments, Barcelona, España). Las muestras se inyectaron en el sistema cromatográfico a través de un inyector manual Rheodyne 7725i, provisto de un *loop* de 20  $\mu$ L (Rheodyne, Berkeley, CA, EE.UU.). El programa Design Expert v.7 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, EE.UU.) se utilizó para la optimización de las condiciones cromatográficas (análisis de datos y determinación de la función deseabilidad). El análisis estadístico de los datos de validación

se realizó con el programa STATGRAPHICS Centurion XV 15.02.06 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EE. UU.) y Matlab 7.6.0.324 (Math Works, Naticks, MA, EE. UU.).

### **2.2.1.2 Condiciones cromatográficas**

Las separaciones se llevaron a cabo en un columna de fase reversa Phenomenex Gemini 5  $\mu$  C18 110A, conectada a un guardacolumna (Phenomenex Inc. CA, USA), a temperatura ambiente (25°C). La fase móvil consistió de una solución *buffer* de ácido acético/acetato de sodio 0,03 mol L<sup>-1</sup>, 5% de metanol. El pH de la fase móvil fue ajustado a 3,8, 4,8 y 5,8, de acuerdo a las condiciones del diseño de optimización (Tabla 2.1). Las fases móviles se filtraron a través de un filtro de membrana Millipore de 0,45  $\mu$ m y fueron desgasificadas usando vacío.

### **2.2.1.3 Preparación solución madre de AA**

Se preparó una solución estándar de ácido ascórbico (4,0 g L<sup>-1</sup>) en solución extractante de ácido metafosfórico (30 g L<sup>-1</sup>) y ácido acético (80 g L<sup>-1</sup>) (AOAC, 1995). La misma se realizó disolviendo 0,1 g de AA, secado por 1 hora a 105°C, en 25 mL de solución extractante. La solución madre se protegió del contacto con la luz y se almacenó a 4°C hasta su uso.

### **2.2.1.4 Preparación de las muestras de frutilla**

De las frutillas preparadas tal como se indica en la sección 2.1.1, se tomaron 500 g de la variedad *Selva*, se homogeneizaron con licuadora manual, y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Para la extracción se tomaron 5 g de frutillas homogeneizadas y se le adicionaron 25 mL de solución extractante. La mezcla se homogeneizó por 1 min, se sonicó en ultrasonido por 15 min, y se centrifugó a 12000 g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se separó y a 1 mL de este se lo diluyó con fase móvil hasta 6 mL, se filtró a través de membrana Millipore de 0,45  $\mu$ m y se inyectó en el sistema de HPLC. Esta muestra se usó para medir el contenido de ácido ascórbico (AA) de las muestras. Para cuantificar el ácido ascórbico total (AAT) o Vitamina C, a 1 mL de sobrenadante se le agregó 0,2 mL de

solución de DL-ditiotreitol (DTT) 5 g L<sup>-1</sup> (preparada en fosfato de potasio dibásico 2,58 M) (Odriozola-Serrano y col., 2007). La mezcla, luego de haberse dejado reaccionar en oscuridad por 2 horas, se diluyó a 6 mL, se filtró a través de membrana Millipore y se inyectó en el sistema cromatográfico.

El contenido de ácido dehidroascórbico (ADHA) de las muestras se calculó como la diferencia entre los contenidos de AAT y AA (Sánchez-Mata y col., 2000). Todas las muestras se protegieron de la luz y se manipularon en baño de hielo para evitar pérdidas por oxidación.

#### **2.2.1.5 Procedimiento de optimización**

Para la optimización de la determinación de AA por HPLC se utilizó un diseño de Box-Behnken de tres factores con tres niveles cada uno. Una descripción más detallada de este diseño se expone en la sección 2.3.3. El diseño consistió en 15 experiencias (corridas cromatográficas) bajo diferentes condiciones (Tabla 2.1). Los factores estudiados fueron el pH de la fase móvil (valores de los niveles de la variable: 3,8, 4,8 y 5,8); la velocidad del flujo (valores de los niveles de la variable: 0,5, 0,85 y 1,2 mL min<sup>-1</sup>); y la longitud de onda (valores de los niveles de la variable: 240, 255 y 270 nm). Las respuestas estudiadas fueron: las áreas cromatográficas, los tiempos de retención y los anchos de pico obtenidos para la determinación de AA y AAT. Las muestras de AA estándar usadas fueron diluciones de la solución madre obtenida en la sección 2.2.1.3 en solución extractante hasta obtener una concentración de 0,08 g L<sup>-1</sup>. Luego, esta dilución se volvió a diluir con fase móvil hasta obtener una concentración final de 0,016 g L<sup>-1</sup>. Las muestras de AAT estándar se obtuvieron por reducción de una alícuota de solución estándar de AA con DTT 5 g L<sup>-1</sup>. Se mezclaron 4 mL de solución de AA estándar 0,2 g L<sup>-1</sup> (preparado por dilución de la solución madre con mezcla extractante) con 1,2 mL de DTT, se dejó reaccionar en oscuridad por 2 horas, se diluyó con solución extractante a una concentración de 0,08 g L<sup>-1</sup>, y finalmente se llevó la solución a una concentración de 0,016 g L<sup>-1</sup> con fase móvil.

#### **2.2.1.6 Procedimiento de validación**

El método de HPLC optimizado fue validado para la determinación de AA y AAT o vitamina C en frutillas. Con las soluciones de AA y AAT estándar se estudió la linealidad,

los límites de detección y cuantificación, y las sensibilidades de calibración y analítica. Estudios de precisión, exactitud y robustez se llevaron a cabo usando muestras de frutillas.

Tabla 2.1. Corridas experimentales del diseño de Box-Behnken para tres variables\*

Nº corrida	pH de la fase móvil	Flujo (mL min <sup>-1</sup> )	Longitud de onda (nm)
1	4,8	0,85	255
2	4,8	0,85	255
3	4,8	0,85	255
4	4,8	0,50	270
5	4,8	0,50	240
6	5,8	0,50	255
7	5,8	1,20	255
8	3,8	1,20	255
9	3,8	0,50	255
10	4,8	1,20	270
11	3,8	0,85	240
12	5,8	0,85	270
13	4,8	1,20	240
14	3,8	0,85	270
15	5,8	0,85	240

(\*) 15 experiencias con 2 repeticiones del punto central.

Todos los experimentos de validación se llevaron a cabo en las condiciones óptimas obtenidas para pH de la fase móvil, velocidad de flujo y longitud de onda. Los análisis se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25°C) bajo condiciones isocráticas.

#### 2.2.1.6.1 Estudio de la linealidad y otras figuras de mérito

Cantidades adecuadas de soluciones estándares de AA y AAT con reducción por DTT (AAT) (0,08 g L<sup>-1</sup>), preparadas en triplicado, como se describió anteriormente, se diluyeron en fase móvil para obtener las siguientes concentraciones: 0,004, 0,008, 0,012, 0,016 y 0,020 g L<sup>-1</sup>, cubriendo el rango de 50 a 150 % de la concentración de vitamina C encontrada comúnmente en frutillas. Los valores de las áreas integradas de los picos cromatográficos se graficaron en función de las concentraciones de AA y AAT y se usaron para los test de linealidad, la determinación de los límites de detección y cuantificación, y las sensibilidades de calibración y analítica.

#### **2.2.1.6.2 Estudio de la precisión del método**

Se prepararon 6 muestras de frutillas de acuerdo a la sección 2.2.1.4 y se inyectaron en el equipo de HPLC. Los resultados de AA, ADHA y AAT obtenidos se utilizaron para conocer la variación intra-diaria o repetitividad del método.

#### **2.2.1.6.3 Estudio de la exactitud del método**

Porciones de 5 g de frutillas homogeneizadas se procesaron de la misma manera como se procedió en la sección 2.2.1.4, con la diferencia de que fueron adicionadas, antes de la extracción, con cantidades conocidas de AA estándar. Las adiciones se hicieron para alcanzar concentraciones de AA y AAT similares a las utilizadas en los test de linealidad. Estas concentraciones adicionadas estuvieron entre el 30 y 150% de las concentraciones de analito esperadas en muestras de frutillas. Los procedimientos se repitieron 3 veces.

#### **2.2.1.6.4 Estudio de la robustez del método**

La robustez del método se estudió empleando un diseño factorial fraccionado  $3^{4-2}$  en nueve corridas cromatográficas (Bianchini y col., 2009, Massart y col., 1997). Los niveles de los factores de este diseño (pH de la fase móvil, velocidad de flujo y longitud de onda) fueron pequeños cambios en los niveles de las condiciones experimentales optimizadas. Además se agregó como factor el porcentaje de metanol en la fase móvil, cuyos niveles se variaron entre 3 y 7%. La respuesta estudiada fue el porcentaje de recuperación de AA y AAT luego de una adición del analito 90% de la esperada. El procedimiento de las muestras fue igual al descrito para el estudio de la exactitud.

### **2.2.2 Determinación de compuestos fenólicos en frutillas: desarrollo y validación de un método de cromatografía líquida de alta performance con detección por arreglo de diodos (HPLC-DAD)**

El análisis de compuestos fenólicos se lleva generalmente a cabo por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) con columnas de fase reversa de  $C_{18}$  y gradientes binarios de solvente (Tarola y col., 2012). La fase móvil consiste generalmente de una solución acuosa ácida (de ácido fórmico, acético, o trifluoroacético) y un solvente orgánico (acetoniitrilo o metanol) (Lopes da Silva y col., 2007, Aaby y col., 2007, Tulipani y col., 2008). Sin

embargo, el uso de acetonitrilo se ha cuestionado recientemente debido a que una disminución en su producción provocó un aumento en su precio, además por presentar una elevada toxicidad para los humanos y el medio ambiente. Es por ello que se está tratando de reemplazar al acetonitrilo con metanol, lo que podría conducir a una reducción del nivel de costos de solventes y un menor impacto para la salud y el ambiente (Giné-Bordonaba y col., 2011).

En la identificación de los compuestos fenólicos, la detección se hace generalmente en el ultravioleta (UV) (Romanová y col., 2000), por arreglo de diodos (DAD) (Lopes da Silva y col., 2007, Hernanz y col., 2007, Giné-Bordonaba y col., 2011), o por espectrometría de masas (MS) (Aaby y col., 2007, Chen and Zuo, 2007). Los detectores MS proveen información acerca de la masa molecular y los patrones de fragmentación del analito, y se han usado para identificar una amplia variedad de compuestos fenólicos, sin la necesidad de contar con los correspondientes estándares fenólicos (Määttä-Riihinen y col., 2004, Aaby y col., 2007). Sin embargo, los detectores DAD han demostrado ser una excelente herramienta en la determinación de compuestos fenólicos, si se considera su menor costo y la mayor posibilidad de ser adquirido por un laboratorio analítico, comparado con la detección MS (Molnár-Perl y Zs, 2005, Tarola y col., 2012).

#### **2.2.2.1 Aparatos y Software**

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida Shimadzu LC-10AT (Shimadzu Scientific Instruments, Japón), equipado con cuatro bombas FCV-10AL, un desgasificador en línea DGU-14<sup>a</sup>, un inyector Rheodyne 7725i con un *loop* de 20  $\mu$ L (Rheodyne, Berkeley, CA, EE.UU.), y un detector de arreglos de fotodiodo SPD-M20A, operando entre 200 y 900 nm. Los datos cromatográficos se procesaron con el programa Shimadzu LC solution software. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa STATGRAPHICS Centurion XV 15.02.06 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EE.UU.) y Matlab 7.6.0.324 (Math Works, Naticks, MA, EE.UU.).

#### **2.2.2.2 Condiciones cromatográficas**

Las separaciones se llevaron a cabo en un columna de fase reversa Supelcosil LC-ABZ 150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m, unida a un guardacolumna Alltech C18 5 $\mu$ m. La fase móvil fue un

gradiente preparado a partir de una solución acuosa de ácido fórmico al 2%, pH 3, (Solvente A) y una solución de ácido fórmico en metanol al 2%, pH 3, (solvente B). El programa de gradiente fue: 0,01-8,00 min 15% B isocrático, 8,01-25,00 min 15-50% B, 25,01-40,00 min 50% B isocrático, 40,01-50,00 min 50-90% B, y 50,01-55,00 min 90-15% B. Para equilibrar la columna se requirieron 10 minutos antes de cada inyección. El flujo fue de  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ , y los análisis fueron realizados a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ).

El detector se ajustó a 280, 320, 360 y 520 nm para realizar la detección simultánea de los diferentes grupos de compuestos fenólicos. La identificación de los picos se realizó comparando los tiempos de retención y las características espectrales aportadas por el detector DAD, con compuestos fenólicos estándares.

### **2.2.2.3 Preparación solución madre de compuestos fenólicos**

Se prepararon distintas soluciones madres de compuestos fenólicos en metanol en las siguientes concentraciones: ácido gálico ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ), catequina ( $400 \text{ mg L}^{-1}$ ), epicatequina ( $400 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido *p*-cumárico ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido ferúlico ( $2000 \text{ mg L}^{-1}$ ), rutina ( $640 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido cinámico ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido elágico ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), quercitina ( $620 \text{ mg L}^{-1}$ ), kaempferol ( $135 \text{ mg L}^{-1}$ ), cianidina ( $2000 \text{ mg L}^{-1}$ ), y pelargonidina ( $1300 \text{ mg L}^{-1}$ ). Estas soluciones, estables por 2 meses, se protegieron de la luz y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.2.4 Elección del sistema de extracción para las muestras de frutillas**

La acetona y el metanol, puros o combinados con agua o ácidos (ácidos acético, fórmico y clorhídrico) son los solventes más usados para la extracción de compuestos fenólicos en muestras de frutillas (Häkkinen y Törrönen, 2000, Mattila y Kumpulainen, 2002, da Silva Pinto y col., 2008, Ignat y col., 2011, Giné Bordonaba y col., 2011). Recientemente, el uso de metanol demostró ser el mejor solvente para la recuperación de antocianinas en frutillas y otras muestras como sorgo negro (Awika y col., 2005, Giné Bordonaba y col., 2011). Aparentemente, las moléculas de antocianinas experimentarían una modificación estructural significativa en medios de extracción de acetona acuosa, fenómeno que no ocurriría con metanol acidificado (Awika y col., 2005).

Como el objetivo de nuestro trabajo fue identificar y cuantificar simultáneamente en una única corrida cromatográfica una amplia variedad de compuestos fenólicos presentes en frutillas, incluyendo a las antocianinas, se decidió utilizar un sistema de extracción basado en metanol. Se realizó inicialmente un *screening* con el objetivo de elegir las mejores condiciones de extracción. Se probaron 3 tipos de solventes de extracción: Metanol puro, Metanol/agua (50:50) y Metanol/ácido fórmico (99:1). El sistema de extracción usando metanol puro mostró ser el más adecuado, dando los valores de áreas de compuestos fenólicos más grandes (datos no mostrados).

Por lo tanto, el sistema de extracción conteniendo metanol puro fue el elegido para la realización de este estudio.

#### **2.2.2.5 Preparación de la muestras de frutilla**

De las frutillas preparadas en la sección **2.1.1** se tomaron 500 g de las variedades *Selva* y *Camarosa*, se liofilizaron, se molieron sobre un mortero y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Se midió la humedad de las frutillas a 70°C hasta peso constante de acuerdo a AOAC (2005), y se calcularon los sólidos secos de cada cultivar de frutilla ( $\text{g ss } 100 \text{ g}^{-1}$  fruta fresca). Estas muestras de fruta se trasladaron hasta el laboratorio de Merceología de la Universidad La Sapienza en Roma, en donde se procedió a desarrollar el método de identificación y cuantificación de compuestos fenólicos, bajo la dirección de la Dra. Anna María Tarola.

Las extracciones se hicieron por triplicado con 0,25 g de frutillas *Selva* ( $10,4 \text{ g ss } 100 \text{ g}^{-1}$  FF) y *Camarosa* ( $8,8 \text{ g ss } 100 \text{ g}^{-1}$  FF) en 5 mL de metanol. Las mezclas se homogeneizaron, se sonicaron por 15 min y se centrifugaron a 2500 g por 15 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se colectaron y sobre los sedimentos se realizó una re-extracción con 5 mL de metanol. Las fracciones colectadas se concentraron a 5 mL en flujo de nitrógeno, a temperatura ambiente, y antes de ser inyectadas en el sistema HPLC se filtraron a través de una membrana Millipore de  $0,45 \mu\text{m}$ .

Estas fracciones se usaron para el análisis de compuestos fenólicos libres naturalmente presentes en los extractos de frutillas (agliconas libres o compuestos fenólicos no conjugados o no condensados).

#### **2.2.2.6 Hidrólisis de los extractos de frutillas**

Sobre alícuotas de los extractos de frutillas obtenidos en la sección 2.2.2.4 se realizó una hidrólisis ácida, con el objetivo de liberar las agliconas de los compuestos fenólicos glicosilados e hidrolizar los compuestos fenólicos conjugados o condensados. Para la hidrólisis, (4 mol L<sup>-1</sup> HCl, 50 min a 90°C) se agregó 1 mL de HCl 12 mol L<sup>-1</sup> sobre 2 mL de muestra, se homogeneizó, y se dejó por 50 min en estufa a 90°C. Luego de la hidrólisis, los extractos se enfriaron y estuvieron listos para ser inyectados en el sistema de HPLC. En esta fracción se medirán las agliconas liberadas de los compuestos fenólicos glicosilados y los compuestos fenólicos que estaban conjugados o condensados.

#### **2.2.2.7 Hidrólisis de los compuestos fenólicos estándares**

El efecto de las condiciones de hidrólisis ácida (4 mol L<sup>-1</sup> HCl, 50 min a 90°C) se probó sobre compuestos fenólicos puros. Se hicieron diluciones en metanol sobre algunos de los estándares preparados según lo indicado en la sección 2.2.2.3. Los compuestos fenólicos seleccionadas fueron: catequina y kaempferol (13,3 mg L<sup>-1</sup>), rutina (21,3 mg L<sup>-1</sup>), y ácidos ferúlico (1,3 mg L<sup>-1</sup>) y elágico (13,3 mg L<sup>-1</sup>).

#### **2.2.2.8 Procedimiento de validación**

El método HPLC-DAD fue validado para la determinación de los principales compuestos fenólicos en frutillas. Estudios de linealidad, límites de detección y cuantificación y sensibilidades de calibración y analítica se realizaron usando soluciones estándares de compuestos fenólicos. Los estudios de precisión y exactitud se realizaron usando extractos de frutillas.

##### **2.2.2.8.1 Estudio de la linealidad y otras figuras de mérito**

Los compuestos fenólicos se inyectaron en el sistema HPLC en forma individual para conocer sus tiempos de retención. Luego de esto, se prepararon por triplicado cinco mezclas de compuestos fenólicos preparadas por diluciones de cantidades adecuadas de soluciones estándares en metanol. Las mezclas de estándares se realizaron cubriendo un rango de concentraciones: ácido gálico, epicatequina y ácido ferúlico: 5-60 mg L<sup>-1</sup>, catequina, ácido *p*-cumárico, rutina y ácido cinámico: 2,5-30 mg L<sup>-1</sup>, ácido elágico: 7,5-100

mg L<sup>-1</sup>, quercitina: 0,5-6 mg L<sup>-1</sup>, kaempferol: 0,3-3,4 mg L<sup>-1</sup>, cianidina: 1,9-15 mg L<sup>-1</sup>, y para pelargonidina: 18,9 – 150 mg L<sup>-1</sup>; todas las concentraciones cubren desde 50 al 150 % de la concentración esperada de cada compuesto fenólico en muestras de frutillas. Las áreas integradas de los picos de los compuestos fenólicos se graficaron en función de sus concentraciones y se usaron para las pruebas de linealidad, la determinación de los límites de detección y cuantificación y las sensibilidades analíticas y de calibración.

#### 2.2.2.8.2 Estudio de la precisión y exactitud del método

Seis muestras de frutillas se prepararon de acuerdo a la sección 2.2.2.5 y se inyectaron en el equipo de HPLC. Los resultados obtenidos en las concentraciones de los compuestos fenólicos se utilizaron para conocer la variación intra-diaria o repetitividad del método.

Para el estudio de la exactitud, 0,25 g de frutillas variedad *Camarosa* liofilizadas se procesaron de la misma manera como se procedió en la sección 2.2.2.5, con la diferencia de que fueron adicionadas, antes de la extracción, con cantidades conocidas de compuestos fenólicos estándares. Los estándares elegidos para las adiciones fueron: ácido gálico y *p*-cumárico (7,50 mg 100 g<sup>-1</sup> FF), rutina (9,60 mg 100 g<sup>-1</sup> FF), quercitina (9,30 mg 100 g<sup>-1</sup> FF), y cianidina (9,0 mg 100 g<sup>-1</sup> FF). Las concentraciones se estimaron usando curvas de calibrado obtenidas para cada compuesto fenólico, las concentraciones obtenidas se compararon con las concentraciones reales adicionadas. El porcentaje de recuperación se calculó antes de la hidrólisis ácida para ácido gálico y *p*-cumárico, quercitina y cianidina. Para rutina, el porcentaje de recuperación se calculó antes y después de la hidrólisis ácida.

#### 2.2.3 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de las muestras se midió de acuerdo a Sánchez-Moreno y col., (2003). La actividad antirradicalaria se cuantificó por la medida de la disminución de la absorbancia de una solución metanólica del radical libre DPPH\* (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) a 517 nm en presencia de alícuotas del extracto de la fruta. La concentración inicial de DPPH\* fue de 0,03 g L<sup>-1</sup> y las medidas de absorbancia se tomaron en espectrofotómetro (Genesis 5, Milton Roy, Ivyland, USA).

Para determinar el tiempo en que la reacción entre el radical DPPH\* y los compuestos antioxidantes de los extractos de frutillas alcanzaron un estado estacionario, se realizaron

lecturas de absorbancia de 3,9 mL de DPPH cada 1 min luego del agregado de 0,025, 0,05 y 0,1 mL de un extracto de frutillas en acetona/agua (80:20). En la Figura 2.2 se muestran las gráficas de cinética de degradación de DPPH\* obtenidas luego del agregado de distintas alícuotas de extracto de frutilla.

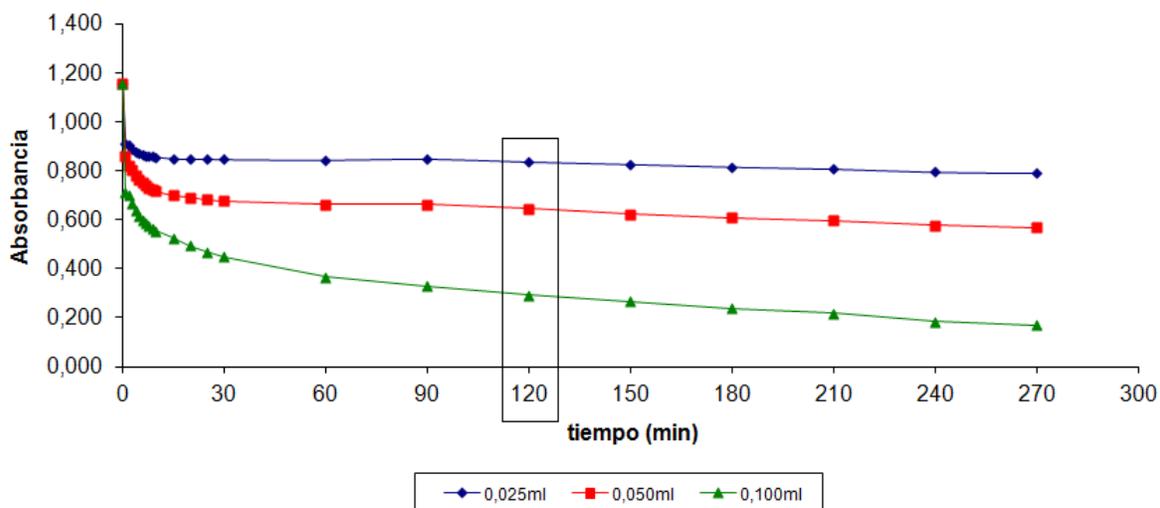


Figura 2.2. Cinética de degradación del radical libre DPPH\* luego del agregado de alícuotas de extracto de frutillas.

Los cálculos se realizaron de acuerdo a la Ecuación 2.1:

$$\%DPPH^*_{\text{remanente}} = \left[ \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100 \quad (2.1)$$

En donde  $A_{\text{control}}$  es la absorbancia de 3,9 mL de solución de DPPH\* adicionado de un volumen de metanol igual al volumen de muestra agregado en el tubo correspondiente y  $A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia de 3,9 mL de DPPH\* adicionado con un volumen entre 0,025 y 0,075 mL de extracto. Se calculó el  $IC_{50}$  (muestra) definido como la cantidad de muestra en 1 mL de reacción necesaria para disminuir al 50% la concentración inicial de DPPH\*, obtenida de la gráfica de porcentaje de DPPH\* remanente vs. concentración (mg de fruta  $\text{mL}^{-1}$  de reacción).

Los análisis se realizaron por duplicado y las lecturas se tomaron luego de dejar reaccionar las muestras durante 120 minutos.

Los resultados se expresaron como la capacidad antioxidante equivalente al ácido ascórbico (AEAC) (Lim, y col., 2007) (Ecuación 2.2).

$$AEAC \left( \frac{\text{mgAA}}{100\text{g de fruta fresca}} \right) = \frac{IC_{50(AA)}}{IC_{50(muestra)}} \times 10^5 \quad (2.2)$$

Donde:  $IC_{50}(AA)$  es la cantidad de ácido ascórbico en 1 mL de reacción necesaria para disminuir al 50% la concentración inicial de DPPH\*, obtenida de la gráfica de % DPPH\* remanente vs. concentración ( $mg$  de AA  $mL^{-1}$  reacción).

Para calcular el  $IC_{50}(AA)$  se preparó una curva de calibrado de AA ( $0 - 0,207 mg mL^{-1}$ ), se mezclaron 3,9 mL de solución de DPPH\* con 0,1 mL de cada dilución y se midieron los valores de absorbancia luego de media hora de reacción (tiempo que la reacción alcanza un estado estacionario luego de la adición de AA). La curva se realizó por triplicado y se calculó el valor de  $IC_{50}(AA) = 3,22 \cdot 10^{-3} mg mL^{-1}$ .

#### **2.2.4 Fenoles totales**

La determinación de fenoles totales se llevó a cabo usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). A 0,125 mL de extracto se agregaron 0,25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla se dejó reaccionar durante 3 minutos. Luego se adicionó 0,5 mL de solución saturada de carbonato de sodio y se completó a 5 mL con agua destilada. Se agitó vigorosamente, se dejó reaccionar durante 25 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 4000 g. Los blancos de reactivos se prepararon reemplazando el volumen de muestra por solución de extracción. Se midió la absorbancia a 760 nm en espectrofotómetro (Genesis 5, Milton Roy, Ivyland, USA).

Se construyó una curva de calibrado de ácido gálico (AG) en el rango de concentraciones 2-10 mg AG  $100 mL^{-1}$ . Las determinaciones se realizaron por triplicado en cada muestra de frutilla y los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico ( $mg$  AG  $100g^{-1}$  FF).

#### **2.2.5 Antocianinas totales**

El contenido de antocianinas totales se determinó con el método de pH diferencial de acuerdo a Jin-Heo y Yong-Lee (2005). Alícuotas de extracto se ajustaron a pH 1 con una solución  $0,1 mol L^{-1}$  de cloruro de potasio y a pH 4,5 usando una solución buffer  $25 mmol L^{-1}$  de ácido acético/acetato de sodio. Se midieron las absorbancias a 510 y 700 nm en espectrofotómetro (Genesis 5, Milton Roy, Ivyland, USA), y los resultados se convirtieron en mg pelargonidin-3-glicósido  $100 g^{-1}$  de fruta fresca, ( $mg$  P3G  $100 g^{-1}$  FF) usando un

coeficiente de extinción molar de  $22,400 \text{ L (mol cm)}^{-1}$ , una masa molecular de  $432,2 \text{ g mol}^{-1}$ , un camino óptico de 1 cm y una absorbancia (A) (Ecuación 2.3) de:

$$A = \left[ (A_{510} - A_{700})_{pH1} - (A_{510} - A_{700})_{pH4,5} \right] \quad (2.3)$$

Donde,  $A_{510}$  y  $A_{700}$  son las medidas de absorbancia a pH 1 y 4,5. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

### 2.2.6 Elección del sistema de extracción para la determinación de la capacidad antioxidante, fenoles y antocianinas totales

Las técnicas de capacidad antioxidante, fenoles y antocianinas totales se realizaron sobre el mismo extracto de frutilla. Se probaron dos sistemas de extracción de acuerdo a bibliografía (Reyes y col., 2007, Kevers y col., 2007, da Silva Pinto y col., 2008):

**Sistema 1:** acetona/agua (80:20),

**Sistema 2:** metanol/agua/ácido acético (70:30:5).

Se ensayaron 75 mL de cada solución extractante en 5 g de frutillas homogeneizadas por duplicado. Cada condición de extracción ensayada se sonicó por 15 min a  $10^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó a  $12.000 \text{ g}$  por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los sobrenadantes se separaron y se utilizaron para realizar los análisis. Se procedió a determinar el sistema de extracción a utilizar en muestras de rutina de acuerdo a los resultados obtenidos. En la Tabla 2.2 se muestran los resultados de capacidad antioxidante, fenoles y antocianinas totales obtenidos con cada sistema de extracción. Como puede apreciarse, los resultados obtenidos con el **Sistema 1** dieron valores de compuestos bioactivos mayores, y por lo tanto se procedió a elegir este sistema de extracción para los análisis futuros. Si bien para la técnica de HPLC-DAD de antocianinas se recomienda el uso de solventes a base de metanol (sección 2.2.2.4), para la técnica espectrofotométrica de determinación de antocianinas totales resultó mejor un solvente a base de acetona.

Tabla 2.2. Resultados de capacidad antioxidante, fenoles y antocianinas totales utilizando dos sistemas de extracción distintos ( $n = 2$ ).

Sistema de Extracción	Capacidad antioxidante AEAC mg AA $100 \text{ g}^{-1}$ FF	Fenoles totales mg AG $100 \text{ g}^{-1}$ FF	Antocianinas totales mg P3G $100 \text{ g}^{-1}$ FF
<b>1</b>	$302 \pm 7$	$163 \pm 8$	$27 \pm 2$
<b>2</b>	$212 \pm 10$	$107 \pm 4$	$24 \pm 1$

### **2.2.7 Sólidos solubles, pH y acidez total**

La determinación de los sólidos solubles se realizó por refractometría, usando un refractómetro digital de mano (Pal-alfa, Atago, Japón) con compensación automática de temperatura, sobre muestras de frutillas homogeneizadas. Los análisis se realizaron por duplicado y los resultados expresados como °Brix.

El pH de las muestras se determinó con un pHmetro (TwinpHmeter B-213, Horiba, Japón) por duplicado.

Para la acidez se valoraron 15 g de frutillas homogeneizadas con una solución de hidróxido de sodio 0,1 N hasta pH 8,1 usando un potenciómetro (Testo 230, Alemania) y un electrodo de pH (Boeco, Alemania), según Rearte y col., 1987. Los análisis se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como g de ácido cítrico anhidro 100 g<sup>-1</sup> FF.

### **2.2.8 Determinaciones enzimáticas**

Las muestras de frutillas para las determinaciones enzimáticas fueron liofilizadas y almacenadas a -80°C hasta su análisis. Para conocer sólidos secos de las muestras (g ss 100 g<sup>-1</sup> FF), se midió la humedad a 70°C hasta peso constante de acuerdo a AOAC (2005). Estos análisis se llevaron a cabo en el departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, bajo la dirección de la Dra. Dolores Garrido Garrido.

#### **2.2.8.1 Fenilalanina amonioliasa (PAL; EC 4.3.1.3)**

Se utilizó la técnica de Mori y col., (2000) con modificaciones. Sobre 0,36 g de polvo de frutillas liofilizadas, se adicionaron 20 mL de solución extractante (tampón fosfato 100 mmol L<sup>-1</sup> pH=8, EDTA 2 mmol L<sup>-1</sup>, PVPP (polivinilpolipirrolidona) 30 g L<sup>-1</sup>, DTT 7 mmol L<sup>-1</sup>, Tritón X100 0,1% v/v). La mezcla se homogeneizó entre 20 y 30 segundos y se agitó durante 1 hora a 4°C. Se centrifugó a 4000 g por 45 min a 4°C, se separó el sobrenadante y se procedió a degradar las pectinas mezclando 10 mL del filtrado con 100 µL de pectinasa (Sigma, P-4716) (concentración en la reacción 0,1% v/v); incubando 60 min a 37°C. Luego se procedió a concentrar las proteínas de la muestra en una columna Amicon® Ultra-15 10K, centrifugando a 4000 g, hasta obtener un volumen de 500 µL a 20°C, se recogió el filtrado, el cual fue usado para realizar el análisis enzimático. La mezcla de reacción consistió en 400 µL de agua destilada, 750 µL de tampón Tris-HCl 100 mmol L<sup>-1</sup> pH=8,8;

300  $\mu\text{L}$  de fenilalanina 50  $\text{mmol L}^{-1}$  y 50  $\mu\text{L}$  de extracto. La mezcla se incubó 1 hora a 37°C, luego se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético 25% y se centrifugó a 4000  $g$  por 5 min. Se incluyeron blancos a los cuales se los preparó de la misma forma que a las muestras, agregando extracto luego de la incubación de la reacción enzimática. La producción de ácido cinámico se midió a 290 nm y los resultados se calcularon en una curva de ácido cinámico (AC) patrón y se expresaron como  $\text{nmol de AC g}^{-1} \text{ FF h}^{-1}$ .

#### **2.2.8.2 Polifenol oxidasa (PPO; EC 1.14.18.1)**

Se utilizó la técnica adaptada de Vicente, (2004). Sobre 0,36 g de polvo de frutillas liofilizadas se adicionaron 20 mL de solución extractante (tampón fosfato 100  $\text{mmol L}^{-1}$  pH=6, PVPP 30  $\text{g L}^{-1}$ , PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1  $\text{mmol L}^{-1}$ , Tritón X100 0,1% v/v, ClNa 1  $\text{mol L}^{-1}$ ). La mezcla se homogeneizó entre 20 y 30 segundos y se agitó durante 1 hora a 4°C. Se centrifugó a 4000  $g$  por 45 min a 4°C, se separó el sobrenadante y se procedió a degradar las pectinas mezclando 10 mL del filtrado con 100  $\mu\text{L}$  de pectinasa (Sigma, P-4716) (concentración en la reacción 0,1% v/v); incubando 60 min a 37°C. Luego se procedió a concentrar las proteínas de la muestra en una columna Amicon® Ultra-15 10K, centrifugando a 4000  $g$ , hasta obtener un volumen de 500  $\mu\text{L}$  a 20°C, se recogió el filtrado, el cual fue usado para realizar el análisis enzimático. La mezcla de reacción consistió en 1150  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 150  $\mu\text{L}$  de pirocatecol 200  $\text{mmol L}^{-1}$ , 150  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 1  $\text{mol L}^{-1}$  pH= 6 y 50  $\mu\text{L}$  de extracto. La mezcla se incubó 1 hora a 37°C. Se incluyeron blancos a los cuales se los preparó de la misma forma que a las muestras, agregando extracto luego de la reacción enzimática. La producción de los productos de oxidación del pirocatecol se midieron como la variación de absorbancia a 410 nm, y los resultados se expresaron como la variación de absorbancia en una hora por miligramo de proteína ( $\Delta A \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

#### **2.2.8.3 Pectinmetil esterasa (PME; EC 3.1.1.11)**

Se aplicó la técnica de Vicente y col., (2005) modificada. Sobre 0,15 g de polvo de frutillas liofilizadas se adicionaron 6 mL de solución extractante (ClNa 1  $\text{mol L}^{-1}$ , PVPP 10  $\text{g L}^{-1}$ ). La mezcla se homogeneizó entre 20 y 30 segundos, y se agitó durante 4 horas a 4°C. Se centrifugó 30 min a 20,000  $g$ , se separó el sobrenadante, al cual se le ajustó el pH a 7,5 con

NaOH 1 eq L<sup>-1</sup>. La mezcla de reacción consistió en 600 µL de pectina cítrica 0,5% pH 7,5 (ajustada con NaOH 1 eq L<sup>-1</sup>), 150 µL azul de bromotimol 0,01% (preparado en tampón fosfato de potasio 3 mmol L<sup>-1</sup>), 100 µL de agua pH 7,5 (ajustada con NaOH 1 eq L<sup>-1</sup>) y 150 µL de extracto pH 7,5. Se registró la reducción de absorbancia  $\Delta A/\Delta t$  a 620 nm en 2 minutos. El  $\Delta A/\Delta t$  de cada muestra se convirtió en nanomoles de ácido galacturónico por miligramo de proteína por minuto (nmol AG mg<sup>-1</sup> proteína<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) con una curva patrón de ácido galacturónico.

#### **2.2.8.4 Poligalacturonasa (PG; EC 3.2.1.15)**

Extracción adaptada con modificaciones de Chisari y col., (2008). Reacción enzimática adaptada de Wang y col., (1997). Sobre 0,15 g de polvo de frutillas liofilizadas se agregaron 6 mL de tampón (0,1 mol L<sup>-1</sup> citrato de sodio, 0,2 mol L<sup>-1</sup> fosfato de sodio, 1 mol L<sup>-1</sup> ClNa, 10 g L<sup>-1</sup> PVPP, 1 mmol L<sup>-1</sup> DTT). La mezcla se homogeneizó entre 20 y 30 segundos, y se agitó durante 1 hora a 4°C. Se centrifugó 30 min a 20,000 g y se separó el sobrenadante. Se mezclaron 500 µL de extracto con 500 µL de sustrato (ácido poligalacturónico 0,5% en tampón acetato/acético 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 5) y se incubó durante 4 horas en baño térmico a 37°C. Luego se agregó a cada tubo 1 ml de DNS y se hirvió la mezcla durante 10 min. El DNS consistió de: 44 mmol L<sup>-1</sup> ácido dinitrosalicílico, 375 mmol L<sup>-1</sup> NaOH, 4 mmol L<sup>-1</sup> sulfito de sodio. Por último se agregaron 4 mL de agua destilada a cada tubo. Las lecturas se realizaron a 575 nm y los resultados se expresaron en nmol ácido galacturónico g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

#### **2.2.8.5 Determinación de proteínas**

La determinación de proteínas sobre los extractos de proteínas se realizó según Lowry y col., (1951).

#### **2.2.9 Color**

Se determinó el color de las frutas sobre muestras trituradas (aproximadamente 50 gramos por muestra), lo cual de acuerdo a experiencias previas se consideró representativo. Las muestras se colocaron en cubetas blancas de 1 cm de espesor, y se midieron utilizando un

espectrofotómetro Minolta 508d (Minolta Co., LTD., Japan), en las siguientes condiciones: iluminante D65, ángulo del observador 10°, SCE (componente especular excluido), evaluándose los parámetros correspondientes al sistema CIE:  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ . 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).

#### 2.2.10 Análisis microbiológico

Se realizaron recuentos de microorganismos aerobios mesófilos. Cada muestra de frutilla (10 g) se homogenizó con 90 mL de agua de peptona al 0,1% por 2 min en *stomacher*. Se efectuaron diluciones decimales con agua de peptona, sembrando 0,1 mL de las diluciones decimales, en superficie de placas de Petrifim<sup>TM</sup> 3M (3M S.A.C.I.F.A, Buenos Aires, Argentina). Las placas se incubaron a 30°C durante 48 hs y los recuentos se expresaron como unidades formadoras de colonia por gramo (UFC g<sup>-1</sup> FF). Los análisis se realizaron por triplicado.

### 2.3 Estudio de la operación de lavado-desinfección de frutillas frescas cortadas con ácido peracético (APA)

#### 2.3.1 Diagrama de procesamiento para la obtención de frutillas frescas cortadas

En la Figura 2.3 se resume el diagrama de la obtención de frutillas mínimamente procesadas, y se destaca la operación de lavado-desinfección, que será estudiada en esta parte. Diez Kg de frutillas fueron acondicionados como se describe en la sección 2.1.1. Posteriormente, las mismas fueron procesadas en una “zona limpia” de la planta piloto del Instituto de Tecnología de Alimentos, FIQ, UNL, con temperatura controlada a 18°C. Se cortaron en cuartos manualmente, con cuchillo de acero inoxidable de hoja lisa, realizando cortes en cuartos. La etapa de lavado-desinfección se realizó en las condiciones de concentración de ácido peracético (APA), tiempo (t) y temperatura (T) según lo indicado por el diseño experimental. Finalmente, las muestras de frutillas lavadas de cada corrida experimental (200 g) y una muestra de frutillas cortadas sin lavar (control) (200 g) se congelaron a -80°C hasta su análisis, excepto las destinadas a los análisis microbiológicos que se procesaron inmediatamente.

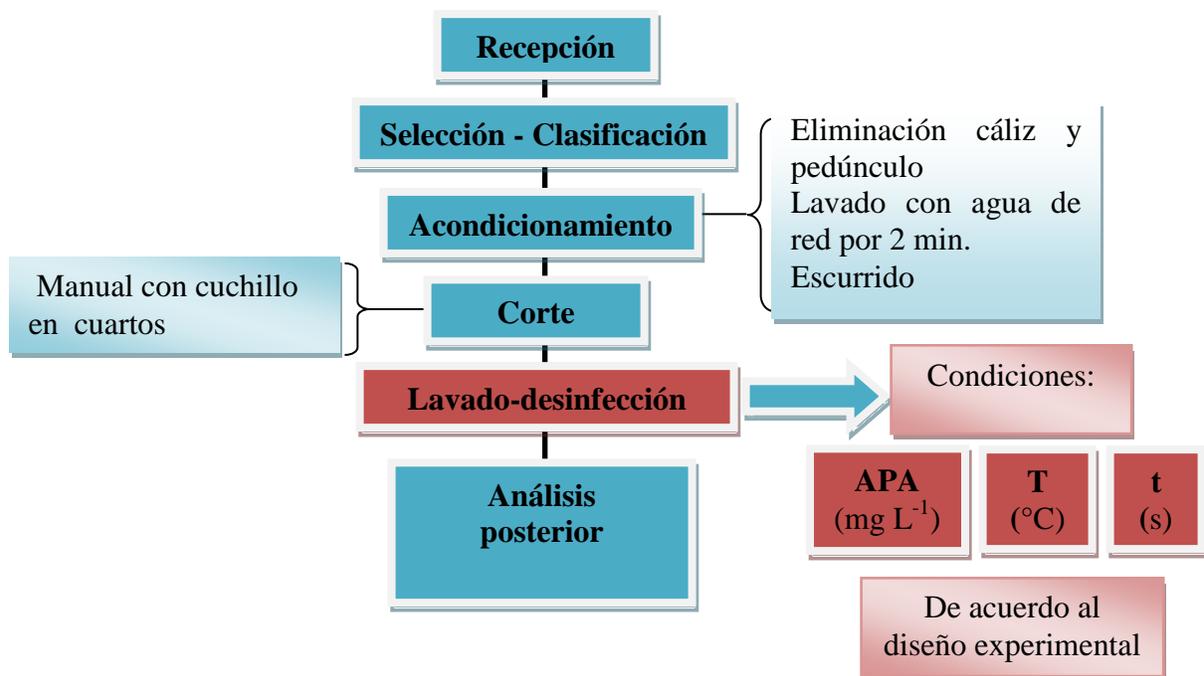


Figura 2.3. Diagrama de procesamiento seguido para obtener frutillas frescas cortadas.  
APA: ácido peracético, T: temperatura, t: tiempo.

### 2.3.2 Lavado-desinfección

Lotes de 200 g de frutillas frescas cortadas se colocaron en una cestilla de acero inoxidable y se lavaron con 600 mL de solución sanitizante (con una relación de 3 litros de solución de lavado por kilogramo de fruta), usando el dispositivo ilustrado en la Figura 2.4, con una agitación de 60 movimientos por minuto, con un escurrido final para eliminar el exceso de líquido. Para lograr las temperaturas ensayadas, se usaron baños termostáticos con temperatura controlada.

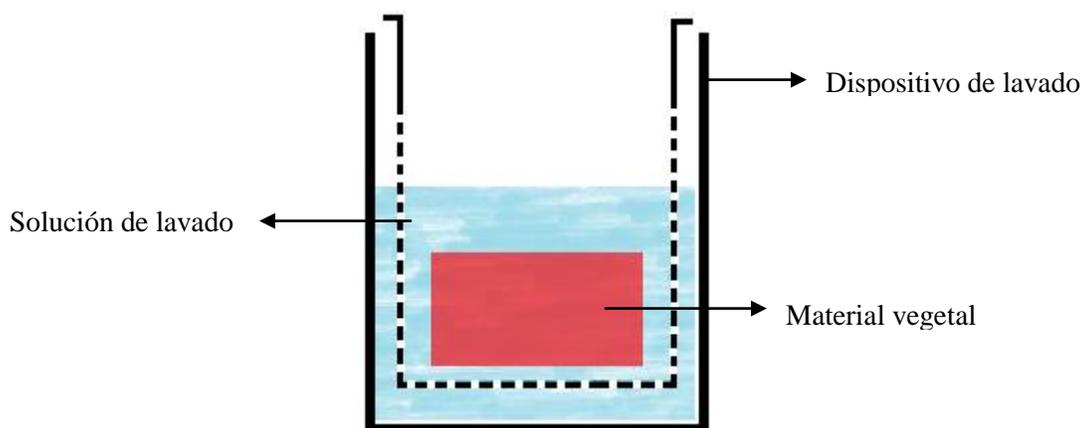


Figura 2.4. Gráfico ilustrativo del dispositivo empleado para lavar las frutillas frescas cortadas.

#### 2.3.2.1 Preparación de soluciones de ácido peracético

En la preparación de las soluciones de lavado-desinfección se utilizó un sanitizante comercial, llamado Oxilac Plus (Indaquim S.A., Santa Fe, Argentina). Oxilac Plus es una mezcla estabilizada de ácido peracético (APA) (mínimo 5%), peróxido de hidrógeno (mínimo 20%) y agua. La concentración de APA en la mezcla comercial se verificó con una titulación redox doble acuerdo a APHA-AWWA-WEF (1998). Donde, el contenido de peróxido de hidrógeno se titula primero con una solución normalizada de permanganato de potasio ( $0,025 \text{ eq L}^{-1}$ ). Luego de alcanzar el punto final, se agrega a la mezcla un exceso de solución de yoduro de potasio ( $500 \text{ g L}^{-1}$ ), y se continúa titulando con una solución de tiosulfato de sodio ( $0,005 \text{ eq L}^{-1}$ ). Finalmente, cuando la mezcla alcanza un color amarillo, se agrega un pequeño volumen de solución de almidón ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), que vuelve a la mezcla de un color oscuro amarronado, y se continúa titulando hasta que la mezcla vira al incoloro.

Las diferentes soluciones de APA utilizadas, de acuerdo al diseño de lavado-desinfección, se prepararon por dilución de cantidades apropiadas de Oxilac Plus con agua de red. Las

concentraciones de estas soluciones diluidas se chequearon con el método de titulación redox doble antes descripto.

### 2.3.3 Diseños experimentales

Para estudiar la operación de lavado-desinfección se empleó la metodología de superficie de respuesta (RSM) usando un diseño de Box-Behnken (3 factores en 3 niveles). Las bases teóricas, fundamentos y aplicaciones de este diseño han sido discutidas en numerosos trabajos (Box y Behnken, 1960, Floros, 1988, Giovani, 1983).

Se supuso que existía una función matemática para cada una de las respuestas estudiadas en función de los tres factores independientes del proceso (Ecuación 2.4):

$$Y_k = f(C, T, t) \quad (2.4)$$

Donde  $Y_k$  = Respuesta,  $C$  = concentración de ácido peracético ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $T$  = temperatura de la solución de lavado ( $^{\circ}\text{C}$ ) y  $t$  = tiempo de tratamiento (s).

La representación matemática exacta de las funciones  $Y_k$  es desconocida o extremadamente compleja.

Para aproximar la función, se usaron ecuaciones polinomiales de 2<sup>do</sup> orden (Ecuación 2.5):

$$Y_k = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^3 \beta_{ki} X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{kii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{kij} X_i X_j \quad (2.5)$$

Donde:  $\beta_{k0}$ ,  $\beta_{ki}$ , y  $\beta_{kij}$  son los coeficientes y  $X_i$  son las variables independientes codificadas.

Los diseños experimentales son dados en función de variables estandarizadas o codificadas ya que los niveles de las variables independientes pueden variar de una aplicación a otra.

Estas variables estandarizadas están linealmente relacionadas con los valores reales de las variables usadas (Ecuación 2.6).

$$X_i = 2(V_i - V_{im}) / R_i \quad (2.6)$$

Donde:  $V_i$  es el valor real del nivel de la variable,  $V_{im}$  es el promedio del nivel alto y bajo de  $V_i$  y  $R_i$  es la diferencia entre los niveles alto y bajos de  $V_i$ .

En la Tabla 2.3 se muestran los niveles, y cantidad de experiencias en el diseño experimental de superficie de respuesta de Box Behnken de 3 variables en 3 niveles.

El programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV 15.02.06 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EE. UU.) fue usado para el análisis de los datos a través del ANOVA y para comprobar la idoneidad de los modelos propuestos. Asimismo, permitió ajustar las ecuaciones polinomiales de 2° orden a los datos experimentales tanto en variables codificadas como sin codificar, graficar las superficies predichas a partir de los modelos y realizar operaciones de optimización en los rangos experimentales ensayados.

Tabla 2.3. Niveles de las variables y número de corridas experimentales

$X_1$	$X_2$	$X_3$	Número de corridas
$\pm 1$	$\pm 1$	0	
$\pm 1$	0	$\pm 1$	3 x 4 (combinaciones) = 12
0	$\pm 1$	$\pm 1$	
0	0	0	1 + 2 (réplicas en el punto central) = 3
			Total de corridas = 15

### 2.3.3.1 Límites del dominio experimental

Para la adopción del dominio experimental (límites para las tres variables operativas): se consideraron las especificaciones técnicas hechas por entes de regulación y bibliografía sobre la desinfección de vegetales mínimamente procesados con soluciones de ácido peracético. El Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos (CFR) permite el uso de APA en el agua de lavado de frutas y vegetales hasta en una concentración de 80 mg L<sup>-1</sup> (CFR, 2007). Sin embargo, como se indicó en la sección 1.5.2.2, algunos estudios indicaron que esta concentración de APA en el agua de lavado, no fue suficiente para obtener una reducción sustancial en la carga microbiológica inicial de vegetales mínimamente procesados (Wisniewsky y col., 2000, Nascimento y col., 2003, Hellstrom y col., 2006). Hilgren y Salverda, (2000), lavaron apio y repollo frescos cortados con 80 mg L<sup>-1</sup> de APA por 30 s a 25°C. Silveira y col., (2008) utilizaron 80 mg L<sup>-1</sup> de APA para el lavado-desinfección de cubos de melones frescos cortados en 1 y 5 minutos a 5°C. Por su parte, Vandekinderen y col., 2009, probaron la eficacia del APA a 25, 80, 150 y 200 mg L<sup>-1</sup>, variando los tiempos de lavado (1, 5 y 10 min) a 17°C en zanahorias, lechuga iceberg, puerro y repollo blanco frescos cortados.

Con estos antecedentes se delimitó el dominio experimental para el diseño de lavado desinfección N° 1 en: concentración de ácido peracético (APA): 0 - 80 mg L<sup>-1</sup>; temperatura

(T): 4 - 40°C y tiempo (t): 10 - 60 s. Posteriormente, se ampliaron estos límites en el diseño de lavado-desinfección N° 2 en función de los resultados logrados en la experiencia N°1 en concentración de ácido peracético (APA): 0 - 100 mg L<sup>-1</sup>; y tiempo (t): 10 - 120 s. La temperatura se mantuvo en los mismos niveles utilizados en el diseño N° 1.

### 2.3.3.2 Diseño de lavado-desinfección N° 1

En este diseño, la operación de lavado-desinfección se realizó sobre las frutillas variedad *Camarosa* descritas en el punto 2.1.1. Las frutillas se prepararon de acuerdo al diagrama de la Figura 2.3. Las variables independientes del proceso, las variables codificadas y sus niveles se presentan en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Diseño experimental de Box-Benhken, variables y niveles codificados y sin codificar para el lavado-desinfección N°1.

Variables Independientes	Símbolos		Niveles	
	Sin codificar	Codificadas	Sin codificar	Codificadas
Conc. ácido peracético (mg L <sup>-1</sup> )	C	X <sub>1</sub>	0	1
			40	0
			80	-1
Temperatura (°C)	T	X <sub>2</sub>	4	1
			22	0
			40	-1
Tiempo (s)	t	X <sub>3</sub>	10	1
			35	0
			60	-1

Los pH de las soluciones de APA fueron para 40 mg L<sup>-1</sup>: 4,15 y para 80 mg L<sup>-1</sup>: 3,94.

Las respuestas estudiadas fueron:

- Porcentaje de retención de ácido ascórbico (%R AA), y vitamina C (%R Vit C)
- Porcentaje de retención de capacidad antioxidante (% R CA)
- Porcentaje de retención de fenoles totales (% R FT)
- Porcentaje de retención de antocianinas totales (% R Ant T)
- Porcentaje de retención de sólidos solubles (% R SS)
- Porcentaje de cambio de pH (% C pH)
- Porcentaje de cambio de acidez total (% C AT)

- Cambio porcentual de los parámetros de color:  $\delta L^*$ ,  $\delta a^*$ ,  $\delta b^*$ ,  $\delta C_{ab}^*$  y  $\delta h_{ab}$
- Porcentaje relativo de actividad de las enzimas PAL, PPO, PME y PG

Los porcentajes de retención se refieren a los valores de los parámetros estudiados en las frutillas cortadas lavadas con respecto a los correspondientes en las frutillas cortadas sin lavar. Los porcentajes relativos de actividad enzimática se refieren a las actividades enzimáticas en las frutillas cortadas lavadas con respecto a la correspondiente de la fruta cortada sin lavar.

Los cambios de los parámetros de color ( $\delta L^*$ ,  $\delta a^*$ ,  $\delta b^*$ ,  $\delta C_{ab}^*$  y  $\delta h_{ab}$ ), AT y pH se expresaron como el porcentaje de la diferencia entre los valores de los parámetros en frutillas cortadas lavadas y los valores de los parámetros en las frutillas cortadas sin lavar, dividido por los valores de los parámetros de color de las frutillas cortadas no lavadas.

Por ejemplo:  $\delta L^* (\%) = (L^* - L_0^*) / L_0^* \times 100$

### 2.3.3.3 Diseño de lavado-desinfección N° 2

En este diseño, la operación de lavado desinfección se realizó con frutillas variedad *Selva* y *Camarosa*, descritas en la sección 2.1.1. Las frutillas se prepararon de acuerdo al diagrama de la Figura 2.3. En la Tabla 2.5 se presentan las variables independientes del proceso, las variables codificadas y sus niveles.

Tabla 2.5. Diseño experimental de Box-Benhken, variables y niveles codificados y sin codificar para el lavado-desinfección N° 2.

Variables Independientes	Símbolos		Niveles	
	Sin codificar	Codificadas	Sin codificar	Codificadas
Conc. ácido peracético (mg L <sup>-1</sup> )	C	X <sub>1</sub>	0	1
			50	0
			100	-1
Temperatura (°C)	T	X <sub>2</sub>	4	1
			22	0
			40	-1
Tiempo (s)	T	X <sub>3</sub>	10	1
			65	0
			120	-1

Los pH de las soluciones de APA fueron, para 50 mg L<sup>-1</sup>: 4,08 y para 100 mg L<sup>-1</sup>: 3,80.

Las respuestas estudiadas fueron:

- Porcentaje de retención de ácido ascórbico (% R AA), y vitamina C (% R Vit C)
- Porcentaje de retención de capacidad antioxidante (% R CA)
- Porcentaje de retención de fenoles totales (% R FT)
- Porcentaje de retención de antocianinas totales (% R Ant T)
- Porcentaje de retención de sólidos solubles (% R SS)
- Porcentaje de cambio de acidez total (% C AT)
- Porcentaje de cambio de pH (% C pH)
- Cambio porcentual de los parámetros de color:  $\delta L^*$ ,  $\delta a^*$ ,  $\delta b^*$ ,  $\delta C_{ab}^*$  y  $\delta h_{ab}$
- Reducción de microorganismos aerobios mesófilos (FAM). FAM =  $-\log N/N_0$ . Donde N = UFC g<sup>-1</sup> en la fruta cortada lavada y N<sub>0</sub> = UFC g<sup>-1</sup> de la fruta cortada sin lavar.

Los cálculos de los porcentajes de retención y cambio se explicaron en la sección 2.3.3.2.

En la Figura 2.5 se muestran los puntos de muestreo en el diagrama de flujo para las evaluaciones microbiológicas.

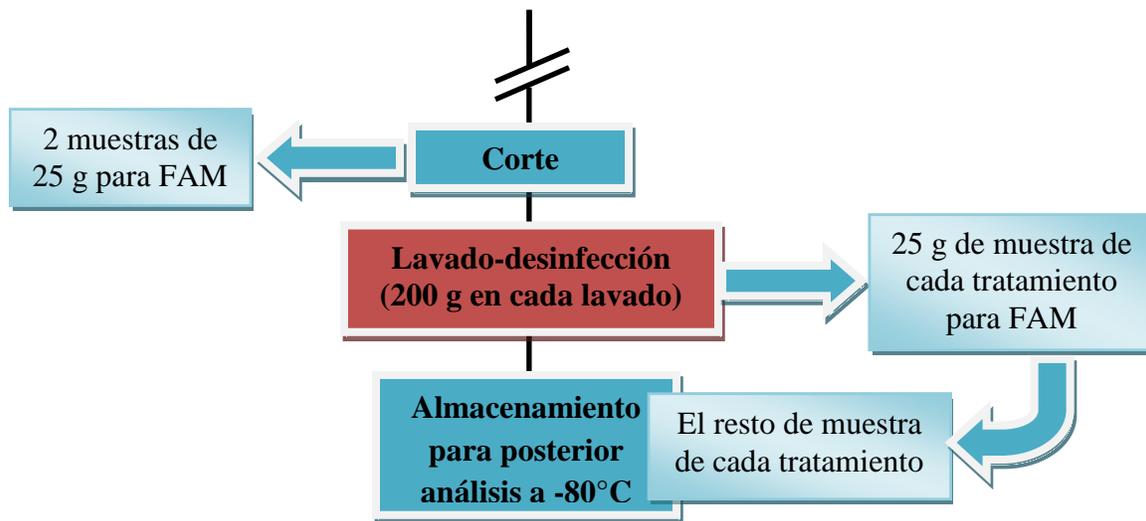


Figura 2.5. Diagrama de procesamiento seguido para obtener frutillas frescas cortadas, y toma de muestras para microbiología.

El número de corridas experimentales fueron 15 para cada variedad. El análisis de varianza, en principio, se realizó empleando los resultados obtenidos en las 30 corridas experimentales, teniendo en cuenta, el factor bloque: *variedad*. Cuando este factor no fue significativo, la respuesta se analizó en conjunto para las dos variedades, de lo contrario el análisis se llevó a cabo por separado para cada variedad.

#### 2.3.3.4 Validación del modelo en diferentes condiciones del proceso de lavado-desinfección establecidas a partir de la optimización de las múltiples respuestas simultáneamente

Se llevó a cabo una optimización del diseño de lavado-desinfección N° 2 con el software STATGRAPHIC Centurion XV 15.02.06 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, E.E. U.U.). Con todas las respuestas estudiadas que resultaron significativas con alguna de las variables del proceso en el cultivar de frutillas *Camarosa*, se procedió a realizar la optimización. En la optimización se planteo encontrar condiciones de las variables en donde se maximice la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales o se minimicen las pérdidas de compuestos bioactivos (AA y Ant T).

Se plantearon dos condiciones de optimización en el lavado-desinfección:

**Optimización 1:** priorizando la desinfección microbiológica.

**Optimización 2:** priorizando la retención de compuestos bioactivos.

Una vez obtenidas las condiciones que optimizaban según los objetivos planteados, se realizaron dos experiencias (una por cada optimización) en planta piloto con 4 Kg de frutillas variedad *Camarosa*. Luego de realizados los lavados, las frutillas mínimamente procesadas se destinaron: una parte (7 bandejas con 200 g cada una) a análisis sensorial por el panel experto del ITA y el resto para cuantificar las respuestas en esas condiciones de proceso. Posteriormente, para validar los modelos se compararon estadísticamente con un *test t* “por pares” los resultados experimentales y los predichos por los modelos.

#### **2.3.3.4.1 Análisis sensorial**

La evaluación de las características sensoriales de las muestras de frutillas mínimamente procesadas se llevó a cabo mediante un *test* descriptivo cuantitativo. Se requirió del panel sensorial entrenado del ITA, formado por 8 jueces (3 hombres y 5 mujeres), con experiencia en evaluar calidad de vegetales frescos.

En el Instituto de Tecnología de Alimentos se dispone de 8 cabinas realizadas de madera recubierta con laminado plástico de color blanco, que fueron usadas para las evaluaciones. Cada cabina consiste de una mesada ubicada a 80 cm del suelo con 3 paredes (2 laterales y una frontal), que se elevan 60 cm por encima de la mesada. El panelista se ubica frente a la mesada sin posibilidad de ver a otros panelistas. La iluminación en la sala es con luz fluorescente, la ventilación adecuada y climatizada a 18°C.

Durante un entrenamiento específico, en sesiones de 5x30 minutos, los panelistas discutieron sobre el significado de cada uno de los atributos (apariencia general, olor genuino, aroma genuino, *flavor* genuino, gusto ácido y gusto dulce) y defectos (olores extraños, sabores extraños y oscurecimiento) seleccionados (Figura 2.6) (Reyes, 2007).

Los atributos y defectos seleccionados se pueden definir como:

**Apriencia general:** relacionado con el aspecto general o impacto visual del producto, comprende aspectos como frescura, color, brillo y/o deshidratación superficial, todos percibidos por la vista. Respecto a las frutillas, se solicitó a los panelistas que consideren

que existe una variabilidad natural de estas frutas que hacen que, aun teniendo todas 90-100 % de color rojo en su superficie, exista variación leve en la tonalidad de los rojos.

**Olor genuino:** relacionado con el olor natural, típico de la frutilla.

**Off-odors:** relacionado con la aparición o desarrollo de olores alcohólicos, a “moho”, a “tierra”, a algún agente sanitizante (ácido peracético), etc.

**Oscurecimiento:** relacionado a la presencia de tonos marrones o pardos, especialmente en las zonas de corte.

**Firmeza:** relacionado a la fuerza que se ejerce al morder a un tejido firme, turgente. Sin embargo, se acordó con los panelistas expertos que esa firmeza no sea excesiva ya que las fresas están consideradas como frutas “tiernas”.

**Aroma genuino:** relacionado al atributo sensorial de frutillas percibido por el órgano olfatorio vía retronasal durante la degustación.

**Flavor genuino:** relacionado con la combinación de sensaciones olfativas, gustativas y trigeminales percibidas durante la degustación que caracterizan a esta fruta, combina un sabor dulce con un cierto nivel de acidez más olor típico a frutilla.

**Off-flavor:** relacionado con la aparición o desarrollo de cualquier *flavor* extraño, ajeno a lo natural y/o propio de las frutillas.

Para el entrenamiento del panel se emplearon distintas muestras de frutillas:

- 1- Frutillas intactas con menos de 1 día de cosecha.
- 2- Frutillas frescas cortadas en cuartos lavadas con agua por 2 min.
- 3- Frutillas frescas cortadas en cuartos lavadas con 50 mg L<sup>-1</sup> de APA por 2 min.
- 4- Frutillas frescas cortadas en cuartos lavadas con 100 mg L<sup>-1</sup> de APA por 2 min.

Las muestras de frutillas lavadas en los puntos de optimización, evaluadas por el panel sensorial consistieron de:

- 1- **Muestras blancos:** Frutillas frescas pre-lavadas con agua por 2 min y cortadas en cuartos.
- 2- **Optimización 1 y 2:** frutillas frescas cortadas en cuartos lavadas con una concentración de APA, temperatura y tiempo de lavado, de acuerdo a las condiciones de optimización correspondiente.

Cada muestra se identificó con números de tres dígitos asignados al azar.

Las distintas muestras de frutillas se prepararon el día anterior en bandejas PET de 270 cm<sup>3</sup> con 50 g cada una, se almacenaron a 6°C y se dejaron a temperatura ambiente una hora antes de las evaluaciones.

La intensidad de cada atributo se indicó colocando una marca sobre una escala lineal no estructurada, con términos anclas ubicados a 1 cm de cada extremo de la línea de 10 cm. La cuantificación de las respuestas se hizo midiendo la distancia desde el extremo izquierdo hasta la marca señalada por el panelista, expresándose en cm. Los términos anclas de izquierda a derecha fueron los siguientes: “1: mala” y “9: excelente” para apariencia general; “1: suave (apenas perceptible) y “9: intenso (muy perceptible)” para olor genuino, olores extraños, aroma genuino, flavor genuino y sabores extraños; “1: poco (apenas perceptible) y “9: intenso (muy perceptible) para oscurecimiento y gusto ácido y dulce; y “1: muy blanda” y “9: firme” para firmeza (Figura 2.6).

#### **2.3.3.4.2 Análisis estadístico**

Se usó el programa Microsoft Excel® para calcular los valores de las medias y desviación estándar de los atributos sensoriales dados por el panel entrenado. El programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV 15.02.06 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EE. UU.) fue usado para el análisis de los datos a través del ANOVA de una vía.

**EVALUACION SENSORIAL DE FRUTILLA**

Nombre y Apellido: ..... Fecha: .....

Se presentan muestras de frutilla identificadas con números aleatorios. Evalúe cuidadosamente los atributos indicados y marque en la escala correspondiente de acuerdo a la intensidad percibida.

Atributo/Descriptor

Apariencia General	-----	-----
	<b>1</b>	<b>9</b>
	<b>Mala</b>	<b>Muy buena</b>
Olor genuino	-----	-----
	<b>1</b>	<b>9</b>
	<b>Suave (apenas perceptible)</b>	<b>Intenso (muy perceptible)</b>
Off -Odors	-----	-----
	<b>1</b>	<b>9</b>
	<b>Suave (apenas perceptible)</b>	<b>Intenso (muy perceptible)</b>
Oscurecimiento	-----	-----
	<b>1</b>	<b>9</b>
	<b>Poco (apenas perceptible)</b>	<b>Mucho (muy perceptible)</b>
Firmeza	-----	-----
	<b>1</b>	<b>9</b>
	<b>Muy blanda</b>	<b>Muy Firme</b>
Aroma genuino	-----	-----
	<b>1</b>	<b>9</b>
	<b>Suave (apenas perceptible)</b>	<b>Intenso (muy perceptible)</b>
Flavor genuino	-----	-----
	<b>1</b>	<b>9</b>
	<b>Suave (apenas perceptible)</b>	<b>Intenso (muy perceptible)</b>
Gusto Ácido	-----	-----
	<b>1</b>	<b>9</b>
	<b>Poco (apenas perceptible)</b>	<b>Intenso (muy perceptible)</b>
Gusto dulce	-----	-----
	<b>1</b>	<b>9</b>
	<b>Poco (apenas perceptible)</b>	<b>Intenso (muy perceptible)</b>
Off-Flavor	-----	-----
	<b>1</b>	<b>9</b>
	<b>Suave (apenas perceptible)</b>	<b>Intenso (muy perceptible)</b>

Figura 2.6. Modelo de planilla utilizada para el análisis sensorial.

## 2.4 Estudio de las operaciones de corte y el almacenamiento de frutillas frescas cortadas.

### 2.4.1 Diagrama de procesamiento para la obtención de frutillas frescas cortadas

En la Figura 2.7 se resume el diagrama de la obtención de frutillas mínimamente procesadas, y se destacan las operaciones de corte y conservación, que serán estudiadas en esta parte. Partiendo de 20 Kg de frutillas variedad *Camarosa*, acondicionadas como se describe en la sección 2.1.1, se continuó con el mínimo procesamiento en una “zona limpia” de la planta piloto del Instituto de Tecnología de Alimentos, FIQ, UNL, con temperatura controlada a 18°C.

El corte de las frutillas fue manual, con cuchillo de acero inoxidable de hoja lisa, realizando cortes en mitades y cuartos longitudinales. Frutillas enteras despedunculadas sin cortar se incluyeron también en el estudio.

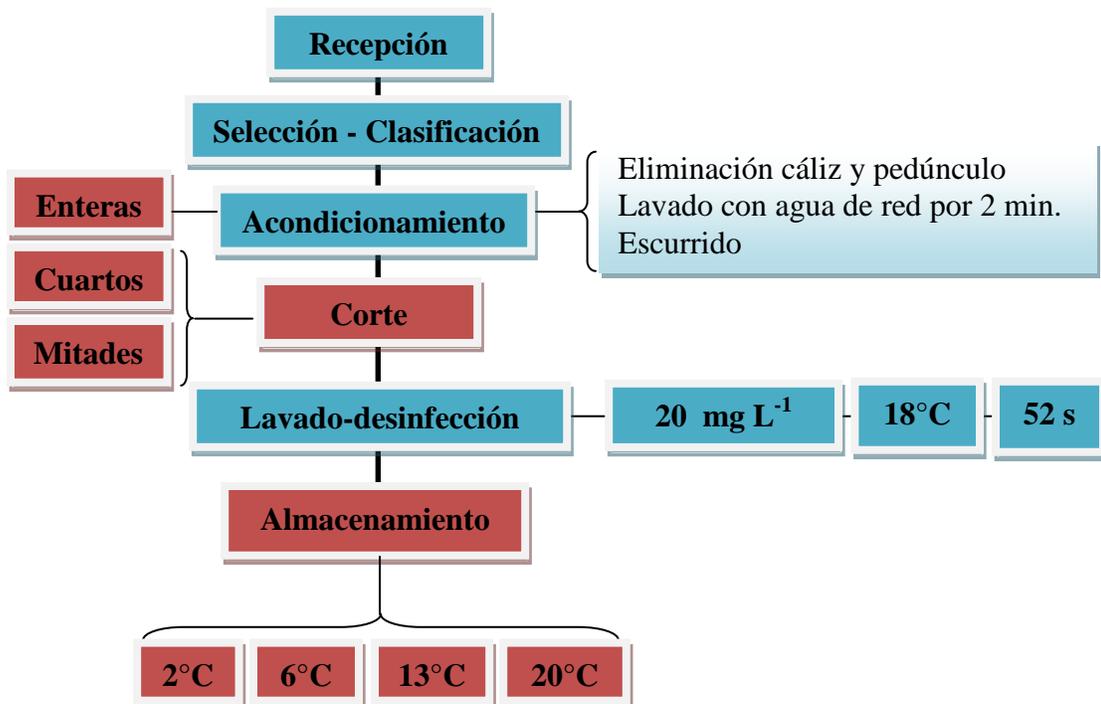


Figura 2.7. Diagrama de procesamiento seguido para obtener frutillas frescas cortadas.  
APA: ácido peracético.

La etapa de lavado–desinfección se realizó en los niveles de las variables obtenidos en la condición de optimización que priorizaba la retención de compuestos bioactivos (Sección

2.3.3.4). Los lavados se hicieron usando el dispositivo ilustrado en la Figura 2.4, con una agitación de 60 movimientos por minuto, una relación de 3 L de solución de lavado por Kg de fruta, y un escurrido final para eliminar el exceso de líquido.

Finalmente, aproximadamente 100 g de muestras de frutillas de cada tipo de corte incluyendo las frutillas enteras despedunculadas se colocaron en bandejas PET y se almacenaron a 2, 6, 13 y 20°C, bajo atmósfera modificada pasiva.

Los períodos de almacenamiento de las frutillas dependieron del tipo de corte practicado y de la temperatura. En experiencias previas se determinó tentativamente el período de aptitud de las frutillas a cada temperatura. Para ello se utilizaron frutillas enteras despedunculadas, las que menos daño mecánico presentaban y las que se estimaba tendrían mayor período de aptitud. De los resultados obtenidos se decidió conservar las frutillas almacenadas a 2°C por un período de 15 días, a 6°C por 10 días, a 13°C por 8- 9 días y a 20°C por un período de 2- 3 días.

#### 2.4.2 Toma de muestra y análisis

En la Tabla 2.6 se presentan los puntos de muestreo que se llevaron a cabo en cada tipo de corte y temperatura. En el momento de la toma de muestra se separaron dos bandejas de 100 g por tratamiento y se inspeccionaron para comprobar su buen estado de conservación. El contenido de cada bandeja se colocó en bolsas plásticas y se guardó a -80°C hasta su análisis. 50 g de frutillas por tratamiento se separaron del resto y se reservaron para realizar medidas de color en las muestras frescas.

Las respuestas estudiadas fueron:

- Contenido de ácido ascórbico (AA), ácido dehidroascórbico (ADHA), y vitamina C (Vit C).
- Contenido de fenoles totales (FT)
- Contenido de antocianinas totales (Ant T)
- Contenido de capacidad antioxidante (CA)
- Contenido de sólidos solubles (SS)
- Contenido de pH
- Parámetros de color:  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$

Tabla 2.6. Puntos de muestreo para cada tipo de corte y temperatura.

Temp.	Días Corte	0	1/2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
		2°C	ED	X		X		X			X		X		X		X	
CM	X			X		X			X		X		X		X			X
CC	X			X		X			X		X		X		X			X
6°C	ED	X		X		X			X		X		X					
	CM	X		X		X			X		X		X					
	CC	X		X		X			X		X		X					
13°C	ED	X		X		X			X	X	X	X						
	CM	X		X		X			X	X	X							
	CC	X		X		X			X	X	X							
20°C	ED	X	X	X	X	X												
	CM	X	X	X	X	X												
	CC	X	X	X	X													

ED: frutillas enteras despedunculadas; CM: frutillas cortadas en mitades y CC: frutillas cortadas en cuartos.

### 2.4.3 Modelado matemático de los cambios en los atributos estudiados

Los cambios en el tiempo de las respuestas estudiadas se investigaron usando la Ecuación 2.7:

$$\pm \frac{dQ}{dt} = k_Q (Q)^n \quad (2.7)$$

Donde Q es la respuesta estudiada, t el tiempo,  $k_Q$  es la constante de velocidad de cambio de la respuesta estudiada para el atributo Q, y n el orden de la reacción cinética. La mayoría de las reacciones llevadas a cabo en alimentos, son descritas con un orden 0 a 1, siendo menos frecuentes el uso de otros órdenes de reacción.

El signo (+) se refiere a una respuesta que incrementa su valor con el tiempo, y el signo (-) se refiere a respuestas cuyos valores disminuyen con el tiempo.

Se usaron análisis de regresión para determinar los órdenes cinéticos de las velocidades de cambio de las respuestas estudiadas, a través del análisis del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), de los residuos, y del valor estimado de la ordenada al origen.

El efecto de la temperatura sobre la constante de velocidad de reacción se describió usando la ecuación de Arrhenius (Ecuación 2.8):

$$K = K_0 \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (2.8)$$

Donde  $K_0$  es el factor pre-exponencial,  $E_a$  es la energía de activación,  $R$  es la constante de los gases ideales ( $8,3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) y  $T$  es la temperatura (K).

El conocimiento de los parámetros cinéticos (constantes de reacción y energías de activación) permitirán contar con modelos para predecir o estimar la disminución o aumento de las respuestas estudiadas a distintos grados de corte y temperaturas.

# **3. Resultados y Discusión**

---

### **3.1 Desarrollo y puesta a punto de métodos y técnicas analíticas**

#### **3.1.1 Determinación de vitamina C en frutillas: optimización y validación de un método de cromatografía líquida de alta performance con detección ultravioleta (HPLC-UV) usando diseños experimentales**

##### **3.1.1.1 Determinación de ácido ascórbico (AA) y ácido ascórbico total (AAT) o vitamina C: optimización del método HPLC usando metodología de superficie respuesta**

La metodología de superficie respuesta (RSM) utiliza modelos polinomiales de segundo orden para describir respuestas de variables cromatográficas en una región experimental determinada. El primer paso en la aplicación de un diseño experimental para la optimización de condiciones cromatográficas son la selección de los factores más críticos para la determinación del analito, sus rangos apropiados y el equipamiento que será empleado. En este trabajo, estas consideraciones se tuvieron en cuenta a través de la investigación en literatura preexistente, en la realización de experimentos preliminares, y en limitaciones instrumentales conocidas. Por ejemplo, el sistema HPLC empleado no proveía de detección por arreglos de diodo, por lo tanto, para conocer la longitud de onda óptima de absorción de los analitos, se definió esta variable como un factor del diseño.

El diseño experimental elegido para la determinación de AA y AAT o Vitamina C fue un diseño de Box-Behnken de 15 corridas experimentales. Las bases teóricas y fundamentos se revisaron en la sección 2.3.3. Los factores (longitud de onda, pH y velocidad de flujo de la fase móvil), y sus correspondientes niveles se exponen en las Tablas 2.1 y 3.1.

Los resultados experimentales de las respuestas estudiadas (áreas, tiempos de retención y anchos de pico de AA y AAT) se muestran en la Tabla 3.1. Los análisis de cada respuesta indicaron que:

- Las áreas de ácido ascórbico (AA) incrementaban a medida que el pH de la fase móvil aumentaba y la velocidad de flujo disminuía (Figura 3.1a).
- Los valores de pH y velocidades de flujo de la fase móvil más altos produjeron los tiempos de retención de AA más cortos (Figura 3.1b).

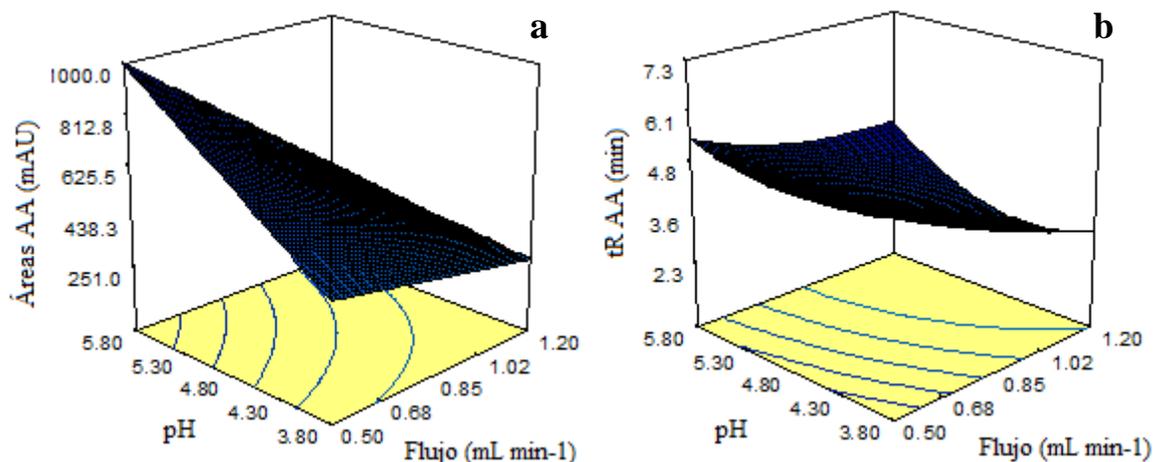
- Un incremento de la velocidad de flujo consecuentemente con valores de pH más bajos en la fase móvil produjeron los anchos de pico más angostos (Figura 3.1c).

Un comportamiento similar se observó para la determinación de ácido ascórbico total (Figuras no mostradas).

Tabla 3.1. Resultados experimentales para áreas, tiempos de retención ( $t_R$ ) y anchos de pico ( $w$ ) de ácido ascórbico (AA) y ácido ascórbico total (AAT) en las condiciones del diseño.

Nº corrida	pH Fase Móvil	Velocidad de Flujo ( $\text{ml min}^{-1}$ )	Longitud de onda (nm)	Áreas AA	Áreas AAT	$t_R$ AA (min)	$t_R$ AAT (min)	$w$ AA (s)	$w$ AAT (s)
1	4,8	0,85	255	507,5	593,1	3,5	3,5	29,3	30,8
2	4,8	0,85	255	573,4	547,0	3,6	3,5	25,4	31,1
3	4,8	0,85	255	569,3	544,1	3,5	3,5	26,5	34,0
4	4,8	0,50	270	441,5	395,9	6,0	5,9	34,6	42,1
5	4,8	0,50	240	640,9	634,7	6,0	5,9	37,6	45,6
6	5,8	0,50	255	1098,4	1132,9	5,4	5,4	39,0	40,9
7	5,8	1,20	255	457,4	451,7	2,3	2,2	17,8	19,4
8	3,8	1,20	255	140,8	139,6	3,1	3,1	13,5	16,9
9	3,8	0,50	255	345,4	355,1	7,4	7,4	28,5	37,4
10	4,8	1,20	270	176,8	155,6	2,5	2,5	16,5	17,5
11	3,8	0,85	240	340,4	344,0	4,4	4,4	21,9	25,4
12	5,8	0,85	270	306,3	328,4	3,2	3,2	18,9	22,0
13	4,8	1,20	240	276,9	272,8	2,5	2,4	17,9	20,6
14	3,8	0,85	270	62,1	56,5	4,4	4,4	13,8	17,0
15	5,8	0,85	240	426,4	437,5	3,2	3,2	20,9	23,5

Las corridas experimentales fueran hechas en orden aleatorio.



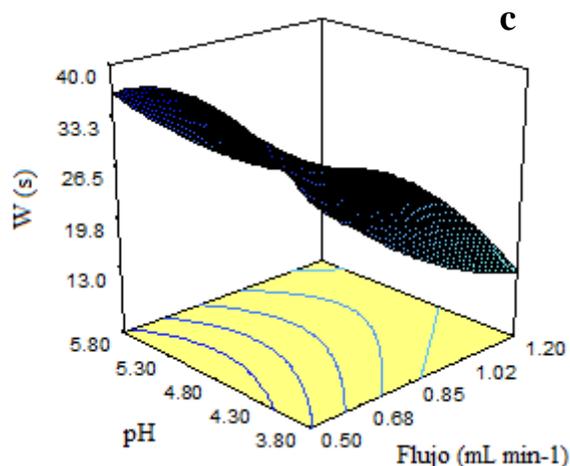


Figura 3.1. Efectos del pH y la velocidad de flujo de la fase móvil sobre las áreas de AA (a), el tiempo de retención (b) y el ancho de pico (c) a una longitud de onda de 255 nm.

Un análisis exhaustivo de los correspondientes modelos de RSM obtenidos para cada respuesta, reveló que los factores longitud de onda, pH y velocidad de flujo de la fase móvil, afectaban a las respuestas de distintas maneras.

Esta situación enfatizó la necesidad de realizar una optimización multifactor activa de la separación cromatográfica. El objetivo de esta operación es encontrar un compromiso entre todas las respuestas, ya que un punto experimental puede ser el mejor para una respuesta, no siendo el mejor para otras respuestas estudiadas (Dewé y col., 2004).

Para la optimización simultánea de las respuestas estudiadas se empleó la metodología desarrollada por Derringer y Suich, (1980). El método involucra la transformación de cada respuesta predicha,  $\hat{y}$ , a una función deseabilidad parcial adimensional,  $d_i$ . Se utilizan funciones de uno o dos lados, dependiendo de si las  $n$  respuestas estudiadas tienen que ser maximizadas, minimizadas o tienen que tomar un valor objetivo. Por ejemplo si la respuesta  $i$  tiene que ser maximizada, la función  $d_i$  se define como:

$$d_i = \left( \frac{\hat{y}-A}{B-A} \right)^{w_i}, \quad A \leq \hat{y} \leq B \quad (3.1)$$

$$d_i = 1, \quad \hat{y} > B$$

$$d_i = 0, \quad \hat{y} < A$$

En la Ecuación 3.1, A y B son los valores más bajo y más alto obtenidos para la respuesta  $i$ , respectivamente; y  $w_i$  es el peso. La función  $d_i$  varía entre 0, para una respuesta completamente indeseable, y 1, para una respuesta completamente deseable. Cuando el valor de  $w_i$  es igual a 1, la función  $d_i$  varía linealmente mientras se acerca al valor deseado.

Las funciones deseabilidad parcial ( $d_i$ ) se combinan en una respuesta simple combinada, llamada función deseabilidad global ( $D$ ) (Ecuación 3.2), definida como la media geométrica de los diferentes valores de  $d_i$ :

$$D = [d_1^{p_1} \times d_2^{p_2} \times \dots \times d_n^{p_n}]^{1/n} \quad (3.2)$$

Un valor de  $D$  diferente de cero implica que todas las respuestas están simultáneamente en un rango deseable; para un valor de  $D$  cercano a 1, la combinación de los diferentes criterios es globalmente óptima. En la Ecuación 3.2,  $p_i$  es la importancia relativa asignada a la respuesta  $i$ . La importancia relativa  $p_i$  es una escala comparativa de peso de cada uno de las funciones  $d_i$  en el producto de la deseabilidad global, y varía desde la menos importante ( $d_i = 1$ ) a la más importante ( $d_i = 5$ ).

De esta manera, se calculó la función deseabilidad de Derringer (deseabilidad global), maximizando los valores de las áreas cromatográficas y minimizando los tiempos de retención y los anchos de pico.

Inicialmente, la función deseabilidad global se calculó para las respuestas estudiadas (áreas, tiempos de retención y anchos de pico) para la determinación de AA (deseabilidad global = 0,83) y de AAT (deseabilidad global = 0,86). Los criterios de optimización utilizados se muestran en la Tabla 3.2. Estos procedimientos de optimización predijeron valores óptimos de longitud de onda diferentes para los análisis de AA (253 nm) y de AAT (249 nm); mientras que los valores predichos óptimos para el pH (5,8) y la velocidad de flujo (1,15 mL min<sup>-1</sup>) de la fase móvil resultaron iguales para ambos casos. La diferencia entre las longitudes de onda obtenidas para AA y AAT se puede explicar por el pequeño cambio de pH producido en la muestra de AA estándar usada para la optimización luego del agregado del reductor DTT. El ácido ascórbico es un compuesto que absorbe en el espectro ultravioleta en el rango 244 – 265 nm, y su absorción depende del pH de la solución (Nováková y col., 2008, Tannenbaum, 1982).

Finalmente, la función deseabilidad global se calculó para las respuestas estudiadas (áreas, tiempos de retención y anchos de pico) en las determinaciones de AA y AAT, conjuntamente.

Los resultados indicaron un valor de deseabilidad global de 0,84 en la determinación de AA y AAT, con un pH de la fase móvil igual a 5,8; una velocidad de flujo de 1,15 mL min<sup>-1</sup>; y una longitud de onda de 251 nm (Figura 3.2).

Tabla 3.2. Criterios utilizados en la optimización usando la función de Derringer

Respuesta	Límite inferior	Límite superior	Criterios	
			Objetivo	$\rho_i$
Área AA	62,065	1098,35	maximice	1
Área AAT	56,4567	1132,94	maximice	1
$t_R$ AA	2,2585	7,4	minimice	5
$t_R$ AAT	2,24363	7,40613	minimice	5
w AA	13,5	38,9583	minimice	2
w AAT	16,875	45,625	minimice	2

$\rho_i$ : importancia relativa, AA: ácido ascórbico y AAT: ácido ascórbico total.

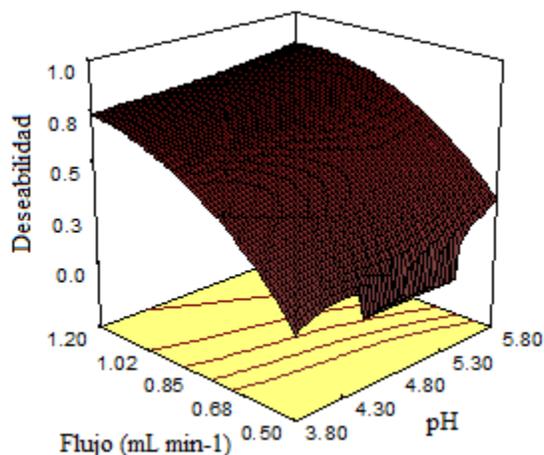


Figura 3.2. Deseabilidad global de Derringer obtenida para la optimización simultánea (a una longitud de onda de 251 nm) de todas las respuestas (áreas, tiempos de retención y anchos de picos de AA y AAT).

Un cromatograma típico en estas condiciones óptimas se muestra en la Figura 3.3; en esta situación, se observó un tiempo de retención de aproximadamente 2,4 min para la detección de AA y AAT.

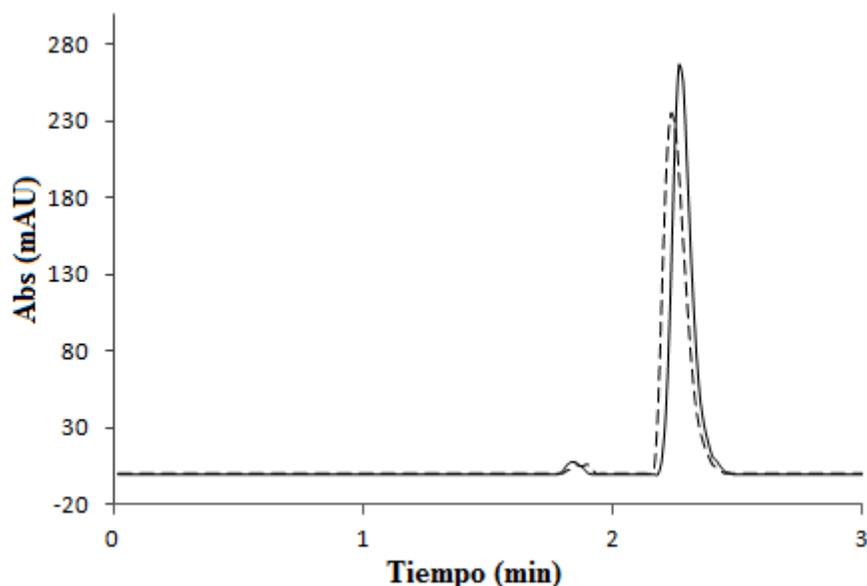


Figura 3.3. Cromatograma típico obtenido para ácido ascórbico (línea punteada) y ácido ascórbico total o vitamina C (línea continua), a 251 nm, y una fase móvil de pH 5,8 y una velocidad de flujo de 1,15 mL min<sup>-1</sup>.

### 3.1.1.2. Validación del método de HPLC para la determinación de AA y AAT en frutillas

Los experimentos de validación se llevaron a cabo en las condiciones que resultaron de la optimización del sistema: pH de la fase móvil: 5,8 (solución buffer ácido acético/acetato 0,03 mol L<sup>-1</sup>, 5% metanol); velocidad de flujo: 1,15 mL min<sup>-1</sup>; longitud de onda: 251 nm.

#### 3.1.1.2.1 Estudio de la linealidad

La linealidad fue evaluada para el procedimiento de determinación de AA y AAT utilizando soluciones estándares (sección 2.2.1.6.1). La homocedasticidad y la linealidad de los datos se analizaron a través de pruebas *F*, de acuerdo a Danzer y Currie, (1998). Para la homocedasticidad, las diferencias entre los valores de *F* observados y los valores de *F* críticos no fueron significativas para ninguna de las curvas de calibración de AA y AAT (Tabla 3.3).

La linealidad de un método se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta. Las áreas de los picos (*y*) se graficaron en función de las concentraciones de ácido ascórbico (*x*), y se realizó un análisis de cuadrados mínimos. En

la Tabla 3.3, se presentan los coeficientes del modelo lineal para la determinación de AA y AAT.

Para las pruebas de linealidad, se calculó un valor experimental de  $F$  dado por (Ecuación 3.3):

$$F_{\text{exp}} = \frac{(S_{y/x})^2}{(S_y)^2} \quad (3.3)$$

Donde  $S_{y/x}$  corresponde al error estándar de los residuos de la regresión y  $S_y$  es una estimación del error instrumental. El valor del  $F$  experimental se comparó con valores de  $F$  tabulados. Las pruebas de linealidad no excedieron los valores tabulados (Tabla 3.3), por lo tanto se puede asumir una relación lineal entre las áreas (variable dependiente) y la concentración de AA y AA con reducción por DTT (AAT) (variable independiente), en el del rango de concentraciones ensayado. Además, se comprobó una distribución normal en los gráficos de residuos (no mostrados).

Tabla 3.3. Análisis estadístico para la linealidad de las curvas de calibración de ácido ascórbico (AA) y ácido ascórbico total (AAT).

Ítem	Resultados	
	AA	AAT
Prueba $F$ para la evaluación de la homocedasticidad	1,50 (19) <sup>a</sup>	2,51 (19) <sup>b</sup>
Prueba $F$ para la evaluación de la linealidad	1,00 (2,89) <sup>c</sup>	2,66 (2,89) <sup>d</sup>
Sensibilidad de calibración	34,9	35,4
Curva de Calibrado	$y = 34,9x - 46,8$	$y = 35,4x - 45,2$
$R^2$	0,996	0,998

Los valores entre paréntesis corresponden a valores críticos a  $\alpha = 0.05$  y los grados de libertad: <sup>a=b</sup>( $v_1 = 2, v_2 = 2$ ); <sup>c=d</sup>( $v_1 = 13, v_2 = 10$ ).

### 3.1.1.2.2 Estudio de los límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LOD) se define como la mínima concentración detectable de manera confiable por la técnica, y el límite de cuantificación (LOQ) es la mínima concentración cuantificable de manera confiable por esta.

LOD y LOQ fueron calculados por las Ecuaciones 3.4 y 3.5 de acuerdo a Olivieri y Goicoechea, (2007):

$$LOD = 3,3 S_0 \quad (3.4)$$

$$LOQ = 10 S_0 \quad (3.5)$$

$S_0$  es la desviación estándar de la concentración de analito predicha en una muestra blanco y depende del nivel de ruido en la respuesta, la pendiente de la curva de calibración y la concentración de analito en las muestras de calibración (Boque y col., 2002, Muñoz de la Peña y col., 2006, Olivieri y Goicoechea, 2007).

Las magnitudes de ambos límites están asociadas a la sensibilidad del método. Los valores de LOD obtenidos para ácido ascórbico y ácido ascórbico total fueron  $1,2 \cdot 10^{-3}$  y  $8,8 \cdot 10^{-4}$  g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Los valores de LOQ fueron  $3,4 \cdot 10^{-3}$  g L<sup>-1</sup> para el ácido ascórbico y  $2,5 \cdot 10^{-3}$  para el ácido ascórbico total. El hecho de que los valores de LOQ obtenidos sean más bajos que todos los valores de concentración de AA hallados en las muestras de frutillas, es una clara evidencia de la validez del método.

### 3.1.1.2.3 Estudio de las sensibilidades de calibración y analítica

La sensibilidad de calibración (SEN) es igual a la pendiente de la curva de calibración e indica la variación de la respuesta producida por el cambio en una unidad de la concentración de analito. La pendiente de la curva de calibración de AAT fue más alta que la de AA (Tabla 3.3), por lo tanto se puede considerar que la detección de AAT es ligeramente más sensible que la detección de AA.

La sensibilidad analítica ( $\gamma$ ) (Ecuación 3.6) se define como la relación entre la SEN y el ruido instrumental, este último puede estimarse con el valor de la desviación estándar de los residuos de la regresión lineal (Muñoz de la Peña y col., 2003).

$$\gamma = \frac{SEN}{S_{y/x}} \quad (3.6)$$

El parámetro  $\gamma$  se interpreta mejor en términos de su inversa ( $\gamma$ )<sup>-1</sup>. Los valores de  $\gamma$ <sup>-1</sup> obtenidos para AA y AAT fueron  $4,10 \cdot 10^{-4}$  y  $3,0 \cdot 10^{-4}$  g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Como la inversa de la sensibilidad analítica indica la menor concentración que es detectable a través de la implementación del método, estos resultados indicarían una mejor sensibilidad en la determinación de AAT.

#### 3.1.1.2.4 Estudio de la precisión

La precisión de método se estudió en términos de su repetibilidad o variación intra-diaria. Se analizaron 6 muestras independientes de frutillas variedad *Selva* luego de la implementación del método analítico completo. En la Tabla 3.4 se muestran los contenidos medio de ácido ascórbico, ácido ascórbico total, ácido dehidroascórbico y sus correspondientes valores de repetibilidad ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  de fruta fresca). La repetibilidad de las muestras se expresó en términos de su desviación estándar relativa (RSD %) (Ecuación 3.7)

$$\text{RSD (\%)} = \frac{\text{Sd}}{\bar{x}} 100 \quad (3.7)$$

Donde  $\bar{x}$  y Sd son la media y la desviación estándar de las concentraciones de AA, AAT y ADHA en las 6 muestras de frutillas. Los valores de repetibilidad obtenidos están de acuerdo con los valores máximos (RSD % = 5,3) recomendados por la *Association of Official Analytical Chemists*, para analitos que representen en la muestra entre el 0,1 y 0,01% (AOAC, 1998).

Los resultados indicaron una buena repetibilidad del método, incluso para la determinación de ADHA. Este último resultado estaría de acuerdo con Sánchez-Mata y col., (2000), quienes propusieron el cálculo del contenido de ADHA en bayas verdes a partir de la substracción del contenido inicial de AA al contenido de AAT obtenido luego de la conversión con DTT. Este método, llamado comúnmente como el “método subtractivo”, desde el punto de vista de la sensibilidad y selectividad en la determinación de ADHA, es mejor que el método de detección directa en el UV (Sánchez-Mata y col., 2000). Sin embargo, Odriozola-Serrano y col., 2007, no obtuvieron buenos resultados cuando calcularon la concentración de ADHA en frutillas por este método, obteniendo valores de RSD (%) entre 11,5 y 30,8. En relación con estos resultados, podríamos concluir que una buena toma de muestra, una correcta homogeneización y el mantenimiento de la estabilidad del AA en solución luego de su extracción son necesarios para obtener resultados exitosos. Existen muchos factores que afectan negativamente la estabilidad del AA, incluyendo la luz natural y UV, pH y temperaturas altas y la presencia de oxígeno e iones metálicos (Nováková y col., 2008). Por lo tanto, es necesario controlar cuidadosamente la influencia de estas variables durante la implementación de un método analítico para obtener buena precisión en los análisis de vitamina C.

Tabla 3.4. Resultados de la estudios de precisión (repetibilidad o variación intra-diaria) del método con muestras de frutillas ( $n=6$ )

Analito	Concentración (mg 100g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	RSD %
AA	40,0 ± 0,6	1,5
ADHA <sup>b</sup>	12,3 ± 0,9	4,9
AAT	51,3 ± 0,6	1,8

AA: ácido ascórbico; ADHA: ácido dehidroascórbico; AAT: ácido ascórbico total. RSD %: desviación estándar relativa. <sup>a</sup>Media ± desviación estándar; <sup>b</sup>Cuantificado indirectamente por la diferencia entre el contenido de AAT y AA.

### 3.1.1.2.5 Estudio de la exactitud

La exactitud del método se evaluó por el método de adición estándar en muestras de frutillas preparadas por triplicado. Los niveles de adición fueron del 30, 60, 90, 120 y 150% de las concentraciones de AA esperadas en frutillas (aproximadamente 40-60 mg AA 100 g<sup>-1</sup> fruta fresca). Las concentraciones se estimaron usando las curvas de calibrado obtenidas para AA y AAT, y luego se compararon con las concentraciones adicionadas conocidas.

En la Tabla 3.5 se muestran los resultados obtenidos de AA y AAT en frutillas adicionadas, y sus correspondientes porcentajes de recuperación.

Tabla 3.5. Resultados de la estudios de recuperación.

AA adicionado (mg 100g)	AA hallado (mg 100 g <sup>-1</sup> FF) <sup>a</sup>	AAT hallado (mg 100 g <sup>-1</sup> FF) <sup>a</sup>	Recuperación AA <sup>a</sup> (%)	Recuperación AAT <sup>a</sup> (%)
12	12,1 ± 0,8	12,6 ± 1,1	100,6 ± 6,2	104,8 ± 9,1
24	23,0 ± 1,4	24,0 ± 0,9	95,9 ± 5,7	100,0 ± 3,5
36	34,2 ± 0,9	35,0 ± 1,8	95,1 ± 2,4	97,3 ± 4,9
48	44,3 ± 1,2	45,3 ± 0,2	92,3 ± 2,5	94,3 ± 0,4
60	57,8 ± 0,7	58,8 ± 0,3	96,3 ± 1,2	98,0 ± 0,4

AA: ácido ascórbico; AAT: ácido ascórbico total. <sup>a</sup>Media ± desviación estándar ( $n = 3$ ).

La exactitud se estudió a través de la prueba de la región elíptica de confianza conjunta (*EJCR test*). Esta prueba permite investigar si el punto (1, 0) está incluido en la región elíptica de confianza conjunta de la pendiente y la ordenada. En esta situación, la ordenada puede considerarse igual a 0, la pendiente igual a 1, y la recuperación igual al 100% (González y col., 1999). Las Figuras 3.4 a y b, muestran las elipses obtenidas por EJCR OLS para las pruebas de recuperación del AA y AAT. Como se puede observar, los puntos

óptimos están incluidos en ambas elipses, por lo tanto con la metodología propuesta se habría alcanzado una buena exactitud.

Adicionalmente, se calcularon las medias de la recuperaciones globales para las 15 determinaciones de ácido ascórbico y ácido ascórbico total, siendo los valores obtenidos: 98,1 y 98,6 %, respectivamente. Se aplicó una prueba *t*, la cual permitió concluir si existían diferencias significativas entre los valores obtenidos y el valor ideal 100 %. Los valores de *t* experimentales (1,30 para AA y 0,88 para AAT) se compararon con *t* de tabla ( $\nu = 14$ ;  $\alpha = 0,05$ ) = 2,145. Los resultados permitieron concluir una buena exactitud para la determinación de AA y AAT en frutillas.

### 3.1.1.2.6 Estudio de la robustez

La robustez de un método analítico indica el grado de confiabilidad del método luego de pequeños cambios en las variables operativas. Se estudió la recuperación de AA y AAT en muestras de frutillas con una adición de analito 90% de la esperada, luego de efectuar pequeñas modificaciones en los valores de las variables operativas (pH de la fase móvil: 5,7-5,9; velocidad de flujo: 1,10-1,20 mL min<sup>-1</sup>; longitud de onda: 250-252 nm y % metanol en fase móvil: 3-7%). Los resultados obtenidos (Tabla 3.6) se estudiaron a través de un ANOVA multifactorial, el cual indicó que el impacto sobre las respuestas de las variaciones efectuadas estuvo dentro de límites aceptables. El porcentaje de recuperación de AA no estuvo influenciado por ninguna de las variaciones de los factores ( $p > 0,05$ ).

Tabla 3.6. Resultados obtenidos del diseño experimental de robustez.

pH fase móvil	Longitud de onda (nm)	Flujo (mL min <sup>-1</sup> )	Modificador orgánico (metanol %)	Recuperación AAT (%)
5,7	250	1,10	3	96,0
5,7	251	1,15	5	94,4
5,7	252	1,20	7	90,1
5,8	250	1,15	7	91,2
5,8	251	1,20	3	97,1
5,8	252	1,10	5	100,4
5,9	250	1,20	5	90,1
5,9	251	1,10	7	96,9
5,8	251	1,15	5	98,0

Las corridas se realizaron en orden aleatorio.

Sin embargo, el porcentaje de recuperación del AAT fue afectado por las variaciones en la velocidad de flujo ( $p \leq 0,05$ ). Los resultados de recuperación de AAT se muestran en la Tabla 3.6. El porcentaje de recuperación medio fue  $95 \pm 4 \%$ , lo que indicaría claramente la robustez del presente método.

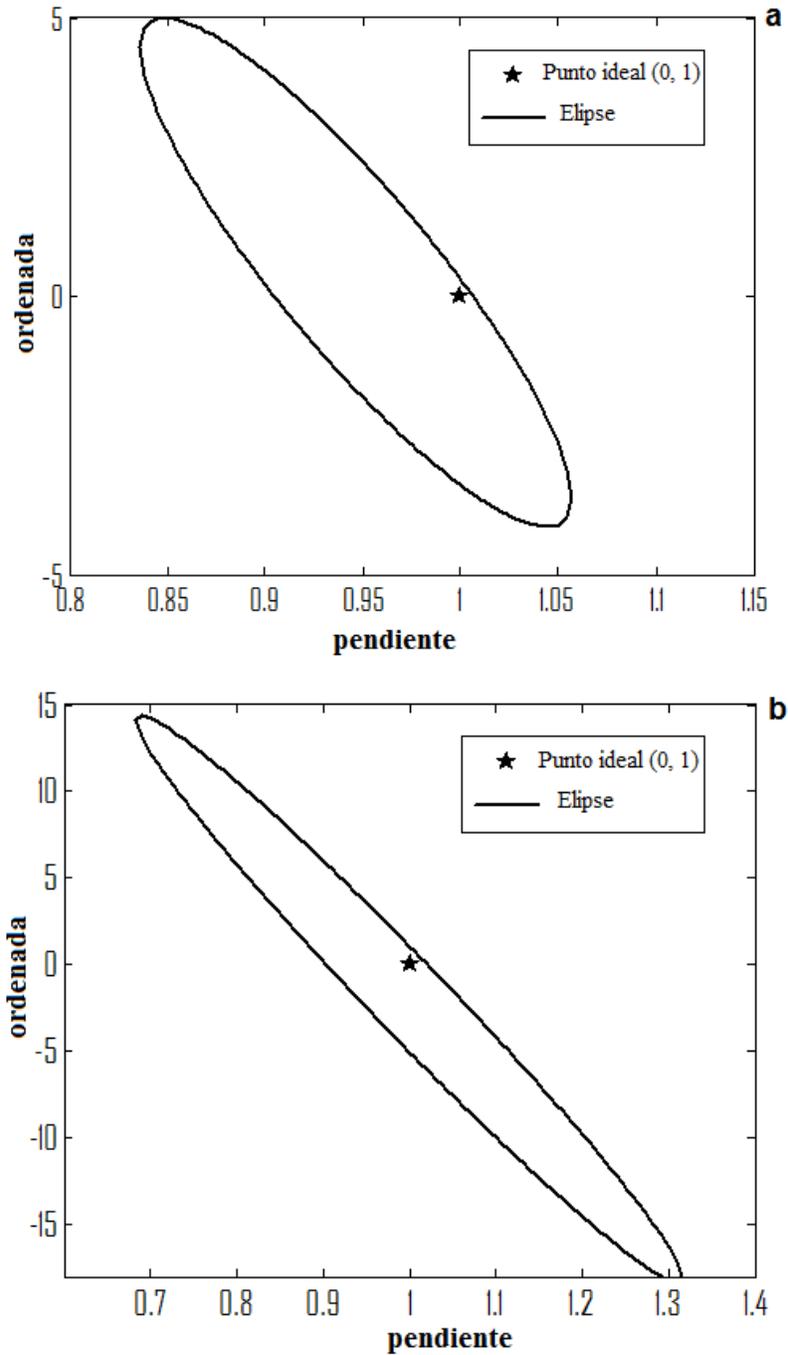


Figura 3.4. Resultados prueba OLS EJCR para AA (a) y AAT (b), las elipses muestran el punto ideal (1, 0).

### 3.1.1.3 Determinación de vitamina C en frutillas

El método optimizado y validado se utilizó para determinar el contenido de AA, ADHA y vitamina C de las frutillas variedad *Selva* y *Camarosa*. Las determinaciones se realizaron en distintos años de cosecha y los resultados se muestran en la Tabla 3.7. La variedad regional *Camarosa* se analizó durante los periodos Noviembre-Diciembre, y las frutillas comerciales *Selva* se analizaron durante Febrero-Marzo, de acuerdo al calendario de cosecha (ver sección 1.2).

De acuerdo a los resultados, la variedad regional *Camarosa*, es la que presentaría menor variabilidad en el contenido de vitamina C con el año de cosecha, comparada con la variedad comercial *Selva*. Como se mencionó en la sección 1.3.2.1.1, el contenido de vitamina C de frutas y hortalizas depende de la especie, cultivar, estado de madurez, y de la manipulación postcosecha (Combs y col., 1998, Lee y Kader, 2000, Nováková y col., 2008). Es probable que un cúmulo de factores que no pudieron controlarse en la variedad comercial, y que si pudieron ser controlados en la variedad regional, tales como las condiciones de cultivo por el mismo productor, la manipulación postcosecha y el periodo de tiempo entre la recolección y el análisis de las frutas sean responsables de esta mayor variabilidad observada.

Tabla 3.7. Resultados de vitamina C en frutillas en distintos periodos de análisis.

Variedad	<i>Selva</i>			<i>Camarosa</i>	
	Mar. 2010	Mar. 2011	Nov. 2009	Dic. 2010	Nov. 2011
AA (mg 100 g <sup>-1</sup> FF)	14,8 ± 0,6	40,29 ± 0,6	41,2 ± 0,8	36,1 ± 0,7	43,3 ± 0,5
ADHA (mg 100 g <sup>-1</sup> FF)	14,3 ± 0,9	12,1 ± 0,6	6,5 ± 0,5	8,1 ± 1,0	1,1 ± 0,3
Vit C (mg 100 g <sup>-1</sup> FF)	28,7 ± 0,3	51,0 ± 0,9	47,6 ± 1,1	41,2 ± 1,2	44,7 ± 0,8

AA: ácido ascórbico; ADHA: ácido dehidroascórbico; AAT: ácido ascórbico total.

<sup>a</sup>Media ± desviación estándar (n = 3)

### 3.1.2 Determinación de compuestos fenólicos en frutillas: desarrollo y validación de un método de cromatografía líquida de alta performance con detección por arreglo de diodos (HPLC-DAD)

### 3.1.2.1 Estudio de las condiciones de hidrólisis sobre compuestos fenólicos estándares

Algunos compuestos fenólicos estándares se analizaron en las condiciones de hidrólisis estudiadas (4 mol L<sup>-1</sup> HCl, 50 min a 90°C). Los compuestos fenólicos para este análisis se eligieron, debido a que en experiencias preliminares se encontraron a bajas (por ejemplo: kaempferol) o altas (por ejemplo: ácido elágico) concentraciones en frutillas. El porcentaje de las cantidades de compuestos fenólicos estándares recuperados luego de la hidrólisis con respecto a las cantidades iniciales se muestran en la Tabla 3.8. Las condiciones hidrolíticas fueron eficientes para producir la aglicona desde el glicósido quercetin-3-rutinósido (rutina). Los contenidos de ácido elágico y kaempferol fueron bien retenidos luego del tratamiento ácido. Sin embargo, para el ácido ferúlico y la catequina, compuestos fenólicos más sensibles, las condiciones ácidas ensayadas produjeron mayor degradación (Tabla 3.8). De manera similar, Nuutila y col., (2002), reportaron una retención del 35% en la concentración de ácido ferúlico, luego de una hidrólisis ácida usando 1,2 mol L<sup>-1</sup> de HCl por 2 horas a 80°C.

Debido a las diferencias en las estructuras químicas y a la sensibilidad variable de los compuestos fenólicos a las condiciones hidrolíticas, se tomó un compromiso entre una producción eficiente de agliconas y una mínima degradación de compuestos fenólicos.

Tabla 3.8. Resultados hidrólisis ácida (4 mol L<sup>-1</sup> HCl, 50 min a 90°C) en compuestos fenólicos estándares.

Compuestos fenólicos	Concentración antes hidrólisis ácida (µg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Concentración después hidrólisis ácida (µg L <sup>-1</sup> ) <sup>ab</sup>	Recuperación (%)
<i>Flavonoides</i>			
Catequina	20	14,9 ± 1,1	74,5
Kaempferol	20,3	18,3 ± 0,9	90,1
Ácido elágico	20	22,1 ± 1,0	110,5
<i>Glicósido de flavonoides</i>			
Rutina	32	4,3 ± 1,2	16,6
<i>Ácidos fenólicos</i>			
Ácido ferúlico	2	0,8 ± 0,3	40,0

<sup>a</sup>n = 2; <sup>b</sup>Media ± desviación estándar.

### 3.1.2.2 Optimización de la separación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos que se identificaron y cuantificaron en este trabajo (Tabla 3.9), se pueden separar de acuerdo a la literatura en 2 grupos (ver sección 1.4.3): *flavonoides*: quercitina, rutina y kaempferol (flavonoles); catequina y epicatequina (flavanoles), y cianidina y pelargonidina (antocianidinas); y *ácidos fenólicos*: ácidos gálico y elágico (derivados del ácido hidroxibenzoico), y ácidos ferúlico, cumárico y cinámico (derivados de ácido hidroxicinámico).

Las condiciones cromatográficas se optimizaron usando una mezcla de estándares de los compuestos fenólicos mencionados arriba, con el fin de asegurar una buena resolución entre ellos.

Se probaron diferentes sistemas de gradientes de concentración y las condiciones mencionadas en la sección 2.2.2.2, resultaron las mejores para asegurar una buena resolución entre todos los picos. El tiempo de la corrida cromatográfica fue de 55 min, en este tiempo se lograron separar 12 compuestos, siendo kaempferol (pico 12), el último compuesto fenólico eluido a aproximadamente 52 min. Los tiempos de retención de todos los compuestos fenólicos se muestran en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Tiempos de retención ( $t_R$ ), absorbancia máxima ( $\lambda_{max}$ ), y absorbancia de cuantificación ( $\lambda$ ) de los compuestos fenólicos.

Compuestos (número de pico)	$t_R \pm SD$ (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	$\lambda$ (nm)
Ácido gálico (1)	6,3 $\pm$ 0,1	271	280
( $\pm$ )-Catequina (2)	16,9 $\pm$ 0,1	278	280
(-)-Epicatequina (3)	20,7 $\pm$ 0,1	279	280
Ácido ferúlico (4)	25,0 $\pm$ 0,1	323	320
Ácido <i>p</i> -cumárico (5)	25,5 $\pm$ 0,1	310	320
Cianidina (6)	26,4 $\pm$ 0,4	530	520
Pelargonidina (7)	28,1 $\pm$ 0,4	517	520
Rutina (8)	30,2 $\pm$ 0,1	354	360
Ácido cinámico (9)	31,6 $\pm$ 0,1	277	280
Ácido elágico (10)	33,7 $\pm$ 0,2	368	360
Quercitina (11)	49,5 $\pm$ 0,1	371	360
Kaempferol (12)	52,0 $\pm$ 0,1	365	360

Los diferentes tipos de compuestos fenólicos exhiben máxima absorción a diferentes longitudes de onda (Kajžanoska y col., 2011). Sin embargo, la mayoría de los compuestos

fenólicos absorben en el UV a 280 nm. Por lo tanto, con fines ilustrativos se muestra en la Figura 3.5 la separación alcanzada a esa longitud de onda. Cuatro longitudes de onda se eligieron para la cuantificación de compuestos fenólicos en este estudio: 280 nm para ácido gálico y cinámico, catequina y epicatequina; 320 nm para ácidos ferúlico y cumárico; 360 nm para rutina, quercitina, kaempferol, y ácido elágico; y 520 nm para cianidina y pelargonidina. En la Tabla 3.9 se muestran los máximos de absorbancia de cada compuesto fenólico hallados con el detector DAD. Adicionalmente, en la Figura 3.6 se muestran espectros de absorción obtenidos de algunos de los compuestos fenólicos estudiados.

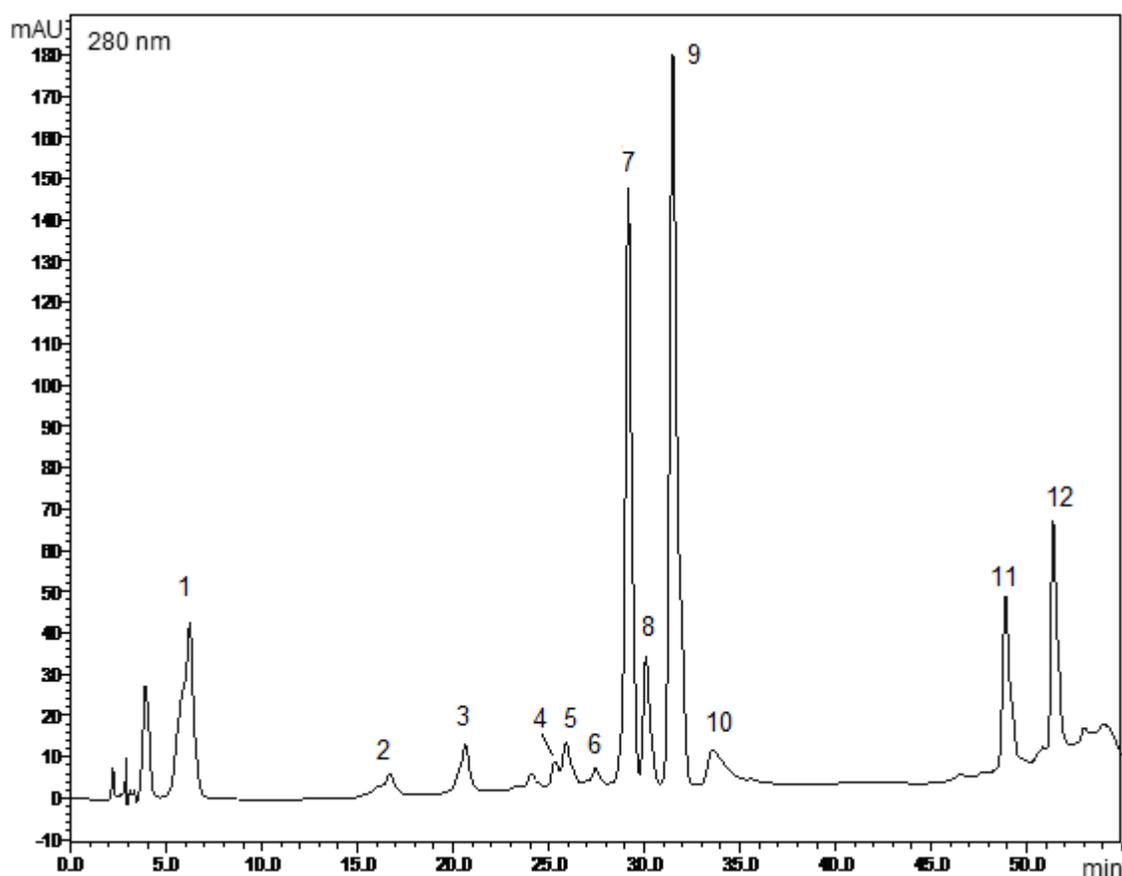


Figura 3.5. Separación de la mezcla de estándares de compuestos fenólicos por HPLC con DAD a 280 nm. Identificación de los picos: 1: ácido gálico, 2: catequina, 3: (-)-epicatequina, 4: ácido ferúlico, 5: ácido *p*-cumárico, 6: cianidina, 7: pelargonidina, 8: rutina, 9: ácido cinámico, 10: ácido elágico, 11: quercitina y 12: kaempferol.

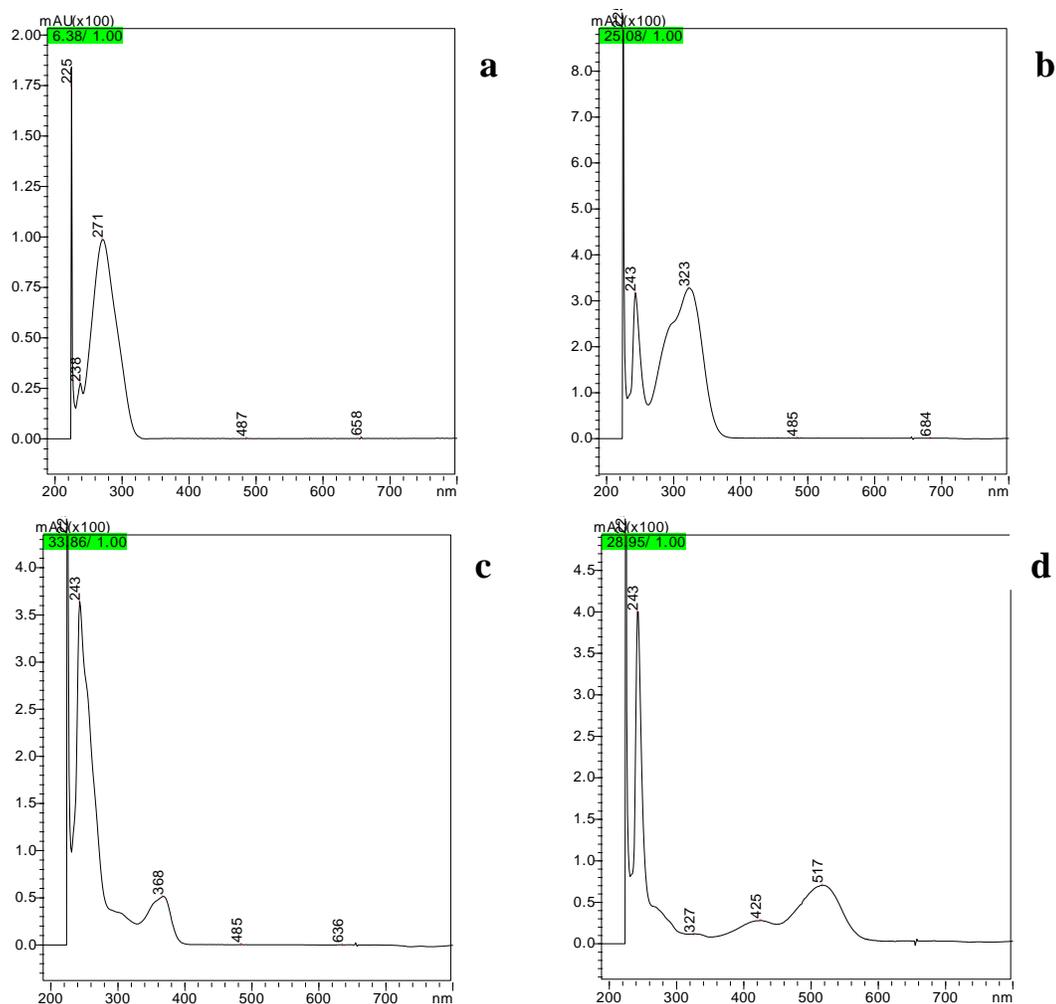


Figura 3.6. Espectro de absorción de ácido gálico (a), ácido ferúlico (b), ácido elágico (c) y pelargonidina (d) obtenidas con el detector DAD.

### 3.1.2.3 Validación del método HPLC para la determinación de los principales compuestos fenólicos en frutillas

#### 3.1.2.3.1 Estudio de la Linealidad

La linealidad fue evaluada para el procedimiento de determinación de compuestos fenólicos utilizando soluciones estándares (sección 2.2.2.8.1). La homocedasticidad y la linealidad de los datos se analizaron a través de pruebas  $F$ , de acuerdo a Danzer y Currie, (1998). Para la homocedasticidad, las diferencias entre los valores de  $F$  observados y los valores de  $F$  críticos no fueron significativas para ninguna de las 12 curvas de calibración de compuestos fenólicos (Tabla 3.10).

Las áreas de los picos ( $y$ ) se graficaron en función de las concentraciones de compuestos fenólicos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) ( $x$ ), y se realizó un análisis de regresión por mínimos cuadrados.

Para las pruebas de linealidad, se calcularon valores experimentales de  $F$  dados por la Ecuación 3.3; los cuales se compararon con valores de  $F$  tabulados. Las pruebas de linealidad no excedieron los valores tabulados (Tabla 3.10), por lo tanto se puede asumir una relación lineal entre las áreas (variable dependiente) y la concentración de compuestos fenólicos (variable independiente), en el del rango de concentración ensayado. Además, se comprobó una distribución normal en los gráficos de residuos (no mostrados).

#### **3.1.2.3.2 Estudio de los límites de detección y cuantificación**

LOD y LOQ fueron calculados por las Ecuaciones 3.4 y 3.5 de acuerdo a Olivieri y Goicoechea, (2007). El hecho de que los valores de LOQ determinados en el presente estudio (Tabla 3.10) sean más bajos que los valores de concentración de compuestos fenólicos encontrados en muestras de frutillas, es una clara evidencia de la validez del método propuesto.

#### **3.1.2.3.3 Estudio de las sensibilidades de calibración y analítica**

Los valores de SEN obtenidos se muestran en la Tabla 3.10. El valor de SEN más alto fue obtenido para el ácido cinámico (250.054,4). El ácido cinámico no está presente en las frutillas en grandes concentraciones, por lo tanto este resultado indicaría un método lo suficientemente sensible para la detección de este compuesto.

Los valores de la inversa de la sensibilidad analítica ( $\gamma^{-1}$ ) obtenidos se presentan en la Tabla 3.10. Los valores de  $\gamma^{-1}$  más bajos se observaron para kaempferol (0,050) y quercitina (0,084), lo cual fue coincidente con sus valores de LOD y LOQ más bajos observados. Estos resultados indicarían la mejor sensibilidad en la detección de estos compuestos fenólicos por el método desarrollado.

#### **3.1.2.3.4 Estudios de la precisión y exactitud del método**

La precisión del método se estudió en términos de su repetibilidad o variación intra-diaria. Se analizaron 6 muestras independientes de frutillas variedad *Camarosa* luego de la implementación del método analítico completo. Los resultados (Tabla 3.11) fueron en la

mayoría de los casos menores a los RSD % máximos recomendados por la *Association of Official Analytical Chemists*. RSD (%) = 7,1 y 11,0 para analitos que representen en la muestra entre 0,01 y 0,001 % y 0,001 y 0,0001 %, respectivamente (AOAC, 1998).

Tabla 3.10. Resultados de la evaluación de linealidad de las curvas de calibración de compuestos fenólicos, sensibilidad de calibración (SEN), inversa de sensibilidad analítica ( $\gamma^{-1}$ ) y límites de detección (LOD y cuantificación (LOQ)).

Compuestos fenólicos	Prueba $F$ homocedasticidad	Prueba $F$ linealidad	Sensibilidad calibración	$\gamma^{-1}$	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	$R^2$
Ácido gálico	80,6	0,67	91,671,8	0,443	1,29	3,48	0,999
(±)-Catequina	52,4	0,79	16,596,5	0,974	2,83	7,6	0,999
(-)-Epicatequina	59,0	0,93	25,380,7	0,153	0,44	1,19	0,999
Ácido ferúlico	11,4	0,79	166,879,4	1,134	3,31	8,89	0,999
Ácido <i>p</i> -cumárico	30,8	1,12	228,845,7	0,531	1,54	4,14	0,999
Cianidina	17,7	1,15	21,327,5	0,651	2,12	5,46	0,997
Pelargonidina	53,8	1,02	197,405,8	5,323	17,34	44,63	0,992
Rutina	47,8	0,82	72,910,8	0,120	0,35	0,93	0,999
Ácido cinámico	26,9	1,34	250,054,4	0,110	0,32	0,86	0,999
Ácido elágico	63,4	0,82	50,001,1	2,548	7,39	19,89	0,999
Quercitina	63,4	0,66	125,260,1	0,084	0,24	0,65	0,999
Kaempferol	46,6	0,77	147,001,9	0,050	0,14	0,39	0,999

Valor para la prueba  $F$  de evaluación de homocedasticidad, con valores críticos de  $\alpha = 0,05$  y los grados de libertad: ( $v_1 = 1, v_2 = 1$ ) = 161,4, Valor para la prueba  $F$  de evaluación de linealidad, con valores críticos de  $\alpha = 0,05$  y los grados de libertad: ( $v_1 = 8, v_2 = 5$ ) = 3,69

Tabla 3.11. Precisión (repetibilidad o variación intra-diaria) del método antes y después de la hidrólisis ácida (4 mol L<sup>-1</sup> HCl, 50 min a 90°C).

Compuestos fenólicos	Antes hidrólisis ácida		Después hidrólisis ácida	
	Concentración (mg 100 g <sup>-1</sup> FF) <sup>a</sup>	RSD (%)	Concentración (mg 100 g <sup>-1</sup> FF) <sup>a</sup>	RSD (%)
Ácido gálico	1,40 ± 0,10	7,10	14,28 ± 1,42	9,94
(±)-Catequina	1,70 ± 0,09	5,31	0,48 ± 0,09	18,75
(-)-Epicatequina	-	-	4,00 ± 0,60	15,00
Ácido ferúlico	-	-	3,44 ± 0,15	4,36
Ácido <i>p</i> -cumárico	-	-	1,69 ± 0,20	11,83
Cianidina	-	-	4,46 ± 0,30	6,73
Pelargonidina	-	-	25,17 ± 1,15	4,57
Rutina	1,00 ± 0,10	10,01	0,09 ± 0,01	11,11
Ácido cinámico	-	-	-	-
Ácido elágico	0,61 ± 0,10	16,40	6,67 ± 0,51	7,64
Quercitina	-	-	0,36 ± 0,04	11,11
Kaempferol	-	-	0,09 ± 0,01	10,41

R.S.D. %: desviación estándar relativa. <sup>a</sup>Media ± desviación estándar ( $n = 6$ ).

La exactitud del método se evaluó con adiciones estándares de compuestos fenólicos a muestras de frutillas, en los niveles que se mencionaron en la sección 2.2.2.8.2. Las recuperaciones halladas luego de la hidrólisis ácida estuvieron entre 81,5 y 168,4%. En el caso del glicósido rutina (quercetin-3-rutinósido), el porcentaje de recuperación obtenido antes de la hidrólisis ácida fue del 98,9 %, mientras que el porcentaje de recuperación hallado luego de la hidrólisis ácida fue del 8,2 %. La hidrólisis de la molécula de rutina produce una molécula del flavonoide quercitina y una molécula del carbohidrato rutinosa. Por lo tanto, la concentración de quercitina luego de la hidrólisis ácida aumenta debido a su formación desde rutina (Boque y col., 2002).

La recuperación total de quercitina observada luego de la hidrólisis ácida fue 168,4 %. Se estimó el porcentaje de recuperación teórico de quercitina proveniente de la conversión de la rutina adicionada, el cual fue del 90,7 %. Con ese dato, se pudo calcular el porcentaje de recuperación de la quercitina adicionada a las muestras de frutillas (77,7 %), como la diferencia entre el porcentaje de recuperación de quercitina total y el porcentaje de recuperación teórico de quercitina proveniente de la conversión de rutina adicionada.

Los porcentajes de recuperación obtenidos para ácido *p*-cumárico, ácido gálico y cianidina fueron de 78,5, 80,5 y 90,1%, respectivamente.

Estos resultados permiten concluir una buena exactitud alcanzada con la metodología propuesta en la determinación de compuestos fenólicos en frutillas.

#### **3.1.2.3.5 Determinación de compuestos fenólicos en frutillas**

El método desarrollado se utilizó para determinar y cuantificar el perfil de compuestos fenólicos de las frutillas variedad *Camarosa* y *Selva*. En la Tabla 3.12 se muestran las concentraciones de compuestos fenólicos halladas antes y después de la hidrólisis ácida.

Como se mencionó antes, los compuestos fenólicos obtenidos antes de la hidrólisis ácida representan las agliconas libres o los compuestos fenólicos no conjugados o no condensados, naturalmente presentes en los extractos de frutillas. Contrariamente, los compuestos fenólicos obtenidos después de la hidrólisis ácida representan las agliconas totales o los compuestos fenólicos conjugados o condensados de los extractos de frutillas.

Las Figuras 3.7 y 3.8 muestran los cromatogramas obtenidos a 280 nm antes y después de la hidrólisis ácida en los extractos de frutillas *Camarosa* y *Selva*, respectivamente.

Los compuestos fenólicos que fueron detectadas antes de la hidrólisis ácida en ambas variedades fueron: catequina, rutina y ácido elágico (Tabla 3.12). En la variedad *Camarosa* estuvo presente además el ácido gálico (Figuras 3.7a y 3.8a).

Las concentraciones de compuestos fenólicos obtenidas en los extractos no hidrolizados fueron menores que las obtenidas en los extractos hidrolizados. Una excepción se dio para catequina, la cual fue afectada por las condiciones hidrolíticas y el contenido de este flavanol fue más bajo en los extractos hidrolizados que en las muestras sin hidrolizar (Tabla 3.12).

Tabla 3.12. Concentración de compuestos fenólicos en muestras de frutillas antes y después de la hidrólisis ácida.

Compuestos fenólicos	Concentración (mg 100 g <sup>-1</sup> FF) <sup>a</sup>		Concentración (mg 100 g <sup>-1</sup> FF) <sup>a</sup>	
	Antes hidrólisis ácida		Después hidrólisis ácida	
	<i>Camarosa</i>	<i>Selva</i>	<i>Camarosa</i>	<i>Selva</i>
Ácido gálico	1,36 ± 0,05	-	14,28 ± 1,35 <sup>a</sup>	17,21 ± 1,30 <sup>b</sup>
(±)-Catequina	1,70 ± 0,17 <sup>a</sup>	3,35 ± 0,42 <sup>b</sup>	0,48 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,10 <sup>a</sup>
(-)-Epicatequina	-	-	4,02 ± 0,28 <sup>b</sup>	0,84 ± 0,20 <sup>a</sup>
Ácido ferúlico	-	-	3,44 ± 0,32 <sup>b</sup>	2,75 ± 0,41 <sup>a</sup>
Ácido p-cumárico	-	-	1,69 ± 0,20 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,18 <sup>a</sup>
Cianidina	-	-	4,46 ± 0,23 <sup>a</sup>	5,28 ± 0,29 <sup>b</sup>
Pelargonidina	-	-	25,20 ± 1,11 <sup>b</sup>	18,67 ± 1,09 <sup>a</sup>
Rutina	1,0 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,84 ± 0,17 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>a</sup>
Ácido cinámico	-	-	-	-
Ácido elágico	0,61 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,67 ± 0,46 <sup>a</sup>	11,87 ± 2,00 <sup>b</sup>
Quercitina	-	-	0,36 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,04 <sup>a</sup>
Kaempferol	-	-	0,09 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,09 <sup>b</sup>
Antocianidinas totales <sup>b</sup>	-	-	29,66 ± 1,32 <sup>b</sup>	23,95 ± 1,37 <sup>a</sup>
Compuestos fenólicos totales <sup>b</sup>	4,66 ± 0,30 <sup>a</sup>	5,82 ± 0,60 <sup>b</sup>	60,79 ± 1,90 <sup>a</sup>	60,20 ± 2,40 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Media ± desviación estándar. ( $n = 3$ ). <sup>b</sup>Suma aritmética. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) por cultivar.

Los flavonoles (quercitina y kaempferol) se encontraron a bajas concentraciones en las muestras de frutillas hidrolizadas. Si bien el contenido medio de quercitina fue mayor en las frutillas *Camarosa*, el contenido de kaempferol fue menor para este cultivar. Los resultados obtenidos estarían de acuerdo con los publicados por Häkkinen y Törrönen, (2000), para 5 variedades de frutillas de Polonia y Finlandia. Los autores reportaron valores de quercitina de 0,3 a 0,4 mg 100 g<sup>-1</sup> FF, y de kaempferol de 0,6 a 0,9 mg 100 g<sup>-1</sup> FF, usando un método de extracción de metanol 50 % y una hidrólisis ácida 1,2 mol L<sup>-1</sup> HCl, a 85°C por 2 horas.

El contenido de rutina fue mayor en las frutillas *Selva* sin hidrolizar, no registrándose diferencias por cultivar en este contenido en las frutillas hidrolizadas ( $p > 0,05$ ). La concentración de rutina (quercetin-3-O-rutinósido) obtenida antes de la hidrólisis ácida menos la concentración de rutina remanente luego de la hidrólisis ácida, dividida por la concentración de rutina antes de la hidrólisis ácida, se usó como una medida de la eficiencia de la hidrólisis en cada extracto de frutilla. El valor de la eficiencia de la hidrólisis (%) para la variedad *Selva* fue del 94,5 % y para la variedad *Camarosa* fue del 90,51 %.

Los compuestos fenólicos derivados del ácido hidroxicinámico (ácidos ferúlico y cumárico) solo se hallaron en los extractos de frutillas hidrolizadas (Tabla 3.12). Las concentraciones de ácido cumárico halladas fueron iguales para ambas variedades ( $p > 0,05$ ), y estuvieron dentro del rango publicado por Häkkinen y Törrönen, (2000): 0,7-1,8 mg 100 g<sup>-1</sup> FF en frutillas de Polonia y Finlandia (condiciones de hidrólisis 1,2 mol L<sup>-1</sup> HCL, a 35°C por 16 horas). Además, estuvieron de acuerdo con los resultados publicados por Mattila y Kumpulainen, (2002), quienes reportaron un valor medio de 2,6 mg 100 g<sup>-1</sup> FF de ácido cumárico en frutillas de Finlandia (condiciones de hidrólisis: hidrólisis alcalina: 1,8 mol L<sup>-1</sup> NaOH, a temperatura ambiente por 16 horas, y hidrólisis ácida: 1 mol L<sup>-1</sup> HCl a 85°C por 16 horas). Sin embargo, en estos trabajos no fue reportada la presencia de ácido ferúlico en frutillas. El contenido de este compuesto fenólico fue 20% mayor en las frutillas *Camarosa* que en las frutas *Selva* ( $p \leq 0,05$ ).

El ácido cinámico no se detectó en ninguna de las dos variedades estudiadas ni antes ni luego de practicar la hidrólisis ácida sobre los extractos.

Como se mencionó en la sección **1.4.3.4.1**, el ácido elágico se encuentra en forma libre en las matrices que lo contienen en muy baja concentración. Sin embargo, estas concentraciones pueden aumentar luego de una hidrólisis ácida de los extractos, como resultado de una liberación desde los elagitaninos (Baettie y col., 2005, da Silva Pinto y col., 2008). En la Figura 3.9 se muestra el incremento de este compuesto bioactivo luego de la hidrólisis ácida en las frutillas *Camarosa* y *Selva*. Las concentraciones de ácido elágico libre halladas en los extractos de frutillas sin hidrolizar (Tabla 3.12) resultaron similares para ambas variedades ( $p > 0,05$ ), y estuvieron de acuerdo con los resultados publicados por

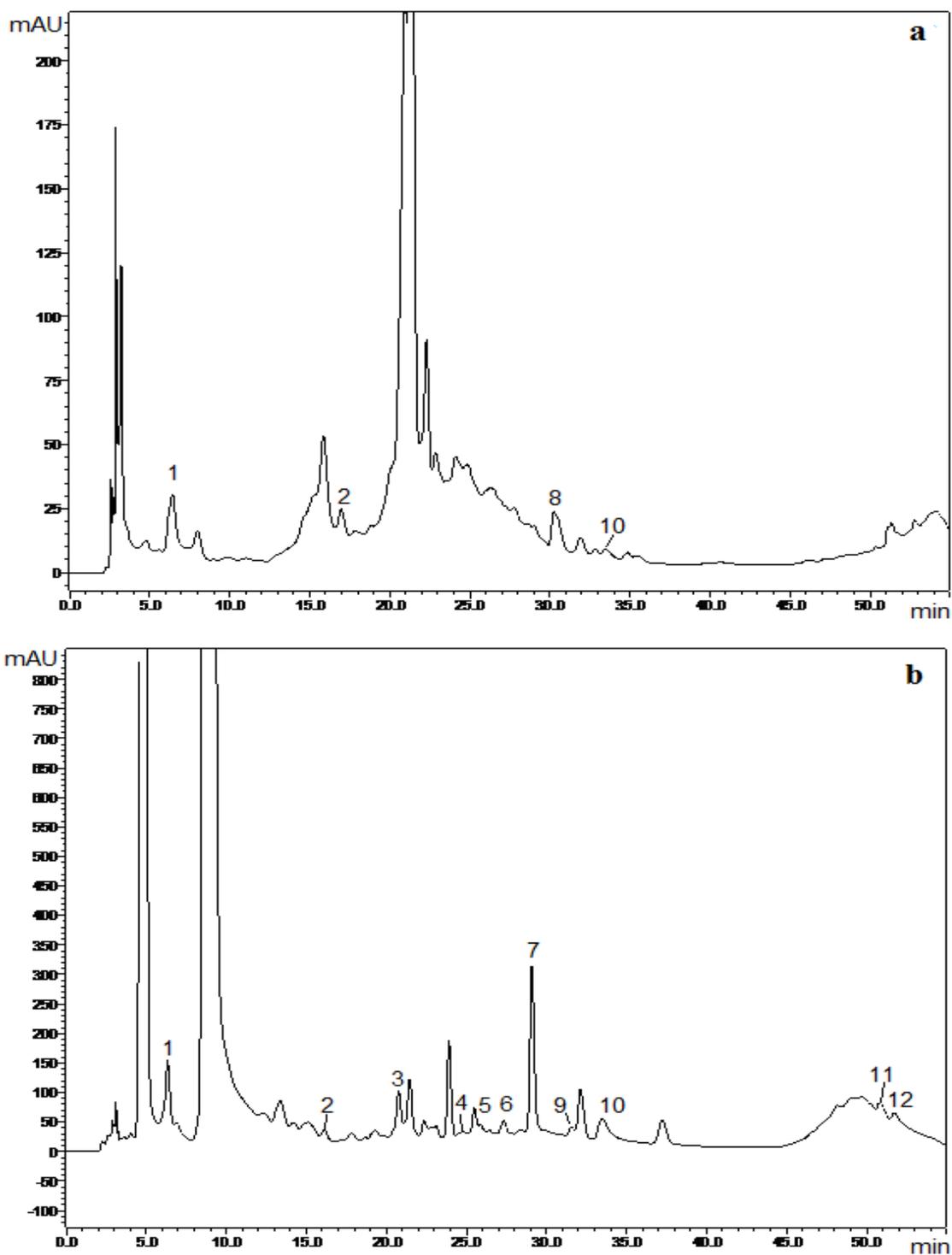


Figura 3.7. Cromatograma HPLC-DAD de extractos de frutillas *Camarosa* antes (a) y luego (b) de la hidrólisis ácida ( $4 \text{ mol L}^{-1}$ , a  $90^\circ\text{C}$  por 50 min) a 280 nm. Identificación de los picos: 1: ácido gálico, 2: catequina, 3: (-)-epicatequina, 4: ácido ferúlico, 5: ácido *p*-cumárico, 6: cianidina, 7: pelarginidina, 8: rutina (no se distingue a 280 nm), 10: ácido elágico, 11: quercitina y 12: kaempferol.

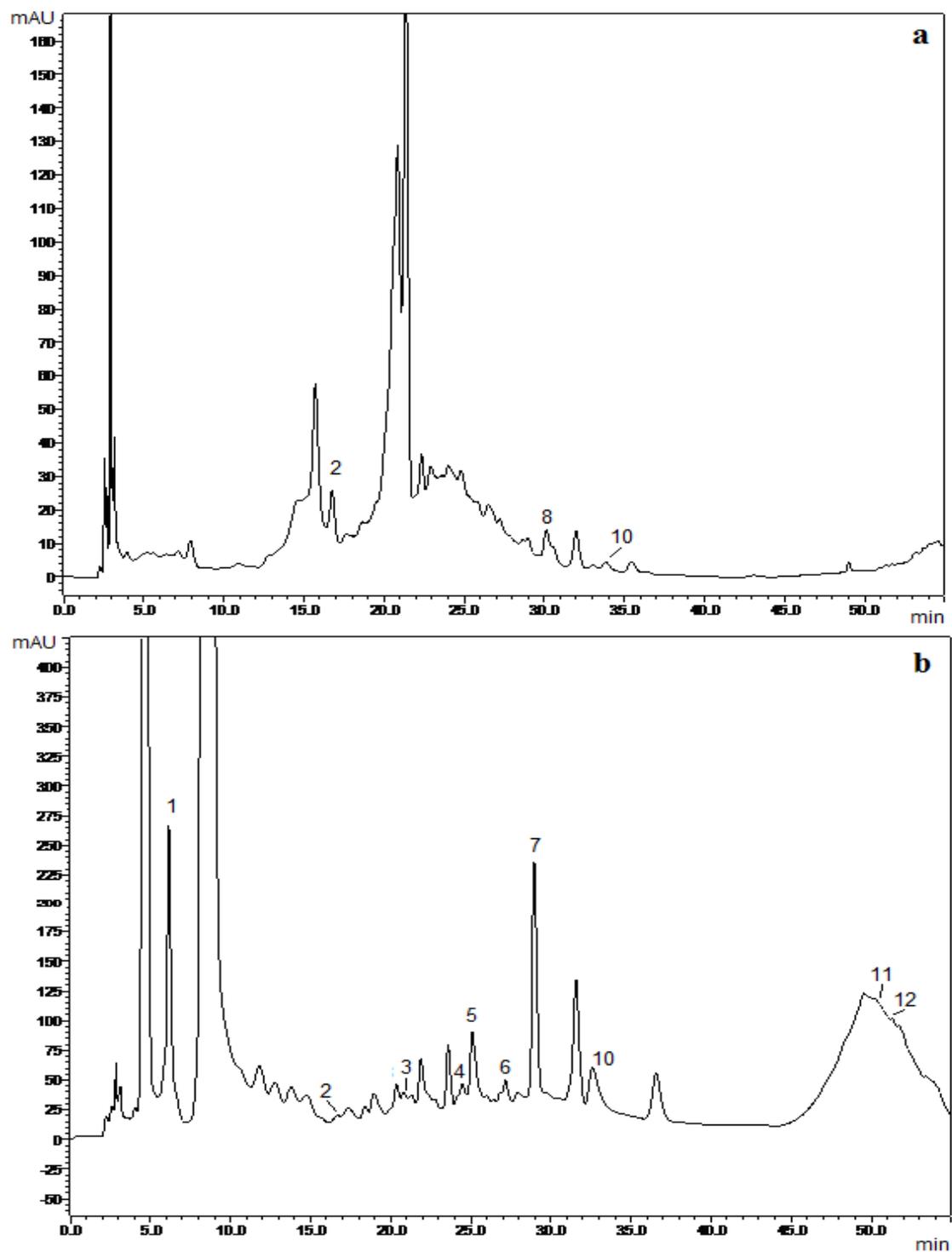


Figura 3.8. Cromatograma HPLC-DAD de extractos de frutillas *Selva* antes (a) y luego (b) de la hidrólisis ácida ( $4 \text{ mol L}^{-1}$ , a  $90^\circ\text{C}$  por 50 min) a 280 nm. Identificación de los picos: 1: ácido gálico, 2: catequina, 3: (-)-epicatequina, 4: ácido ferúlico, 5: ácido *p*-cumárico, 6: cianidina, 7: pelarginidina, 8: rutina (no se distingue a 280 nm), 10: ácido elágico, 11: quercitina y 12: kaempferol.

da Silva Pinto y col., (2008), para 7 cultivares de frutillas de Brasil: de 0,61 a 1,95 mg 100 g<sup>-1</sup> FF. Los contenidos de ácido elágico total obtenidos luego de la hidrólisis ácida (Tabla 3.12) fueron mayores en las frutillas *Selva* ( $p \leq 0,05$ ) y estuvieron, de la misma manera, dentro del rango publicado por da Silva Pinto y col., (2008), entre 17 y 47 mg 100 g<sup>-1</sup> FF (condiciones de hidrólisis: 1 mol L<sup>-1</sup> TFA, a 120°C por 1 hora).

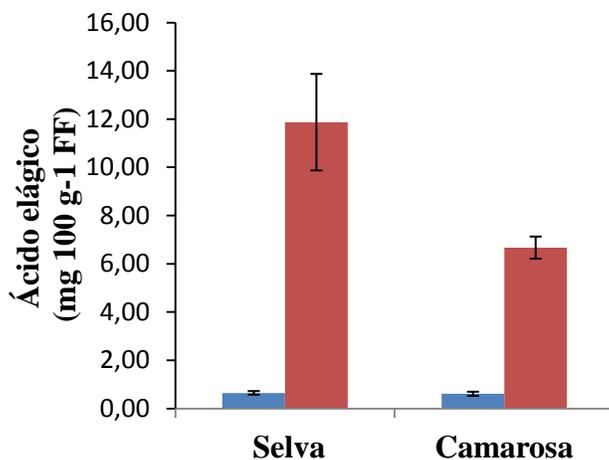


Figura 3.9. Contenido de ácido elágico libre (■) y ácido elágico total (■) en frutillas variedad *Camarosa* y *Selva*.

Las antocianidinas, los principales flavonoides presentes en frutillas, solo se detectaron en los extractos hidrolizados. La concentración de cianidina hallada fue ligeramente superior en las frutillas *Selva* ( $p \leq 0,05$ ), aunque el contenido de pelargonidina en este cultivar fue 26% menor que el encontrado en las frutillas *Camarosa* ( $p \leq 0,05$ ). El contenido de antocianidinas se puede considerar una estimación del contenido de antocianinas (antocianidinas en forma glicosilada). En este sentido, las principales antocianinas encontradas en frutillas son pelargonidin-3-glucósido, cianidin-3-glucósido y pelargonidin-3-rutinósido (da Silva Pinto y col., 2008). Las concentraciones de antocianidinas halladas estuvieron de acuerdo con los valores publicados por Giné Bordonaba y col., (2011), quienes reportaron concentraciones de pelargonidin-3-glucósido entre 25,4 y 40,4 mg 100 g<sup>-1</sup> FF; aunque nuestros valores de cianidina resultaron más elevados que los valores de cianidin-3-glucósido publicados por estos autores: entre 1,3 y 1,4 mg 100 g<sup>-1</sup> FF. Tal como

mencionó Lopes da Silva y col., (2007), la variedad *Camarosa* fue la que presentó la mayor concentración de antocianidinas.

La suma aritmética de los compuestos fenólicos obtenidos por esta técnica antes de la hidrólisis ácida (Tabla 3.12) fue ligeramente superior en la variedad *Selva* que en *Camarosa* ( $p \leq 0,05$ ), aunque la suma obtenida para los compuestos fenólicos hallados luego de la hidrólisis ácida no mostró diferencias significativas por cultivar ( $p > 0,05$ ).

## **3.2 Estudio de la operación de lavado-desinfección de frutillas frescas cortadas con ácido peracético (APA)**

### **3.2.1 Diseño de lavado-desinfección N° 1**

En este diseño, la operación de lavado-desinfección se realizó sobre frutillas variedad *Camarosa*. El objetivo de este diseño de lavado fue estudiar cómo eran afectados los compuestos bioactivos, la calidad nutricional y las actividades enzimáticas de enzimas del metabolismo secundario y de la pared celular de frutillas frescas cortadas en función de la concentración de ácido peracético, la temperatura y el tiempo de lavado. Se utilizó la concentración máxima permitida de APA de 80 mg L<sup>-1</sup> en el agua de lavado de frutas y hortalizas (CFR, 2007b).

#### **3.2.1.1 Compuestos bioactivos, parámetros de calidad y actividades enzimáticas de las frutillas frescas cortadas sin lavar**

En la Tabla 3.13 se muestran las concentraciones de compuestos bioactivos, los parámetros de calidad y las actividades enzimáticas estudiadas en las frutillas variedad *Camarosa*. Los valores obtenidos para todos estos parámetros están en acuerdo con valores publicados en la bibliografía (Davey y col., 2000, Cordenunsi y col., 2005, y Odriozola-Serrano y col., 2007). Los análisis de la materia prima y el diseño de lavado-desinfección se realizaron durante la temporada de cosecha 2009.

#### **3.2.1.2. Efecto de las condiciones de lavado-desinfección sobre los compuestos bioactivos y los parámetros de calidad de frutillas frescas cortadas**

En la Tabla 3.14 se exponen las 15 corridas experimentales con los factores (concentración ácido peracético (APA), temperatura y tiempo) y sus niveles estudiados.

Los resultados de las respuestas estudiadas en el diseño experimental ensayado, (excepto los resultados de las actividades enzimáticas PME, PAL, PG y PPO que serán expuestos más adelante) se muestran en la Tabla 3.15.

En la Tabla 3.16 se presentan los resultados del ANOVA para todas las respuestas mostradas en la Tabla 3.15.

Tabla 3.13. Compuestos bioactivos, parámetros de calidad y actividades enzimáticas en frutillas frescas cortadas sin lavar.

Respuesta	Cultivar
	<i>Camarosa</i>
AA (mg 100 g <sup>-1</sup> FF)	41,2 ± 0,8
ADHA (mg 100 g <sup>-1</sup> FF)	6,5 ± 0,5
Vit C (mg 100 g <sup>-1</sup> FF)	47,6 ± 1,1
FT (mg AG 100 g <sup>-1</sup> FF)	311,6 ± 14,3
Ant T (mg 100 g <sup>-1</sup> FF)	27,1 ± 0,3
CA (mg AA 100 g <sup>-1</sup> FF)	355,1 ± 6,7
SS (° Brix)	5,0 ± 0,3
pH	3,3 ± 0,1
AT (g ACA/100 g <sup>-1</sup> FF)	0,7 ± 0,1
$L_0^*$	33,4 ± 3,9
$a_0^*$	29,4 ± 0,2
$b_0^*$	14,8 ± 1,7
$C_{ab0}^*$	31,5 ± 0,1
$h_{ab0}$	27,6 ± 3,2
PME (nmol AG mg proteína <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	245,3 ± 3,3
PAL (nmol AC g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	507,9 ± 69,6
PPO ( $\Delta$ A mg proteína <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	3,7 ± 0,3
PG (nmol AG g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	38,1 ± 1,3

Media ± desviación estándar. ( $n=3$ ). AA: ácido ascórbico; ADHA: ácido dehidroascórbico; Vit C: vitamina C; FT: fenoles totales; Ant T: antocianinas totales; CA: capacidad antioxidante; SS: sólidos solubles; AT: acidez total;  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$  parámetros del sistema CIELAB; PME: actividad pectin metil esterasa; PAL: actividad fenilalanina amonioliasa; PPO: actividad polifenoloxidasas y PG: actividad poligalacturonasa.

Tabla 3.14. Factores experimentales estudiados y sus niveles correspondientes.

N° corrida	APA (mg L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	40	22	35
2	40	22	35
3	40	40	60
4	40	4	10
5	40	22	35
6	40	4	60
7	80	22	10
8	0	22	60
9	0	22	10
10	0	40	35
11	40	40	10
12	80	40	35
13	0	4	35
14	80	22	60
15	80	4	35

Las corridas experimentales fueran hechas en orden aleatorio.

La significancia de cada término del modelo fue evaluada referida al error puro. El test  $F$  de la falta de ajuste del modelo (datos no mostrados) en el ANOVA mide la falla del modelo en representar los datos en el dominio experimental. En este caso, todos los modelos que representan las respuestas mostraron que la falta de ajuste, basándose en el error puro no fue significativa ( $p > 0,05$ ).

De las respuestas mostradas en la Tabla 3.15, sólo para el caso de la retención de ácido ascórbico (% RAA) resultaron significativos los términos del modelo (Tabla 3.16).

Se obtuvo un modelo completo en variables no codificadas con todos los términos (Ecuación 3.8):

$$\% \text{ RAA} = 130,9 - 0,3 C - 1,0 T + 0,006 CT + 0,002 Ct - 0,001 Tt - 1,9 t + 0,01 C^2 - 0,0009 T^2 + 0,02 t^2 \quad (3.8)$$

A continuación, se obtuvo un modelo predictivo de % RAA eliminando los términos no significativos del modelo por el método de regresión lineal “*setpwise*” (Ecuación 3.9).

$$\% \text{ RAA} = 120,35 - 0,157 C - 0,317 T - 1,81 t + 0,024 t^2 \quad (3.9)$$

El factor más significativo que afectó la retención de ácido ascórbico resultó ser el tiempo a través del término cuadrático ( $t^2$ ), luego la concentración a través de su término lineal ( $C$ ) y la temperatura también a través de su término lineal ( $T$ ).

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 (AAD) de acuerdo a (Bas y Boyaci, 2007).

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es la proporción de variabilidad en los datos explicada o tenida en cuenta por el modelo. El error estándar de las medias (AAD), se calculó con la Ecuación 3.10.

$$\text{AAD} = \left( \left[ \sum_{i=1}^p \frac{|y_{i_{\text{exp}}} - y_{i_{\text{cal}}}|}{y_{i_{\text{exp}}}} \right] / p \right) \times 100 \quad 3.10$$

Donde,  $y_{i_{\text{exp}}}$  y  $y_{i_{\text{cal}}}$  son las respuestas experimentales y predichas por el modelo, respectivamente, y  $p$  es el número de corridas experimentales.

Los valores de  $R^2$  deberían estar cerca de 1 y los valores de AAD entre los valores predichos y observados deben ser lo más pequeños posibles. En este caso, los valores de  $R^2$  y AAD fueron 87,8 % y 4,1 para el modelo completo de % RAA; y 79,4 % y 5,8 para el

modelo reducido de % R AA. Estos resultados indicarían que los modelos obtenidos ajustan apropiadamente los datos experimentales.

De acuerdo al modelo reducido (Ecuación 3.9), un lavado con  $80 \text{ mg L}^{-1}$  de APA, 60 s y  $40^\circ\text{C}$ , predice una retención de AA del 72,9 %.

En la Figura 3.10 se muestra la superficie de respuesta y el gráfico de contornos obtenidos con los modelos completos para la el porcentaje de retención de ácido ascórbico (% RAA) en función de la concentración de APA y el tiempo de lavado-desinfección a  $22^\circ\text{C}$ . El efecto de la temperatura no se muestra en el grafica ya que fue el factor que menos significancia presentó en el modelo de predicción obtenido.

En la Figura 3.10 se observan menores %RAA a concentraciones de APA altas y tiempos largos.

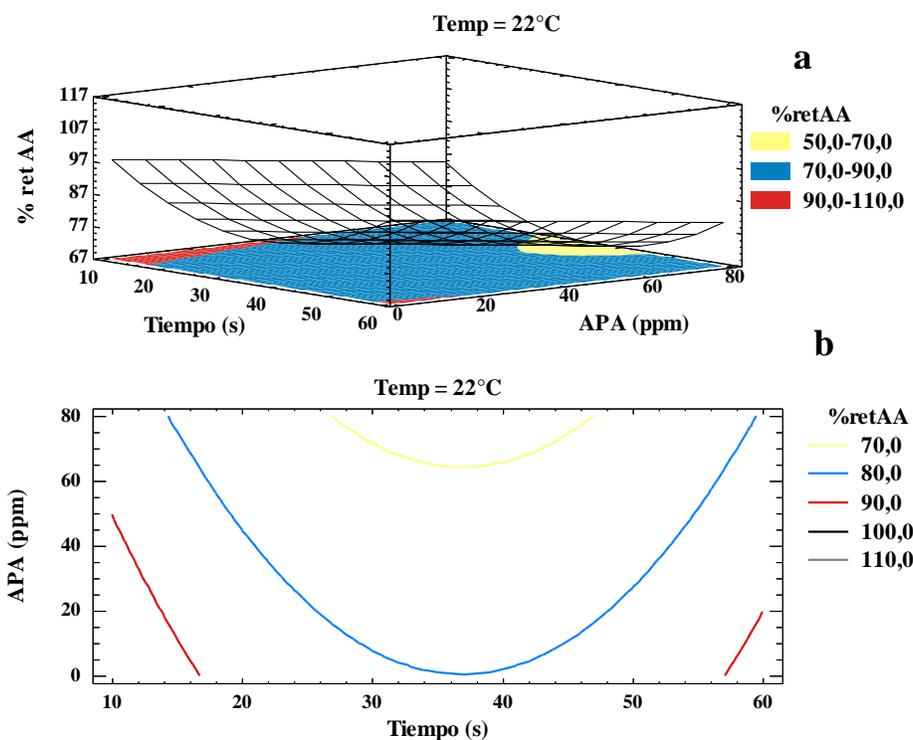


Fig. 3.10 a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el porcentaje de retención de ácido ascórbico (% RAA) en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T= 22^\circ\text{C}$ .

Tabla 3.15. Resultados experimentales del diseño de Box-Benhken de lavado-desinfección N°1 en frutillas *Camarosa*.

N° Corrida	%R AA	%R Vit C	%R FT	%R Ant T	%R CA	%R SS	%C AT	%C pH	$\delta L^*$ (%)	$\delta a^*$ (%)	$\delta b^*$ (%)	$\delta C_{ab}^*$ (%)	$\delta h_{ab}^*$ (%)
1	93,3	98,8	85,3	51,9	89,5	110,9	-4,1	-1,5	5,4	-7,0	-4,8	-3,3	2,0
2	70,0	83,5	82,3	82,8	86,5	107,9	-3,5	-1,0	0,0	-3,1	-5,8	-2,2	-3,7
3	65,5	83,6	84,1	89,5	93,7	110,1	2,4	0,9	-3,6	-14,1	-12,8	-9,8	-1,8
4	90,7	100,2	93,8	62,3	97,4	87,1	-3,1	-2,0	-5,3	0,1	4,0	6,9	-1,2
5	92,7	104,0	87,8	76,8	89,6	62,5	-5,5	-3,1	1,3	-3,9	5,1	-0,4	5,9
6	88,9	95,1	95,8	98,5	113,5	124,2	-4,6	-2,5	2,7	-8,1	-1,3	-1,9	4,8
7	104,4	104,0	96,6	93,6	108,4	121,2	-3,4	-2,8	-4,7	-0,1	2,5	3,2	-0,9
8	71,1	81,8	88,9	72,8	90,8	94,1	3,4	1,1	-12,7	3,1	7,8	7,4	-2,1
9	79,6	91,9	115,7	101,7	112,5	108,9	-7,9	-2,1	-2,8	-2,8	-2,8	0,9	-3,1
10	87,2	94,1	83,3	74,6	103,6	101,0	-5,6	-2,1	5,6	-2,1	5,0	4,3	3,8
11	78,0	91,5	87,9	65,8	89,0	84,2	-5,6	-1,9	-13,8	4,5	2,9	8,1	-4,3
12	65,4	90,9	88,2	67,1	93,9	109,9	-3,5	-1,4	-0,3	-5,0	3,6	-1,0	2,6
13	76,5	90,3	93,0	68,3	98,5	97,0	-5,8	-1,3	4,3	-0,1	11,6	6,8	6,9
14	75,6	90,3	90,5	77,6	92,7	79,1	-8,2	-1,2	-10,3	0,4	3,8	6,5	-3,0
15	91,4	104,5	87,6	104,7	99,5	87,9	-3,3	-1,1	-14,3	-2,1	-9,1	1,0	-9,1

% RAA: porcentaje retención ácido ascórbico; % RVit C: porcentaje retención vitamina C; % RFT: porcentaje retención fenoles totales; % RAnt T: porcentaje retención antocianinas totales; % RCA: porcentaje retención capacidad antioxidante; %R SS: porcentaje retención sólidos solubles; %C AT: porcentaje cambio de acidez total; % C pH: porcentaje cambio de pH;  $\delta L^*$ : porcentaje cambio de luminosidad;  $\delta a^*$ ,  $\delta b^*$ ,  $\delta C_{ab}^*$  y  $\delta h_{ab}^*$ : porcentaje cambios en los parámetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}^*$  del sistema CIELAB.

Tabla 3.16. Análisis de variancia de los resultados del diseño de lavado-desinfección N° 1 en frutillas variedad *Camarosa*.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados												
		%R AA	%R Vit C	%R FT	%R Ant T	%R CA	%R SS	%C AT	%C pH	$\delta L^*$ (%)	$\delta a^*$ (%)	$\delta b^*$ (%)	$\delta C_{ab}^*$ (%)	$\delta h_{ab}^*$ (%)
X <sub>1</sub> (C)	1	314,4*	105,5	1,4	39,0	14,0	740,4	33,3	218,3	115,2	3,0	54,1	11,8	31,6
X <sub>2</sub> (T)	1	259,9*	21,9	0,02	1,5	4,9	237,9	375,2	205,8	52,0	5,3	5,3	15,7	0,2
X <sub>3</sub> (t)	1	43,6	56,1	215,0	638,5	61,7	28,8	0,002	11,7	21,7	52,0	10,4	35,7	6,9
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	8,3*	6,4	50,2	64,8	105,9	22,9	169,5	152,9	29,8	43,8	78,7	65,4	3,7
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	73,0	110,7	0,4	134,8	2,0	70,8	274,4	24,4	28,9	0,2	93,1	0,06	2,4
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1	21,7	13,6	296,7	1004,3	156,6	10,9	0,07	465,3	0,4	7,3	21,6	2,6	54,8
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	49,6	121,3	62,3	4,3	84,8	169,7	156,7	143,0	59,7	4,5	0,0003	1,1	1,6
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1	1,4	15,3	34,0	1,9	17,4	506,5	10,3	1,6	67,1	27,0	27,0	20,7	3,1
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	880,6	289,1	107,0	109,0	330,1	245,0	73,9	44,3	2,5	6,9	0,006	18,8	26,4
Residual	5													
Falta de ajuste	3	205,7	42,6	98,1	1295,5	188,2	1762,4	947,5	399,6	273,8	142,1	247,5	186,7	96,2
Error Puro	2	22,7	40,4	58,1	110,8	74,0	106,5	362,2	66,2	15,5	8,4	72,6	4,3	46,6
R <sup>2</sup>	-	87,8	89,5	83,3	58,6	75,2	52,5	46,1	73,2	56,5	50,1	47,6	46,5	47,8
AAD <sup>1</sup> (%)	-	4,1	2,2	2,8	11,5	3,8	9,4	10,0	4,9	-173,8	12,3	7,1	28,7	-49,9

\*p≤ 0,05; \*\*p≤ 0,01. <sup>1</sup>AAD: desviación absoluta de la media.

% RAA: porcentaje retención ácido ascórbico; % RVit C: porcentaje retención vitamina C; % RFT: porcentaje retención fenoles totales; % RAnt T: porcentaje retención antocianinas totales; % RCA: porcentaje retención capacidad antioxidante; %R SS: porcentaje retención sólidos solubles; %C AT: porcentaje cambio de acidez total; % C pH: porcentaje cambio de pH;  $\delta L^*$ : porcentaje cambio de luminosidad;  $\delta a^*$ ,  $\delta b^*$ ,  $\delta C_{ab}^*$  y  $\delta h_{ab}^*$ : porcentaje cambios en los parámetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}^*$  del sistema CIELAB.

La concentración de vitamina C, no mostró cambios en función de las variables de proceso en el espacio experimental ensayado, lo cual indicaría que la reducción en la vitamina fue la misma en cualquier condición. Sin embargo, las pérdidas de AA sí fueron afectadas por las variables del proceso (Ecuación 3.8) posiblemente debido más a oxidación del AA a ADHA por efecto del APA, que a pérdidas por lixiviación en el agua de lavado. Como el ADHA también presenta actividad de vitamina C, el lavado-desinfección propuesto no afectaría sensiblemente el aporte de dicha vitamina por parte de la fruta fresca cortada (93,6% de retención promedio para las 15 corridas experimentales).

Para todas aquellas respuestas en las que los modelos no muestran términos significativos en el ANOVA, la mejor predicción en función de las variables del proceso (concentración de ácido peracético, temperatura y tiempo) en el rango experimental ensayado, será el promedio de cada respuesta de las 15 experiencias. En la Tabla 3.17 se muestran los porcentajes promedio de retención de todas las corridas experimentales.

Tabla 3.17. Porcentaje de retención promedio luego de los ensayos de lavado-desinfección con ácido peracético (0-80 mg L<sup>-1</sup>), tiempo (10-60 s) y temperatura (4-40°C).

<b>Respuesta</b>	<b>Porcentaje de retención</b>
Ac. Ascórbico Total (mg 100 g <sup>-1</sup> FF)	93,6 ± 7,5
Fenoles Totales (mgAG 100 g <sup>-1</sup> FF)	90,7 ± 8,2
Antocianinas ( mgP3G 100 g <sup>-1</sup> FF)	79,2 ± 15,6
Capacidad Antioxidante (mgAA 100 g <sup>-1</sup> FF)	97,3 ± 8,7
Acidez Total (g ACA/100 g <sup>-1</sup> FF)	83,0 ± 13,2
Sólidos Solubles (° Brix)	99,1 ± 16,8
pH	102,0 ± 10,7

Media de las 15 corridas ± desviación estándar.

Como puede observarse, los porcentajes de retención promedio obtenidos indican que las pérdidas de compuestos bioactivos y atributos de sabor como los sólidos solubles fueron mínimas. En este sentido, Silveira y col., (2008) demostraron que el lavado con 80 mg L<sup>-1</sup> de ácido peracético demoró el ablandamiento, no afectó la velocidad de respiración, los

sólidos solubles ni la acidez total de melones frescos cortados variedad *Galia* durante 10 días a 5°C. Asimismo, Vandekinderen y col., (2008) coincidieron en que el lavado-desinfección con ácido peracético de zanahorias ralladas puede optimizarse desde el punto de vista microbiológico sin afectar severamente la calidad sensorial ni nutricional del producto.

La evaluación instrumental de color no presentó cambios significativos en ninguno de los parámetros evaluados en función de las variables del proceso (Tabla 3.16).

Un estudio de correlación ( $r$ ) entre los cambios de los parámetros de color y el porcentaje de retención de las antocianinas totales en los puntos del diseño de lavado-desinfección (Tabla 3.18), reveló la mejor correlación entre el parámetro  $a^*$  y el % R Ant T ( $r = 0,74$ ). El parámetro  $a^*$  mide la intensidad del color rojo. Las antocianinas se pueden encontrar en diferentes formas químicas de acuerdo al pH del medio en que se encuentran, lo que produce cambios en el color de las mismas (Castañeda-Ovando y col., 2009). Las antocianinas de las frutillas son rojas al pH natural de las frutas (3.3). La buena correlación entre el parámetro  $a^*$  y el % R Ant T indicaría que el proceso de lavado-desinfección no provocó cambios en el color de las frutas en el espacio experimental ensayado.

Tabla 3.18. Correlaciones entre los cambios de los parámetros de color y el porcentaje de retención de antocianinas totales en el diseño de lavado-desinfección.

Respuesta	Correlación (R)
	$\delta_{\text{parámetro color vs. \% R Ant T}}$
$L^*$	-0,61
$a^*$	0,74
$b^*$	0,25
$C_{ab}^*$	0,61
$h_{ab}$	-0,48

Media  $\pm$  desviación estándar. ( $n=3$ ).

### 3.2.1.3 Efecto de las condiciones de lavado-desinfección sobre las actividades enzimáticas de frutillas frescas cortadas

La Tabla 3.19 muestra los resultados experimentales de las enzimas en el diseño ensayado, expresados como actividad relativa con respecto a la determinada en las frutillas frescas cortadas sin lavar.

En la Tabla 3.20 se presentan los resultados del ANOVA para todos los porcentajes de actividad enzimática relativa estudiados. Para las actividades relativas de PME y PPO, algunas variables del proceso resultaron significativas.

Se obtuvieron modelos completos en variables no codificadas para las actividades relativas de PME y PPO (Ecuaciones 3.11 y 3.12), los cuales mostraron que la falta de ajuste, basándose en el error puro, no fue significativa ( $p > 0,05$ ). Estos modelos explicaron el 94,5% y 87,7% de la variabilidad de los datos, respectivamente. Además los valores de AAD obtenidos fueron aceptables (Tabla 3.20).

$$PME (\%) = 40,4 + 0,4 C + 1,4 T + 2,0 t - 0,02 CT + 0,003 Ct - 0,003 Tt + 0,002 C^2 - 0,009 T^2 - 0,03 t^2 \quad (3.11)$$

$$PPO (\%) = 62,7 - 0,6 C + 0,5 T - 1,4 t - 0,003 CT + 0,008 Ct + 0,006 Tt + 0,004 C^2 - 0,01 T^2 + 0,01 t^2 \quad (3.12)$$

Tabla 3.19. Resultados experimentales de la actividad relativa (%) para la PME, PAL, PPO y PG, luego del lavado-desinfección con ácido peracético (0-80 mg L<sup>-1</sup>), tiempo (10-60 s) y temperatura (4-40°C), respecto a las frutillas frescas cortadas sin tratar.

N° corrida	Actividad relativa (%)			
	PME	PAL	PPO	PG
1	104,6	89,2	24,2	85,6
2	105,4	95,2	32,3	69,3
3	77,6	81,2	31,4	89,9
4	84,0	71,1	39,5	99,5
5	100,4	101,8	31,9	87,9
6	78,0	110,5	23,5	97,2
7	91,6	94,1	35,1	89,0
8	78,0	83,3	33,4	69,0
9	77,2	80,1	52,4	90,2
10	111,0	97,1	41,2	93,7
11	89,5	95,5	36,0	57,7
12	95,6	77,0	26,4	109,0
13	80,7	71,6	32,9	125,7
14	105,7	90,2	48,9	157,0
15	126,3	67,4	26,7	98,7

Las corridas experimentales fueran hechas en orden aleatorio.

Tabla 3.20. Análisis de variancia de las actividades relativas PME, PAL, PPO y PG.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados			
		PME (%)	PAL (%)	PPO (%)	PG (%)
X <sub>1</sub> (C)	1	655,6*	1,5	64,8	702,6
X <sub>2</sub> (T)	1	2,7	114,3	18,8	625,0
X <sub>3</sub> (t)	1	1,2	74,0	83,5	736,9
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	31,1	361,7	136,6	1556,17
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	932,1**	62,8	18,5	447,4
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1	43,7	12,3	267,8*	1989,7
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	32,6	193,3	51,5	104,3
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1	8,8	722,3	32,3	296,0
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	1227,3**	7,15	175,7*	0,12
Residual	5				
Falta de ajuste	3	156,5	537,8	77,8	1343,1
Error Puro	2	14,5	79,7	42,1	205,0
R <sup>2</sup>	-	94,5	71,2	87,7	80,6
AAD (%)	-	3,4	5,9	7,6	9,7

\*p≤ 0,05; \*\*p≤ 0,01. <sup>1</sup>AAD: desviación absoluta de la media.

PME (%): actividad relativa pectin metil esterasa; PAL (%): actividad relativa fenilalanina amonioliasa; PPO (%): actividad relativa polifenoloxidasas y PG (%): actividad relativa poligalacturonasa.

Basándose en estos análisis, se aceptaron estos modelos para representar los datos experimentales y se obtuvieron modelos reducidos con los coeficientes presentados en las ecuaciones 3.13 y 3.14 en el caso de la PME y la PPO, respectivamente.

$$PME (\%) = 39,8 + 0,7 C + 0,9 T + 2,0 t - 0,02 CT - 0,03 t^2 \quad R^2 = 90,6 \quad AAD = 3,6 \quad (3.13)$$

$$PPO (\%) = 62,8 - 0,4 C - 1,2 t + 0,008 Ct + 0,01 t^2 \quad R^2 = 60,0 \quad AAD = 12,4 \quad (3.14)$$

En el caso de la PME los factores más significativos resultaron ser el tiempo a través del término cuadrático ( $t^2$ ), y la concentración a través de su contribución en los términos lineal (C) y cruzado con la temperatura (CT).

Valores de actividad enzimática relativa superiores al 100% indicarían una activación de la enzima, valores menores al 100% indicarían una reducción de la actividad enzimática. En la Figura 3.11 se puede observar como la actividad relativa de la PME de las frutillas frescas cortadas lavadas con ácido peracético aumenta a medida que aumenta la concentración del agente activo, y con respecto al tiempo presenta un valor máximo y luego

decrece. En el gráfico de contornos de la Figura 3.11 puede observarse que en un amplio conjunto de combinaciones de concentración y tiempos de tratamiento los valores predichos de actividad relativa de la PME muestran una menor actividad que en la fruta fresca cortada sin tratar (PME (%) < 100%).

Las variables de proceso que afectaron la actividad de la PPO en el lavado desinfección (Ecuación 3.14) fueron el tiempo de lavado a través del término cuadrático ( $t^2$ ) y la concentración de ácido peracético ( $C t$ ). Como se observa en la Figura 3.12, la PPO mostró una reducción mayor del 50 % de la actividad en todo el espacio experimental ensayado. Por otro lado, la actividad relativa disminuyó a medida que aumentaba el tiempo y aumentó levemente en función de la concentración a los mayores tiempos (60 segundos), pero se produjo una reducción a tiempos cortos (10 segundos). Este comportamiento fue similar a las tres temperaturas ensayadas.

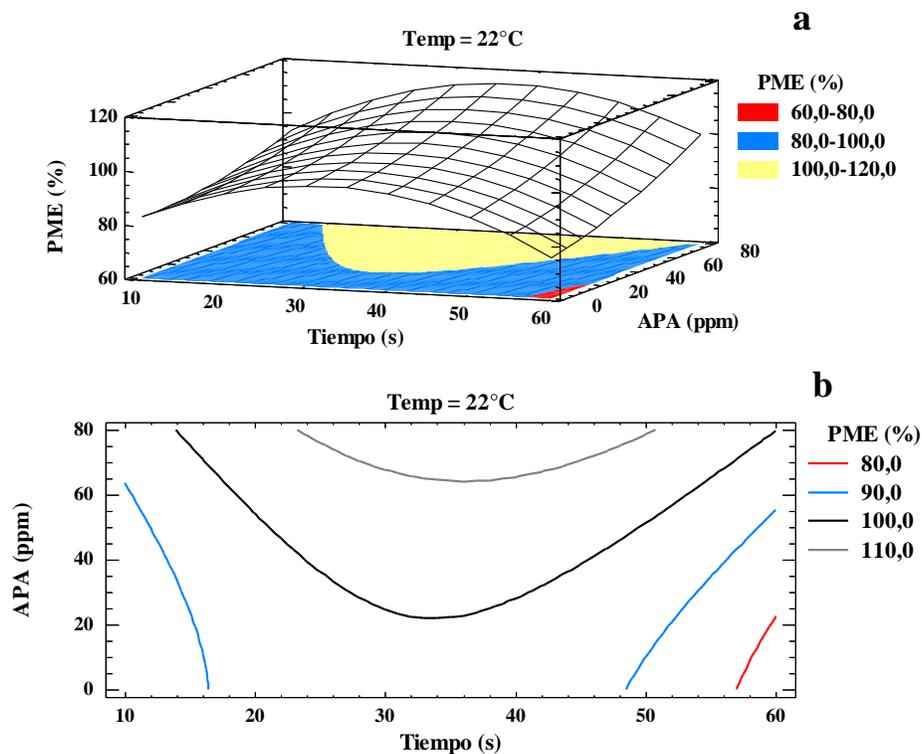


Figura 3.11. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para la actividad relativa PME en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T = 22^{\circ}\text{C}$ .

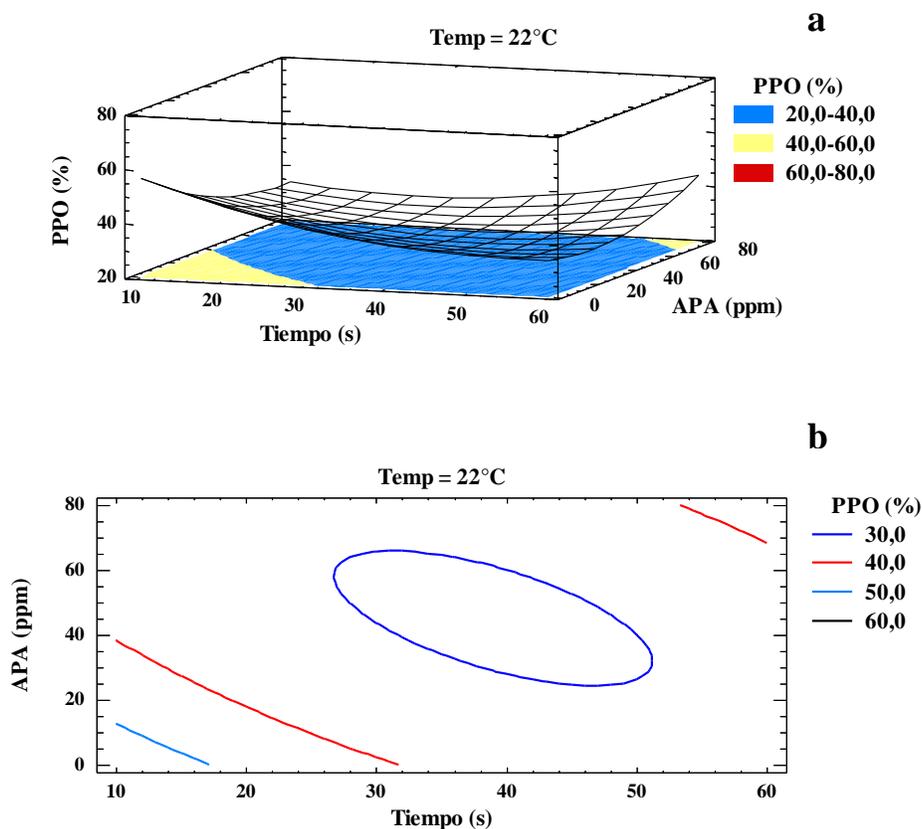


Figura 3.12. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para la actividad relativa PPO en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T = 22^{\circ}\text{C}$ .

Para la PAL y PG, los términos del modelo no resultaron significativos según el ANOVA por lo que la mejor predicción de la respuesta en función de las variables del proceso (concentración de ácido peracético, temperatura y tiempo) en el rango experimental ensayado, será el promedio de la respuesta de las 15 experiencias. La actividad de la PAL resultó un  $87,4 \pm 5,8\%$  y la de la PG  $94,6 \pm 23,9\%$  de las frutillas frescas cortadas sin lavar. Como puede observarse, los cambios relativos de las actividades de PG y PAL debido al lavado-desinfección, en las condiciones del espacio experimental ensayado, fueron mínimos.

### 3.2.2 Diseño de lavado-desinfección N° 2

En este nuevo diseño se amplió la concentración máxima de APA a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , y el tiempo de lavado máximo se incrementó a 120 s. Se estudió como repercutían estas nuevas condiciones en los niveles de compuestos bioactivos y se comprobó la efectividad sanitizante con pruebas microbiológicas.

#### 3.2.2.1 Compuestos bioactivos, parámetros de calidad y microorganismos aerobios mesófilos totales de las frutillas frescas cortadas sin lavar

Se estudiaron 2 variedades de frutillas, *Camarosa*, de origen regional (la misma variedad usada en el diseño N°1, pero en la temporada de cosecha 2010), y *Selva*, oriundas de Mar del Plata, Buenos Aires (adquirida del comercio en marzo de 2010).

En la Tabla 3.21 se presentan las concentraciones de compuestos bioactivos, los parámetros de calidad y la carga inicial de microorganismos aerobios mesófilos totales en las frutillas frescas cortadas sin lavar.

Las frutillas variedad *Camarosa* presentaron mayor contenido inicial de compuestos bioactivos (ácido ascórbico, vitamina C, fenoles y antocianinas totales), y mayor contenido inicial de sólidos solubles que la variedad *Selva*. Las diferencias naturales en los contenidos de compuestos fitoquímicos entre cultivares de frutillas fue observada en trabajos previos en la literatura. Meyers y col., (2003), usando el mismo método analítico, reportaron diferencias en el contenido de antocianinas totales de 8 cultivares de frutillas de Estados Unidos, en un rango de 21,9 a  $50 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FF}$ . De acuerdo a Davey y col., (2000), Cordenunsi y col., (2005), y Odriozola-Serrano y col., (2007), los contenidos de antocianinas y vitamina C dependen del cultivar de la frutilla, como de otros factores mencionados en la sección **1.3.2.1.1**.

En la Tabla 3.12 se muestran los perfiles de fenoles obtenidos para las dos variedades de frutillas estudiadas por HPLC-DAD. Los fenoles totales calculados como la suma aritmética de los compuestos fenólicos obtenidos por esta técnica (Tabla 3.12) no mostraron prácticamente diferencias para ambos cultivares de frutillas estudiados, y fueron menores que los valores de fenoles totales obtenidos por la técnica de Folin-Ciocalteu (Tabla 3.21). Con esta técnica, el contenido de fenoles totales hallado en *Camarosa* fue 10% superior que el encontrado en *Selva*.

Tabla 3.21. Compuestos bioactivos, parámetros de calidad y carga inicial de microorganismos aerobios mesófilos totales en frutillas frescas cortadas sin lavar.

Respuesta	Cultivar	
	<i>Camarosa</i>	<i>Selva</i>
AA (mg 100 g <sup>-1</sup> FF)	36,1 ± 2,5 <sup>b</sup>	14,8 ± 0,6 <sup>a</sup>
ADHA (mg 100 g <sup>-1</sup> FF)	8,1 ± 1,0 <sup>a</sup>	14,3 ± 0,9 <sup>b</sup>
Vit C (mg 100 g <sup>-1</sup> FF)	41,2 ± 3,4 <sup>b</sup>	28,7 ± 0,3 <sup>a</sup>
FT (mg AG 100 g <sup>-1</sup> FF)	324,2 ± 6,2 <sup>b</sup>	292,4 ± 5,1 <sup>a</sup>
Ant T (mg 100 g <sup>-1</sup> FF)	47,0 ± 2,2 <sup>b</sup>	19,0 ± 0,8 <sup>a</sup>
CA (mg AA 100 g <sup>-1</sup> FF)	440,1 ± 8,1 <sup>b</sup>	395,7 ± 7,2 <sup>a</sup>
SS (° Brix)	8,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	6,6 ± 0,2 <sup>a</sup>
pH	3,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,4 ± 0,1 <sup>a</sup>
AT (g ACA/100 g <sup>-1</sup> FF)	0,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>a</sup>
<i>L</i> <sub>0</sub> <sup>*</sup>	30,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	32,3 ± 0,6 <sup>a</sup>
<i>a</i> <sub>0</sub> <sup>*</sup>	37,2 ± 0,6 <sup>b</sup>	25,4 ± 0,7 <sup>a</sup>
<i>b</i> <sub>0</sub> <sup>*</sup>	20,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	12,2 ± 0,6 <sup>a</sup>
<i>C</i> <sub>0</sub> <sup>*</sup>	42,5 ± 0,5 <sup>b</sup>	28,2 ± 0,9 <sup>a</sup>
<i>h</i> <sub>ab0</sub>	29,1 ± 0,6 <sup>b</sup>	25,7 ± 0,5 <sup>a</sup>
FAM (log UFC g <sup>-1</sup> )	3,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,1 <sup>a</sup>

Media ± desviación estándar. ( $n=3$ ). AA: ácido ascórbico; ADHA: ácido dehidroascórbico; Vit C: vitamina C; FT: fenoles totales; Ant T: antocianinas totales; CA: capacidad antioxidante; SS: sólidos solubles; AT: acidez total;  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$  parámetros del sistema CIELAB, FAM: microorganismos aerobios mesófilos totales.

Valores en la misma fila con diferente letra muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) por variedad.

El método de Folin-Ciocalteu es un método simple y rápido para medir el contenido de compuestos fenólicos totales en productos naturales. El mecanismo básico es una reacción redox en el que la oxidación de los compuestos fenólicos por un reactivo heteropolianión molibdotungstosfórico produce un producto coloreado con un máximo de absorción a 765 nm. Se sabe que la reacción de Folin-Ciocalteu puede tener interferencias (particularmente azúcares, aminas aromáticas, dióxido de sulfuro, ácido ascórbico, otros ácidos orgánicos, y  $Fe^{2+}$ ) que pueden reaccionar con el reactivo, sobreestimando las concentraciones de fenoles totales (Prior y col., 2005). Sin embargo, según Tarola y col., (2012), los valores de fenoles totales obtenidos por ambas metodologías pueden correlacionarse.

Con respecto a los atributos de color, se observó un color rojo más vívido en la variedad *Camarosa* ( $C_{abo}^*$  mayores), lo cual coincide con los valores de antocianinas totales más altos encontrados para este cultivar.

### 3.2.2.2 Efecto de las condiciones de lavado-desinfección sobre los compuestos bioactivos, los parámetros de calidad y los microorganismos aerobios mesófilos totales de frutillas frescas cortadas

En la Tabla 3.22 se muestran las 15 corridas experimentales con los factores (concentración ácido peracético (APA), temperatura y tiempo) y sus niveles estudiados.

Tabla 3.22. Factores experimentales estudiados y sus niveles correspondientes.

N° corrida	APA (mg L <sup>-1</sup> )	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
1	50	65	22
2	50	65	22
3	50	65	22
4	0	10	22
5	0	120	22
6	100	10	22
7	100	120	22
8	50	10	4
9	50	120	4
10	50	10	40
11	50	120	40
12	0	65	4
13	100	65	4
14	0	65	40
15	100	65	40

Las corridas experimentales fueran hechas en orden aleatorio.

El número de corridas experimentales en cada experiencia de lavado-desinfección fue de 15 para cada variedad. En la Tablas 3.23 y 3.24 se muestran los resultados de las respuestas estudiadas para las variedades *Camarosa* y *Selva*, respectivamente.

El análisis de varianza, en principio, se realizó empleando los resultados obtenidos en las 30 corridas experimentales, teniendo en cuenta, el factor bloque: *variedad*. Cuando este factor no fue significativo, la respuesta se analizó en conjunto para las dos variedades; de lo contrario el análisis se llevó a cabo por separado para cada variedad.

Los ANOVAS de los porcentajes de retención de ácido ascórbico, antocianinas totales, fenoles totales, y capacidad antioxidante (Tabla 3.25) no presentaron efectos de bloque significativo, por lo tanto, los resultados se modelaron en forma conjunta para ambas variedades de frutillas estudiadas.

Se obtuvieron los modelos completos en variables no codificadas para las respuestas % R AA, % R Ant T, % R FT y % R CA (Ecuaciones 3.15, 3.16, 3.17 y 3.18). Los valores de  $R^2$  y AAD (Tabla 3.25) resultaron aceptables.

$$\% R AA = 89,7 - 0,1 C + 0,06 T + 0,4 t - 0,009 CT - 0,001 Ct + 0,002 Tt + 0,001 C^2 + 0,001 T^2 - 0,004 t^2 \quad (3.15)$$

$$\% R Ant T = 84,8 + 0,08 C + 0,9 T - 0,03 t - 0,001 CT - 0,0010 Ct - 0,003 Tt - 0,001 C^2 - 0,02 T^2 + 0,00010 t^2 \quad (3.16)$$

$$\% R FT = 102,6 - 0,2 C - 0,3 T - 0,1 t - 0,0006 CT + 0,0004 Ct + 0,002 Tt + 0,002 C^2 + 0,005 T^2 + 0,00008 t^2 \quad (3.17)$$

$$\% R CA = 104,3 - 0,3 C + 0,3 T - 0,2 t - 0,0002 CT + 0,0006 Ct + 0,002 Tt + 0,0010 C^2 - 0,01 T^2 - 0,0001 t^2 \quad (3.18)$$

Los modelos reducidos para estas respuestas eliminando los términos no significativos por el método de regresión lineal “*setpwise*” se muestran en las Ecuaciones 3.19, 3.20, 3.21 y 3.22.

$$\% R AA = 88,5 - 0,08 C + 0,3 T + 0,4 t - 0,009 CT - 0,004 t^2 \quad R^2 = 74,7 \quad AAD = 9,7 \quad (3.19)$$

$$\% R Ant T = 94,6 - 0,2 C + 0,6 T - 0,1 t - 0,02 T^2 \quad R^2 = 63,0 \quad AAD = 6,3 \quad (3.20)$$

$$\% R FT = 97,6 - 0,2 C - 0,05 t + 0,002 C^2 \quad R^2 = 65,9 \quad AAD = 2,6 \quad (3.21)$$

$$\% R CA = 94,9 - 0,1 C \quad R^2 = 22,8 \quad AAD = 8,2 \quad (3.22)$$

Tabla 3.23. Resultados experimentales del diseño de Box-Benhken de lavado desinfección N° 2 en la variedad *Camarosa*.

N° Corrida	%R AA	%R Vit C	%R FT	%R Ant T	%R CA	%R SS	%C AT	%C pH	$\delta L^*$ (%)	$\delta a^*$ (%)	$\delta b^*$ (%)	$\delta C_{ab}^*$ (%)	$\delta h_{ab}$ (%)	Red FAM
1	89,8	99,5	92,6	83,4	96,8	86,4	-5,1	-1,2	1,5	3,0	8,0	4,2	4,1	1,7
2	79,5	85,0	86,8	86,5	74,4	87,6	-4,5	-1,2	3,6	-3,2	-5,0	-3,6	-1,6	1,8
3	86,7	94,7	84,3	88,0	80,1	84,6	0,4	0,1	4,1	-4,8	-8,7	-5,7	-3,5	2,0
4	102,9	107,2	95,3	92,9	108,3	101,2	-2,1	-1,2	2,7	-2,6	-3,6	-2,9	-0,8	0,3
5	81,3	92,1	90,3	82,3	84,4	92,9	-9,5	-4,1	4,8	1,6	7,9	3,2	5,1	1,5
6	75,5	83,0	89,2	96,0	100,7	87,6	-10,6	-3,8	-1,6	0,5	5,3	1,7	3,9	1,5
7	62,4	75,3	88,1	70,8	82,3	87,0	-16,6	-3,8	8,8	-4,4	-4,9	-4,5	-0,4	2,1
8	76,2	82,8	93,0	94,1	98,3	89,9	3,4	0,1	9,6	-0,3	2,6	0,4	2,4	1,6
9	73,5	95,3	81,4	79,4	68,1	66,9	-9,9	-2,5	4,3	-5,0	-6,8	-5,4	-1,6	0,9
10	75,0	93,2	92,6	87,6	76,0	87,0	-6,6	-4,1	1,8	1,1	7,7	2,7	5,4	1,7
11	57,9	82,1	87,0	82,9	88,5	88,2	-4,6	-1,2	2,7	-7,8	-12,8	-9,0	-4,6	1,7
12	93,7	98,8	97,1	86,9	91,6	102,4	-7,5	-0,4	9,0	-4,7	-10,2	-6,0	-5,0	1,4
13	75,7	76,9	91,4	81,9	90,8	89,9	-6,8	-1,2	1,9	-5,9	-8,6	-6,5	-2,4	1,8
14	96,1	99,3	93,9	82,0	87,4	105,9	-10,3	-1,2	9,5	0,2	0,1	0,2	-0,1	1,4
15	62,6	83,7	86,0	65,4	78,9	92,3	-17,3	-1,2	10,9	-5,2	-11,0	-6,6	-5,2	2,8

Donde % RAA: porcentaje retención ácido ascórbico, % RVit C: porcentaje retención vitamina C; % RFT: porcentaje retención fenoles totales; % RAnt T: porcentaje retención antocianinas totales; % RCA: porcentaje retención capacidad antioxidante; %R SS: porcentaje retención sólidos solubles; %C AT: porcentaje cambio de acidez total; %C pH: porcentaje cambio de pH;  $\delta L^*$ : porcentaje cambio de luminosidad;  $\delta a^*$ ,  $\delta b^*$ ,  $\delta C_{ab}^*$  y  $\delta h_{ab}$ : porcentaje cambios en los parámetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$  del sistema CIELAB; Red FAM: reducción de microorganismos aerobios mesófilos.

Tabla 3.24. Resultados experimentales del diseño de Box-Benhken de lavado-desinfección en la variedad *Selva*.

N° Corrida	%R AA	%R Vit C	%R FT	%R Ant T	%R CA	%R SS	%C AT	%C pH	$\delta L^*$ (%)	$\delta a^*$ (%)	$\delta b^*$ (%)	$\delta C_{ab}^*$ (%)	$\delta h_{ab}$ (%)	Red FAM
1	80,7	88,0	85	81,1	99,5	94,7	-5,1	4,4	-3,0	13,3	10,8	12,9	-1,9	1,1
2	92,6	86,1	86,8	91,4	92,5	96,2	-4,5	8,6	-7,3	15,4	15,0	15,4	-3,2	1,3
3	93,0	95,0	84,28	90,3	94,7	97,7	0,4	6,3	-5,8	13,6	12,3	13,4	-1,0	1,0
4	96,4	89,2	95,25	97,6	107,2	96,9	-2,1	-0,4	1,1	16,2	19,6	16,0	3,4	0,2
5	91,5	80,8	90,31	88,9	92,1	90,8	-9,5	-0,4	-1,9	15,7	18,5	16,2	5,0	0,6
6	70,4	57,6	89,2	77,3	83,0	92,4	-10,6	-0,6	2,2	12,5	18,6	13,7	4,7	0,7
7	31,2	49,6	88,12	62,1	75,3	86,3	-16,6	-0,3	6,7	7,6	12,8	7,9	4,9	1,3
8	93,9	82,9	93,02	72,3	82,8	94,7	3,4	4,9	4,9	6,3	10,5	6,5	2,2	1,0
9	56,5	69,3	81,37	72,4	95,3	86,3	-9,9	-4,2	-1,7	7,7	18,5	8,4	10,3	0,9
10	82,7	87,7	92,58	97,8	93,2	81,7	-6,6	-0,9	-7,6	7,9	11,8	8,1	5,4	1,1
11	77,9	73,9	87,04	66,8	82,1	87,0	-4,6	-0,6	0,3	12,7	33,3	16,9	15,4	1,5
12	105,8	82,5	97,11	93,0	98,8	90,8	-7,5	-2,5	-1,2	11,4	19,0	12,9	5,9	0,6
13	109,6	76,3	91,43	67,9	76,9	86,3	-6,8	0,1	-0,3	-0,5	9,9	1,8	5,9	1,5
14	112,3	95,6	93,9	83,2	99,3	93,1	-10,4	2,2	7,1	5,5	21,4	7,2	14,5	0,5
15	65,2	84,5	85,96	62,0	83,7	84,0	-17,3	-1,9	4,5	3,4	20,0	6,5	12,4	1,6

Donde % RAA: porcentaje retención ácido ascórbico, % RVit C: porcentaje retención vitamina C; % RFT: porcentaje retención fenoles totales; % RAnt T: porcentaje retención antocianinas totales; % RCA: porcentaje retención capacidad antioxidante; %R SS: porcentaje retención sólidos solubles; %C AT: porcentaje cambio de acidez total; %C pH: porcentaje cambio de pH;  $\delta L^*$ : porcentaje cambio de luminosidad;  $\delta a^*$ ,  $\delta b^*$ ,  $\delta C_{ab}^*$  y  $\delta h_{ab}$ : porcentaje cambios en los parámetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$  del sistema CIELAB; Red FAM: reducción de microorganismos aerobios mesófilos.

La retención de ácido ascórbico fue afectada por la concentración de APA a través del término lineal ( $p \leq 0,01$ ), y por el tiempo a través de los términos lineal y cuadrático ( $p \leq 0,01$ ). La temperatura fue significativa también a través de la interacción con la concentración de APA (CT) ( $p \leq 0,05$ ).

Tabla 3.25. Análisis de variancia de los resultados del diseño de lavado-desinfección N° 2 en frutillas variedad *Camarosa* y *Selva*.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados			
		%R AA	%R Ant T	%R FT	% R CA
X <sub>1</sub> (C)	1	3212,1**	951,4**	119,5*	594,1*
X <sub>2</sub> (T)	1	190,7	25,7	2,3	11,4
X <sub>3</sub> (t)	1	1229,4**	759,1**	134,7*	414,1
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	51,7	95,3	109,2*	44,0
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	544,6*	7,4	2,6	0,2
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1	81,5	55,8	7,4	20,8
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	1,2	216,4*	19,3	100,2
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1	40,6	216,4	18,7	45,6
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	1287,8**	0,6	0,5	1,5
Bloque	19	137,4	104,4	1,9	100,2
Residual	1				
Falta de ajuste	15	1928,9	909,6	94,5	2103,0
Error Puro	4	153,3	75,4	39,9	153,3
R <sup>2</sup>	-	77,0	69,6	75,3	45,0
AAD (%)	-	9,4	5,9	1,9	7,1

\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ . <sup>1</sup>AAD: desviación absoluta de la media

% RAA: porcentaje retención ácido ascórbico, % RFT: porcentaje retención fenoles totales; % RAnt T: porcentaje retención antocianinas totales; % RCA: porcentaje retención capacidad antioxidante.

En la Figura 3.13 se muestra como la % R AA disminuye cuando la concentración de APA y el tiempo aumentan a 22°C. Además, pequeños cambios en la %R AA tuvieron lugar a medida que la temperatura aumentaba en las condiciones de lavado-desinfección de concentración de APA bajas. Por otra parte, un claro decrecimiento en la retención de ácido ascórbico se encontró a medida que la temperatura aumentaba, usando concentraciones de APA altas (Figura no mostrada). Con la Ecuación 3.19, el valor predicho de la retención de ácido ascórbico es de 93,3 y 46,9 % en las condiciones mínimas (0 mg L<sup>-1</sup> APA, 4°C y 10 s) y máximas (100 mg L<sup>-1</sup> APA, 40°C y 120 s) de las variables del diseño estudiadas, respectivamente.

La retención de antocianinas totales fue afectada por la concentración de APA y el tiempo del lavado-desinfección, a través de los términos lineales ( $p \leq 0,01$ ), y la temperatura, a través del término cuadrático ( $p \leq 0,05$ ). En la Figura 3.14 se observa la disminución de la retención de antocianinas totales (%R Ant T) a medida que la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado aumentan, a 22 °C.

Con la Ecuación 3.20, el valor predicho de %R Ant T es del 66,1 %, trabajando a 100 mg L<sup>-1</sup> de APA, 22°C y 120 s. La retención de antocianinas más baja (54,6%) fue alcanzada a esa concentración de APA y tiempo, pero a 40°C. Esta situación podría ser justificada no solo por la alta concentración de APA y los tiempos largos utilizados, sino también por la temperatura, que probablemente incrementa procesos difusivos de las antocianinas desde las frutillas frescas cortadas. Alexandre y col., (2012) reportaron una retención de antocianinas totales del 85 % en frutillas enteras despedunculadas lavadas en agua a 15°C por 2 minutos. Estos resultados estarían de acuerdo con nuestras predicciones en esas mismas condiciones (%R Ant T= 87,1% a 0 mg L<sup>-1</sup> APA, 15°C y 120 s).

Una retención de antocianinas de casi el 100 % se alcanzaría trabajando a 0 mg L<sup>-1</sup> de APA, 4°C y 10 s, los valores mínimos empleados de las variables del proceso.

La retención de fenoles totales fue afectada por la concentración de APA a través de los términos lineal y cuadrático ( $p \leq 0,05$ ) y el tiempo en el término lineal ( $p \leq 0,05$ ). Otra vez, se observa una disminución de la retención de fenoles totales a medida que la concentración de APA y el tiempo del proceso aumentan (Figura 3.15).

En cuanto a la capacidad antioxidante, si bien el modelo de % R CA obtenido presenta un valor de  $R^2$  bajo (menor a 0,5), el AAD (%) es aceptable y como puede observarse en la Figura 3.16 existe concordancia con los resultados observados para los compuestos bioactivos, es decir, se observa una disminución de la capacidad antioxidante a medida que la concentración de APA aumenta. La Ecuación 3.22 predice una retención de la capacidad antioxidante del 84,8 % en las condiciones extremas del diseño (100 mg L<sup>-1</sup> APA; 40°C y 120 s).

El efecto oxidante del ácido peracético justificaría las pérdidas de ácido ascórbico, antocianinas totales, fenoles totales y capacidad antioxidante en las frutillas frescas cortadas luego del lavado-desinfección. Además, las soluciones de ácido peracético contienen peróxido de hidrógeno (200 y 400 mg L<sup>-1</sup> en 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> de solución de APA,

respectivamente), el cual se considera un agente oxidante fuerte. Al respecto, Özkan y col., (2005), reportaron una degradación del contenido de antocianinas totales en néctar de cerezas amargas, frutillas y granadas, luego del lavado-desinfección con soluciones de peróxido de hidrógeno entre 167 y 502 mg L<sup>-1</sup>. Estos autores describieron una alta susceptibilidad de las antocianinas de las frutillas al peróxido de hidrógeno, seguidas por las de las granadas y las cerezas. Alexandre y col. (2012) estudiaron la eficacia como sanitizante del peróxido de hidrógeno a altas concentraciones (10,000 y 50,000 mg L<sup>-1</sup>) en frutillas frescas despedunculadas. Los autores demostraron que el contenido de antocianinas totales disminuyó y esta situación resultó en un impacto negativo sobre la calidad de las frutas. Por lo tanto, un efecto oxidante conjunto entre el APA y el peróxido de hidrogeno justificaría aún más la degradación observada en los compuestos bioactivos.

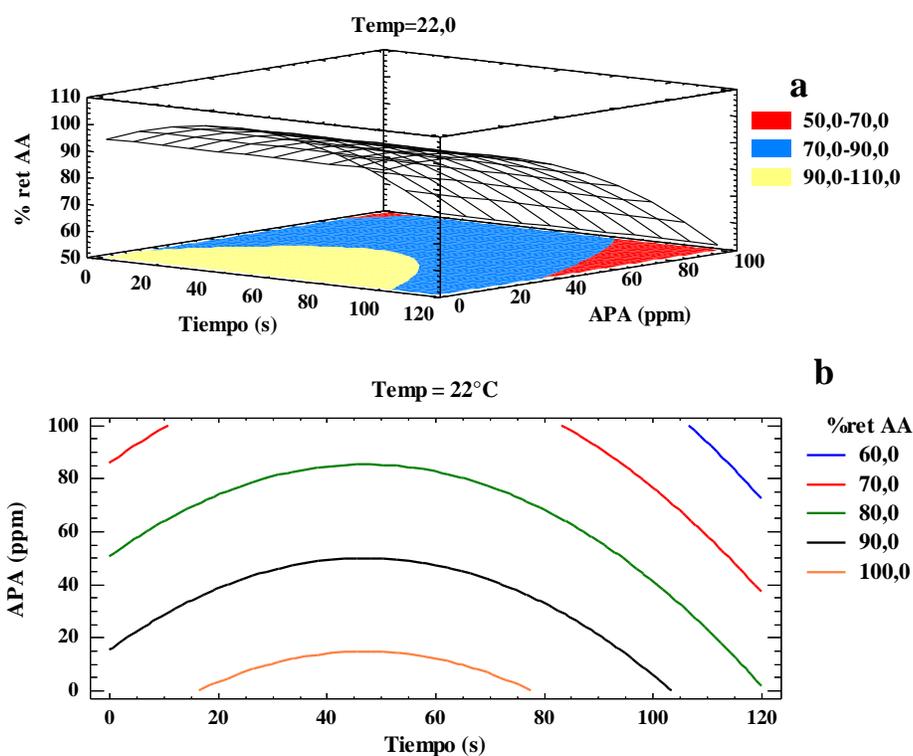


Figura 3.13. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el porcentaje de retención de ácido ascórbico en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a T= 22°C.

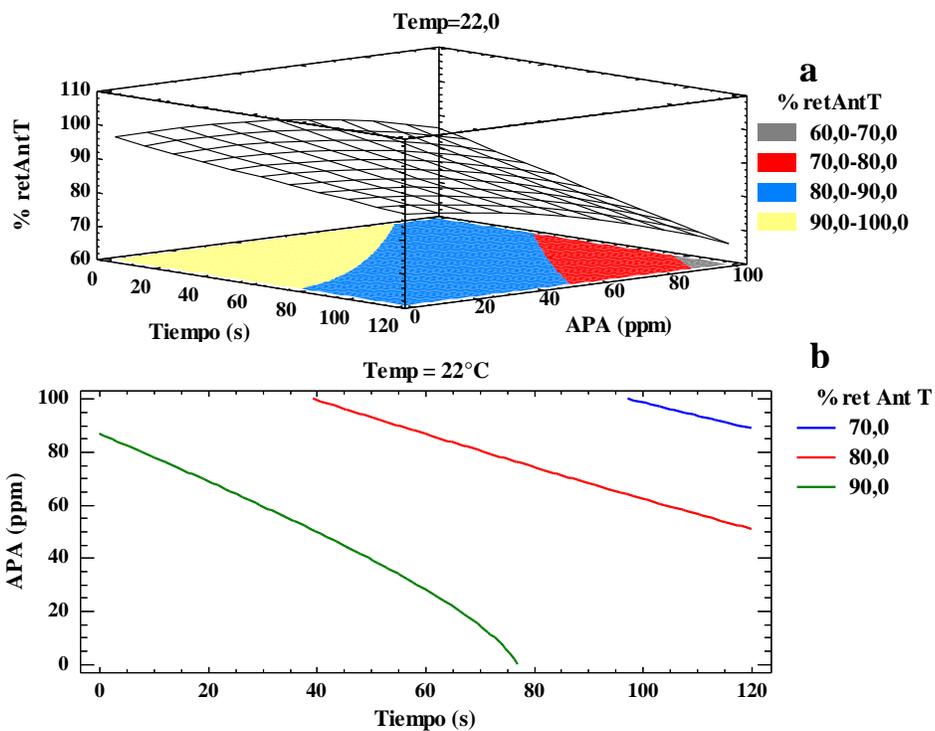


Figura 3.14. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el porcentaje de retención de antocianinas totales en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T=22^{\circ}\text{C}$ .

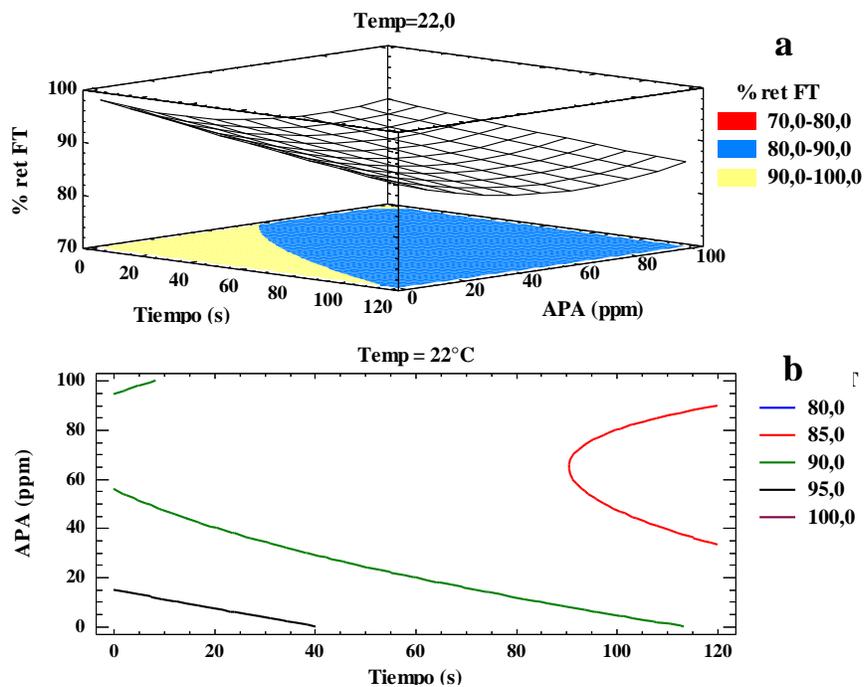


Figura 3.15. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el porcentaje de retención de fenoles totales en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T=22^{\circ}\text{C}$ .

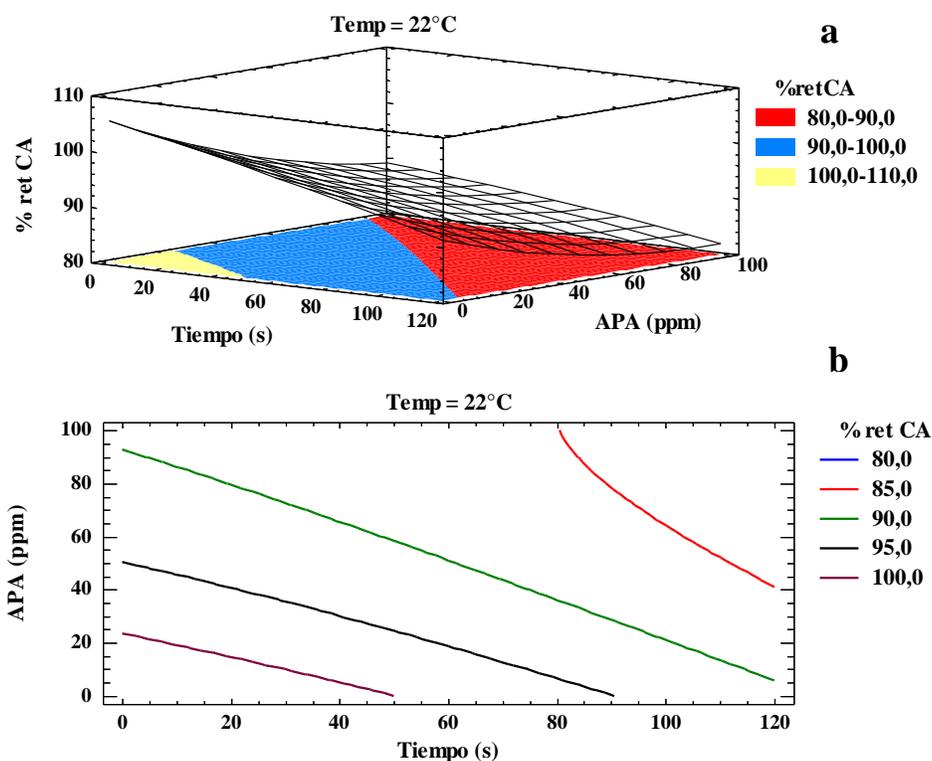


Figura 3.16. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el porcentaje de retención de capacidad antioxidante en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T=22^{\circ}\text{C}$ .

La retención vitamina C y sólidos solubles, la reducción de los microorganismos aerobios mesófilos totales, los cambios de pH, y acidez total; y los parámetros de color, presentaron efecto de bloque (variedad) significativo, por lo que se analizaron por separado.

En las Tablas 3.23 y 3.24 se muestran los resultados experimentales de estas respuestas para las variedades *Camarosa* y *Selva*, respectivamente.

En la Tabla 3.26 y 3.27 se presentan los resultados del análisis de la varianza para las frutillas *Camarosa* y *Selva*, respectivamente.

Para *Camarosa*, el modelo de %R Vit C no presentó falta de ajuste, pero ninguno de los términos del modelo polinomial de 2° orden resultaron significativos, por lo que el promedio de la respuesta resulta la mejor estimación del cambio de calidad de las frutillas durante el lavado desinfección, en cualquier situación del espacio experimental ensayada. El % R Vit C promedio para las 15 experiencias fue de  $90 \pm 4 \%$ .

Se obtuvo el modelo completo en variables no codificadas para el %R Vit C para la variedad *Selva* (Ecuación 3.23). Los valores de  $R^2$  y AAD (Tablas 3.27) resultaron aceptables.

$$\% R Vit C_{Selva} = 77,5 + 0,1 C + 0,0001 T + 0,5 t - 0,001 CT + 0,00004 Ct - 0,00005 Tt - 0,003 C^2 + 0,006 T^2 - 0,004 t^2 \quad (3.23)$$

El modelo reducido de % R Vit C para la variedad *Selva* se muestra en las Ecuación 3.24.

$$\% R Vit C_{Selva} = 85,2 - 0,2 C + 0,5 t - 0,004 t^2 \quad R^2 = 71,4. \text{ AAD} = 6,9 \quad (3.24)$$

La retención de vitamina C en las frutillas variedad *Selva* fue afectada por la concentración de APA a través de su factor lineal ( $p \leq 0,01$ ), y por el tiempo a través de su factor cuadrático ( $p \leq 0,01$ ).

El ácido peracético produce un efecto oxidante sobre el ácido ascórbico (AA). El ácido ascórbico, la principal forma biológicamente activa de vitamina C, puede ser reversiblemente oxidado a ácido dehidroascórbico (ADHA), el cual también presenta actividad biológica, pero en menor proporción (Otsuka y col., 1986) (Figura 1.2). La subsecuente oxidación genera de forma irreversible ácido dicetogulónico (ADCG), el cual no presenta actividad de vitamina C (Hernández y col., 2006).

La predicción con el modelo de % R Vit C obtenido (Ecuación 3.24), indica una retención en las frutillas variedad *Selva* del 67,6 %, trabajando a las condiciones máximas del diseño de lavado-desinfección ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ , y 120s). La mayor pérdida de vitamina C alcanzada en las frutillas variedad *Selva*, se debe a la mayor oxidación del AA y ADHA a ADCG por el ácido peracético.

La Figura 3.17 muestra el gráfico de superficie y contorno obtenido para el % R Vit C en la variedad *Selva*. En ambos gráficos puede observarse, una disminución de la retención de vitamina C a medida que la concentración de APA y el tiempo del lavado-desinfección aumentan.

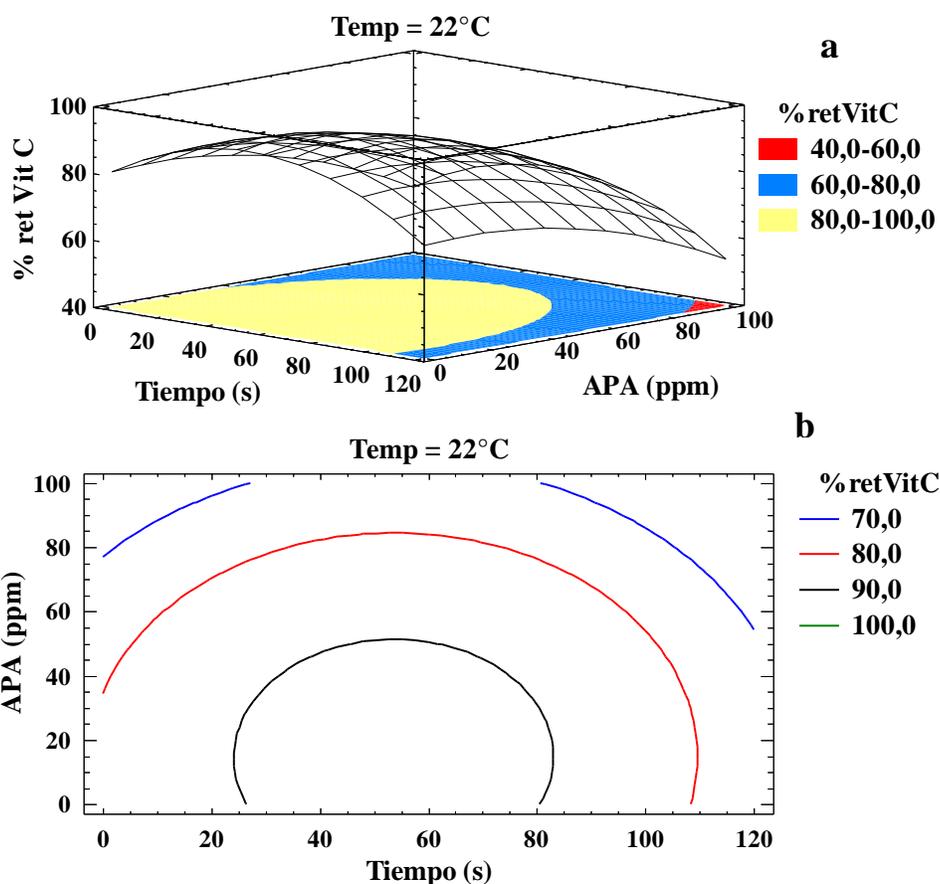


Figura 3.17. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el porcentaje de retención de vitamina C en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T = 22^{\circ}\text{C}$  en la variedad *Selva*.

Con respecto a los atributos de color, para el cultivar *Camarosa*, los términos del modelo no resultaron significativos según el ANOVA (Tabla 3.26), por lo tanto los datos no pueden ser representados por ecuaciones polinomiales de 2° orden. Además, se obtuvieron bajos valores de  $R^2$  y altos valores de AAD (mayores a 100) (Tabla 3.26). Los porcentajes de los cambios de color estuvieron entre -1,6 a +10,9; -7,8 a +3; -12,8 a 8; -9 a 4,2 y, -5,2 a 5,4 para  $\delta L^*$ ,  $\delta a^*$ ,  $\delta b^*$ ,  $\delta C_{ab}$  y  $\delta h_{ab}$ , respectivamente, en el dominio experimental ensayado (0 - 100  $\text{mg L}^{-1}$  APA, 4 - 40°C y 10 - 120 s).

Para el cultivar *Selva*, los parámetros de color fueron afectados por las variables del proceso. Los modelos obtenidos (Ecuaciones 3.25, 3.26, 3.27, 3.28 y 3.29) no presentaron falta de ajuste significativa ( $p \geq 0,05$ ), los valores de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) fueron mayores a 60,0%, y los valores de AAD estuvieron dentro de 15-34% (Tabla 3.27).

$$\delta L^*_{Selva} = 11,0 - 0,2 C - 0,5 T - 0,2 t - 0,0010 CT + 0,0007 Ct + 0,004 Tt + 0,002 C^2 + 0,007 T^2 + 0,0006 t^2 \quad (3.25)$$

$$\delta a^*_{Selva} = 8,8 - 0,002 C + 0,8 T - 0,05 t + 0,003 CT - 0,0004 Ct + 0,0009 Tt - 0,0010 C^2 - 0,02 T^2 + 0,0004 t^2 \quad (3.26)$$

$$\delta b^*_{Selva} = 23,3 - 0,1 C - 0,5 T - 0,1 t + 0,002 CT - 0,0004 Ct + 0,003 Tt + 0,0007 C^2 + 0,009 T^2 + 0,0009 t^2 \quad (3.27)$$

$$\delta C_{ab}^*_{Selva} = 10,8 - 0,02 C + 0,5 T - 0,05 t + 0,003 CT - 0,0005 Ct + 0,002 Tt - 0,0007 C^2 - 0,02 T^2 + 0,0004 t^2 \quad (3.28)$$

$$\delta h_{abSelva} = 10,4 - 0,1 C - 0,9 T - 0,07 t - 0,0006 CT - 0,0001 Ct + 0,0005 Tt + 0,002 C^2 + 0,02 T^2 + 0,0009 t^2 \quad (3.29)$$

Los modelos reducidos de los atributos de color se muestran en las Ecuaciones 3.30, 3.31, 3.32, 3.33 y 3.34.

$$\delta L^*_{Selva} = 1,3 - 0,2 C + 0,002 C^2 \quad R^2 = 35,0 \quad AAD = 24,4 \quad (3.30)$$

$$\delta a^*_{Selva} = 9,0 - 0,1 C + 0,8 T + 0,003 CT - 0,02 T^2 \quad R^2 = 80,6 \quad AAD = 33,5 \quad (3.31)$$

$$\delta b^* = 12,4 + 0,2 T \quad R^2 = 20,0 \quad AAD = 27,0 \quad (3.32)$$

$$\delta C_{ab}^*_{Selva} = 7,4 - 0,06 C + 0,8 T - 0,02 T^2 \quad R^2 = 58,6 \quad AAD = 28,3 \quad (3.33)$$

$$\delta h_{abSelva} = 10,7 - 0,2 C - 0,9 T - 0,07 t + 0,002 C^2 + 0,02 T^2 + 0,0009 t^2 \quad R^2 = 89,7 \quad AAD = 33,1 \quad (3.34)$$

La concentración de ácido peracético fue el factor más significativo sobre los parámetros de color ( $\delta L^*$  y  $\delta C_{ab}^*$ ) en las frutillas frescas cortadas lavadas variedad *Selva*. Dependiendo de las condiciones del lavado-desinfección, se obtuvieron valores de  $\delta L^*$  positivos y negativos, indicando que las frutillas frescas cortadas lavadas fueron más claras o más oscuras que las frutillas frescas cortadas sin lavar, respectivamente. El modelo predictivo de cambio de  $L^*$  fue solo afectado por la concentración de APA. La Figura 3.18 muestra que

las frutas más claras se obtuvieron cuando se lavaron con las concentraciones más altas de APA ( $> 80 \text{ mg L}^{-1}$ ), y los tiempos más largos ( $>100 \text{ s}$ ) a  $22^\circ\text{C}$ . La oxidación y la subsecuente degradación de las antocianinas por el ácido peracético comercial (el cual contiene ácido peracético y peróxido de hidrógeno) podrían justificar la obtención de frutas más claras luego del lavado en este dominio experimental.

El parámetro  $C_{ab}^*$  mide la cromaticidad de los colores de las muestras, e incluye a los parámetros  $a^*$  y  $b^*$ . Los valores positivos en los  $\delta C_{ab}^*$  en las muestras de frutillas frescas cortadas lavadas, indican que el color de las mismas es más vívido que en las muestras de frutillas frescas cortadas sin lavar. La Figura 3.19 muestra que en cualquier condición dentro del área experimental estudiada, las frutillas frescas cortadas lavadas fueron más vívidas que las no lavadas. Sin embargo, a  $22^\circ\text{C}$ , las frutas más vívidas se obtienen a bajas concentraciones de APA ( $< 30 \text{ mg L}^{-1}$ ), y tiempos largos ( $> 100 \text{ s}$ ).

El modelo del porcentaje de cambio de  $h_{ab}$  fue afectado por la concentración de APA, el tiempo y la temperatura (Ecuación 3.34). El  $h_{ab}$  mide la tonicidad del color de las muestras. Los valores de  $\delta h_{ab}$  positivos y negativos obtenidos, indicaron que las frutillas frescas cortadas lavadas fueron menos o más rojas que las muestras de frutillas frescas cortadas sin lavar, respectivamente. Una amplia área experimental de trabajo de diferentes tiempos y concentraciones de APA demuestran la posibilidad de realizar el lavado-desinfección, preservando el color inicial de las frutas ( $\delta h_{ab} = 0$ ) o de obtener frutillas frescas cortadas más rojas ( $\delta h_{ab} < 0$ ) (Figura 3.20). El incremento del color rojo en esa área experimental (tiempos  $< 65 \text{ s}$  y concentraciones de APA entre  $30$  y  $70 \text{ mg L}^{-1}$ ) podría justificarse debido a que el pH bajo de las soluciones de APA ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ : 4,15;  $100 \text{ mg L}^{-1}$ : 3,80.) intensificaría el color rojo de las antocianinas, con mínima degradación.

Las variables del proceso solo mostraron efectos significativos sobre los parámetros de color en el caso de las frutillas variedad *Selva*, cuya concentración inicial de antocianinas totales fue más baja (Tabla 3.21).

Tabla 3.26. Análisis de variancia de los resultados del diseño de lavado-desinfección N° 2 en frutillas variedad *Camarosa*.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados									
		%R Vit C	%R SS	% C pH	%C AT	$\delta L^*$ (%)	$\delta a^*$ (%)	$\delta b^*$ (%)	$\delta C_{ab}^*$ (%)	$\delta h_{ab}$ (%)	Red FAM
$X_1$ (C)	1	768,7	259,9	1,2	50,0	4,5	11,3	22,4	13,5	1,4	1,6*
$X_2$ (T)	1	2,6	73,8	1,7	72,0	0,001	2,2	6,1	2,9	0,6	0,5*
$X_3$ (t)	1	57,2	117,8	0,8	46,1	8,2	25,6	102,2	38,7	19,2	0,2
$X_1X_2$	1	9,8	0,3	0,2	15,2	18,1	4,4	40,3	9,9	14,8	0,3
$X_1X_3$	1	13,4	14,8	2,1	0,6	17,2	20,7	117,7	37,8	26,0	0,1
$X_2X_3$	1	138,7	146,4	7,6	65,6	9,6	4,4	30,8	8,7	9,0	0,1
$X_1^2$	1	48,8	391,7	2,2	169,1	13,1	0,2	3,8	0,6	1,5	0,01
$X_2^2$	1	81,1	4,7	1,1	3,8	29,8	14,8	40,3	25,2	17,8	0,02
$X_3^2$	1	90,9	69,1	1,1	5,6	6,3	1,7	61,7	8,2	31,7	0,7*
<b>Residual</b>	5										
<b>Falta de ajuste</b>	3	87,5	45,8	2,1	54,3	84,0	28,6	135,3	46,9	31,3	0,8
<b>Error puro</b>	2	109,1	4,6	1,1	13,6	3,8	33,6	153,9	46,9	31,3	0,05
<b><math>R^2</math></b>		92,0	95,6	89,5	86,4	55,2	57,9	62,0	59,3	66,8	80,8
<b>AAD (%)<sup>1</sup></b>		2,6	1,7	0,4	2,1	45,2	156,8	181,6	147,0	129,4	18,1

\* $p \leq 0.05$  ; \*\* $p \leq 0.01$ , <sup>1</sup>AAD : desviación absoluta de la media. % R Vit C: porcentaje retención vitamina C; %R SS: porcentaje retención sólidos solubles; %C AT: porcentaje cambio de acidez total; % C pH: porcentaje cambio de pH;  $\delta L^*$ : porcentaje cambio de luminosidad;  $\delta a^*$ ,  $\delta b^*$ ,  $\delta C_{ab}^*$  y  $\delta h_{ab}$ : porcentaje cambios en los parámetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$  del sistema CIELAB; Red FAM: reducción de microorganismos aerobios mesófilos.

Tabla 3.27. Análisis de variancia de los resultados del diseño de lavado-desinfección N° 2 en frutillas variedad *Selva*.

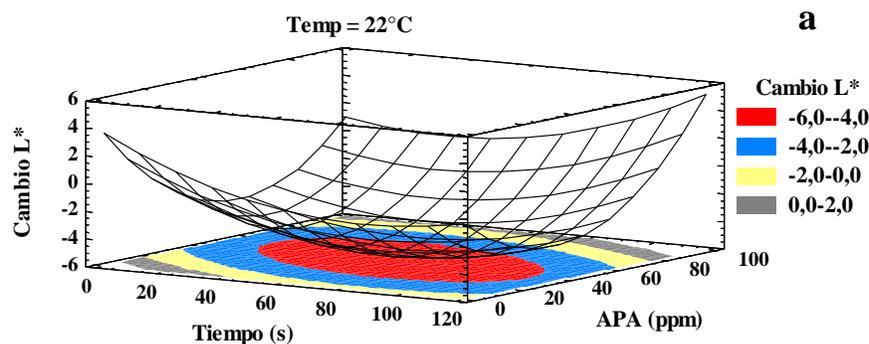
Fuente	g.l.	Suma de cuadrados									
		%R Vit C	%R SS	%C pH	%C AT	$\delta L^*$ (%)	$\delta a^*$ (%)	$\delta b^*$ (%)	$\delta C_{ab}^*$ (%)	$\delta h_{ab}$ (%)	Red FAM
$X_1$ (C)	1	801,4*	65,6	0,3	76,9	8,0	83,2*	37,0	62,7*	0,1	1,4**
$X_2$ (T)	1	117,7	18,7	0,03	9,2	0,8	2,6	102,3*	10,4	68,4*	0,07
$X_3$ (t)	1	239,0	29,2	9,0	49,0	1,0	0,1	63,8	3,3	49,5*	0,2
$X_1X_2$	1	5,9	5,2	11,2	0,1	3,1	24,0*	14,8	27,0	1,1	0,004
$X_1X_3$	1	0,04	0,1	0,02	0,5	14,1	4,8	5,5	9,0	0,5	0,01
$X_2X_3$	1	0,01	47,2	22,1	68,9	52,6	2,9	45,6	11,9	0,9	0,06
$X_1^2$	1	185,6	8,5	47,6	1,9	110,5*	21,3	12,8	10,2	57,4*	0,3*
$X_2^2$	1	15,1	120,8	41,9	27,1	21,6	168,2**	33,5	97,5*	222,7**	0,1
$X_3^2$	1	657,6*	26,2	39,4	3,0	13,6	6,2	29,2	5,4	24,8*	0,1
<b>Residual</b>	5										
<b>Falta de ajuste</b>	3	290,4	31,8	13,6	109,5	85,9	26,7	169,0	48,8	68,4	0,2
<b>Error puro</b>	2	43,4	5,6	8,8	5,8	9,5	2,6	9,1	3,5	2,5	0,03
<b><math>R^2</math></b>		85,7	89,2	87,3	67,0	68,9	91,5	65,3	82,0	90,3	92,3
<b>AAD (%)<sup>1</sup></b>		5,4	1,5	1,0	2,6	21,2	24,1	18,2	15,5	34,2	10,5

\* $p \leq 0,05$  ; \*\* $p \leq 0,01$ , <sup>1</sup>AAD : desviación absoluta de la media. % R Vit C: porcentaje retención vitamina C; %R SS: porcentaje retención sólidos solubles; %C AT: porcentaje cambio de acidez total; % C pH: porcentaje cambio de pH;  $\delta L^*$ : porcentaje cambio de luminosidad;  $\delta a^*$ ,  $\delta b^*$ ,  $\delta C_{ab}^*$  y  $\delta h_{ab}$ : porcentaje cambios en los parámetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$  del sistema CIELAB; Red FAM: reducción de microorganismos aerobios mesófilos.

Liang y col., (2011) encontraron que los valores de  $a^*$  mostraron correlación positiva con las antocianinas totales en diferentes cultivos de uvas cuando la concentración de antocianinas era baja (menor a  $10 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FF}$ ); a medida que la concentración de antocianinas aumentaba, la correlación con  $a^*$  se perdía. Por otra parte, los autores reportaron una correlación negativa entre los valores de  $L^*$  y la concentración de antocianinas totales, cuando esta concentración era baja (menor a  $10 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FF}$ ). Los valores de  $L^*$  permanecieron constantes cuando la concentración de antocianinas totales de los cultivares de uva era mayor a  $50 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FF}$ .

Los resultados obtenidos en el presente estudio, estarían de acuerdo con los de Liang y col., (2011), debido a que los coeficientes de correlación ( $r$ ) entre los cambios de los parámetros de color ( $\delta a^*$  y  $\delta L^*$ ) y las concentraciones de antocianinas en los puntos de lavado del diseño fueron mejores para las frutillas frescas cortadas lavadas variedad *Selva*, cuyo contenido de antocianinas fue bajo ( $19 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FF}$ ) ( $r \delta a^*$  vs Ant T = 0,60,  $r \delta L^*$  vs Ant T = -0,61) que para el cultivar *Camarosa*, de contenido de antocianinas totales alto ( $47 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FF}$ ) ( $r \delta a^*$  vs Ant T = 0,37;  $r \delta L^*$  vs Ant T = -0,50).

En el diseño de lavado-desinfección N° 1 se obtuvo también una buena correlación entre los % R Ant T y los valores de  $\delta a^*$  ( $r = 0,71$ ) en frutillas frescas cortadas lavadas variedad *Camarosa*, de concentración de antocianinas totales ( $27 \text{ mg } \text{L}^{-1}$ ) menor que las frutillas de la misma variedad usadas el diseño de lavado N° 2 ( $47 \text{ mg } \text{L}^{-1}$ ).



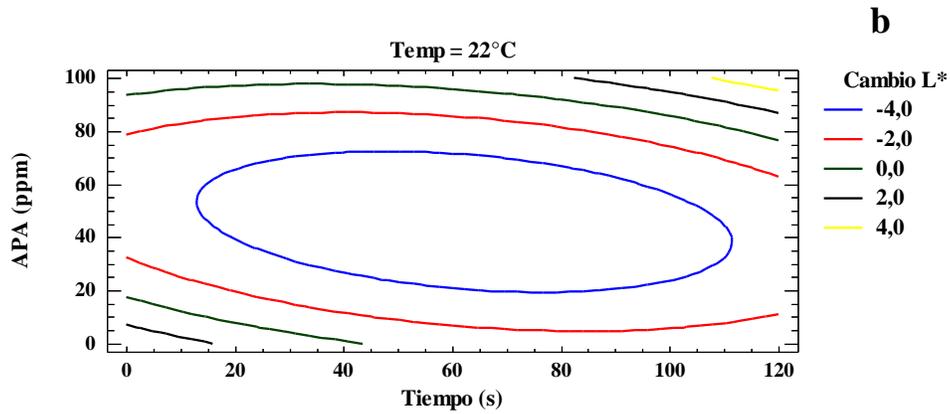


Figura 3.18. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el cambio de  $L^*$  en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T = 22^\circ\text{C}$  en la variedad *Selva*.

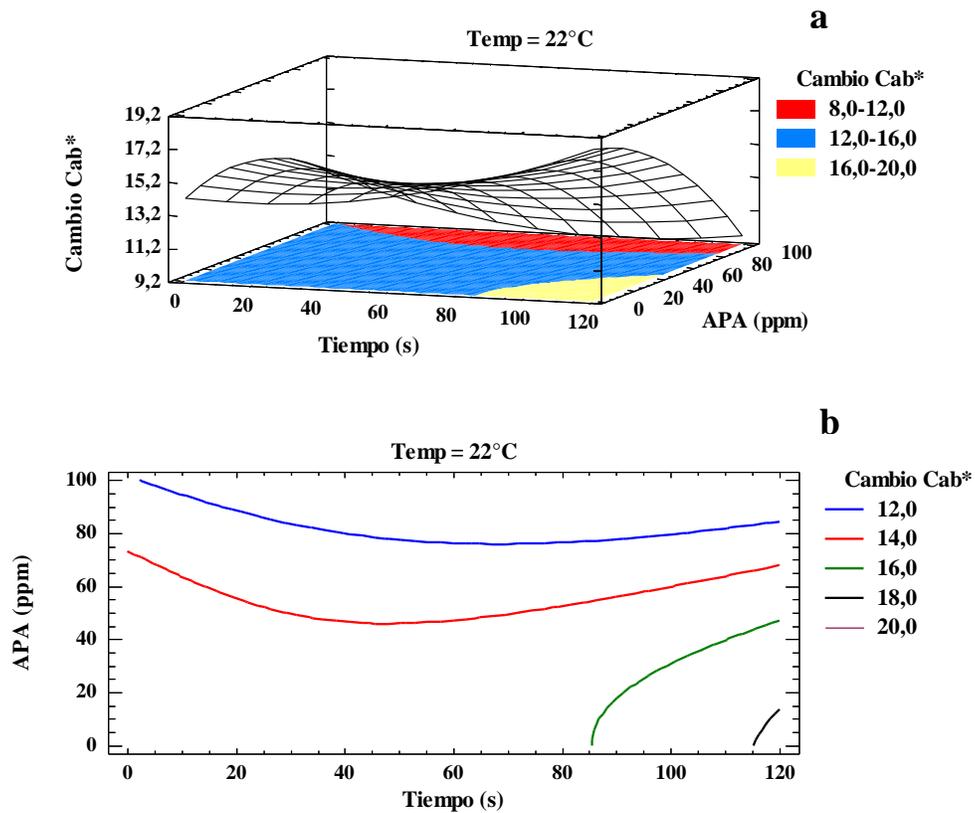


Figura 3.19. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el cambio de  $C_{ab}^*$  en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T = 22^\circ\text{C}$  en la variedad *Selva*.

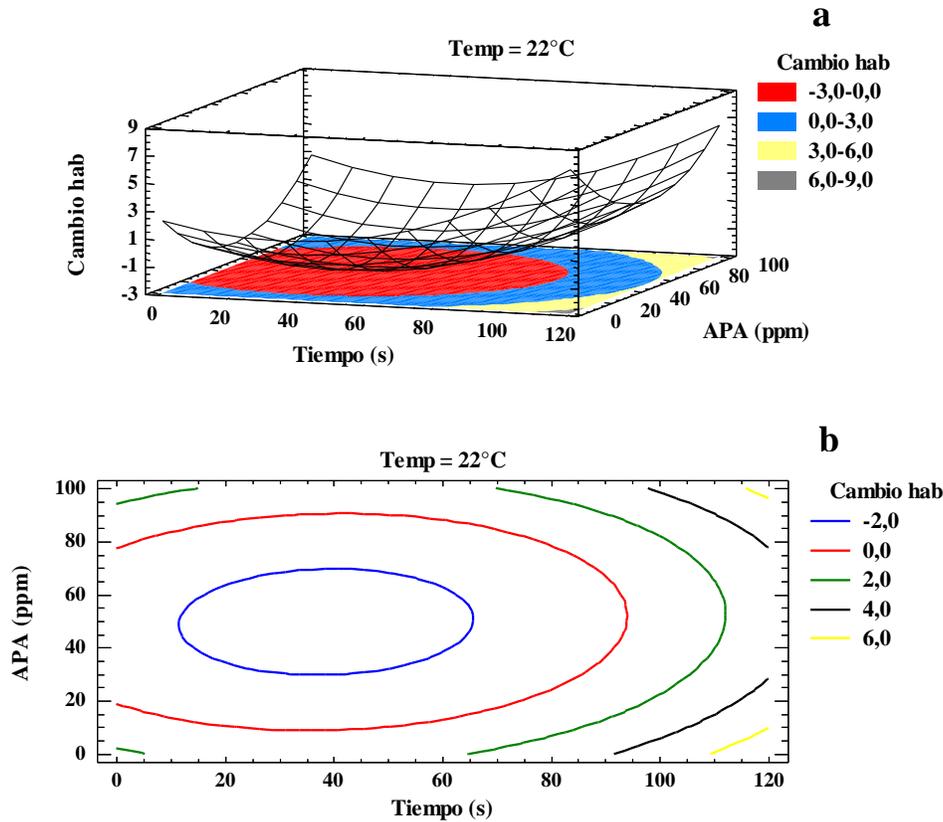


Figura 3.20. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para el cambio de  $h_{ab}$  en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T = 22^{\circ}\text{C}$  en la variedad *Selva*.

La reducción de microorganismos aerobios mesófilos (FAM) fue afectada por las variables del proceso para ambos cultivares, pero al haberse presentado efecto bloque (variedad) significativo, se procedió a realizar el análisis por separado para cada variedad. Estas diferencias en el comportamiento de la reducción de FAM frente al sanitizante han sido mencionadas en la bibliografía, varios factores condicionan la descontaminación de los productos vegetales tales como las condiciones de contaminación, tiempo entre la contaminación y el lavado, unión en sitios inaccesibles, formación de biofilms, internalización de bacterias dentro del producto, entre otros (Sapers, 2001).

En las ecuaciones 3.35 y 3.36 se muestran los modelos de reducción de los microorganismos FAM en variables no codificadas para las variedades *Camarosa* y *Selva*, respectivamente. Los valores de  $R^2$  y AAD resultaron adecuados para ambos modelos (Tablas 3.26 y 3.27)

$$\begin{aligned} \text{Red FAM}_{(\text{Camarosa})} = & 0,8 + 0,009 C - 0,02 T + 0,02 t + 0,0003 CT - 0,00005 Ct + 0,0002 Tt - \\ & 0,00002 C^2 + 0,0002 T^2 - 0,0001 t^2 \quad (3.35) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Red FAM}_{(\text{Selva})} = & 0,5 + 0,02 C - 0,03 T + 0,007 t + 0,00003 CT + 0,00002 Ct + 0,0001 Tt - \\ & 0,0001 C^2 + 0,0006 T^2 - 0,00006 t^2 \quad (3.36) \end{aligned}$$

En las ecuaciones 3.37 y 3.38 se muestran los modelos reducidos para las variedades *Camarosa* y *Selva*, respectivamente.

$$\begin{aligned} \text{Red FAM}_{(\text{Camarosa})} = & 0,3 + 0,009 C + 0,01 T + 0,02 t - 0,0001 t^2 \quad R^2 = 68,9 \quad \text{AAD} = 26,3 \\ & (3.37) \end{aligned}$$

$$\text{Red FAM}_{(\text{Selva})} = 0,5 + 0,02 C - 0,0001 C^2 \quad R^2 = 68,0 \quad \text{AAD} = 25,0 \quad (3.38)$$

El modelo de reducción de FAM de la variedad *Camarosa* fue afectado por la concentración de APA, la temperatura y el tiempo en sus términos lineales; y también por el tiempo, a través de su término cuadrático. Para la variedad *Selva*, en cambio, el modelo de reducción de FAM solo se vio afectado por la concentración de APA a través de sus términos lineal y cuadrático.

Con ambos modelos se puede predecir una reducción de FAM de 2,6 y 1,5 ordenes logarítmicos para las variedades *Camarosa* y *Selva*, respectivamente, a las condiciones extremas del diseño de lavado-desinfección (100 mg L<sup>-1</sup> APA, 40 °C y 120 s).

En la Figuras 3.21 se muestra como la reducción de FAM aumenta en la variedad *Camarosa* a medida que el tiempo y la concentración de APA del lavado-desinfección aumentan a 22°C. En la Figura 3.22 se muestra como en la variedad *Selva*, la reducción de FAM aumenta a medida que la concentración de APA incrementa.

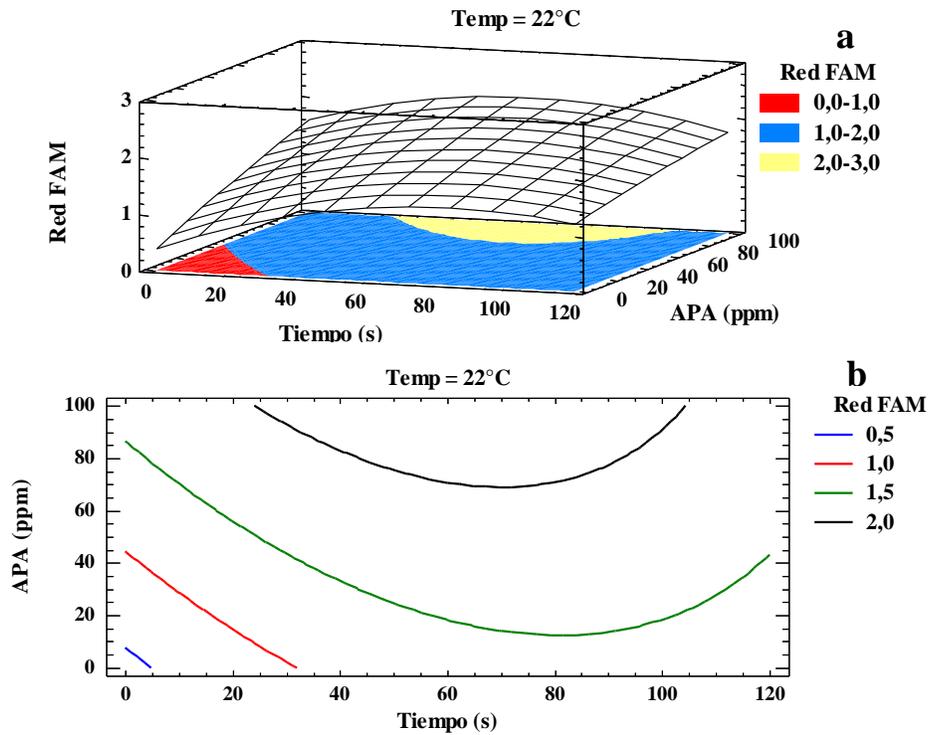


Figura 3.21. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para la reducción de aerobios mesófilos totales en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T = 22^{\circ}\text{C}$  en la variedad *Camarosa*.

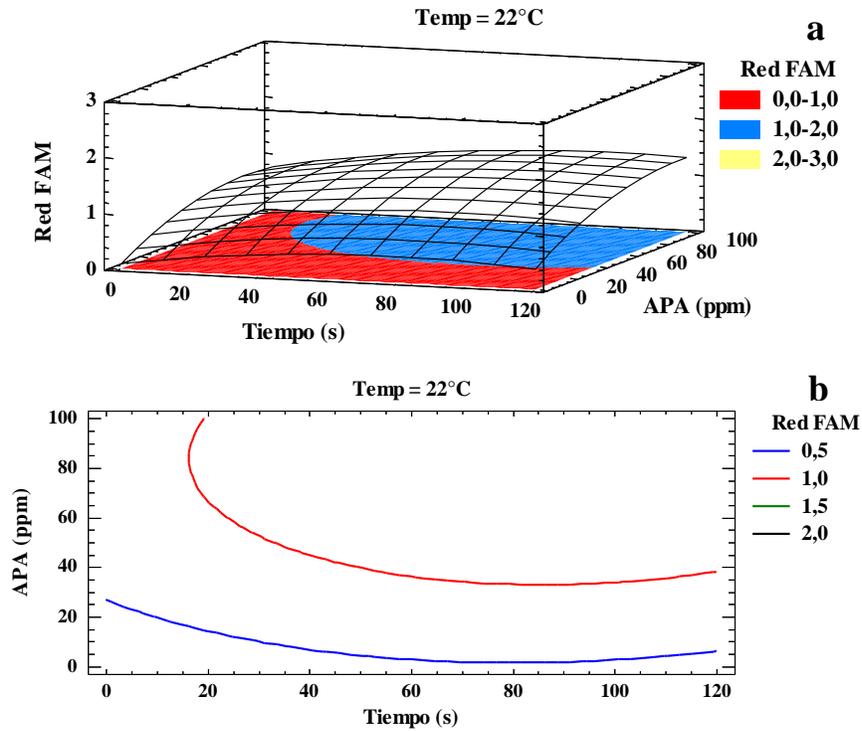


Figura 3.22. a) Superficie de respuesta y b) Gráfico de contorno para la reducción de aerobios mesófilos totales en función de la concentración de ácido peracético y el tiempo de lavado desinfección a  $T = 22^{\circ}\text{C}$  en la variedad *Selva*.

En relación con la retención de SS, y los cambios de pH y AT, los mismos no fueron afectados por las variables del diseño de lavado, y por lo tanto no pueden modelarse con ecuaciones polinomiales de 2° orden. Las retención y los cambios porcentuales promedio de las 30 corridas experimentales fueron:  $90\% \pm 7$ ,  $-7\% \pm 5$ , y  $-0,4\% \pm 3,0$ , para SS, pH y AT, respectivamente.

### **3.2.3 Validación del modelo en diferentes condiciones del proceso de lavado-desinfección establecidas a partir de la optimización de las múltiples respuestas simultáneamente**

Con las respuestas % RAA, % R Ant T y Red FAM, las cuales resultaron significativas con alguna de las variables del proceso, se procedió a realizar una optimización múltiple usando frutillas variedad *Camarosa*. En la optimización se planteo encontrar condiciones de las variables en donde se maximice la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales o se minimicen las pérdidas de compuestos bioactivos (AA, y Ant T). La elección de estas respuestas se hizo en base a que las antocianinas totales representan el grupo mayoritario de los compuestos fenólicos de las frutillas y están muy relacionadas con el color de las frutas y por lo tanto con la aceptación organoléptica por los consumidores. Por otra parte, el ácido ascórbico es importante a nivel nutricional, y las frutillas representan una fuente muy importante del mismo. No se incorporó en la optimización a la Vitamina C, ya que en las frutillas *Camarosa*, donde se realizó la validación no había sido una respuesta significativa. Se plantearon dos condiciones de optimización:

#### **3.2.3.1 Optimización 1**

En esta optimización se priorizó la desinfección microbiológica en el lavado-desinfección por encima de la retención de compuestos bioactivos. Los criterios usados en la función deseabilidad de Derringer se muestran en la Tabla 3.28. El valor de deseabilidad alcanzado y los valores de los niveles de las variables del proceso de lavado en estas condiciones se muestran en la Tabla 3.29. Para alcanzar estos niveles, se maximizó la reducción de FAM y se fijaron las retenciones de compuestos bioactivos (AA y Ant T) en 90 %. En la Figura 3.23 se muestra el gráfico de deseabilidad obtenido en esas condiciones.

Los valores predichos de las respuestas y los valores experimentales obtenidos luego del lavado-desinfección se muestran en la Tabla 3.29.

Tabla 3.28. Criterios utilizados en la optimización usando la función de Derringer.

Respuesta	Límite inferior	Límite superior	Criterios	
			Objetivo	$\pi_i$
Red FAM	0,29	2,77	maximice	5
% R AA	57,92	102,9	acierto 90 %	1
% R Ant T	65,37	96,04	acierto 90 %	1

$\pi_i$ : importancia relativa, Red FAM: reducción de microorganismos aerobios mesófilos % RAA: porcentaje de retención de ácido ascórbico y % R Ant T: porcentaje de retención de antocianinas totales.

Tabla 3.29. Valores para las variables operativas en el lavado-desinfección y sus respuestas predichas y experimentales en la optimización N° 1.

Optimización N° 1				
Deseabilidad		0,72		
Factor	Valor	Respuesta	Valor predicho	Valor experimental
Ac. Per. ( $\text{mg L}^{-1}$ )	100	% R AA	76,1 <sup>a</sup>	82,7 ± 1,5 <sup>b</sup>
Temp. (°C)	24	% R Ant T	80,7 <sup>a</sup>	80,8 ± 3,3 <sup>a</sup>
Tiempo (s)	50	Red FAM	2,2 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,5 <sup>a</sup>

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

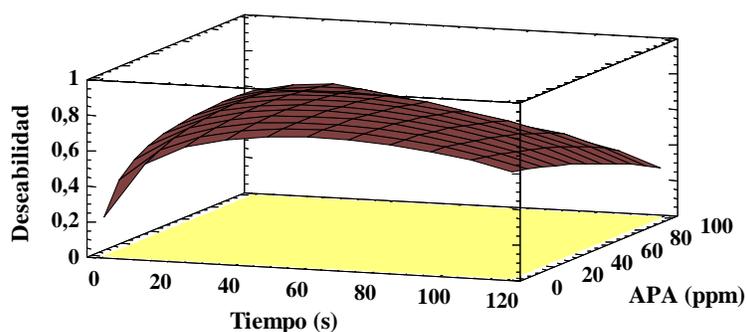


Figura 3.23. Gráfico de deseabilidad obtenido para la optimización simultánea N° 1 para el proceso de lavado-desinfección en frutillas variedad *Camarosa*.

### 3.2.3.2 Optimización 2

En esta optimización se priorizó la retención de compuestos bioactivos por encima de la reducción de FAM. Los criterios usados en la función deseabilidad de Derringer se muestran en la Tabla 3.30. El valor de deseabilidad alcanzado y los valores de los niveles de las variables del proceso de lavado en estas condiciones se muestran en la Tabla 3.30. Para lograr los objetivos, se fijó la respuesta reducción de bacterias FAM en 2,0 unidades logarítmicas, lo que se consideró una buena reducción de la carga bacteriana, y se maximizaron las retenciones de los compuestos bioactivos (AA y Ant T). En la Figura 3.24 se muestra el gráfico de deseabilidad obtenido en esas condiciones.

Los valores predichos de las respuestas y los valores experimentales obtenidos luego del lavado-desinfección se muestran en la Tabla 3.30.

Tabla 3.30. Criterios utilizados en la optimización usando la función de Derringer.

Respuesta	Límite inferior	Límite superior	Criterios	
			Objetivo	$\pi_i$
Red FAM	0,29	2,77	Acierto 2 log UFC g <sup>-1</sup>	1
% R AA	57,92	102,9	Maximice	1
% R Ant T	65..37	96,04	Maximice	1

$\pi_i$ : importancia relativa, Red FAM: reducción de flora aerobia mesófila, % RAA: porcentaje de retención de ácido ascórbico y % R Ant T: porcentaje de retención de antocianinas totales.

Tabla 3.31. Valores para las variables operativas en el lavado desinfección y sus respuestas predichas y experimentales en la optimización N° 2.

Optimización N° 2				
Deseabilidad	0,74			
Factor	Valor	Respuesta	Valor predicho	Valor experimental
<i>Ac. Per. (mg L<sup>-1</sup>)</i>	20	% R AA	95,2 <sup>b</sup>	92,3 ± 1,0 <sup>a</sup>
<i>Temp. (°C)</i>	18	% R Ant T	88,4 <sup>a</sup>	87,2 ± 0,5 <sup>a</sup>
<i>Tiempo (s)</i>	52	Red FAM	1,4 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,2 <sup>a</sup>

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

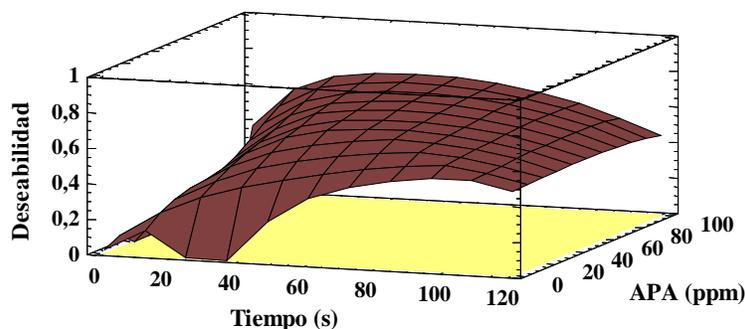


Figura 3.24. Gráfico de deseabilidad obtenido para la optimización simultánea N° 2 para el proceso de lavado-desinfección en frutillas variedad *Camarosa*.

### 3.2.4 Evaluación Sensorial

La evaluación sensorial por panel experto de las frutillas procesadas en planta piloto en las dos condiciones de optimización, como se mencionó en la sección 2.2.3.4.1, fueron:

- 1- **Muestra control:** Frutillas frescas pre-lavadas con agua por 120 s y cortadas en cuartos.
- 2- **Optimización 1:** Frutillas frescas cortadas en cuartos lavadas con 100 mg L<sup>-1</sup> de APA, 24°C, por 50 s.
- 3- **Optimización 2:** Frutillas frescas cortadas en cuartos lavadas con 20 mg L<sup>-1</sup> de APA, 18°C por 52 s.

Los resultados obtenidos para cada atributo en las muestras evaluadas por el panel sensorial se muestran en la Tabla 3.32.

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 3.32, la apariencia general, oscurecimiento, firmeza, aroma genuino, *flavor* genuino y gustos dulce y ácido, no presentaron diferencias significativas entre las muestras de frutillas frescas cortadas sin lavar (control) y las muestras lavadas en las condiciones óptimas estudiadas.

El olor genuino fue mejor en las frutillas frescas cortadas control, no encontrándose diferencias entre las frutillas lavadas en los puntos óptimos a distintas concentraciones de APA.

Tabla 3.32. Resultados de los atributos sensoriales de las muestras de frutillas frescas cortadas control y en los puntos de optimización.

Atributo sensorial	Muestras		
	Muestra control	Optimización 1	Optimización 2
Apariencia general	6,1 ± 1,2 <sup>a</sup>	6,4 ± 1,0 <sup>a</sup>	6,7 ± 1,0 <sup>a</sup>
Olor genuino	6,1 ± 1,0 <sup>b</sup>	4,2 ± 1,5 <sup>a</sup>	4,1 ± 1,5 <sup>a</sup>
Off-odors	1,4 ± 1,0 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,8 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,7 <sup>ab</sup>
Oscurecimiento	2,4 ± 1,4 <sup>a</sup>	2,7 ± 1,0 <sup>a</sup>	2,5 ± 1,4 <sup>a</sup>
Firmeza	5,4 ± 1,3 <sup>a</sup>	5,3 ± 1,0 <sup>a</sup>	5,5 ± 1,0 <sup>a</sup>
Aroma genuino	5,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	5,1 ± 1,3 <sup>a</sup>	5,5 ± 1,5 <sup>a</sup>
Flavor genuino	5,0 ± 1,0 <sup>a</sup>	4,4 ± 1,2 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,9 <sup>a</sup>
Gusto ácido	4,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	4,7 ± 1,3 <sup>a</sup>	4,5 ± 1,0 <sup>a</sup>
Gusto dulce	3,5 ± 1,2 <sup>a</sup>	3,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	3,6 ± 1,0 <sup>a</sup>
Off-flavor	1,6 ± 1,1 <sup>a</sup>	2,5 ± 1,1 <sup>b</sup>	1,5 ± 1,0 <sup>a</sup>

Media ± desviación estándar ( $n=8$ ). Valores en la misma fila con diferente letra son estadísticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

El análisis sensorial reportó la aparición de *off-odors* en las frutillas lavadas en las condiciones de optimización 1 (100 mg L<sup>-1</sup> APA, 24°C, 50 s), y 2 (20 mg L<sup>-1</sup> APA, 18°C, 52 s), no encontrándose diferencias significativas entre los resultados para ambas condiciones. Sin embargo, la aparición de este defecto sensorial en las frutas control fue similar a la hallada en las frutillas lavadas en las condiciones de optimización 2 (20 mg L<sup>-1</sup> APA). Por lo tanto, es probable que el aumento en la concentración de APA provoque la mayor aparición de *off-odors* en las frutas lavadas. La aparición de *off-flavor* fue mayor en las frutas lavadas en las condiciones de optimización 1, de mayor concentración de APA. Las frutillas cortadas sin lavar y las frutas cortadas lavadas en las condiciones de optimización 2 no presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la aparición de *off-flavor* y la magnitud de este descriptor sensorial resultó menor que el de las frutillas lavadas en el punto de optimización 1.

### 3.3 Estudio de las operaciones de corte y el almacenamiento de frutillas frescas cortadas

#### 3.3.1 Resultados de los efectos del tipo de corte practicado sobre las frutillas frescas

En la Tabla 3.33 se muestran los resultados del contenido de compuestos bioactivos y los parámetros de calidad de las frutillas variedad *Camarosa* enteras despedunculadas (ED), y cortadas en mitades (CM) y en cuartos (CC) luego del mínimo procesamiento.

Tabla 3.33. Compuestos bioactivos y parámetros de calidad de las frutillas variedad *Camarosa* con diferentes grados de corte.

Atributo	ED	Corte	
		CM	CC
AA (mg 100 g <sup>-1</sup> FF)	47,1 ± 0,7 <sup>c</sup>	43,6 ± 1,0 <sup>b</sup>	40,8 ± 0,5 <sup>a</sup>
Vit C (mg 100 g <sup>-1</sup> FF)	48,3 ± 0,1 <sup>c</sup>	44,8 ± 0,8 <sup>b</sup>	42,2 ± 0,8 <sup>a</sup>
ADHA (mg 100 g <sup>-1</sup> FF)	1,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,4 <sup>a</sup>
FT (mg AG 100 g <sup>-1</sup> FF)	250,0 ± 3,0 <sup>a</sup>	241,7 ± 5,7 <sup>a</sup>	218,5 ± 0,5 <sup>b</sup>
Ant T (mg 100g <sup>-1</sup> FF)	41,2 ± 0,3 <sup>b</sup>	32,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	33,4 ± 0,4 <sup>a</sup>
CA (mg AA 100 g <sup>-1</sup> FF)	322,4 ± 15,4 <sup>a</sup>	342,9 ± 5,6 <sup>a</sup>	339,8 ± 13,8 <sup>a</sup>
SS (° Brix)	8,1 ± 0,1 <sup>c</sup>	7,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	7,2 ± 0,1 <sup>a</sup>
pH	3,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,1 <sup>a</sup>
<i>L</i> *	31,1 ± 1,1 <sup>a</sup>	34,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	31,7 ± 0,2 <sup>a</sup>
<i>a</i> *	31,9 ± 1,3 <sup>a</sup>	36,0 ± 0,4 <sup>c</sup>	34,6 ± 0,3 <sup>b</sup>
<i>b</i> *	16,6 ± 1,6 <sup>a</sup>	21,7 ± 0,7 <sup>c</sup>	19,3 ± 0,4 <sup>b</sup>
<i>C<sub>ab</sub></i> *	36,0 ± 1,9 <sup>a</sup>	42,0 ± 0,7 <sup>c</sup>	39,6 ± 0,4 <sup>b</sup>
<i>h<sub>ab</sub></i> *	27,4 ± 1,3 <sup>a</sup>	31,1 ± 0,5 <sup>b</sup>	29,1 ± 0,3 <sup>a</sup>

Media ± SD (*n*=3). AA: ácido ascórbico; Vit C: vitamina C; ADHA: ácido dehidroascórbico; FT: fenoles totales; Ant T: antocianinas totales; CA: capacidad antioxidante; SS: sólidos solubles; *L*\*, *a*\*, *b*\*, *C<sub>ab</sub>*\* y *h<sub>ab</sub>* parámetros del sistema CIELAB. ED: frutillas enteras despedunculadas, CM: frutillas cortadas en mitades, CC: frutillas cortadas en cuartos. Valores en la misma fila con diferente letra son significativamente diferentes (*p*≤0,05) aplicando ANOVA de una vía.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con los reportados por otros autores para frutillas frescas enteras o cortadas variedad *Camarosa* (Cordenunsi y col., 2005, Odriozola-Serrano y col., 2009, Alexandre y col., 2012). Como se observa en la Tabla 3.33, algunos de los atributos y parámetros estudiados en las frutillas frescas cortadas mostraron diferencias estadísticas con los de las frutillas enteras despedunculadas inmediatamente luego del mínimo procesamiento.

Los contenidos de AA y vitamina C resultaron mayores para las frutillas enteras despedunculadas, disminuyendo con el grado de corte practicado al tejido vegetal. De

acuerdo a los valores obtenidos (Tabla 3.33) se obtuvieron pérdidas similares en los contenidos de AA y Vit C para las frutillas cortadas en relación a las frutillas ED, siendo esta pérdida de aproximadamente un 8 y 16% para las frutillas CM y CC, respectivamente. Las antocianinas totales resultaron mayores en las frutillas ED, no encontrándose diferencias en el contenido entre las frutillas CM y CC. La pérdida de antocianinas totales en las frutillas cortadas fue de aproximadamente un 20 %. El contenido de fenoles totales resultó ser también mayor en las frutillas ED, aunque este contenido no se diferenció del observado para las frutillas CM. Podemos suponer que ocurrió una mayor oxidación y/o lixiviación de compuestos bioactivos a medida que aumentó el grado de corte practicado en el tejido vegetal, inmediatamente luego del mínimo procesamiento. Castro y col., (2002) demostraron que el hecho de cortar el pedúnculo de frutillas variedad *Camarosa* no provocaba cambios en el contenido de compuestos bioactivos. Sin embargo, el efecto del corte en pequeñas piezas de 3 a 18 mm producía luego de 5 min de contacto con el aire a temperatura ambiente una disminución de hasta el 50 % en el contenido de vitamina C, no ocurriendo mayores pérdidas hasta los 30 min. Los autores indicaron además, que se produjeron pérdidas mínimas en el contenido de antocianinas y fenoles totales en las frutillas cortadas en esos períodos.

Es necesario recordar que las frutillas ED, CM y CC tuvieron una operación de lavado-desinfección luego del corte (20 mg L<sup>-1</sup> ácido peracético, 18°C y 52 s) obtenidos en la condición de optimización que priorizaba la retención de compuestos bioactivos (ver sección 3.2.3.2).

A pesar de haberse encontrado diferencias en los compuestos bioactivos en los tres tipos de corte, no se hallaron diferencias en la capacidad antioxidante con el corte practicado.

Con respecto a los sólidos solubles, se observó también una disminución de los mismos con el tipo de corte, probablemente por la mayor lixiviación en la operación de lavado posterior al corte, o mayor utilización de los azúcares por respiración como consecuencia del incremento en el grado de corte o lesión de los tejidos. El pH de las frutillas no se vio afectado por el tipo de corte practicado.

Con respecto al color, se observaron diferencias entre los parámetros de color y el grado de corte practicado, siendo las frutillas cortadas iguales o ligeramente más vívidas (mayores valores de  $C_{ab}^*$ ) que las frutillas enteras despedunculadas. Esto podría justificarse por el

hecho de que al haber realizado un lavado con una solución con pH ácido (4.20), esta ocasionaría que se intensificara el color rojo de las antocianinas en aquellas frutillas con mayor exposición al agente sanitizante, resultando en mayores valores de  $C_{ab}^*$ .

### **3.3.2 Resultados de los efectos del almacenamiento a distintas temperaturas sobre las frutillas frescas con distintos tipos de cortes**

En las Tablas 3.34 (a, b, c y d) se muestran los resultados obtenidos en el almacenamiento de frutillas frescas cortadas (enteras despedunculadas, cortadas en mitades y cuartos) a distintas temperaturas (2, 6, 13 y 20°C), en relación a los contenidos de ácido ascórbico, vitamina C, ácido dehidroascórbico, fenoles y antocianinas totales, capacidad antioxidante, pH, sólidos solubles y parámetros de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$ ).

#### **3.3.2.1 Cambios en el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante**

Los contenidos de fenoles totales en las frutillas frescas ED, CM y CC resultaron prácticamente iguales al principio y al final del periodo de almacenamiento a todas las temperaturas estudiadas. Sin embargo, se registraron aumentos significativos a días específicos de la conservación para cada tipo de corte. La Figuras 3.25 a, b, c y d, muestran la evolución de los fenoles totales con el tiempo de almacenamiento para frutillas frescas ED, CM y CC a 2, 6, 13 y 20°C, respectivamente.

Como se observa en la Figura 3.25 a, se produjo un aumento progresivo en el contenido de fenoles totales de las frutillas CC hasta los 6 días (22% del basal) a 2°C, para luego decrecer, manteniéndose en niveles incluso más altos que los basales en el resto de la conservación.

Tabla 3.34 a. Compuestos bioactivos y atributos de calidad de las frutillas frescas cortadas almacenadas a 2°C por 15 días.

Atributo	Corte	Almacenamiento (días)							
		0	1	3	6	8	10	13	15
AA	ED	47,6 ± 0,7	44,1 ± 0,4	49,7 ± 0,3	44,6 ± 0,2	46,1 ± 1,4	52,0 ± 0,2	45,1 ± 0,3	45,6 ± 1,3
	CM	43,6 ± 1,0	39,1 ± 1,3	40,9 ± 0,6	39,0 ± 0,1	44,7 ± 3,0	42,5 ± 0,5	44,0 ± 1,6	39,4 ± 1,1
	CC	40,8 ± 0,5	39,4 ± 0,1	40,0 ± 0,6	42,8 ± 0,6	42,0 ± 0,2	44,0 ± 1,8	44,2 ± 0,4	43,1 ± 1,4
Vit C	ED	48,3 ± 0,1	45,5 ± 1,3	51,7 ± 0,9	47,3 ± 0,1	48,7 ± 0,8	56,8 ± 1,1	49,8 ± 0,2	49,9 ± 1,2
	CM	44,8 ± 0,8	40,8 ± 1,0	43,4 ± 0,4	41,9 ± 0,3	47,9 ± 2,8	46,0 ± 0,3	48,2 ± 2,0	44,2 ± 0,5
	CC	42,2 ± 0,8	42,2 ± 0,4	43,8 ± 1,1	47,6 ± 0,4	48,2 ± 0,6	50,1 ± 2,1	50,7 ± 0,5	50,5 ± 1,7
ADHA	ED	1,2 ± 0,7	1,4 ± 0,9	2,0 ± 1,1	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,5	4,8 ± 1,3	4,8 ± 0,1	4,4 ± 0,1
	CM	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,3	2,6 ± 0,2	2,9 ± 0,3	3,2 ± 0,2	3,5 ± 0,7	4,2 ± 0,3	4,9 ± 0,7
	CC	1,4 ± 0,4	2,8 ± 0,5	3,8 ± 0,5	4,8 ± 0,2	6,2 ± 0,8	6,1 ± 0,3	6,5 ± 0,9	7,4 ± 0,3
FT	ED	250,1 ± 3,0	251,6 ± 2,1	252,1 ± 6,3	249,6 ± 2,1	284,5 ± 0,9	277,5 ± 2,7	282,2 ± 0,4	244,1 ± 3,8
	CM	241,7 ± 5,7	245,5 ± 5,3	235,9 ± 6,6	253,7 ± 0,6	244,1 ± 6,4	245,6 ± 3,0	236,9 ± 4,4	234,4 ± 4,6
	CC	218,5 ± 0,5	247,2 ± 2,4	237,0 ± 5,0	267,1 ± 0,6	243,3 ± 4,5	242,5 ± 3,4	243,0 ± 3,2	248,3 ± 5,4
Ant T	ED	41,2 ± 0,3	38,8 ± 0,4	38,4 ± 0,2	37,2 ± 0,7	35,9 ± 0,2	29,4 ± 0,5	28,6 ± 0,4	26,6 ± 0,1
	CM	32,1 ± 0,9	33,6 ± 0,6	32,2 ± 0,2	29,4 ± 1,1	31,6 ± 0,6	28,9 ± 0,7	28,9 ± 1,2	26,8 ± 0,7
	CC	33,4 ± 0,4	33,0 ± 0,2	34,9 ± 0,0	30,4 ± 0,8	29,1 ± 1,3	26,4 ± 0,8	26,2 ± 0,8	24,8 ± 0,9
CA	ED	322,3 ± 15,4	303,6 ± 3,3	305,6 ± 5,5	316,0 ± 5,1	362,2 ± 3,9	356,6 ± 9,5	381,0 ± 0,3	364,9 ± 11,8
	CM	342,9 ± 5,6	310,1 ± 1,6	285,6 ± 4,6	313,6 ± 5,8	315,8 ± 0,2	304,6 ± 1,2	310,2 ± 14,3	350,3 ± 23,8
	CC	339,8 ± 13,8	310,4 ± 5,4	275,3 ± 3,0	336,8 ± 9,0	318,2 ± 9,3	291,4 ± 6,9	312,8 ± 7,1	335,5 ± 0,2
SS	ED	8,1 ± 0,1	7,7 ± 0,1	8,3 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,7 ± 0,1	8,0 ± 0,0	7,1 ± 0,0	8,0 ± 0,1
	CM	7,4 ± 0,1	7,2 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,1 ± 0,1	7,0 ± 0,0	6,9 ± 0,1	6,9 ± 0,2	7,1 ± 0,3
	CC	7,2 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,8 ± 0,0	6,8 ± 0,0	7,2 ± 0,2	7,4 ± 0,1	7,0 ± 0,1

Atributo	Corte	Almacenamiento (días)							
		0	1	3	6	8	10	13	15
pH	ED	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1
	CM	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,7 ± 0,1
	CC	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,7 ± 0,1	3,7 ± 0,1	3,8 ± 0,1
$L^*$	ED	31,1 ± 1,1	30,3 ± 0,3	29,8 ± 0,7	30,0 ± 0,8	30,9 ± 0,3	29,5 ± 0,4	32,9 ± 0,7	27,7 ± 0,1
	CM	34,3 ± 0,6	30,4 ± 0,5	31,7 ± 0,1	29,3 ± 0,5	29,3 ± 0,6	30,5 ± 0,8	28,3 ± 0,7	29,9 ± 0,7
	CC	31,7 ± 0,2	27,6 ± 0,4	28,0 ± 0,6	28,5 ± 0,2	31,4 ± 0,2	30,7 ± 0,5	29,2 ± 0,5	32,5 ± 0,2
$a^*$	ED	31,9 ± 1,3	35,5 ± 0,2	34,0 ± 0,3	32,6 ± 0,4	33,3 ± 0,2	30,2 ± 0,6	28,4 ± 0,2	30,7 ± 0,1
	CM	36,0 ± 0,4	35,0 ± 0,4	32,5 ± 0,6	30,9 ± 0,2	31,0 ± 0,4	32,8 ± 0,4	28,9 ± 0,9	28,8 ± 0,4
	CC	34,6 ± 0,3	32,6 ± 0,5	33,9 ± 0,7	30,3 ± 0,6	30,2 ± 0,1	32,8 ± 0,2	29,6 ± 0,5	28,7 ± 0,2
$b^*$	ED	16,6 ± 1,6	20,0 ± 0,4	19,1 ± 0,4	16,7 ± 0,5	17,0 ± 0,3	13,8 ± 0,5	12,3 ± 0,2	14,3 ± 0,1
	CM	21,7 ± 0,7	20,8 ± 0,7	16,7 ± 0,7	14,7 ± 0,2	14,8 ± 0,5	16,8 ± 0,3	12,9 ± 0,9	12,3 ± 0,3
	CC	19,3 ± 0,4	18,2 ± 0,3	17,7 ± 0,8	13,4 ± 0,6	13,6 ± 0,3	16,9 ± 0,2	12,5 ± 0,5	13,2 ± 0,2
$C_{ab}^*$	ED	36,0 ± 1,9	40,7 ± 2,9	39,0 ± 0,3	36,6 ± 0,6	37,4 ± 0,3	33,2 ± 0,7	30,9 ± 0,2	33,8 ± 0,1
	CM	42,0 ± 0,7	40,7 ± 0,7	36,5 ± 0,9	34,2 ± 0,1	34,3 ± 0,6	36,9 ± 0,5	31,6 ± 1,2	31,3 ± 0,5
	CC	39,6 ± 0,4	37,4 ± 0,5	38,3 ± 0,9	33,1 ± 0,8	33,2 ± 0,2	36,9 ± 0,3	32,1 ± 0,6	31,6 ± 0,3
$h_{ab}^*$	ED	27,4 ± 1,3	29,4 ± 0,4	29,4 ± 0,6	27,1 ± 0,5	27,0 ± 0,3	24,5 ± 0,5	23,4 ± 0,4	25,0 ± 0,2
	CM	31,1 ± 0,5	30,7 ± 0,6	27,2 ± 0,5	25,4 ± 0,4	25,5 ± 0,4	27,1 ± 0,3	24,1 ± 1,0	23,2 ± 0,2
	CC	29,1 ± 0,3	29,2 ± 0,5	27,6 ± 0,8	23,9 ± 0,6	24,3 ± 0,4	27,3 ± 0,2	22,9 ± 0,4	24,6 ± 0,3

Media ± desviación estándar. ( $n=3$ ). AA: ácido ascórbico; ADHA: ácido dehidroascórbico; Vit C: vitamina C; FT: fenoles totales; Ant T: antocianinas totales; CA: capacidad antioxidante; SS: sólidos solubles;  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}^*$  parámetros del sistema CIELAB. ED: frutillas enteras despedunculadas, CM: frutillas cortadas en mitades, CC: frutillas cortadas en cuartos.

Tabla 3.34 b. Compuestos bioactivos y atributos de calidad de las frutillas frescas cortadas almacenadas a 6°C por 10 días.

Atributo	Corte	Almacenamiento (días)					
		0	1	3	6	8	10
AA	ED	47,1 ± 0,7	45,1 ± 1,5	38,7 ± 1,4	47,6 ± 1,3	47,1 ± 1,5	45,3 ± 1,6
	CM	43,6 ± 1,0	40,7 ± 1,2	44,7 ± 3,1	47,6 ± 1,2	42,0 ± 1,7	43,3 ± 1,5
	CC	40,8 ± 0,5	39,9 ± 1,0	39,6 ± 1,4	39,2 ± 0,7	38,9 ± 0,6	37,5 ± 2,0
Vit C	ED	48,3 ± 0,1	47,0 ± 1,9	40,0 ± 0,1	51,3 ± 1,2	51,0 ± 1,5	50,4 ± 2,3
	CM	44,8 ± 0,8	42,6 ± 0,8	47,1 ± 3,3	51,0 ± 0,8	45,8 ± 0,7	47,7 ± 0,4
	CC	42,2 ± 0,8	42,7 ± 1,3	44,0 ± 1,9	44,9 ± 0,9	46,1 ± 1,4	45,4 ± 2,6
ADHA	ED	1,2 ± 0,7	1,9 ± 0,4	2,2 ± 0,3	3,7 ± 0,1	3,9 ± 0,1	5,1 ± 0,8
	CM	1,2 ± 0,7	1,9 ± 0,4	2,3 ± 0,3	3,4 ± 0,1	3,8 ± 0,1	4,3 ± 0,8
	CC	1,4 ± 0,4	2,7 ± 0,1	4,4 ± 0,5	5,7 ± 0,2	7,2 ± 0,8	7,8 ± 0,6
FT	ED	250,1 ± 3,0	253,1 ± 0,4	249,8 ± 0,7	264,8 ± 3,9	266,5 ± 5,3	229,3 ± 2,4
	CM	241,7 ± 5,7	247,6 ± 0,3	235,7 ± 4,8	250,8 ± 3,4	223,6 ± 2,3	253,6 ± 0,3
	CC	218,5 ± 0,5	231,1 ± 0,7	272,3 ± 10,0	228,0 ± 7,2	245,7 ± 3,2	252,6 ± 1,1
Ant T	ED	41,2 ± 0,3	39,6 ± 0,9	38,4 ± 0,2	36,0 ± 0,3	35,8 ± 0,6	36,8 ± 0,7
	CM	32,1 ± 0,9	31,3 ± 0,3	31,6 ± 1,7	30,4 ± 0,6	30,9 ± 1,4	28,9 ± 0,6
	CC	33,4 ± 0,4	35,0 ± 0,5	33,1 ± 0,8	30,9 ± 0,6	28,8 ± 0,2	23,7 ± 1,0
CA	ED	322,3 ± 15,4	341,2 ± 15,4	357,2 ± 10,0	375,2 ± 9,2	366,6 ± 6,0	256,2 ± 8,1
	CM	342,9 ± 5,6	334,4 ± 5,7	306,6 ± 0,2	333,5 ± 11,3	304,8 ± 9,9	286,4 ± 0,7
	CC	339,8 ± 13,8	323,8 ± 13,8	345,0 ± 5,5	284,1 ± 0,1	320,0 ± 14,5	313,8 ± 21,9
SS	ED	8,1 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,7 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,5 ± 0,0
	CM	7,4 ± 0,1	7,7 ± 0,0	7,7 ± 0,1	7,4 ± 0,1	6,7 ± 0,0	6,7 ± 0,0
	CC	7,2 ± 0,1	7,3 ± 0,0	7,3 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,2 ± 0,1	6,8 ± 0,2

Atributo	Corte	Almacenamiento (días)					
		0	1	3	6	8	10
pH	ED	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,2	3,5 ± 0,1	3,7 ± 0,1
	CM	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1
	CC	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,7 ± 0,1
$L^*$	ED	31,1 ± 1,1	33,6 ± 0,4	32,9 ± 1,0	28,0 ± 0,4	30,7 ± 0,4	29,4 ± 0,6
	CM	34,3 ± 0,6	28,5 ± 0,2	30,3 ± 0,5	29,1 ± 0,8	31,5 ± 0,3	28,6 ± 0,6
	CC	31,7 ± 0,2	30,3 ± 0,4	31,5 ± 0,6	29,2 ± 0,7	29,2 ± 0,7	28,1 ± 1,0
$a^*$	ED	31,9 ± 1,3	33,8 ± 0,6	33,3 ± 0,2	33,5 ± 0,2	27,7 ± 0,3	29,6 ± 0,2
	CM	36,0 ± 0,4	31,3 ± 0,6	33,9 ± 0,3	28,7 ± 0,4	27,2 ± 0,2	27,3 ± 0,5
	CC	34,6 ± 0,3	34,3 ± 0,6	30,7 ± 0,1	31,6 ± 0,9	28,9 ± 0,3	27,8 ± 0,4
$b^*$	ED	16,6 ± 1,6	19,4 ± 0,9	18,1 ± 0,2	17,2 ± 0,4	10,8 ± 0,2	14,0 ± 0,1
	CM	21,7 ± 0,7	16,3 ± 0,7	18,2 ± 0,8	12,9 ± 0,3	10,6 ± 0,3	10,9 ± 0,4
	CC	19,3 ± 0,4	18,6 ± 0,7	14,9 ± 0,3	14,6 ± 0,9	11,6 ± 0,2	12,1 ± 0,7
$C_{ab}^*$	ED	36,0 ± 1,9	39,0 ± 1,0	37,9 ± 0,2	37,6 ± 0,4	29,8 ± 0,3	32,8 ± 0,2
	CM	42,0 ± 0,7	35,3 ± 0,9	38,5 ± 0,6	31,5 ± 0,4	29,2 ± 0,2	29,4 ± 0,6
	CC	39,6 ± 0,4	39,0 ± 0,8	34,1 ± 0,3	34,8 ± 1,1	31,1 ± 0,3	30,3 ± 0,7
$h_{ab}^*$	ED	27,4 ± 1,3	29,9 ± 0,8	28,5 ± 0,4	27,2 ± 0,4	21,3 ± 0,4	25,3 ± 0,2
	CM	31,1 ± 0,5	27,6 ± 0,6	28,2 ± 0,8	24,1 ± 0,4	21,3 ± 0,6	21,9 ± 0,6
	CC	29,1 ± 0,3	28,5 ± 0,5	25,9 ± 0,4	24,8 ± 1,0	21,8 ± 0,3	23,5 ± 0,9

Media ± desviación estándar. ( $n=3$ ). AA: ácido ascórbico; ADHA: ácido dehidroascórbico; Vit C: vitamina C; FT: fenoles totales; Ant T: antocianinas totales; CA: capacidad antioxidante; SS: sólidos solubles;  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}^*$  parámetros del sistema CIELAB. ED: frutillas enteras despedunculadas, CM: frutillas cortadas en mitades, CC: frutillas cortadas en cuartos.

Tabla 3.34 c. Compuestos bioactivos y atributos de calidad de las frutillas frescas cortadas almacenadas a 13°C por 8- 9 días.

Atributo	Corte	Almacenamiento (días)						
		0	1	3	6	7	8	9
AA	ED	47,1 ± 0,7	42,0 ± 0,5	44,4 ± 1,1	48,5 ± 0,4	43,3 ± 0,1	41,3 ± 1,1	40,8 ± 1,1
	CM	43,6 ± 1,0	44,4 ± 1,4	41,5 ± 1,1	42,6 ± 1,9	44,1 ± 0,7	42,3 ± 0,8	
	CC	40,8 ± 0,5	39,8 ± 1,0	39,7 ± 0,3	37,6 ± 0,4	38,6 ± 0,4	33,9 ± 2,0	
Vit C	ED	48,3 ± 0,1	43,9 ± 0,3	47,1 ± 1,0	52,1 ± 0,2	47,7 ± 0,4	46,1 ± 1,2	46,5 ± 0,3
	CM	44,8 ± 0,8	46,5 ± 1,2	44,7 ± 0,4	47,3 ± 0,1	49,7 ± 0,1	50,3 ± 1,5	
	CC	42,2 ± 0,8	41,7 ± 0,2	42,9 ± 0,6	41,9 ± 0,9	43,8 ± 0,3	40,8 ± 1,9	
ADHA	ED	1,2 ± 0,7	1,9 ± 0,2	2,6 ± 0,1	3,6 ± 0,2	4,4 ± 0,5	4,8 ± 0,1	5,7 ± 0,8
	CM	1,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1	3,3 ± 0,7	4,6 ± 1,9	5,6 ± 0,6	7,9 ± 0,7	
	CC	1,4 ± 0,4	1,9 ± 0,8	3,2 ± 0,4	4,2 ± 0,5	5,2 ± 0,1	6,9 ± 0,1	
FT	ED	250,1 ± 3,0	255,0 ± 2,7	235,7 ± 11,1	233,5 ± 5,0	233,2 ± 6,4	221,8 ± 1,5	216,1 ± 1,8
	CM	241,7 ± 5,7	257,3 ± 2,0	238,5 ± 4,7	295,2 ± 10,4	257,5 ± 6,3	244,0 ± 1,4	
	CC	218,5 ± 0,5	259,8 ± 3,0	270,0 ± 0,3	239,3 ± 1,0	248,3 ± 4,8	235,3 ± 7,2	
Ant T	ED	41,2 ± 0,3	39,8 ± 1,2	38,8 ± 0,8	33,8 ± 0,2	36,6 ± 2,1	34,0 ± 0,2	34,6 ± 1,2
	CM	32,1 ± 0,9	31,2 ± 0,1	30,0 ± 0,5	29,9 ± 0,7	30,3 ± 1,2	27,9 ± 1,2	
	CC	33,4 ± 0,4	33,7 ± 0,4	30,8 ± 0,5	30,0 ± 1,2	29,6 ± 1,1	27,8 ± 0,6	
CA	ED	322,3 ± 15,4	326,8 ± 14,5	321,4 ± 4,5	333,5 ± 0,5	266,5 ± 12,9	290,9 ± 1,6	256,9 ± 5,0
	CM	342,9 ± 5,6	313,8 ± 11,1	310,0 ± 1,1	444,4 ± 16,4	287,8 ± 0,7	337,6 ± 12,7	
	CC	339,8 ± 13,8	317,6 ± 1,1	352,3 ± 5,5	352,8 ± 1,7	271,5 ± 6,7	291,2 ± 13,3	
SS	ED	8,1 ± 0,1	7,5 ± 0,1	7,0 ± 0,1	7,7 ± 0,2	7,0 ± 0,1	6,7 ± 0,1	6,2 ± 0,1
	CM	7,4 ± 0,1	7,7 ± 0,1	7,3 ± 0,1	6,9 ± 0,1	7,2 ± 0,1	6,2 ± 0,1	
	CC	7,2 ± 0,1	7,5 ± 0,0	7,5 ± 0,0	6,6 ± 0,1	6,1 ± 0,1	6,4 ± 0,1	

Atributo	Corte	Almacenamiento (días)						
		0	1	3	6	7	8	9
pH	ED	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,7 ± 0,1
	CM	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,6 ± 0,1	
	CC	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,7 ± 0,1	
L*	ED	31,1 ± 1,1	31,6 ± 0,1	30,3 ± 0,6	27,1 ± 0,9	29,4 ± 0,5	25,5 ± 0,7	28,0 ± 0,4
	CM	34,3 ± 0,6	31,2 ± 0,2	28,1 ± 0,3	30,2 ± 0,1	27,6 ± 0,6	30,2 ± 0,1	
	CC	31,7 ± 0,2	30,6 ± 0,5	25,8 ± 0,5	28,5 ± 0,2	26,9 ± 0,5	30,6 ± 0,6	
a*	ED	31,9 ± 1,3	34,2 ± 0,4	30,1 ± 0,4	29,4 ± 0,4	27,3 ± 0,1	27,7 ± 0,6	27,1 ± 0,2
	CM	36,0 ± 0,4	33,8 ± 0,3	31,2 ± 0,3	29,8 ± 0,4	26,1 ± 0,7	27,8 ± 0,4	
	CC	34,6 ± 0,3	32,6 ± 0,4	30,2 ± 0,8	29,8 ± 0,1	28,6 ± 0,2	26,4 ± 0,8	
b*	ED	16,6 ± 1,6	19,4 ± 0,5	12,7 ± 0,7	13,8 ± 0,2	10,9 ± 0,2	11,5 ± 0,5	10,7 ± 0,2
	CM	21,7 ± 0,7	17,7 ± 0,3	15,8 ± 0,3	12,5 ± 0,5	10,0 ± 0,5	10,0 ± 0,3	
	CC	19,3 ± 0,4	17,7 ± 0,6	13,9 ± 1,0	13,0 ± 0,2	11,4 ± 0,1	10,5 ± 0,5	
Cab*	ED	36,0 ± 1,9	39,3 ± 0,6	32,7 ± 0,6	32,4 ± 0,4	29,4 ± 0,1	30,0 ± 0,7	29,1 ± 0,3
	CM	42,0 ± 0,7	38,1 ± 0,3	34,9 ± 0,4	32,3 ± 0,5	28,0 ± 0,9	29,5 ± 0,5	
	CC	39,6 ± 0,4	37,1 ± 0,6	33,3 ± 1,0	32,5 ± 0,2	30,8 ± 0,2	28,4 ± 0,7	
hab*	ED	27,4 ± 1,3	29,5 ± 0,4	28,9 ± 1,0	25,1 ± 0,4	21,7 ± 0,4	22,5 ± 0,4	21,5 ± 0,3
	CM	31,1 ± 0,5	27,6 ± 0,3	26,9 ± 0,3	22,7 ± 0,6	21,0 ± 0,4	19,9 ± 0,3	
	CC	29,1 ± 0,3	28,5 ± 0,7	24,6 ± 1,3	23,6 ± 0,2	21,7 ± 0,2	21,7 ± 1,3	

Media ± desviación estándar. (n=3). AA: ácido ascórbico; ADHA: ácido dehidroascórbico; Vit C: vitamina C; FT: fenoles totales; Ant T: antocianinas totales; CA: capacidad antioxidante; SS: sólidos solubles; L\*, a\*, b\*, Cab\* y hab parámetros del sistema CIELAB. ED: frutillas enteras despunculadas, CM: frutillas cortadas en mitades, CC: frutillas cortadas en cuartos.

Tabla 3.34 d. Compuestos bioactivos y atributos de calidad de las frutillas frescas cortadas almacenadas a 20°C por 2- 3 días.

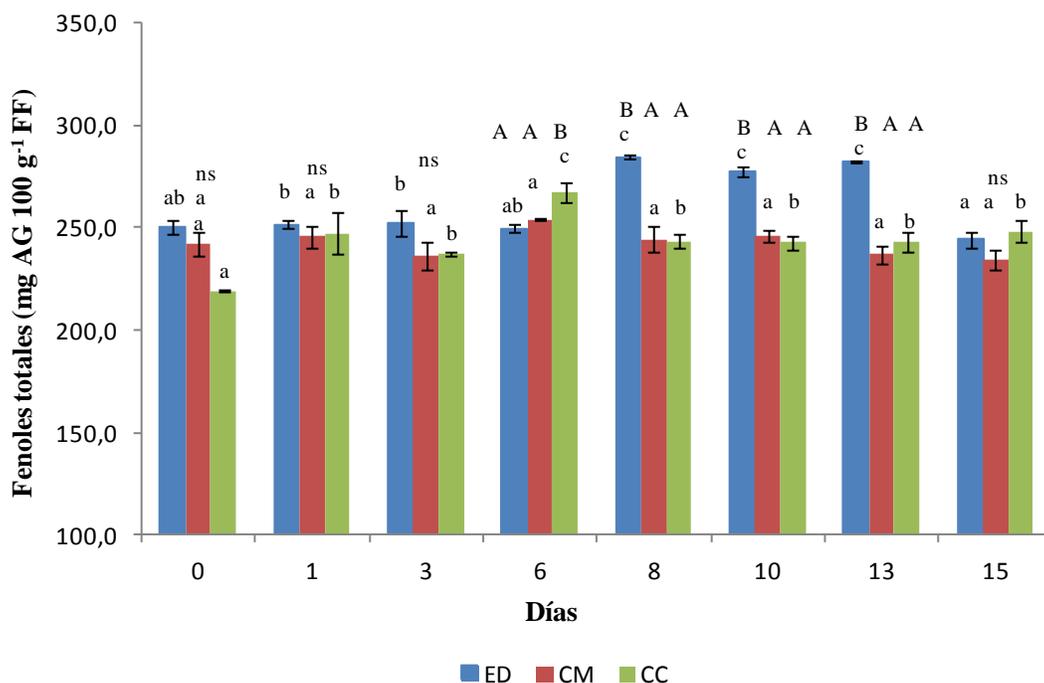
Atributo	Corte	Almacenamiento (horas)				
		0	12	24	48	72
AA	ED	47,1 ± 0,7	48,6 ± 1,0	48,4 ± 0,6	45,2 ± 0,1	47,7 ± 0,7
	CM	41,0 ± 0,6	41,0 ± 0,6	43,5 ± 0,4	40,2 ± 0,4	34,1 ± 0,4
	CC	40,8 ± 0,5	40,5 ± 0,8	40,2 ± 0,1	29,9 ± 0,4	
Vit C	ED	48,3 ± 0,1	50,4 ± 0,4	51,9 ± 0,1	48,4 ± 0,2	52,8 ± 1,4
	CM	44,8 ± 0,8	43,7 ± 1,2	49,4 ± 1,3	47,5 ± 0,2	43,5 ± 1,1
	CC	42,2 ± 0,8	46,1 ± 1,4	47,2 ± 0,2	41,6 ± 0,4	
ADHA	ED	1,2 ± 0,7	1,8 ± 0,6	3,5 ± 0,6	3,2 ± 0,1	5,1 ± 0,8
	CM	1,2 ± 0,1	2,7 ± 0,6	5,7 ± 0,9	7,3 ± 0,2	9,4 ± 1,6
	CC	1,4 ± 0,4	5,7 ± 0,5	7,0 ± 0,1	11,7 ± 0,8	
FT	ED	250,1 ± 3,0	238,5 ± 3,0	297,8 ± 4,6	243,5 ± 4,0	272,6 ± 2,6
	CM	241,7 ± 5,7	243,4 ± 3,1	278,9 ± 9,2	231,9 ± 1,8	231,8 ± 8,5
	CC	218,5 ± 0,5	245,8 ± 6,3	267,7 ± 4,3	241,5 ± 3,4	
Ant T	ED	41,2 ± 0,3	35,1 ± 0,1	27,9 ± 0,7	26,2 ± 0,7	24,4 ± 0,7
	CM	32,1 ± 0,9	30,6 ± 0,1	30,6 ± 0,3	26,5 ± 0,5	24,9 ± 0,4
	CC	33,4 ± 0,4	31,7 ± 1,3	27,8 ± 0,8	25,0 ± 0,7	
CA	ED	322,3 ± 15,4	330,2 ± 3,7	339,9 ± 5,9	313,3 ± 9,3	323,9 ± 0,6
	CM	342,9 ± 5,6	307,3 ± 6,9	296,7 ± 4,6	298,1 ± 13,1	280,0 ± 5,2
	CC	339,8 ± 13,8	329,2 ± 4,9	298,3 ± 7,8	278,3 ± 4,7	
SS	ED	8,1 ± 0,1	7,7 ± 0,1	8,2 ± 0,1	6,4 ± 0,1	7,1 ± 0,1
	CM	7,4 ± 0,1	7,1 ± 0,0	7,7 ± 0,1	6,6 ± 0,1	6,1 ± 0,1
	CC	7,2 ± 0,1	7,3 ± 0,1	6,9 ± 0,1	5,7 ± 0,1	

Atributo	Corte	Almacenamiento (horas)				
		0	12	24	48	72
pH	ED	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1
	CM	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1
	CC	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1	
$L^*$	ED	31,1 ± 1,1	32,0 ± 0,6	29,0 ± 1,0	28,5 ± 0,3	28,9 ± 0,2
	CM	34,3 ± 0,6	27,9 ± 1,0	27,9 ± 0,3	29,6 ± 0,2	31,5 ± 0,2
	CC	31,7 ± 0,2	28,6 ± 0,5	28,6 ± 0,6	30,5 ± 0,2	
$a^*$	ED	31,9 ± 1,3	33,1 ± 0,3	33,2 ± 0,4	28,2 ± 0,3	29,3 ± 0,6
	CM	36,0 ± 0,4	33,5 ± 1,1	31,7 ± 0,3	30,2 ± 0,2	27,9 ± 0,5
	CC	34,6 ± 0,3	32,1 ± 0,3	30,5 ± 0,2	29,7 ± 0,1	
$b^*$	ED	16,6 ± 1,6	17,7 ± 0,5	15,7 ± 0,5	13,2 ± 0,4	12,4 ± 0,6
	CM	21,7 ± 0,7	18,0 ± 1,1	15,9 ± 0,4	14,4 ± 0,3	12,9 ± 0,3
	CC	19,3 ± 0,4	15,0 ± 0,5	14,4 ± 0,3	13,7 ± 0,2	
$C_{ab}^*$	ED	36,0 ± 1,9	37,5 ± 0,5	37,9 ± 0,6	31,1 ± 0,4	31,8 ± 0,8
	CM	42,0 ± 0,7	32,8 ± 1,4	35,4 ± 0,5	33,4 ± 0,3	30,7 ± 0,5
	CC	39,6 ± 0,4	33,7 ± 0,4	34,0 ± 0,3	32,7 ± 0,2	
$h_{ab}^*$	ED	27,4 ± 1,3	28,1 ± 0,5	29,0 ± 0,4	25,1 ± 0,6	22,9 ± 0,7
	CM	31,1 ± 0,5	29,0 ± 1,0	26,7 ± 0,3	25,6 ± 0,3	24,9 ± 0,5
	CC	29,1 ± 0,3	25,3 ± 0,6	26,2 ± 0,4	24,7 ± 0,2	

Media ± desviación estándar. ( $n=3$ ). AA: ácido ascórbico; ADHA: ácido dehidroascórbico; Vit C: vitamina C; FT: fenoles totales; Ant T: antocianinas totales; CA: capacidad antioxidante; SS: sólidos solubles;  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$  parámetros del sistema CIELAB. ED: frutillas enteras despunculadas, CM: frutillas cortadas en mitades, CC: frutillas cortadas en cuartos.

Asimismo, se observó también un aumento de los fenoles con el tiempo en las frutillas ED, registrándose un pico entre los 8 y 13 días (13% del basal), para luego decrecer en el resto del almacenamiento. A esta temperatura el contenido de fenoles en las frutillas CM se mantuvo constante en todo el periodo de almacenamiento.

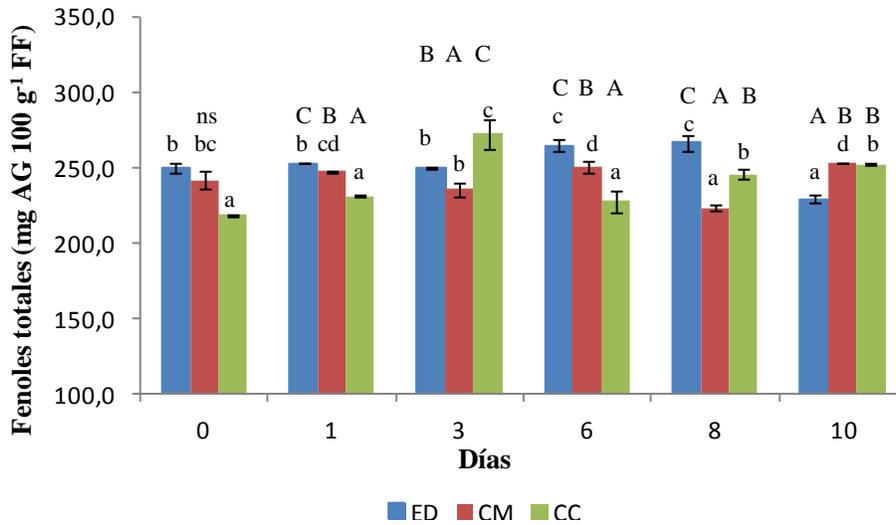
Figura 3.25 a. Evolución de los fenoles totales con el tiempo de almacenamiento a 2°C de frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).



Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para un mismo corte con el tiempo de almacenamiento. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre cortes de frutillas para un día determinado del almacenamiento.

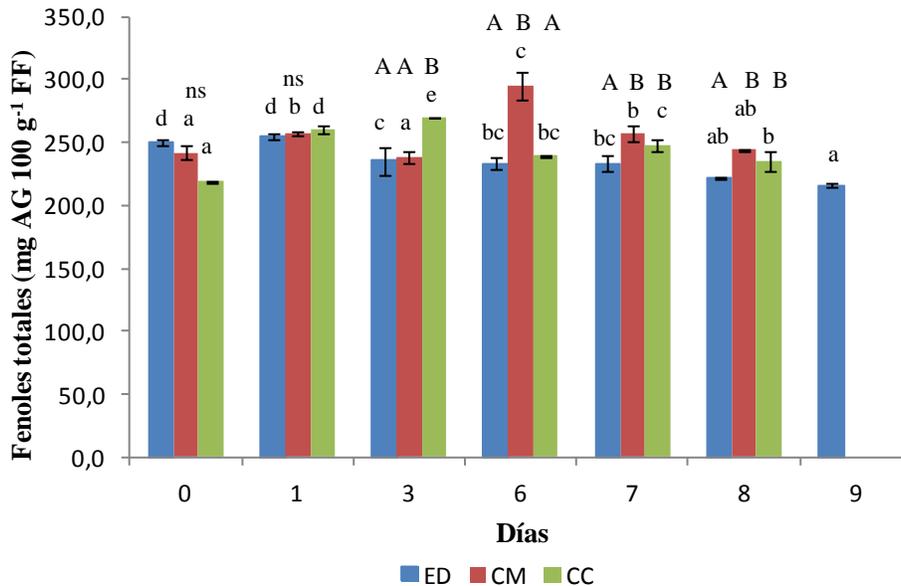
A 6°C se observó un aumento en los fenoles totales en todos los cortes practicados, presentándose un pico a los 3 días para las frutillas CC (25% del basal), a los 6 días para las CM (4% del basal) y a los 8 días para las frutillas ED (7% del basal) (Figura 3.25 b). A 13°C, el pico de aumento en los fenoles ocurrió a los 3 días para las frutillas CC (24% del basal), al igual que lo ocurrido en las frutillas conservadas a 6°C. Para las frutillas CM el pico se observó a los 6 días (22% del basal), mientras que para las frutillas ED la concentración de fenoles no registró pico y se mantuvo constante en el tiempo (Figura 3.25 c).

Figura 3.25 b. Evolución de los fenoles totales con el tiempo de almacenamiento a 6°C de frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).



Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para un mismo corte con el tiempo de almacenamiento. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre cortes de frutillas para un día determinado del almacenamiento.

Figura 3.25 c. Evolución de los fenoles totales con el tiempo de almacenamiento a 13°C de frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

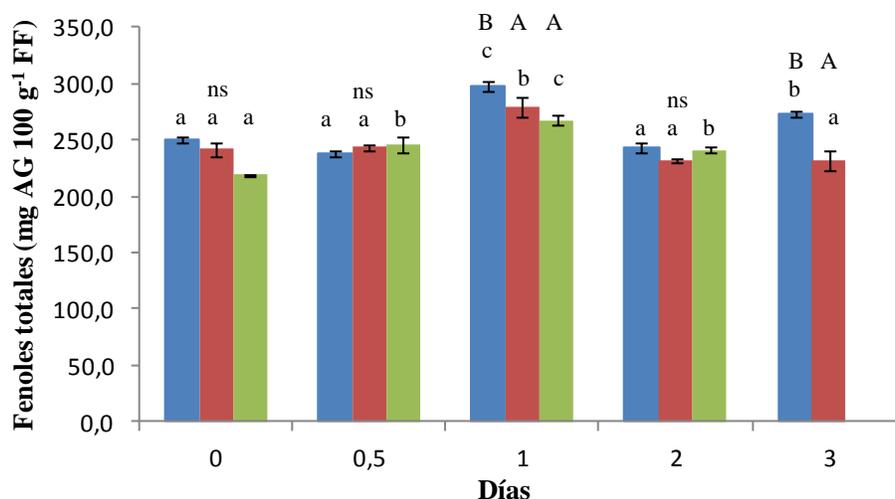


Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para un mismo corte con el tiempo de almacenamiento. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre cortes de frutillas para un día determinado del almacenamiento.

A los 20°C, como se observa en la Figura 3.25 d, los picos de aumento se registraron al día del almacenamiento para todos los tipos de corte, siendo el aumento 20, 15 y 23% del basal para las frutillas ED, CM y CC, respectivamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el efecto de la temperatura se vio reflejado en el momento en que ocurrió el pico o aumento de los fenoles totales. Cuanto mayor fue el corte practicado sobre las frutillas, mayor fue la magnitud del pico de fenoles totales. Sin embargo habría menores diferencias en la aparición del pico en las muestras almacenadas a 6 y a 13°C. Además, los mayores aumentos ocurrieron en las frutillas cortadas en cuartos, las de mayor injuria. Como se mencionó en la sección 1.5.3, el efecto de la lesión (cortado, rallado, troceado), estimula la actividad de la enzima fenilalanina-amonio liasa (PAL) como respuesta fisiológica a las condiciones de estrés, con la consecuente producción de compuestos fenólicos.

Figura 3.25 d. Evolución de los fenoles totales con el tiempo de almacenamiento a 20°C de frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).



Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para un mismo corte con el tiempo de almacenamiento. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre cortes de frutillas para un día determinado del almacenamiento.

Por otra parte, según lo observado, el efecto del incremento de la temperatura de conservación de las frutillas frescas cortadas adelantaría la producción de fenoles, presumiblemente por mayor síntesis de PAL (Hyodo y col., 1978, Sánchez-Ballesta y col.,

2000). Aunque cabe destacar que la magnitud de este aumento fue la misma para todas las temperaturas en las frutillas cortadas en cuartos (aproximadamente 23% para todas las temperaturas testeadas).

Consistentemente, Odriozola-Serrano y col., (2010) describieron un aumento en el contenido de quercitina (38 % sobre el contenido basal) luego de 21 días de conservación en atmósfera modificada pasiva a 4°C en frutillas frescas cortadas en cuartos variedad *Camarosa*.

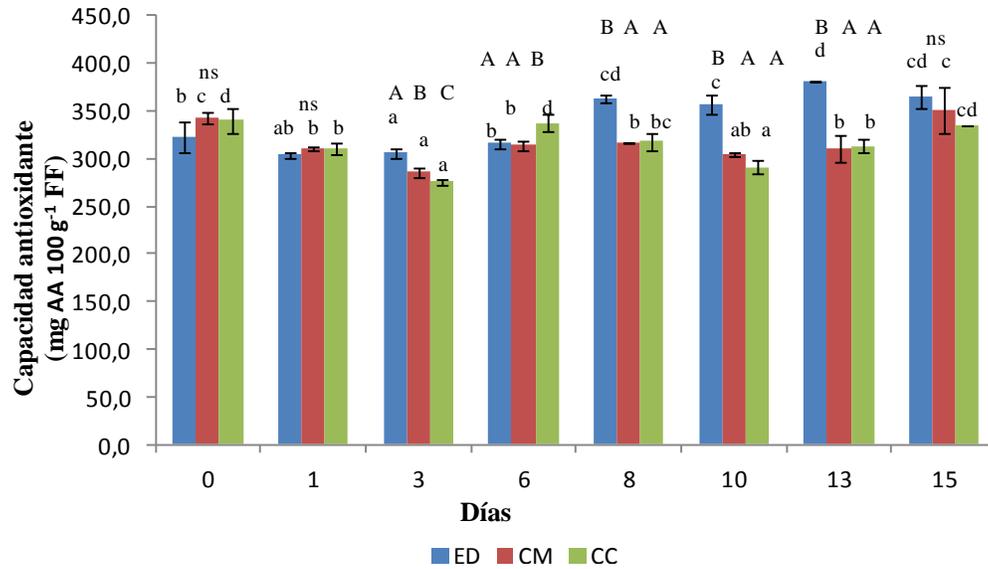
De acuerdo a Cisneros-Zevallos, (2003), los compuestos fenólicos inducidos por condiciones de estrés abiótico, incrementan la capacidad antioxidante de los tejidos vegetales, por lo que la aplicación de estos efectos de estrés serían una potencial herramienta para brindar productos más saludables.

En general, el comportamiento de la capacidad antioxidante para todos los tipos de corte de frutillas y temperaturas ensayadas acompañó la tendencia mostrada por los fenoles totales. Se mantuvo constante o experimentó aumentos de más del 20 % en relación a los contenidos iniciales, en las muestras almacenadas a 2, 6 y 13°C. Sin embargo, la capacidad antioxidante disminuyó levemente con el tiempo de almacenamiento para las frutillas CM y CC a 20°C. En las Figuras 3.26 a, b, c y d se muestra la evolución de la capacidad antioxidante con el tiempo para las frutillas ED, CM y CC a 2, 6, 13 y 20°C, respectivamente.

El aumento de la capacidad antioxidante pudo deberse al incremento en la cantidad de compuestos antioxidantes (compuestos fenólicos), o a una mejor conservación de los compuestos antioxidantes iniciales de la fruta (ácido ascórbico, compuestos fenólicos, etc.). A 2°C en las frutillas ED, se registró un aumento progresivo de la capacidad antioxidante, máximo a los 13 días de almacenamiento, lo cual coincidió con el pico de fenoles totales registrado en esas condiciones. Las frutillas CC y CM mantuvieron su capacidad antioxidante constante a esta temperatura (Figura 3.26 a).

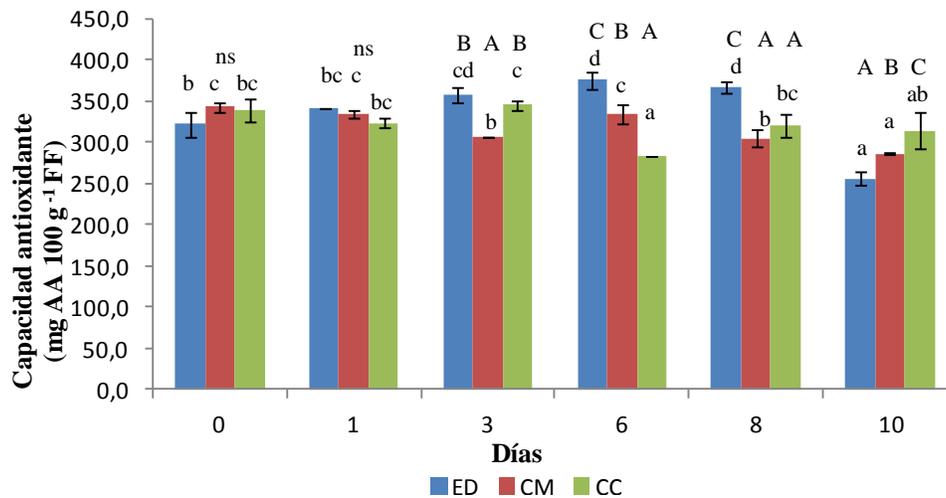
A 6°C, las frutillas ED registraron un aumento del 16 % con respecto a los valores iniciales a los 8 días, decreciendo al final de la conservación. Las muestras CM y CC mantuvieron los niveles de capacidad antioxidante al final del periodo de almacenamiento (Figura 3.26 b).

Figura 3.26 a. Evolución de la capacidad antioxidante con el tiempo de almacenamiento a 2°C de frutillas frescas enteras despunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).



Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) para un mismo corte con el tiempo de almacenamiento. Letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre cortes de frutillas para un día determinado del almacenamiento.

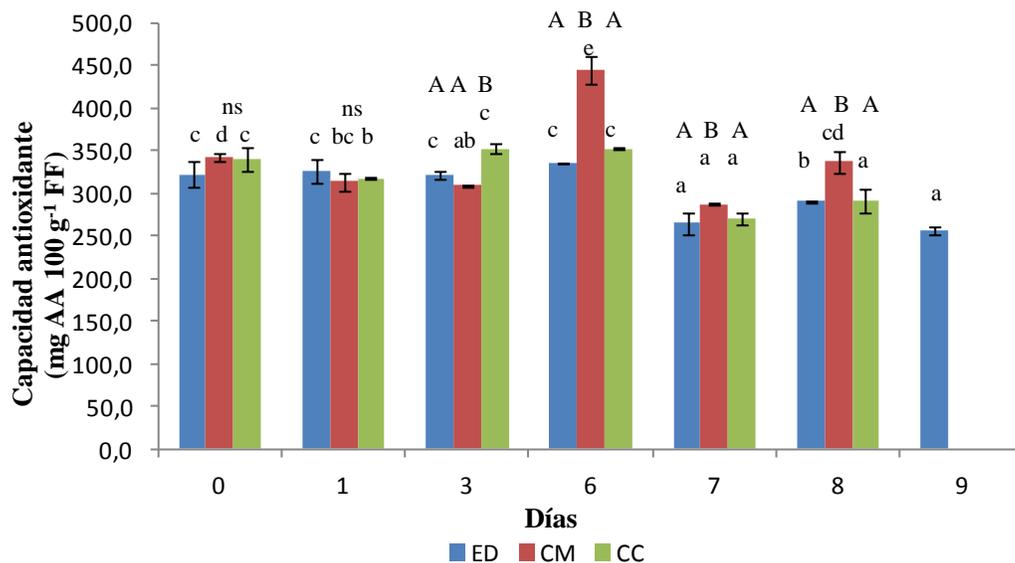
Figura 3.26 b. Evolución de la capacidad antioxidante con el tiempo de almacenamiento a 6°C de frutillas frescas enteras despunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).



Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) para un mismo corte con el tiempo de almacenamiento. Letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre cortes de frutillas para un día determinado del almacenamiento.

A 13°C se registró el mayor aumento de capacidad antioxidante (30%) en las frutillas CM a los 6 días de conservación, que también coincidió con el pico de fenoles observado; luego de ese periodo la capacidad antioxidante comenzó a decrecer. Las frutillas ED y CC mantuvieron sus niveles hasta el día 6, para luego descender levemente (Figura 3.26 c). Odriozola-Serrano y col., (2010) midieron la capacidad antioxidante por el radical ABTS en frutillas frescas cortadas en cuartos variedad *Camarosa* y registraron aumentos que adjudicaron a las variaciones que experimentaron los compuestos fenólicos luego del corte.

Figura 3.26 c. Evolución de la capacidad antioxidante con el tiempo de almacenamiento a 20°C de frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

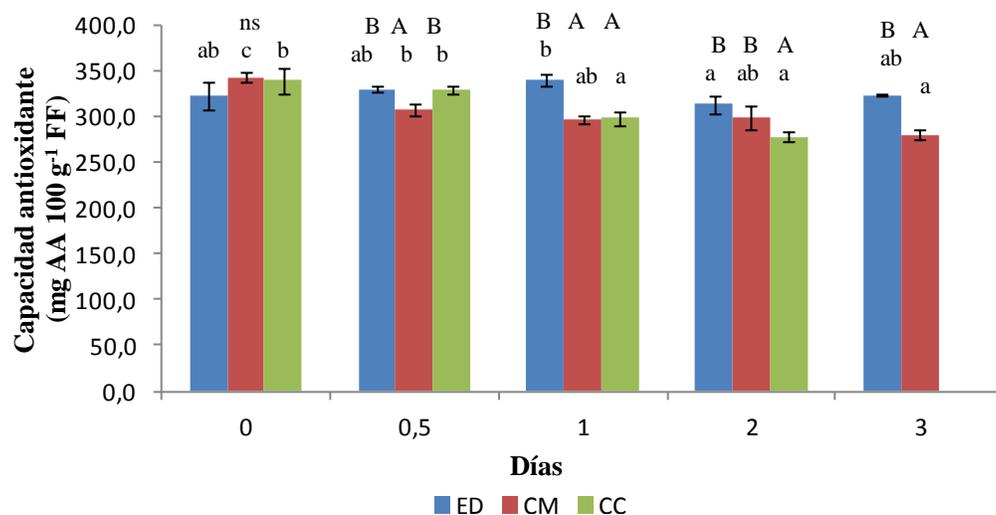


Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) para un mismo corte con el tiempo de almacenamiento. Letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre cortes de frutillas para un día determinado del almacenamiento.

Las frutillas CM y CC almacenadas a 20°C sufrieron una disminución leve (del 18% aproximadamente) en su capacidad antioxidante (Figura 3.26 d), y la tendencia no correspondió con la observada para los compuestos fenólicos a esta temperatura (Figura 3.25 d). Es probable que la disminución en el ácido ascórbico en función de la formación de ácido dehidroascórbico, ocurrido sobre todo en las frutillas CC, haya provocado tal diferencia. La capacidad antioxidante del ácido dehidroascórbico es menor que la del ácido

ascórbico, debido a que es un compuesto muy inestable que puede ser fácilmente oxidado hacia la forma inactiva de ácido dicetogulónico (Otsuka y col., 1986, Davey y col., 2000). Adicionalmente, como se mencionó en la sección 1.4, en frutillas, la vitamina C es responsable entre el 15 y 30% de la capacidad antioxidante total, el resto se debe a compuestos fenólicos como las antocianinas, derivados del ácido elágico y los flavonoles (Tulipani y col., 2008, Giamperi y col., 2012).

Figura 3.26 d. Evolución de la capacidad antioxidante con el tiempo de almacenamiento a 13°C de frutillas frescas enteras despunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).



Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) para un mismo corte con el tiempo de almacenamiento. Letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre cortes de frutillas para un día determinado del almacenamiento.

En cuanto a las frutillas ED almacenadas a 20°C, mostraron un contenido de capacidad antioxidante que registró un pico del 6% del contenido basal al día de la conservación (Figura 3.26 d), coincidiendo con el pico de fenoles totales observado.

### 3.3.2.2 Modelado matemático de los cambios de ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico, vitamina C, sólidos solubles, pH, parámetros de color y antocianinas totales.

De acuerdo a lo expuesto en la sección 2.4.3, los cambios en el tiempo de las respuestas se investigaron usando la Ecuación 2.7.

$$\pm \frac{dQ}{dt} = K_Q (Q)^n \quad (2.7)$$

Donde Q es la respuesta estudiada, t el tiempo,  $K_Q$  es la constante de velocidad de cambio de la respuesta estudiada para el atributo Q, y n el orden de la reacción cinética. El signo (+) se refiere a una respuesta que incrementa su valor con el tiempo, y el signo (-) se refiere a respuestas cuyos valores disminuyen con el tiempo.

### 3.3.2.2.1 Determinación del orden de reacción

Los procesos de deterioro de la calidad de los alimentos almacenados bajo condiciones ambientales controladas pueden describirse con funciones de velocidad de orden cero o primer orden (Saguy y Karel, 1980; Taoukis y col., 1997). Para encontrar las cinéticas de cambio de los atributos estudiados en frutillas frescas enteras despedunculadas y cortadas en mitades y cuartos, se ajustaron los datos experimentales (presentados en las Tablas 3.34 a, b, c, y d) a las siguientes ecuaciones, aplicando análisis de regresión lineal:

$$Q = Q_0 \pm K_{(T)} * t \quad (3.39)$$

$$\ln Q = \ln Q_0 \pm K_{(T)} * t \quad (3.40)$$

Donde Q es la respuesta estudiada,  $Q_0$  es el valor de la respuesta estudiada a tiempo cero, t el tiempo, K es la constante de velocidad de cambio de la respuesta estudiada para el atributo Q a una determinada temperatura (T).

A través del análisis de regresión lineal se determinó el orden y las constantes de las diferentes reacciones de cambio de los parámetros estudiados. Para elegir el orden del modelo se tuvieron en cuenta como criterio de bondad de ajuste los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de las ecuaciones de orden cero ( $n = 0$ ) y primer orden ( $n = 1$ ) para los atributos estudiados.

En las Tablas 3.35 a, b y c se exponen los valores de  $R^2$  para los atributos: ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico, sólidos solubles, pH y parámetros de color:  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$ , que ajustaron a los órdenes de reacción propuestos en las frutillas enteras despedunculadas, cortadas en mitades y cortadas en cuartos, respectivamente.

Para modelar los cambios en los parámetros estudiados se adoptó una cinética de orden cero, ya que se lograron mejores ajustes (mayores  $R^2$ ) con este orden en la mayoría de los casos. En aquellos casos donde esto no fue así, los porcentajes de cambio de los parámetros

eran generalmente menores al 50% y esto implica que la representación por una cinética de orden cero resulta suficiente (Singh, 1999).

Tabla 3.35 a. Coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de las regresiones para los compuestos bioactivos y parámetros de calidad de frutillas frescas enteras despedunculadas almacenadas a distintas temperaturas.

Frutillas enteras despedunculadas (ED)										
Temp. (°C)	Orden	AA	ADHA	SS	pH	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C_{ab}^*$	$h_{ab}$
2°C	$n = 0$	NA	0,8678	NA	0,9427	NA	0,5555	0,6671	0,6001	0,7281
	$n = 1$	NA	0,8923	NA	0,9412	NA	0,5562	0,6688	0,6012	0,7282
6°C	$n = 0$	NA	0,9765	0,9628	0,8007	0,3800	0,4750	0,5332	0,5072	0,5131
	$n = 1$	NA	0,9467	0,9638	0,8086	0,3720	0,4760	0,5042	0,5024	0,4887
13°C	$n = 0$	NA	0,9777	0,6350	0,7856	0,6732	0,8404	0,7463	0,8096	0,8189
	$n = 1$	NA	0,9609	0,6340	0,7926	0,6528	0,8546	0,7774	0,8292	0,8219
20°C	$n = 0$	NA	0,8679	0,5271	0,9026	0,5661	0,5867	0,8777	0,6384	0,7520
	$n = 1$	NA	0,8205	0,5140	0,9044	0,5698	0,5868	0,8956	0,6461	0,7674

NA: no ajusta. AA: ácido ascórbico; ADHA: ácido dehidroascórbico; SS: sólidos solubles;  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$  parámetros del sistema CIELAB.

Tabla 3.35 b. Coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de las regresiones para los compuestos bioactivos y parámetros de calidad de frutillas frescas cortadas en mitades almacenadas a distintas temperaturas.

Frutillas cortadas en mitades (CM)										
Temp. (°C)	Orden	AA	ADHA	SS	pH	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C_{ab}^*$	$h_{ab}$
2°C	$n = 0$	NA	0,9655	0,5170	0,8334	0,4761	0,7889	0,7873	0,7896	0,8040
	$n = 1$	NA	0,8850	0,5693	0,8419	0,4803	0,7953	0,8109	0,8002	0,8163
6°C	$n = 0$	NA	0,9810	0,7162	0,9166	0,1846	0,7656	0,8445	0,8121	0,9012
	$n = 1$	NA	0,9106	0,7186	0,9202	0,1771	0,8130	0,8769	0,8337	0,9073
13°C	$n = 0$	NA	0,9280	0,6746	0,9450	0,3914	0,9080	0,9553	0,9306	0,9694
	$n = 1$	NA	0,9473	0,6598	0,9482	0,4803	0,8999	0,9696	0,9299	0,9735
20°C	$n = 0$	NA	0,9484	0,7510	0,7104	0,4021	0,9509	0,8681	0,5767	0,8584
	$n = 1$	NA	0,8121	0,7692	0,7097	0,3894	0,9648	0,9159	0,5971	0,8755

NA: no ajusta. AA: ácido ascórbico; ADHA: ácido dehidroascórbico; SS: sólidos solubles;  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$  parámetros del sistema CIELAB.

Tabla 3.35 c. Coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de las regresiones para los compuestos bioactivos y parámetros de calidad de frutillas frescas cortadas en cuartos almacenadas a distintas temperaturas.

Cortadas en cuartos (CC)										
Temp. (°C)	Orden	AA	ADHA	SS	pH	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C_{ab}^*$	$h_{ab}$
2°C	$n = 0$	NA	0,9483	NA	0,9388	NA	0,6677	0,6571	0,6806	0,5825
	$n = 1$	NA	0,7962	NA	0,9339	NA	0,6726	0,6496	0,6835	0,5721
6°C	$n = 0$	0,8882	0,9720	0,3870	0,9307	0,8110	0,8806	0,8962	0,8962	0,8618
	$n = 1$	0,8859	0,8538	0,3897	0,9261	0,8170	0,8841	0,9033	0,9028	0,8526
13°C	$n = 0$	0,7100	0,9476	0,7601	0,9567	0,9292	0,9120	0,9428	0,9307	0,9438
	$n = 1$	0,6903	0,9663	0,7612	0,9533	0,9205	0,9094	0,9572	0,9331	0,9505
20°C	$n = 0$	0,8115	0,9664	0,8790	0,9589	0,7685	0,8438	0,6760	0,6133	0,5891
	$n = 1$	0,8061	0,7862	0,8718	0,9602	0,7698	0,8563	0,7071	0,6262	0,5957

NA: no ajusta. AA: ácido ascórbico; ADHA: ácido dehidroascórbico; SS: sólidos solubles;  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$  parámetros del sistema CIELAB.

### 3.3.2.2.2 Determinación de la constante de reacción y cálculo de las energías de activación para los atributos estudiados

En la Tabla 3.36 se exponen los valores de las constantes de reacción obtenidas y las energías de activación ( $E_a$ ) calculadas con sus respectivos valores de coeficientes de determinación ( $R^2$ ) para los atributos ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico, sólidos solubles y pH, que ajustaron a cinéticas de reacción de orden cero. En la Tabla 3.37 se expone la misma información para los parámetros de color:  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$ . Se informan también los valores iniciales experimentales ( $Q_0$ ) de cada atributo para cada grado de corte.

Con respecto al contenido de AA, las frutillas ED mantuvieron los niveles prácticamente constantes durante el almacenamiento a todas las temperaturas ensayadas (2, 6, 13 y 20°C). El contenido de AA de las frutillas CM se mantuvo constante a 2 y 6°C durante 10 días de almacenamiento. A 13°C, se encontraron disminuciones leves a los 8 días, y a 20°C las frutillas cortadas en mitades experimentaron una pérdida del 17 % de AA a los 3 días de almacenamiento. En estas muestras las disminuciones de AA con el tiempo de almacenamiento a diferentes temperaturas fueron nulos o leves, por lo que no pudieron determinarse las constantes ( $k(T)$ ) de pérdida de calidad para este atributo.

El contenido AA de las frutillas CC almacenadas a 2°C se mantuvo constante hasta los 15 días que duró la experiencia. En cambio, a las otras temperaturas ensayadas, se observó un aumento del catabolismo de AA a medida que aumentaba la misma, lo que puede verse a través de los aumentos de los valores de las constantes de velocidad de reacción (*K*) obtenidos a temperaturas crecientes (Tabla 3.36).

El parámetro  $Q_{10}$  dado por la Ecuación 3.41, al igual que la *Ea*, permite evaluar la funcionalidad de la temperatura con la cinética de reacción. Para entender este concepto, un valor de  $Q_{10}$  igual a 2 a 10°C, indicaría que un aumento en la temperatura de 10°C (de 10 a 20°C) provocaría una duplicación en la cinética de la reacción.

$$\ln Q_{10} = \frac{Ea}{R} * \left[ \frac{10}{T(T + 10)} \right] \quad (3.41)$$

En la Tabla 3.38 se exponen los valores de  $Q_{10}$  calculados para los atributos estudiados a 10°C. Como se puede observar la especie AA en las frutillas CC tiene un  $Q_{10}$  alto, de más de 8, lo que significaría un aumento de ocho veces en la cinética de degradación por un aumento de 10° C en la temperatura de almacenamiento.

El contenido de ácido dehidroascórbico (ADHA) aumentó en todos los tipos de corte y temperaturas ensayadas en los periodos de almacenamiento testeados. Las constantes de velocidad de reacción aumentaron en función de la temperatura para cada tipo de corte (Tabla 3.36). Las energías de activación obtenidas para las frutillas CM y CC fueron mayores que las obtenidas para las frutillas ED, lo que indicaría una “mayor sensibilidad” de estas frutillas a la temperatura, lo cual estaría de acuerdo con los valores de  $Q_{10}$  hallados (Tabla 3.38).

La mayor formación de ADHA (10 veces) ocurrió en las frutillas cortadas en cuartos almacenadas a 20°C por 2 días. Como se describió en la sección *1.3.2.1.1*, el ácido dehidroascórbico es el primer producto de oxidación del ácido ascórbico y posee actividad vitamínica, aunque menor que la que presenta el AA (Otsuka y col. 1986, Hernández y col., 2006). La suma del contenido de AA y ADHA representa el contenido de vitamina C de las frutas. Una ulterior oxidación del ADHA origina ácido dicetogulónico, el cual no tiene actividad vitamínica, lo que produce una pérdida de vitamina C.

El contenido de vitamina C en las frutillas frescas se mantuvo prácticamente constante (2 y 6°C) durante 15 y 10 días de almacenamiento, respectivamente, o con leves pérdidas

(menores al 10 %) a 13 y 20°C durante 9 y 3 días almacenamiento, respectivamente, para los todos los tipos de corte. Estos resultados no pudieron modelarse matemáticamente. Se puede inferir que el aumento del grado de corte y la temperatura de almacenamiento de las frutillas frescas no produjeron pérdidas de vitamina C, solo produjeron cambios por oxidación de ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico. Estos resultados estarían de acuerdo con los de Gil y col., (2006), quienes reportaron que la vitamina C se mantuvo constante en frutillas frescas cortadas en cuartos variedad *Seascape* luego de 9 días de almacenamiento a 5°C, observándose una pérdida en el contenido de AA del 13%, y un aumento de 3,6 veces en el contenido de ácido dehidroascórbico.

Por otra parte, Odriozola-Serrano y col., (2010), reportaron una pérdida del 40% en el contenido de vitamina C en frutillas frescas cortadas en cuartos variedad *Camarosa* luego de 21 días de almacenamiento a 4°C. Este aumento en el catabolismo de la vitamina C reportado por los autores podría deberse a la mayor acumulación de dióxido de carbono en la atmósfera modificada pasiva debido a la respiración del producto fresco cortado al cabo de 21 días de almacenamiento.

Aparentemente, muy bajas concentraciones de O<sub>2</sub> y muy altas concentraciones de CO<sub>2</sub> en los envases podrían aumentar el estrés oxidativo de las frutillas frescas cortadas, que a su vez favorecería la actividad de la enzima peroxidasa (POD) con una consecuente oxidación de ácido ascórbico. El aumento en los niveles de CO<sub>2</sub> provocaría la acidificación del citoplasma de las células vegetales con la consecuente disfunción mitocondrial, lo que produciría una acumulación de especies de oxígeno reactivo (ROS), tales como el superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), responsables del estrés oxidativo. Las especies ROS pueden causar peroxidación lipídica y la subsecuente pérdida de la integridad de las membranas (Cantos y col., 2002). Adicionalmente, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la peroxidasa cataliza la oxidación de sustratos tales como compuestos fenólicos, aminos, y ciertos compuestos heterocíclicos como la vitamina C y el indol. Oms-Oliu y col., (2008), reportaron un importante incremento en la actividad de la enzima peroxidasa de melón fresco cortado “*Piel de sapo*” almacenado en atmósfera modificada pasiva de bajo contenido de O<sub>2</sub> y alto contenido de CO<sub>2</sub> durante 14 días a 4°C, lo cual provocó un marcado descenso en el contenido de vitamina C.

Tabla 3.36. Constantes de reacción ( $K$ ) y funcionalidad con la temperatura ( $Ea$ ) de compuestos bioactivos y parámetros de calidad en frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

Parámetro	Temp. (°C)	ED $K \pm DS$	CM $K \pm DS$	CC $K \pm DS$
AA (mg 100 g <sup>-1</sup> FF) $Q_{0ED} = 47,1 \pm 0,7$ $Q_{0CM} = 41,0 \pm 0,6$ $Q_{0CC} = 40,8 \pm 0,5$	2°C	-	-	-
	6°C	-	-	0,26 ± 0,05
	13°C	-	-	0,6 ± 0,2
	20°C	-	-	5,6 ± 2,0
	$Ea$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	-	-	<b>148,4</b>
	$R^2$	-	-	0,9355
ADHA (mg 100 g <sup>-1</sup> FF) $Q_{0ED} = 1,2 \pm 0,7$ $Q_{0CM} = 1,2 \pm 0,1$ $Q_{0CC} = 1,4 \pm 0,4$	2°C	0,250 ± 0,04	0,22 ± 0,02	0,35 ± 0,03
	6°C	0,37 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,62 ± 0,05
	13°C	0,45 ± 0,03	0,7 ± 0,1	0,61 ± 0,07
	20°C	1,2 ± 0,4	2,7 ± 0,4	4,9 ± 0,6
	$Ea$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	<b>53,5</b>	<b>93,4</b>	<b>87,1</b>
	$R^2$	0,9204	0,9699	0,7921
SS (° Brix) $Q_{0ED} = 8,1 \pm 0,1$ $Q_{0CM} = 7,4 \pm 0,1$ $Q_{0CC} = 7,2 \pm 0,1$	2°C	-	0,027 ± 0,009	-
	6°C	0,054 ± 0,005	0,10 ± 0,03	0,04 ± 0,02
	13°C	0,16 ± 0,05	0,13 ± 0,05	0,16 ± 0,05
	20°C	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,2
	$Ea$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	<b>102,2</b>	<b>94,7</b>	<b>150,6</b>
	$R^2$	0,9985	0,9292	0,9992
pH $Q_{0ED} = Q_{0CM} = Q_{0CC}$ $= 3,3 \pm 0,1$	2°C	0,017 ± 0,002	0,021 ± 0,004	0,031 ± 0,003
	6°C	0,027 ± 0,001	0,030 ± 0,005	0,040 ± 0,006
	13°C	0,033 ± 0,004	0,034 ± 0,002	0,044 ± 0,005
	20°C	0,057 ± 0,004	0,075 ± 0,008	0,097 ± 0,02
	$Ea$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	<b>42,0</b>	<b>42,6</b>	<b>40,0</b>
$R^2$	0,9950	0,9065	0,8861	

AA: ácido ascórbico; ADHA: ácido dehidroascórbico, SS: sólidos solubles.

$Ea$ : energía de activación.  $Q_0$ : valor del parámetro experimental a tiempo cero.

Tabla 3.37. Constantes de reacción ( $K$ ) y funcionalidad con la temperatura ( $Ea$ ) de parámetros de color en frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

Parámetro	Temp. (°C)	ED $K \pm DS$	CM $K \pm DS$	CC $K \pm DS$
$L^*$	2°C	-	0,23 ± 0,01	-
	6°C	0,3 ± 0,2	0,25 ± 0,01	0,33 ± 0,08
	13°C	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,69 ± 0,09
	20°C	1,0 ± 0,5	1,4 ± 1,0	1,6 ± 0,6
	$Ea$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	<b>51,9</b>	<b>68,8</b>	<b>76,6</b>
	$R^2$	0,9938	0,9180	0,9860
$a^*$	2°C	0,3 ± 0,1	0,42 ± 0,09	0,32 ± 0,09
	6°C	0,4 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1
	13°C	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,1
	20°C	1,4 ± 0,7	2,5 ± 0,3	2,3 ± 0,7
	$Ea$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	<b>56,1</b>	<b>60,7</b>	<b>67,0</b>
	$R^2$	0,9875	0,9487	0,9398
$b^*$	2°C	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
	6°C	0,6 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,7 ± 0,1
	13°C	0,8 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1
	20°C	1,7 ± 0,4	2,6 ± 0,6	2 ± 1
	$Ea$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	<b>52,7</b>	<b>54,0</b>	<b>61,9</b>
	$R^2$	0,9681	0,9602	0,9553
$C_{ab}^*$	2°C	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1
	6°C	0,6 ± 0,3	1,2 ± 0,3	0,9 ± 0,1
	13°C	1,0 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,2
	20°C	2,1 ± 0,9	3 ± 1	3 ± 1
	$Ea$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	<b>55,5</b>	<b>50,2</b>	<b>61,8</b>
	$R^2$	0,9781	0,9491	0,9478
$h_{ab}$	2°C	0,34 ± 0,09	0,46 ± 0,09	0,3 ± 0,1
	6°C	0,5 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1
	13°C	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1
	20°C	1,8 ± 0,6	2,0 ± 0,5	2 ± 1
	$Ea$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	<b>59,4</b>	<b>49,8</b>	<b>56,7</b>
	$R^2$	0,9925	0,9337	0,964

$L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$  parámetros del sistema CIELAB.

$Ea$ : energía de activación.  $Q_0$ : valor del parámetro experimental a tiempo cero.

Tabla 3.38. Valores de  $Q_{10}$  a  $10^{\circ}\text{C}$  para compuestos bioactivos y parámetros de calidad en frutillas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

Atributo	$Q_{10}$ ( $T = 10^{\circ}\text{C}$ )		
	ED	CM	CC
AA	-	-	8,60
ADHA	2,17	3,88	3,54
SS	4,40	3,95	9,34
pH	1,84	1,85	1,79
$L^*$	2,15	2,71	3,04
$a^*$	2,26	2,41	2,64
$b^*$	2,15	2,19	2,45
$C_{ab}^*$	2,24	2,07	2,45
$h_{ab}$	2,37	2,06	2,27

AA: ácido ascórbico; ADHA: ácido dehidroascórbico; SS: sólidos solubles;  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$  parámetros del sistema CIELAB.

En cuanto a los sólidos solubles, la tendencia fue de una disminución con el periodo de almacenamiento, lo cual es evidente ya que son degradados por la fruta para su metabolismo. Los sólidos solubles decayeron más rápidamente en las muestras almacenadas a las temperaturas más altas, lo que se refleja en las constantes de velocidad obtenidas para los tres tipos de corte. De acuerdo a las energías de activación y los valores de  $Q_{10}$  obtenidos (Tablas 3.36 y 3.38), la temperatura afectó de igual manera la depleción de este atributo en las frutillas enteras despedunculadas y cortadas en mitades, siendo las frutillas cortadas en cuartos las más sensibles a la temperatura.

El pH tendió a subir con el tiempo y a medida que aumentaba la temperatura para un mismo tipo de corte. Este hecho hace evidente el uso por parte de la fruta de algunos ácidos orgánicos para las actividades de respiración y metabolismo. De acuerdo a las energías de activación y los valores de  $Q_{10}$  obtenidos (Tablas 3.36 y 3.38), podemos inferir que la temperatura afectó de igual manera el aumento de este atributo para todos los cortes de frutillas estudiados.

En cuanto al color, se registró una disminución del término  $L^*$  con el tiempo de almacenamiento para todas los cortes y temperaturas ensayadas. La disminución de  $L^*$  se traduce en un oscurecimiento de las frutas, siendo este fenómeno más rápido en las muestras almacenadas a las temperaturas más altas, lo que se refleja en las constantes de velocidad obtenidas para los tres tipos de corte. Según las energías de activación obtenidas

(Tabla 3.37), habría una mayor sensibilidad al oscurecimiento con aumentos de la temperatura a medida que aumenta el grado de corte. Wright y Kader, (1997), reportaron una disminución con el tiempo de almacenamiento del término  $L^*$  en frutillas frescas enteras despedunculadas y cortadas en cuartos variedad *Selva* almacenadas a 5°C por 7 días, siendo el oscurecimiento más notable en las frutillas cortadas que en las enteras. Los valores de  $h_{ab}^*$  disminuyeron con el tiempo de almacenamiento debido a las disminuciones de los parámetros  $a^*$  y  $b^*$ . Esta disminución fue más marcada a medida que aumentaba la temperatura, reflejado por las constantes de velocidad observadas (Tabla 3.37); además según las energías de activación obtenidas, la disminución del parámetro no dependería del grado de corte practicado sobre el tejido vegetal. Valores de ángulo de tono ( $h_{ab}^*$ ) más chicos con disminuciones de los valores de  $a^*$  y  $b^*$ , reflejarían un aumento de la tonicidad de las frutas con el tiempo de almacenamiento. En cuanto a los valores de  $C_{ab}^*$ , se encontró una disminución del parámetro con el tiempo a medida que la temperatura aumentaba para todos los tipos de corte. La disminución del parámetro reflejaría la menor vivacidad de las muestras con el tiempo de almacenamiento. Wright y Kader, (1997), reportaron pequeños aumentos en los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  con el tiempo de almacenamiento en frutillas frescas enteras despedunculadas variedad *Selva* almacenadas a 5°C por 7 días, mientras que no encontraron cambios en los mismos parámetros en las frutillas frescas cortadas en cuartos. La diferencia observada con los investigadores puede deberse a la forma en que se efectuaron las mediciones de color. Wright y Kader, (1997), midieron el color sobre la superficie de las frutillas frescas cortadas, mientras que en la presente tesis la medición se realizó sobre un homogeneizado del producto.

Con respecto al contenido de antocianinas totales, si bien las mismas son parte de los compuestos fenólicos totales, experimentaron una pérdida con el tiempo de almacenamiento en todos los tipos de corte (Tablas 3.39). Las antocianinas son moléculas muy inestables y altamente susceptibles a la degradación. Su estabilidad está afectada por varios factores tales como el pH, la temperatura, la estructura química, su concentración, la luz, el oxígeno, la presencia de enzimas, proteínas y metales (Maarit y Heinonen, 2002).

Como se observa en la Tabla 3.39, las constantes de velocidades de reacción de orden cero calculadas a 2, 6 y 13°C, no se diferenciaron entre sí, por lo que la cinética de cambio de las antocianinas totales parecería no depender de la temperatura en ese rango. Este

fenómeno se observó independientemente del tipo de corte evaluado. Sin embargo, a 20°C, de acuerdo al valor de  $K$  obtenido, la degradación de las antocianinas ocurrió más rápidamente.

De acuerdo a Zheng y col., (2007) y Odriozola-Serrano y col., (2010), el almacenamiento de frutillas frescas cortadas en atmósferas con un contenido de  $O_2 \leq 21$  KPa, como el que se presenta en las atmósferas modificadas pasivas, aumentaría el contenido de las antocianinas totales, presumiblemente por la estimulación de su síntesis vía PAL, como se indicó para los fenoles totales. Contrariamente, la acumulación del  $CO_2$  de las atmósferas desfavorecería este aumento debido a la inhibición de dos enzimas claves de la síntesis de antocianinas (Holcroft y Kader, 1999). Además cabe agregar, que por efecto del corte entrarían en contacto la enzima polifenol oxidasa (PPO) con sus sustratos, los compuestos fenólicos, y en presencia de oxígeno, se produciría una oxidación de los fenoles (Tomás-Barberán y Espín, 2001).

Tabla 3.39. Constantes de reacción ( $K$ ) y funcionalidad con la temperatura ( $Ea$ ) de antocianinas totales (Ant T) en frutillas frescas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC).

Parámetro	Temp. (°C)	ED $K \pm DS$	$R^2$	CM $K \pm DS$	$R^2$	CC $K \pm DS$	$R^2$
<b>Ant T</b> (mg 100 g <sup>-1</sup> FF)	2°C	1,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,9262	0,37 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,7422	0,65 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,8825
	6°C	0,95 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,9937	0,24 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,5805	0,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,8533
	13°C	0,84 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,9775	0,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,6153	0,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,8606
$Q_{0ED} = 41,2 \pm 0,3$	20°C	5 ± 2 <sup>b</sup>	0,7990	2,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,9552	4,3 ± 0,7 <sup>b</sup>	0,9487
$Q_{0CM} = 32,1 \pm 0,9$	$Ea^* (KJ mol^{-1})$	62,9		70,9		70,4	
$Q_{0CC} = 33,4 \pm 0,4$	$R^2$	-		-		-	

$Ea^*$ : energía de activación estimada con dos puntos. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) para un mismo corte con la temperatura de almacenamiento.

Por lo tanto, el resultado final de la concentración de antocianinas totales estaría determinado por dos fenómenos, uno de síntesis en respuesta al estrés provocado por el corte y otro de degradación producido tanto por el aumento de la temperatura, la inhibición de la síntesis por la acumulación de  $CO_2$ , y la activación de la PPO. Como se observa en la Tabla 3.39, una estimación de las energías de activación, indicaría una mayor sensibilidad a la degradación con la temperatura de las antocianinas en las frutillas cortadas que en las enteras.

## **4. Conclusiones**

---

#### 4.1 “Desarrollo y puesta a punto de métodos y técnicas analíticas”

- Se desarrolló y optimizó un método UV-HPLC rápido y conveniente para la cuantificación de ácido ascórbico (AA), ácido dehidroascórbico (ADHA) y vitamina C en frutillas utilizando diseños experimentales, y optimización simultánea a través de la función deseabilidad de Derringer. Se obtuvieron condiciones óptimas de longitud de onda, velocidad de flujo y pH de la fase móvil. Se realizó una validación exhaustiva del método, la cual demostró que el método propuesto es lineal en el rango de concentraciones estudiado, sensible, preciso, exacto y robusto.
- El método optimizado y validado se utilizó para determinar el contenido de AA, ADHA y vitamina C en frutillas variedad *Selva*, compradas en el mercado local (de origen Mar del Plata) y *Camarosa*, obtenida directamente de un productor regional de la zona de Arroyo Leyes (Santa Fe). Las determinaciones se realizaron en distintos años de cosecha. De acuerdo a los resultados, la variedad *Camarosa* es la que presentaría menor variabilidad en el contenido de vitamina C con el año de cosecha, comparada con la variedad *Selva*. Como se indicó el contenido de vitamina C de frutas y hortalizas depende de la especie, cultivar, estado de madurez, y de la manipulación postcosecha.
- Se desarrolló un método DAD-HPLC para la identificación y cuantificación de los principales compuestos fenólicos en frutillas en una sola corrida cromatográfica. La extracción con metanol con una posterior hidrólisis ácida demostró ser adecuada tanto para los estándares de compuestos fenólicos como para los extractos de frutillas. Se demostró la conveniencia del uso de una fase móvil basada en metanol en reemplazo del acetonitrilo (solvente orgánico más comúnmente utilizado en estos análisis). Se realizó una validación exhaustiva, la cual demostró que el método propuesto es lineal en el rango de concentración estudiado, sensible, preciso y exacto.

- El método desarrollado se utilizó para determinar y cuantificar el perfil de compuestos fenólicos de las frutillas variedad *Camarosa* y *Selva*. Se detectaron diferencias en la ocurrencia y concentración de compuestos fenólicos para ambos cultivares. En las frutillas *Camarosa* se encontró un mayor contenido en antocianidinas, sobre todo pelargonidina, lo cual explica el color rojo más vívido detectado para este cultivar. El contenido de fenoles totales obtenido como la suma aritmética de los compuestos fenólicos hallados en cada cultivar antes de la hidrólisis ácida fue mayor en las frutillas *Selva* que en las frutas *Camarosa*, aunque luego de la hidrólisis ácida esta diferencia no resultó significativa .

#### **4.2 “Estudio de la operación de lavado-desinfección de frutillas frescas cortadas con ácido peracético (APA)”**

- Los resultados del proceso de lavado-desinfección N° 1 de frutillas frescas cortadas en cuartos variedad *Camarosa* en el espacio experimental ensayado (0 - 80 mg L<sup>-1</sup> ácido peracético, 4 - 40°C, y 10 - 60 s), indicaron que las variables de proceso y los niveles utilizados en la operación afectaron la retención de AA. Esto se pudo cuantificar a través del modelo desarrollado. Aplicando dicho modelo, un tratamiento con 80 mg L<sup>-1</sup> de APA, concentración recomendada para el lavado de frutas y hortalizas por el Código Federal de Regulaciones de los E.E.U.U., a 40°C y 60 s, resultó en una retención predicha de AA del 72,9 %. Además, las retenciones de compuestos bioactivos (vitamina C, antocianinas y fenoles totales), capacidad antioxidante y parámetros de calidad (sólidos solubles, pH, acidez total y parámetros de color) no fueron afectados por las variables del proceso en el espacio experimental estudiado.

Por otra parte, el proceso de lavado-desinfección en las diferentes condiciones ensayadas afectó levemente y en forma similar la actividad de las enzimas PAL (fenilalanina-amoniaco liasa) y PG (poligalacturonasa). En cuanto a las enzimas PME (pectinmetilesterasa) y PPO (polifenoloxidasas), las diferentes condiciones de la operación de lavado-desinfección produjeron cambios significativos, los cuales pueden representarse con los correspondientes modelos obtenidos.

- Para el diseño de lavado-desinfección N° 2, (0 - 100 mg L<sup>-1</sup> ácido peracético, 4 - 40°C, y 10 - 120 s) se estudiaron dos cultivares de frutillas, *Camarosa* y *Selva*. El estudio permitió demostrar el comportamiento diferente de cada uno de los cultivares de frutillas luego del proceso de lavado-desinfección. Las retenciones de ácido ascórbico, antocianinas totales, fenoles totales y capacidad antioxidante se vieron afectadas por las variables del proceso, principalmente por la concentración de APA y el tiempo, y no se observaron diferencias entre los cultivares; por lo que los resultados pudieron modelarse conjuntamente. Las predicciones realizadas con los modelos obtenidos, trabajando a las máximas condiciones del diseño (100 mg L<sup>-1</sup> ácido peracético, 40°C y 120 s), arrojaron retenciones superiores al 60 % en la mayoría de ellos.

La retención de vitamina C (AA + ADHA) y los cambios de color no se vieron afectados por las variables de procesamiento dentro del dominio experimental ensayado para el cultivar *Camarosa*. Sin embargo, para la variedad *Selva*, la retención de vitamina C y los cambios de color se vieron afectados por las variables de la operación.

Por otra parte, la reducción de los microorganismos aerobios mesófilos fue afectada por las variables del proceso en ambos cultivares de manera diferente y se obtuvieron modelos predictivos para cada uno de ellos.

Estos modelos de predicción para la retención de compuestos bioactivos, capacidad antioxidante y reducción de microorganismos aerobios mesófilos demostraron ser adecuados; además serían herramientas predictivas útiles para los procesadores de frutillas frescas cortadas para mejorar la retención de compuestos bioactivos en el lavado-desinfección en condiciones variables de concentración de ácido peracético, temperatura y tiempo. Como se observó, diferencias en las variables de operación podrían conducir a productos con aportes nutricionales y nutraceuticos diferentes para los consumidores.

- Una optimización simultánea de las respuestas estudiadas en el diseño de lavado-desinfección N°2 permitió encontrar condiciones de lavado en dos escenarios: a)

maximizando la reducción microbiológica con retenciones en los compuestos bioactivos del 90%, y b) priorizando la retención de compuestos bioactivos con una buena reducción microbiológica. Experiencias de validación de los modelos obtenidos usando frutillas *Camarosa* permitieron demostrar la eficacia de los mismos y el análisis sensorial con panel entrenado aportó información adicional sobre la calidad de los productos obtenidos en las condiciones de optimización estudiadas.

#### **4.3 “Estudio de las operaciones de corte y el almacenamiento de frutillas frescas cortadas”**

- El efecto del mínimo procesamiento en el día cero de frutillas frescas cortadas mostró una pérdida de compuestos bioactivos y sólidos solubles. El efecto del corte en frutillas enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC) y el subsiguiente lavado con APA en las condiciones que priorizaban la retención de compuestos bioactivos, ocasionaron pérdidas que aumentaron con el grado de corte practicado en el tejido vegetal.
- El estudio del posterior almacenamiento de las frutillas frescas cortadas a temperaturas crecientes mostró, en general, un desmejoramiento en los atributos estudiados a medida que aumentaba el grado de corte y la temperatura de la conservación.
- La evolución de los atributos (ácido dehidroascórbico, sólidos solubles, pH y parámetros de color) en función del tiempo pudo ser modelada con cinéticas de orden cero en todos los tipos de corte practicado, a todas las temperaturas ensayadas (2, 6, 13 y 20°C). La dependencia de las constantes de reacción con la temperatura mostró un buen ajuste con la ecuación de Arrhenius. Las energías de activación calculadas para los distintos atributos mostraron, como tendencia general, una mayor sensibilidad a la temperatura de las frutillas frescas cortadas que las enteras despedunculadas.

- La evolución del contenido de ácido ascórbico solo pudo modelarse con cinética de orden cero en las frutillas CC. El contenido de ácido ascórbico de las frutillas ED y CM no mostraron cambios con la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Por su parte, la vitamina C se mantuvo prácticamente invariable en todas las temperaturas, a lo largo de la conservación para todos los cortes estudiados.
- El efecto del estrés abiótico ocasionado por el corte provocó la acumulación de compuestos fenólicos. Se registraron aumentos significativos a días específicos de la conservación para cada tipo de corte ensayado. Cuanto mayor fueron el grado de corte y la temperatura de conservación, más rápido ocurrió el aumento. Además los mayores aumentos (23 % del basal) se dieron en las frutillas frescas cortadas en cuartos, las de mayor grado de injuria. Al final de la conservación, los contenidos de fenoles totales en las frutillas frescas ED, CM y CC se mantuvieron prácticamente constantes respecto de los valores iniciales.
- En el caso de las antocianinas totales, se observó una disminución de su concentración con el tiempo de almacenamiento, hecho más marcado en las muestras almacenadas a 20°C. Aparentemente la síntesis de antocianinas en respuesta al estrés provocado por el corte atenuaría la degradación producida tanto por el aumento de la temperatura, la activación de la polifenoloxidasa, y la inhibición de la vía sintética de las antocianinas producida por la acumulación de CO<sub>2</sub> en los envases.
- Por lo general, la capacidad antioxidante acompañó la evolución presentada por los compuestos fenólicos totales. Sin embargo, las frutillas cortadas (CM y CC), almacenadas a 20°C mostraron una disminución con el tiempo, probablemente por la reducción en el contenido de ácido ascórbico ocurrido en esas condiciones.
- De acuerdo a los resultados obtenidos, las frutillas frescas cortadas en cuartos experimentarían el mayor detrimento de su calidad a medida que aumenta la temperatura de conservación, por la mayor injuria recibida en el tejido vegetal que

acelera el metabolismo. Contrariamente, el estrés abiótico que produce el cortado de las frutillas frescas en cuartos, induciría un incremento en el contenido de fenoles totales con un consecuente aumento en su capacidad antioxidante, siendo este aumento acelerado al incrementar la temperatura de conservación. Por lo tanto, se podrían preparar frutillas frescas cortadas en cuartos y conservarse a temperaturas bajas (2°C), obteniéndose de este modo productos con un mayor nivel en compuestos fenólicos, lo que significaría un potencial bioactivo aumentado.

# **5. Bibliografía**

---

- Aaby, K.; Ekeberg, D.; y Skrede, G. (2007). *Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity*. J. Agric. Food Chem. 55, 4395-4406.
- Alexandre, E.M.C.; Brandão, T.R.S.; y Silva, C.L.M. (2012). *Efficacy of non-thermal technologies and sanitizer solutions on microbial load reduction and quality retention of strawberries*. J. Food Eng. 108, 417-426.
- Allende, A. y Artés, F. (2003). *UV-C radiation as a novel technique for keeping quality of fresh processed "Lollo rosso" lettuce*. Food Res. Int. 36, 739- 746.
- Amakura, Y.; Okada, M.; Tsuji, S. y Tonogai, Y. (2000). *High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits*. J. Chromatogr. A. 896, 87- 93.
- Anónimo, (2012). *Aconsejan aumentar el consumo de frutas y verduras para prevenir enfermedades*. <http://www.telam.com.ar/nota/34574/>
- APHA-AWWA-WEF. (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20th 7 Ed., Washington, D.C., E.E.U.U..
- Artés, F.; Gómez, P.; Aguayo, E.; Escalona, V. y Artés Hernández, F. (2009). *Review: Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities*. Postharvest Biol. Technol. 51, 287-296.
- Association of Official Agricultural Chemists (1995). *Official Methods of Analysis, (16th edition)*. (Ed. M.J. Deutsch). Arlington, VA, E.E.U.U.
- Association of Official Agricultural Chemists. (1998). *AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures*. Arlington, VA., EE.UU.
- Awika, J. M.; Rooney, J. W. y Waniska, R. D. (2005). *Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties*. Food Chem. 90, 293-301.
- Ayala-Zavala, F. J. y González-Aguilar, G. A. (2009). *El envase como protector de la calidad sensorial y nutricional de frutas y hortalizas frescas cortadas*. En: *Aspectos*

- 
- nutricionales y sensoriales de vegetales frescos cortados*. (Ed. Trillas, S.A. de C.V.). D.F. México. p. 283- 306.
- Baettie, J.; Crozier, A. y Duthie, G. G. (2005). *Potential health benefits of berries*. *Curr. Nutri. Food Sci.* 1, 71-86.
- Baş, D. y Boyacı, I. H. (2007) *Modelling and optimization I: usability of response surface methodology*. *J. Food Eng.* 78, 836-845.
- Bavaresco, L. (2003). *Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wines*. *Drugs Exp. Clin. Res.* 29, 181- 187.
- Benzie I. F. F. y Strain J. J. (1997). *Simultaneous automated measurement of the total antioxidant (reducing) capacity and ascorbic acid concentration*. *Redox Rep.* 3, 233-238.
- Bianchini, R. M.; Castellano, P. M. y Kaufman, T. S. (2009). *Development and validation of an HPLC method for the determination of process-related impurities in pridinol esylate, employing experimental designs*. *Anal. Chim. Acta.* 654, 141-147.
- Block, G.; Patterson, B., y Subar, A. (1992). *Fruits, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence*. *Nutr. Cancer*, 18, 1- 29.
- Boque, R.; Ferré, J.; Faber, N. M. y Rius, F. X. (2002). *Limit of detection estimator for second-order bilinear calibration*. *Anal. Chim. Acta.* 451, 313-321.
- Box, G. E. P. y Behnken, D. W. (1960). *Some new three level designs for study of quantitative variables*. *Technometrics* 2, 455-475.
- Brackett, RE. (1994). *Microbiological consequences of minimally processed fruits and vegetables*. *J. Food Quality.* 10, 195- 206.
- Bramley, M.; Elmadfa, I.; Kafatos, A.; Kelly, F. J.; Manios, Y.; Roxborough, H. E.; Schuch, W.; Sheehy, P. J. A. y Wagner, K. H. (2000). *Vitamin E*. *J. Sci. Food Agric.* 80, 913-938.
- Branzanti, E.C. (1989). *La Fresa*. (Ed. Mundi-Prensa). Madrid, España.
- Buck, J. W.; Walcott, R.R y Beuchat, L.R. (2003). *Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables*. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2003-0121-01-RV.
-

- Bureau, S.; Renard, C. M. G. C.; Reich, M; Ginies, C. y Audergon, J. M. (2009). *Change in anthocyanin concentrations in red apricot fruits during ripening*. LWT-Food Sci. Technol. 42, 372-377.
- Cano, M. P.; Sánchez-Moreno, C.; de Pascual-Teresa, S. y de Ancos, B. (2005). *Procesado mínimo y valor nutricional*. En: *Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados*. (Eds. González-Aguilar, G. A.; Gardea, A. A. y Cuamea-Navarro, F.) Logiprint Digital S. de R. L. de C. V., Guadalajara, Jalisco, México, p. 119- 152.
- Cantos, E.; Espín, J. C. y Tomás-Barberán, F. A. (2001). *Effect of wounding on phenolic enzymes in six minimally processed lettuce cultivars upon storage*. J. Agr. Food Chem. 49, 322- 330.
- Cantos, E.; Tudela, J. A.; Gil, M. I. y Espín, J. C. (2002). *Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh-cut potatoes*. J. Agric. Food Chem. 50, 3015–3023.
- Caridi, D; Trenerry, V. C.; Rochfort, S.; Laughher, D y Jones, R. (2007). *Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (Allium cepa L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography*. Food Chem. 105, 691-699.
- Carr, A. C.; Zhu, B. Z. y Frei, B. (2000). *Potencial antiatherogenic mechanisms of ascorbate (Vitamin C) and  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamine E)*. Circ. Res. 87, 349- 354.
- Castañeda Ovando, A.; Pacheco Hernández, M.; Páez Hernández, M.; Rodríguez, J. y Galán Vidal, C. (2009). *Chemical studies of anthocyanins: A review*. Food Chem., 11, 859-871.
- Castro, I.; Gonçalves, J. A. y Vicente, A. A. (2002). *Comparative study of Selva and Camarosa strawberries for the comercial market*. J Food Sci. 67, 2132- 2136.
- Chen, H. y Zuo, Y. (2007). *Identification of flavonol glycosides in American cranberry fruit*. Food Chem. 101, 1357-1364

- Chisari, M; Silveira A. C.; Barbagallo, R.N.; Spagna, G.; Artés, F. (2008). *Ripening stage influenced the expression of polyphenol oxidase, peroxidase, pectin methylesterase and polygalacturonase in two melón cultivars*. Int. J. Food. Sci. Tech. 5, 940-946.
- Christen, Y. (2000). *Oxidative stress and Alzheimer's disease*. Am. J. Clin. Nutr. 71, 621- 629.
- Cian, R. E. (2009). *Estudio de propiedades bio-funcionales de péptidos provenientes de hemoglobina bovina y su incorporación a productos extrudidos*. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Cisneros-Zevallos, L. (2003). *The use of controlled postharvest abiotic stresses as a toll for enhancing the nutraceutical content and adding-value of fresh fruits and vegetables*. J. Food Sci. 68, 1560-1565.
- Clifford, M. N. y Scalbert, A. (2000). *Ellagitannins, nature, occurrence and dietary burden*. J. Sci. Food Agric. 80, 1118- 1125.
- Code of Federal Regulations [CFR] (2007). *Chemicals used in washing or to assist in the peeling of fruits and vegetables. Chlorine dioxide*. [Http://frwebgate3.access.gpo.gov/cgi-bin](http://frwebgate3.access.gpo.gov/cgi-bin).
- Combs, G. F. (1998). *The vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health*. California: Academic Press.
- Cordenunsi, B. R.; Nascimento, J. R. O.; Genovese, M. I. y Lajolo, F. M. (2002). *Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil*. J. Agr. Food Chem. 50, 2581- 2586.
- Cordenunsi, B.R.; Genovese, M.I.; Oliveira do Nascimento, J.R.; Hassimotto, N.M.A.; dos Santos, R.J. y Lajolo, F.M. (2005). *Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars*. Food Chem. 91, 113-121.
- Crouzet, J; Sakho, H.; Chassagne, D. (1997). *Fruits aroma precursors with special references to phenolics*. En: *Phytochemistry of Fruits and Vegetables*. (Eds. Tomás-Barberán, F. A. y Robins, R. J.) Clarendon Press, Oxford, p. 109- 123.

- D'Archivio, M.; Filesi, C.; Di Benedetto, R.; Gargiulo, R.; Giovannini, C. y Masella, R. (2007). *Polyphenols, dietary sources and bioavailability*. Ann. Ist. Super. Sanita. 43, 348, 361.
- da Silva Pinto M.; Lajolo F., y Genovese M. (2008) *Bioactive compounds and quantification of ellagic acid in strawberries (Fragaria x ananassa Duch.)*. Food Chem. 107, 1629-1635.
- Danzer, K. y Currie, L.A. (1998). *Guidelines for calibration in analytical chemistry*. Pure and Appl. Chem. 70, 993-1014.
- Dávalos, A.; Miguel, M.; Bartolomé, B. y López-Fadiño, R. (2004). *Antioxidant activity of peptides from egg white proteins by enzymatic hydrolysis*. J. Food Protect. 67, 1939-1944.
- Davey, M.W.; Van Montagu, M.; Inzé D.; Sanmartin M.; Kanellis A., Smirnoff, N.; Benzie, I .J .J.; Strain, J. J.; Favell D. y Fletcher, J. (2000). *Review: Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing*. J. Sci Food and Agric. 80, 825- 860.
- de Ancos, G.; Sánchez-Moreno, C. y Cano, M. P. (2009). *Aspectos nutricionales y saludables de vegetales frescos cortados*. En: *Aspectos Nutricionales y Sensoriales de Vegetales Frescos Cortados*. (Ed. Trillas S. A. de C. V.) México, D.F. p. 120- 154.
- Del Valle, V.; Hernandez-Muñoz, P.; Guarda, A. y 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 Chem. 91, 751- 756.
- Delmas, D.; Lancon, A.; Colin, D.; Jannin, B. y Latruffe, N. (2006). *Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting cancer*. Current Drugs Targets. 7, 423- 442.
- Derringer, G. y Suich, J. (1980). *Simultaneous optimization of several response variables*. J. Qual. Technol. 12, 214 – 219.
- Dewé, W.; Marini, R. D.; Chiap, P.; Hubert, Ph.; Crommen, J. y Boulanger, B. *Development of response models for optimising HPLC methods*. Chemometr. Intell. Lab. 74, 263- 268.

- Dixon, R. A. y Paiva, N. A. (1995). *Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism*. *The Plant Cell*. 7, 1085- 1097.
- FAO/OMS, 2003. *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation*. *WHO Technical Report Series*, No. 916. Geneva. [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_916.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_916.pdf)
- Floros, J.D. y Chinnan, M.S. (1988) *Computer graphics assisted optimization for product and process development*. *Food Technol.* 42, 72- 78.
- Fontannaz, P.; Kilinic, T. y Heudi, O. (2006). *HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products*. *Food Chem.* 94, 626- 631.
- Gey K. F. (1998). *Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer*. *Biofactors*. 7, 113- 174.
- Giampieri, F.; Tulipani, S.; Alvarez-Suarez, A. M.; Quiles, J. L.; Mezzetti, B. y Battino, M. (2012). *The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health*. *Nutrition*, 28, 9- 19.
- Gil, M. I.; Aguayo, E. y Kader, A. A. (2006). *Quality changes and nutrition retention in fresh-cut versus whole fruits during storage*. *J. Agr. Food Chem.* 54, 4284- 4296.
- Gil, M. I.; Selma, M. V.; López-Gálvez, F. y Allende, A. (2009). *Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions*. *Int J. Food Microbiol.* 134, 37- 45.
- Giné Bordonaba J.; Crespo, P. y Terry, L. (2011). *A new acetonitrile-free mobile phase for HPLC-DAD determination of individual anthocyanins in blackcurrant and strawberry fruits: A comparison and validation study*. *Food Chem.* 129, 1265- 1273.
- Giovanni, M. (1983) *Response surface methodology and product optimization*. *Food Technol.* 37, 41-45.
- González, A.G.; Herrador, M.A. y Asuero, A.G. (1999). *Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays*. *Talanta* 48, 729- 736.

- González, M. y Lobo, G. M. (2005). *Técnicas de Procesamiento*. En: *Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados*. (Eds. González-Aguilar, G. A.; Gardea, A. A. y Cuamea-Navarro, F.) Logiprint Digital S. de R. L. de C. V., Guadalajara, Jalisco, México, p. 97- 115.
- González, R.; Allende, A.; Ruíz-Cruz, S. y Luo, Y. (2005). *Sanitizantes utilizados*. En: *Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados*. (Eds. González-Aguilar, G. A.; Gardea, A. A. y Cuamea-Navarro, F.) Logiprint Digital S. de R. L. de C. V., Guadalajara, Jalisco, México, p. 262- 284.
- Guía de Seguridad Alimentaria para la Industria de Productos Vegetales Frescos Cortados. International Fresh-cut Produce Association (IFPA) (2003). (Eds. Gil, M. I. y Gorny, J R.).
- Gunes, G.; Hotchkiss, J. H. y Watkins, C. B. (2001). *Effects of gamma radiation in the texture of minimally processed apple slices*. J. Food Sci. 66, 63- 67.
- Hagerman, A. E. (2002). *Tannin Handbook*. Department of Chemistry and Biochemistry, Miami University, E.E. U.U.
- Häkkinen, S, Törrönen, A. (2000). *Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and Vaccinium species: influence of cultivar, cultivation site and technique*. Food Res. Intern. 33, 517- 524.
- Halliwell, B. (1997). *Antioxidants and human disease: a general introduction*. Nutrition reviews. 55, 49- 52.
- Hannum, S. M. (2004). *Potential impact of strawberries on human health: A review*. Crc. Cr. Rev. Food Sci. 44, 1- 17.
- Hellstrom, S.; Kervinen, R.; Lyly, M.; Ahvenainen-Rantala, R. y Korkeala, H. (2006). *Efficacy of disinfectants to reduce Listeria monocytogenes on pre-cut iceberg lettuce*. J. Food Prot. 69, 1565- 1570.
- Hernández, Y.; Gloria Lobo, M. y González, M. (2006). *Determination of Vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods*. Food Chem. 96, 654- 664.

- Hernanz, D.; Recamales, A. F.; Meléndez-Martínez, a. J. González-Miret, M. L. y Heredia, F. J. (2007). *Assessment of the Differences in the Phenolic Composition of Five Strawberry Cultivars (Fragaria × ananassa Duch.) Grown in Two Different Soilless Systems*. J. Agric. Food Chem. 55, 1846- 1852.
- Herrmann, K. M. (1995). *The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds*. The Plant Cell. 7, 907- 919.
- Hilgren, J. D. y Salverda, J. A. (2000). *Antimicrobial efficacy of a peroxyacetic/octanoic acid mixture in fresh-cut vegetable process waters*. J. Food Sci. 65, 1376– 1379.
- Hilgren, J.; Swanson, K. M. J.; Diez-Gonzalez, F. y Cords, B. (2007). *Inactivation of Bacillus anthracis spores by liquid biocides in the presence of food residue*. Appl. Environ. Microbiol. 73, 6370– 6377
- Holcroft, D. M. y Kader, A. A. (1999). *Controlled atmospheres-induced changes in pH and organic acid metabolism may affect color of stored strawberry fruit*. Postharvest Biol. Tec. 17, 19- 32.
- Huang, D.; Ou, B. y Prior, R. (2005). *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. J. Agric. Food Chem. 53, 1841- 1856.
- Huang, H. Y.; Appel, L. J.; Croft, K. D.; Miller-Iii, E. R.; Mori, T. A. y Puddey, I. B. (2002). *Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial*. Am. J. Clin. Nutr. 76, 549- 555.
- Hyodo, H.; Kuroda, H. y Yang, S. F. (1978). *Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting by ethylene*. Plant Physiol. 62, 31- 35.
- Ignat, I.; Volf, I. y Popa, V. I. (2011). *A critical review of method for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables*. Food Chem. 126, 1821- 1835.
- International Fresh-cut Produce Association (IFPA) and the Produce Marketing Association (PMA). (1999). *Handling Guidelines for the Fresh-cut Produce Industry*. 3rd edition. IFPA, Alexandria, VA., p. 5 -7.

- Jin-Heo, H. y Yong-Lee., C. (2005). *Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells*. J. Agric. Food Chem. 53, 1984- 1989.
- Joshiyura, K. J.; Hu, F. B.; Manson, J. A. E.; Stampfer, M. J.; Rimm, E. B.; Speizer, F. E.; Colditz, G.; Ascherio, A.; Rosner, B. y Spiegelman, D. (2001). *The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease*. Amn. Int. Med. 134, 1106- 1114.
- Kader, A. A. (1997). *Biological bases of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> effects on postharvest-life of horticultural perishables*. En: *Proceedings of the 7th International Controlled Atmosphere Research Conference*. (Ed. Salveit, M. E.). Universidad de Davis, E.E. U.U.4, 160- 163.
- Kajdžanoska, M.; Gjamovski, V. y Stefova, M. (2011). *Comparison of Different Extraction Solvent Mixtures for Characterization of Phenolic Compounds in Strawberries*. J. Agric. Food Chem. 59, 5272- 5278.
- Kang, H. y Saltveit, M. (2002). *Antioxidant capacity of lettuce leaf tissue increases after wounding*. J. Agric. Food Chem. 50, 7536– 7541.
- Karadag, A.; Ozcelik, B. y Saner, S. (2009). *Review of Methods to determine antioxidant capacities*. Food Anal. Methods. 2, 41- 60.
- Kevers, C.; Falkowski, M.; Tabart, J.; Defraigne, J. O.; Dommès, J. y Pincemail, J. (2007). *Evolution of antioxidants capacity during storage of selected fruits and vegetables*. J. Agric. Food Chem. 55, 8596- 8603.
- Kirschbaum, D. S. y Hancock, J. F. (2000). *The strawberry industry in South America*. HortScience. 35, 807- 811.
- Kitis, M. (2004). *Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review*. Environmental Institute. 30, 47-55.
- Kong, J. M.; Chia L. S., Goh, N. K.; Chia, T. F. y Brouillard, R. (2003). *Review Analysis and biological activities of anthocyanins*. Phytochemistry. 64, 923- 933.
- Koponen , J. M.; Happonen, A. M.; Mattila, P. H. y Törrönen, A. R. (2007). *Contents of Anthocyanins and Ellagitannins in Selected Foods Consumed in Finland*. J. Agric. Food Chem. 55, 1612– 1619.

- Kunigk, L. y Almeida, M. C. B. (2001). *Action of peracetic acid on escherichia coli and staphylococcus aureus in suspension or settled on stainless steel surfaces*. Braz. J. Microbiol. 32, 38- 41.
- Kyanko, M. V.; Russo, M. L.; Fernández, M. y Pose, G. (2010). *Efectividad del Acido Peracético sobre la reducción de la carga de Esporas de Mohos causantes de Pudrición Poscosecha de Frutas y Hortalizas*. Inf. Tecn. 21, 125- 130.
- Lee, S. K. y Kader, A. A. (2000). *Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops*. Postharvest Biol. Tec. 20, 207- 220.
- Liang, Z.; Sang, M.; Fan, P.; Wu, B.; Wang, L.; Yang, S. y Li, S. (2011). *CIELAB coordinates in Response to berry skin anthocyanins and their composition in Vitis germplasm*. J. Food Sci. 76, 490- 497.
- Lim, Y. Y.; Lim, T. T. y Tee J. J. (2007). *Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study*. Food Chem. 103, 1003-1008.
- Liu, R. H. y Felice, D. L. (2007). *Antioxidants and whole food phytochemicals for cancer prevention*. En: *Antioxidants Measurement and Applications*. (Eds. Shahidi, F. y Ho, C. T.). American Chemical Society. Washington, D.C. E.E. U.U. p. 15- 34.
- Lopes da Silva, F.; de Pascual Teresa, S.; Rivas-Gonzalo, J. y Santos-Buelga, C. (2002). *Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection*. Eur. Food. Res. Technol. 214, 248- 253.
- Lopes da Silva, F.; Escribano Bailón, M.; Pérez Alonso, J.; Rivas Gonzalo, J. y Santos Buelga, C. (2007) *Anthocyanin pigments in strawberry*. LWT – Food Sci. Tec. 40, 374– 382.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N.; Farr, L. y Randall, R. (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. 193, 265- 275.
- Lukaski, H. C. (2004). *Vitamin and mineral status: effects on physical performance*. Nutrition. 20, 632- 644.
- Maarit, J. E. y Heinonen, M. (2002). *Anthocyanin Color Behavior and Stability during Storage: Effect of Intermolecular Copigmentation*. J. Agric. Food Chem. 50, 7461- 7466.

- Määttä-Riihinen, K. R.; Kamal-Eldin, A. y Törrönen, A. R. (2004). *Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries of Fragaria and Rubus Species (Family Rosaceae)*. J. Agric. Food. Chem. 52, 6178- 6187.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. y Jiménez, L. (2004) *Polyphenols: food sources and bioavailability*. Am. J. Clin. Nutr. 79, 727- 747.
- Martín-Belloso, O. y Rojas-Graü, M. A. (2005). *Factores que afectan la calidad*. En: *Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados*. (Eds. González-Aguilar, G. A.; Gardea, A. A. y Cuamea-Navarro, F.) Logiprint Digital S. de R. L. de C. V., Guadalajara, Jalisco, México, p. 77- 93.
- Massart, D.L.; Vandeginste, B.; Buiydens, L.; De Jong, S.; Lewi, P. y Smeyers-Verbeke, J. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A*, Elsevier.
- Mattila, P. y Kumpulainen, J. (2002). *Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC with Diode-Array Detection*. J. Agric. Food Chem. 50, 3660- 3667.
- Mazza, G. y Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*. (Ed. CRC). Boca Ratón, E.E. U.U. p. 108- 109.
- Meyers, K., J.; Watkins, C. B.; Pritts, M.P. y Hai Lui, R. (2003). *Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries*. J. Agric. and Food Chem. 51, 6887- 6892.
- Micha, R. y Mozaffarian, D. (2010). *Saturated Fat and Cardiometabolic Risk Factors, Coronary Heart Disease, Stroke, and Diabetes: a Fresh Look at the Evidence*. Lipids, 45, 893- 905.
- Molnár-Perl, I. y Zs, F. (2005). *Review Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids*. J. Agric. Food Chem. 1073, 201– 227.
- Mori, T.; Sakurai, M.; Sakuta, M. (2000). *Changes in PAL, CHS, DAHP synthase (Ds-Co and Ds-Mn) activity during anthocyanin synthesis in suspension culture of Fragaria ananassa*. Plant Cell Tiss. Org. 62, 135- 139.

- Muñoz de la Peña, A.; Espinosa Mansilla, A.; Gonzalez Gómez, D.; Olivieri, A. y Goicochea, H. C. (2003). *Interference-Free Analysis Using Three-Way Fluorescence Data and the Parallel Factor Model*. Anal. Chem. 75, 2640- 2646.
- Murkovic, M. (2003). *Phenolic compounds*. En: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. (Ed. Caballero, B.) Elsevier, p. 4507- 4514.
- Nascimento, M. S.; Silva, N.; Catanozi, M. O. L. M. y Silva, K. C. (2003). *Effects of different disinfection treatments on the natural microbiota of lettuce*. J. Food Protect. 66, 1697- 1700.
- Nieuwenhuijsen, M. J.; Toledano, M. B. y Elliot, P. (2000). *Uptake of chlorination disinfection by-products; a review and a discussion of its implication for exposure assessment in epidemiological studies*. J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol. 10, 586- 599.
- Nováková, L.; Solich, P. y Solichová, D. (2008). *HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids*. Trends Anal. Chem. 27, 942- 958.
- Nuutila, A. M.; Kammiovirta, K.; Oksman-Caldentey, K. M. (2002). *Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis*. Food Chem. 76, 519- 525.
- Odriozola Serrano, I.; Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. (2010) *Changes in bioactive composition of fresh-cut strawberries stored under superatmospheric oxygen, low-oxygen or passive atmospheres*. J. Food Compos. Anal. 23, 37- 43.
- Odriozola-Serrano, I.; Hernández-Jover, T. y Martín Belloso, O. (2007). *Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits*. Food Chem. 105, 1151- 1158.
- Oh, S. W.; Gray, P. M.; Dougherty, R. H. y Kang,-H, D. (2005). *Aerosolization as novel sanitizer delivery system to reduce food-borne pathogens*. Lett. Appl. Microbiol. 41, 56– 60.
- Olivieri, C. y Goicochea H. (2007). *La calibración en Química Analítica*. (Ed. UNL), Santa Fe, Argentina.

- Ölmez, H. y Kretschmar, U. (2009). *Review: Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact*. LWT – Food Sci. Tech. 42, 686- 693.
- Oms-Oliu, G.; Odriozola-Serrano, I.; Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso O. (2008). *The role of peroxidase on the antioxidant potential of fresh-cut 'Piel de Sapo' melon packaged under different modified atmospheres*. Food Chem. 106, 1085- 1092.
- Orsat, V.; Gariépy, Y.; Raghavan, G. S. V. y Lyew, D. (2001). *Radio-frequency treatment for ready-to-eat fresh carrots*. Food Res. Int. 34, 527- 536.
- Otsuka, M.; Kurata, T. y Arakawa, N. (1986). *Antiscorbutic effect of dehydro-L-ascorbic acid in vitamin C-deficient guinea pigs*. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 32, 183- 190.
- Özkan, M.; Yemenicioglu, A. y Cemeroglu, B. (2005). *Degradation of various fruit juice anthocyanins by hydrogen peroxide*. Food Res. Int. 38, 1015- 1021.
- Piagentini, A. M.; Méndez, J. C.; Güemes, D. R. Y Pirovani, M. E. (2005). *Modeling changes of sensory attributes for individual and mixed-cut leafy vegetables*. Postharvest Biol. Technol. 38, 202- 212.
- Pincemail, J.; Kevers, C.; Tabart, J.; Defraigne J.O. y Dommes J. (2012). *Cultivars, culture conditions, and harvest time influence phenolic and ascorbic acid contents and antioxidant capacity of strawberry (Fragaria x ananassa)*. J. Food Sci. 77, 205- 210.
- Pirovani, M. E.; Güemes, D. R. Y Piagentini, A. M. (2006). *Vegetales frescos cortados. Procesamiento y calidad*. Ediciones UNL. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.
- Prior, R. L. Wu, X. y Schaich, K. (2005). *Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Food and Dietary Supplements*. J. Agric. Food Chem. 53, 4290- 4302.
- Ramón, J. (1993). *Radicales libres y antioxidantes en clínica humana*. (Ed. IDEPSA, Internacional de Ediciones y Publicaciones, S. A.), Madrid, España.

- Rearte, A.; Pedrani de Silvestre, M. y Buljan de Manzino, M. (1987). *Técnicas Analíticas en Identidad y calidad de los alimentos frutihortícolas*. En: *Recopilación Técnica*. INTI, CITEF.
- Reyes, L. F.; Villareal, J. E. y Cisneros-Zevallos, L. (2007). *The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue*. Food Chem. 101, 1254- 1262.
- Reyes, L.F. y Cisneros-Zevallos, L. (2003). *Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes*. J. Agric. Food Chem. 51, 5296-5300.
- Reyes, S. (2007). *Efecto de la variedad y del procesamiento sobre la vida útil de frutillas mínimamente procesadas*. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J. y Paganga, G. (1996). *Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids*. Free Radical Bio. Med. 20, 933- 956.
- Robles-Sánchez, M.; Mercado-Ruiz, J.; Cruz.Valenzuela, R. y Rodrigo-García, J. (2009). *Vitaminas y minerales en frutas, y su relación con la nutrición y la salud humana*. En: *Aspectos nutricionales y sensoriales de vegetales frescos cortados*. p. 256- 281.
- Rocha, A. M. C. N.; Brochado, C.M.; Kirby, R. y Morais, A. M. M. B. (1995). *Shelf-life of chilled cut orange determined by sensory quality*. Food Control. 6, 317- 322.
- Rodrigo-García, J.; Álvarez-Parrilla, E.; De la Rosa, L. A.; González-Aguilar, G. A. y Ruiz-Cruz, S. (2009). *Compuestos bioactivos de frutos templados y sus beneficios en la salud*. En: *Aspectos nutricionales y sensoriales de vegetales frescos cortados*. p. 256- 281.
- Romanová, D.; Grančai, D.; Józová, B.; Božek, P. y Vachálková, A.(2000) *Determination of apigenin in rat plasma by high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr. A 870, 463- 467.
- Romojaro, F.; Riquelme, F.; Pretel, T.; Martínez, G.; Serrano, M.; Lozano, P.; Segura, P. y Luna, P. (1996). *Nuevas tecnologías de conservación de frutas y hortalizas: atmósferas modificadas*. Ed. Mundi Prensa, Madrid, España.

- Saccone, K. (2006). *Caracterización de la zona de Coronda como productora de Frutillas*. Subsecretaria de Producción y Medio Ambiente, Municipalidad de Coronda, Santa Fe, Argentina.  
[Http://www.alimentosargentinos.gov.ar/03/frutas/frutas\\_finas/Produccion\\_de\\_frutillas\\_en\\_coronda.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/03/frutas/frutas_finas/Produccion_de_frutillas_en_coronda.pdf)
- Saguy, I. y Karel, M. (1980). *Modeling of quality deterioration during food processing and storage* Food Technol. Chicago. 34, 78- 85.
- Saleem, M; Kim, H. J.; Ali, M. S. y Lee, Y. S. (2005). *An update on bioactive plant lignans*. Natural Prod. Rep. 22, 696- 716.
- Salveit, M. E. (2000). *Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock*. Postharvest Biol. Technol. 21, 61-69.
- Sanchez-Ballesta, M. T.; Zacarias, L.; Granell, A. y Lafuente, M. T. *Accumulation of Pal Transcript and Pal Activity as Affected by Heat-Conditioning and Low-Temperature Storage and Its Relation to Chilling Sensitivity in Mandarin Fruits*. J. Agric. Food Chem. 48, 2726- 2731.
- Sánchez-Mata, M. C.; Cámara-Hurtado, M.; Díez-Marqués, C. y Torija-Isasa, M. E. (2000). *Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (Phaseolus vulgaris L.)*. Eur. Food Res. Technol. 210, 220- 225.
- Sánchez-Moreno, C.; Plaza, L.; de Ancos, B. y Cano. M. P. (2003). *Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices*. J. Sci. Food Agr. 83, 430- 439.
- Sapers, G. M. (2001). *Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products*. Food Technol. Biotech. 39, 305- 311.
- Saura-Calixto, F. (1997). *Dietary fibre complex in a sample rich in condensed tannins and uronic acid*. Food Chem. 23, 95- 106.
- Scalbert, A. y Williamson, G. (2000). *Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols*. J. Nutr. 130, 2073- 2085.

- Sen, C. K.; Khanna, S. y Roy, S. (2006). *Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols*. Life Sci. 78, 2088- 2098.
- Silveira, A.C.; Conesa, A.; Aguayo, E. y Artés, F. (2008). *Alternative sanitizers to chlorine for use on fresh-cut "Galia" (Cucumis melo var. catalupensis) melon*. J. Food Sci. 73, 405-411.
- Singh, R. (1999). *Scientific principles of shelf life evaluation*. En: *Shelf life evaluation of foods*. (Eds. Man, C. M. D. y Jones, A. A.). Aspen Publishers. E. E. U. U.
- Singleton, V. L.; y Rossi, J. A. (1965). *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. Am. J. Enol. Viticult. 16, 144- 158.
- Soliva-Fortuny, R. C. y Martin-Belloso, O. (2003). *New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits*. Trends Food Sci. Tech. 14, 341- 353.
- Steinmetz, K. A. y Potter, J. D. (1996). *Vegetables, fruit and cancer prevention: A review*. Kohlmeir J. of the Am. Dietetic Association. 96, 1027- 1039.
- Suttley® (2008). *Almacenamiento de alimentos. Tratamiento con ácido peracético*. Suttley Química, Argentina.
- Tannenbaum, S. R. (1982). *Vitaminas y Minerales*. En: *Introducción a la Ciencia de los Alimentos*. (Ed. O. Fennema). Editorial Reverté, Barcelona, España.
- Taoukis, P.; Labuza, T. P. y Saguy, I. (1997). *New advances in extending the shelf-life prediction*. En: *The Handbook of Food Engineering Practice*. (Eds. Valentas, K. J.; Rotstein, E. y Singh, P.) CRC. Press, Boca Ratón, Florida. p. 361- 403.
- Tarola, A. M.; Van de Velde, F.; Salvagni, L. y Preti, R. (2012). *Determination of Phenolic Compounds in Strawberries (Fragaria ananassa Duch) by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection*. Food Anal. Methods. DOI 10.1007/s12161-012-9431-5.
- Terefe, N. S.; Matthies, K.; Simons, L. y Versteeg, C. (2009). *Combined high pressure-mild temperature processing for optimal retention of physical and nutritional quality of strawberries (Fragaria×ananassa)*. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 10, 297–307.

- Tomás-Barberán, F. A. y Espín, J. C. (2001). *Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables*. J. Sci. Food Agric. 81, 853- 876.
- Tovar, B.; García, H. S.; Mata, M. (2001). *Physiology of pre-cut mango. II. Evolution of organic acids*. Food Res. Int. 34, 705- 714.
- Tulipani, S.; Mezzetti, B.; Capocasa, F.; Bompadre, S.; Beekwilder, J.; De Vos, C. H. R.; Capanoglu, E.; Bovy, A. y Battino, M. (2008). *Antioxidants, Phenolic Compounds, and Nutritional Quality of Different Strawberry Genotypes*. J. Agric. Food Chem. 56, 696-704.
- USDA (2012). *National Nutrient Database for Standard Reference Release 24*. <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>.
- Vandekinderen I.; Devlieghere, F.; De Meulenaer, B.; Ragaert, P. y Van Camp., J. (2009). *Optimization and evaluation of a decontamination step with peroxyacetic acid for fresh-cut produce*. Food Microbiol. 26, 882- 888.
- Vandekinderen, I.; Van Camp, J.; Devlieghere, F.; Veramme, K.; Denon, Q.; Ragaert, P. y De Meulenaer, B. (2008). *Effect of decontamination agents on the microbial population, sensorial quality, and nutrient content of grated carrots (Daucus carota L.)*. J. Agric. Food Chem. 56, 5723- 5731.
- 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.
- Vicente, A. R.; Costa, M. L., Martínez G. A.; Chaves, A. L. y Civello, P. M. (2005). *Effect of heat treatments on cell wall degradation and softening in strawberry fruit*. Postharvest Biol. Techol. 38, 213- 222.
- Wang, G.; Michailides, T. J. y Bostock, R. M. (1996). *Improved detection of polygalacturonase activity due to Mucor piriformis with a modified dinitrosalicylic acid reagent*. Phytopathology. 87, 161- 163.
- White, P. J. (2002). *Recent advances in fruit development and ripening: an overview*. J. Exp. Bot. 53, 1995- 2000.

- Wiley, R. C. (1997). *Métodos de conservación de las frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas*. En: *Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas*. Ed. Acribia S. A., Zaragoza, España, p. 65- 124.
- Williner, M. R.; Pirovani, M. E. y Güemes, D. R. (2003). *Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages*. J. Sci. Food Agric. 83, 842- 845.
- Wright, K. P. y Kader, A. A. (1997). *Effect of slicing and controlled-atmosphere storage on the ascorbate content and quality of strawberries and persimmons*. Postharvest Biol. Technol. 10, 39- 48.
- Yildiz, F. (1994). *Initial preparation, handling, and distribution of minimally processed refrigerated fruits and vegetables*. En: *Minimally, processed refrigerated fruits and vegetables*. (Ed. Wiley R. C.). Chapman and Hall, New York, E. E. U. U. p. 15- 65.
- Zadernowski, R.; Czaplicki, S. y Naczek, M. (2009). *Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (Garcinia mangostana)*. Food Chem. 112, 685- 689.
- Zheng, Y.; Wang, S.; Wang, C. y Zheng, W. (2007). *Changes in strawberry phenolics, anthocyanins and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments*. LWT-Food Sci. Technol. 40, 49- 57.