

RESUMEN

En este estudio se evaluó, el efecto de distintos sanitizantes en brotes de alfalfa almacenados y refrigerados a 5 °C, utilizando hipoclorito de sodio en una concentración de 100 mg L⁻¹ (HS 100) como control. En un primer ensayo se utilizó peróxido de hidrógeno (25 y 50 mg L⁻¹; PH 25 y PH 50), ácido láctico (8,5 y 17 mg L⁻¹; AL 8,5 y AL 17) y ácido cítrico (5000 y 10000 mg L⁻¹; AC 5000 y AC 10000). Posteriormente los brotes se almacenaron bajo atmósfera modificada con valores de 6,7 - 13,7% de O₂ y 1,9 - 3,5% de CO₂ durante 12 días a 5 °C.

Para el segundo ensayo se escogieron las concentraciones de los sanitizantes más efectivas para controlar el crecimiento microbiano, sin alterar la calidad sensorial. De esta forma se seleccionaron el peróxido de hidrógeno, ácido láctico y ácido cítrico (50, 17 y 5000 y 10000 mg L⁻¹, respectivamente). Los productos tratados con estos sanitizantes fueron almacenados durante 7 días y refrigerados a 5 °C.

Los tratamientos con AL (8,5 y 17 mg L⁻¹) fueron efectivos en reducir la carga microbiana de los brotes hasta el quinto día de almacenamiento, posteriormente los recuentos aumentaron sin diferencias entre tratamientos. La apariencia, sabores extraños, color y turgencia de los brotes de alfalfa se afectó por los tratamientos con PH (25 y 50 mg L⁻¹) y con AL (8,5 y 17 mg L⁻¹). Por el contrario, con AC (5000 y 10000 mg L⁻¹) y el tratamiento control (HS 100) fueron evaluados positivamente por los jueces en el análisis de calidad sensorial. En el ensayo II, a pesar de la alta carga microbiana inicial, el tratamiento AL 17 fue efectivo en cuanto a la reducción microbiológica de los brotes de alfalfa, logrando una reducción de 3,0 log ufc g⁻¹ de microorganismos psicrófilos; sin embargo, éste fue evaluado negativamente por el panel sensorial, cuya apariencia el primer día de evaluación fue calificada como “deficiente”. A diferencia de los tratamientos AC 5000 y AC 10000, los cuales a pesar de ser efectivos para mantener la calidad sensorial, no fueron capaces de reducir las poblaciones microbianas de los brotes de alfalfa.

PH 50, AL 17, AC (5000 y 10000) y el tratamiento control, disminuyeron el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante en el tiempo, sin mayores diferencias entre tratamientos; sin embargo, el tratamiento control HS 100 fue el menos afectado en cuanto a la disminución del contenido de fenoles total (0,2 mg EAG, Equivalentes de Ácido Gálico, g⁻¹ de peso fresco), pero se observó una disminución significativa de la actividad antioxidante (0,9 mg ET, Equivalentes de Trolox, g⁻¹ de peso fresco) desde el inicio, hasta el final de la conservación a 5 °C.

Palabras claves: mínimo proceso, vida útil, calidad sensorial, hortalizas.

ABSTRACT

In this research, the effects of different sanitizers on alfalfa sprouts stored at 5 °C were evaluated, using sodium hypochlorite at 100 mg L⁻¹ (HS 100) as control. The first assay was comprised of the application of hydrogen peroxide (25 and 50 mg L⁻¹; PH 25 and PH 50), lactic acid (8,5 and 17 mg L⁻¹; AL 8,5 and AL 17) and citric (5000 y 10000 mg L⁻¹; AC 5000 and AC 10000). After that, the sprouts were stored under modified atmosphere with values of 6,7 – 13,7% of O₂ and 1,9 – 3,5% of CO₂ during 12 days at 5 °C.

For the second assay, the concentrations of the most effective treatments regarding to microbiological growth without affecting sensory attributes in alfalfa sprouts were chosen, where hydrogen peroxide, lactic acid and citric acid (50, 17 and 5000 and 10000 mg L⁻¹, respectively) were selected. The product treated with these sanitizers were stored at 5 °C for 7 days.

Treatments with AL (8,5 and 17 mg L⁻¹) were effective in reducing the microbial load of the sprouts up to the fifth day of storage, subsequently the counts increased without differences between treatments. Treatments with PH (25 and 50 mg L⁻¹) and lactic acid (8,5 and 17 mg L⁻¹) affected appearance, presence of off flavors, color and turgor on the alfalfa sprouts. On the other hand, with AC (5000 and 10000 mg L⁻¹) and the control (HS 100) treatment were evaluated positively in the sensory quality analysis by judges. In Assay II, in spite of the high initial microbial load, AL 17 treatment was effective in the microbiological reduction of alfalfa sprouts achieving 3,0 log cfu g⁻¹ reductions of psychrophilic microorganisms, nevertheless it was evaluated negatively by the sensory panel, due to the appearance on the first day of evaluation was graded as "deficient". Eventhough the treatments AC (5000 and 10000) were effective to preserve the sensory quality, they were not able to reduce the microbial populations of alfalfa sprouts.

PH 50, AL 17, AC (5000 and 10000) and control treatment, decreased the content of total phenols and antioxidant activity along the shelf life, without significantly statistical differences among them, nevertheless the HS 100 control treatment was less affected in decreasing the total phenols content (0,2 mg GAE, Gallic Acid Equivalent, g⁻¹ of fresh weight), on the contrary a significantly decrease of antioxidant activity (0,9 mg ET, Trolox Equivalent, g⁻¹ of fresh weight) was observed from the beginning, to the end of the shelf life period at 5 °C.

Key words: fresh cut, shelf-life, sensory quality, vegetables.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una preocupación mundial por un estilo de vida más saludable aumentando la demanda de alimentos frescos y prácticos, libres de aditivos, y con un alto valor nutricional, para ser consumidos tanto en el hogar como en servicios de alimentación (Wiley, 1994; Artés *et al.*, 2009). Con el fin de satisfacer estas necesidades surgen los productos mínimamente procesados en fresco (MPF), que consisten en frutas y hortalizas preparadas mediante una única o varias operaciones unitarias apropiadas tales como lavado, pelado, cortado, entre otras; asociadas a un parcial tratamiento de conservación (Wiley, 1997), con una vida útil de al menos 5 días en refrigeración, que garantice la seguridad alimentaria y mantenga su calidad nutricional, funcional y sensorial (Wiley, 1994). Así, los productos MPF otorgan un valor agregado a las frutas y hortalizas en términos de conveniencia y ahorro de tiempo. Sin embargo, las operaciones requeridas para preparar estos productos tienen como resultado un aumento en la tasa respiratoria y transpiración, aumento de la actividad enzimática y proliferación microbiana (Nguyen-the y Carlin, 1994).

Una forma de combatir el deterioro sufrido por los productos MPF durante su elaboración es el envasado en atmósferas modificadas (EAM) en condiciones de bajas temperaturas de almacenamiento (Shah y Nath, 2006). El EAM de productos frescos se basa en la modificación de la atmósfera al interior del envase, logrado por la interacción natural entre dos procesos, la respiración del producto y la transferencia de gases a través del envase que conduce a una atmósfera más rica en CO₂ y pobre en O₂ en relación al aire. Esta atmósfera puede reducir potencialmente la tasa respiratoria, la sensibilidad y producción de etileno, las podredumbres y los cambios fisiológicos referidos a procesos oxidativos (Kader *et al.*, 1989, citado por Oliveira *et al.*, 2007). Además, la alta humedad generada al interior del EAM previene la pérdida excesiva de agua por parte del producto, aunque crea condiciones favorables para el crecimiento microbiano, especialmente cuando hay fluctuaciones de temperatura (Hertog, 2003), afectando de forma adversa tanto la calidad sensorial como la seguridad del producto (Wiley, 1997). En el caso de las hortalizas, las condiciones de baja acidez y alta humedad, junto con una gran superficie expuesta tras el corte pueden proporcionar las condiciones ideales para el crecimiento microbiano. No obstante, la contaminación microbiana de los productos MPF también puede provenir de numerosas fuentes, desde la manipulación post cosecha hasta el procesamiento (Ahvenainen, 1996).

Con el fin de disminuir la carga microbiana inicial de los productos frescos, éstos se someten a un lavado después de la cosecha por medio de sistemas de transporte por cinta, tanques o aspersores de agua, lo que permite remover restos de tierra y desechos, mejorar la apariencia del producto, bajar la temperatura y limitar el desarrollo de cambios fisiológicos, lo cual tiene un impacto sobre la calidad, la vida útil y la seguridad del producto (Fan *et al.*, 2009). La eficiencia de los tratamientos de lavado parece estar relacionada con las características de la superficie del vegetal y la susceptibilidad microbiana de cada especie (Velázquez *et al.*, 2009). Un aumento en la turbulencia del agua de lavado es de suma importancia para lograr un adecuado contacto del agua con la superficie del producto y así

eliminar desechos y algunos microorganismos (Longley, 1978). Los chorros de agua, flujos de agua por gravedad y burbujas de aire o de inyección, han sido utilizados por la industria de MPF como medios para aumentar la turbulencia durante el proceso de lavado (Fan *et al.*, 2009).

Durante el proceso de germinación algunos compuestos complejos como los lípidos, los hidratos de carbono y las proteínas de reserva se descomponen en nutrientes simples y de fácil digestión, lo que junto con el valor nutricional hace que los brotes puedan ser una buena fuente de alimento para los patógenos y microorganismos alterantes de los alimentos (Waje *et al.*, 2009). Así, los microorganismos patógenos pueden exceder de $1 \cdot 10^7$ microorganismos por gramo de semillas germinadas durante su producción, sin afectar negativamente la apariencia del producto. Por lo tanto, los enfoques técnicos para garantizar la seguridad podrán exigir varias medidas para eliminar a los patógenos de las semillas, tanto antes de que brote como durante el proceso de germinación (Taormina y Beuchat, 1999). No obstante, aunque la mayoría de las enfermedades infecciosas se encuentran ligadas a los brotes de alfalfa, también otros tipos de brotes de semillas se vinculan a diversas enfermedades como la Salmonelosis y las enfermedades gastrointestinales (Taormina *et al.*, 1999).

Por otro lado, poco se sabe acerca del crecimiento microbiano que ocurre desde la germinación de la semilla hasta la cosecha de los brotes y de las diferentes asociaciones microbianas presentes en el hipocotilo, hojas y raíces. Algunos microorganismos como *Pseudomonas* y *Enterobacterias* han sido considerados como los principales agentes microbianos en brotes hortícolas (Becker y Holzapfel, 1997). Es por esto que además del lavado, la utilización de desinfectantes superficiales, como cloro y ozono se han aplicado en la industria para reducir la carga microbiana y extender la vida útil de los productos MPF. El cloro ha sido el desinfectante más usado en las prácticas agrícolas (Beuchat, 1998). Sin embargo, existe una tendencia a eliminar su uso debido a la formación de compuestos cancerígenos halogenados derivados de la desinfección del producto (Ölmez y Kretzschmar, 2009).

Actualmente, los ácidos orgánicos se han considerado como una alternativa de sanitización debido a sus efectos inhibitorios basados en su actividad antimicrobiana. Los ácidos orgánicos, principalmente los ácidos cítrico, láctico y acético, han sido en general reconocidos como seguros. Su efecto antimicrobiano se debe principalmente a la reducción del pH del medio y a los cambios provocados por las características de cada uno de los ácidos (Mastromatteo *et al.*, 2009), lo que a su vez afecta el transporte de nutrientes, dañan la membrana citoplasmática, alteran la permeabilidad de la membrana externa de la célula e influyen en la síntesis de macromoléculas (Ricke, 2003). Algunos estudios revelan que los ácidos acético, cítrico y láctico reducen efectivamente poblaciones de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* (Ryu *et al.*, 1999; Jung y Beuchat, 2000; Harris *et al.*, 2006).

Por otro lado, la eficiencia del lavado con peróxido de hidrógeno, ha demostrado extender la vida útil de los productos MPF y reducir las poblaciones microbianas nativas y patógenas (Artés *et al.*, 2007 citado por Artés *et al.*, 2009). Se ha investigado que el uso de peróxido de hidrógeno en concentraciones de 25 mg L^{-1} a 50 mg L^{-1} redujo las poblaciones de *Salmonella* en melón Cantaloupe entero y MPF (Ukuku y Sapers, 2001; Ukuku, 2004). Este

sanitizante es considerado como amigable con el ambiente debido a que está compuesto por agua y oxígeno, los cuales son los únicos productos involucrados en el proceso de sanitización (Koivunen y Heinone-Tanski. 2005).

Otro de los beneficios del EAM es la de preservar la calidad nutricional y sensorial de los productos. Las frutas y hortalizas son fuente de nutrientes y de otros compuestos que protegen al organismo, como es el caso de los nutraceuticos ó fitoquímicos. Estos compuestos son el resultado del metabolismo secundario y entre ellos se encuentran los ácidos fenólicos, flavonoides o polifenoles, reconocidos como potentes antioxidantes en las células animales (Zabaleta *et al.*, 2005). Estos metabolitos son esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y sirven de protección ante la presencia de patógenos, siendo secretados como mecanismos de defensa (Butler, 1992). Los compuestos fenólicos o polifenoles intervienen como antioxidantes naturales de los alimentos, por lo que la obtención y preparación de alimentos con un alto contenido de estos compuestos se asocia con un rol protector contra enfermedades de tipo cardiovasculares y cancerígenas, así como también en procesos de envejecimiento en seres humanos (Tsimidou, 1998). En los brotes de semillas, los niveles de algunos factores antinutricionales disminuyen o hasta desaparecen durante el proceso de germinación, mientras que algunos compuestos con capacidad antioxidante aumentan, fenómeno que también contribuye a mejorar la calidad nutricional de los brotes comparados con sus semillas (Peñas *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que las heridas generadas en los tejidos vegetales durante el procesamiento aumentan el contenido de fenoles en hortalizas MPF (Reyes y Cisneros- Zevallos, 2003).

Por tanto, siguen siendo necesarias las investigaciones relacionadas con hortalizas mínimamente procesadas para la obtención de productos microbiológicamente seguros, de alto valor nutricional y calidad sensorial (Martín-Belloso y Fortuny, 2003).

Objetivo general

✓ Evaluar el efecto de tratamientos sanitizantes en atmósferas modificadas para reducir la carga microbiana y mantener las características funcionales de brotes de alfalfa durante el almacenamiento refrigerado.

Objetivos específicos

✓ Evaluar el efecto de distintas soluciones de sanitizantes sobre la carga microbiana durante el almacenamiento de brotes de alfalfa.

✓ Evaluar el efecto de distintas soluciones sanitizantes sobre la capacidad antioxidante y fenoles totales durante el almacenamiento de brotes de alfalfa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

Los ensayos de este estudio se realizaron en el Centro de Estudios Postcosecha (CEPOC) y en el laboratorio de microbiología del Departamento de Agroindustria y Enología, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, bajo el financiamiento del proyecto titulado “Technology Innovations Applied to Novel Fresh-cut Leaf Vegetables: Quality and Food Safety” (N°1090059, FONDECYT-CONICYT, Chile).

Materiales

Material vegetal

En este estudio se utilizaron brotes de alfalfa provistos por la empresa “Más Vida S.A.” (Lonquén, Calera de Tango, Región Metropolitana), cultivados hidropónicamente en cámaras climatizadas entre 20 y 22 °C, con humedad relativa del 90%. Los brotes fueron cosechados tras 7 días posteriores a su cultivo.

Metodología

Se realizaron dos ensayos, el primero con brotes cosechados en septiembre, mientras que en el segundo con brotes cosechados en octubre. Se evaluaron las concentraciones (Cuadros 1 y 2) que mejor respondieron en cuanto a la calidad microbiológica, evaluación sensorial y compuestos funcionales de los brotes de alfalfa.

Procesamiento

Los brotes de alfalfa se trasladaron desde el huerto en bolsas de plástico de 5 kg en frío en un recipiente aislado (Thermos Brand L.L.C., Illinois, EE.UU.) hasta el laboratorio del CEPOC, donde se almacenaron en una cámara frigorífica a 5 °C durante 1 día.

Desde las cámaras de almacenamiento, los brotes se llevaron a la sala de manipulación, limpia y acondicionada a 8 °C, en donde se lavaron en recipientes de acero inoxidable con agua potable para retirar cualquier material extraño. Posteriormente, los brotes se trataron por inmersión durante 3 min con hipoclorito de sodio (NaClO) (Clorox, California, EE.UU.); peróxido de hidrógeno (H₂O₂, Winkler Ltda, Lampa, Santiago, Chile); ácido láctico (C₃H₆O₃, SAFC, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, EE.UU.) y ácido cítrico (C₆H₈O₇, Granotec, RZBC Imp&Exp Co. Ltda, Santiago, Chile) (Cuadros 1 y 2). Al finalizar cada tratamiento, los brotes se escurrieron sobre una malla de acero inoxidable durante 5 min y el excedente de agua se retiró mediante una centrifuga manual. A continuación unos 60 g de producto se envasaron en bolsas plásticas PD-961 EZ de 20 × 21 cm con transmisión de O₂ y CO₂ de 7000 y 21000 mL m⁻² día⁻¹ (23 °C y 1 atm), respectivamente. Las que se sellaron por calor con una selladora manual (Impulse Sealer Tew Equipment Co., Taiwan) y finalmente se almacenaron a 5 °C durante al menos 7 días (Figura 1).

Cuadro 1. Tipo y concentración de sanitizantes empleados en brotes de alfalfa (ensayo I).

Tratamiento	Solución sanitizante	Concentración (mg L ⁻¹)	pH*	
			Inicial	Final
HS 100	Hipoclorito de sodio	100	6,53	6,21
PH 25	Peróxido de hidrógeno	25	6,97	6,80
PH 50	Peróxido de hidrógeno	50	6,79	6,67
AL 8,5	Ácido láctico	8,5	2,34	2,54
AL 17	Ácido láctico	17	2,16	2,34
AC 5000	Ácido cítrico	5000	2,49	2,61
AC 10000	Ácido cítrico	10000	2,32	2,43

*Corresponde al pH de la solución sanitizante antes y después del lavado de los brotes.

Se determinó el pH del agua de las soluciones sanitizantes previo a tratar los brotes y después de tratarlos con las soluciones sanitizantes en ambos ensayos, mediante un pHmetro (Hanna Instruments, pH 21, Woonsocket, Rhode Island, EE.UU.).

La calidad del agua se determinó midiendo el pH, conductividad eléctrica (CE) y Cl libre (pH = 7,7; CE = -65 mV; Cl libre = 0).

El hipoclorito de sodio fue acidificado con ácido cítrico 0,5 N (30,74 g L⁻¹).

Cuadro 2. Tipo y concentración de sanitizantes empleados en brotes de alfalfa (ensayo II)

Tratamiento	Solución sanitizante	Concentración (mg L ⁻¹)	pH*	
			Inicial	Final
HS 100	Hipoclorito de sodio	100	7,21	6,84
PH 50	Peróxido de hidrógeno	50	6,39	6,36
AL 17	Ácido láctico	17	2,31	2,35
AC 5000	Ácido cítrico	5000	2,67	2,61
AC 10000	Ácido cítrico	10000	2,37	2,48

*Corresponde al pH de la solución sanitizante antes y después del lavado de los brotes.

Parámetros evaluados

Tasa respiratoria: Se determinó mediante un método estático a 5 °C, para lo cual se colocaron 60 g de brotes en recipientes herméticos de vidrio de 1 L. Las tapas de los frascos estaban provistas de un septum de silicona, a través del cual se tomaron muestras gaseosas de 10 mL del espacio de cabeza, con una jeringa de plástico (Nitro, Argentina) después de 1,5 h del cierre. Posteriormente, las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases (CG) HP 5890 serie II (Hewlett Packard, Co., Rockville, MD, EE.UU.) equipado con un detector de conductividad térmica (DCT) y una columna HayeSep Q de 2,4 m × 3 mm (Norwalk, Connecticut, EE.UU.) (Figura 2). La temperatura del inyector y del horno fue de 50 °C y 200 °C respectivamente. Se utilizó helio como gas portador a 50 psi. El cromatógrafo de gases fue calibrado cada día previo a las mediciones con un estándar de 10% de CO₂ como patrón (Indura, Santiago-Chile). La tasa respiratoria se expresó como mg CO₂ kg⁻¹h⁻¹. Se realizaron mediciones por triplicado los días 0 (tras procesamiento), 1, 5, 8 y 12.



Figura 2. Medición de la tasa respiratoria mediante cromatógrafo de gases a 5 °C.

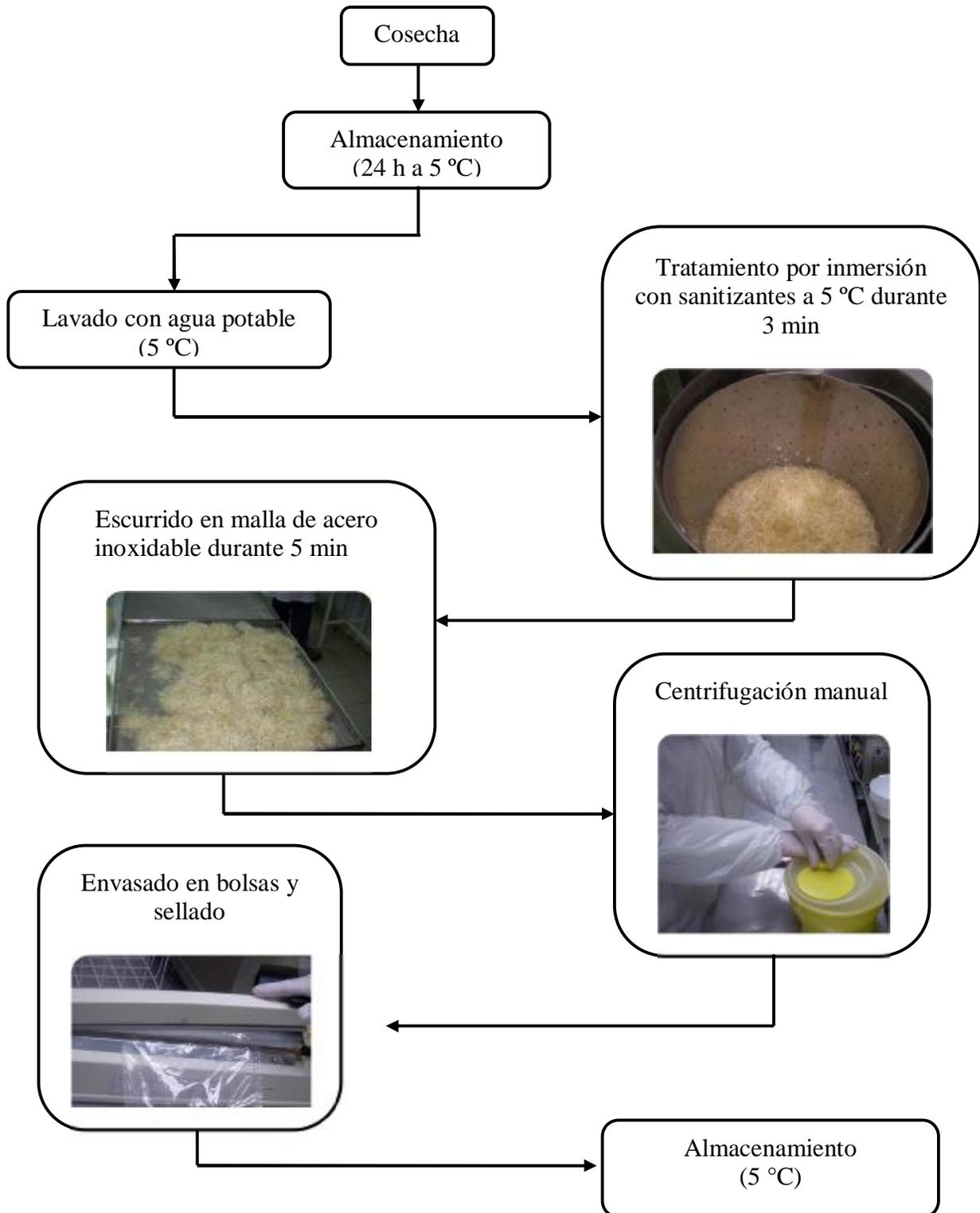


Figura 1. Diagrama de flujo del procesamiento de brotes de alfalfa tratados con diferentes soluciones sanitizantes, envasados en AM y almacenados a 5 °C.

Atmósfera modificada: La evolución de la concentración de gases de CO₂ y O₂ al interior de las bolsas de los brotes de alfalfa se determinó por medio de un analizador de gases manual (PBI Dansensor, Checkpoint, Ringsted, Dinamarca) y se expresó como porcentaje de CO₂ y O₂. Las muestras gaseosas se tomaron pinchando directamente las bolsas con brotes selladas, tal como se muestra en la Figura 3.

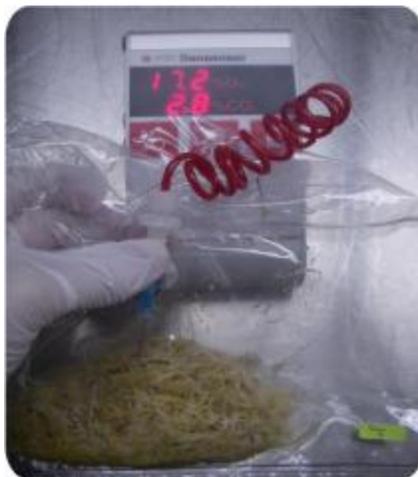


Figura 3. Medición de la concentración interna de CO₂ y O₂ de las bolsas de plástico por medio del analizador de gases manual.

Análisis microbiológico: La calidad microbiológica se evaluó de acuerdo con la legislación chilena en la sección para frutas y otros vegetales comestibles pre-elaborados listos para el consumo (Ministerio de Salud, 1997) (Anexo I), para lo cual se tomó una muestra compuesta de 10 g por bolsa de cada tratamiento, y se mezcló con 90 mL de agua peptonada estéril en un homogenizador (Homogenizador Classic, IUL S.A., Barcelona, España) durante 1 min. Las condiciones de incubación se presentan en el Cuadro 3. Los recuentos microbiológicos se expresaron como el logaritmo de unidades formadoras de colonias por g de brotes de alfalfa (log ufc g⁻¹).

Cuadro 3. Tipo de microorganismos y condiciones de incubación

Cultivos	Temperatura (° C)	Tiempo (días)	Medio de cultivo
Aeróbios mesófilos	37	2	Agar para Conteo en Placas
Enterobacterias	37	2	Agar Eosina Azul de Metileno
Bacterias psicrófilas	7	7	Agar para Conteo en Placas
Hongos y levaduras*	22	2/5	Agar Papa y Dextrosa
Bacterias lácticas**	37	3	Agar Man, Ragosa y Sharpe

*Medio acidificado con ácido láctico para llevar su pH a 3,5.

**Evaluado solo en ensayo II.

Determinaciones físicas

Color: Los brotes se colocaron sobre una placa petri y se midió el color en el filamento de estos por medio de un colorímetro compacto triestímulo (CR-300, Kónica Minolta Chroma meter, Ramsey, New Jersey, EE.UU) con fuente iluminante D65 y un ángulo observador de 0° (Figura 4). Previo a las mediciones, el colorímetro se calibró con un estándar blanco, usando el sistema CIELab. Los valores de los parámetros se expresaron como luminosidad (L), croma (C*) y tono (H_{ab}).



Figura 4. Medición del color de brotes de alfalfa con colorímetro compacto triestímulo.

Además, para evaluar los cambios de color de los brotes de alfalfa durante su almacenamiento se elaboró una escala de color de 5 puntos, donde 5 corresponde a blanco; 4 a blanco opaco; 3 a amarillo claro; 2 a amarillo y 1 a amarillo pardo. El límite de aceptación fue el valor 3, mientras que valores de 1 y 2 fueron considerados inaceptables (Figura 5).



Figura 5. Escala de color de los brotes de alfalfa.

Determinaciones químicas

Se evaluó el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante total al inicio (tras el tratamiento) y a los 7 días del ensayo II, para lo cual se tomaron 25 g de brotes de alfalfa de cada bolsa por tratamiento y se congelaron a -80 °C hasta el día de su análisis.

Contenido de fenoles totales: El contenido de fenoles totales se evaluó de acuerdo con el método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965; Siriphanich y Kader, 1985) con algunas modificaciones. Para la extracción de los compuestos fenólicos se tomaron 2 g de las muestras congeladas de cada tratamiento y se homogenizaron manualmente en un mortero con 8 mL de metanol: agua (4:1) durante 3 min aproximadamente. Seguidamente, la mezcla se filtró a través de 4 capas de gasa y se centrifugó (Hermle Labortechnik, Z326K, Alemania) a 4 °C durante 45 min a 10000 g_N. Posteriormente, el sobrenadante se filtró con papel Whatman n°2 (Schleicher y Schuell, Reino Unido), del cual se tomó una alícuota de 0,5 mL y se mezcló con 5 mL del reactivo A (tartrato de sodio potasio y carbonato de sodio) y se mantuvo a 25 °C durante 15 min. Transcurrido este tiempo se agregó 1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y se incubó entre 15-20 °C durante 60 min. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 660 nm con un espectrofotómetro visible (T 70 UV-Vis PG Instruments Ltd, Leicester, Reino Unido) en comparación con un blanco metanol:agua 4:1 (v/v). El contenido de fenoles totales se calculó por medio de una curva de calibración realizada en base a una solución madre de ácido gálico 0,06 M, con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9975$. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico (EAG) g⁻¹ de peso fresco.

Actividad antioxidante total: La actividad antioxidante total se midió por medio del método FRAP (ferric reducing antioxidant power) descrito por Benzie y Strain (1996) con ciertas modificaciones, para lo cual se pesaron 2 g de brotes de alfalfa de cada bolsa por tratamiento y se molieron en mortero con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino, al que se le agregó 8 mL de etanol:agua (4:1). Esta mezcla se centrifugó (Hermle Labortechnik, Z326K, Alemania) a 4 °C durante 45 min a 10000 g_N y el sobrenadante se filtró con papel Whatman n°2 (Schleicher and Schuell, Reino Unido). Posteriormente, se tomó una alícuota de 100 µL del extracto, a los que se le añadió 900 µL del reactivo FRAP y se incubó durante 30 min entre 15-20 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió la absorbancia de las muestras a 593 nm cada 30 seg durante 6 min en el espectrofotómetro descrito anteriormente. La actividad antioxidante total fue calculada por medio de una curva de calibración realizada en base a una solución madre de Trolox 0,05 M, con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9868$, lo que permitió expresar los resultados como mg de trolox (ET) g⁻¹ de peso fresco.

Determinación de la calidad sensorial

La calidad sensorial de los brotes se analizó por medio del método descriptivo-cuantitativo (Araya 2006), aplicado a un panel de 12 jueces semientrenados, usando una pauta no estructurada de 0 a 15 cm, para evaluar los aspectos visual (apariencia y color) y gustativo (sabores extraños y turgencia) de una muestra compuesta de tres repeticiones de cada tratamiento. La pauta de evaluación se presenta en el Anexo I,

Análisis estadístico

En el ensayo I se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado independiente con estructura factorial 2 x 3, con tres repeticiones por tratamiento; el primer factor fue la concentración, y el segundo factor fue el sanitizante (PH, AL y AC); más un tratamiento control (HS 100).

Para poder comparar el efecto de los tratamientos sólo contra el tratamiento control se utilizó la prueba de Dunnet.

Por otro lado, en el ensayo II se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado, con 5 tratamientos con 3 repeticiones cada uno, de las concentraciones que mejor respondieron en cuanto a la calidad microbiológica y evaluación sensorial de los brotes de alfalfa del ensayo I.

Para ambos ensayos, la unidad experimental correspondió a una bolsa con 60 g de brotes de alfalfa.

Los datos obtenidos de los ensayos se evaluaron previamente mediante análisis exploratorios por una prueba de normalidad para hallar datos anómalos y evaluar la normalidad de las muestras y, realizar un análisis de varianza (ANDEVA) al 5% de significancia. En el caso de encontrar diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, se aplicó el test de comparaciones múltiples de TUKEY a $P < 0,05$. Estos análisis se ejecutaron en el programa JMP V.8 (SAS Institute Inc. Cary, NC, EE.UU).

Los resultados de los análisis sensoriales se evaluaron con un análisis por componentes principales.

Las correlaciones del análisis sensorial por componentes principales se clasificaron de acuerdo a lo propuesto por Fan *et al.*, (2010); en donde, $r^2 = 0-0,3$ es considerado débil; $r^2 = 0,31-0,7$ es considerado moderada y $r^2 = 0,71-1,0$ es considerado alta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ENSAYO I

Tasa respiratoria:

Una de las consecuencias más importantes del estrés que sufren frutas y hortalizas durante el procesamiento, es el aumento de la tasa respiratoria (Cantwell, 1996). En el día 0 del experimento, los tratamientos presentaron tasas respiratorias en un rango de 69,4 - 81,8 mg CO₂ kg⁻¹ h⁻¹, sin presentar diferencias significativas entre ellos, como tampoco con el tratamiento control. El día 1 no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, si las hubo al comparar los tratamientos con el control, donde se observó que AC 5000 y AC 10000 presentaron tasas respiratorias mayores (86,0 y 86,1 mg CO₂ kg⁻¹ h⁻¹ respectivamente) respecto del control (53,8 mg CO₂ kg⁻¹ h⁻¹) (Figura 6). El día 5 los tratamientos AL 17 y AC 10000 presentaron una tasa de respiración significativamente menor (29,1 y 34,2 mg CO₂ kg⁻¹ h⁻¹, respectivamente) con respecto de PH 50 que alcanzó un valor de 48,9 mg CO₂ kg⁻¹ h⁻¹ (Cuadro 1, Apéndice I), a partir de este día se logra un equilibrio de la tasa respiratoria hasta el término del almacenamiento a 5 ° C. El día 8 y 12 no se presentaron diferencias entre tratamientos como tampoco hubo diferencias significativas al comparar los tratamientos con el control (Cuadro 2, Apéndice I).

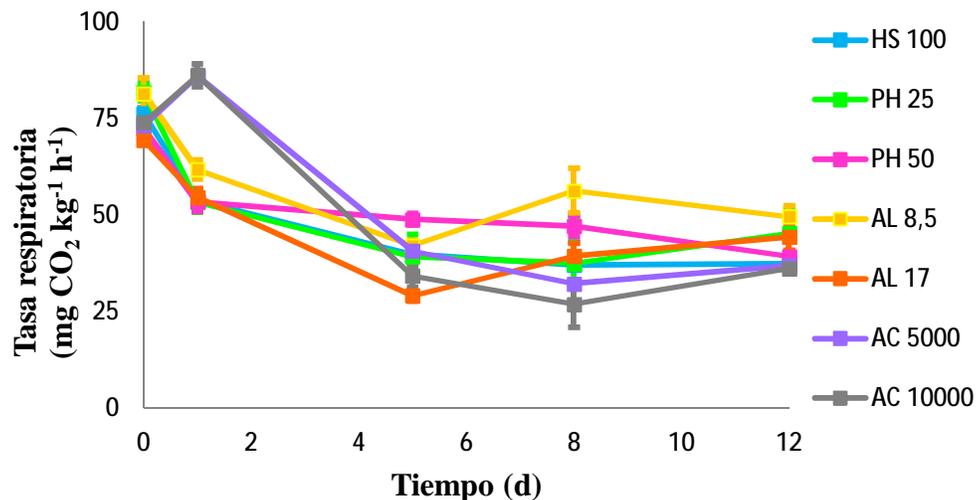


Figura 6. Evolución de la tasa respiratoria de los brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 12 días. Los valores corresponden a la media (n=3) ± error estándar.

En estudios anteriores se observó que el uso de NaClO (20 y 200 mg L⁻¹) no tuvo un efecto significativo en la tasa respiratoria de repollo MPF almacenado a 7 °C durante 2 días (Vanderinderen *et al.*, 2008a). Por otra parte, Kim *et al.* (2007) evaluaron la tasa respiratoria de cilantro MPF almacenado a 5 °C durante 14 días, donde se observó un rápido aumento de la tasa respiratoria luego del procesamiento (día cero), la cual alcanzó su punto máximo después de 12 horas.

Atmósfera modificada

En general, todos los tratamientos tuvieron una tendencia a disminuir la concentración de O₂ de la atmósfera interna de las bolsas, y a un aumento en la concentración de CO₂ a lo largo de la conservación refrigerada de los brotes de alfalfa a 5 °C.

La atmósfera de equilibrio para el CO₂ se logró a partir del día 5, sin embargo el O₂ no logró la atmósfera de equilibrio, ya que el día 8 los tratamientos con AC (5000 y 10000) aumentan su concentración para posteriormente disminuir el día 12 (Figura 7).

En relación al O₂, se presentó una interacción significativa entre los factores el primer día de análisis (día 1) (Cuadro 3, Apéndice I). El tratamiento AC 5000 obtuvo una concentración significativamente inferior de O₂ (14,8%) en comparación con AL 8,5 (17,4%), AL 17 (17,4%) y PH 25 (17,8%). Posteriormente no se observaron diferencias significativas a lo largo de la conservación a 5 °C (Figura 7).

Con respecto a la concentración de CO₂ se observó que en el día 5, AL 17 alcanzó 1,8% de CO₂, en cambio el resto de los tratamientos tuvieron valores entre un 2,3 a 2,8% (Cuadro 4, Apéndice I). El día 8 se observó un incremento significativo de las concentraciones de CO₂ en los tratamientos PH 25, PH 50 y AL 8,5 con valores de 3,2; 3,5 y 3,4%. El día 12 no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, manteniendo valores de CO₂ en un rango de 1,9 a 3,5%.

En un estudio realizado con hojas de rúcula MPF conservadas durante 7 días a 8 °C, al ser tratadas con 100 µL/L de cloro, presentaron un máximo de 2,8% de CO₂ durante el primer día de almacenamiento. Posteriormente la concentración tendió a disminuir hasta el cuarto día, la cual se mantuvo en un rango de 1,2 a 1,4% de CO₂ hasta el término de la conservación (Koukounaras *et al.*, 2010).

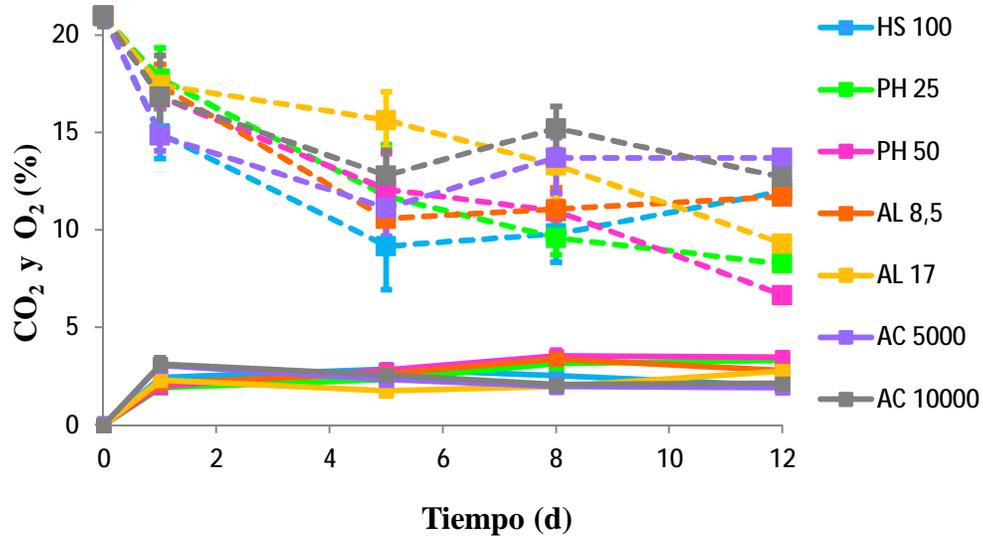


Figura 7. Evolución de la atmósfera interna (— % CO₂ y --- % O₂) de los envases de brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes conservados a 5 °C durante 12 días. Los valores corresponden a la media (n=6) ± error estándar.

Color

Luminosidad (L): En general, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, como tampoco con el tratamiento control HS 100 (Figura 8A). Los valores de luminosidad de los brotes estuvieron en un rango de 64,3 a 58,5 almacenados durante 12 días a 5 °C. Brennan *et al.* (2000) observaron que las rebanadas de champiñones en fresco, tratadas por inmersión en ácido cítrico (40 mg L⁻¹) y peróxido de hidrógeno (50 mg L⁻¹) y almacenadas a 4 °C durante 19 días presentaron valores de L altos, lo cual se traduce en un color más blanco, en relación con aquellas sólo tratadas con agua (control).

Tono (H_{ab}): La interacción de los sanitizantes y sus concentraciones tuvieron un efecto significativo en el tono de los brotes a lo largo del almacenamiento a 5 °C. Así, los brotes tratados con AL 17 presentaron tonos más bajos, a lo largo de su vida útil (en un rango de 90,8 - 91,6), con respecto de los brotes tratados con AC 5000 y AC 10000 en donde se observó un comportamiento opuesto (en un rango de 96,4 - 97,1 y 96,8 - 98,9 respectivamente) (Figura 8B). Los tratamientos PH 25 y PH 50 no presentaron mayores fluctuaciones hasta el término del período de análisis, lo cual indica que los brotes de alfalfa sometidos a esta solución sanitizante conservaron su color durante el período de almacenamiento.

Croma (C*): Este parámetro sólo presentó diferencias significativas entre los tratamientos el día 12 (Figura 8C). Los tratamientos AL 8,5 y AL 17 aumentaron los valores de croma en el tiempo, siendo mucho más notorio desde el día 8, alcanzando valores de 25,5 y 22,3 respectivamente el día 12, en comparación con los tratamientos con AC (5000 y 10000), cuyo C* llegó a valores de 13,9 y 14,1 respectivamente. Los tratamientos con AL

presentaron una coloración más apagada, por el contrario los brotes tratados con AC mostraron coloraciones blancas mucho más intensas.

De acuerdo con la escala de color (Figura 5), la luminosidad, tono y croma en brotes de alfalfa al inicio del ensayo estuvieron entre "3", y "4" puntos; considerados como aceptables, a excepción del tratamiento AL 17, el cual fue clasificado como inaceptable (puntuación "2"). Tras 12 días de almacenamiento a 5 °C, los tratamientos HS 100, AC 5000 y AC 10000 se mantuvieron entre los niveles de aceptabilidad para L, Hab y C*, a diferencia de los tratamientos AL 8,5, AL 17, PH 25 y PH 50 cuyos valores se clasifican como inaceptables.

Según los resultados de este ensayo los sanitizantes AC 5000 y AC 10000 no afectan el color de brotes de alfalfa conservados a 5 °C por 12 días.

Análisis microbiológico

Recuentos aerobios mesófilos: La materia prima (MP) obtuvo recuentos de aeróbios mesófilos de $5,8 \log \text{ufc g}^{-1}$, posteriormente al lavar los brotes con agua potable (AP) no mostró una significativa disminución de su carga microbiana inicial ($5,6 \log \text{ufc g}^{-1}$). Estos recuentos estuvieron por encima del nivel máximo permitido para aeróbios mesófilos ($5,7 \log \text{ufc g}^{-1}$).

El recuento inicial de microorganismos mesófilos fue de 3 a $4 \log \text{ufc g}^{-1}$ en espinaca MPF envasada bajo AM, tras 7 días de conservación dicho recuento aumentó hasta $6 \log \text{ufc g}^{-1}$, permaneciendo constante y por debajo de $7 \log \text{ufc g}^{-1}$ hasta los 21 días de conservación a 5 °C (Rodríguez-Hidalgo *et al.*, 2006).

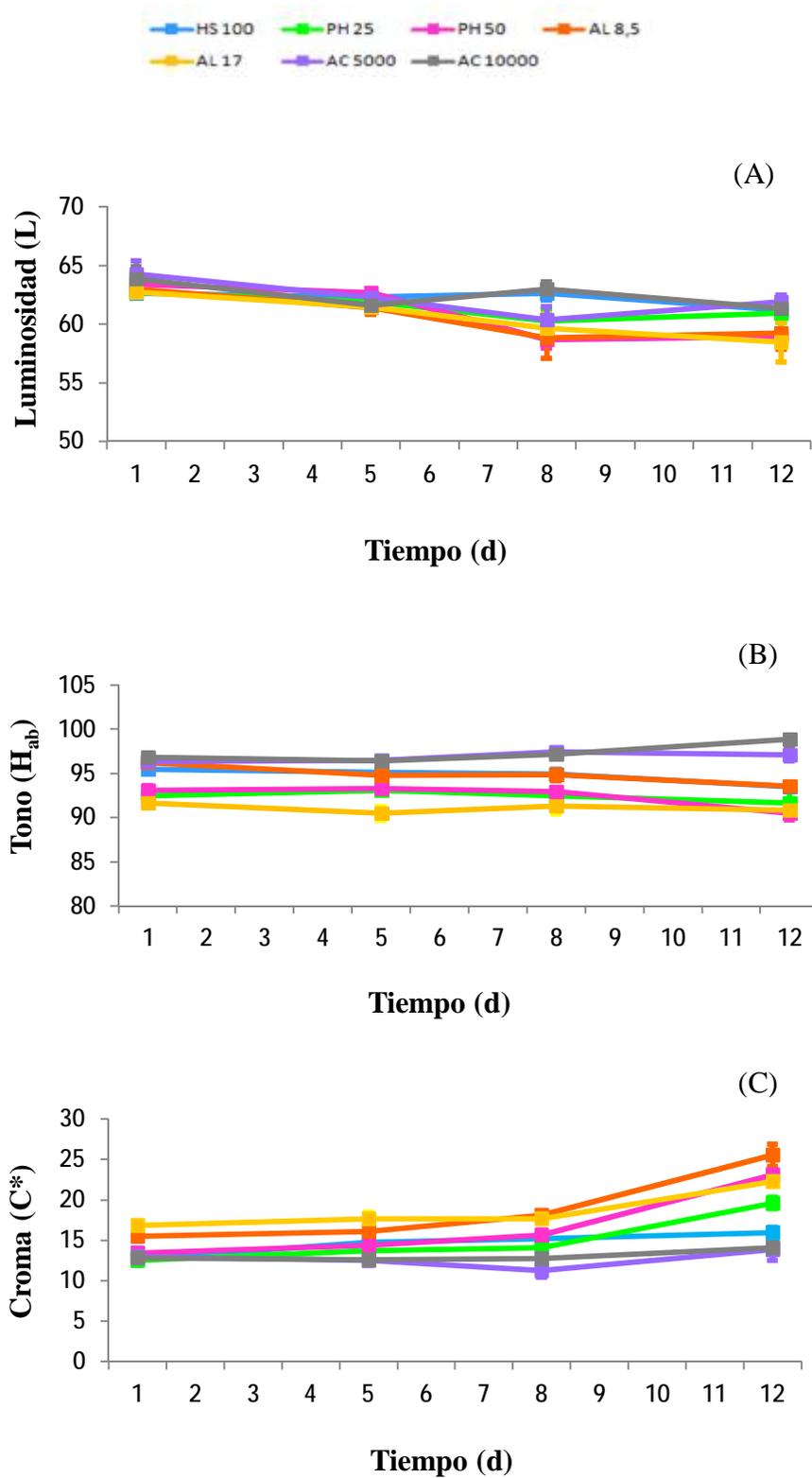


Figura 8. Evolución de los parámetros de luminosidad (A), tono (B) y croma (C) en brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 12 días. Los valores corresponden a la media (n=3) \pm error estándar.

Después de 5 días, los brotes de alfalfa con AL (8,5 y 17) presentaron una reducción significativa del recuento de microorganismos mesófilos presentando valores de 5,5 y 4,6 log ufc g⁻¹ respectivamente (Cuadro 5, Apéndice I), en relación con los otros sanitizantes que mantuvieron sus valores entre 6,3 y 6,9 log ufc g⁻¹; por lo que su vida útil podría fijarse en 5 días, de acuerdo con lo establecido en el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (Ministerio de Salud, 1997), ya que posterior al quinto día, todos los tratamientos aumentaron sus recuentos de aerobios mesófilos hasta el término de la conservación a 5 °C sin diferencias significativas entre ellos (Figura 9).

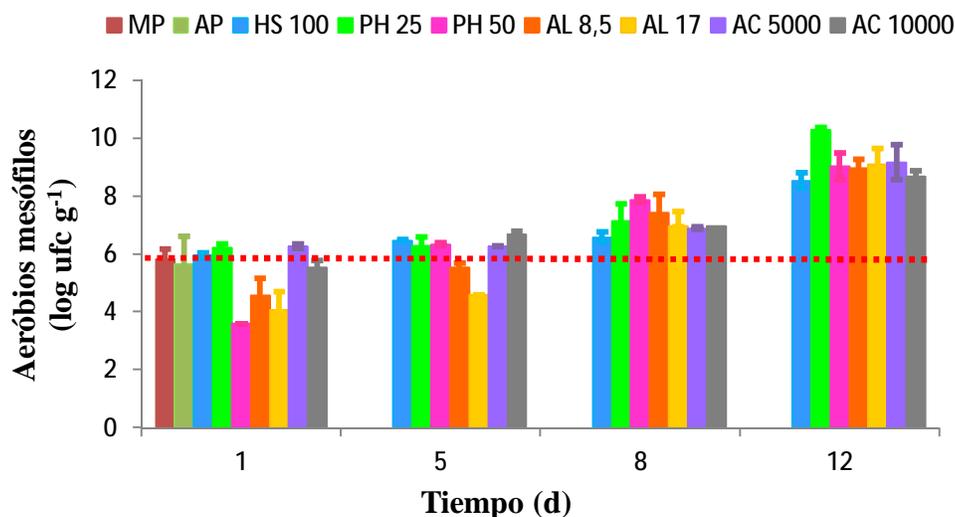


Figura 9. Evolución del crecimiento de aeróbios mesófilos en brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes conservados a 5 °C durante 12 días. Los valores corresponden a la media (n=3) ± error estándar. La línea punteada indica el límite máximo permitido.

Enterobacterias: La materia prima (MP) obtuvo recuentos de enterobacterias de 4,7 log ufc g⁻¹ y tras ser lavada con agua potable (AP) presentó un recuento de 4,6 log ufc g⁻¹. Al tratar los brotes de alfalfa con los diferentes sanitizantes, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, aumentando sus recuentos durante el almacenamiento. Tras 5 días, los brotes tratados con AL 17 presentaron un recuento de 5,1 log ufc g⁻¹, siendo significativamente menor respecto del tratamiento control (6,7 log ufc g⁻¹) (Figura 10). El día 8 y 12 no se presentaron diferencias significativas.

Brotes de alfalfa y soya MPF envasados bajo AM a 6,5 °C, a los cuales no se les aplicó ningún tratamiento, estaban altamente contaminadas con enterobacterias con un nivel promedio de 7,2 log ufc g⁻¹ (Abadias *et al.*, 2008).

El límite máximo permitido fue sobrepasado el día 1 (> 4,7 log ufc g⁻¹) por todos los tratamiento, en donde el tratamiento PH 25 presentó el recuento más alto (7 log ufc g⁻¹).

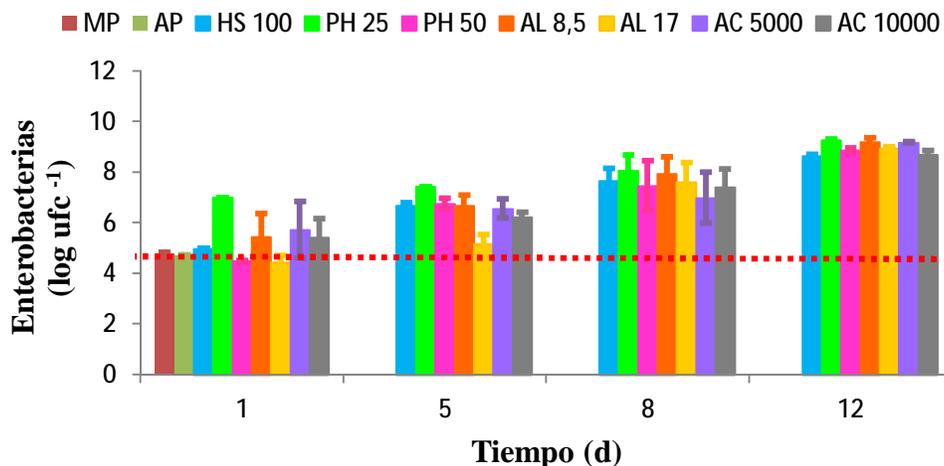


Figura 10. Evolución del recuento de enterobacterias en brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes conservados a 5 °C durante 12 días. Los valores corresponden a la media ($n=3$) \pm error estándar. La línea punteada indica el límite máximo permitido.

Psicrófilos: Los brotes de alfalfa tras la cosecha tenían una carga microbiana de $4,9 \log \text{ufc g}^{-1}$, la cual luego de ser lavados con agua potable presentaron un recuento de $4,1 \log \text{ufc g}^{-1}$. Tras 1 día posterior al tratamiento, AC 10000, AL 17 y PH 50 tuvieron un efecto sobre el crecimiento microbiano, ya que redujeron la carga microbiana inicial, presentando recuentos de $3,9 \log \text{ufc g}^{-1}$, $3,7 \log \text{ufc g}^{-1}$ y $3,2 \log \text{ufc g}^{-1}$, respectivamente (Cuadro 6, Apéndice I), sin embargo, el tratamiento AL 8,5 fue el que presentó los niveles más bajos de los microorganismos psicrófilos, ($1,7 \log \text{ufc g}^{-1}$). Al quinto día de almacenamiento a 5 °C, el tratamiento AL 17 fue el único que presentó un recuento de $4,5 \log \text{ufc g}^{-1}$, el cual fue el más bajo ese día. Al final de la conservación (día 12) a 5 °C, todos los tratamientos presentaron un recuento de psicrófilos sin diferencias significativas (Figura 11).

En lechuga Iceberg MPF lavada con agua y tratada con dióxido de cloro acuoso e hipoclorito de sodio (3 mg L^{-1} y 100 mg L^{-1} , respectivamente) y almacenada tras 10 días a 7 °C, se obtuvo un rango de psicrófilos de $5,9 - 6,7 \log \text{ufc g}^{-1}$, sin observarse diferencias significativas entre tratamientos (López-Gálvez *et al.*, 2010). En lechugas Angustana MPF lavadas con agua potable (testigo) y tratadas con Cl_2O (100 mg L^{-1}) se obtuvieron recuentos de $8 \log \text{ufc g}^{-1}$ y $4,4 \log \text{ufc g}^{-1}$ respectivamente, luego de 6 días de almacenamiento a 4 °C (Chen *et al.*, 2010).

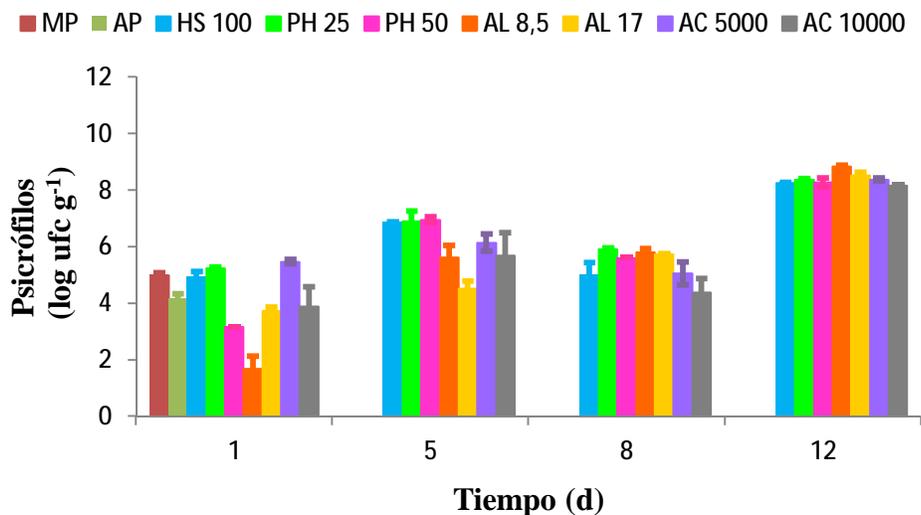


Figura 11. Evolución de los recuentos de microorganismos psicrófilos en brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes conservados a 5 °C durante 12 días. Los valores corresponden a la media ($n=3$) \pm error estándar.

Hongos y levaduras: Se observaron recuentos < 3 log ufc g^{-1} durante 12 días a 5 °C (datos no mostrados). Según Allende *et al.* (2009) obtuvo bajos recuentos de hongos y levaduras en cilantro MPF después de un lavado con hipoclorito de sodio (200 mg L^{-1}) en comparación con el testigo (agua potable) que presentó un recuento de 4,5 log ufc g^{-1} .

Evaluación sensorial

Análisis univariante de los resultados

Apariencia: Tras un día de almacenamiento, no se presentaron diferencias significativas, la apariencia de los brotes fue calificada como “buena” a “muy buena” (en un rango de 9,3 a 13,1 puntos) (Figura 12A). El día 5 se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, en donde AL 17 presentó la puntuación más baja (1,2 puntos) encontrándose en el rango “muy mala” (Cuadro 7, Apéndice I), mientras que los tratamientos AC 5000 y 10000 se encontraron en el rango de apariencia “buena” (10,8 y 11,2 puntos, respectivamente). El día 8 y 12 no se encontraron diferencias significativas.

En estudios anteriores, Velázquez *et al.* (2009) encontraron que la apariencia de hojas de lechuga almacenadas a 4 °C después de 7 días de almacenamiento, presentó alteraciones evidentes (pequeñas manchas de aspecto amarillento en la superficie de los vegetales) luego de tratar las muestras con cloruro de benzalconio (0,1 mg mL^{-1}) y ácido láctico (0,2%).

Color: Al inicio del período de almacenamiento a 5 °C no se encontraron diferencias significativas. El día 5, los brotes tratados con AL 17 fueron evaluados como “insuficiente” (3,1 puntos), en cambio el color de los brotes tratados con AC 5000 y 10000 se encontraron

en el rango de “bueno” (Cuadro 8, Apéndice I). El día 12 los tratamientos mejor evaluados corresponden a AC 5000 y AC 10000 situándose en el rango de “muy bueno” (13,0 y 11,9 puntos, respectivamente), por el contrario los tratamientos PH 50 y AL 8,5 fueron calificados como “insuficientes” (3,5 y 2,3 puntos, respectivamente). El tratamiento control HS 100 se mantuvo en el rango de “bueno” (7,7 puntos) (Figura 12B).

Los resultados obtenidos por parte de los panelistas coinciden con lo discutido anteriormente en relación con los valores de luminosidad (L) obtenidos en los tratamientos con AC (5000 y 10000), cuyos valores fueron los más altos durante todo el período de análisis, lo cual se traduce como un color más cercano al blanco y a un aumento de los valores de croma (C*) en los tratamientos AL 8,5 y AL 17, lo cual se asocia con la presencia de colores cercanos al amarillo-pardo.

El color de un producto alimenticio fresco es un atributo de importancia para el consumidor, debido a que es un parámetro de evaluación de calidad del producto. Varios agentes de desinfección tienen fuertes propiedades oxidantes relacionadas con efectos nocivos sobre el color de los vegetales generando oscurecimiento o decoloración de los tejidos vegetales (Vandekinderen *et al.*, 2008b). El ácido cítrico, ácido ascórbico y clorito de sodio han sido algunas de las alternativas utilizadas para prevenir el pardeamiento en lechuga Iceberg MPF (Castañer *et al.*, 1996).

Sabores extraños: No se presentaron diferencias significativas entre los sanitizantes y sus concentraciones durante todo el período de análisis. En relación al recuento de microorganismos mesófilos, la presencia de sabores extraños fue evaluada hasta el día 5, luego de ese día los brotes de alfalfa no estaban aptos para el consumo de acuerdo al Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (Ministerio de salud, 1997) (Cuadro 9, Apéndice I).

El sabor extraño detectado en algunos tratamientos, pudo deberse a los ácidos orgánicos que se emplearon para lavar los brotes, ya que los ácidos orgánicos poseen un sabor característico, lo cual puede tener un efecto negativo en la calidad sensorial del producto, por lo tanto se debe tomar en consideración que el uso de los ácidos orgánicos con propósitos de desinfección en la industria de los productos MPF podría tener un impacto sobre el sabor del producto (Ölmez y Kretzschmar, 2009).

Turgencia: La turgencia de los brotes tratados con los diferentes sanitizantes no presentó diferencias significativas el día 1. Tras 5 días de conservación a 5 °C, la turgencia de los brotes tratados con AL 17 fue calificada como “baja” (3,9 puntos), mientras que la turgencia del resto de los tratamientos se situó en los rangos “levemente alta” a “muy alta” (Cuadro 10, Apéndice I). De acuerdo al análisis de microorganismos mesófilos, la turgencia de los brotes fue evaluada hasta el día 5, luego de ese día los brotes de alfalfa no estaban aptos para el consumo de acuerdo al Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (Ministerio de salud, 1997) (Figura 12D).

Análisis de los resultados por componentes principales

Los tres primeros componentes principales (CP) explican el 93% de la variabilidad total. El CP1 que explica el 58% de la variabilidad total está definido en su orientación positiva por la apariencia y el color del producto, lo cual permitió diferenciar las muestras de los tratamientos AC 5000, AC 10000 y HS 100 en el día 1 del resto de las muestras. El CP3 explica un 12% de la variabilidad, definido por la turgencia en su orientación negativa, permitió separar los tratamientos PH 25 y PH 50 en el día 1 y los tratamientos AC 5000 y HS 100 en el día 5 del resto de las muestras (Figura 13). Los resultados del análisis multivariante permiten comprobar los resultados del análisis univariante, ya que los tratamientos separados por el CP1 fueron los que obtuvieron una mejor valoración de su apariencia y color por el panel de jueces, mientras que los tratamientos separados por el CP3 presentaron una mejor valoración de la turgencia (Cuadro 13).

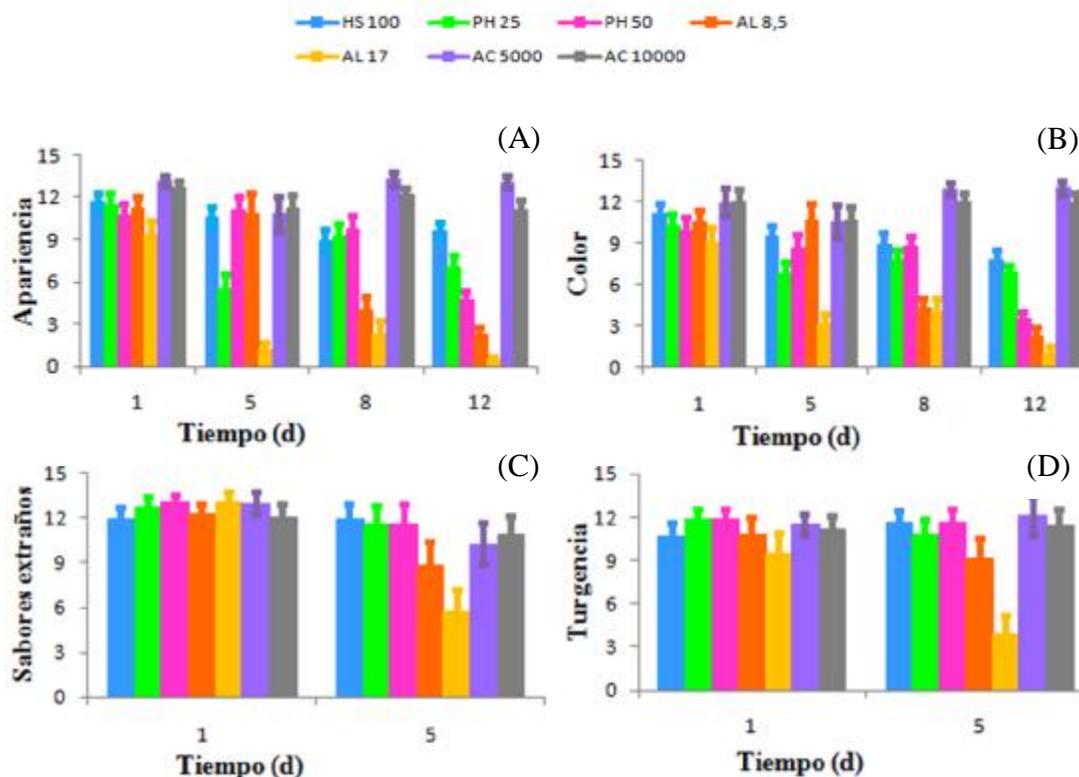


Figura 12. Valoración de la apariencia (A), color (B), sabores extraños (C) y turgencia (D) de brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes conservados a 5 °C durante 12 (gráficas A y B) y 5 días (gráficas C y D) por un panel de 12 jueces semientrenados. Los valores corresponden a la media ($n=12$) \pm error estándar.

El análisis multivariante también logró comprobar una alta correlación ($r= 0,71$) entre la apariencia y el color de los brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y una correlación moderada entre su apariencia y turgencia ($r= 0,60$). Estos resultados concuerdan con lo discutido anteriormente en el análisis univariante de los resultados, ya que los

tratamientos que fueron evaluados positivamente en cuanto a la apariencia del producto, también lo fueron en cuanto a color y turgencia del producto. Esto podría deberse a que los parámetros visuales (apariencia y color) están altamente relacionados entre ellos ya que una percepción positiva de uno de ellos por parte del consumidor, genera también la aceptación del otro parámetro. Además, las características visuales son muy importantes en la diferenciación de la calidad al momento de la compra. Por lo tanto, muchos estudios y experimentos relacionados con la vida útil de vegetales MPF incluyendo las evaluaciones sensoriales, se han centrado en la calidad total, basado en la apariencia del producto (Ragaert *et al.*, 2007).

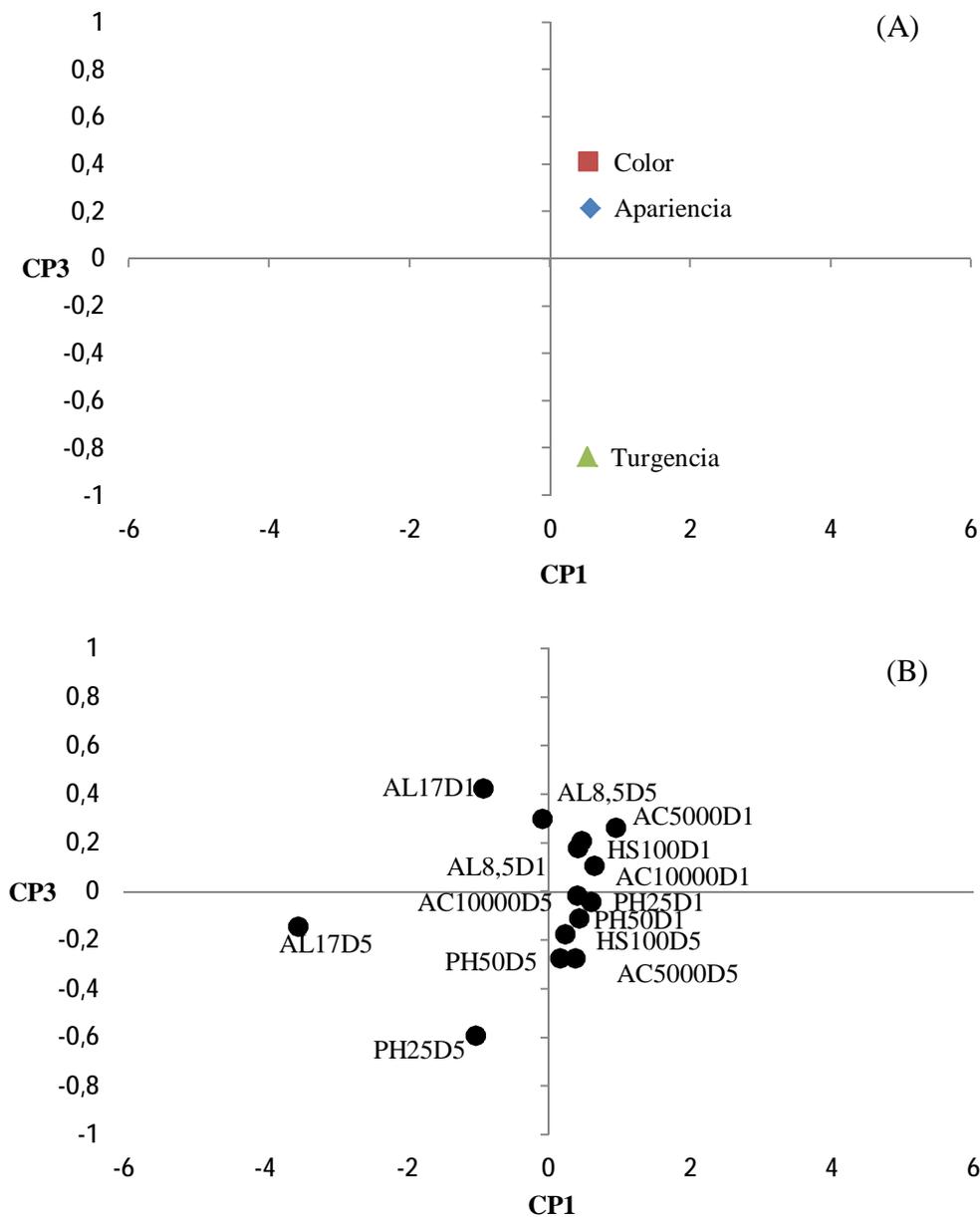


Figura 13. “Biplot” del análisis de los resultados por componentes principales (A) y (B) de los atributos de apariencia, turgencia y color evaluados sensorialmente en brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes conservados a 5 °C durante 5 días. Los valores corresponden al centroide de la muestra (n=12) \pm error estándar.

CONCLUSIÓN ENSAYO I

Tras las evaluaciones de los diferentes parámetros analizados, se obtuvieron reducciones de la carga microbiológica significativas por parte de algunos tratamientos, como también buenos resultados en los análisis de la calidad sensorial de los brotes de alfalfa; sin embargo, hubo diferencias en la efectividad de las concentraciones de los diferentes tratamientos aplicados. Por lo tanto, se realizó un segundo ensayo con las concentraciones más efectivas en relación a los parámetros microbiológicos y sensoriales durante su almacenamiento. Por lo tanto los tratamientos PH 50, AL 17, AC 5000 y 10000 fueron escogidos para ser evaluados en el ensayo II, utilizando la misma película plástica y condiciones de almacenamiento, de modo de confirmar los resultados.

ENSAYO II

Tasa respiratoria: El día 0, se presentaron diferencias significativas (Cuadro 1, Apéndice II) en los brotes tratados con PH 50 y AL 17 cuya tasas respiratorias fueron las más bajas (50,5 y 48,4 mg CO₂ kg⁻¹ h⁻¹, respectivamente), a diferencia de los brotes tratados con AC 5000, AC 10000 y con HS 100 (control) (70,4; 70,8 y 69,3 mg CO₂ kg⁻¹ h⁻¹ respectivamente). En los días restantes del almacenamiento a 5 °C no se encontraron diferencias significativas. La tasa respiratoria de los brotes tratados con los diferentes sanitizantes tendió a disminuir para luego estabilizarse a partir del día 5 de la conservación (en un rango de 26,7 a 39,8 mg CO₂ kg⁻¹ h⁻¹) (Figura 14).

A diferencia del ensayo I los brotes de alfalfa tratados con las soluciones sanitizantes seleccionadas presentaron una vida útil de 7 días (Figura 15), lo cual pudo ser consecuencia de la abrupta disminución de la tasa respiratoria, ya que la velocidad de deterioro conocida como perecibilidad de las hortalizas MPF es generalmente proporcional a su velocidad de respiración. Durante la respiración, a medida que las reservas alimenticias que proporcionan energía se agotan, se genera el aceleramiento de la senescencia (Kader, 2002). Sin embargo, hay poca información publicada con respecto del impacto de los tratamientos sanitizantes sobre la fisiología del producto, particularmente sobre las tasas respiratorias (Martínez-Sánchez *et al.*, 2006).

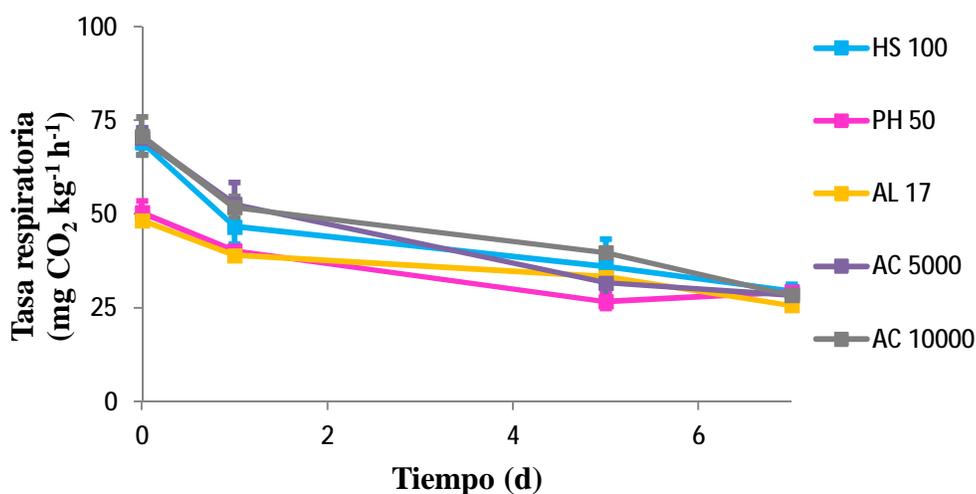


Figura 14. Evolución de la tasa respiratoria de los brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes conservados a 5 °C durante 7 días. Los valores corresponden a la media (n=3) ± error estándar.



Figura 15. Apariencia de los brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes envasados en recipientes herméticos de vidrio utilizados para medir su tasa de respiración tras 7 días de almacenamiento a 5 °C.

Atmósfera modificada: Inicialmente, todos los tratamientos tenían una concentración de 0% CO₂ y 21% O₂. Sin embargo, tras 1 día posterior al tratamiento, los brotes tratados con AL 17 presentaron una atmósfera interna de 17,3% de O₂ y 1,7% de CO₂, la cual fue la más baja de todas en ambas concentraciones de gases (Cuadro 2, Apéndice II). En el quinto día de almacenamiento, los brotes tratados con HS 100 y AC 10000 presentaron una concentración de 9,1% y 10% de O₂ en su atmósfera interna, respectivamente, las cuales fueron menores que las obtenidas por el resto de los tratamientos. El tratamiento PH 50 presentó una concentración de 3,7% de CO₂ siendo la más alta ese día, aumentando su concentración más rápido que el resto de los tratamientos. Para el término de la conservación de los brotes, no se presentaron diferencias significativas en la concentración de O₂ al interior del envase, pero sí las hubo en cuanto a la concentración de CO₂, en donde los tratamientos con AC (5000 y 10000) presentaron los valores más bajos (1,9% y 2,4%, respectivamente) (Figura 16). La estabilización de la atmósfera interna para el CO₂ se logró tras 5 días de almacenamiento, sin embargo el O₂ no logra en equilibrio.

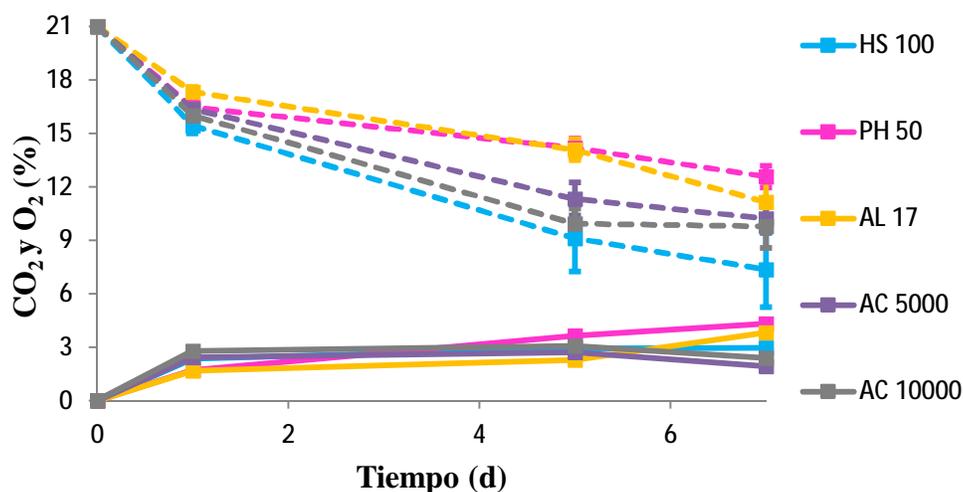


Figura 16. Evolución de la atmósfera modificada (— %CO₂ y ---- %O₂) de los envases de brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes conservados a 5 °C durante 7 días. Los valores corresponden a la media (n=6) ± error estándar.

En este ensayo la composición gaseosa de CO₂ y O₂ alcanzada el día 7 fue similar a la composición gaseosa alcanzada en el ensayo I el día 12. En ambos ensayos se alcanzó la atmósfera de equilibrio para el CO₂ al quinto día de almacenamiento a 5 °C, mientras que las concentraciones de O₂ no logran estabilizarse. Martínez-Sánchez *et al.*, (2006), quienes trabajaron con hojas de rúcula salvaje lavadas con hipoclorito de sodio (100 mg L⁻¹), agua ionizada (10 mg L⁻¹), ácido láctico (20 mg L⁻¹), clorito de sodio acidificado (250 mg L⁻¹) y ácido peroxiacético (300 mg L⁻¹), las cuales luego de 5 días de almacenamiento a 4 °C, alcanzaron una atmósfera de equilibrio con concentraciones de 1-3 kPa de O₂ y niveles de CO₂ en un rango de 11-13 kPa, manteniéndose hasta el final de la conservación (12 días).

Por otro lado, los envases presentaron una alta acumulación de agua, lo cual influyó en la vida útil de los brotes, puesto que la apariencia de éstos se vio gravemente afectada (Figura 17). La presencia de líquido condensado al interior de la bolsa puede bloquear la difusión de O₂ al interior de los tejidos y a través de la película plástica siendo causa de fermentación (Cameron *at al.*, 1995).

Se ha observado que las combinaciones de niveles bajos de O₂ y altos CO₂ y las notorias condensaciones de agua en los envases, debido a la limitación de la difusión del vapor de agua por la película plástica utilizada, generaron el rápido deterioro de hojas de rúcula tratada con distintos sanitizantes y almacenadas a 4 °C (Martínez-Sánchez, 2008).



Figura 17. Apariencia de los brotes de alfalfa tratados con diferentes sanitizantes y envasados en bolsas plásticas para medir la composición gaseosa de brotes de alfalfa a los 7 días de almacenamiento a 5 °C.

Color

Luminosidad (L): Este parámetro no presentó diferencias significativas a lo largo del almacenamiento, los valores de L al término del almacenamiento estuvieron en un rango de 60,0 a 61,6 (Cuadro 3, Apéndice II), por lo tanto, las soluciones sanitizantes aplicadas a los brotes de alfalfa no afectaron este parámetro (Figura 18A).

Por el contrario, en lechuga Angustana lavada con agua potable (control) y almacenada a 4 °C durante 14 días, los valores de luminosidad se redujeron notablemente, alcanzando un nivel inaceptable (valor de L* < 38) en el día 6 de almacenamiento, mientras que los valores de L de las muestras tratadas con ClO₂ (10, 40 y 100 mg L⁻¹) fueron más altos y se mantuvieron por encima de 30 durante todo el período de almacenamiento (Chen *et al.*, 2010).

Tono (H_{ab}): El día 1, AL 17 presentó valores bajos de tono (87,6), en comparación con los brotes tratados con AC (5000 y 10000) cuyos valores fueron de 96,0 y 97,1; respectivamente. Los días 5 y 7, los brotes de alfalfa tratados con (AC 5000 y 10000) manifestaron un comportamiento similar en el tiempo, siendo los tratamientos que alcanzaron una tonalidad más alta (Figura 18B). Los brotes tratados con AL 17 presentaron valores de tono bajos durante el período de conservación a 5 °C con coloraciones pardo-amarillentas en comparación con los otros tratamientos, lo cual concuerda con lo discutido en el ensayo I (Cuadro 3, Apéndice II).

El amarillamiento es el principal atributo que indicó el acortamiento de la vida útil de hojas de rúcula MPF, cuyo tono fue descendiendo 1,25 por día en promedio durante la conservación a 10 °C (Able *et al.*, 2003).

Croma (C^*): El croma del color de los brotes de alfalfa tratados con diferentes sanitizantes presentó diferencias significativas entre los tratamientos durante la vida útil del producto (Cuadro 3, Apéndice II). El día 1 los brotes tratados con AL 17 presentaron un valor de C^* de 16,4; el cual fue alto comparado con los otros tratamientos que se mantuvieron un rango de 12,5 a 13,4 (Figura 18C). Luego de 5 días de conservación los valores de AL 17 continúan siendo los más altos (19,1), mientras que los brotes tratados con AC (5000 y 10000) presentaron valores más bajos (14,1 y 14,5; respectivamente), lo cual se traduce en una coloración blanca más intensa. Al término del almacenamiento (día 7) el tratamiento PH 50 presentó un aumento de C^* (22,6), siendo el valor más alto, seguido de HS 100 (19,5) y AL 17 (18,8), por el contrario los tratamientos con AC (5000 y 10000) presentaron los valores de C^* más bajos (14,2 y 15,9 respectivamente).

En general, los valores de C^* obtenidos en este ensayo son similares a los presentados en el ensayo I.

En relación con la escala de color (Figura 5), la luminosidad, tono y croma presentan una puntuación de "5", "4" y "3" al inicio del ensayo, siendo calificados como aceptables. Para el término del ensayo los tratamientos HS 100 y AC (5000 y 10000) también fueron calificados como aceptables, ya que mantuvieron el color blanco característico de los brotes de alfalfa, mientras que los tratamientos PH 50 y AL 17 fueron clasificados como inaceptables, debido a que presentaron coloraciones amarillas y pardas (Figura 19).

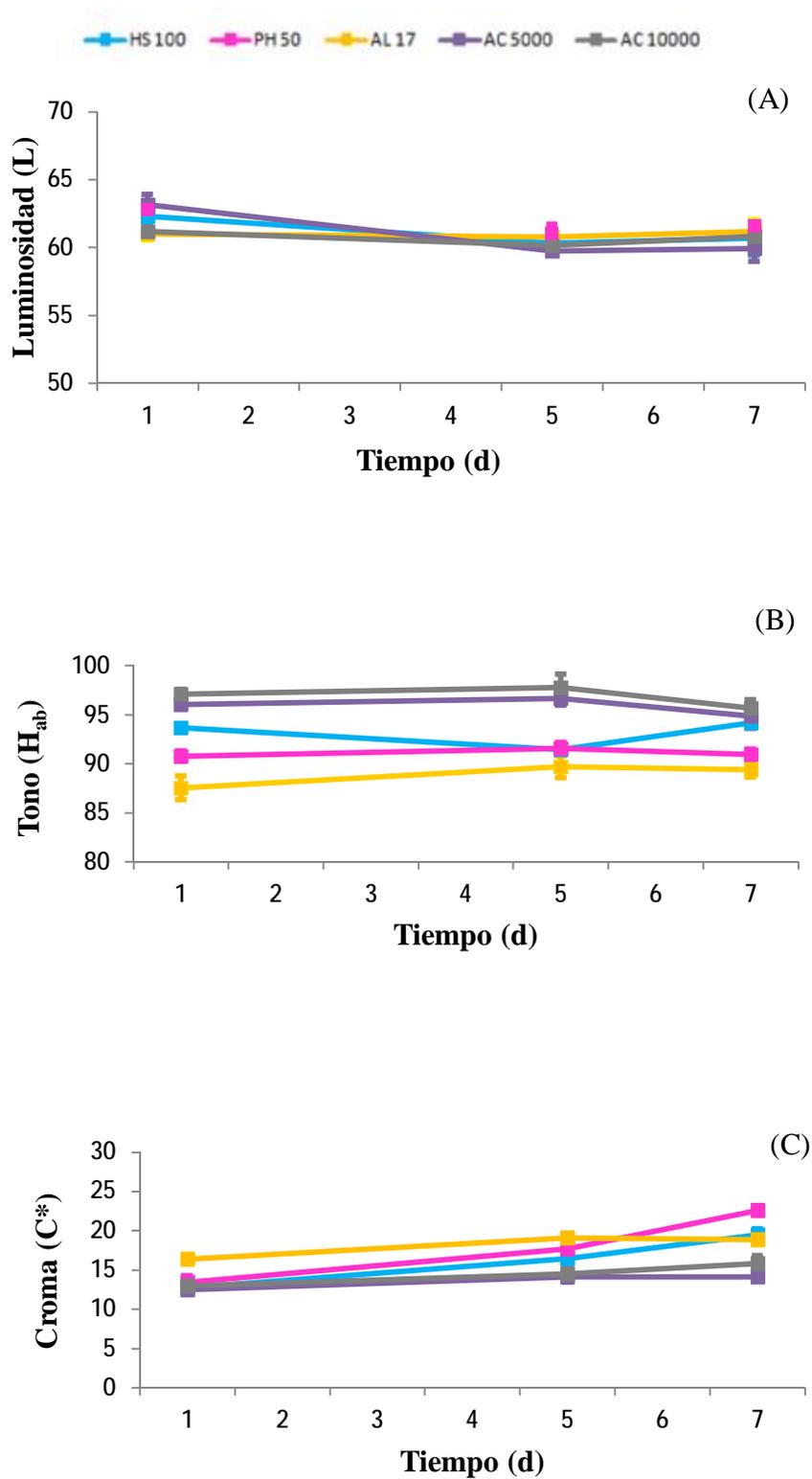


Figura 18. Evolución de los parámetros luminosidad (A), tono (B) y croma (C) del color de los brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes conservados a 5 °C durante 7 días. Los valores corresponden a la media (n=3) ± error estándar.

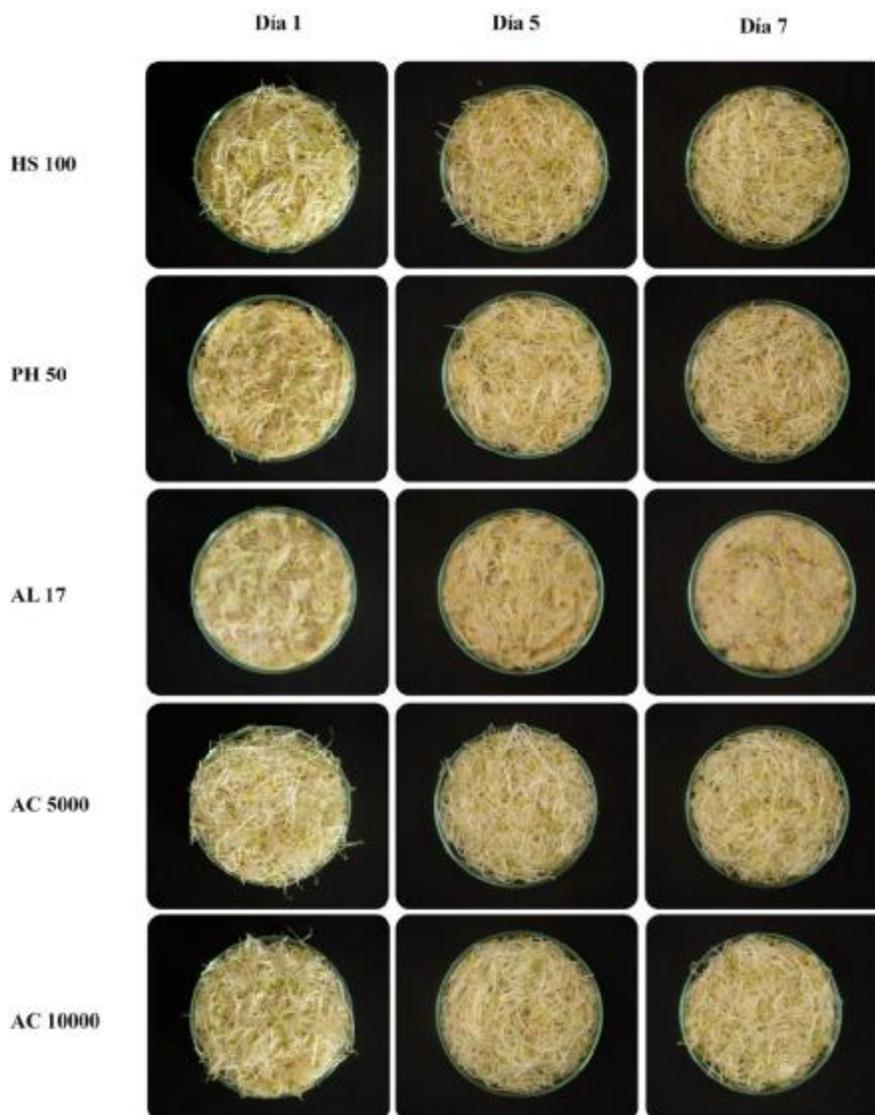


Figura 19. Evolución del color de los brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 7 días.

Análisis microbiológico

La eficiencia de los tratamientos sanitizantes en términos de reducciones logarítmicas, está influenciada por la población microbiana inicial, que también podría determinar la magnitud de la prolongación de la vida útil del producto (Gómez-López *et al.*, 2008). Por otro lado, el agua de lavado utilizada en el procesamiento del producto, si no es apropiadamente desinfectada, puede convertirse en una fuente de contaminación microbiológica para cualquier parte del producto que esté en contacto con ella (Zagory 1999).

Recuentos aerobios mesófilos: Los brotes provenientes del campo y los que fueron lavados con agua potable presentaron recuentos microbiológicos idénticos ($6,5 \log \text{ ufc g}^{-1}$), por lo que el lavado con agua no tuvo ningún efecto sobre la eliminación de microorganismos (Figura 20A). Esto concuerda con lo descrito por Martínez-Sánchez *et al.* (2008) quien observó que en hojas de rúcula MPF los recuentos de aerobios mesófilos no disminuyeron luego de ser lavadas con agua potable y almacenadas a 4 y 8 °C.

Hubo diferencias significativas entre los tratamientos el día 7, donde AL 17 obtuvo los recuentos más bajos de microorganismos ($6,2 \log \text{ ufc g}^{-1}$), mientras que el resto de los tratamientos mantuvieron recuentos similares entre ellos a lo largo de la conservación refrigerada (entre $7,7$ y $8,2 \log \text{ ufc g}^{-1}$)

Todos los tratamientos alcanzan el límite máximo permitido el día 1 de conservación, por lo que los brotes no son considerados aptos para el consumo.

Enterobacterias: La materia prima presentó un recuento de $6,4 \log \text{ ufc g}^{-1}$ de enterobacterias y luego de ser lavada con agua potable este recuento se logró reducir a $5,8 \log \text{ ufc g}^{-1}$. Se encontraron diferencias significativas tras tratamiento (día 1), en donde AL 17 fue el tratamiento que presentó los recuentos más bajos ($4,8 \log \text{ ufc g}^{-1}$) (Cuadro 4, Apéndice II) (Figura 20B). El día 5 AL 17 sigue siendo el tratamiento que mantuvo los recuentos más bajos ($5,3 \log \text{ ufc g}^{-1}$), mientras que el resto de los tratamientos presentaron recuentos en un rango de $6,6$ a $7,6 \log \text{ ufc g}^{-1}$. Al término de la conservación (día 7) no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

No obstante, debido a que los recuentos de enterobacterias de los brotes tratados con diferentes soluciones sanitizantes excedieron las $4,7 \log \text{ ufc g}^{-1}$ permitidos por el reglamento sanitario de los alimentos, lo que coincide con lo discutido en el ensayo I, este producto no podría ser comercializado.

Las poblaciones de enterobacterias en lechuga MPF lavada con agua, dióxido de cloro (3 mg L^{-1}) e hipoclorito de sodio (100 mg L^{-1}) redujeron la carga microbiana inicial de enterobacterias en $1,2 \log \text{ ufc g}^{-1}$ (López-Gálvez *et al.*, 2010).

Bacterias lácticas: La materia prima presentó recuentos de bacterias lácticas de $5,4 \log \text{ ufc g}^{-1}$, los cuales fueron similares a los obtenidos luego de lavar la materia prima con agua potable ($5,1 \log \text{ ufc g}^{-1}$). Todos los tratamientos fueron efectivos al reducir la carga microbiológica inicial de la materia prima siendo los brotes tratados con AL 17 los que presentaron los recuentos más bajos ($3,1 \log \text{ ufc g}^{-1}$) (Figura 20C). No se presentaron diferencias significativas en ninguno de los días de evaluación.

Martínez-Sánchez (2008), quien trabajó con rúcula salvaje MPF lavada con agua, hipoclorito de sodio (100 mg L^{-1}), agua ozonizada (10 mg L^{-1}), ácido láctico (20 mg L^{-1}), clorito de sodio acidificado (250 mg L^{-1}) y ácido peroxiacético (300 mg L^{-1}), observó que los recuentos de bacterias ácido lácticas fueron siempre menores a $3 \log \text{ ufc g}^{-1}$ y no se

vieron afectados por ninguno de los lavados o condiciones atmosféricas durante la conservación (15 días) a 4 °C.

Psicrófilos: Todos los tratamientos sanitizantes tuvieron un efecto positivo sobre la materia prima, cuya carga microbiológica inicial fue de 5,9 log ufc g⁻¹. Por otro lado, el lavado con agua potable no tuvo mayor relevancia en la eliminación de microorganismos psicrófilos (5,5 log ufc g⁻¹). Los días 1 y 5 de almacenamiento a 5 °C hubo diferencias significativas entre los tratamientos, observando una gran diferencia en los brotes tratados con AL 17, cuyos recuentos fueron de 2,9 y 4,6 log ufc g⁻¹ (días 1 y 5, respectivamente) (Cuadro 5, Apéndice II). Al término de la vida útil (día 7), los brotes tratados con Al 17 continúan siendo los que presentaron el recuento más bajo (6,2 log ufc g⁻¹) (Figura 20 D).

En un estudio realizado en lechuga Lollo Rosso MPF, el lavado con agua clorada (160 a 180 ppm) redujo los recuentos de psicrófilos en 3 log ufc g⁻¹, sin embargo el lavado con agua potable aumentó los recuentos en 1,5 log ufc g⁻¹, almacenada a 5 °C durante 7 días (Allende *et al.*, 2004).

Hongos y levaduras: Los recuentos microbiológicos fueron <3 log ufc g⁻¹ durante todo el período de almacenamiento a 5 °C de los brotes, sin diferencias significativas entre tratamientos (datos no mostrados). Tournal *et al.* (2005) en estudios con brotes de diferentes especies observaron bajos recuentos de levaduras, siendo los brotes de ajo y cebolla los que presentaron los recuentos más bajos.

Evaluación sensorial

Análisis univariante de los resultados

Apariencia: Se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos los tres días de análisis (1, 5 y 7). En el día 1, los brotes de alfalfa mejor evaluados por el panel fueron aquellos tratados con AC (5000 y 10000), cuya apariencia fue catalogada como “excelente” (13,7 y 13,6 puntos, respectivamente), mientras que la apariencia de los brotes tratados con AL 17 fue calificada como “deficiente” (3,6 puntos) (Cuadro 5). En el día 5 de vida útil, la apariencia de los brotes tratados con AC (5000 y 10000) fue nuevamente catalogada como “buena” y “muy buena”, respectivamente (11,4 y 12,5 puntos, respectivamente); sin embargo, la apariencia de los brotes tratados con AL 17 fue calificada como “muy mala” (1,1 puntos). Al término de la conservación (día 7), la apariencia de los brotes de alfalfa tratados con PH 50 fue considerada como “deficiente”, mientras que la apariencia del control (HS100) y la de los brotes tratados con AC fue calificada como “más que regular” y “muy buena”, respectivamente.

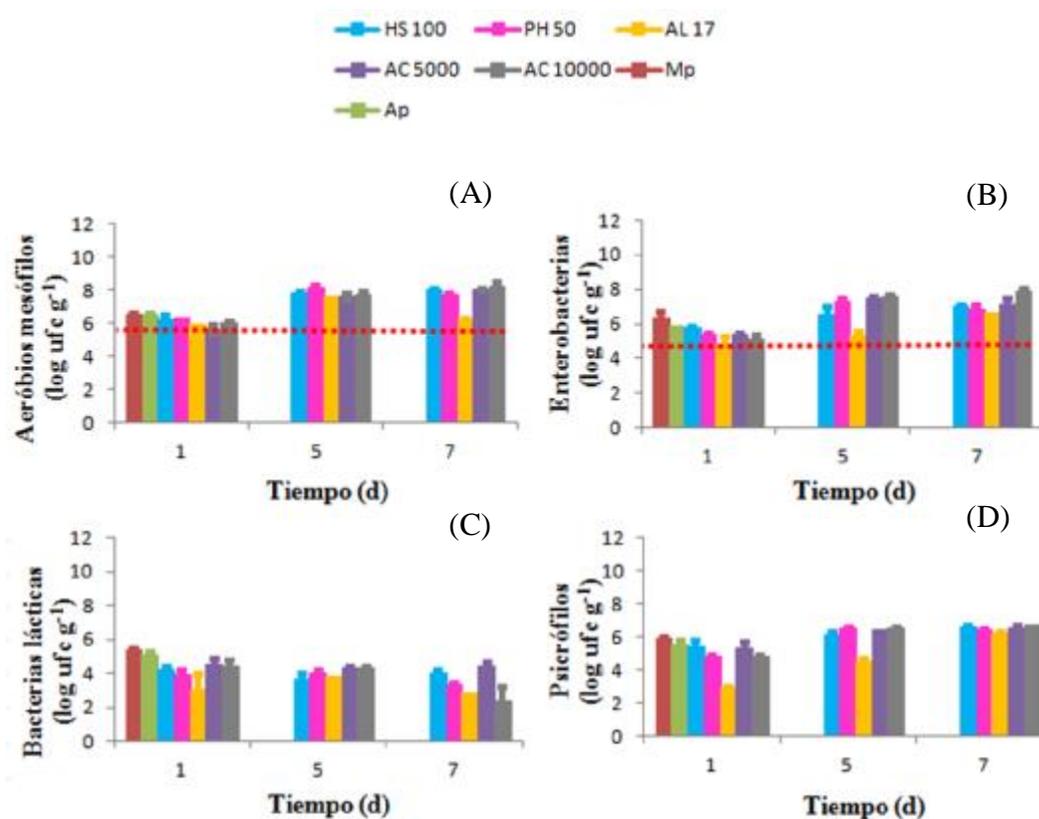


Figura 20. Evolución de los recuentos microbiológicos de aeróbios mesófilos (A), enterobacterias (B), bacterias lácticas (C) y psicrófilos (D) en brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 7 días. Los valores corresponden a la media ($n=3$) \pm error estándar. La línea punteada indica el límite legal permitido de microorganismos aerobios mesófilos ($5,7 \log \text{ufc g}^{-1}$) y enterobacterias ($4,7 \log \text{ufc g}^{-1}$) establecido por el Reglamento Sanitario de los Alimentos.

La pérdida de apariencia es el principal factor que limitó la vida útil de castañas MPF tratadas con 0,1 M de ácido cítrico y agua destilada, almacenadas a 4 °C durante 12 días, las cuales luego de ser procesadas perdieron rápidamente su color blanco, incluso al ser almacenadas a baja temperatura. La calidad de consumo se redujo rápidamente con el desarrollo de manchas oscuras a medida que pasaba el tiempo, las cuales fueron evidentes a los 6 días. Las muestras tratadas con 0,1 M de ácido cítrico mantuvieron un color parcialmente brillante y no se observó pardeamiento hasta el final del almacenamiento (Jiant *et al.*, 2004).

Color: El día 1 de almacenamiento no se detectaron diferencias significativas entre los brotes de alfalfa tratados con diferentes sanitizantes, cuyo color fue calificado como “muy bueno” y “excelente” (Cuadro 5). En el día 5 de la vida útil, el color de los brotes tratados con AL 17 fue calificado como “insuficiente” (3,4 puntos), a diferencia del color de los brotes tratados con AC (5000 y 10000) que fueron calificados como “muy bueno” (11,4 y 12,3 puntos, respectivamente). Al igual que en el parámetro anterior, al término de la

conservación a 5 °C, los brotes que presentaron un mejor color fueron aquellos tratados con HS 100, AC 5000 y AC 10000, ya que su color fue calificado como “bueno”, “bueno” y “muy bueno”, respectivamente (7,9; 10,9 y 11,9 puntos, respectivamente).

Estos resultados concuerdan con los que se obtuvieron en el ensayo I, en el que los brotes evaluados positivamente de acuerdo con su apariencia, también lo fueron de acuerdo al color de los brotes.

En la evaluación de los parámetros de color, los brotes de alfalfa tratados con AC presentaron valores de croma bajos y tono altos, lo cual se refleja en un color blanco intenso, mientras que los brotes tratados con AL, manifestaron luego de 5 días de almacenamiento, una disminución de los valores de tono y aumento del croma, dando como resultado un color más amarillento y pardo.

Brennan *et al.* (2000) observaron que la aplicación de 40 g L⁻¹ de ácido cítrico, indujeron a un menor amarillamiento en rebanadas de hongos MPF hasta el término del almacenamiento (20 días) a 4 °C.

Sabores extraños: En el día 1 del almacenamiento, los jueces detectaron una presencia “levemente alta” de sabores extraños en los brotes tratados con AL 17 (5,4 puntos), para el resto de los tratamientos la presencia de sabores extraños estuvo en un rango desde normal (7,9 puntos) a muy baja (12,5 puntos). En relación al recuento de microorganismos mesófilos, la presencia de sabores extraños fue evaluada al principio del ensayo (día 1), luego de ese día los brotes de alfalfa no estaban aptos para el consumo de acuerdo al Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (Ministerio de salud, 1997) (Cuadro 8, Apéndice I).

La aplicación de una solución acuosa fría (a 4 °C) de peróxido de hidrógeno (50 mg L⁻¹), ácido cítrico (40 g L⁻¹) y agua destilada como control fueron evaluadas sensorialmente por 21 panelistas en rebanadas de hongos MPF y almacenadas durante 20 días, dando como resultado la ausencia de sabores ácidos o coloraciones amarillas en los bordes de las rebanadas de hongos (Brennan *et al.*, 2000).

Turgencia: La turgencia de los brotes tratados con diferentes soluciones sanitizantes no presentó diferencias significativas entre los tratamientos almacenados a 5 °C. En relación al recuento de microorganismos mesófilos, la presencia de sabores extraños fue evaluada al principio del ensayo (día 1), luego de ese día los brotes de alfalfa no estaban aptos para el consumo de acuerdo al Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (Ministerio de Salud, 1997) (Cuadro 8, Apéndice I).

Los cambios de turgencia pudieron deberse a el efecto de cada uno de los sanitizantes sobre los brotes de alfalfa. Por el contrario Park *et al.* (2001), quienes realizaron estudios en hojas de lechuga MPF tratadas con agua potable, agua clorada (45 ppm), agua electrolizada y en

hojas de lechuga sin lavar (control), postulan que la reducción del turgor en las hojas de lechuga fue principalmente debido al largo período de almacenamiento (14 días) a 4 °C y no a los tratamientos aplicados puesto que observaron cambios en la turgencia a medida que pasaron los días, y una disminución gradual de este parámetro, sin existir diferencias entre los tratamientos aplicados, lo cual indica que los diferentes tratamientos no tuvieron un efecto significativo en comparación con el control.

Cuadro 5: Evaluación sensorial de la apariencia, color, sabores extraños y turgencia en brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 7 días (apariciencia y color) y 1 día (sabores extraños y turgencia) de almacenamiento.

	Tratamiento	Tiempo (d)		
		1	5	7
Apariciencia	HS 100	12,2 ab ¹	8,2 b	9,3 b
	PH 50	10,6 b	7,9 b	4,4 c
	AL 17	3,6 c	1,1 c	0,5 d
	AC 5000	13,7 a	11,4 a	11,9 a
	AC 10000	13,6 a	12,5 a	12,8 a
Color	HS 100	13,2 a	6,9 b	7,9 b
	PH 50	12,1 a	6,4 bc	3,9 c
	AL 17	11,9 a	3,4 c	1,2 c
	AC 5000	13,5 a	11,4 a	10,9 ab
	AC 10000	12,9 a	12,3 a	11,9 a
Sabores extraños	HS 100	12,4 a		
	PH 50	12,4 a		
	AL 17	5,4 b		
	AC 5000	12,5 a		
	AC 10000	7,9 ab		
Turgencia	HS 100	12,3 a		
	PH 50	11,8 a		
	AL 17	10,2 a		
	AC 5000	13,2 a		
	AC 10000	12,4 a		

¹ Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticas $p < 0,05$ entre tratamientos

Análisis de los resultados por componentes principales

El 95% de la variabilidad total es explicada por los tres primeros componentes principales (CP). El CP1 que explica el 60% de la variabilidad total, se encuentra definido por el color y la apariencia del producto en su orientación negativa, permite separar los brotes de alfalfa

tratados con AC 5000, AC 10000 y HS 100 en el día 1. El CP3 que explica el 14% de la variabilidad total y está definido en su orientación positiva por la turgencia del producto, permite separar los brotes de alfalfa tratados con PH 50 en el día 1 del resto (Figura 21).

Estos resultados concuerdan con los resultados del análisis estadístico univariante y con el análisis por componentes principales del ensayo I, lo cual permite comprobar que los tratamientos HS 100, AC 5000 y AC 10000 presentaron una mejor apariencia y permiten conservar el color a lo largo del almacenamiento de los brotes.

A través del análisis multivariante fue posible apreciar la alta correlación ($r= 0,80$) entre los parámetros visuales (apariciencia y color) y una correlación moderada ($r= 0,54$) entre apariciencia y turgencia del producto.

La apariciencia de un vegetal MPF es el atributo que impacta de manera fuerte e inmediata al consumidor, lo cual tiene un efecto en la decisión de compra. Muchos factores que no se encuentran vinculados directamente, influyen en la apariciencia de un producto, estos factores van desde los efectos relacionados con las heridas provocadas durante el procesamiento hasta la deshidratación y la colonización microbiana del producto. Estos factores tienen causas diferentes, y efectos diferentes, pero todos convergen en la obtención de un producto poco atractivo (Toivonen y Brummell, 2008).

Investigaciones anteriores (Jacxsens *et al.*, 2003) realizadas en lechuga MPF envasada en AM almacenada durante 6 días a 7 °C, revelan que la apariciencia del producto calificada por los panelistas como “inaceptable” se basó en el olor de éste, el cual fue descrito como “mohoso”, los autores de esta investigación postulan que la presencia de este olor “mohoso” se generó probablemente por la producción de compuestos volátiles del metabolismo de la planta y/o del metabolismo microbiano.

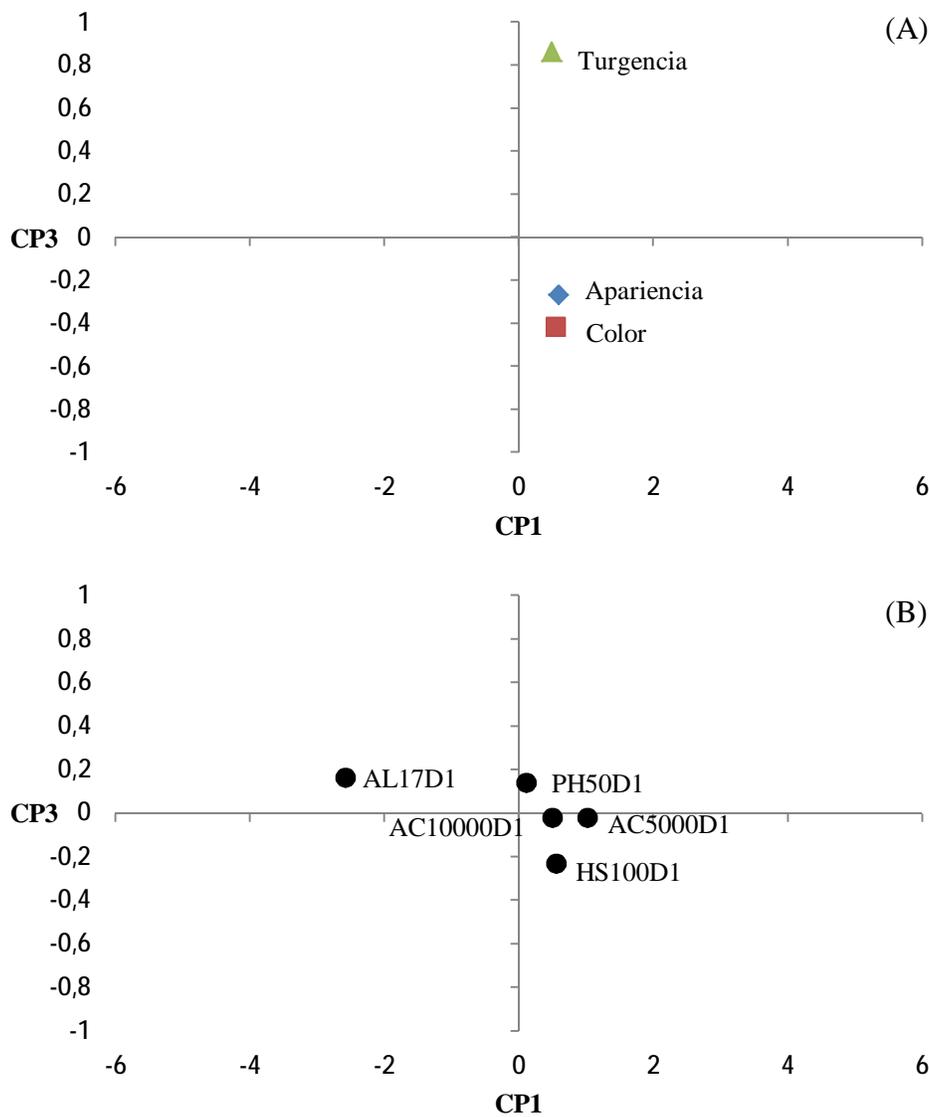


Figura 21. “Biplot” del análisis de los resultados por componentes principales (A) y (B) de los atributos de apariencia, turgencia y color evaluados sensorialmente en brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 1 día de almacenamiento. Los valores corresponden al centroide de la muestra ($n=12$) \pm error estándar.

Contenido de fenoles totales: El contenido de fenoles totales que presentó la materia prima fue de 2,0 mg EAG g_{pf}^{-1} , lo cual es más alto que el de los brotes tratados con sanitizantes. Al inicio del ensayo no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 6, Apéndice II), sin embargo fue notorio el efecto que provocaron las soluciones sanitizantes sobre la disminución del contenido fenólico en brotes de alfalfa. Para el final del ensayo (día 7) se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, en donde el control (HS 100) disminuyó 0,2 mg EAG g_{pf}^{-1} desde el inicio al término de la conservación de los brotes de alfalfa, mostrándose como el tratamiento menos afectado por el tiempo en cuanto al contenido de fenoles totales (Figura 22). Los

tratamientos restantes mostraron una disminución significativa entre 0,4 y 0,7 mg EAG $\text{g}_{\text{pf}}^{-1}$ a lo largo de su almacenamiento a 5 °C.

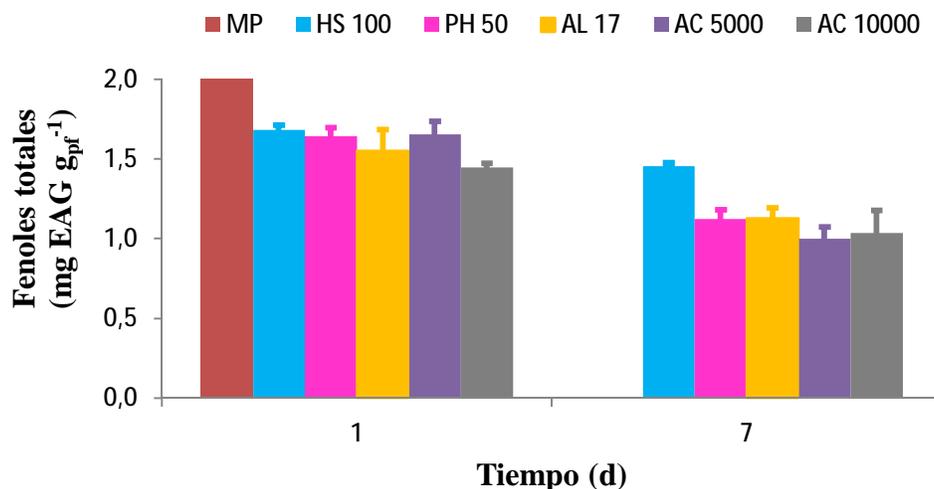


Figura 22. Contenido de fenoles totales de brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes conservados a 5 °C durante 7 días. Los valores corresponden a la media ($n=3$) \pm error estándar.

En un estudio anterior se observó que el contenido fenólico de brotes de alfalfa a los 7 días fue de 1,2 mg EAC $\text{g}_{\text{pf}}^{-1}$ (Equivalentes de Ácido Clorogénico) $\text{g}_{\text{pf}}^{-1}$, mientras que para semillas de alfalfa fue de 0,02 mg EAC semilla^{-1} , por lo que los fenoles durante la germinación de las semillas aumentan, dando como resultado una mejora en sus propiedades nutraceuticas (Cevallos-Casals y Cisneros -Zevallos, 2010).

De acuerdo a lo propuesto por López-Gálvez *et al.* (2010) el contenido fenólico inicial de lechuga MPF obtuvo un valor de $0,20 \pm 0,9$ mg EAC $\text{g}_{\text{pf}}^{-1}$, el cual fue muy similar a los resultados obtenidos en lechuga lavada con agua potable, dióxido de cloro (3 mg L^{-1}) e hipoclorito de sodio (100 mg L^{-1}), los cuales se mantuvieron en un rango desde $0,29 \pm 2,7$ hasta $0,23 \pm 3,4$ mg EAC $\text{g}_{\text{pf}}^{-1}$. En general el contenido de fenoles totales de lechuga MPF no se vio afectado por ninguna de las soluciones sanitizantes aplicadas.

Actividad antioxidante total: La materia prima presentó una actividad antioxidante de 1,5 mg ET $\text{g}_{\text{pf}}^{-1}$ (Equivalentes de Trolox). La aplicación de soluciones sanitizantes sobre los brotes de alfalfa provocó una baja de la actividad antioxidante total en todos los tratamientos (Figura 23). Al inicio del ensayo (día 1) no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 5, Apéndice II). No obstante, el tratamiento control (HS 100) fue el más afectado por el tiempo, presentando una disminución de 0,9 mg ET $\text{g}_{\text{pf}}^{-1}$ desde el día 1 al día 7, respectivamente; por el contrario los brotes tratados con AC 10000 presentaron una disminución de la actividad antioxidante de 0,1 mg ET $\text{g}_{\text{pf}}^{-1}$ desde el día 1 hasta el término del almacenamiento a 5 °C (Cuadro 6, Apéndice II).

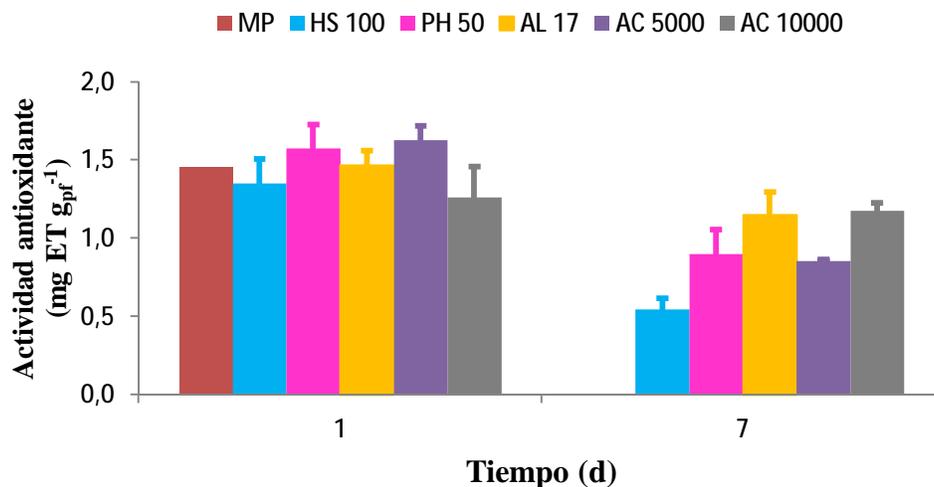


Figura 23. Actividad antioxidante total de brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes conservados a 5 °C durante 7 días. Los valores corresponden a la media (n=3) ± error estándar.

La tendencia general en la actividad antioxidante total de hojas de mizuna MPF tratadas con agua electrolizada y agua no electrolizada con diferentes concentraciones de cloro (40, 70 y 100 mg L⁻¹), hasta el cuarto día de vida útil disminuyó gradualmente los valores iniciales (40-45%). Después de 11 días de almacenamiento a 5 °C se observó, una reducción general de 30 a 40% de la actividad antioxidante total inicial. Este hecho podría deberse a las pérdidas de vitamina C y carotenoides durante la vida útil del producto (Tomás-Callejas *et al.*, 2011).

CONCLUSIÓN ENSAYO II

La utilización de ácido láctico en una concentración de 17 mg L^{-1} fue efectiva al reducir las poblaciones microbianas de brotes de alfalfa, sin embargo la calidad sensorial se vio significativamente afectada por la aplicación de este sanitizante. La influencia del ácido láctico no afectó mayormente las características funcionales de los brotes de alfalfa.

La aplicación de ácido cítrico en concentraciones de 5000 y 10000 mg L^{-1} no logró disminuir las poblaciones microbianas de brotes de alfalfa a través del tiempo. Por otro lado, este sanitizante fue eficiente al reducir la tasa respiratoria y tuvo un efecto positivo en los atributos sensoriales del producto, sin diferencias significativas entre las concentraciones aplicadas, por lo que podría ser recomendado para mantener las características sensoriales de los brotes de alfalfa.

El peróxido de hidrógeno a una concentración de 50 mg L^{-1} no tuvo mayor efecto en la disminución de la carga microbiana, como tampoco en las características funcionales.

El hipoclorito de sodio en una concentración de 100 mg L^{-1} , ampliamente usada en la industria de los productos MPF, tiene un efecto positivo sobre la calidad y apariencia del producto provocada por una reducción en la tasa respiratoria y una baja en la carga microbiana, lo que resulta en una mejora en los niveles de aceptabilidad. También, este tratamiento fue el que menos afectó el contenido de fenoles totales durante la conservación de los brotes de alfalfa a $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Por lo tanto, la utilización de este sanitizante a una concentración de 100 mg L^{-1} sigue siendo la más recomendable para extender la vida útil de brotes de alfalfa MPF.

BIBLIOGRAFÍA

- Abadias, M., J. Usall, M. Anguera, C. Solsona and I. Viñas. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology* 123: 121–129.
- Able, A.J., L.S. Wong, A. Prasad and T.J. O'Hare. 2003. The effects of 1-methylcyclopropene on the shelf life of minimally processed leafy Asian vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 27: 157-161.
- Ahvenainen, R. 1996. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends in Food Science and Technology* 7: 179-187.
- Allende, A., E. Aguayo and F. Artés. 2004. Microbial and sensory quality of commercial fresh processed red lettuce throughout the production chain and shelf life. *International Journal of Food Microbiology* 91: 109-117.
- Allende, A., J. McEvoy, Y. Tao and Y.Luo. 2009. Antimicrobial effect of acidified sodium chlorite, sodium chlorite, sodium hypochlorite, and citric acid on *Escherichia coli* O157:H7 and natural microflora of fresh cilantro. *Food Control* 20: 230-234.
- Araya, E. 2006. Curso Evaluación Sensorial de los Alimentos. Guía de laboratorio. Departamento de Agroindustria y Enología. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. 68p.
- Artés, F., E. Aguayo, V.H. Escalona and P. Gómez. 2009. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biology and Technology* 51: 287-296.
- Becker B. and W.H. Holzapfel. 1997. Mikrobiologisches risiko von fertigverpackten keimlingen und maßnahmen zur reduzierung ihrer mikrobiellen belastung, *Archiv für Lebensmittelhygiene* 48: 73-96.
- Benzie, I.F. and J. J. Strain. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70–76.
- Beuchat, L.R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: A review. World Health Organization, Food and Safety Unit. University of Georgia, Griffin, Georgia, USA. Disponible en:
http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/surfac_decon/en/. Leído el 27 de julio de 2010.

Brenann, M., G. Le Port and R. Gormley. 2000. Post-harvest treatment with citric acid or hydrogen peroxide to extend the shelf life of fresh sliced mushrooms. *Journal of Food Science and Technology* 33: 285-289.

Butler, L.G. 1992. Protein polyphenol interactions: nutritional aspects. p 18-23. In: *Proceedings of the 16th International Conference of Grape Polyphenol*. Lisboa, Portugal. July 13-16, 1992. Lisboa, Portugal.

Cameron, A.C., P.C Talasila and D.W. Joles. 1995. Predicting film permeability needs for modified-atmosphere packaging of lightly processed fruit and vegetables. *HortScience* 30: 25-34.

Cantwell, M. 1996. Fresh-cut biology and requirements. In *Fresh-cut products: Maintaining quality and safety*. Postharvest Horticultures Series. University of California, Davis, CA, Vol. 10, pp 7.2-7.7.

Castañer, M., M.I. Gil, F. Artés and F.A. Tomas-Barberan. 1996. Inhibition of browning of harvested head lettuce. *Journal of Food Science* 61: 314-316.

Cevallos-Casals, B.A. and L. Cisneros-Zevallos. 2010. Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. *Food Chemistry* 119: 1485-1490.

Chen, Z., C. Zhu, Y. Zhang, D. Niu and J. Du. 2010. Effects of aqueous chlorine dioxide treatment on enzymatic browning and shelf-life of fresh-cut asparagus lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Postharvest Biology and Technology* 58: 232-238.

Fan, X., B. A. Niemira, C. J. Doona, F. E. Feeherry and R. B. Gravani. Editors. 2009. *Microbial safety of fresh produce*. Wiley-Blackwell. Oxford, UK. 446 p.

Fan S, D.G. Bielenberg, T.N. Zhebentyayeva, G.L. Reighard, W.R. Okie, D. Holland, A.G. Abbott. 2010. Mapping quantitative trait loci associated with chilling requirement, heat requirement and bloom date in peach (*Prunus persica*). *New Phytologist* 185: 917-930.

Gómez-López, V.M., P. Ragaert, J. Debevere and F. Devlieghere. 2008. Decontamination methods to prolong the shelf-life of minimally processed vegetables, state-of-art. *Food Science and Nutrition* 48: 487-495.

Harris, K., M.F. Miller, G.H. Loneragan and M.M. Brashead. 2006. Validation of the use of organic acids and acidified sodium chlorite to reduce *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in beef trim and ground beef in a simulated processing environment. *Journal of Food Protection* 69: 1802-1807.

Hertog, M. 2003. MAP performance under dynamic temperature conditions. In: *Novel food packaging techniques*. Edited by Ahvenainen. Cambridge, England: Wood Publishing, 563-575.

Jacxsens, L., F. Devlieghere, P. Ragaert, E. Vanneste and J. Debevere. 2003. Relation between microbiological quality, metabolite production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh-cut produce. *International Journal of Food Microbiology* 83: 263-280.

Jiang, Y., L. Pen and J. Li. 2004. Use of citric acid for shelf life and quality maintenance of fresh-cut Chinese water chestnut. *Journal of Food Engineering* 63: 325-328.

Jung, Y.S. and L.R. Beuchat. 2000. Sensitivity of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 to organic acids and thermal inactivation in liquid egg products. *Food Microbiology* 17: 63-71.

Kader, A. 2002. Tecnología postcosecha de cultivos hortofrutícolas. Universidad de California, Davis. Estados Unidos. 570 p.

Kim, J. G., Y. Luo and Y. Tao. 2007. Effect of the sequential treatment of 1-methylcyclopropene and acidified sodium chlorite on microbial growth and quality of fresh-cut cilantro. *Postharvest Biology and Technology* 46: 144-149.

Koivunen, J. and H. Heinone-Tanski. 2005. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. *Water Research* 39: 1519-1526.

Koukounaras, A., A.S. Siomos and E. Sfakiotakis. 2010. Effects of degree of cutting and storage on atmosphere composition, metabolic activity and quality of rocket leaves under modified atmosphere packaging. *Journal of Food Quality* 33: 303-316.

Longley, K. E. 1978. The role of mixing in wastewater disinfection. *Journal of the American Water Works Association* 74: 376-390.

López-Gálvez, F., A. Allende, P. Truchado, A. Martínez-Sánchez, J.A. Tudela, V. Selma and M.I. Gil. 2010. Suitability of aqueous chlorine dioxide versus sodium hypochlorite as an effective sanitizer for preserving quality of fresh-cut lettuce while avoiding by-product formation. *Postharvest Biology and Technology* 55: 53-60.

Martín-Belloso, O. and R.C. Soliva-Fortuny. 2003. New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science and Technology* 14: 341-353.

Martínez-Sánchez, A., A. Allende R.N. Bennett, F. Ferreres and M.I. Gil. 2006. Microbial, nutritional and sensory quality of rocket leaves as affected by different sanitizers. *Postharvest Biology and Technology* 42: 86-97.

Martínez-Sánchez, A. 2008. Caracterización de compuestos bioactivos en crucíferas de uso en IV gama: Aspectos relacionados con la fisiología y tecnología postrecolección Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena, Departamento de Ingeniería de Alimentos y Equipamiento Agrícola. Cartagena, España. 267 p.

Martínez-Sánchez, A.A., A. Allende, Y. Cortés-Galera and M.I. Gil. 2008. Respiration rate response of four baby leaf *Brassica* species to cutting at harvest and fresh-cut washing. *Postharvest Biology and Technology* 47: 382-388.

Mastromatteo, M., A. Conte and M.A. Del Nobile. 2009. Preservation of fresh-cut produce using natural compounds. *Stewart Postharvest Review* 4: 1-7.

Ministerio de Salud. Chile. 1997. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Disponible en: http://www.minsal.cl/ici/S_1/salud_ambiental/Ds977.pdf. Leído el 1 Agosto 2009.

Nguyen-the, C. and F. Carlin. 1994. The microbiology of minimally processed fresh and fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34: 371-401.

Oliveira, F.A.R., J.C. Montanez, J. Frias and P.V. Mahajan. 2007. Development of user-friendly software for desing of modified atmosphere packaging for fresh and fresh-cut produce. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8: 84-92.

Ölmez, H. and U. Kretzschmar. 2009. Potential alternative disinfection method for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT-Food Science and Technology* 42: 686-693.

Park, C.M., Y.C. Hung, G.O.I. Ezeike and C.Kim. 2001. Pathogen reduction and quality of lettuce treated with electrolyzed oxidizing and acidified chlorinated water. *Journal of Food Microbiology and Safety* 66: 1368-1372.

Peñas, E., R. Gómez, J. Frías and C. Vidal-Valverde. 2008. Application of high-pressure treatment on alfalfa (*Medicago sativa*) and mung bean (*Vigna radiata*) seeds to enhance the microbial safety on their sprouts. *Food Control* 19: 698-705.

Ragaert, P., F. Devlieghere and J. Debevere. 2007. Role of microbiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 44: 185-194.

Reyes, L.F and L. Cisneros-Zevallos. 2003. Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5296-5300.

Ricke, S.C. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobial. *Poultry Science* 82: 632-639.

Rodríguez-Hidalgo, S., A.C. Silveira, F. Artés Hernández y F. Artés Calero. 2006. Evolución de la calidad de cuatro variedades de espinaca “baby” cultivadas en bandejas flotantes y mínimamente procesadas en fresco. En: III Simposio Nacional y V Ibérico de Maduración y Postrecolección del 27 al 30 de Septiembre de 2006. Universidad Miguel Hernández. Departamento de Tecnología Agroalimentaria. Disponible en: <http://repositorio.bib.upct.es/dspace/handle/10317/493>. Leído el 28 de junio de 2011.

Ryu, J-H., Y. Deng and L.R. Beuchat 1999. Behavior of acid-adapted and unadapted *Escherichia coli* O157:H7 when exposed to reduced pH achieved with various organic acids. *Journal of Food Protection* 62: 451-455.

Shah, N.S. and N. Nath. 2006. Minimally processed fruits and vegetables freshness with convenience. *Journal of Food Science and Technology* 43: 561-570.

Singleton, V.L. and J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-157.

Siriphanich, J. and A.A. Kader. 1985. Effects of CO₂ on total phenolics, phenylalanine ammonia lyase, and polyphenol oxidase in lettuce tissue. *Journal of American Society Horticulture Sciences* 110: 249-253.

Taormina, P.J. and L.R. Beuchat. 1999. Comparison of chemical treatments to eliminate enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *Journal of Food Protection* 62: 318-24.

Taormina, P.J., L.R. Beuchat and L. Slutsker. 1999. Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. Centers for Disease Control and Prevention. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no5/taormina.htm>. Leído el 7 de Junio de 2010.

Toivonen, P.M.A. and D.A. Brumell. 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit en vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 48: 1-14.

Tomás-Callejas, A. G.B. Martínez-Hernández, F.Artés and F.Artés-Hernández. 2011. Neutral and acid electrolyzed water as emergent sanitizers for fresh-cut mizuna baby leaves. *Postharvest Biology and Technology* 59: 298-306.

Tournal V.H. 2005. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. *International Journal of Food Microbiology* 99: 71-77.

Tsimidou, M. 1998. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Journal of Food Science* 10: 99-116.

Ukuku, D.O. and G.M. Sapers. 2001. Effect of sanitizer treatments on *Salmonella* Stanley attached to the surface of cantaloupe and cell transfer to fresh-cut tissues during cutting practices. *Journal of Food Protection* 64: 1286-1291.

Ukuku, D.O. 2004. Effect hydrogen peroxide treatment on microbial quality and appearance of whole and fresh-cut melons contaminated with *Salmonella* spp. *International of Journal of Food Microbiology* 95: 137-146.

Vandekinderen, I., F. Devlieghere, B. De Meulenaer, K. Veramme, P. Ragaert and J. Van Camp. 2008a. Impact of decontamination agents and a packaging delay on the respiration rate of fresh-cut produce. *Postharvest Biology and Technology* 49: 277-282.

Vandekinderen, I., J. Van Camp, F. Devlieghere, K. Veramme, Q. Denon, P. Ragaert and B. De Meulenaer. 2008b. Effect of decontamination agents on the microbial population, sensorial quality, and nutrient content of grated carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 5723-5731.

Velázquez, L.d.C., N.B. Barbini, M.E. Escudero, C.L Estrada and A.M. Stefanini de Guzmán. 2009. Evaluation of chlorine, benzalkonium chloride and lactic acid as sanitizers for reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* on fresh vegetables. *Food Control* 20: 262-268.

Waje, C.K., S.Y. Jen, Y.K. Lee, B.N. Kim, D.H. Han, C. Jo and J.H Kwon. 2009. Microbial quality assessment and pathogen inactivation by electron beam and gamma irradiation of commercial seed sprouts. *Food Control* 20: 200-204.

Wiley, R. 1994. Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables. Introduction to minimally processed refrigerated fruits and vegetables. Chapman & Hall, New York, 4p.

Wiley, R. 1997. Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas. Acribia. Zaragoza, España. 360 p.

Zabaleta, J., A.M. Muñoz, T. Blanco, C. Alvarado-Ortiz y B. Loja. 2005. Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Revista Horizonte Médico* 2: 29-38.

Zagory, D. 1999. Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. *Postharvest Biology and Technology* 15: 313-321.

ANEXO I

Reglamento sanitario de los alimentos, Ministerio de Salud, decreto n° 977/96.
Especificaciones microbiológicas por grupo de alimentos.

Frutas y otros vegetales comestibles pre-elaborados, listos para el consumo

Plan de muestreo

Parámetro	Categoría	Clases	n	c	Límite por gramo	
					m	M
RAM	6	3	5	1	5×10^4 (4,7log)	5×10^5 (5,7 log)
Enterobacteriaceas	6	3	5	1	5×10^3 (3,7 log)	5×10^4 (4,7 log)
E.coli	6	3	5	1	10	10^2
S.aureus	6	3	5	1	10	10^2
Salmonella en 25 g	10	2	5	0	0	---

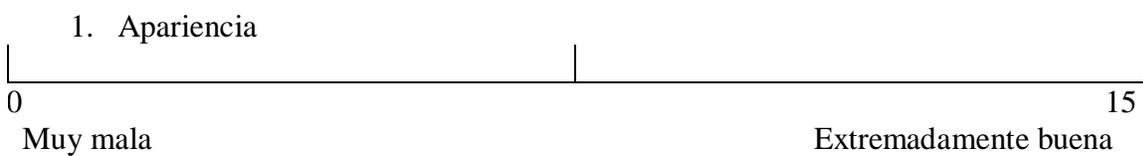
n: número de muestras a ser examinadas; m: valor del parámetro microbiológico para el cual o por debajo del cual el alimento no representa un riesgo para la salud; c: número máximo de unidades de muestra que puede contener un número de microorganismos comprendidos entre “m” y “M” para que el alimento sea aceptable; M: valor del parámetro microbiológico por encima del cual el alimento representa un riesgo para la salud. **Grados de calidad:** “aceptable”: valores entre 0 y m; “medianamente aceptable”: valores entre m y M; “rechazable”: valores superiores a M. (Reglamento Sanitario de los Alimentos, Ministerio de Salud Pública, Chile, 1997).

ANEXO II

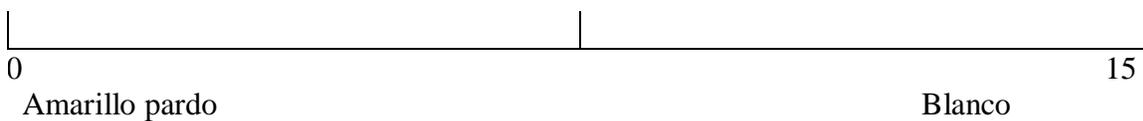
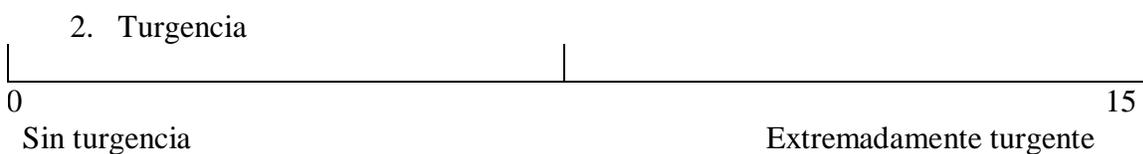
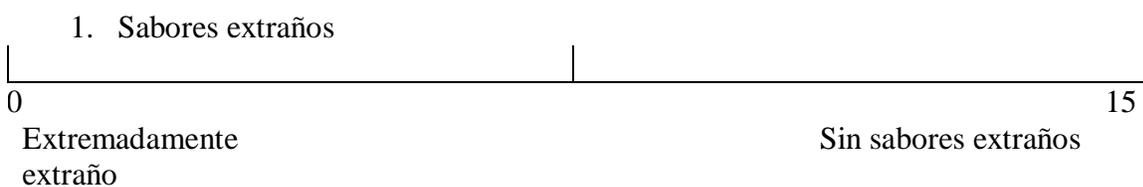
EVALUACIÓN DE CALIDAD PANEL ENTRENADO

Nombre:.....Fecha:.....

Muestra N° ____

Aspecto visual

Intensidad color

Aspecto gustativo

Comentarios: _____

ANEXO III

Pauta de valores para Evaluación Sensorial en brotes de alfalfa:

Apariencia

Muy mala	0 – 1,75
Mala	1,76 – 3,50
Deficiente	3,51 – 5,24
Menos que regular	5,25 – 6,99
Regular	7,00 – 7,99
Más que regular	8,00 – 9,75
Buena	9,76 – 11,50
Muy buena	11,51 – 13,25
Excelente	13,26 – 15

Intensidad de color

Negativo	0 – 0,94
Ordinario	0,95 – 1,88
Insuficiente	1,89 – 3,75
Suficiente	3,76 – 7,50
Bueno	7,52 – 11,25
Muy bueno	11,26 – 13,13
Excelente	13,12 – 15

Sabores extraños

Extremadamente alto	0 – 1,75
Muy alto	1,76 – 3,50
Alto	3,51 – 5,24
Levemente alto	5,25 – 6,99
Moderado, normal	7,00 – 7,99
Levemente bajo, suave	8,00 – 9,75
Bajo, suave	9,76 – 11,50
Muy bajo, suave	11,51 – 13,25
Sin sabor extraño	13,26 – 15,00

Turgencia

Sin turgencia	0 – 1,75
Muy baja	1,76 – 3,50
Baja	3,51 – 5,24
Levemente baja	5,25 – 6,99
Moderada, normal	7,00 – 7,99
Levemente alta	8,00 – 9,75

Alta	9,76 – 11,50
Muy alta	11,51 – 13,25
Extremadamente alta	13,26 – 15,00

Fuente: Araya (2006).

APÉNDICE I

Cuadro 1. Tasa respiratoria de los brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 12 días.

	Tasa respiratoria (mg CO ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹)					
	Día 0	Día 1	Día 5	Día 8	Día 12	
Sanitizante (S)						
Peróxido de hidrógeno (PH)	77,1	53,4	b 44,0	42,3	ab 42,3	ab
Ácido Láctico (AL)	75,4	58,2	b 35,6	47,8	a 47,0	a
Ácido Cítrico (AC)	73,6	86,1	a 37,4	29,5	b 36,5	b
Concentración (C)						
1	78,8	a ¹ 67,0	40,6	42,0	43,9	
2	71,9	b 64,7	37,4	37,8	39,9	
Interacción (SxC)						
PH 1	81,8	53,4	39,2	ab 37,5	45,3	
PH 2	72,3	53,4	48,9	a 47,1	39,2	
AL 1	81,5	61,7	42,1	ab 56,3	49,6	
AL 2	69,4	54,6	29,1	b 39,3	44,3	
AC 1	73,2	86,0	40,6	ab 32,2	36,8	
AC 2	74,0	86,1	34,2	b 26,9	36,1	
Nivel de significancia						
S	NS	****	*	*	*	
C	*	NS	NS	NS	NS	
SxC	NS	NS	**	NS	NS	

¹ Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticas $p < 0,05$ para cada factor.

NS, *, **, ***, ****. No significativo o significativo para $p < 0,05, 0,01, 0,001$ ó $0,0001$ respectivamente.

Cuadro 2. Tasa respiratoria de los brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 12 días.

Tratamiento	Tasa respiratoria (mg CO ₂ Kg ⁻¹ h ⁻¹)				
	Día 0	Día 1	Día 5	Día 8	Día 12
PH 1	81,8	53,4	39,2	37,5	45,3
PH 2	72,3	53,4	48,9	47,1	39,2
AL 1	81,5	61,7	42,1	56,3	49,6
AL 2	69,4	54,6	29,1	39,3	44,3
AC 1	73,2	86,0 *	40,6	32,2	36,8
AC 2	74,0	86,1 *	34,2	26,9	36,1
HS 100	76,3	53,8	39,8	37,0	37,4

* En sentido vertical indican diferencias estadísticas $p < 0,05$.

Cuadro 3. Concentración de oxígeno en la atmósfera interna de los brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 12 días.

	Atmósfera modificada (% O ₂)			
	Día 1	Día 5	Día 8	Día 12
Sanitizante (S)				
Peróxido de hidrógeno (PH)	17,3	11,9	10,3	7,5
Ácido Láctico (AL)	17,4	13,1	12,2	10,5
Ácido Cítrico (AC)	15,8	12,0	14,5	13,2
Concentración (C)				
1	16,7	11,2	11,5	11,2
2	17,0	13,5	13,2	9,6
Interacción (SxC)				
PH 1	17,8	a ₁ 11,7	9,6	8,3
PH 2	16,8	ab 12,1	11,0	6,7
AL 1	17,4	a 10,6	11,1	11,7
AL 2	17,4	a 15,6	13,3	9,3
AC 1	14,8	b 11,1	13,7	13,7
AC 2	16,8	ab 12,8	15,2	12,7
Nivel de significancia				
S	*	NS	*	****
C	NS	NS	NS	NS
SxC	*	NS	NS	NS

¹ Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticas $p < 0,05$ para cada factor.

NS, *, **, ***, ****. No significativo o significativo para $p < 0,05, 0,01, 0,001$ ó $0,0001$ respectivamente.

Cuadro 4. Concentración de dióxido de carbono en la atmósfera interna de los brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 12 días.

	Atmósfera modificada (% CO ₂)			
	Día 1	Día 5	Día 8	Día 12
Sanitizante (S)				
Peróxido de hidrógeno (PH)	1,9	2,6	3,3	3,4
Ácido Láctico (AL)	2,2	2,2	2,7	2,8
Ácido Cítrico (AC)	3,1	2,4	2,0	2,0
Concentración (C)				
1	2,4	2,4	2,8	2,7
2	2,5	2,4	2,5	2,8
Interacción (SxC)				
PH 1	1,9	2,3 ab	3,2 a	3,3
PH 2	2,0	2,8 a	3,5 a	3,5
AL 1	2,2	2,6 a	3,4 a	2,8
AL 2	2,3	1,8 b	2,0 b	2,8
AC 1	3,0	2,3 ab	2,0 b	1,9
AC 2	3,1	2,6 ab	2,1 b	2,1
Nivel de significancia				
S	****	NS	****	****
C	NS	NS	NS	NS
SxC	NS	**	***	NS

¹ Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticas $p < 0,05$ para cada factor.

NS, *, **, ***, ****. No significativo o significativo para $p < 0,05, 0,01, 0,001$ ó $0,0001$ respectivamente.

Cuadro 5. Recuentos microbiológicos de microorganismos aerobios mesófilos en brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 12 días.

	Mesófilos (log ufc/g)			
	Día 1	Día 5	Día 8	Día 12
Sanitizante (S)				
Peróxido de hidrógeno (PH)	4,9 ab ¹	6,3	7,5 a	9,7
Acido Láctico (AL)	4,3 b	5,1	7,2 ab	9,0
Acido Cítrico (AC)	5,9 a	6,6	5,8 b	8,9
Concentración (C)				
1	5,7 a	6,0	7,2	9,5
2	4,4 b	5,9	6,5	8,9
Interacción (SxC)				
PH 1	6,2	6,3 ab	7,1	10,3
PH 2	3,6	6,3 ab	7,9	9,0
AL 1	4,6	5,5 bc	7,4	9,0
AL 2	4,1	4,6 c	7,0	9,1
AC 1	6,3	6,3 ab	6,9	9,2
AC 2	5,6	6,9 a	4,8	8,7
Nivel de significancia				
S	**	***	*	NS
C	**	NS	NS	NS
SxC	NS	*	NS	NS

¹Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticas $p < 0,05$ para cada factor NS, *, **, ***, ****. No significativo o significativo para $p < 0,05, 0,01, 0,001$ ó $0,0001$ respectivamente.

Cuadro 6. Recuentos microbiológicos de microorganismos psicrófilos en brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 12 días.

	Psicrófilos (log ufc/g)			
	Día 1	Día 5	Día 8	Día 12
Sanitizante (S)				
Peróxido de hidrógeno (PH)	4,2	6,9 a	5,8 a	8,3 b
Ácido Láctico (AL)	2,7	5,1 b	5,8 a	8,7 a
Ácido Cítrico (AC)	4,7	5,9 ab	4,7 a	8,3 b
Concentración (C)				
1	4,1	6,2	5,6	8,5
2	3,6	5,7	5,2	8,3
Interacción (SxC)				
PH 1	5,2 a ¹	6,9	5,9	8,4
PH 2	3,2 ab	7,0	5,6	8,3
AL 1	1,7 b	5,6	5,8	8,9
AL 2	3,7 a	4,5	5,7	8,5
AC 1	5,5 a	6,1	5,1	8,4
AC 2	3,9 a	5,7	4,4	8,2
Nivel de significancia				
S	***	*	*	**
C	NS	NS	NS	NS
SxC	***	NS	NS	NS

¹Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticas $p < 0,05$ para cada factor NS, *, **, ***, ****. No significativo o significativo para $p < 0,05, 0,01, 0,001$ ó $0,0001$ respectivamente.

Cuadro 7. Resultados de la evaluación sensorial de la apariencia de los brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 12 días.

	Apariencia			
	Día 1	Día 5	Día 8	Día 12
Sanitizante (S)				
Peróxido de hidrógeno (PH)	11,1 b ¹	8,3	9,5 b	5,9 b
Ácido Láctico (AL)	10,3 b	6,0	3,2 c	1,4 c
Ácido Cítrico (AC)	12,9 a	11,0	12,7 a	12,1 a
Concentración (C)				
1	11,9	9,0	8,8	7,5 a
2	10,9	7,8	8,0	5,4 b
Interacción (SxC)				
PH 1	11,5	5,5 b	9,3	7,0
PH 2	10,7	11,1 a	9,7	4,7
AL 1	11,2	10,9 a	4,0	2,3
AL 2	9,3	1,2 c	2,3	0,4
AC 1	13,1	10,8 a	13,2	13,0
AC 2	12,6	11,2 a	12,1	11,1
Nivel de significancia				
S	**	****	****	****
C	NS	ND	NS	****
SxC	NS	****	NS	NS

¹ Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticas $p < 0,05$ para cada factor NS, *, **, ***, ****. No significativo o significativo para $p < 0,05$, 0,01, 0,001 ó 0,0001 respectivamente.

Cuadro 8. Resultados del análisis sensorial del color de los brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a una temperatura de 5 °C durante 12 días.

	Color			
	Día 1	Día 5	Día 8	Día 12
Sanitizante (S)				
Peróxido de hidrógeno (PH)	10,1 ab ¹	7,7	8,3 b	5,2
Ácido Láctico (AL)	9,8 b	6,9	4,1 c	1,7
Ácido Cítrico (AC)	12,0 a	10,6	12,5 a	12,4
Concentración (C)				
1	10,9	9,3	8,3	7,4
2	10,3	7,5	8,3	5,5
Interacción (SxC)				
PH 1	10,3	6,8 ab	7,8	6,9 b
PH 2	9,8	8,6 a	8,8	3,5 c
AL 1	10,6	10,7 a	4,3	2,3 cd
AL 2	9,0	3,1 b	4,0	1,1 d
AC 1	11,9	10,5 a	12,9	13,0 a
AC 2	12,1	10,7 a	12,1	11,9 a
Nivel de significancia				
S	*	***	****	****
C	NS	*	NS	****
SxC	NS	****	NS	*

¹ Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticas $p < 0,05$ para cada factor NS, *, **, ***, ****. No significativo o significativo para $p < 0,05$, 0,01, 0,001 ó 0,0001 respectivamente.

Cuadro 9. Evaluación sensorial de los sabores extraños en brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 5 días.

	Sabores extraños			
	Día 1	Día 5	Día 8	Día 12
Sanitizante (S)				
Peróxido de hidrógeno (PH)	11,4	11,6 a ¹		
Ácido Láctico (AL)	11,3	7,3 b		
Acido Cítrico (AC)	10,3	10,6 a		
Concentración (C)				
1	11,6	10,2		
2	10,5	9,4		
Interacción (SxC)				
PH 1	10,7	11,6		
PH 2	12,2	11,6		
AL 1	12,3	8,8		
AL 2	10,4	5,7		
AC 1	11,8	10,3		
AC 2	8,8	10,9		
Nivel de significancia				
S	NS	**		
C	NS	NS		
SxC	NS	NS		

¹ Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticas $p < 0,05$ para cada factor
NS, *, **, ***, ****. No Significativo o significativo para $p < 0,05, 0,01, 0,001$ ó $0,0001$ respectivamente.

Cuadro 10. Evaluación sensorial de la turgencia de brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a una temperatura de 5 °C durante 5 días.

	Turgencia			
	Día 1	Día 5	Día 8	Día 12
Sanitizante (S)				
Peróxido de hidrógeno (PH)	11,9	11,2		
Acido Láctico (AL)	10,2	6,5		
Acido Cítrico (AC)	11,3	11,7		
Concentración (C)				
1	11,4	10,7		
2	10,9	8,9		
Interacción (SxC)				
PH 1	11,9	10,8 a ¹		
PH 2	11,9	11,6 a		
AL 1	10,8	9,1 a		
AL 2	9,5	3,9 b		
AC 1	11,5	12,1 a		
AC 2	11,2	11,3 a		
Nivel de significancia				
S	NS	****		
C	NS	NS		
SxC	NS	*		

¹ Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticas $p < 0,05$ para cada factor
NS, *, **, ***, ****. No Significativo o significativo para $p < 0,05, 0,01, 0,001$ ó $0,0001$ respectivamente.

APÉNDICE II

Cuadro 1. Evolución de la tasa respiratoria de los brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 7 días.

Tratamiento	Tasa respiratoria (mg CO ₂ Kg ⁻¹ h ⁻¹)			
	Tiempo (días)			
	Día 0	Día 1	Día 5	Día 7
HS 100	69,3 a ¹	46,7 a	36,0 a	29,5 a
PH 50	50,5 b	40,2 a	26,7 a	29,2 a
AL 17	48,4 b	39,0 a	33,3 a	25,7 a
AC 5000	70,4 a	52,7 a	31,7 a	28,4 a
AC 10000	70,8 a	51,8 a	39,8 a	28,4 a

¹ Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Cuadro 2. Composición de la atmósfera interna (%O₂ y %CO₂) de los brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 7 días.

Tratamiento	Atmósfera modificada (%)			
	Tiempo (días)			
		1	5	7
O ₂	HS 100	15,4 b ¹	9,1 b	7,4 a
	PH 50	16,5 ab	14,2 a	12,6 a
	AL 17	17,3 a	14,1 a	11,2 a
	AC 5000	16,4 ab	11,3 ab	10,2 a
	AC 10000	16,0 b	10,0 ab	9,8 a
CO ₂	HS 100	2,4 a ¹	3,0 b	3,0 b
	PH 50	1,7 b	3,7 a	4,3 a
	AL 17	1,7 b	2,3 c	3,8 a
	AC 5000	2,4 a	2,7 bc	1,9 c
	AC 10000	2,8 a	3,1 ab	2,4 bc

¹ Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Cuadro 3. Evolución de los parámetros de luminosidad, tono y croma del color de los brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 7 días.

		Color		
		Tiempo (días)		
	Tratamiento	1	5	7
Luminosidad (L*)	HS 100	62,3 a ¹	60,3 a	60,7 a
	PH 50	62,8 a	61,0 a	61,6 a
	AL 17	61,0 a	60,8 a	61,2 a
	AC 5000	63,2 a	59,7 a	59,9 a
	AC 10000	61,2 a	60,2 a	60,8 a
Tono (h)	HS 100	93,7 bc	91,5 b	94,2 ab
	PH 50	90,8 c	91,6 b	90,9 bc
	AL 17	87,6 d	89,7 b	89,4 c
	AC 5000	96,0 ab	96,7 a	94,8 a
	AC 10000	97,1 a	97,8 a	95,7 a
Croma (C*)	HS 100	12,7 b	16,5 ab	19,5 ab
	PH 50	13,4 b	17,7 a	22,6 a
	AL 17	16,4 a	19,1 a	18,8 bc
	AC 5000	12,5 b	14,1 b	14,2 d
	AC 10000	13,0 b	14,5 b	15,9 cd

¹ Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Cuadro 4. Recuento microbiano de enterobacterias en brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 7 días.

	Enterobacterias (log ufc g ⁻¹)		
	Tiempo (días)		
Tratamiento	1	5	7
HS 100	5,7 a ¹	6,6 b	7,0 a
PH 50	5,4 ab	7,3 ab	6,8 a
AL 17	4,8 b	5,3 c	6,7 a
AC 5000	5,3 ab	7,5 ab	7,1 a
AC 10000	5,0 ab	7,6 a	7,9 a

¹ Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Cuadro 5. Recuento de microorganismos psicrófilos en brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 7 días.

Tratamiento	Psicrófilos (log ufc g ⁻¹)		
	Tiempo (días)		
	1	5	7
HS 100	5,4 a ¹	6,2 a	6,6 a
PH 50	4,8 a	6,5 a	6,4 a
AL 17	2,9 b	4,6 b	6,2 b
AC 5000	5,3 a	6,4 a	6,5 a
AC 10000	4,8 a	6,5 a	6,7 a

¹ Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticas (p<0,05) entre tratamientos.

Cuadro 6. Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante total en brotes de alfalfa tratados con distintos sanitizantes y conservados a 5 °C durante 7 días.

Tratamiento	Compuestos funcionales		
	Tiempo (días)		
	1	7	
Fenoles totales mg EAG g ⁻¹	HS 100	1,7 a ¹	1,5 a
	PH 50	1,6 a	1,1 ab
	AL 17	1,6 a	1,1 ab
	AC 5000	1,7 a	1,0 b
	AC 10000	1,4 a	1,0 b
Actividad antioxidante mg ET g ⁻¹	HS 100	1,4 a	0,5 b
	PH 50	1,6 a	0,9 ab
	AL 17	1,5 a	1,2 a
	AC 5000	1,6 a	0,9 ab
	AC 10000	1,3 a	1,2 a

¹ Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias estadísticas (p<0,05) entre tratamientos.

