



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

EFICACIA DEL AGUA ELECTROLIZADA Y DEL DIOXIDO DE CLORO PARA LA
ELIMINACIÓN DE RESIDUOS DE FUNGICIDAS Y LA HIGIENIZACIÓN DE FRUTAS DE
HUESO

EFFECTIVENESS OF ELECTROLYZED WATER AND CHLORINE DIOXIDE
FOR FUNGICIDE RESIDUE REMOVAL AND SANITIZATION OF STONE FRUIT

Autor/es

LORENA GARCÍA PASCUAL

Director/es

ROSA ORIA ALMUDÍ
MARÍA EUGENIA VENTURINI CRESPO

Facultad de Veterinaria

2016

ÍNDICE

0. RESUMEN/ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Las frutas de hueso: características y producción	3
1.2. Microbiología de las frutas	4
1.3. Productos fitosanitarios o fungicidas	6
1.4. Tratamientos higienizantes	8
1.4.1. Desinfectantes a base de cloro	8
1.4.1.1. Hipoclorito de sodio	8
1.4.1.2. Dióxido de cloro	9
1.4.2. Agua electrolizada	10
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS	14
3.1. Material	14
3.1.1. Frutas	14
3.1.2. Obtención de suspensiones esporales	14
3.1.3. Equipo de agua electrolizada	14
3.1.4. Dióxido de cloro	16
3.1.5. Fungicidas	16
3.2. Desarrollo experimental	17
3.2.1. Actividad <i>in vitro</i> del agua electrolizada y del dióxido de cloro frente a esporas fúngicas	17
3.2.2. Eficacia <i>in vivo</i> del agua electrolizada y del dióxido de cloro para la reducción de la microbiota epífita superficial y de esporas de <i>M. fructicola</i>	18
3.2.2.1. Eficacia del agua electrolizada y del dióxido de cloro en la reducción de microorganismos presentes en la superficie de frutas de hueso	18
3.2.2.2. Eficacia del agua electrolizada para la eliminación de <i>M. fructicola</i> previamente inoculada en melocotón	19

3.2.3. Eficacia <i>in vivo</i> del agua electrolizada en la reducción de fungicidas e influencia del residuo de fludioxonil en el desarrollo de podredumbre por <i>M. fructicola</i>	19
3.2.3.1. Eficacia del lavado con agua electrolizada para la reducción de fludioxonil, ciprodinil, iprodiona y tebuconazol	20
3.2.3.2. Eficacia del uso de fludioxonil y el posterior lavado con agua electrolizada en la reducción de <i>M. fructicola</i>	20
3.3. Metodología	22
3.3.1. Calidad físico-química del agua electrolizada y de las soluciones de dióxido de cloro	22
3.3.2. Recuentos microbiológicos	23
3.3.3. Residuos de fungicidas	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. Actividad <i>in vitro</i> del agua electrolizada y del dióxido de cloro frente a esporas fúngicas	24
4.2. Eficacia <i>in vivo</i> del agua electrolizada y del dióxido de cloro para la reducción de la microbiota epífita superficial y de esporas de <i>M. fructicola</i>	25
4.2.1. Eficacia del agua electrolizada y del dióxido de cloro en la reducción de microorganismos presentes en la superficie de frutas de hueso	25
4.2.2. Eficacia del agua electrolizada para la eliminación de <i>M. fructicola</i> previamente inoculada en melocotón	29
4.3. Eficacia <i>in vivo</i> del agua electrolizada en la reducción de fungicidas e influencia del residuo de fludioxonil en el desarrollo de podredumbre por <i>M. fructicola</i>	30
4.3.1. Eficacia del lavado con agua electrolizada para la reducción de fludioxonil, ciprodinil, iprodiona y tebuconazol	30
4.3.2. Eficacia del uso de fludioxonil y el posterior lavado con agua electrolizada en la reducción de <i>M. fructicola</i>	33
5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	36
6. APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE	38
7. EVALUACIÓN Y SUGERENCIAS DE MEJORA	38
8. BIBLIOGRAFÍA	39
ANEXO I	A
ANEXO II	E
ANEXO III	F

0. RESUMEN / ABSTRACT

El objetivo de este trabajo ha sido determinar la eficacia del agua electrolizada (agua EO) para la higienización y la reducción de productos fitosanitarios en frutas de hueso, comparando su eficacia con la obtenida con el empleo del dióxido de cloro. Para ello, se han desarrollado las siguientes actividades: 1) un estudio de la actividad *in vitro* del agua EO y del dióxido de cloro frente a esporas fúngicas, 2) un estudio de la eficacia *in vivo* del agua EO y del dióxido de cloro para la reducción de la microbiota epífita superficial y de esporas de *M. fructicola* previamente inoculadas y 3) un estudio de la eficacia *in vivo* del agua EO y del dióxido de cloro en la reducción de fungicidas y posterior análisis del desarrollo de podredumbre por *M. fructicola* según la cantidad de residuo de fludioxonil presente.

El tratamiento con agua EO durante 10 minutos eliminó la totalidad de las esporas de *Monilinia laxa*, *M. fructicola*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*, siendo su eficacia mayor que la producida por el dióxido de cloro. En los estudios para la reducción de la microbiota epífita el tratamiento con agua EO durante 5 minutos elimina totalmente los mohos y levaduras en todas las frutas estudiadas (albaricoque, cereza, melocotón, nectarina y paraguayo) y reduce notablemente el diámetro de crecimiento fúngico (más de la mitad) de *M. fructicola* previamente inoculada en melocotón. En cuanto a los fungicidas, el agua EO reduce eficazmente las concentraciones de fludioxonil y ciprodinil mientras que el dióxido de cloro es más activo en la disminución de iprodiona y tebuconazol. Como era de esperar, la reducción en los niveles de fludioxonil por debajo de su límite máximo de residuos (10 mg/kg) previo a la comercialización conlleva una mayor infección por *M. fructicola*.

ABSTRACT

The objective of this work was to determine the effectiveness of electrolyzed water (EO water) for the decontamination and reduction of fungicides in stone fruits, comparing its effectiveness with that obtained with washed with chlorine dioxide. To this aim the following activities has been carried out: 1) a study of the *in vitro* activity of EO water and chlorine dioxide against fungal spores, 2) a study of the *in vivo* efficacy of EO water and chlorine dioxide for the reduction of the surface epiphytic

microbiota and of *M. fructicola* spores previously inoculated in the fruit and 3) a study of the *in vivo* efficacy of EO water and chlorine dioxide in reducing fungicides and subsequent analysis of the development of *M. fructicola* rot depending on the amount of fludioxonil residue present.

EO water treatment for 10 minutes completely removed *Monilinia laxa*, *M. fructicola*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* spores, being its effectiveness greater than that produced by chlorine dioxide. In the study to reduce the epiphytic microbiota, the treatment with EO water for 5 minutes completely eliminates molds and yeasts in all the fruits studied (apricot, cherry, peach, nectarine and flat peach) and significantly reduces the diameter of fungal growth (more than 50%) of *M. fructicola* previously inoculated in peach. EO water effectively reduces fludioxonil and cyprodinil concentrations while chlorine dioxide is more active in reducing iprodione and tebuconazole. As expected, the reduction of the levels of fludioxonil below the maximum residue limit (10 mg / kg) allows the development of *M. fructicola* during the commercialization.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LAS FRUTAS DE HUESO: CARACTERÍSTICAS Y PRODUCCIÓN

Las frutas de hueso son frutos carnosos de forma redondeada que tienen en su interior una única semilla envuelta en una capa leñosa dura o hueso. Entre ellas, destacan la cereza, el albaricoque, el melocotón, la ciruela, la nectarina y el paraguayo.

La producción total de frutas en Europa se reparte principalmente entre Italia, España y Francia. El sector de frutas y hortalizas en España constituye una actividad económica con un fuerte peso en la producción, exportación y el empleo agrario. La participación del sector en la Producción Vegetal Agrícola alcanzó 14.457 millones de euros en 2014, lo que representa el 59 % del total, según datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. En cuanto a la Producción Final Agraria, representa el 34 % del total. La producción de frutas y hortalizas destinadas al mercado fresco es estimada en 19 millones de toneladas. La exportación supone aproximadamente dos tercios de la facturación del sector, elevándose, en 2014, a 10.475 millones de euros.

La fruta de hueso es el principal cultivo de frutas no cítricas en España. Según la Encuesta sobre Superficies de Cultivo en España de 2013 del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, la superficie de cultivo en España del melocotonero-nectarino totalizó 82.124 hectáreas, la superficie de cerezo ascendió a 32.077 hectáreas, la de albaricoquero fue de 20.676 hectáreas y la de ciruelo de 14.086 hectáreas. En Aragón, la superficie dedicada al cultivo de los frutales de hueso supera las 27.500 hectáreas, de las que casi 18.000 son de melocotón o nectarina. El siguiente cultivo en importancia es el cerezo, con más de 7.000 hectáreas, seguido a mucha distancia por el albaricoquero y el ciruelo, con alrededor de 1.000 hectáreas cada uno.

España es el principal productor y exportador europeo de fruta de hueso, un producto que tiene una importancia estratégica en el sector agroalimentario español. En la actualidad, las producciones de melocotones, paraguayos, nectarinas, ciruelas y cerezas, entre otras frutas de hueso, son de gran importancia para el sector agrícola español, superando las 1,2 millones de toneladas en producción anual. El sector de la fruta de hueso es de vital importancia para la fruticultura española, por ser la fruta dulce de mayor superficie, mayor producción y de mayor exportación. Es la segunda especie

de fruta más exportada después de los cítricos. Según datos facilitados por la Federación Española de Asociaciones de Productores y Exportadores de Frutas y Hortalizas (FEPEX), las exportaciones en 2013 de frutas de hueso se situaron en 908.772 toneladas, de las que 406.908 corresponden a nectarina, 342.045 a melocotón, 71.652 a ciruelas, 61.763 a albaricoques y, por último, 26.394 a cerezas. En valor, las exportaciones españolas rozaron los mil millones de euros. La amplia oferta de variedades de frutas de hueso y el extenso calendario de comercialización son dos de las claves del éxito de este sector agrícola en España.

1.2. MICROBIOLOGÍA DE LAS FRUTAS

Desde el momento de la recolección, las frutas comienzan a sufrir un proceso de deterioro, de manera que disminuyen las barreras naturales que se oponen a la infección por mohos patógenos. Además, muchos de los cambios que se producen en el desarrollo del fruto que son deseables para alcanzar las condiciones organolépticas y nutritivas óptimas para el consumo, son también favorables para el desarrollo de las podredumbres fúngicas.

Las poblaciones microbianas en las frutas pueden verse influenciadas por numerosos factores, que incluyen el uso de estiércol como fertilizante, agua contaminada por productos agrícolas, equipos de cultivo contaminados, prácticas higiénicas de los trabajadores en el campo, en las envasadoras y en las plantas de procesado y la presencia de animales salvajes en los campos y en las envasadoras.

Son muchos los agentes etiológicos específicos que están relacionados con brotes asociados a dichos productos. En productos agrícolas contaminados relacionados con enfermedades humanas se han encontrado bacterias (*Salmonella* y *Shigella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica*), virus (calicivirus, el virus de la hepatitis A y norovirus) y parásitos (*Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*) (Beuchat, 2002; Sewell y Farber, 2001; Sivapalasingam *et al.*, 2004).

Quizás, las dos fuentes de patógenos más importantes antes de la recolección son el agua utilizada para la irrigación y para la aplicación de insecticidas y fungicidas y el estiércol aplicado como fertilizante. La mayoría de los microorganismos que han sido recuperados de frutas crudas durante la recolección no presentan un riesgo para la salud

humana, pero pueden causar deterioros. *Pseudomonas*, levaduras, mohos, *Bacillus*, *Erwinia*, *Xanthomonas* y *Clostridium* spp. representan la microbiología presente en la huerta, en el campo y en la viña durante la recolección. La contaminación en el campo puede llegar a ser un riesgo de alta magnitud si el microorganismo consigue acceder a áreas internas de la planta a través de lesiones de su superficie, ya que los patógenos situados internamente son difíciles de alcanzar con los desinfectantes (Sapers *et al.*, 2000).

Sin embargo, el principal problema para la conservación y comercialización de las frutas son las mermas producidas por las podredumbres post-cosecha, que se estiman entre un 10-20 % de la mercancía enviada a destino. En los estudios y prospecciones realizadas, se han identificado hasta 12 hongos causantes de esas podredumbre y, de ellos, los más importantes en frutas de hueso son *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa*, *Rhizopus stolonifer* y *Botrytis cinerea* (Figura 1), representando *Monilinia* más del 93 % de las podredumbres de fruta de hueso. *Monilinia* es una enfermedad presente en el campo y que, posteriormente, por contaminación de los frutos, pasa a la central. Para su control es necesario realizar un programa de control fitosanitario completo desde la caída de pétalos hasta la cosecha y, posteriormente, continuar con un tratamiento post-cosecha para conseguir un aumento de la vida comercial de la fruta. Hasta 2006, la podredumbre marrón en España estaba asociada casi en exclusiva (85-90 %) a la especie *M. laxa*, correspondiendo el resto a *M. fructigena*. Sin embargo, ese año se detectó por primera vez en España, así como en numerosos países de Europa, la especie *M. fructicola*. Esta especie posee las desventajas de que crece más rápidamente, posee una esporulación más abundante y las esporas generadas son más resistentes.



Figura 1. Podredumbre por *M. fructicola*, *R. stolonifer* y *B. cinerea* en frutas de hueso.

En Aragón, la enfermedad que produce más pérdidas en todas las especies es la producida por mohos del género *Monilinia* (*M. laxa* y *M. fructicola*, principalmente). La incidencia se agrava si durante el periodo previo a la recolección se suceden periodos húmedos. En melocotonero, nectarina y, particularmente, en albaricoquero, las pérdidas en la floración también llegan a ser importantes si las lluvias acompañan a este estado fenológico. En los últimos años se ha detectado un aumento de la presencia de *M. fructicola* en algunos municipios del valle del Cinca y del Bajo Aragón.

1.3. PRODUCTOS FITOSANITARIOS O FUNGICIDAS

Los pesticidas, plaguicidas o fitosanitarios son compuestos químicos que se aplican en los cultivos para protegerlos frente a las plagas y enfermedades que los dañan durante la cosecha y, en algunos casos, después de la cosecha. Según la FAO, actualmente las plagas y enfermedades arruinan entre un 25-35 % de la cosecha mundial y, las malas hierbas, un 10 %. Los pesticidas aumentan la producción mundial de alimentos al proteger contra plagas y enfermedades, mejoran el aspecto de los vegetales, contribuyen a alargar su vida comercial y protegen al consumidor de algunos peligros. Los residuos de pesticidas son pequeñas cantidades de pesticidas o sus productos de degradación que permanecen y se acumulan en los alimentos recolectados o almacenados, de forma que al ser ingeridos por el ser humano en grandes cantidades pueden afectar a su salud. La preocupación por sus posibles efectos nocivos en fruta adquiere especial importancia si tenemos en cuenta que la fruta suele ser consumida en fresco y la proximidad temporal entre la aplicación de los tratamientos y su consumo.

Tradicionalmente, y también hoy en día, el control de enfermedades post-cosecha en España se realiza mediante tratamientos en las centrales hortofrutícolas con fungicidas químicos de síntesis. Los tratamientos con fungicidas convencionales son típicamente persistentes, con acción curativa frente a infecciones fúngicas establecidas y preventiva frente a posibles infecciones posteriores a la aplicación. En España, la aplicación habitual se realiza en forma acuosa ('dréncher', baño, cortina de espuma o ducha en la línea de confección), incorporados a formulaciones de ceras, o gaseosa en forma de potes fumígenos. Aunque su efectividad depende de la dosis y del modo de aplicación, en general es elevada y las aplicaciones habituales no sobrepasan los LMRs establecidos por la legislación europea. Este factor, junto a su facilidad de aplicación y su precio razonable, ha contribuido a perpetuar el uso de estos productos químicos. La

aplicación masiva y continuada de materias activas ha provocado preocupación en la opinión pública por la generación de un exceso de residuos químicos y también problemas al sector, como el tratamiento de caldos residuales (obligatorio en la mayoría de casos para evitar la liberación de residuos químicos al medioambiente) o la proliferación de cepas patogénicas resistentes que reduce o anula la eficacia de los tratamientos.

En el contexto actual, el sector debe atenerse a las exigencias de una legislación que, haciéndose eco de las demandas de los consumidores, es y será cada vez más restrictiva en lo referente al uso de pesticidas. Así, a finales de 2009 se publicó en el Diario Oficial de la Unión Europea (UE) el nuevo Reglamento (CE) 1107/2009 sobre comercialización de productos fitosanitarios que deroga las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo y fue de aplicación a partir del 14 de junio de 2011. Su finalidad es garantizar un nivel elevado de protección de la salud humana y animal, así como del medio ambiente, y mejorar el funcionamiento del mercado interior mediante la armonización de las normas sobre la comercialización de productos fitosanitarios. En la práctica, ha supuesto la retirada o el rechazo del 66 % (741 de 1.119) de las sustancias activas revisadas. La Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo sobre el uso sostenible de los plaguicidas establece el marco de la actuación comunitaria en esta temática. Según ella, los estados miembros debieron adoptar antes del pasado 26 de noviembre de 2012 planes de acción nacionales (PAN) para fijar sus objetivos cuantitativos, metas, medidas, calendarios e indicadores, a fin de reducir los riesgos y los efectos de la utilización de plaguicidas en la salud humana y el medio ambiente. La existencia de diferencias entre los estados miembros de la UE con respecto a los contenidos máximos permitidos de estos residuos representa en algunos casos una barrera para el comercio y, en especial, para las exportaciones de nuestra fruta al resto de los países de la UE.

Aparte de los cambios legislativos, la utilización de fungicidas convencionales se ve influenciada por un marcado cambio de tendencia en la comercialización de productos hortofrutícolas, con dos consecuencias importantes. Por un lado, aumenta considerablemente el volumen de los mercados de producto ecológico, orgánico o ‘verde’, en los que se exige no sólo la ausencia total de residuos químicos en el producto final sino también la prohibición de su uso durante todo el ciclo de producción. Por otro lado, y lo que es muy grave para el sector productor español,

importantes mercados ‘tradicionales’, especialmente supermercados o cadenas alimentarias europeas, están exigiendo el cumplimiento de criterios propios más restrictivos que los LMRs establecidos por la legislación. A pesar de que, afortunadamente para el sector, varios fungicidas podrán seguir utilizándose durante los próximos años, la situación descrita del control químico convencional, tanto a nivel legal como comercial, social y técnico, establece un nuevo paradigma para el futuro cercano y hace evidente la necesidad de encontrar alternativas para el control de enfermedades de post-cosecha.

1.4. TRATAMIENTOS HIGIENIZANTES

Para asegurar la calidad e inocuidad de las frutas y hortalizas tras la cosecha es necesario minimizar la contaminación de los productos. A su vez, es de suma importancia reducir al máximo el inóculo de patógenos vegetales que puedan afectar a la calidad del producto durante el almacenamiento post-cosecha. Existen varios métodos para reducir la flora superficial de frutas y hortalizas y cada método tiene ventajas y desventajas dependiendo del tipo de producto y del proceso.

Los tratamientos con agentes desinfectantes se aplican en solución acuosa por inmersión o aspersión. El alcance del tratamiento depende del compuesto desinfectante y de los microorganismos que se quieran eliminar. Su eficacia varía con la concentración del agente y, en mayor o menor medida, con la temperatura, pH, tiempo de contacto y contenido de materia orgánica. Actualmente, existe una tendencia a reducir el número de tratamientos y sus dosis. Entre estos tratamientos destacan los desinfectantes a base de cloro y el agua electrolizada.

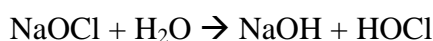
1.4.1. Desinfectantes a base de cloro

1.4.1.1. Hipoclorito de sodio

Los desinfectantes a base de cloro se han utilizado ampliamente para desinfectar los productos y las superficies dentro de las instalaciones de procesamiento, así como para reducir las poblaciones microbianas en agua durante varias décadas y son, quizás, los desinfectantes más utilizados en la industria alimentaria (Ogawa *et al.*, 1980; Walker y LaGrange 1991; Cherry, 1999). El cloro se obtiene como un gas (Cl_2) o como un líquido en forma de hipoclorito de sodio (NaOCl) o calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$). Generalmente es usado en una concentración de 50 a 200 ppm durante 1 o 2 minutos. La actividad

antimicrobiana depende del ácido hipocloroso (HOCl) presente en el agua, del pH, de la concentración de la materia orgánica y del grado de temperatura.

Por encima de pH 7,5 se produce muy poco ácido hipocloroso (HOCl), que es la forma activa, sino más bien hipoclorito (OCl^-) que es la forma inactiva. Si la concentración de cloro activo (ácido hipocloroso) no es lo suficientemente alta, no será efectivo como desinfectante. Por lo tanto, el pH del agua debe mantenerse entre 6 y 7,5 para asegurar la actividad del cloro (Sapers, 2001).



La concentración de cloro disponible determina el potencial de oxidación de la solución y el poder desinfectante. Aunque se requieren concentraciones mínimas de cloro disponible (1 ppm) para inactivar microorganismos en el agua limpia, se utilizan comúnmente concentraciones más altas para la mayoría de los productos básicos.

El cloro tiene acción antimicrobiana, inhibiendo las enzimas bacterianas esenciales y llevando a una oxidación irreversible de los grupos sulfhidrilo (SH). El hipoclorito de sodio neutraliza aminoácidos, formando agua y sal, y actúa como disolvente orgánico degradando ácidos grasos, transformándolos en sales de ácidos grasos y glicerol que reducen la tensión superficial (Estrela *et al.*, 2002).

Un gran inconveniente en el uso del hipoclorito de sodio es la formación de subproductos de desinfección, como los trihalometanos halogenados (THM) y los ácidos haloacéticos (HAA). La temperatura del agua, la cantidad de materia orgánica, la dosis de cloro, el pH, el tiempo de contacto y la concentración de iones bromuro son algunos factores que influyen en los niveles de los subproductos de desinfección.

1.4.1.2. Dióxido de cloro

El dióxido de cloro (ClO_2) es un oxidante que actúa como desinfectante fuerte y que ha ganado atención como sustituto para el cloro. Se utiliza principalmente para la desinfección de agua y puede ser aplicado para la descontaminación de frutas y vegetales en fases acuosas y gaseosas. El ClO_2 es un gas en sentido real, ya que se disuelve fácilmente en el agua sin reaccionar con ella. El número de oxidación de su átomo de cloro es +4, lo que determina la capacidad de oxidación.

El dióxido de cloro (ClO_2) es más eficaz contra muchas clases de microorganismos en concentraciones más bajas que el cloro libre. Sus principales ventajas sobre el HOCl incluyen la reactividad reducida con la materia orgánica y la mayor actividad a pH neutro. Por lo tanto, produce menos productos de reacción clorados, potencialmente cancerígenos, que el cloro (Tsai *et al.*, 1995; Rittman, 1997), a pesar de que su poder oxidante es 2,5 veces más alto que el de éste (Apel, 1993; White, 1992). Sin embargo, la baja estabilidad del dióxido de cloro puede ser un problema. Además, los sistemas de generación del dióxido de cloro son generalmente más caros que las del hipoclorito, ya que requieren la generación *in situ*, programas especializados de seguridad, así como sistemas de inyección de cierre para la contención de la fuga de concentrado y los vapores de volatilización. Sin embargo, se han estabilizado formulaciones líquidas, que son más baratas y fáciles de usar (Tecsca[®]Clor, Protecsa S.A.; ProMinent Gugal S.A.).

La inactivación bacteriana parece ser causada principalmente por la oxidación de proteínas de la membrana celular, lo que conduce a la pérdida de control de la permeabilidad (Berg *et al.*, 1986). El ClO_2 tiene un fuerte efecto en la degradación de proteínas complejas y en la inhibición de enzimas (Finnegan *et al.*, 2010). Los microorganismos son inactivados por la desnaturalización de proteínas críticas para su integridad y/o función, principalmente debido a la modificación covalente de triptófano y tirosina. También ocasiona daños en las esporas, ya que pueden iniciar la germinación, pero no completarla (Young y Setlow, 2003).

1.4.2. Agua electrolizada

El agua electrolizada es un caso especial de cloración que se ha introducido en las industrias de alimentos como un nuevo agente para desinfectar. El agua electrolizada se genera al pasar una solución de sal diluida (1 % NaCl) a través de una celda electroquímica donde el cátodo y el ánodo están separados por un diafragma (Guentzel *et al.*, 2008). La celda de electrolisis electroliza el agua, produciendo dos tipos de agua que poseen diferentes propiedades (Figura 2):

1. Una solución electrolizada básica (agua ER, AIEW o BEW) a partir de una corriente del cátodo ($\text{pH} > 11$ y $\text{ORP} < -800\text{mV}$), que tiene un fuerte potencial de reducción.

2. Una solución electrolizada ácida (agua AE o AcEW) de una corriente del ánodo (pH < 2,7, ORP > 1100mV y una base de cloro reactivo de 10-90 ppm) que tiene un fuerte efecto bactericida (Anonymus, 1997).

El agua electrolizada neutra (NEW) puede ser producida por diferentes métodos: no usando ninguna membrana de separación en la celda electrolítica que divida el producto (Venczel *et al.*, 1977), mediante la mezcla de aguas electrolizadas ácidas y alcalinas (Deza *et al.*, 2003; Rico *et al.*, 2008) o directamente desde el lado anódico de la celda (Guentzel *et al.*, 2008).

El agua NEW elimina todos los microbios accesibles, incluyendo las esporas y *Cryptosporidium* en cuestión de segundos. Esta solución débil pero activa de HOCl regresa a su estado anterior inmediatamente después de su uso. El ácido hipocloroso activado (HOCl) en el agua NEW es 400 % más eficaz que el formado químicamente con, por ejemplo, hipoclorito de sodio. El agua NEW alcanza un potencial redox de +900mV que directa e irreparablemente daña la pared celular microbiana. Además, la disposición de las moléculas de agua se altera electroquímicamente, permitiendo una mejor penetrabilidad y la interacción de los iones microbicidas. Esta es otra característica que no se encuentra en los desinfectantes convencionales.

El agua EO contiene cloro gas (Cl_2), HOCl y OCl^- . Todo ello contribuye a liberar cloro disponible, es decir, radicales de cloro no combinados (Len *et al.*, 2000). Un número significativo de científicos cree que el cloro, el pH y el ORP contribuyen a la desinfección (Al-Haq *et al.*, 2002); pero sobre todo la presencia de cloro y el alto ORP han demostrado su capacidad antimicrobiana. El ORP es un indicador de la capacidad de oxidar o reducir, ya que valores positivos y elevados están correlacionados con una mayor fuerza oxidante (McPherson, 1993; Robbs *et al.*, 1995; Jay, 1996).

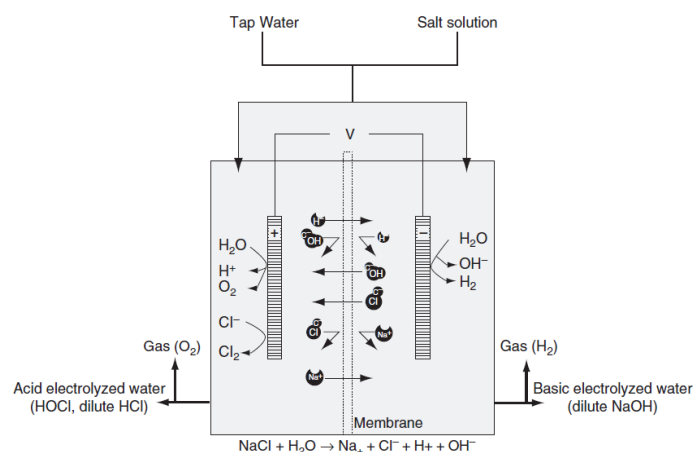


Figura 2. Esquema del generador de agua electrolizada y producción de compuestos. Reproducido por *Food Science and Technology Research* 11:2, Al-Haq *et al.* (2005) 'Applications of electrolyzed oxidizing water in agriculture and food industries' pp. 135-150.

2. OBJETIVOS

Los productores y comercializadores de frutos de hueso sufren importantes pérdidas económicas porque la fruta afectada por podredumbres debe desecharse y porque, además, la aparición de estas patologías lleva a la pérdida de confianza de distribuidores y clientes. La imposibilidad de aplicar sustancias fungicidas en la post-cosecha ha hecho necesaria la búsqueda de métodos alternativos de control. Se lleva investigando muchos años, pero la mayoría de las estrategias utilizadas (luz UV-C, agua caliente a 50-60 °C, ozono...) no consiguen evitar totalmente la aparición de la infección. Es por ello de gran interés encontrar un sistema de higienización que garantice la calidad del producto, tanto desde un punto de vista comercial como sanitario.

Con el aumento del consumo de frutas y hortalizas, la presencia de residuos de plaguicidas se ha convertido en un problema de salud para los consumidores debido a los riesgos adversos a largo plazo sobre la salud humana. Frutas y verduras se enjuagan tras la cosecha, pero el proceso suele tener poco efecto en la eliminación de plaguicidas. La legislación actual referente a la comercialización de fruta fresca establece diferentes tipos de exigencias con respecto a residuos de plaguicidas. Principalmente se relaciona o bien con los límites máximos de residuos (LMRs) o bien con el número de materias activas permitidas en función del país de destino. Por este motivo, resulta especialmente interesante el empleo de tecnologías que puedan ser fácilmente incorporadas al proceso productivo y que permitan reducir los residuos de pesticidas, asegurando la ausencia o mínima presencia de determinadas materias activas.

Actualmente, el agua electrolizada está generando unas altas expectativas en la desinfección de productos hortofrutícolas. Este agua se obtiene por la electrolisis de una solución de cloro y su principal característica es la elevada cantidad de ácido hipocloroso generada. Aparte de su potente acción antimicrobiana, el agua electrolizada que se usa como agente desinfectante también puede actuar como un agente oxidante que nos ayude a disminuir la concentración de fungicidas en los frutos. Otra especie oxidante que también se puede aplicar para la descontaminación y la reducción del contenido de pesticidas en las frutas es el dióxido de cloro. Esta sustancia es un poderoso oxidante que se aplica por su poder antimicrobiano y como alternativa al uso de hipoclorito sódico. Además, es mucho más estable, menos peligroso y más selectivo

que el ozono y el cloro, permitiendo que su dosificación sea menor y no afecta al sabor o el aroma del producto, por lo que su versatilidad es muy alta.

El objetivo general de este Trabajo Fin de Grado fue determinar la eficacia del agua electrolizada para la higienización de frutas de hueso y para la reducción de productos fitosanitarios, comparando su eficacia con la obtenida con los lavados con agua de red y con dióxido de cloro. Para ello, se desarrollaron tres acciones:

- 1) Determinar la actividad *in vitro* del agua electrolizada frente a esporas de *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*.
- 2) Establecer el efecto descontaminante del agua electrolizada en frutas de hueso, tanto sobre la contaminación natural presente en el fruto como sobre esporas de *M. fructicola* inoculadas de forma artificial previamente.
- 3) Estudiar la viabilidad del agua electrolizada para la reducción de distintos fungicidas (fludioxonil, ciprodinil, iprodiona y tebuconazol). Además, se comparó el grado de infección por *M. fructicola* con la presencia de más o menos residuo de fludioxonil (fungicida autorizado en la post-cosecha de frutas de hueso) durante un periodo de simulación de la comercialización.

Los experimentos desarrollados en este Trabajo Fin de Grado forman parte de las actuaciones incluidas en el marco del proyecto '*Zero Residues: towards a sustainable production and supply chain for stone fruit*', cofinanciado por el programa '*LIFE +*' de la Unión Europea.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Frutas

Este trabajo se llevó a cabo con diferentes frutas de hueso: cerezas (variedades Satín y Sonata), melocotones (variedades CG-58, Spring Flame y Rich Lady), nectarinas (variedades 696 y Nectafun), paraguayos (variedades 796 y Flatstar) y albaricoques (variedades Tsunami y Pink Cot).

Las cerezas y los melocotones de la variedad CG-58 fueron suministrados por la Central Hortofrutícola Lafuente Tomey situada en La Muela (Zaragoza). El resto de frutas fueron suministradas por la empresa FENIX FRESH, situada en Torres de Segre (Lleida).

3.1.2. Obtención de suspensiones esporales

Las soluciones esporales de *M. fructicola*, *M. laxa*, *G. candidum*, *P. expansum*, *A. alternata* y *B. cinerea* se obtuvieron a partir de placas de Agar Patata Dextrosa (PDA, Merck) incubadas a 20 °C durante 7-10 días hasta alcanzar un grado de esporulación elevado. Para ello, en cada placa de PDA que contenía las cepas fúngicas crecidas se añadieron 5 mL de agua destilada estéril, con un 0,05 % de Tween 80 y, posteriormente, se raspó la superficie con una asa de siembra estéril para separar el micelio y las esporas de su superficie. El contenido de la placa se filtró a través de 4 capas de gasa estéril y el número de esporas por mL se ajustó a 10^5 esporas/mL tras conteo microscópico directo y posterior dilución.

3.1.3. Equipo de agua electrolizada

El equipo de agua electrolizada utilizado en este estudio ha sido el modelo DiaClean[®] Lab Unit, suministrado por la empresa WaterDiam Sarl (Delémont, Suiza). Esta unidad está provista de electrodos BDD/Si (Diamante Dopado con Boro sobre Silicio). Las partes de las que está compuesto el equipo son las siguientes (Figura 3):

1. Tanque de almacenamiento del fluido a tratar: permite además la evacuación de gases durante la electrolisis y tiene un sistema de mantenimiento de la temperatura, la cual no debe superar los 35 °C.

2. Bomba: impulsa el fluido por todo el circuito y está conectada a la parte inferior del tanque, donde hay un sensor de nivel, el cual para el equipo en caso de que no haya líquido suficiente. A la salida hay una válvula para controlar el flujo del circuito.
3. Filtro de 50 mm: evita la entrada de partículas grandes o elementos sólidos que puedan bloquear el circuito hidráulico.
4. Electrodo DiaClean: lleva a cabo la electrólisis del agua.
5. Válvulas localizadas a lo largo del circuito para toma de muestra o vaciado del mismo.
6. Panel de control: donde podemos modificar el voltaje y la intensidad de la corriente.
7. Equipo de generación de frío: enfría el agua que va a ser electrolizada.

Este equipo tiene la capacidad de generar agua electrolizada oxidante (agua EO), de forma que modificando su potencial (V) se pueden obtener diferentes elementos activos, siendo los radicales OH^\cdot los más activos que se pueden generar mediante esta electrólisis.

Para la generación de agua electrolizada, en primer lugar hay que conectar el equipo de frío, adicionar 25 litros de agua al tanque de almacenamiento y añadir al agua 1,6 gramos de ácido cítrico y 40 gramos de NaCl (para ajustar el pH a 7 y aumentar la cantidad de cloro libre a formar). Tras ello, se pone en marcha el equipo y se deja actuando durante el tiempo deseado. Pasado este tiempo, se desconecta el equipo y se extrae el agua electrolizada generada.

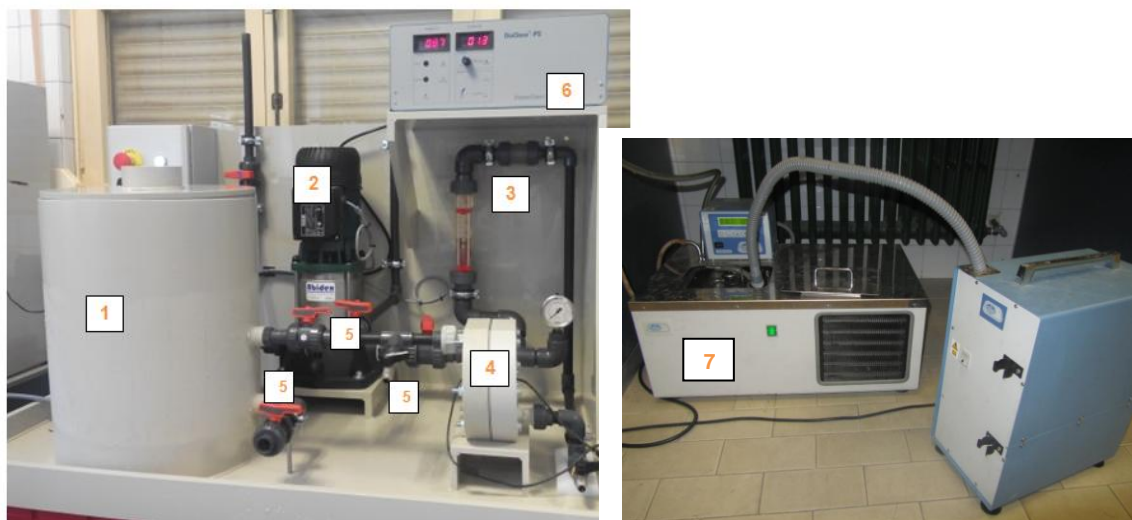


Figura 3. Equipo DiaClean® Lab Unit.

3.1.4. Dióxido de cloro

El dióxido de cloro utilizado (CLODOS PURO) fue suministrado por EMINFOR S.L. Tiene una concentración de 0,15 % (1500 ppm), está listo para usar y se puede diluir con agua corriente.

3.1.5. Fungicidas

Los fungicidas empleados en este experimento fueron fludioxonil (Scholar), ciprodinil (Chorus), iprodiona (Rovral 50 WP) y tebuconazol (GENIUS WG).

Scholar[®] (Figura 4) es una marca comercial de Syngenta Group Company. El Scholar es un tratamiento post-cosecha permitido para la fruta de hueso y que se utiliza ampliamente en las centrales como fungicida post-cosecha. Su materia activa es fludioxonil (23 % p/v) y según la última autorización excepcional del Ministerio no tiene plazo de seguridad. Su uso está autorizado únicamente en las Comunidades de Cataluña, Aragón, Murcia, Extremadura y Andalucía, para frutos recolectados de cereza, ciruela, melocotón y nectarina.

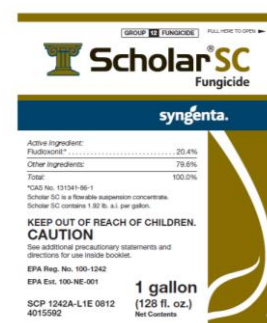


Figura 4. Etiqueta de Scholar[®] SC. Obtenida de Syngentacropprotection.com [internet].

Chorus[®] (Figura 5) es una marca comercial de Syngenta Group Company. Su materia activa es ciprodinil (50 %). Es un fungicida sistémico con acción preventiva y curativa, resistente al lavado y su eficacia no es afectada por bajas temperaturas. Es un producto indicado para el control de varias enfermedades en frutales de hueso y de pepita, ya que es activo frente a *B. cinerea*, *Aspergillus spp.*, *Monilinia spp.*...



Figura 5. Etiqueta de Chorus[®]. Obtenida de Syngentacropprotection.com [internet].

Rovral 50 WP (Figura 6) es una marca comercial de Bayer. Su materia activa es iprodiona (50 %) y su eficacia se basa en la inhibición de la germinación de las esporas y en el bloqueo del crecimiento micelial del hongo. Tiene actividad frente a *B. cinerea*, *M. laxa*, *A. alternata*...



Figura 6. Etiqueta de Rovral 50 WP. Obtenida de Cropsience.bayer.es [internet].

GENIUS WG (Figura 7) es una marca comercial de Sarabia, S.A. Su materia activa es tebuconazol (25 %) y se utiliza como tratamiento fungicida preventivo o curativo contra infecciones incipientes. Tiene un plazo de seguridad de 7 días en albaricoquero, cerezo, ciruelo, melocotonero, nectarino y pimiento. Es activo frente a *Monilinia spp.*, *B. cinerea*, *Cladosporidium spp.*...



Figura 7. Etiqueta de GENIUS WG. Obtenida de Sarabia.eu [internet].

La aplicación de los tratamientos se llevó a cabo en el laboratorio, según las indicaciones del fabricante y los límites establecidos en la legislación. Para ello, se bañaron los frutos en la solución de fungicida diluida en agua durante 5 minutos con agitación (Figura 8). Las dosis de aplicación fueron de 2,5 mL/L de agua para fludioxonil, 5 g/L de agua para ciprodinil, 2 mL/L de agua para iprodiona y 0,7 mL/L para tebuconazol.



Figura 8. Tratamiento de melocotones con Scholar.

3.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.2.1. Actividad *in vitro* del agua electrolizada y del dióxido de cloro frente a esporas fúngicas

Este primer ensayo se realizó para determinar la actividad *in vitro* del agua electrolizada y del dióxido de cloro frente a esporas de *M. laxa*, *M. fructicola*, *G. candidum*, *P. expansum*, *A. alternata* y *B. cinerea*.

Para ello, se prepararon suspensiones de los diferentes mohos, con una concentración de 10^5 esporas/mL. En todos los casos, las soluciones se sembraron en medio Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC) por siembra en superficie para conocer con exactitud la concentración inicial.

Después, se aplicaron los diferentes tratamientos por triplicado. Para ello, se introdujo 1 mL de cada solución esporal en tubos de ensayo donde posteriormente se añadieron 9 mL de las muestras de agua electrolizada/dióxido de cloro.

- Los tratamientos con agua electrolizada se dieron durante 5 y 10 minutos en *M. laxa*, *M. fructicola*, *G. candidum*, *P. expansum*, *A. alternata* y *B. cinerea*. El agua electrolizada alcanzó un ORP de 760 mV y una concentración de cloro libre de 150 mg/L.
- Los tratamientos con dióxido de cloro (20 ppm) se aplicaron durante 5 y 10 minutos en *M. fructicola*, *P. expansum*, *A. alternata* y *B. cinerea*. La solución de dióxido de cloro tenía un ORP de 764 mV y una concentración de cloro libre de 6 mg/L.

Una vez transcurrido el tiempo de contacto, las reacciones se interrumpieron con tiosulfato de sodio (10 %) y, posteriormente, 0,1 mL de cada tubo se sembraron en superficie en medio DRBC. Todas las placas se incubaron a 25 °C durante 3 días. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonia por mL.

3.2.2. Eficacia *in vivo* del agua electrolizada y del dióxido de cloro para la reducción de la microbiota epífita superficial y de esporas de *M. fructicola*

Este experimento se realizó para establecer el efecto descontaminante del agua electrolizada y del dióxido de cloro en distintas frutas de hueso. Para ello, se realizaron dos ensayos; en el primero se determinó la reducción en la microbiota epífita de las frutas y, en el segundo, el efecto sobre esporas de *M. fructicola* previamente inoculadas en el fruto.

3.2.2.1. Eficacia del agua electrolizada y del dióxido de cloro en la reducción de microorganismos presentes en la superficie de frutas de hueso

Este ensayo se llevó a cabo con diferentes frutas de hueso (melocotón, paraguayo, nectarina y albaricoque) y, como ya hemos dicho, se realizó para comprobar la eficacia del lavado con agua electrolizada y dióxido de cloro en la reducción de los microorganismos presentes en la superficie de las frutas. Para ello, se establecieron los lotes necesarios (10 frutas por lote) y se les aplicaron los tratamientos indicados en la Tabla 1 (Anexo I). Además, a un lote de cada variedad no se le realizó ningún tratamiento para utilizarlo como control. Tras el lavado y el secado de estos, se procedió al análisis microbiológico de tres muestras de cada lote, analizando mesófilos totales, mohos y levaduras (Epígrafe 3.3.2.).

3.2.2.2. Eficacia del agua electrolizada para la eliminación de *M. fructicola* previamente inoculada en melocotón

Este ensayo se llevó a cabo con melocotones de la variedad CG-58 para comprobar la eficacia del lavado con agua electrolizada en la eliminación de esporas de *M. fructicola*. Para ello se prepararon dos lotes de 10 melocotones cada uno:

(1) Melocotones sin lavado

(2) Melocotones lavados con agua electrolizada. Las características del agua electrolizada utilizada en este ensayo fueron: ORP de 766 mV y cloro libre de 102 mg/L.

Todos los melocotones se inocularon con una solución de esporas de *M. fructicola* (10^4 esporas/mL). Para ello, se realizaron dos pequeñas incisiones en la epidermis de la zona peduncular (Figura 9) con una punta de micropipeta estéril. Estas incisiones fueron inoculadas con 10 μ L de la suspensión esporal y, tras mantener los melocotones inoculados durante 2 horas a temperatura ambiente para favorecer la implantación del moho, se dispusieron a 1 °C durante 7 días.

Pasado este tiempo, el lote 2 se lavó durante 5 minutos con agua electrolizada. Tras el lavado y escurrido de las frutas, los dos lotes se almacenaron a 20 °C y se fue monitorizando el diámetro de crecimiento fúngico durante 7 días.



Figura 9. Incisiones realizadas en el melocotón para inocular la suspensión de esporas de *M. fructicola*.

3.2.3. Eficacia *in vivo* del agua electrolizada en la reducción de fungicidas e influencia del residuo de fludioxonil en el desarrollo de podredumbre por *M. fructicola*

Este experimento se realizó para establecer el efecto del agua electrolizada en la reducción de fungicidas en distintas frutas de hueso. Para ello, se realizaron dos ensayos; el primero estaba centrado en la reducción de la concentración de fungicidas y el segundo enfocado a determinar cómo influye la reducción de fludioxonil tras el lavado con agua electrolizada en el desarrollo de podredumbres por *M. fructicola*.

3.2.3.1. Eficacia del lavado con agua electrolizada para la reducción de fludioxonil, ciprodinil, iprodiona y tebuconazol

En este ensayo se emplearon diferentes frutas de hueso (cereza, melocotón, nectarina, paraguay y albaricoque). La eficacia del agua electrolizada para reducir la concentración de fungicidas se comparó con la del dióxido de cloro.

El día de la recepción de las frutas (10 frutas por lote), se trataron las muestras con la concentración indicada del fungicida específico (fludioxonil/ ciprodinil/ iprodiona/ tebuconazol) por inmersión durante 5 minutos (Epígrafe 3.1.5.). Posteriormente, las frutas se conservaron a 1 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, se aplicaron los diferentes métodos de lavado indicados en la Tabla 2 (Anexo I) (Figura 10). Tras el tratamiento, los frutos se dejaron escurrir sobre papel absorbente y se prepararon para su transporte al Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria para el análisis de residuos (Epígrafe 3.3.3.). La efectividad del tratamiento se determinó relacionando el residuo de pesticida presente en el fruto tras el lavado, en base al contenido inicial en el fruto (muestra control):

$$\text{Efectividad (\%)} = \frac{\text{Residuo inicial} - \text{Residuo restante}}{\text{Residuo inicial}} \times 100$$



Figura 10. Tratamiento de melocotones con agua electrolizada y dióxido de cloro.

3.2.3.2. Eficacia del uso de fludioxonil y el posterior lavado con agua electrolizada en la reducción de *M.fructicola*

Este ensayo, dividido en dos partes, se llevó a cabo para comprobar el comportamiento de *M. fructicola* con la presencia de fludioxonil. En la primera parte, melocotones de la variedad CG-58 y cerezas de las variedades Satín y Sonata fueron tratados con fludioxonil, lavados con agua electrolizada y con dióxido de cloro e inoculados con esporas de *M. fructicola* para establecer el potencial como tratamiento preventivo del fludioxonil (Figura 11). En la segunda parte, melocotones de la variedad

CG-58 fueron inoculados con esporas de *M. fructicola*, tratados con fludioxonil y lavados con agua electrolizada para determinar si la reducción de los niveles de fungicida protege frente a una infección previa de *M. fructicola* (Figura 12).

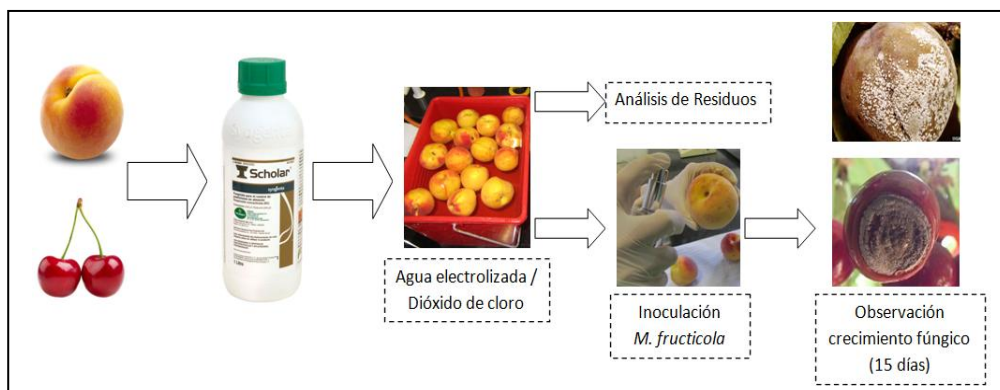


Figura 11. Primera parte del desarrollo experimental para establecer el potencial del fludioxonil como tratamiento preventivo para *M. fructicola*.

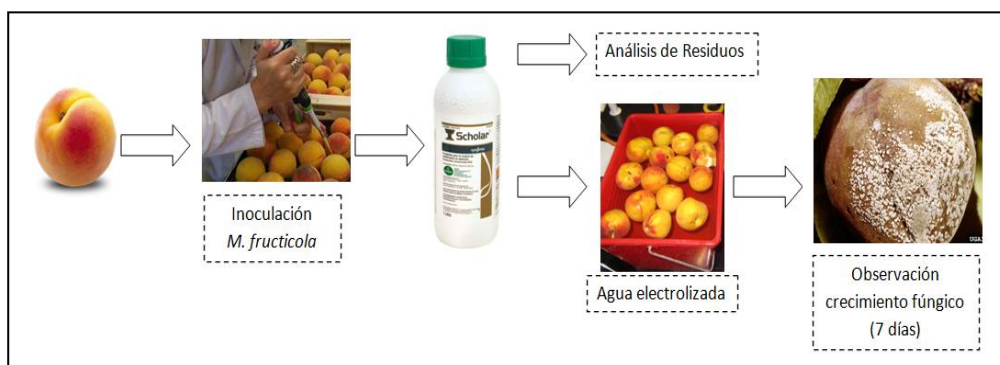


Figura 12. Segunda parte del desarrollo experimental para determinar si la reducción de los niveles de fludioxonil protegen frente a una infección previa de *M. fructicola*.

En la primera parte, a los lotes de melocotones y cerezas (10 frutos por lote) se les aplicó un baño con fludioxonil durante 5 minutos y se conservaron a 1 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se aplicaron los diferentes métodos de lavado, indicados en la Tabla 3 (Anexo I). Además, a un lote de cada variedad no se le realizó ningún tratamiento de lavado para utilizarlo como control. Tras el tratamiento, los frutos se dejaron escurrir sobre papel absorbente y parte de ellos se prepararon para su transporte al CNTA para el análisis de residuos de fludioxonil (Epígrafe 3.3.3.). El resto de frutos se inocularon con una solución de esporas de *M. fructicola* (10^4 esporas/mL) para comparar posteriormente el grado de infección con la presencia de mayor o menor cantidad de fludioxonil. En este caso, la inoculación de la solución de esporas se realizó mediante rociado con spray. Tras ello, se dejaron secar y se conservaron a 4 °C durante 3 días. Pasado este tiempo, las frutas se dispusieron a temperatura ambiente y se fue comprobando el desarrollo de la infección durante 15 días.

En la segunda parte, se prepararon dos lotes de melocotones (10 frutos por lote):

(1) Melocotones sin lavado

(2) Melocotones lavados con agua electrolizada (ORP de 766 mV y cloro libre de 102 mg/L).

Los dos lotes de melocotones se inocularon por punción con esporas de *M. fructicola* (10^4 esporas/mL). Para ello, se realizaron dos incisiones con una punta de micropipeta estéril en la zona peduncular del melocotón y en cada una se inyectó 10 µL de la solución. Tras la inoculación y el secado de estos, se les aplicó a los dos lotes un baño con fludioxonil durante 5 min. Una vez secos se introdujeron en la cámara de refrigeración durante 7 días. Pasado este tiempo, el lote 2 se lavó durante 5 minutos con agua electrolizada. Tras el lavado y el escurrido, los melocotones se almacenaron a 20 °C y se fue comprobando el crecimiento fúngico durante 7 días. Además, para realizar el análisis de residuos, 3 melocotones de cada lote fueron preparados para su transporte al CNTA (Epígrafe 3.3.3.).

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Calidad físico-química del agua electrolizada y de las soluciones de dióxido de cloro

Los parámetros determinados fueron los siguientes:

- **pH:** este parámetro fue medido antes y después de añadir ácido cítrico al agua y tras la electrolización de esta. Se utilizó un pHmetro (pH-metro Basic 20+) con dos electrodos (pH y mV).
- **Potencial de Óxido-reducción (ORP):** este parámetro se determinó tras la adición de ácido cítrico, tras la adición de NaCl y tras la electrolización del agua. Cuanto mayor sea el ORP mayor será la capacidad de desinfección del agua. Para ello se utilizó un pHmetro (pH-metro Basic 20+) con dos electrodos (pH y mV).
- **Cloro libre:** se determinó tras la electrolización del agua de lavado. Para su medida se empleó un fotómetro HI 83099 (Hanna Instruments) y el kit HI 93701-0. Para la determinación se mezclaron 10 mL del agua de lavado correspondiente con el reactivo, apareciendo un color rosa de mayor o menor

intensidad en función de la cantidad de cloro libre (más intenso cuanto mayor cloro). Tras 1 minuto de espera, el equipo nos ofrece el resultado de cloro libre expresado en mg/L.

3.3.2. Recuentos microbiológicos

En el ensayo 3.2.2. se llevó a cabo el recuento de aerobios mesófilos totales y de mohos y levaduras presentes en la superficie de los frutos (melocotón, paraguayo, nectarina y albaricoque). Se analizaron tres muestras de cada tratamiento aplicado. Con la ayuda de una ventana estéril, se procedió a muestrear 10 cm² de la pared de cada fruto. Cada muestra se introdujo en un bote estéril, al que se le añadieron 80 mL de agua de peptona y se agitaron en un vibromatic durante 5 minutos. Cada dilución se sembró en masa por triplicado en dos medios de cultivo: Triptona Soja Agar (TSA) y Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC). Las placas de TSA se incubaron a 30 °C/ 3 días y las placas con DRBC, a 25 °C/ 3 días. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonia por cm², por lo que se calcularon teniendo en cuenta la superficie del fruto muestreada y el volumen de agua de peptona empleado.

3.3.3. Residuos de fungicidas

Para realizar el análisis de residuos de fungicidas, varias muestras de cada lote fueron congeladas con nitrógeno líquido, envasadas al vacío y mantenidas en congelación, para su transporte al CNTA (Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria), donde se realizaron los correspondientes análisis. El análisis de residuos se realizó por Cromatografía de Gases acoplado a un espectrofotómetro de masas (CG-MS).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ACTIVIDAD *IN VITRO* DEL AGUA ELECTROLIZADA Y DEL DIÓXIDO DE CLORO FRENTE A ESPORAS FÚNGICAS

El objetivo de este primer ensayo fue determinar la actividad *in vitro* del agua electrolizada y del dióxido de cloro frente a esporas de *M. laxa*, *G. candidum*, *M. fructicola*, *P. expansum*, *A. alternata* y *B. cinerea*.

En la Figura 13 se recogen los recuentos microbiológicos tras el tratamiento *in vitro* de las esporas, durante 5 y 10 minutos, con agua electrolizada y con dióxido de cloro (20 ppm).

Al interpretar los resultados, lo primero que llama la atención es que el tratamiento con agua electrolizada durante 10 minutos fue el más efectivo, ya que eliminó la totalidad de las esporas. En segundo lugar, la mayor eficacia se dio en el tratamiento con agua electrolizada durante 5 minutos, donde únicamente sobrevivió *A. alternata*, aunque sus recuentos se redujeron en 2,3 u.log.

Por otro lado, se observó que la eficacia *in vitro* del dióxido de cloro en la inactivación de esporas fue mínima. En ninguno de los casos la inactivación fue mayor a 1 u.log. y no se detectaron diferencias con el aumento del tiempo de contacto. *A. alternata* y *B. cinerea* sufrieron mayor reducción con el tratamiento de 5 minutos, mientras que *M. fructicola* y *P. expansum* lo hicieron con el tratamiento de 10 minutos, aunque las diferencias fueron mínimas.

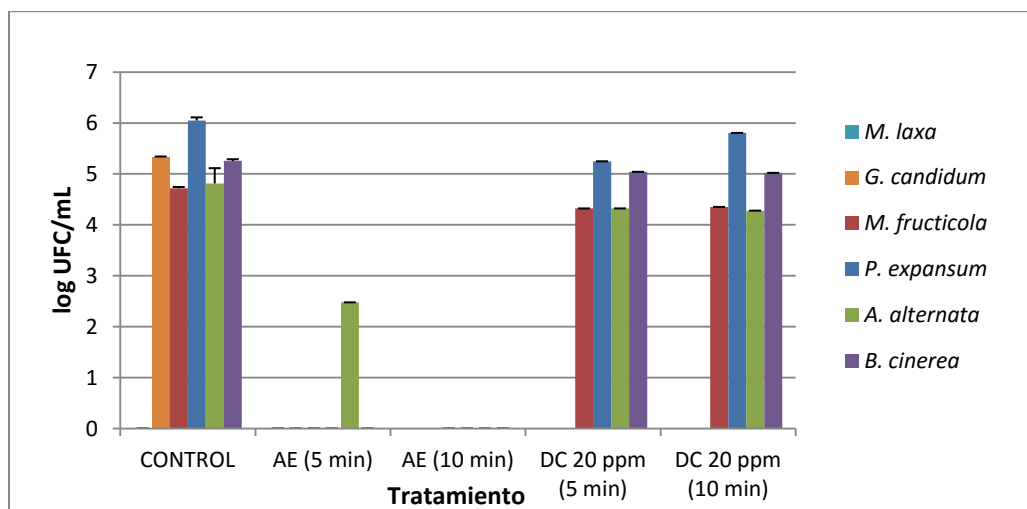


Figura 13: Recuentos de esporas fúngicas tras el tratamiento con agua electrolizada (AE) y dióxido de cloro (DC).

4.2. EFICACIA *IN VIVO* DEL AGUA ELECTROLIZADA Y DEL DIÓXIDO DE CLORO PARA LA REDUCCIÓN DE LA MICROBIOTA EPÍFITA SUPERFICIAL Y DE ESPORAS DE *M. FRUCTICOLA*

Este experimento se realizó para establecer el efecto descontaminante del agua electrolizada y del dióxido de cloro en distintas frutas de hueso. Para ello, se realizaron dos ensayos; en el primero se determinó la reducción en la microbiota epífita de las frutas y, en el segundo, el efecto sobre esporas de *M. fructicola* previamente inoculadas en el fruto.

4.2.1. Eficacia del agua electrolizada y del dióxido de cloro en la reducción de microorganismos presentes en la superficie de frutas de hueso

Este primer ensayo se realizó para comprobar la eficacia del lavado con agua electrolizada (a diferentes concentraciones de cloro libre y ORP y durante 5 y 15 minutos) y con dióxido de cloro (a concentraciones de 10 y 20 ppm y durante 5, 15 y/o 20 minutos) en la reducción de microorganismos presentes en la superficie de las frutas de hueso. Para ello, se aplicaron los diferentes tratamientos y se realizó el recuento de mesófilos totales (AMT) y de mohos y levaduras (M y L).

La eficacia en la reducción de microorganismos en las tres variedades de melocotones empleados está representada en la Figura 14. Los recuentos iniciales más altos se dieron en las variedades CG-58 y Rich Lady, donde predominaron mohos y levaduras (3,9 y 3,6 log UFC/cm², respectivamente). En la variedad CG-58 el lavado con agua electrolizada durante 5 minutos logró reducir casi 3 u.log. los mesófilos totales y no se detectaron mohos y levaduras (reducción de 4 u.log.). El aumento del tiempo de lavado a 15 minutos eliminó toda la microbiota superficial. En las variedades Spring Flame y Rich Lady, los lavados con agua electrolizada durante 5 y 15 minutos lograron eliminar la totalidad de la microflora presente, lo que puede ser debido a una mayor cantidad de cloro libre en el agua electrolizada empleada en este ensayo (149 y 168 mg/L, respectivamente, frente a 102 mg/L en la variedad CG-58). En cambio, el lavado con dióxido de cloro con una concentración de 10 ppm durante 15 minutos no consiguió una reducción considerable; e incluso aumentando la concentración a 20 ppm, la reducción fue menor a 1 u.log.

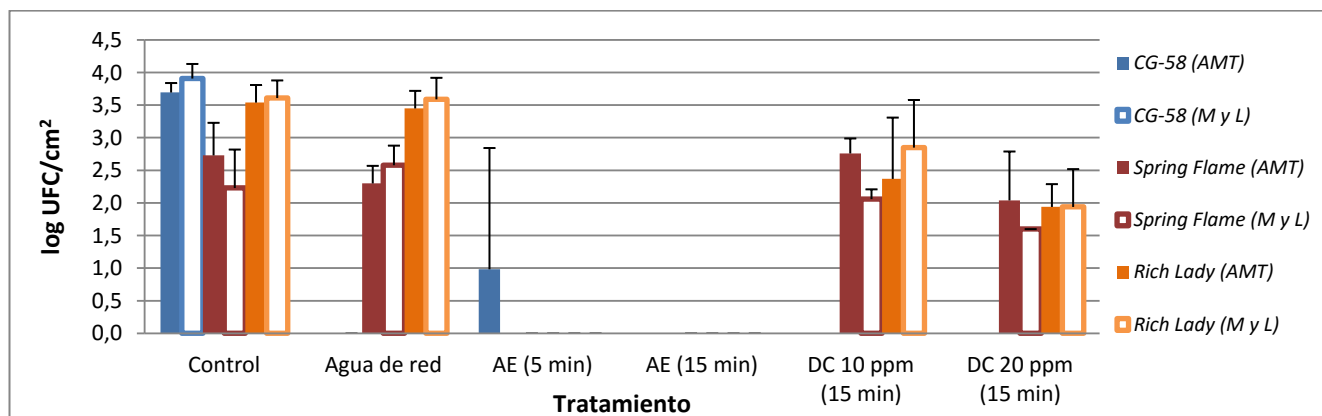


Figura 14: Reducción de microorganismos presentes en la superficie de diferentes variedades de melocotón tras el lavado con agua electrolizada (AE) y dióxido de cloro (DC). AMT: representados por barras rellenas. M y L: representados por barras sin relleno. Control: muestras sin lavar.

En la Figura 15 se representan las reducciones microbianas en las dos variedades de paraguayos empleadas (796 y Flatstar), mediante los tratamientos con agua electrolizada y dióxido de cloro. Los recuentos iniciales más altos se dieron en la variedad Flatstar (3,5 log UFC/cm² en mesófilos totales y mohos y levaduras) y, en ambas variedades, las diferencias en los recuentos entre aerobios mesófilos totales y mohos y levaduras fueron mínimas. El lavado con agua electrolizada eliminó la totalidad de mohos y levaduras en las dos variedades de paraguayos. La reducción de los mesófilos totales en la variedad Flatstar fue similar en los dos tiempos de tratamiento con agua electrolizada (5 y 15 minutos), siendo de 1 u.log. En cambio, en la variedad 796, se produjo una mayor reducción de mesófilos totales en el lavado de 5 minutos (1,2 u.log.) frente al de 15 minutos (0,6 u.log.). El lavado con dióxido de cloro durante 15 minutos a diferente concentración (10 y 20 ppm) en la variedad 796 produjo una reducción de mesófilos totales y de mohos y levaduras muy similar, siendo ligeramente mayor a una concentración de 20 ppm (0,6 u.log. en mesófilos totales y 1,4 u.log. en mohos y levaduras) frente a la de 10 ppm (0,4 u.log. en mesófilos totales y 1,2 u.log. en mohos y levaduras). La variedad Flatstar se trató con dióxido de cloro durante 5 y 20 minutos a una concentración de 10 ppm. La reducción en el tratamiento de 5 minutos fue mínima (menos de 0,5 u.log.), siendo algo mayor para mohos y levaduras en el tratamiento de 20 minutos (más de 1 u.log.). Hay que destacar la elevada cantidad de mesófilos totales que sobrevivieron al tratamiento con dióxido de cloro durante 20 minutos.

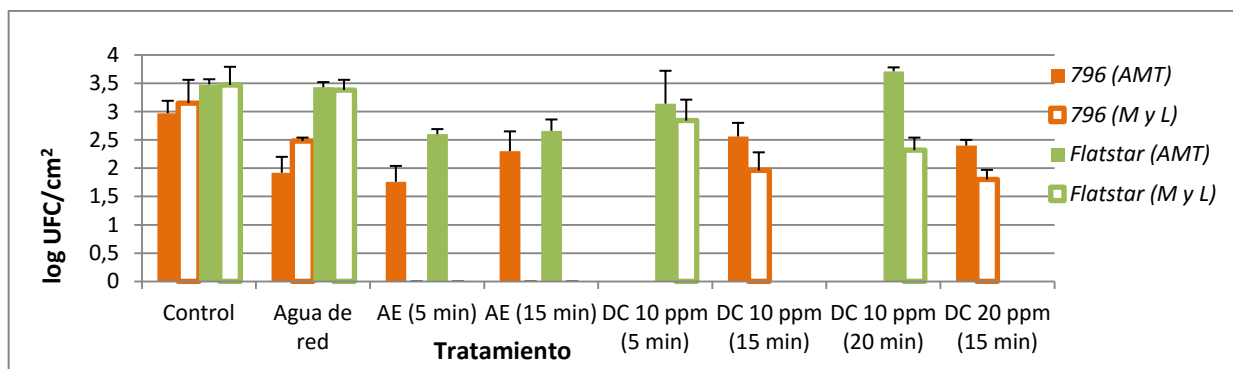


Figura 15: Reducción de microorganismos presentes en la superficie de dos variedades de paraguay. AMT: representados por barras rellenas. M y L: representados por barras sin relleno. Control: muestras sin lavar. AE: Agua electrolizada. DC: Dióxido de cloro.

En la Figura 16 se representan las reducciones microbianas en nectarina de la variedad 696. En los recuentos iniciales predominaron los aerobios mesófilos totales ($2,9 \log \text{ UFC/cm}^2$) frente a los mohos y levaduras ($2,3 \log \text{ UFC/cm}^2$). Como se puede observar, el tratamiento con agua electrolizada durante 5 y 15 minutos redujo por completo las poblaciones microbianas. Los mohos y levaduras también desaparecieron tras los dos tratamientos con dióxido de cloro. En cambio, la reducción de mesófilos totales con los tratamientos de dióxido de cloro fue aproximadamente de 1 u.log., siendo algo mayor en el de 20 ppm de concentración.

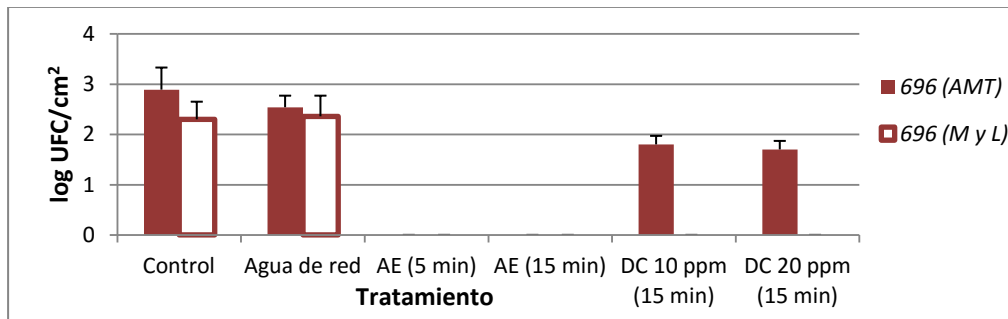


Figura 16: Reducción de microorganismos presentes en la superficie de nectarina (variedad 696). AMT: representados por barras rellenas. M y L: representados por barras sin relleno. Control: muestras sin lavar. AE: Agua electrolizada. DC: Dióxido de cloro.

La Figura 17 representa las reducciones microbianas en albaricoque de la variedad Tsunami, donde predominan los aerobios mesófilos totales ($3,8 \log \text{ UFC/cm}^2$) frente a los mohos y levaduras ($3,1 \log \text{ UFC/cm}^2$). Los tratamientos con agua electrolizada eliminaron los mohos y levaduras presentes en el fruto. En cambio, para aerobios mesófilos totales, el tratamiento con agua electrolizada durante 5 minutos redujo en, aproximadamente, 1 u.log. y el realizado durante 15 minutos, en 2 u.log.. Por el contrario, los tratamientos con dióxido de cloro eliminaron la totalidad

de los aerobios mesófilos totales, pero solo redujeron en 1,5 u.log. los mohos y levaduras presentes, sin existir diferencia en ambos tratamientos.

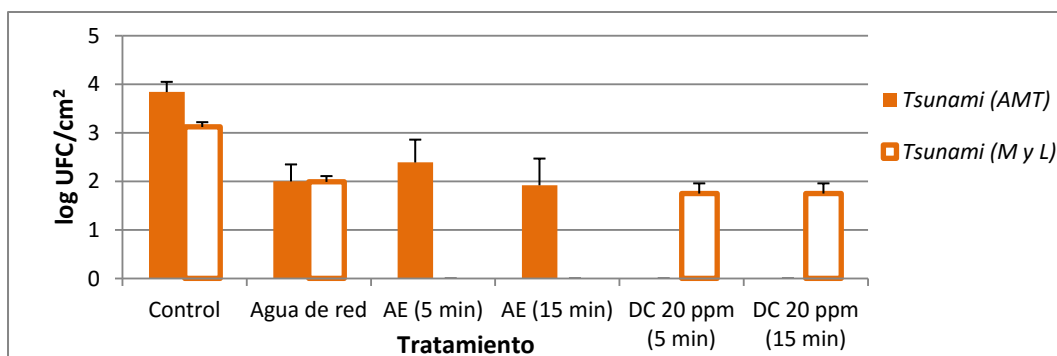


Figura 17: Reducción de microorganismos presentes en la superficie de albaricoque (variedad Tsunami). AMT: representados por barras rellenas. M y L: representados por barras sin relleno. Control: muestras sin lavar. AE: Agua electrolizada. DC: Dióxido de cloro.

En la Figura 18 están representados los recuentos microbianos realizados tras todos los tratamientos llevados a cabo durante este ensayo, diferenciados según el tipo de fruta de hueso. En el caso de los melocotones, la mayor reducción se produjo en los tratamientos con agua electrolizada, siendo el menos eficiente para mesófilos totales el tratamiento de 5 minutos. En paraguayos hay que destacar la baja eficacia que ofrecieron los tratamientos de agua electrolizada para la disminución de mesófilos totales, aunque la reducción de mohos y levaduras fue completa. Los tratamientos en nectarina dieron buenos resultados, ya que el agua electrolizada eliminó la totalidad de la carga microbiana y el dióxido de cloro redujo completamente a mohos y levaduras. En el caso de los albaricoques, los tratamientos con agua electrolizada fueron menos efectivos para mesófilos totales y, por el contrario, los tratamientos con dióxido de cloro fueron poco efectivos para mohos y levaduras. Respecto al lavado con agua de red, las reducciones fueron escasas en todas las frutas de hueso, siendo el cambio más apreciable en albaricoques. El tratamiento con agua de red redujo mayor cantidad de aerobios mesófilos totales que de mohos y levaduras. En general, se puede concluir que los tratamientos con agua electrolizada fueron más eficientes que los de dióxido de cloro para la mayoría de las frutas de hueso.

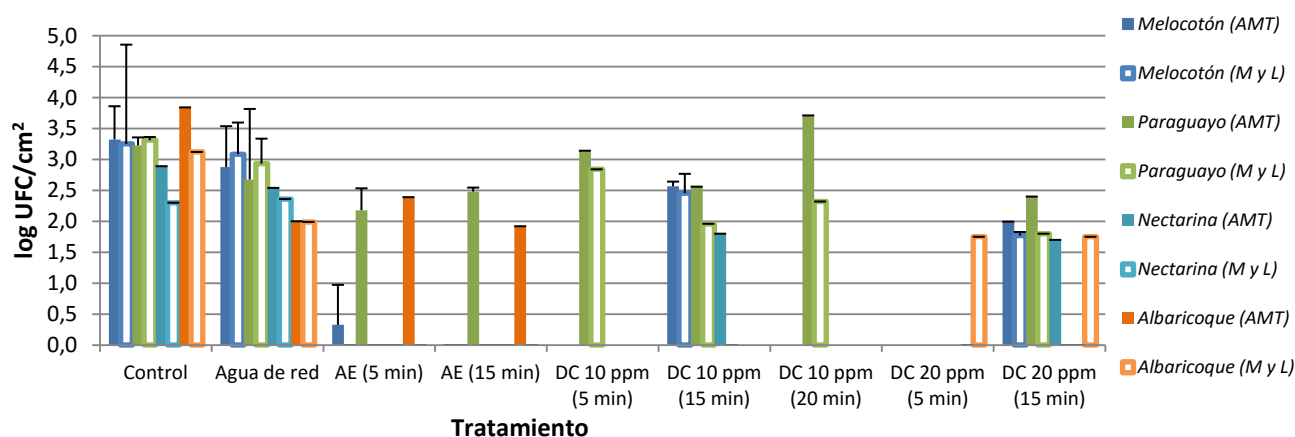


Figura 18: Reducción de microorganismos presentes en la superficie de diferentes frutas de hueso. AMT: representados por barras rellenas. M y L: representados por barras sin relleno. AE: Agua electrolizada. DC: Dióxido de cloro.

4.2.2. Eficacia del agua electrolizada para la eliminación de *M. fructicola* previamente inoculada en melocotón

Este segundo ensayo se realizó para determinar la eficacia del lavado con agua electrolizada en la eliminación de *M. fructicola* previamente inoculada en el fruto. Se emplearon para ello melocotones de la variedad CG-58.

Las frutas fueron inoculadas con esporas de *M. fructicola*, conservadas en refrigeración durante 7 días, lavadas con agua electrolizada durante 5 minutos e incubadas a 20 °C. La inspección del diámetro de crecimiento fúngico se llevó a cabo en los días 5, 6 y 7 tras el tratamiento.

Los melocotones utilizados en el lote control tenían todas las heridas infectadas, mientras que en los tratados con agua electrolizada, dos de los cinco melocotones empleados no tenían ninguna de sus heridas infectadas.

Como se puede observar en la Figura 19, el diámetro de crecimiento de *M. fructicola* en los melocotones lavados con agua electrolizada fue aproximadamente la mitad que en los melocotones utilizados como control. Esto demuestra la eficacia del agua electrolizada en la incidencia y severidad de las lesiones por *M. fructicola*.

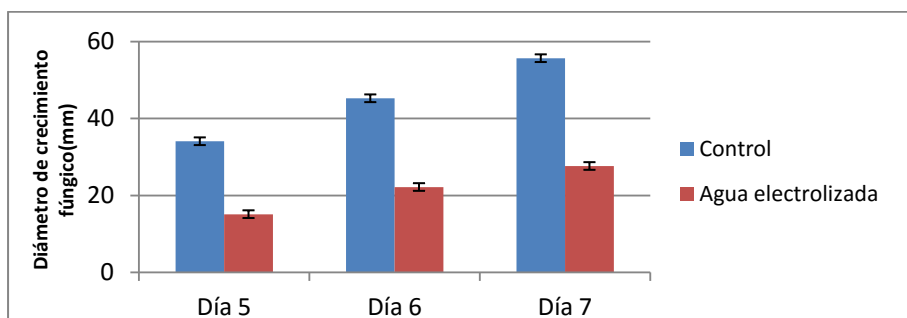


Figura 19: Diámetro de crecimiento fúngico de *M. fructicola* en melocotones control y lavados con agua electrolizada.

En las figuras 20, 21 y 22 (Anexo II) se puede observar el desarrollo de *M. fructicola* en el lote control y en el lote tratado durante los días 5, 6 y 7 de incubación a 20 °C, posteriores al tratamiento con agua electrolizada.

4.3. EFICACIA *IN VIVO* DEL AGUA ELECTROLIZADA EN LA REDUCCIÓN DE FUNGICIDAS E INFLUENCIA DEL RESIDUO DE FLUDIOXONIL EN EL DESARROLLO DE PODREDUMBRE POR *M. FRUCTICOLA*

En esta parte del estudio, las frutas de hueso fueron tratadas con agua electrolizada para comprobar la viabilidad de este tratamiento en la reducción de fungicidas. La eficacia de este método también se comparó con la del dióxido de cloro, otro tratamiento oxidante. Para ello, se desarrollaron dos ensayos; el primero centrado en la reducción de la concentración de fungicidas y, el segundo, enfocado a determinar cómo influye la reducción del fungicida fludioxonil tras el lavado con agua electrolizada en el desarrollo de podredumbres por *M. fructicola*.

4.3.1. Eficacia del lavado con agua electrolizada para la reducción de fludioxonil, ciprodinil, iprodiona y tebuconazol

En este ensayo se contaminaron las muestras con un fungicida específico y, pasadas 24 horas, se les aplicó el tratamiento correspondiente, con agua electrolizada o dióxido de cloro. El análisis de residuos se realizó tras la aplicación del fungicida (control) y tras la aplicación de los tratamientos de lavado.

En la Tabla 4 vienen indicadas las concentraciones de fungicidas empleadas en el ensayo y los límites máximos de residuos (LMRs) de cada uno de ellos.

Tabla 4: Concentraciones de fungicidas aplicados en los tratamientos y LMRs permitidos.

	Dosis de aplicación	Materia activa (%)	LMRs (mg/kg)
Fludioxonil	2,5 mL/L	23	5 (cerezas) y 10 (melocotones)
Ciprodinil	5 g/L	50	2
Iprodiona	2 mL/L	50	3
Tebuconazol	0,7 mL/L	25	0,6

En la Figura 23 se representan los residuos de fludioxonil presentes en cerezas (variedad Satín y Sonata) y melocotones (variedad CG-58). El LMR de fludioxonil es de 5 mg/kg para cerezas y 10 mg/kg para melocotones. Como se puede observar, los melocotones contenían mayor cantidad de residuo de fungicida, mientras que las cerezas Sonata fueron las que menor residuo presentaron, quizás por la menor adherencia al tener una piel glabra (sin tricomas). Aun así, ni los lotes control ni los lotes tratados superaron este límite. El agua electrolizada fue el tratamiento más eficaz para la reducción de fludioxonil, siendo las reducciones más bajas en los tratamientos con dióxido de cloro para los dos tipos de frutas tratadas.

En la Figura 24 se representan los residuos de ciprodinil presentes en melocotones (variedad Spring Flame y Rich Lady), nectarina (variedad Nectafun) y paraguayos (variedad 796 y Flatstar). El LMR de ciprodinil es de 2 mg/kg. En los lotes control, las muestras de melocotones y de paraguayos (Flatstar) excedieron el LMR permitido y no disminuyeron a un nivel aceptable mediante ningún tratamiento. Las otras dos muestras (nectarina Nectafun y paraguayo 796) contenían niveles muy bajos de residuo. En general, el tratamiento con agua electrolizada produjo las mayores reducciones, seguido del tratamiento con dióxido de cloro de 20 ppm de concentración durante 15 minutos, aunque no fueron totalmente efectivos.

En la Figura 25 se representan los residuos de iprodiona presentes en melocotones (variedad Rich Lady) y nectarinas (variedad 696 y Nectafun). El LMR de iprodiona es de 3 mg/kg y ninguna de las tres muestras superó este límite, siendo las nectarinas las que más residuo contenían. La mayor reducción se produjo en melocotones Rich Lady mediante el tratamiento con dióxido de cloro a 20 ppm de concentración durante 15 minutos. En nectarina 696 las mayores reducciones se produjeron con los tratamientos de dióxido de cloro, mientras que en nectarina Nectafun se dieron con agua electrolizada durante 25 minutos.

Los residuos de tebuconazol presentes en albaricoques (variedad Tsunami y Pink Cot) vienen representados en la Figura 26. El LMR de tebuconazol es de 0,6 mg/kg y fue superado por el lote control de la variedad Tsunami. En las dos variedades de albaricoques, los tratamientos más efectivos en la reducción de fungicidas se dieron con dióxido de cloro (20 ppm/15 min para Tsunami y 10 ppm/20

min para Pink Cot). Por otro lado, los albaricoques de la variedad Pink Cot tuvieron las mayores reducciones mediante el tratamiento con agua de red.

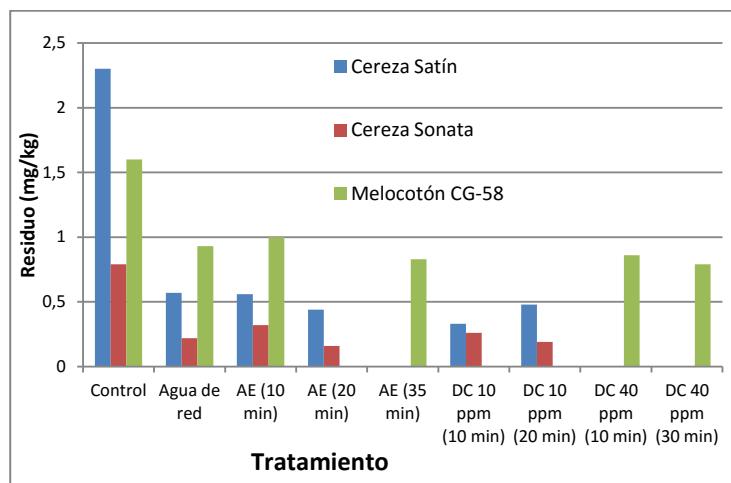


Figura 23: Residuos de fludioxonil en cerezas (variedad Satín y Sonata) y melocotones (variedad CG-58). AE: Agua electrolizada. DC: Dióxido de cloro.

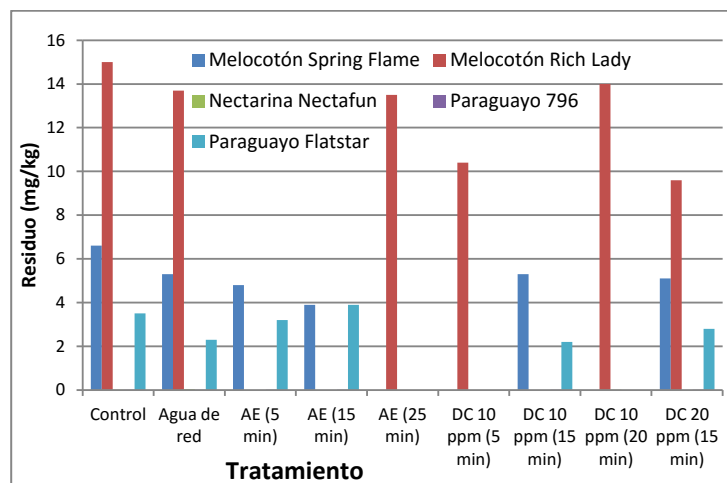


Figura 24: Residuos de ciprodinil en melocotones (variedad Spring Flame y Rich Lady), nectarinas (variedad Nectafun) y paraguayos (variedad 796 y Flatstar). AE: Agua electrolizada. DC: Dióxido de cloro.

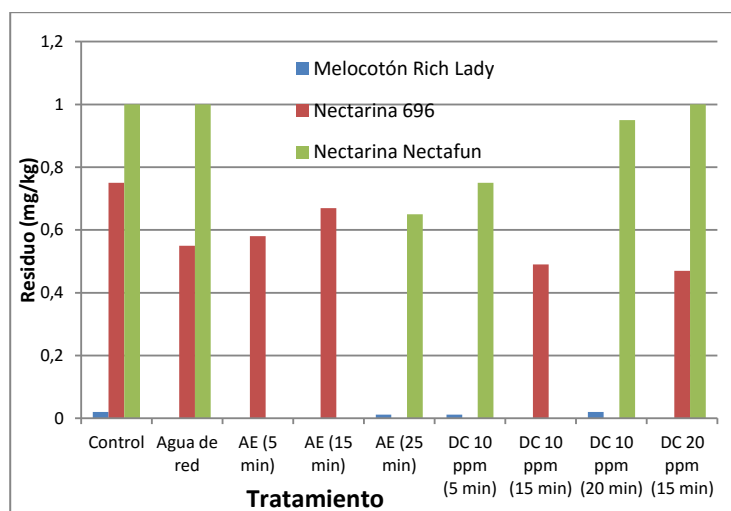


Figura 25: Residuos de iprodiona en melocotones (variedad Rich Lady) y nectarinas (variedad 696 y Nectafun). AE: Agua electrolizada. DC: Dióxido de cloro.

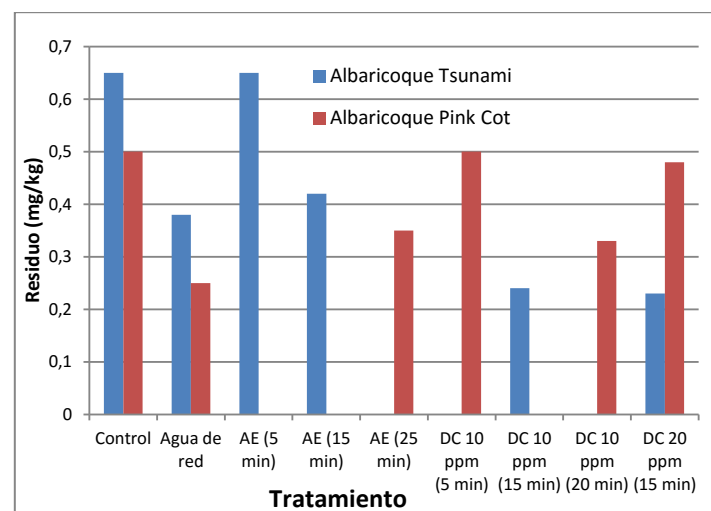


Figura 26: Residuos de tebuconazol en albaricoques (variedad Tsunami y Pink Cot). AE: Agua electrolizada. DC: Dióxido de cloro.

En la Tabla 5 (anexo III) se recoge el % de reducción ocurrido con cada tratamiento.

En las cerezas (Satín y Sonata) el tratamiento más efectivo en la reducción de fludioxonil fue el agua electrolizada durante 20 minutos (81 %), seguido del agua electrolizada durante 10 minutos para la variedad Satín (76 %). El dióxido de cloro produjo incluso menores reducciones que el lavado con agua de red.

Los melocotones se trataron con fludioxonil, ciprodinil e iprodiona. Para el fludioxonil, la mayor efectividad en la reducción se obtuvo con agua electrolizada durante 35 minutos (48 %). La reducción más elevada de ciprodinil en la variedad Spring Flame se produjo en el lavado con agua electrolizada durante 15 minutos (41 %), mientras que en la variedad Rich Lady, el más efectivo fue el lavado con dióxido de cloro (20 ppm/15 min) (36 %). La reducción de Iprodiona fue del 100 % en el lavado con agua de red y en el tratamiento con dióxido de cloro (20 ppm) durante 15 minutos, siendo nada efectivo el tratamiento con dióxido de cloro (10 ppm) durante 20 minutos.

Para las nectarinas, la mayor reducción de iprodiona en la variedad 696 se obtuvo con el tratamiento de dióxido de cloro (20 ppm/15 min) (37 %), mientras que en la variedad Nectafun se produjo con el lavado con agua electrolizada durante 25 minutos (35 %). El ciprodinil, en la variedad Nectafun, se redujo completamente con agua electrolizada (25 min) y dióxido de cloro (10 ppm/5 min y 20 ppm/15 min).

En los paraguayos, hay que destacar que el ciprodinil en la variedad 796 no se redujo con ningún tratamiento. Por otro lado, en la variedad Flatstar, las reducciones fueron bajas, siendo la mayor con dióxido de cloro (10 ppm/15 min) (37 %).

En la variedad de albaricoque Tsunami, la reducción de tebuconazol fue mayor con los tratamientos de dióxido de cloro (63-64 %), siendo nula en el lavado con agua electrolizada durante 5 minutos. En la variedad Pink Cot, la mayor reducción se produjo con agua de red (50%) seguido del dióxido de cloro (10 ppm/20 min) (34 %), siendo nula con dióxido de cloro a 10 ppm durante 5 min.

4.3.2. Eficacia del uso de fludioxonil y el posterior lavado con agua electrolizada en la reducción de *M.fructicola*

En la primera parte de este ensayo, se trataron los melocotones (variedad CG-58) y las cerezas (variedades Satín y Sonata) con fludioxonil, se aplicaron los tratamientos de lavado con agua electrolizada o con dióxido de cloro y se inocularon con *M. fructicola*, para posteriormente relacionar el grado de infección con la presencia de mayor o menor cantidad de fludioxonil. En la Figura 27 se indica el residuo de fludioxonil presente tras los tratamientos aplicados y, en la Figura 28, se representa el grado de infección de las frutas tras 15 días de conservación.

Las frutas control no recibieron ningún tratamiento, por lo que el residuo de fludioxonil fue alto (2,3-0,8 mg/kg) y, por tanto, el índice de infección bajo (31-20 %). En las frutas lavadas con agua de red también se detectó un residuo de fungicida elevado (0,9-0,2 mg/kg), por lo que el bajo índice de infección (45-33 %) concuerda con la cantidad de residuo presente. Los melocotones lavados con agua electrolizada durante 10 minutos tuvieron un residuo de fungicida más alto (1 mg/kg) que las cerezas tratadas igualmente (0,6 y 0,3 mg/kg en Satín y Sonata, respectivamente), por lo que los índices de infección en cerezas (35,4 % en Satín y 37,5 % en Sonata) fueron más altos que en melocotones (22,5 %). Sin embargo, los resultados del tratamiento con agua electrolizada durante 20 minutos deberían de haber sido al revés, ya que las cerezas Satín contenían más fungicida (0,4 mg/kg) y, por tanto, deberían de haber tenido un menor grado de infección (44 %). También, los melocotones lavados con agua electrolizada durante 35 minutos (15 %) deberían de haber tenido un índice de infección mayor que los tratados durante 10 minutos (22 %), ya que la concentración de residuo era menor. Las cerezas Sonata tratadas con dióxido de cloro a 10 ppm de concentración, ofrecieron resultados concordantes, ya que a mayor concentración de residuo (0,3 y 0,2 mg/kg para 10 y 20 minutos, respectivamente), menor grado de infección (42 y 54 %, respectivamente), pero en el caso de las cerezas Sonata, ocurrió lo contrario. Los melocotones tratados con dióxido de cloro con una concentración de 40 ppm también ofrecieron resultados esperables, ya que a mayor cantidad de residuo presente (0,9 y 0,8 mg/kg para 10 y 30 minutos, respectivamente), menor índice de infección (12 y 35 %, respectivamente).

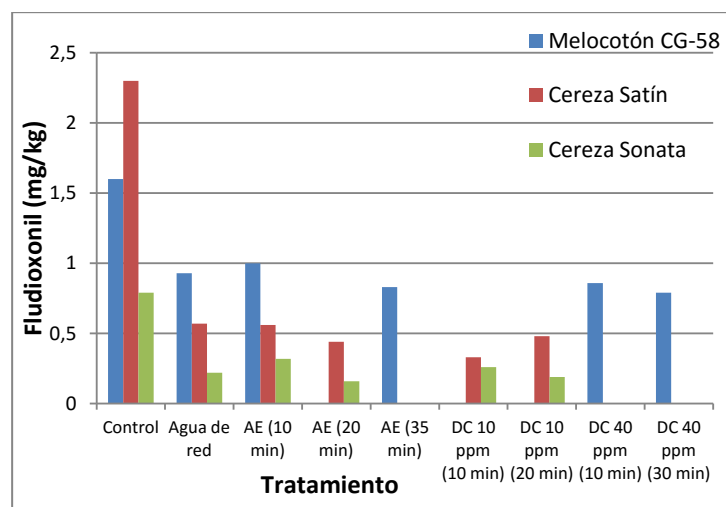


Figura 27: Residuo de fludioxonil tras los tratamientos con agua electrolizada y dióxido de cloro en melocotón (variedad CG-58) y cereza (variedad Satín y Sonata). AE: Agua electrolizada. DC: Dióxido de cloro.

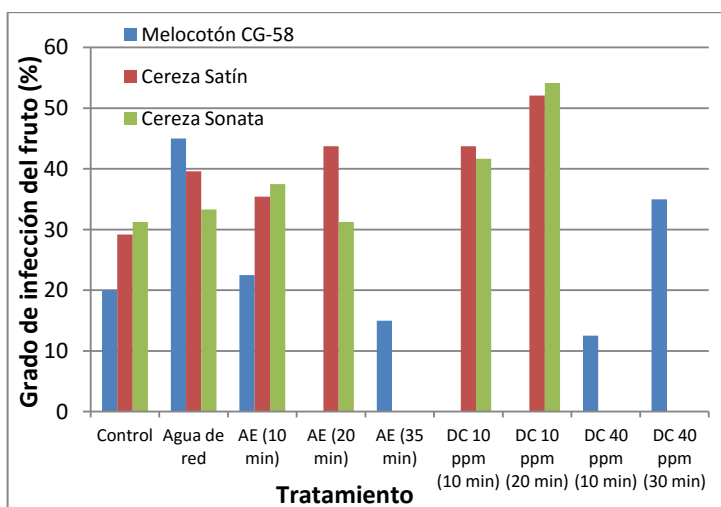


Figura 28: Grado de infección (%) en melocotón (variedad CG-58) y cereza (variedad Satín y Sonata) tras los tratamientos con agua electrolizada y dióxido de cloro e incubación durante 15 días a temperatura ambiente. AE: Agua electrolizada. DC: Dióxido de cloro.

En las Figura 29 se muestran melocotones con diferentes grados de infección por *M. fructicola*.



Figura 29: Melocotones con diferentes grados de infección por *M. fructicola*. De izquierda a derecha: 0 %, 25 %, 50 % y 100 %.

En la segunda parte de este ensayo, se inocularon melocotones de la variedad CG-58 con *M. fructicola* y, después, se les aplicó un baño con fludioxonil. Tras una conservación de 7 días en refrigeración, los melocotones se lavaron con agua electrolizada durante 5 minutos. Tras ello, se realizó un análisis de residuos y se estudió el tamaño del halo durante los 7 días posteriores. El objetivo de este estudio era determinar si la reducción de los niveles de fungicida antes de que las frutas sean comercializadas protege frente a una infección previa.

Como se puede observar en la Figura 30, no hubo crecimiento fúngico en los melocotones control, ya que no fueron lavados con agua electrolizada y, por tanto, la concentración de fludioxonil presente en el fruto era alta (10,4 mg/kg). Por el contrario, el lavado con agua electrolizada redujo la concentración de fludioxonil (7,5 mg/kg) y el tamaño del halo en los melocotones tratados fue en aumento conforme avanzaban los días de almacenamiento.

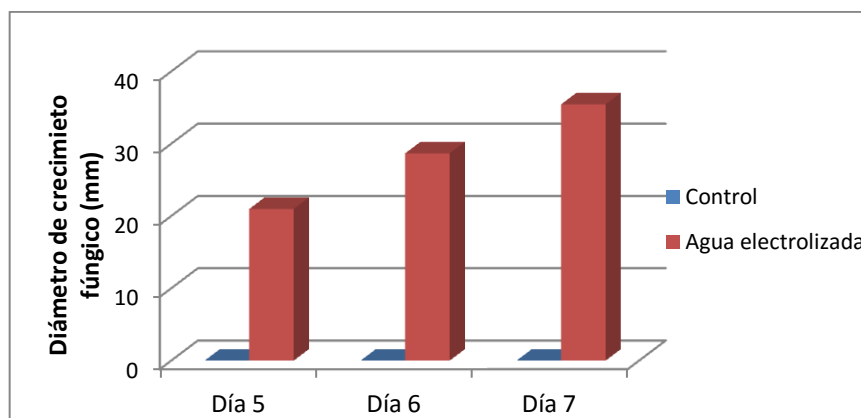


Figura 30: Diámetro de crecimiento fúngico de *M. fructicola* en melocotones de la variedad CG-58 tratados con Scholar. Control: no lavados con agua electrolizada.

5. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

1. La actividad antifúngica *in vitro* del agua electrolizada frente a esporas de *M. laxa*, *M. fructicola*, *G. candidum*, *P. expansum*, *A. alternata* y *B.cinerea* fue mayor (>4 u.log.) que la eficacia producida por el dióxido de cloro.
2. La reducción en la microbiota epífita de las frutas de hueso fue, en general, más elevada en el caso del agua electrolizada. Ambos tratamientos (agua electrolizada y dióxido de cloro) tuvieron mayor eficacia en la reducción de mohos y levaduras, que en la de aerobios mesófilos totales.
3. El tratamiento con agua electrolizada redujo notablemente la incidencia y severidad de las lesiones por *M. fructicola* previamente inoculada en melocotón.
4. El agua electrolizada produjo las mayores reducciones de fludioxonil y ciprodinil, mientras que las de iprodiona y tebuconazol se obtuvieron con dióxido de cloro.
5. Los tratamientos con agua electrolizada previos a la comercialización de los frutos permiten reducir los niveles de fludioxonil por debajo del límite de detección pero esta disminución permite el desarrollo de la podredumbre marrón, independientemente de si la infección se ha producido antes o después del tratamiento fungicida.

CONCLUSIONS

1. *In vitro* antifungal activity of electrolyzed water against spores of *M. laxa*, *M. fructicola*, *G. candidum*, *P. expansum*, *A. alternata* and *B. cinerea* was very high (> 4 u.log.) and greater than that of chlorine dioxide.
2. The reduction in the epiphytic microbiota of stone fruits was, in general, higher in the case of electrolyzed water. Both treatments (electrolyzed water and chlorine dioxide) were more effective in reducing the mold and yeast populations than the total aerobic mesophilic ones.
3. Electrolyzed water treatment effectively reduced *M. fructicola* growth in peaches previously inoculated.
4. Electrolyzed water reduced fludioxonil and ciprodinil residues while for iprodione and tebuconazol the chlorine dioxide treatment was more effective
5. Electrolyzed water treatment for premarketing fruit can reduce fludioxonil levels below the detection limit but this decrease allows the development of brown rot, whether infection occurred before or after the fungicide treatment.

6. APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE

Los conocimientos, las aptitudes y la experiencia que he adquirido durante la realización de este Trabajo Fin de Grado son muchas y muy satisfactorias.

El desarrollo de este proyecto es algo muy diferente a lo que se realiza durante el resto del grado, ya que el trabajo es bastante autónomo, aunque siempre guiado por las directoras, lo que te obliga a desarrollar tus capacidades de trabajo y de resolución de problemas de una forma más independiente. Al tratarse de un proyecto de investigación, me ha permitido conocer como se lleva a cabo un trabajo de esta índole, desde la revisión bibliográfica (donde he desarrollado la capacidad lectora en inglés y he aprendido a identificar las partes que me han podido interesar de los artículos), la parte experimental en el laboratorio (en el que se necesita una buena planificación de trabajo y confianza a la hora de desarrollarlo) y la realización del análisis de resultados, interrelacionando conceptos, hasta obtener unas conclusiones.

Por otro lado, también he podido conocer el grave problema que ocasionan las podredumbres post-cosecha y los métodos que existen y que se están estudiando para su control, además de la importancia del uso de fungicidas en la producción de frutas de hueso y la necesidad de reducir su presencia para mejorar la salud humana.

7. EVALUACIÓN Y SUGERENCIAS DE MEJORA

La realización del Trabajo Fin de Grado es una experiencia necesaria para completar la formación impartida durante el Grado en CTA, ya que se afianzan determinadas competencias que no se tienen tan en cuenta en el resto de horas lectivas, como desenvolverse en un ambiente de trabajo que exige organización y compromiso.

Como aspecto negativo, destacaría que el valor que se le otorga a este trabajo (6 créditos ECTS) resulta escaso, debido al elevado número de horas necesarias para su desarrollo, en comparación con otras asignaturas.

En general, he terminado contenta con la labor realizada en este proyecto de investigación y muy satisfecha con los conocimientos adquiridos sobre los temas tratados y sobre la forma de trabajar. Por otro lado, el trato recibido por las personas que han estado conmigo en su realización ha sido muy bueno, prestándome toda la ayuda necesaria y resolviendo mis dudas en todo momento.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Haq, M. I., Seo, Y., Oshita, S. y Kawagoe, Y. 2002. Disinfection effects of electrolyzed oxidizing water on suppressing fruit rot of pear caused by *Botryosphaeria berengeriana*. *Food Research International*. 35: 657-664.
- Anonymus. 1997. Principle of formation of electrolytic water. Hoshizaki Electric Co. Ltd., Sakae, Toyoake, Aichi, Japan.
- Apel, G. 1993. Chlorine dioxide. *Tree Fruit Postharvest Journal*. 4: 12-13.
- Berg, J. D., Roberts, P. V. y Matin, A. 1986. Effect of chlorine dioxide on selected membrane functions of *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology*. 60: 213-220.
- Beuchat, L. R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.* 4: 413-423.
- Ceroresiduos.eu [internet]. España: Cero Residuos; 2013 [actualizado 2 Mayo 2016; citado 2 Mayo 2016]. Disponible en: <http://ceroresiduos.eu/objetivos/objetivos-39.html>
- Cherry, J. P. 1999. Improving the safety of fresh produce with antimicrobials. *Food Technology*. 53: 54-57.
- Cropscience.bayer.es [internet]. España: Crop Science; 2008 [actualizado 16 Septiembre 2015; citado 30 Abril 2016]. Disponible en: <http://www.cropscience.bayer.es/>
- Deza, M. A., Araujo, M. y Garrido, M. J. 2003. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on the surface of tomatoes by neutral electrolyzed water. *Letters in Applied Microbiology*. 37: 482-487.
- Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas.
- Elika.eus [internet]. País Vasco: ELIKA; 2001 [actualizado 17 Mayo 2011; citado 30 Marzo 2016]. Disponible en: http://www.elika.eus/consumidor/es/preguntas_residuos.asp
- EMINFOR S.L. Tratamiento de aguas [internet]. Barcelona: Eminfor & Sergi Martín; 2013 [actualizado Junio 2010; citado 22 Marzo 2016]. Disponible en: <http://www.eminfor.com/index.php>
- Estrela, C., Estrela, C. R. A., Barbin, E. L., Spanó, J. C. E., Marchesan, M. A. y Pécora, J. D. 2002. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dentistry*. J13 (2): 113-117.
- FEPEX.es [internet]. España: Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas vivas; 2013 [actualizado 2015; citado 22 Marzo 2016]. Disponible en: <http://www.fepex.es/ext/sector-frutas-hortalizas.aspx>
- Finnegan, M., Linley, E., Denyer, S. P., McDonnell, G., Simons, C. y Maillard, J-Y. 2010. Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas forms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65: 2108-2115.
- Guentzel, J. L., Lam, K. L., Callan, M. A., Emmons, S. A. y Dunham, V. L. 2008. Reduction of bacteria on spinach, lettuce and surfaces in food service area using neutral electrolyzed oxidizing water. *Food Microbiology*. 25: 36-41.
- Han, Y., Linton, R. H., Nielsen, S.S. y Nelson, P. E. 2001. Reduction of *Listeria monocytogenes* on green peppers (*Capsicum annuum* L.) by gaseous and aqueous chlorine dioxide and water washing and its growth at 7°C. *Journal of Food Protection*. 64: 1730-1738.
- Jay, J. M. 1996. Modern food microbiology, 5th ed. Aspen Pub., Frederick, MD. 48-49.
- Karl R. Matthews. 2006. Microbiología de las frutas y las verduras frescas. Zaragoza (España): Acribia, S.A.
- Len, S-V., Hung, Y-C., Ericksen, M. C. y Kim, C. 2000. Ultraviolet spectrophotometric characterization and bactericidal properties of electrolyzed oxidizing water as influenced by amperage and pH. *Journal of Food Protection*. 63: 1534-1537.
- Lozano Tomás, C., Cambra Álvarez, M. y Aguado Martínez, A. M^a. Situación actual de las plagas y las enfermedades de los frutales de hueso en Aragón. VidaRURAL [internet]. 2012 [citado 22 Marzo 2016]; 339: 25-39. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_Vrural%2FVrural_2012_339_25_29.pdf
- Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., editores. 2011. Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing. Nueva York: CRC Press.

-
- McPherson, L. L. 1993. Understanding ORP's role in the disinfection process. *Water Engineering and Management*. November. 29-31.
- Ogawa, J. M., Hoy, M. W., Manji, B. T., y Hall, D. H. 1980. Proper use of chlorine for postharvest decay control of fresh market tomatoes. California Tomato Rama, *Informational Bulletin*. 27: 2.
- Palou, L. 2012. Situación actual del control de enfermedades de pos-cosecha de cítricos en España. *Fruticultura*. N° 23: 24-31.
- Reglamento (CE) n° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo.
- Rico, D., Martin-Diana, A. B., Barry-Ryan, C., Frias, J. M., Henehan, G. T. M. y Barat, J. M. 2008. Use of neutral electrolysed water (EW) for quality maintenance and shelf life extension of minimally processed lettuce. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9: 37-48.
- Rittman, D. D. 1997. "Can you have your cake and eat it too" with chlorine dioxide? *Water & Wastes Digest magazine*.
- Robbs, P. G., Bartz, J. A., Brecht, J. K. y Sargent, S. A. 1995. Oxidation-reduction potential of chlorine solutions and their toxicity to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Geotrichum candidum*. *Plant Disease*. 79: 158-162.
- Rodrigo García. Frutas de hueso: una apuesta jugosa y segura. Origen [internet]. 2014 [citado 22 Marzo 2016]. 29: 1-4. Disponible en: <http://www.origenonline.es/reportajes-frutas-hueso-una-apuesta-jugosa-y-segura/1/2538.html>
- Roller, S. D., Olivieri, V. P. y Kawata, K. 1980. Mode of bacterial inactivation by chlorine dioxide. *Water Research*. 14: 635-641.
- Sapers, G. M. 2001. Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. *Food Technology and Biotechnology*. 39: 305-311.
- Sapers, G. M., R. L. Miller, M. Jantschke, y A. M. Mattrazzo. 2000. Factors limiting the efficacy of hydrogen peroxide washes for decontamination of apples containing *Escherichia coli*. *Journal of Food Science*. 65: 529-532.
- Sarabia.eu [internet]. España: Exclusivas Sarabia, S.A.; 2014 [actualizado 2016; citado 18 Mayo 2016]. Disponible en: http://www.sarabia.eu/productos/index.php?content=mostraproducte&id_producto=44
- Sewell, A. M., y Farber, J. M. 2001. Foodborne outbreaks in Canada linked to produce. *Journal of Food Protection*. 64: 1863-1877.
- Sivapalasingam, S., Friedman, C. R., Cohen, L. y Tauxe, R. V. 2004. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*. 67: 2342-2353.
- Steele, M., Unger, S. y Odumeru, J. 2004. Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. *Journal of Food Protection*. 67: 2839-2849.
- Syngentacropprotection.com [internet]. Estados Unidos: Syngenta Crop Protection, LLC; 2015 [actualizado 30 Marzo 2015; citado 22 Marzo 2016]. Disponible en: <http://www.syngentacropprotection.com/>
- Tsai, L. H., Higby, R. y Schade, J. 1995. Disinfection of poultry chiller water with chlorine dioxide: consumption and byproduct formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43: 2768-2773.
- Venczel, L. V., Arrowood, M., Hurd, M. y Sobsey, M. D. 1997. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 1598-1601. See also errata in 63, 4625.
- Vicente M. Gómez-López. 2012. Decontamination of Fresh and Minimally Processed Produce. Estados Unidos: Wiley-Blackwell.
- Walker, H. W., y LaGrange, W. S. 1991. Sanitation in food manufacturing operations, in *Disinfection, sterilization, and preservation*. Block, S. E., Ed., 4th ed., Lea and Febiger, Philadelphia.
- White, G. C. 1992. *Handbook of chlorination and alternative disinfectants*. 3rd ed., Van Nostrand Reinhold, New York.
- Wim Jongen. 2005. Improving the safety of fresh fruit and vegetables. Nueva York: CRC Press.
- Young, S. B. y Setlow, P. 2003. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 54-67.

ANEXO I

Tabla 1: Diseño experimental de los tratamientos realizados en el Epígrafe 3.2.2.1. ‘Eficacia del agua electrolizada y del dióxido de cloro en la reducción de microorganismos presentes en la superficie de frutas de hueso’

FRUTA	VARIEDAD	TRATAMIENTO	TIEMPO CONTACTO	CARACTERÍSTICAS*
Melocotón	CG-58	Agua electrolizada	5 min	ORP ^a : 766 mV Cloro libre: 102 mg/L
	Spring Flame	Agua de red	10 min	pH: 8,04 Cloro: 0 mg/L ORP ^a : 456 mV Turbidez: 0,32 NTU
		Agua electrolizada	5 min	ORP ^a : 780 mV Cloro libre: 149 mg/L
		Agua electrolizada	15 min	
		Dióxido de cloro (10 ppm)	15 min	pH: 7,37 ORP ^a : 740 mV Cloro libre: 3 mg/L
		Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	pH: 7,09 ORP ^a : 764 mV Cloro libre: 6 mg/L
	Rich Lady	Agua de red	10 min	ORP ^a : 776 mV Cloro libre: 168 mg/L
		Agua electrolizada	5 min	
		Agua electrolizada	15 min	
		Dióxido de cloro (10 ppm)	15 min	
		Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	
Paraguay	796	Agua de red	10 min	ORP ^a : 775 mV Cloro libre: 197 mg/L
		Agua electrolizada	5 min	
		Agua electrolizada	15 min	
		Dióxido de cloro (10 ppm)	15 min	
		Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	
	Flatstar	Agua de red	10 min	ORP ^a : 775 mV Cloro libre: 197 mg/L
		Agua electrolizada	5 min	
		Agua electrolizada	15 min	
		Dióxido de cloro (10 ppm)	5 min	
		Dióxido de cloro (10 ppm)	20 min	
Nectarina	696	Agua de red	10 min	ORP ^a : 780 mV Cloro libre: 149 mg/L
		Agua electrolizada	5 min	
		Agua electrolizada	15 min	
		Dióxido de cloro (10 ppm)	15 min	
		Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	
Albaricoque	Tsunami	Agua de red	10 min	ORP ^a : 769 mV Cloro libre: 71 mg/L
		Agua electrolizada	5 min	
		Agua electrolizada	15 min	
		Dióxido de cloro (20 ppm)	5 min	
		Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	

* Las características de pH, ORP, Cloro libre y turbidez de los tratamientos con 10 y 20 ppm de dióxido de cloro y los tratamientos con agua de red son iguales para todos los ensayos.

^aORP: Potencial de oxidación-reducción.

Tabla 2: Diseño experimental de los tratamientos realizados para la reducción de fungicidas, indicado en el Epígrafe 3.2.3.1.
‘Eficacia del lavado con agua electrolizada para la reducción de fludioxonil, ciprodinil, iprodiona y tebuconazol’

FRUTA	VARIEDAD	MATERIA ACTIVA	TRATAMIENTO	TIEMPO CONTACTO	CARACTERÍSTICAS*
Cereza	Satín	Fludioxonil	Agua de red	10 min	pH: 8,04 Cloro: 0 mg/L ORP ^a : 456 mV Turbidez: 0,32 NTU
			Agua electrolizada	10 min	ORP ^a : 771 mV Cloro libre: 148 mg/L
			Agua electrolizada	20 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	10 min	pH: 7,37 ORP ^a : 740 mV Cloro libre: 3 mg/L
			Dióxido de cloro (10 ppm)	20 min	
	Sonata	Fludioxonil	Agua de red	10 min	ORP ^a : 771 mV Cloro libre: 148 mg/L
			Agua electrolizada	10 min	
			Agua electrolizada	20 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	10 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	20 min	
Melocotón	CG-58	Fludioxonil	Agua de red	10 min	ORP ^a : 754 mV Cloro libre: 110 mg/L
			Agua electrolizada	10 min	
			Agua electrolizada	35 min	
			Dióxido de cloro (40 ppm)	10 min	pH: 7 ORP ^a : 780 mV Cloro libre: 11 mg/L
			Dióxido de cloro (40 ppm)	30 min	
	Spring Flame	Ciprodinil	Agua de red	10 min	ORP ^a : 780 mV Cloro libre: 149 mg/L
			Agua electrolizada	5 min	
			Agua electrolizada	15 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	15 min	pH: 7,09 ORP ^a : 764 mV Cloro libre: 6 mg/L
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	
	Rich Lady	Ciprodinil	Agua de red	10 min	ORP ^a : 769 mV Cloro libre: 143 mg/L
			Agua electrolizada	25 min	
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	5 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	20 min	
		Iprodiona	Agua de red	10 min	ORP ^a : 769 mV Cloro libre: 143 mg/L
			Agua electrolizada	25 min	
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	5 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	20 min	

FRUTA	VARIEDAD	MATERIA ACTIVA	TRATAMIENTO	TIEMPO CONTACTO	CARACTERÍSTICAS*
Nectarina	696	Iprodiona	Agua de red	10 min	ORP ^a : 780 mV Cloro libre: 149 mg/L
			Agua electrolizada	5 min	
			Agua electrolizada	15 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	15 min	
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	
	Nectafun	Iprodiona	Agua de red	10 min	ORP ^a : 769 mV Cloro libre: 143 mg/L
			Agua electrolizada	25 min	
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	5 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	20 min	
		Ciprodinil	Agua de red	10 min	ORP ^a : 769 mV Cloro libre: 143 mg/L
			Agua electrolizada	25 min	
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	5 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	20 min	
Paraguay	796	Ciprodinil	Agua de red	10 min	ORP ^a : 775 mV Cloro libre: 197 mg/L
			Agua electrolizada	5 min	
			Agua electrolizada	15 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	15 min	
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	
	Flatstar	Ciprodinil	Agua de red	10 min	ORP ^a : 775 mV Cloro libre: 197 mg/L
			Agua electrolizada	5 min	
			Agua electrolizada	15 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	15 min	
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	
Albaricoque	Tsunami	Tebuconazol	Agua de red	10 min	ORP ^a : 580 mV Cloro libre: 71 mg/L
			Agua electrolizada	5 min	
			Agua electrolizada	15 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	15 min	
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	
	Pink Cot	Tebuconazol	Agua de red	10 min	ORP ^a : 769 mV Cloro libre: 160 mg/L
			Agua electrolizada	25 min	
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	5 min	
			Dióxido de cloro (10 ppm)	20 min	

* Las características de pH, ORP, Cloro libre y turbidez de los tratamientos con 10 y 20 ppm de dióxido de cloro y los tratamientos con agua de red son iguales para todos los ensayos.

^aORP: Potencial de oxidación-reducción.

Tabla 3: Diseño experimental de los tratamientos realizados para la reducción de fludioxonil en melocotones (variedad CG-58) y cerezas (variedades Satín y Sonata), indicado en el Epígrafe 3.2.3.2 ‘Eficacia del uso de fludioxonil y el posterior lavado con agua electrolizada en la reducción de *M. fructicola*’.

FRUTA	TRATAMIENTO	TIEMPO CONTACTO	CARACTERÍSTICAS
Cerezas (Satín y Sonata)	Agua de red	10 min	pH: 8,04 Cloro: 0 mg/L ORP ^a : 456 mV Turbidez: 0,32 NTU
	Agua electrolizada	10 min	ORP ^a : 771 mV
	Agua electrolizada	20 min	Cloro libre: 148 mg/L
	Dióxido de cloro (10 ppm)	10 min	pH: 7,37
	Dióxido de cloro (10 ppm)	20 min	ORP ^a : 740 mV Cloro libre: 3 mg/L
Melocotón (CG-58)	Agua de red	10 min	pH: 8,04 Cloro: 0 mg/L ORP ^a : 456 mV Turbidez: 0,32 NTU
	Agua electrolizada	10 min	ORP ^a : 754 mV
	Agua electrolizada	35 min	Cloro libre: 110 mg/L
	Dióxido de cloro (40 ppm)	10 min	pH: 7
	Dióxido de cloro (40 ppm)	30 min	ORP ^a : 780 mV Cloro libre: 11 mg/L

^aORP: Potencial de oxidación-reducción

ANEXO II



Figura 20: Melocotones control (izquierda) y melocotones tratados con agua electrolizada (derecha) en el día 5 de incubación a 20 °C.



Figura 21: Melocotones control (izquierda) y melocotones tratados con agua electrolizada (derecha) en el día 6 de incubación a 20 °C.



Figura 22: Melocotones control (izquierda) y melocotones tratados con agua electrolizada (derecha) en el día 7 de incubación a 20 °C.

ANEXO III

Tabla 5: Porcentaje de reducción de fludioxonil, ciprodinil, iprodiona y tebuconazol ocasionado por los tratamientos con agua electrolizada y dióxido de cloro.

FRUTA	VARIEDAD	MATERIA ACTIVA	TRATAMIENTO	TIEMPO CONTACTO	% REDUCCIÓN
Cereza	Satín	Fludioxonil	Agua de red	10 min	75,22
			Agua electrolizada	10 min	75,65
			Agua electrolizada	20 min	80,87
			Dióxido de cloro (10 ppm)	10 min	85,65
			Dióxido de cloro (10 ppm)	20 min	79,13
	Sonata	Fludioxonil	Agua de red	10 min	75,15
			Agua electrolizada	10 min	59,49
			Agua electrolizada	20 min	79,75
			Dióxido de cloro (10 ppm)	10 min	67,09
			Dióxido de cloro (10 ppm)	20 min	75,95
Melocotón	CG-58	Fludioxonil	Agua de red	10 min	41,88
			Agua electrolizada	10 min	37,50
			Agua electrolizada	35 min	48,13
			Dióxido de cloro (40 ppm)	10 min	46,25
			Dióxido de cloro (40 ppm)	30 min	50,63
	Spring Flame	Ciprodinil	Agua de red	10 min	19,70
			Agua electrolizada	5 min	27,27
			Agua electrolizada	15 min	40,91
			Dióxido de cloro (10 ppm)	15 min	19,70
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	22,73
	Rich Lady	Ciprodinil	Agua de red	10 min	8,67
			Agua electrolizada	25 min	10,00
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	36,00
			Dióxido de cloro (10 ppm)	5 min	30,67
			Dióxido de cloro (10 ppm)	20 min	6,67
		Iprodiona	Agua de red	10 min	100,00
			Agua electrolizada	25 min	40,00
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	100,00
			Dióxido de cloro (10 ppm)	5 min	40,00
			Dióxido de cloro (10 ppm)	20 min	0,00

FRUTA	VARIEDAD	MATERIA ACTIVA	TRATAMIENTO	TIEMPO CONTACTO	% REDUCCIÓN
Nectarina	696	Iprodiona	Agua de red	10 min	26,67
			Agua electrolizada	5 min	22,67
			Agua electrolizada	15 min	10,67
			Dióxido de cloro (10 ppm)	15 min	34,67
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	37,33
	Nectafun	Iprodiona	Agua de red	10 min	0,00
			Agua electrolizada	25 min	35,00
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	0,00
			Dióxido de cloro (10 ppm)	5 min	25,00
			Dióxido de cloro (10 ppm)	20 min	5,00
		Ciprodinil	Agua de red	10 min	-156,25
			Agua electrolizada	25 min	100,00
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	100,00
			Dióxido de cloro (10 ppm)	5 min	100,00
			Dióxido de cloro (10 ppm)	20 min	0,00
Paraguay	796	Ciprodinil	Agua de red	10 min	0,00
			Agua electrolizada	5 min	0,00
			Agua electrolizada	15 min	0,00
			Dióxido de cloro (10 ppm)	15 min	0,00
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	0,00
	Flatstar	Ciprodinil	Agua de red	10 min	34,29
			Agua electrolizada	5 min	8,57
			Agua electrolizada	15 min	-11,43
			Dióxido de cloro (10 ppm)	15 min	37,14
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	20,00
Albaricoque	Tsunami	Tebuconazol	Agua de red	10 min	41,54
			Agua electrolizada	5 min	0,00
			Agua electrolizada	15 min	35,38
			Dióxido de cloro (10 ppm)	15 min	63,08
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	64,62
	Pink Cot	Tebuconazol	Agua de red	10 min	50,00
			Agua electrolizada	25 min	30,00
			Dióxido de cloro (20 ppm)	15 min	4,00
			Dióxido de cloro (10 ppm)	5 min	0,00
			Dióxido de cloro (10 ppm)	20 min	34,00