



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Química

Estabilidad de manzanas
refrigeradas en jugos de bajo pH

Tesis Doctoral
Silvina Cecilia Andrés

2001

Tesis No 1079

COMPRA.....
Fecha.....
Inv. B.....
57452



***Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Química***

***Estabilidad de manzanas
refrigeradas en jugos de bajo pH***

Tesis Doctoral

Silvina Cecilia Andrés

2001

A Jimena
A Fer

Agradecimientos

- *A la Dra. Noemí Zaritzky, quien me dirigió a lo largo de estos años brindándome su experiencia, predisposición y apoyo.*
- *A la Dra. Leda Giannuzzi, quien me codirigió en este trabajo, por su constante apoyo y optimismo.*
- *A la Dra. María Cristina Añon por haberme permitido realizar tareas de investigación en el CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos).*
- *A Alejandra, Adriana, Charo y Graciela, con quien compartimos momentos felices y no tanto, por su ayuda incondicional y por su amistad.*
- *A Nora B., Arturo, Alejandra, Adriana P., Mercedes, Graciela G., Aldo, Juan Martín y a todos los que de una u otra forma me ayudaron con equipos o técnicas de laboratorio.*
- *A mis compañeros del CIDCA, a todos y cada uno por su apoyo y compañerismo.*
- *A los investigadores del IBBM por permitirme utilizar el flujo de seguridad para los ensayos de inoculación.*
- *A los docentes de la cátedra de Micología de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, por su ayuda en la identificación de hongos.*
- *Al personal del Laboratorio Central del Ministerio de Salud de la Pcia. de Buenos Aires, por su colaboración en la identificación de levaduras.*
- *Al personal del CITEFA, por su colaboración en la toma de fotografías mediante ESEM.*
- *A los docentes de la Cátedra de Fruticultura de la Facultad de Agronomía, UNLP, por el material bibliográfico.*
- *A mis compañeros de la Cátedra de Bromatología, por su apoyo.*
- *A la Dra. Graciela De Antoni y el Dr. Patricio de Urraza, por su ayuda y disposición en los primeros pasos en la investigación.*
- *A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Bs. As. por su apoyo financiero.*
- *A mis padres y mi familia por todo lo que siempre hicieron por mí.*
- *A Fer por su cariño, por estar siempre y por Jimena.*

Parte de los resultados presentados en el presente trabajo de tesis han sido publicados en los siguientes trabajos:

➤ **Efecto de la adición de ácidos orgánicos y del envasado al vacío en las propiedades físicas y flora microbiana de cubos de manzanas refrigerados.**

Andrés, S.; Giannuzzi, L. y Zaritzky, N. Actas del II Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, (1998), Bahía Blanca, Argentina.

➤ **Vida útil de cubos de manzanas en sistemas de bajo pH, refrigerados y envasados en películas plásticas.**

Andrés, S. C.; Giannuzzi, L. y Zaritzky, N. Actas del VII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, (1999), Rafaela, Santa Fe, Argentina.

➤ **Effect of chemical preservatives and packaging film permeability on microbial growth in refrigerated orange juice.**

Andrés, S. C.; Giannuzzi, L. and Zaritzky, N. Proceedings of "Food Microbiology and Food Safety into the Next Millennium", Seventeenth International Conference of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH), (1999), Veldhoven, Holanda.

➤ **Microbial Flora During Storage of Packaged Fresh Orange Juice**

Andrés, S. C.; Giannuzzi, L. and Zaritzky, N. SCANNING, The Journal of Scanning Microscopies, 21, 147-148 (1999).

➤ **Firmness of Apple Tissue in Low pH Juice and Related Microstructural Analysis**

Andrés, S. C.; Giannuzzi, L. and Zaritzky, N. SCANNING, The Journal of Scanning Microscopies, 21, 148-149 (1999).

➤ **Effect of chemical preservatives on the quality of refrigerated apple cubes in orange juice packaged in different plastic films.**

Andrés, S. C.; Giannuzzi, L. and Zaritzky, N. Proceedings of Eighth International Congress on Engineering and Food (2000), Puebla, México.

➤ **Modelling of microbial growth in packaged refrigerated apple cubes immersed in orange juice with potassium sorbate.**

Andrés, S. C.; Giannuzzi, L. y Zaritzky, N. Aceptado para su publicación en Proceedings del 3rd International Conference on Predictive Modelling in Foods, (2000), Leuven, Bélgica.

➤ **Packaging effect on the quality of refrigerated apple cubes in systems containing oranges juice, organic acids and preservatives.**

Andrés, S. C.; Giannuzzi, L. and Zaritzky, N. Proceedings of Improving Postharvest Technologies of Fruits, Vegetables and Ornamentals, (2000), Murcia, España.

➤ **Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated orange juice treated with chemical preservatives**

Andrés, S. C.; Giannuzzi, L. and Zaritzky, N. *Journal of Food Science*. En prensa. 2001.

➤ **Quality parameters of packaged refrigerated apple cubes in low pH juice**

Andrés, S. C.; Giannuzzi, L. and Zaritzky, N. En etapa de revisión de "Food Science and Technology - Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie (Iwt)".

Asimismo, se ha obtenido el Premio LAS-DAMYC al mejor trabajo de investigación relacionado con los aspectos microbiológicos de los alimentos y sus procesos de elaboración en el marco del VI Congreso Latinoamericano de Microbiología de Alimentos y I Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos (Microal 2000), Buenos Aires, Argentina, por el trabajo: "Acción de preservadores químicos y permeabilidad de películas plásticas de envase, en el desarrollo microbiano y la calidad de manzanas sin piel en jugo de bajo pH". Andrés, S. C.; Giannuzzi, L. y Zaritzky, N.

1. INTRODUCCION	1
1.1 PARAMETROS DE CALIDAD DE FRUTAS MINIMAMENTE PROCESADAS REFRIGERADAS	2
1.1.1 Pardeamiento	2
1.1.2 Modificaciones en la textura	6
1.1.3 Alteraciones microbianas	6
1.2 CONSERVACION DE FRUTAS	12
1.2.1 Métodos de conservación	14
1.2.1.1 Métodos químicos	17
1.2.1.2 Temperatura	42
1.2.1.3 Actividad acuosa	43
1.2.1.4 Potencial de óxido-reducción	43
1.2.1.5 Envasado	44
1.3 FRUTAS QUE INTEGRAN EL SISTEMA BAJO ESTUDIO: MANZANAS (Malus domestic) Y NARANJAS (Citrus sinensis)	45
1.3.1 Producción	45
1.3.2 Estructura de frutos	48
1.3.3 Fisiología	50
1.3.4 Composición	55
1.4 OBJETIVOS	62
2. MATERIALES Y METODOS	66
2.1 MATERIAS PRIMAS Y REACTIVOS	66
2.2 CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LAS MATERIAS PRIMAS	67
2.2.1 Métodos para expresar la acidez	67
2.2.1.1 Determinación del pH	68
2.2.1.2 Determinación de Acidez Titulable	69
2.2.2 Determinación de ácidos orgánicos	69
2.2.2.1 HPLC (Cromatografía líquida de alta presión)	69
2.2.2.2 Determinación de ácido L-ascórbico: método enzimático-colorimétrico	69
2.2.3 Determinación de azúcares	71
2.2.4 Sólidos solubles, insolubles y totales	73
2.3 PREPARACION DE LAS MUESTRAS	73
2.4 DETERMINACION DE LOS PARAMETROS DE CALIDAD	74
2.4.1 Análisis sensorial	74

2.4.2 Determinación instrumental de la coloración superficial	75
2.4.3 Determinación de textura	77
2.4.4 Estudios microbiológicos	79
2.4.4.1 Recuentos microbianos	79
2.4.4.2 Calidad sanitaria	80
2.4.4.3 Identificación de la flora microbiana	84
2.4.4.3.1 Identificación de bacterias	84
2.4.4.3.2 Identificación de levaduras y hongos	86
2.4.4.3.2.1 Levaduras	86
2.4.4.3.2.2 Hongos filamentosos	89
2.4.4.4 Observaciones microscópicas	90
2.4.4.5 Modelado matemático del desarrollo microbiano	90
2.4.4.6 Índice de Inhibición	92
2.4.4.7 Determinación de la composición de la atmósfera gaseosa en el interior del envase mediante cromatografía gaseosa	92
2.4.4.8 Determinación del contenido de vitamina C durante el almacenamiento	93
2.4.4.9 Determinación de Etanol por método enzimático-UV durante el almacenamiento	93
2.4.4.10 Abuso térmico	94
2.4.4.11 Inoculación con <i>Escherichia coli</i> O157:H7	94
2.4.5 Vida útil	95
2.5 ANALISIS ESTADISTICO	95
3. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LAS MATERIAS PRIMAS	96
3.1 Acidez titulable y pH	96
3.2 Acidos orgánicos	96
3.2.1 HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Presión)	96
3.2.2 Determinación de ácido L-ascórbico: método enzimático-colorimétrico	100
3.3 Azúcares	100
3.4 Sólidos solubles, insolubles y totales	102
4. CALIDAD DE LOS JUGOS	104
4.1 JUGOS ANALIZADOS	104
4.2 ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS	105
4.2.1 Jugo de naranjas pasteurizado	105

4.2.2 Jugo de naranjas fresco	105
4.2.2.1 Efecto del procedimiento de lavado de la piel de las naranjas	105
4.2.2.2 Efecto de la adición de ácidos orgánicos	107
4.2.2.3 Efecto del agregado de sorbato de potasio y benzoato de sodio sobre la microflora en jugo fresco de naranjas	110
4.2.2.4 Índice de Inhibición	112
4.2.2.5 Vida útil	112
5. CALIDAD DEL SISTEMA: MANZANAS EN JUGO DE BAJO pH	115
5.1 ANALISIS SENSORIAL PRELIMINAR	115
5.1.1 Evaluación sensorial (color, textura y aroma) de los sistemas	115
5.1.2 Evaluación sensorial (color y sabor) y reformulación de los sistemas	118
5.2 PARAMETROS DE CALIDAD	121
5.2.1 Formulaciones analizadas	121
5.2.2 Color superficial	122
5.2.3 Textura	129
5.2.4 Estudios microbiológicos	132
5.2.4.1 Identificación de la Flora microbiana	132
5.2.4.2 Recuentos microbianos	139
5.2.5 Contenido de CO ₂ y O ₂ en el interior del envase	149
5.2.6 Medida del contenido de vitamina C en el producto	150
5.2.7 Abuso térmico	153
5.2.8 Índice de inhibición	156
5.2.9 Vida útil	159
5.2.10 Inoculación con <i>Escherichia coli</i> O157:H7	161
5.2.11 Estado sanitario del producto formulado	162
6. CONCLUSIONES	163
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	168

1. INTRODUCCION

Los cambios en los estilos de vida, junto con el aumento en la demanda de calidad tipo fresco en todos los productos alimenticios, han llevado al desarrollo de una nueva categoría de frutas y vegetales "mínimamente procesados" (Rocha y col. 1998).

El "procesamiento mínimo" se ha definido como el manipuleo, preparación, envasado y distribución de productos vegetales en un estado tipo fresco, y que pueden incluir procesos como cepillado, cortado e irradiación de bajo nivel (O'Connor-Shaw y col., 1994).

El procesamiento mínimo de vegetales crudos tiene dos finalidades. La primera es preservar la frescura del producto a la vez que lo hace conveniente para su uso. La segunda es brindar un producto con suficiente vida útil para lograr una posible distribución del mismo dentro de un área razonable. El objetivo en el procesamiento mínimo es lograr que la vida útil del producto desde el punto de vista microbiológico, sensorial y nutricional (vitamina C) sea de al menos 4-7 días, y preferiblemente mayor. Sin embargo, como resultado del pelado y cortado, los vegetales pueden pasar de una forma de relativa estabilidad, con una vida útil de varias semanas y aún meses, a ser un vegetal perecedero con una corta vida útil de sólo dos o tres días a temperaturas de refrigeración. El incremento de la respiración, y las actividades microbianas y enzimáticas, son las principales razones de su reducida vida útil (Mattila y col. 1993).

Las ensaladas de fruta "listas para consumir" son normalmente preparadas con frutas frescas en jugos de bajo pH como es el jugo de naranjas; generalmente estas ensaladas de fruta incluyen cubos de manzanas. Las manzanas son un ejemplo de fruta susceptible al pardeamiento enzimático, resultado de la oxidación enzimática de fenoles endógenos produciendo quinonas que polimerizan dando productos marrones; las diferentes variedades de manzanas presentan diferente susceptibilidad al pardeamiento, lo cual altera los atributos de color, acortando la vida útil del producto (Kim y col., 1993).

El presente trabajo de Tesis se refiere al análisis de un sistema modelo de ensalada de fruta conservadas en fresco mediante refrigeración e incorporación de preservadores químicos y, la utilización de películas de diferente permeabilidad gaseosa. El objetivo fue desarrollar un producto refrigerado elaborado a base de manzanas cortadas mantenidas en jugo de naranjas, envasados en películas plásticas de diferente permeabilidad gaseosa, por lo cual se debieron considerar los principales aspectos de pérdida de calidad, tanto debido a las manzanas trozadas (la alteración del color superficial, las modificaciones en la textura y los aspectos microbiológicos) como al jugo de naranjas utilizado.

1.1 PARAMETROS DE PERDIDA DE CALIDAD DE FRUTAS MINIMAMENTE PROCESADAS REFRIGERADAS

En productos mínimamente procesados refrigerados, los sistemas enzimáticos permanecen activos, y tienen abundante microflora al momento del envasado. La deterioro del producto, luego de la cosecha, es ocasionado principalmente por la respiración y el madurado (en frutos climatéricos) y una eventual senescencia del tejido por la cual disminuyen las reservas energéticas (en frutos climatéricos o no climatéricos), pérdida de agua por transpiración, deterioro por crecimiento de microorganismos y daños mecánicos durante su transporte.

El procesamiento mínimo incrementa estas pérdidas de calidad por aumento de la velocidad de respiración, incremento de la pérdida de humedad por aumento del área de corte, y por incremento de la disponibilidad de nutrientes celulares liberados que son utilizados por la microflora.

Enzimas y sustratos están normalmente localizados en distintos compartimentos celulares y su transferencia está regulada activamente. Por el procesamiento hay destrucción de superficies celulares y lesiones del tejido. Las reacciones enzimáticas provocan deterioro sensorial, como off-flavor, alteración de color y pérdida de firmeza:

- **off-flavor**: la peroxidación enzimática de ácidos grasos insaturados es el ejemplo más dramático de las modificaciones bioquímicas del aroma natural de vegetales que han sido mínimamente procesados. Esta peroxidación está catalizada por la *lipoxigenasa* y lleva a la formación de numerosos aldehídos y cetonas.

- **alteración del color**: La principal alteración del color que ocurre en tejidos vegetales dañados es el *pardeamiento enzimático*. La actividad enzimática depende marcadamente del pH; una reducción de 0.5 del pH natural de manzanas resulta en una disminución del 50% en la actividad de la *polifenoloxidasas* (PPO) de cloroplastos.

- **pérdida de firmeza**: debido a la hidrólisis enzimática de componentes de la pared celular. En células dañadas se liberan *enzimas pectinolíticas* y *proteolíticas* que podrían difundir en tejidos internos.

1.1.1 Pardeamiento

Muchos productos alimenticios sufren pardeamiento debido a reacciones enzimáticas o no enzimáticas que ocurren durante el procesamiento y almacenamiento.

Dichas reacciones tienen gran influencia en la calidad de los alimentos y por lo tanto son de suma importancia en la industria alimenticia.

El pardeamiento en alimentos es más complejo que una simple clasificación de estas reacciones como enzimáticas o no enzimáticas, debido al gran número de reacciones secundarias que pueden ocurrir. Esto se ve reflejado en el rango de colores producidos por dichas reacciones, aún en las mismas condiciones. Por ejemplo, las papas pre-peladas pueden desarrollar coloraciones rojas, marrones o aún negras, a veces, en sitios opuestos del mismo tubérculo. Estas coloraciones son resultado de reacciones de pardeamiento enzimático, pero el oscurecimiento posterior a la cocción, no enzimático, inducido por calentamiento también puede contribuir a la coloración de la superficie pelada. La alteración de color puede ocurrir también en algunos alimentos crudos en los que el ácido ascórbico endógeno o agregado es oxidado a ácido dehidroascórbico, el que luego reacciona con aminoácidos produciendo colores marrones por reacción de Maillard u otras reacciones no enzimáticas (Sapers, 1993).

🕒 **Pardeamiento enzimático:** es la alteración de color que se produce cuando compuestos mono y difenólicos de las plantas, en presencia de oxígeno atmosférico y la enzima polifenoloxidasa (PPO), son hidroxilados a *o*-difenoles, y luego oxidados a *o*-quinonas. Las *o*-quinonas son compuestos altamente reactivos y pueden polimerizar espontáneamente para formar compuestos de alto peso molecular o pigmentos marrones (melaninas), o reaccionar no enzimáticamente con aminoácidos y proteínas para incrementar el color marrón producido (Figura 1.1).

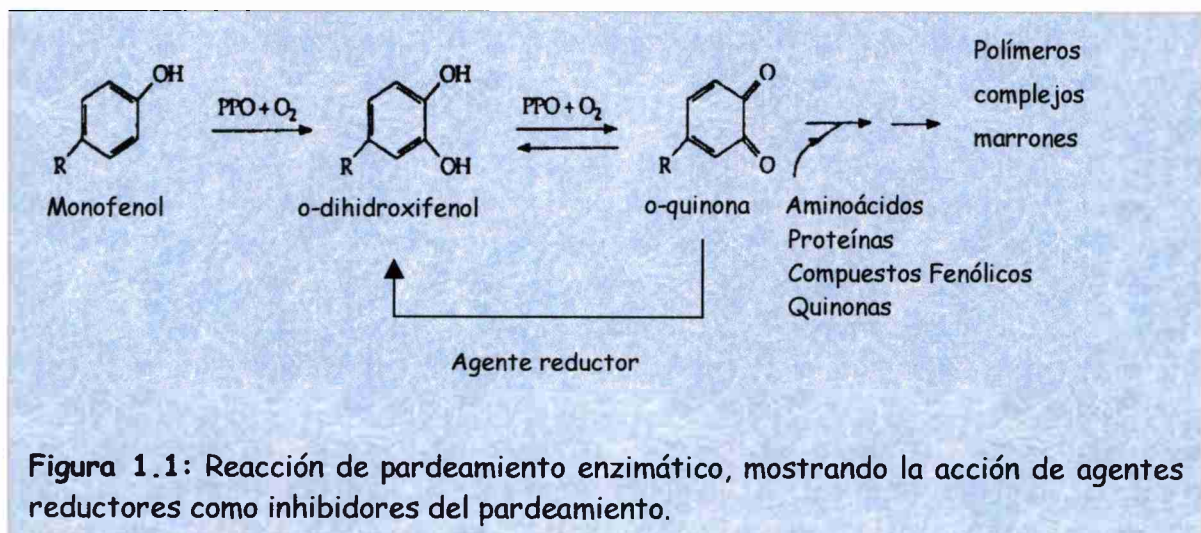


Figura 1.1: Reacción de pardeamiento enzimático, mostrando la acción de agentes reductores como inhibidores del pardeamiento.

Diversas variedades de compuestos fenólicos son oxidadas por la PPO; los sustratos más importantes son catequinas, ésteres de ácido cinámico, 3,4-hidroxifenilalanina (DOPA) y tirosina. El pH óptimo para la actividad PPO es entre 5 y 7. La enzima es relativamente lábil al calor y puede ser inhibida por ácidos, haluros, ácidos fenólicos, sulfitos, agentes quelantes, agentes reductores como ácido ascórbico, quinonas acopladoras como cisteína, y compuestos ligadores de sustratos.

En frutas y vegetales enteros o sin dañar, los sustratos fenólicos naturales están separados de la PPO por compartimentalización, y no ocurre pardeamiento. Esta alteración de color limita la vida útil de muchos alimentos con procesamiento mínimo o disminuye su valor de mercado; también constituye un problema en frutas y vegetales deshidratados y congelados (Huxsoll y col., 1989). El pardeamiento enzimático es un problema importante en frutas, como manzanas, peras, duraznos, bananas, y también en vegetales como papas, hongos y lechugas.

El pardeamiento enzimático no es siempre un defecto; esta reacción contribuye al color deseable y flavor de algunos productos como café, té, cacao, pasas y ciruelas (Vamos-Vigyazo, 1981).

El pardeamiento enzimático puede controlarse en determinados productos de frutas y vegetales por escaldado, inactivando la PPO (Ma y col., 1992). El escaldado no puede usarse en algunos productos, ya que podría afectar contrariamente el flavor y la textura. Por lo tanto, en estos casos deben aplicarse otros procesos como la exclusión de oxígeno y/o la aplicación de inhibidores del pardeamiento.

● Pardeamiento no enzimático: resulta de la polimerización de compuestos fenólicos endógenos, así como de la reacción de grupos carbonilo y amino libres, llevando a la formación de pigmentos marrones tipo melaninas (la clásica reacción de Maillard). Estas reacciones limitan la vida útil de muchas frutas y vegetales deshidratados, productos cítricos y jugos (Sapers, 1993). A pesar que la reacción de pardeamiento no enzimático entre azúcares reductores y aminoácidos o proteínas es importante en muchos productos, el pardeamiento sólo resulta de la degradación de azúcares o de la degradación oxidativa del ácido ascórbico y la posterior reacción de los compuestos carbonilo formados vía condensación aldólica o reacción con grupos amino para dar pigmentos marrones. Los compuestos fenólicos también pueden sufrir oxidación no enzimática para dar pigmentos marrones.

Además de provocar la alteración de color, el pardeamiento no enzimático produce una destrucción de nutrientes como aminoácidos esenciales y ácido ascórbico,

disminuye la digestibilidad de proteínas, inhibe las enzimas digestivas e interfiere en el metabolismo mineral por complejar iones metálicos. Asimismo, en la reacción de Maillard pueden formarse productos potencialmente tóxicos y mutagénicos, especialmente en alimentos provenientes de músculo cocido.

La extensión del pardeamiento no enzimático en alimentos depende de la composición del producto, por ejemplo, de los precursores de Maillard, del pH, de la actividad acuosa (a_w), exposición al oxígeno y, del tiempo y temperatura de almacenamiento (Sapers, 1993).

El pardeamiento no enzimático en frutas y vegetales puede inhibirse por refrigeración, controlando el a_w en alimentos deshidratados, disminuyendo el contenido de azúcares reductores en papas durante el almacenamiento, disminuyendo el contenido de nitrógeno amínico en jugos por exclusión iónica, envasando con secuestrantes de oxígeno, y mediante el uso de sulfitos. Los aminoácidos con grupos sulfhidrilos han sido similares en su efectividad al bisulfito para controlar el pardeamiento no enzimático en sistemas modelo. Sin embargo, el tratamiento con cisteína no fue efectivo en manzanas deshidratadas.

La severidad del pardeamiento enzimático en superficies cortadas o peladas de frutas y vegetales depende en parte del grado de daño producido al tejido superficial por el procedimiento de pelado o cortado. El pelado de papas con un cuchillo filoso ocasiona menos daño que el pelado por abrasión o vapor (Sapers y col., 1989a). El sistema de corte con "jet" de agua produce más daño celular subsuperficial en rodajas de papas que una hoja de cuchillo afilada, como lo ha demostrado la microscopía electrónica de barrido y la medida de extractabilidad de proteínas de la superficie cortada (Becker y Gray, 1992).

Las distintas variedades de frutas y vegetales muestran grandes diferencias en su tendencia al pardeamiento, debido a la variación entre ellas de la actividad de PPO y el contenido de sustratos. Las manzanas Empire y Granny Smith (Coseteng y Lee, 1987; Sapers y Douglas, 1987), y las papas Atlantic (Sapers y col., 1989a) son ejemplos de variedades que se pardean lentamente. Estas diferencias pueden ser utilizadas en la selección del material para procesar con baja tendencia al pardeamiento de manera que los tratamientos para controlarlo puedan minimizarse. Los métodos de ingeniería genética así como el convencional cultivo de plantas pueden resultar de suma utilidad para desarrollar frutas y vegetales de bajo pardeamiento.

1.1.2 Modificaciones en la textura

El término **textura**, como se aplica a alimentos, ha sido interpretado tan ampliamente por diferentes autores que incluye distintas características de apariencias y del sentido del tacto además de las características de textura experimentadas durante el consumo mismo del alimento. En el presente contexto, el término debe ser usado para cubrir sólo aquellas propiedades que son percibidas por el sentido del tacto en la boca. Los órganos responsables de la percepción de dicho atributo, por lo tanto, son las terminaciones sensoriales nerviosas relacionadas con el tacto y la presión en la superficie de la boca, y en los músculos y tendones involucrados en la masticación.

La **textura** es una propiedad compleja que se manifiesta de diversas maneras. Los diferentes términos utilizados para describir los cambios texturales en productos de frutas y vegetales incluyen firmeza, jugosidad, fibrosidad, arenosidad o harinosidad. En un análisis final, estos atributos son dependientes de las propiedades físicas y de la organización estructural del principal constituyente del tejido.

La **textura** es un factor de calidad importante para manzanas frescas. Las células del parénquima y los espacios intercelulares están estrechamente dispuestos en un patrón tipo red, inhomogéneo y anisotrópico.

1.1.3 Alteraciones microbianas

Entre los índices de calidad, el principal factor que limita la vida útil de un producto es el desarrollo microbiano (Fu y Labuza, 1993). Los microorganismos presentes en la superficie de las frutas y vegetales recién recolectadas comprenden no sólo la flora superficial normal, sino la proveniente del suelo y del agua, e incluso gérmenes patógenos.

La microflora responsable del deterioro de frutas y vegetales mínimamente procesados refrigerados incluye un gran número de especies bacterianas y fúngicas. Las frutas y vegetales difieren sustancialmente en sus características físicas y bioquímicas. Esto provocan diferencias en la microflora normalmente asociada con tipos específicos de productos.

Las frutas difieren principalmente de los vegetales en que poseen un alto contenido de azúcar y un pH más ácido (pH 4.6 o menor). Este bajo pH y la naturaleza de los ácidos orgánicos involucrados generalmente inhibe el crecimiento de otras bacterias que no sean las bacterias ácido-lácticas. En consecuencia, la microflora predominante es fúngica (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Principales especies fúngicas que predominan en frutas.

Levaduras	Hongos
Saccharomyces	Aspergillus
Hanseniaspora	Penicillium
Pichia	Mucor
Kloeckera	Alternaria
Cándida	Cladosporium
Rhodotórula	Botrytis

En uva Concord se determinaron recuentos de $3.8 \cdot 10^4$ a $6.8 \cdot 10^5$ hongos y levaduras por gramo (en su mayoría levaduras), mientras que en manzanas se determinó un nivel de 10^3 levaduras por gramo. En frutas dañadas o defectuosas los recuentos pueden llegar a 10 millones de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de fruta (Brackett, 1994).

Con una visión ecológica de la microbiología, se considera al alimento como un prolífico nicho ecológico, complejo y dinámico, con vida. Dentro del alimento hay también muchos microambientes: interfase alimento-envase, interior del alimento, etc. Como resultado del procesamiento de alimentos, se afectan los microambientes y los microorganismos pueden ser también afectados, en distinta forma, favoreciendo o no su desarrollo. El resultado de estos cambios en la microflora produce en general el deterioro; estos cambios pueden no ser evidentes inmediatamente pero podrían causar problemas luego, indirectamente. La microecología de un producto mínimamente procesado refrigerado es especialmente compleja ya que estos alimentos pueden cambiar el microambiente de los microorganismos vía su propia respiración.

Los diversos microorganismos que son responsables de la alteración de los alimentos pueden crecer a temperaturas comprendidas entre -10 y 80°C , pero, ninguno de ellos se multiplica en todo este intervalo de temperaturas. Cada microorganismo tiene sus temperaturas "cardinales" de crecimiento: mínima, óptima y máxima. Ello es así por la relación, tanto de la duración de la fase de latencia como de la fase logarítmica, con la temperatura. Teniendo en cuenta las temperaturas cardinales, pueden establecerse las categorías de microorganismos alterantes de los alimentos que se indican en la Tabla 1.2 (Mossel, 1985).

Como la mayoría de las frutas y vegetales crecen o son cosechadas durante estaciones cálidas, la microflora predominante la constituyen los mesófilos. Sin embargo,

almacenando y procesando estos alimentos en ambientes refrigerados, se seleccionan gradualmente los psicrótrofos.

Tabla 1.2: Grupos de microorganismos alteradores de los alimentos según sus temperaturas cardinales de crecimiento (Mossel, 1985).

Tipo	Temperatura mínima (°C)	Temperatura óptima (°C)	Temperatura máxima (°C)
Psicrófilos	-15	10-15	18-20
Psicrótrofos	-5	20-30	35-40
Mesófilos	5-10	30-37	alrededor 45
Termótrofos	15	42-46	50
Termófilos	25-42	50-80	60-85

Entre los microorganismos psicrótrofos presentes en alimentos se encuentran: *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Leuconostoc*, *Serratia*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* y *Listeria*, entre los géneros bacterianos; y entre los géneros fúngicos, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Cándida*, *Penicilium*, y *Rhodotórula*.

Las frutas y vegetales mínimamente procesados, provienen de frutas y vegetales frescos que pueden estar contaminados con muchos microorganismos que causan deterioro, incluyendo levaduras, hongos y bacterias. Aún más, algunas de las bacterias que podrían estar presentes, incluido *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes*, son patógenas para el consumidor; otros patógenos, incluidos *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus spp.*, podrían contaminar el producto a través de los manipuladores del alimento. Así, un estricto cumplimiento de normas sanitarias y "buenas prácticas de manufactura" (Good Manufacturing Practices, GMPs) recomendadas por la FDA (Food and Drug Administration), son esenciales para el éxito del marketing de frutas y vegetales mínimamente procesados. Es necesario el lavado para eliminar tierra y contaminantes, así como el uso de agua clorada para reducir la carga microbiana en productos mínimamente procesados antes de ser envasados. El mantenimiento de un ambiente de procesamiento a bajas temperaturas es también recomendado. Controles de calidad, incluyendo metodologías de HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point), son herramientas esenciales para asegurar la producción de productos, con adecuada vida útil, de alta calidad (Schlimme, 1995).

El procesamiento mínimo podría incrementar el deterioro microbiano de las frutas por la transferencia de la microflora de la piel a la pulpa, donde los microorganismos pueden crecer rápidamente ante su exposición a los fluidos nutritivos.

El bajo pH de la mayoría de las frutas restringe la microflora a microorganismos ácido tolerantes como hongos, levaduras y bacterias ácido lácticas (lactic acid bacteria, LAB). Los tests recomendados para asegurar la sanidad y prácticas de manufactura para frutas son la enumeración de levaduras, hongos, LAB y Enterobacteriaceae. Los coliformes son parte de la microflora normal de las frutas y de las líneas de procesamiento (O'Connor-Shaw y col., 1994).

El pH, parámetro que muchas veces el tecnólogo alimentario puede controlar, es el factor más importante que determina la conformación y la actividad de las proteínas de las células microbianas. Además, el pH externo influye sobre los caminos metabólicos. Cada especie posee un rango óptimo de pH citoplasmático y cada organismo exhibe distinta capacidad para regularlo, mostrando así diferente tolerancia a la perturbación del pH externo. El rango de pH externo límite para el crecimiento es 4-9 para bacterias, 1.5-8 para levaduras y 1.5-11 para hongos (Alzamora, 1994).

La Tabla 1.3 muestra valores de pH mínimos para el crecimiento y el medio correspondiente para algunas bacterias esporuladas de interés en frutas, así como también, en algunos casos, la influencia del acidificante usado para disminuir el pH. Por ejemplo, en el caso de *Bacillus coagulans* el pH mínimo difiere cuando se usa ácido cítrico o ácido clorhídrico como acidificante.

Tabla 1.3: Valor mínimo de pH para el crecimiento de bacterias esporuladas relacionadas con las alteraciones comerciales de frutas (Alzamora, 1994).

Organismo	pH mínimo	Medio	Acidificante
<i>Bacillus coagulans</i>	4.12	Jugo de tomate	Acido cítrico
	4.30	Caldo de cultivo	Acido clorhídrico
	3.85	Jugo de tomate	Acido clorhídrico
<i>Bacillus licheniformis</i>	4.0	Puré de tomate	Acido clorhídrico
<i>Clostridium butyricum</i>	4.8	Jugo de pera	Acido cítrico
<i>Clostridium pasteurianum</i>	4.4-4.2	Ananá en lata	Sin ajustar
	3.5	Jugo de damasco 10°Brix	--
	3.7	Jugo de damasco 20°Brix	--
	4.0	Puré de tomate	Sin ajustar
	3.8	Jugo de pera	Acido cítrico
<i>Clostridium butyricum</i> y <i>C. saccharobutyricum</i>	3.5	Jugo de pera 10°Brix	--
	5.1	Caldo nutritivo	--
	3.8	--	--
<i>Bacillus macerans</i>	3.8	--	--
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	4.0	--	--

En la Tabla 1.4 se dan los valores de pH máximos y mínimos para el crecimiento de hongos y levaduras, los cuales pueden crecer a pH mucho más bajos que las bacterias.

Tabla 1.4: Valores aproximados de pH máximo y mínimo para el crecimiento de hongos y levaduras (Alzamora, 1994).

Organismo	pH mínimo	pH máximo
Levaduras		
<i>Candida pseudotropicalis</i>	2.3	8.8
<i>Hansenula canadensis</i>	2.15	8.6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.35	8.6
<i>Saccharomyces fragilis</i>	2.4	9.05
<i>Saccharomyces microellipsoides</i>	2.2	8.8
<i>Saccharomyces pastori</i>	2.1	8.8
<i>Saccharomyces exiguus</i>	1.5	-
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	5.45	7.05
<i>Candida krusei</i>	1.5	-
<i>Hanseniaspora melligeri</i>	1.5	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1.5	-
Mohos		
<i>Aspergillus oryzae</i>	1.6	9.3
<i>Penicillium italicum</i>	1.9	9.3
<i>Penicillium variable</i>	1.6	11.1
<i>Fusarium oxysporum</i>	1.8	11.1
<i>Marasmius foetidus</i>	2.0	6.8
<i>Phycomyces blakeslecanus</i>	3.0	7.5

En frutas que no sufren daño por frío, el almacenamiento a bajas temperaturas es efectivo para prolongar su vida útil. Inhibe la respiración y transpiración de los tejidos de la planta y el crecimiento de microorganismos.

Entre los microorganismos mesófilos patógenos de interés en este tipo de alimentos, se encuentran: *Aeromonas hydrophila*, cepas no proteolíticas de *Clostridium botulinum*, *Listeria spp.*, *Yersinia enterocolítica*, algunas cepas de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* enteropatógena y *Vibrio parahaemolyticus*.

Algunos patógenos pueden provocar enfermedad con una ingesta de pocas células: sólo 10 células de *E.coli* O157:H7 podrían causar diarrea hemorrágica, Síndrome Urémico Hemolítico (S.U.H) y llegar a producir falla renal (Buchanan y Doyle, 1997).

Algunos serotipos y cepas de *E.coli*, anaerobio facultativo, que son parte de la microflora normal del tracto intestinal humano y de la mayoría de los animales de sangre caliente, pueden causar enfermedad. A pesar de no ser considerados psicrótrofos verdaderos, algunas cepas pueden crecer a 6.9°C y temperaturas menores. Las cepas de

E. coli patogénicas son categorizadas en seis grupos: enteropatógena, enteroinvasiva, enterotoxigénica, enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa y enteroadherente. Los alimentos involucrados en brotes por *E. coli* enterohemorrágica incluyen carne, vegetales, sidra de manzana no pasteurizada, leche cruda y agua. Algunas cepas de *E. coli*, incluyendo algunas EHEC, son ácido tolerantes (sobreviven a $\text{pH} < 4.6$) (Benjamin y Datta, 1995), un fenómeno complejo dependiente de las fases de crecimiento, e inducible, siendo esta tolerancia al ácido capaz de persistir por extensos períodos durante la refrigeración (Marth, E, 1998). La fuente de *E. coli* O157:H7 en la sidra fresca se atribuye al contacto de las manzanas que caen al suelo con heces de animales, antes de su procesamiento. El producto desarrollado en este trabajo, manzanas en jugo de naranjas fresco, no sufre tratamiento térmico, por lo que es un potencial transmisor de este patógeno, dada su resistencia a la acidez.

Varios tipos de bacterias psicrótrofas, levaduras y hongos pueden crecer a niveles suficientes para causar deterioro del alimento. Algunas levaduras de los géneros *Cándida*, *Hanseniaspora* y *Saccharomyces* pueden crecer en jugos de fruta por debajo de su temperatura de congelación. El crecimiento de levaduras en alimentos está generalmente acompañado de producción de CO_2 , productos de off-flavor y aromas típicos a alcohol, levadura o frutal. Muchas especies diferentes de levaduras y hongos están presentes en la superficie de las frutas. Estudios sobre levaduras de frutas cítricas, manzanas y uvas han indicado que la población de éstas está dividida entre especies imperfectas y formadoras de ascosporas. *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* y *Pichia* son algunas de las más numerosas productoras de ascosporas, mientras que entre las imperfectas se encuentran *Kloecklera*, *Cándida* y *Rhodotórula*. Los hongos predominantes encontrados fueron los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Botrytis* (Splittstoesser, 1987).

Algunos hongos que son responsables del deterioro en frutas producen micotoxinas. La patulina, es una micotoxina especialmente diseminada ya que es producida por especies de *Aspergillus*, *Byssochlamys* y *Penicillium*, incluyendo al *P. expansum*, común en la mayoría de las frutas. La alta probabilidad de que la patulina esté presente en manzanas o peras infectadas por hongos hace que éstas deban descartarse.

El lavado de las frutas, generalmente uno de los primeros pasos del procesamiento, remueve la mayoría de la microflora original. Existen evidencias que un cepillado seguido de un rociado con agua clorada reduce la población microbiana en la superficie de naranjas en un 95%, mientras que en manzanas lavadas con agua potable se obtuvo una reducción en el recuento de viables del 99% (Splittstoesser, 1987).

1.2 CONSERVACION DE FRUTAS

Las técnicas de conservación primitivas incluían el secado al sol, el curado, la fermentación, la cocción, y posteriormente, el uso de preservadores simples como el dióxido de azufre (generado al quemar azufre y particularmente efectivo para descontaminar la fruta antes de la fermentación), la sal, el azúcar, el vinagre y otros ácidos derivados de procesos fermentativos.

El objetivo primordial de la tecnología de alimentos es garantizar la conservación de los productos mediante la inhibición o retardo de los procesos de deterioro que limitan su vida útil. El deterioro de los alimentos puede ser de diversos tipos, incluyendo el de origen físico, como podría ser el endurecimiento superficial por desecación, el de origen químico, como el enranciamiento y pardeamiento no enzimático, y las alteraciones de origen microbiano, que se consideran en muchos casos, de mayor importancia por sus implicancias en problemas de salud pública y de seguridad higiénica de los alimentos, aparte de las alteraciones que se producen en las características organolépticas de los productos.

Las alteraciones de origen microbiano se caracterizan por el hecho de ser muy rápidas en su evolución, sus efectos no se detectan de forma evidente (no siempre se desarrollan olores y sabores ácidos y/o pútridos, coloraciones anormales o enmohecimiento superficial) y el riesgo asociado es elevado ya que pueden aparecer sustancias no deseables o tóxicas. Sin embargo, las alteraciones químicas y físicas (exceptuando de estas últimas las reacciones enzimáticas), constituyen un fenómeno lento y menos riesgoso, pues si bien producen ciertamente un descenso del valor nutricional y económico de los productos, el consumidor queda generalmente advertido por la modificación del aspecto y de las características organolépticas del alimento.

De cualquier manera, el objetivo fundamental de la preservación de alimentos es evitar las pérdidas de calidad microbiológica, enzimática, química y física, resultado de ciertas reacciones que ocurren en los complejos sistemas biológicos que constituyen los alimentos. Cuando la preservación de alimentos falla, las consecuencias van desde un riesgo y peligro extremo, como sería el desarrollo de organismos toxigénicos si estos no son controlados, a pérdidas de calidad organolépticas como serían pérdidas de color, las cuales son también de gran importancia ya que reducen la vida útil de los productos y pueden producir grandes pérdidas económicas.

La preservación de alimentos está sujeta a modificaciones en respuesta a las necesidades de los consumidores, las que también con el tiempo han ido cambiando. Durante los últimos años, los hábitos alimenticios han cambiado tratando de lograr una

alimentación "sana". De esta manera el consumidor está cada vez más preocupado por los efectos perjudiciales al organismo, que pueden tener los preservadores químicos. En consecuencia, se ha observado una marcada reducción de los niveles de preservadores usados en una gran variedad de productos, hecho al que ciertos investigadores atribuyen un aumento en las cifras reportadas de los casos por infecciones e intoxicaciones alimentarias (Tapia y col., 1994).

Los consumidores requieren productos que sean:

- Convenientes: fáciles de almacenar y con vida útil satisfactoria
- De alta calidad
- De procesamientos menos severos: calentados menos intensamente y con mínimo daño de congelación
- De preservación menos intensa
- Más libres de "aditivos artificiales"
- Más frescos y naturales
- Nutricionalmente más saludables: con menos sal, con menos grasas (saturadas), con menos azúcar y con menos calorías
- Más seguros

El procesamiento de alimentos por la técnica conocida como **métodos combinados** brinda una alternativa para el desarrollo de alimentos con un grado mínimo de procesamiento cuyas propiedades organolépticas en algunos casos permanecen muy cercanas a las del producto fresco.

El concepto de **tecnología de obstáculos** (Hurdle Technology) considera a cada factor o parámetro, ya sea intrínseco, extrínseco o de procesamiento, como una barrera o un obstáculo impuesto a los microorganismos para lograr la estabilidad microbiana de los alimentos.

El uso de varios factores en un proceso de conservación de alimentos permite:

- Potenciar la contribución individual de algunos de ellos al lograr un *efecto sinérgico* entre ellos.
- Evitar la aplicación excesiva de un solo factor, como por ejemplo, concentración de nitritos o de otro tipo de sustancias químicas.
- Lograr una menor severidad en la aplicación de un proceso, causando menos daño al producto
- Lograr un ahorro en el consumo energético

La conservación de alimentos por "factores combinados" se basa en inhibir el desarrollo bacteriano así como también de hongos y levaduras por la interacción combinada de distintos factores de "stress": actividad acuosa (a_w), pH, potencial redox, incorporación de conservadores, escaldado (disminución de la contaminación inicial), tratamiento térmico suave, temperatura de almacenamiento, etc. (Alzamora, 1994).

Al usarse una combinación inteligente de obstáculos, se asegura además de la estabilidad microbiológica, una mejor preservación de las propiedades sensoriales, nutritivas, e inclusive del valor económico de los alimentos. La importancia práctica de la tecnología de obstáculos para alimentos estables y seguros ha sido reconocida por la industria, tanto en el diseño como en el control de los mismos, siendo cada vez más usado exitosamente.

1.2.1 Métodos de conservación

El objetivo del desarrollo de **productos mínimamente procesados refrigerados (MPR, Minimally Processed Refrigerated)** es brindar al consumidor una fruta o un vegetal con características similares al producto fresco, con una extensa vida útil, y al mismo tiempo incrementar la seguridad y el mantenimiento de su calidad nutricional y sensorial. Estos productos requieren la aplicación de métodos de conservación con el fin de cumplir con dichas características, como son la refrigeración y el envasado.

La principal diferencia entre frutas y vegetales MPR frescos radica en los pasos de procesamiento y conservación específicos llevados a cabo. Los productos MPR son generalmente tejidos vivos que respiran, y en los cuales la respiración es incrementada por los cortes, tratamientos térmicos o procesos aplicados. Las células intactas son más resistentes al pardeamiento oxidativo y a la entrada de microorganismos, que las células dañadas. Los daños mecánicos aceleran el deterioro del producto fresco por ruptura de membranas, e incrementan la actividad enzimática, ocasionando reacciones no deseadas. Estas rupturas celulares ocurren durante las operaciones de preparación (pelado, cortado), permitiendo a las enzimas mezclarse con sus sustratos.

La temperatura es el principal factor que controla la respiración, el metabolismo, la actividad enzimática, la transpiración y el crecimiento de microorganismos.

Las frutas y vegetales "listas para usar" requieren de algunas operaciones de preparación; como son: limpieza, lavado, pelado, trozado, aplicación de preservadores, envasado y almacenamiento.

● La limpieza es la eliminación de todo material extraño (polvo, arena, insectos, pesticidas o residuos de fertilizantes) presente en el producto fresco.

● En cuanto al lavado, está destinado a eliminar a la mayoría de los microorganismos mediante un tratamiento con agua clorada. La adición de distintas formas de cloro al agua de lavado ayuda a prevenir la contaminación microbiana; luego debe eliminarse el cloro remanente en el producto como paso final. En el lavado, se deben controlar tres parámetros: la cantidad de agua usada (5-10 l/kg producto), la temperatura del agua (4°C) y la concentración de cloro activo (100 mg/l).

Pueden usarse dos formas de cloro:

- gaseoso: es 100% activo, pero requiere equipamiento especial.

- hipoclorito de sodio o calcio: de menor actividad, especialmente si el agua es alcalina (debe regularse el pH), pero no requiere equipamiento especial.

Cuando se agregan al agua, ambos producen rápidamente ácido hipocloroso, que es considerado el agente germicida, siendo su actividad directamente proporcional a la concentración de ácido hipocloroso no ionizado en solución.

● El pelado puede realizarse de distintas formas: manual, automatizado, mediante agentes físicos o químicos, etc.

● El trozado o corte, da al producto forma y tamaño prefijados, por aplicación de distintos tipos de fuerzas (impacto, fricción, compresión). Este paso acelera la respiración, causa daño mecánico y ablanda los tejidos vegetales. Por esto, el producto debe ser llevado a 4°C inmediatamente luego de finalizar su corte (Wiley, 1994a).

La conservación de productos mínimamente procesados refrigerados es compleja, ya que algunas células respiran a velocidad normal, las células dañadas lo hacen a velocidades muy altas, y otras están virtualmente muertas o inactivadas. Se deberá tener en cuenta la relación volumen/superficie de un producto mínimamente procesado refrigerado trozado, para predecir el tipo de método de conservación que será más efectivo para extender su vida útil.

Pueden usarse los métodos clásicos de conservación o una combinación de ellos, que tienen la ventaja del sinergismo que presentan algunos de ellos. Estos efectos combinados o de "barrera" deben considerar tanto a los sistemas enzimáticos de los tejidos vivos: polifenoloxidasas (PPO), que produce el pardeamiento enzimático, peroxidases (PO), pectinasas, poligalacturonasas (PG) y pectinesterasas (PE), las dos últimas, relacionadas con el ablandamiento de tejidos, y enzimas vinculadas a la respiración, como a los microorganismos que pueden provocar deterioro (Wiley, 1994).

Sólo unas pocas técnicas usadas hoy en día operan eliminando los microorganismos. La mayoría están basadas en la inhibición o disminución de la velocidad de crecimiento de microorganismos patógenos o de deterioro. La Tabla 1.5 presenta los factores de conservación empleados más frecuentemente en alimentos.

Tabla 1.5: Clasificación de los factores de conservación

Modo de acción	Factor de conservación	
Inactivación microbiana	Calor	Pasteurización,
	Radiación	Esterilización, Radicidación Radurización Radapertización
Inhibición o disminución de velocidad de crecimiento microbiano	Frío	Refrigeración, Congelación
	Restricción de agua (reducción de a_w)	Secado Adición de sal, azúcar, glicerol u otros solutos, u una combinación de ellos
	Restricción de oxígeno	Envasado al vacío Envasado con nitrógeno
	Incremento del CO_2	Envasado con CO_2
	Acidificación	Agregado de ácidos Fermentación láctica, acética
	Adición de alcohol	Fermentación Fortificación
	Agregado de preservadores	Inorgánicos (sulfito, nitrito) Orgánicos (sorbato, benzoato, parabenos) Antibióticos (nisina) Humo
Restricción del acceso de microorganismos al producto	Control microestructural	Emulsión (agua/aceite)
	Decontaminación	Ingredientes Envases, calor, irradiación
	Manipuleo aséptico o limpio	Procesamiento limpio, aséptico
	Envasado	

Entre éstos, resultan de interés en el presente trabajo de Tesis, la acidificación, el agregado de preservadores químicos, así como el envasado en películas de diferente permeabilidad gaseosa y su posterior almacenamiento refrigerado. Se descartan los tratamientos térmicos, aún los más suaves, ya que el producto debe mantener las características originales de la fruta fresca.

1.2.1.1 Métodos químicos

Los preservadores químicos son sustancias que en pequeñas cantidades disminuyen o inhiben las acciones fermentativas, es decir, la acción microbiana y las acciones enzimáticas, favoreciendo la conservación de los alimentos. Pueden, además, neutralizar toxinas bacterianas, destruir productos de inhibición y actuar como desodorantes, estabilizando vitaminas, enzimas o sustancias olorosas lábiles. Pueden ser naturales o sintéticos.

Para el uso de los preservadores químicos es necesario ponderar exactamente la dosis según la IDA (Ingesta Diaria Admisible), así como conocer la distribución y metabolismo de la sustancia. La IDA, desde el punto de vista de la salud, representa la cantidad de aditivo que es consumida por un adulto promedio diariamente con su dieta normal durante toda su vida, sin incurrir en un riesgo apreciable en su salud (OMS/FAO). Se expresa en mg ó g por kg de peso corporal. El límite de tolerancia representa la concentración real aceptada por la legislación sobre el alimento (mg/kg o ppm).

Por combinación de preservadores químicos puede ocurrir sinergismo, efecto aditivo o antagonismo. La combinación debe ser probada en el producto, y al menos debe tener acción aditiva y preferiblemente sinérgica, pero no antagónica.

Para lograr un producto similar al fresco, de alta calidad, con una extensa vida útil, se debe considerar tanto antimicrobianos como antioxidantes, dentro de aquellos reconocidos como GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros).

Sulfitos

Los sulfitos son altamente efectivos en controlar el pardeamiento pero están sujetos a restricciones regulatorias debido a sus efectos adversos sobre la salud. No son considerados GRAS para frutas o vegetales crudos, por lo que no son recomendados para productos MPR. La cantidad máxima permitida varía de acuerdo al tipo de alimento. En el caso de alimentos de consumo directo rara vez superan 100 mg/kg. La IDA para una persona de 70 kg es aproximadamente 50 mg/día (FAO/OMS). El Código Alimentario Argentino exige el rotulado de los alimentos que contienen dióxido de azufre.

Los agentes sulfitantes (dióxido de azufre, sulfito de sodio, bisulfito de sodio y potasio y metabisulfitos) han sido agregados a muchos alimentos desde la antigüedad para prevenir el pardeamiento enzimático y no enzimático, controlar el desarrollo de microorganismos, actuar como agentes de blanqueado, antioxidantes, o agentes reductores, y llevar a cabo otras funciones. El sulfito actúa como inhibidor de la

polifenoloxidasas (PPO); además reacciona con las α -quinonas producidas por catálisis de la PPO, dando difenoles menos reactivos y menos coloreados, previniendo por lo tanto la condensación no enzimática a pigmentos precipitables.

En 1959, los agentes sulfitantes fueron listados como GRAS para el uso como preservadores químicos. Después de 1982, en que la FDA afirmara la condición de los agentes sulfitantes como GRAS (FDA, 1982), recibió informes que atribuían reacciones tipo alérgicas al consumo de alimentos que contenían sulfitos. Estos informes indicaron que el sulfito podía inducir episodios de asma en un segmento de la población sensible. En casos raros, podían ocurrir asma severa o aún reacciones de tipo anafiláctica. Debido a esto, la FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology), en 1984 decidió reexaminar la condición de GRAS de los agentes sulfitantes. En su informe final (FASEB, 1985) concluyó que los agentes sulfitantes son no teratogénicos, mutagénicos o carcinogénicos en animales de laboratorio. El panel no encontró nuevos datos metabólicos o toxicológicos que sugieran la necesidad de cambiar el nivel de efectos adversos no observados (NOAEL), que es aproximadamente diez veces el nivel de dióxido de azufre ingerido por consumidores de alta ingesta (percentil 99) y 180 veces la media de la ingesta diaria por cápita. Concluyeron que "para la mayoría de la población, no hay evidencia que demuestre o sugiera razonablemente una sospecha de riesgo para el público cuando estas sustancias (los agentes sulfitantes) son usados en niveles que son corrientes". También concluyó que "para la fracción de público que es sensible al sulfito, hay evidencia en la información disponible acerca de los agentes sulfitantes que demuestra o sugiere sospechar de un riesgo de impredecible severidad para dichos individuos" (FDA, 1988a).

En respuesta a significantes cuestiones surgidas acerca de la seguridad de estos ingredientes, en 1986, la FDA revocó la condición de GRAS del sulfito en frutas y la mayoría de los vegetales destinados a ser servidos o vendidos crudos al consumidor (FDA, 1986). En marzo de 1990, la FDA extendió esta revocación a papas frescas o vendidas sin envasar y sin rotular (FDA, 1990), pero esta revocación fue revertida por decisión de la U.S. Court of Appeals para el 3° Circuito en Filadelfia el 22 de mayo de 1991 (Anónimo, 1991).

Las nuevas reglas, propuestas por la FDA en 1988, requieren que la presencia de sulfitos en alimentos estandarizados sea declarada en la etiqueta cuando los agentes sulfitantes tengan un efecto funcional o estén presentes en nivel detectable, definido como 10 ppm o más (FDA, 1988a). Reglas adicionales afirman la condición GRAS de los agentes sulfitantes en ciertos alimentos específicos a un nivel residual máximo

especificado, provistos de la declaración de la presencia de sulfito en el rótulo del producto envasado. Los agentes sulfitantes no son GRAS para su uso en carnes, alimentos reconocidos como fuente importante de vitamina B-1, debido a que reduce su biodisponibilidad por complejarla, o frutas o vegetales destinados al consumo o venta crudos, o para ser presentados al consumidor como "frescos" (FDA, 1988b).

Alternativas para el sulfito

Las restricciones de la FDA acerca del uso del sulfito en ciertas frutas y productos vegetales y, considerando que sus otros usos podrían ser sujetos a futuras limitaciones, han promovido el desarrollo de sustitutos de sulfito como ingredientes. El sulfito es un agente multifuncional. La búsqueda de alternativas ha logrado componentes que son efectivos para sólo una o dos de las funciones obtenidas con sulfito. Es poco probable que se desarrolle un único sustituto para el sulfito, por lo que son necesarias combinaciones de varios ingredientes activos, formulados para satisfacer las necesidades de un determinado tipo de producto, de adecuado costo y aprobadas por la FDA.

Los agentes anti-pardeamiento se han clasificado de acuerdo a su principal modo de acción (Tabla 1.6).

Tabla 1.6: Inhibidores del pardeamiento enzimático (McEvily, Iyengar y Otwell, 1992)

Agentes Reductores	Agentes Quelantes
Agentes sulfitantes	Fosfatos
Acido ascórbico y análogos	EDTA
Glutación	Acidos orgánicos
Cisteína	
Inhibidores Enzimáticos	Acidulantes
Acidos aromáticos carboxílicos	Acido cítrico
Alcoholes alifáticos	Acido fosfórico
Resorcinoles sustituidos	
Aniones	Agentes Complejantes
Péptidos	Ciclodextrinas
Tratamientos Enzimáticos	
Oxigenasas	
α -metil transferasa	
Proteasas	

🍷 Acidos orgánicos y derivados

Pueden ser naturales del producto, acumularse por fermentación o ser agregados en el procesamiento. Ajustan el pH del producto por debajo de 4.6, mínimo para la esporulación y crecimiento de *C. botulinum*. Algunos ácidos actúan como fungicidas o fungiestáticos, mientras otros parecen ser más efectivos inhibiendo el crecimiento bacteriano.

El modo de acción es por directa reducción de pH de sustratos, reducción del pH interno de la célula microbiana debido a la ionización del ácido no disociado, o alteración del mecanismo de transporte a través de la membrana celular. La efectividad de los ácidos orgánicos como antimicrobianos está principalmente relacionada con la constante de disociación del ácido (pKa) y el factor más importante que afecta su actividad es el pH. Esto es debido a que la forma no disociada del ácido es la responsable de la actividad antimicrobiana. Generalmente, cuando el pH se incrementa, el porcentaje de ácido no disociado decrece, y el ácido orgánico se hace menos efectivo. En general, los pKa de los ácidos usados en alimentos varían entre 3 y 5 (Wiley, 1994).

La acidificación es un procedimiento de preservación ampliamente usado en alimentos. Las células vegetativas de bacterias cambian repentinamente con un descenso de pH, sin sufrir un período de adaptación, con lo cual, la velocidad de crecimiento cambia inmediatamente.

El principal efecto que produce la acidificación es en la homeostasis, en la cual las células microbianas reaccionan generalmente para mantener el valor de pH intracelular constante. Para hacerlo, el microorganismo debe absorber H^+ que pasan a su interior mientras el pH disminuye. Esta situación debe revertirse si se debe evitar la acidificación interna. La remoción de H^+ contra un gradiente de concentración de varios cientos de veces en muchos alimentos preservados con ácidos, es demandante de energía, y, si el pH se reduce aún más, la energía requerida para mantener el pH intracelular es mayor, y es menor la disponible para la síntesis de material celular.

El pH límite inferior para el crecimiento microbiano se alcanza cuando la velocidad de generación de energía es demasiado baja para el mantenimiento del pH interno constante y la síntesis celular, y, cuando es excedida, ocurre la acidificación del interior de la célula. Una restricción de energía extra incrementará la efectividad de la preservación por pH bajo, por ser un "obstáculo" adicional.

- **Acido cítrico ($C_6H_8O_7$):** Es muy soluble en agua y tiene un sabor agradable. Se encuentra naturalmente en una variedad de frutas, especialmente en frutas cítricas.

Actúa reduciendo el pH y es quelante de metales (compleja el cobre a través de un par de electrones no compartido). Ambas funciones inhiben a la PPO (Santerre y col., 1988), previniendo el pardeamiento. También puede lograrse la inactivación de enzimas y el potenciamiento de antioxidantes en frutas y vegetales, como el ácido ascórbico, el ácido eritórbito o el eritorbato de sodio, por quelar metales traza.

- **Acido L-ascórbico (vitamina C) y eritórbito:** son antioxidantes GRAS para su uso en frutas y vegetales, para prevenir el pardeamiento y reacciones de oxidación; inhiben la PPO. El ácido L-ascórbico se usa junto con ácido cítrico para mantener el pH más ácido y actúa como quelante del cobre de varias enzimas (PPO).

El ácido ascórbico, naturalmente presente en muchos alimentos, es nutricionalmente beneficioso y se agrega de distintas formas en algunos de ellos. La mejor manera es incorporarlo al final del procesamiento, para mantener altos niveles durante su almacenamiento. Desgraciadamente ofrece sólo inhibición temporaria del pardeamiento y está afectado por el pH, temperatura, actividad enzimática, oxígeno, iones cobre, hierro y concentración de sustratos.

Probablemente la mejor alternativa para el sulfito es el ácido ascórbico (vitamina C). Este compuesto es un inhibidor del pardeamiento enzimático altamente efectivo, debido a su función en sistemas alimenticios: (1) actúa como secuestrante de radicales libres y por lo tanto previene la oxidación, (2) altera el potencial redox del sistema, y (3) reduce los productos oxidados indeseables. La principal función del ácido ascórbico es prevenir el pardeamiento enzimático por su capacidad de reducir α -quinonas, generadas por la oxidación de polifenoles catalizada por la PPO, volviéndolas a compuestos fenólicos antes de sufrir las reacciones para convertirse en pigmentos. Sin embargo, una vez que el ácido ascórbico agregado ha sido completamente oxidado a ácido dehidroascórbico (DHAA) por esta reacción, las quinonas pueden acumularse y sufrir pardeamiento. Además, el DHAA mismo puede sufrir pardeamiento no enzimático. En altas concentraciones, el ácido ascórbico también puede inhibir directamente a la PPO (Vamos-Vigyazo, 1981). Esta inactivación sería bifásica, con una velocidad inicial baja de inactivación, seguida de una velocidad de inactivación rápida que disminuye con el tiempo; la inactivación parece ser irreversible.

El ácido ascórbico y su isómero el ácido eritórbito (α -isoascórbico) han sido usados por casi 50 años como inhibidores del pardeamiento enzimático en frutas frescas cortadas y congeladas como duraznos y manzanas. Estos compuestos son agregados al almíbar o aplicados por inmersión de la fruta en soluciones que contienen el inhibidor, a

veces en combinación con un ácido orgánico como cítrico y una sal de calcio. A pesar que el modo de acción del ácido ascórbico y el eritórbito es el mismo, el ácido ascórbico ha resultado ser un inhibidor del pardeamiento más efectivo respecto del eritórbito. Sin embargo, las concentraciones recomendadas de ambos son similares. Se ha reportado que el ácido eritórbito sufre oxidación catalizada por cobre más rápidamente que el ácido ascórbico en sistemas acuosos modelo y en productos alimenticios. Como el cobre está presente en trazas en casi todos los alimentos, la diferencia en eficacia puede atribuirse a la más rápida velocidad de oxidación del eritórbito.

Sapers y Ziolkowski (1987) compararon los ácido ascórbico y eritórbito como inhibidores del pardeamiento enzimático, presentando similar efecto en jugo de manzanas (0.125 o 0.250 %p/v de ácido ascórbico ó eritórbito). Sin embargo, bajo idénticas condiciones de tratamiento, trozos de manzanas Red Delicious y Winesap mostraron períodos más largos para llegar al pardeamiento con ascórbico respecto al eritórbito. La eficacia del ácido ascórbico y eritórbito como inhibidores del pardeamiento parece depender del sistema alimenticio específico. Por lo tanto, un compuesto no puede sustituirse por el otro sin experimentos previos para evaluar su equivalencia.

Un serio inconveniente, tanto del ácido ascórbico como de eritórbito como inhibidores de pardeamiento, es que son fácilmente oxidados por enzimas endógenas, así como su conversión a ácido dehidroascórbico por autooxidación catalizada por hierro o cobre. El ácido ascórbico, oxidado por estas reacciones o utilizado a elevada concentración, puede mostrar efectos prooxidantes. Otro problema importante que limita la eficacia de los ácidos ascórbico y eritórbito cuando se comparan con sulfitos es su insuficiente penetración en la matriz celular del trozo de fruta o vegetal.

El reciente interés en sustitutos del sulfito, en respuesta a las acciones regulatorias de la FDA, ha producido una proliferación de productos inhibidores del pardeamiento. Un registro realizado en 1986 por la National Restaurant Association listó 13 sustitutos de dichas formulaciones. Estos productos generalmente contienen ácido ascórbico o eritórbito, o sus sales de sodio, generalmente en combinación con uno o más coadyuvantes como otros acidulantes, una sal de calcio, fosfato, cloruro de sodio, cisteína o un preservador como benzoato o sorbato de potasio.

Desde 1986, se han comercializado otras formulaciones de inhibidores de pardeamiento. Aparentemente no hay un consenso en el nivel óptimo de ácido ascórbico para el tratamiento de frutas y vegetales.

Los tratamientos con ácido ascórbico son generalmente menos efectivos respecto al sulfito debido a la mayor estabilidad y mejor penetración de este último. Se han desarrollado derivados del ácido ascórbico de mayor estabilidad. El ácido ascórbico-2-fosfato y el ácido ascórbico-2-trifosfato han sido investigados como fuentes alternativas estables del ácido ascórbico para la inhibición del pardeamiento en superficies cortadas de manzanas, papas y jugos de fruta (Sapers y col., 1989b; Sapers y Miller, 1992). Estos ésteres liberan ácido ascórbico cuando son hidrolizados por fosfatasa ácidas. Los ésteres fosfato fueron menos efectivos que el ácido ascórbico en la prevención del pardeamiento en papas cortadas, pero fueron más efectivos que similares concentraciones de ascórbico en superficies cortadas de trozos de manzanas Red Delicious y Winesap.

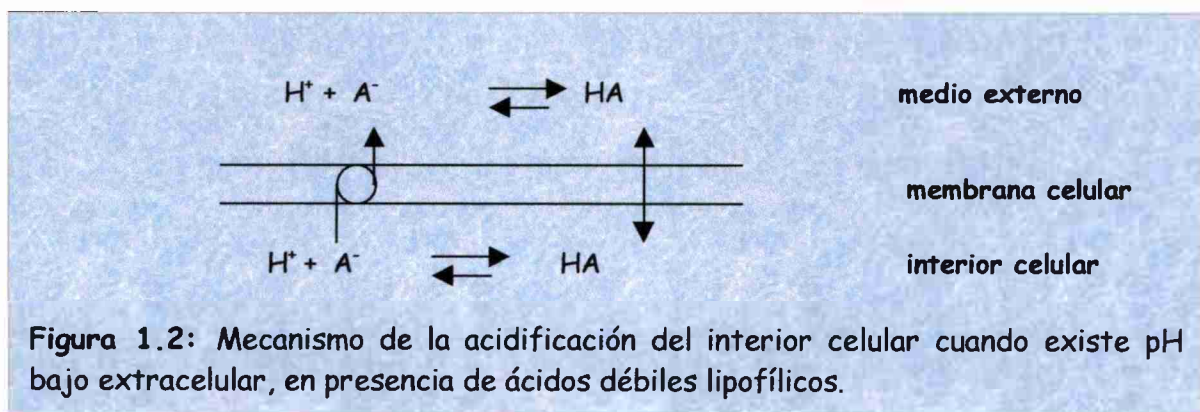
Otra fuente alternativa estable de ácido ascórbico son los ésteres ascorbil-6-ácido graso (ascorbil palmitato, laurato y decanoato) (Sapers y Douglas, 1987). Cuando se agregan al jugo de manzanas Granny Smith en concentraciones tan altas como 1.14 mM (equivalente a 0.02 % de ácido ascórbico), inhiben el pardeamiento por al menos 6 hs (Sapers y col., 1989). La eficacia de los ésteres fue menor o similar a la del ascórbico inicialmente, pero fue superior a la de éste después de largos períodos de almacenamiento. La combinación de ascorbil decanoato y ácido ascórbico fue significativamente más efectiva respecto a cada agente por separado, y juntos pueden prevenir el pardeamiento de jugo de manzanas por más de 24 hs (Sapers y col., 1989b).

Los ésteres ascorbil-ácido graso necesitan ser solubilizados, por ejemplo, por ajuste del pH a 9.0, para actuar como agentes antipardeamiento (Cort, 1982). Pueden prepararse dispersiones acuosas de ésteres en jugo de manzanas usando agentes emulsificantes hidrofílicos (Sapers y col., 1989a) como Tween 60 (monoesterato de polioxietilensorbitan), Santone 8-1-0 (un éster poliglicerol), Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitan), o EC 25 (un éster de propilenglicol) en relaciones en el rango de 1:2 a 2:1 (relación entre el agente emulsificante a ester). Los agentes emulsificantes altamente lipofílicos tienden a precipitar los ésteres. Los efectos adversos observados por la adición de emulsificantes serían debido a la alteración de las membranas celulares en la superficie cortada de la fruta, resultando en la liberación de PPO y sus sustratos, incrementando así la reacción de pardeamiento. Por lo tanto, los agentes emulsificantes incrementan la estabilidad de las dispersiones de ascorbil ésteres pero tienen efectos contrarios en su habilidad para funcionar como agentes antipardeamiento. Con excepción del ascorbil palmitato, estos derivados no han sido aún aprobados para alimentos por la

FDA. Otro derivado, el ácido α -glucosil ascórbico tendría mayor estabilidad que el ácido ascórbico y podría ser adecuado para sistemas con suficiente nivel de α -glucosidasa.

La penetración del inhibidor del pardeamiento en base a ácido ascórbico puede incrementarse por tratamiento bajo presión o vacío en lugar de inmersión o rociado (Sapers y col., 1990). Sin embargo, una absorción excesiva de la solución antipardeamiento por las muestras tratadas resultará en una apariencia traslúcida (water-logged) y en un deterioro prematuro de los productos frescos.

Otros preservadores de alimentos ampliamente usados son los ácidos débiles lipofílicos, como sórbico, benzoico y propiónico, que deben su efectividad en gran parte a la solubilidad de la forma no dissociada en la membrana celular y a su consecuente acción como ionóforos de H^+ . Estos compuestos esencialmente permiten que los H^+ ingresen a la célula microbiana más rápido de lo que lo harían en su ausencia y así incrementan los requerimientos energéticos de la célula microbiana para mantener su pH interno relativamente cercano a la neutralidad. Los ácidos lipofílicos incrementan el flujo de H^+ a través de la membrana celular, de forma tal que el pasaje de H^+ se hace equivalente a aquel encontrado a un pH mucho menor en su ausencia (Figura 1.2).



La interferencia con el gradiente de H^+ a través de la membrana interrumpe muchas de las funciones quimio-osmóticas de la célula, como el transporte de aminoácidos.

Algunos organismos, como la levadura *Saccharomyces bailii*, pueden adaptarse fenotípicamente a niveles altos de alguno de estos agentes antimicrobianos. Las células adaptadas parecen ser resistentes esencialmente por homeostasis, por desarrollar un sistema que efectivamente excreta el ácido fuera de la célula (por ejemplo, benzoico o sórbico).

La homeostasis sería pasiva en las esporas de bacterias, donde se mantendría el protoplasto central constantemente en bajo contenido acuoso, y sería activa en las células vegetativas, para mantener su contenido acuoso alto o pH cercano al neutro, y permitir el funcionamiento independientemente de lo que ocurra en el exterior.

- **Acido sórbico** ($\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCOOH}$): es un ácido graso insaturado de cadena lineal trans-trans (ácido 2,4-hexadienoico) y de peso molecular 112.13. Ha sido usado como antimicrobiano desde 1940 en numerosos productos. Es considerado GRAS. El grupo carboxilo del ácido sórbico es altamente reactivo y puede formar varias sales y ésteres. Las sales disponibles comercialmente incluyen los sorbatos de calcio, de sodio y de potasio. El sorbato de potasio es manufacturado como gránulos o polvo, y en equivalencia en peso con el ácido tiene una potencia antimicrobiana del 74%.

La solubilidad del ácido sórbico en agua a temperatura ambiente es sólo 0.16 g/100ml, y se incrementa con la temperatura y con un incremento del pH de la solución. La solubilidad es también alta en alcoholes, especialmente etanol, donde alcanza el 13%, y en ácido acético glacial.

El sorbato de potasio (PM = 150.22) tiene mayores aplicaciones en alimentos debido a su mayor solubilidad en agua (58.20 g/100ml a 20°C). En sistemas alimenticios la solubilidad del compuesto se estima menor a un 50%.

La principal acción inhibitoria del sorbato es frente a levaduras y hongos, mientras la actividad contra bacterias no está tan comprendida y aparentemente sería selectiva. La concentración efectiva antimicrobiana del sorbato en muchos alimentos está en el rango de 0.05-0.30%.

Otro factor que podría influir sobre la actividad del preservador es el nivel de contaminación; el crecimiento podría no ser inhibido si la población de hongos y levaduras es demasiado elevada. Una explicación posible para esto es que ciertos preservadores podrían ser destruídos por los microorganismos contaminantes. *Penicillium* spp. por ejemplo, es capaz de degradar el sorbato de potasio.

Las levaduras inhibidas por sorbato incluyen especies de los géneros *Brettanomyces*, *Cándida*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Oospora*, *Pichia*, *Rhodotórula*, *Sacharomyces*, *Sporobolomycesorulaspora*, *Torulopsis*, y *Zygosachamyces*.

Las especies de hongos inhibidos por sorbato pertenecen a los géneros *Alternaria*, *Ascochyta*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*,

Phoma, Papularia, Pestalotiopsis, Pullularia, Rosellinia, Rhizoctonia, Rhizopus, Sporotrichum, Trichoderma y Truncatella.

Las bacterias inhibidas por sorbato pertenecen a los géneros *Acetobacter, Bacillus, Achromobacter, Azotobacter, Alcaligenes, Clostridium, Escherichia, Enterobacter, Proteus, Pseudomonas, Propionibacterium, Salmonella, Serratia, Sarcina, Staphylococcus* y *Vibrio*.

Es de aceptación general que los organismos catalasa positivos son menos resistentes al sorbato que los catalasa negativos. También se cree que la acción antibacteriana es más pronunciada contra aerobios que contra anaerobios. Hay numerosos trabajos que documentan la acción antibacteriana del sorbato en muchos alimentos y contra una variedad de bacterias, incluidas *Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Pseudomonas sp., Staphylococci, Bacilli, Vibrio parahaemolyticus, etc* (Sofos y Busta, 1983).

La acción antimicrobiana del sorbato es dependiente del pH y se incrementa cuando el pH del sustrato disminuye (Tabla 1.7). La actividad antimicrobiana del sorbato ha sido relacionada con la forma no disociada del compuesto, al igual que otros ácidos lipofílicos de 1-4 átomos de carbono, mientras que el anión del ácido no es efectivo.

Tabla 1.7: Disociación del ácido sórbico a distintos valores de pH

pH	Acido no disociado (%)
7.00	0.6
6.00	6.0
5.80	7.0
5.00	37.0
4.75 (pK _a)	50.0
4.40	70.0
4.00	86.0
3.70	93.0
3.00	98.0

A pesar de su gran actividad a pH bajos, el sorbato tiene la ventaja de ser efectivo a valores de pH tan altos como 6.0-6.5. En contraste, el máximo valor de pH para la actividad antimicrobiana para el común de los preservadores alimenticios es más bajo, por ejemplo, 5.0-5.5 y 4.0-4.5 para propionato y benzoato, respectivamente. En ciertas circunstancias, el sorbato puede reemplazar parcial o totalmente al benzoato en alimentos de bajos pH con el fin de evitar posibles off-flavors debido a los altos niveles

de benzoato y para extender el rango de grupos microbianos inhibidos por benzoato o propionato.

Como se indicó anteriormente, la actividad antimicrobiana del sorbato se incrementa cuando el pH del entorno disminuye. Cuando esto ocurre, no solo se incrementa la cantidad de sorbato no disociado efectiva, sino también el entorno se torna más restrictivo para el crecimiento.

Ciertos estudios han demostrado que el sorbato tiene acción sinérgica con sales y azúcares, así como con ciertos antioxidantes. Asimismo, actúa sinérgicamente con el almacenamiento refrigerado y tratamientos térmicos de procesamiento (Sofos y Busta, 1983).

En general, la extensión de la actividad antimicrobiana del sorbato bajo condiciones comerciales es difícil de predecir, debido a la variedad de factores que influyen sobre dicha actividad. Estos factores incluyen el pH del producto y composición (grasa, humedad), presencia de otros ingredientes y preservadores, procesamiento del producto, higiene y contaminación, envasado y temperatura de almacenamiento.

Los métodos de aplicación del sorbato incluyen la directa adición dentro del producto en la forma de polvo o de solución, espolvoreado del producto con sorbato en polvo, e incorporándolo (impregnación) en películas o material de envase. El método particular de aplicación depende de la forma de sorbato a usar, de los objetivos a alcanzar, y de las propiedades físicas, químicas y morfológicas del producto a ser conservado. Los principales grupos de alimentos que pueden conservarse con sorbato incluyen productos lácteos, productos de panadería, productos vegetales y frutas, productos de emulsiones grasas comestibles, algunas carnes y pescados, etc. Según el Código Alimentario Argentino Actualizado, en su artículo N°1040 (Res. 2067, 11.10.88) para jugos vegetales, la máxima concentración de ácido sórbico o sorbato es de 1.00 g/Kg.

Los productos frutícolas conservados con sorbato incluyen frutas deshidratadas, jugos de frutas y jarabes, ensaladas de fruta, mermeladas, jaleas, gelatinas, bebidas y vinos. A menor contenido de humedad en el producto, es menor el nivel de sorbato requerido para su conservación (0.5-1 g/kg). Además, en productos de alto contenido de azúcar (jaleas, mermeladas) menores cantidades de ácido sórbico resultan adecuadas para su conservación debido a la acción sinérgica del sorbato con el azúcar.

En jugos de fruta y en otras bebidas, el sorbato se usa principalmente en las etapas de pre-procesamiento junto con dióxido de azufre (SO₂) y pasteurización para inhibir el deterioro químico, enzimático o microbiológico (por ejemplo, fermentación).

Las concentraciones adecuadas para bebidas son de 0.2-1 g/kg. Combinaciones de ácido sórbico y SO₂ también son usadas para conservar jugos de fruta con alto contenido de pulpa. En estos productos el ácido sórbico actúa como inhibidor microbiano, mientras que el SO₂ previene la oxidación y deterioro enzimático.

Algunos investigadores han sugerido que las enzimas que contienen grupos sulfhidrilos serían los sitios de la acción del sorbato. Varias enzimas de este grupo han mostrado ser inhibidas por sorbato, incluyendo la fumarasa en bacterias catalasa-positivas, levaduras y hongos, aspartasa, succínico deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa de levaduras. Se ha sugerido que el sorbato reacciona con las enzimas sulfuradas a través de una reacción de adición con el grupo tiol de la cisteína. Sin embargo, otros estudios han indicado que la cisteína incrementa la actividad del ácido sórbico contra hongos (Sofos y Busta, 1983).

Otro mecanismo postulado para el sorbato incluye un posible desacoplamiento de la fosforilación oxidativa por inhibición de enzimas dentro de la célula, inhibición de la aminación por α -cetoglutarato, formación de complejos estables con enzimas que contienen sulfhidrilos a través de un ácido tiohexoico derivado (CH₃-CH=CH-RSCH-CH₂-COOH), y formación de puentes covalentes entre sulfuro o ZnOH de la enzima y el carbono α y/o β del sorbato.

La toxicidad producida por el ácido sórbico puede clasificarse en:

Aguda: La LD₅₀ (Dosis Letal 50%) del ácido sórbico cuando es administrado por vía oral en ratas es de 10.5 ± 1.96 g/Kg de peso corporal. Otros autores citaron valores de 7.4 y 8.7 g/Kg de peso. La LD₅₀ del sorbato de sodio ha sido determinada entre 5.94 y 7.16. La toxicidad aguda del ácido sórbico no es alterada por la introducción de otros preservadores al mismo tiempo en la alimentación de los animales experimentales. El ácido sórbico irrita las membranas mucosas, pero solamente en personas altamente sensibles causa irritación en la piel intacta.

Subcrónica: La administración de un 10% de ácido sórbico fue tolerado por ratas durante 42 días sin provocar daños. En otra experiencia del mismo tipo pero llevada a cabo por un período de 120 días, produjo un incremento del crecimiento y un mayor peso del hígado. El funcionamiento reproductivo de los animales fue normal. La adición del 5% de ácido sórbico al alimento de ratas y perros no produjo daños durante los 90 días que duró el ensayo; igualmente el 8% del ácido sórbico, que representaba 5 g/Kg de peso corporal, causaba solamente un ligero aumento en el peso del hígado sin cambios histológicos; ese incremento observado ocasionalmente es interpretado como una hipertrofia funcional, atribuible a la utilización calórica del ácido sórbico.

Crónica: El ácido sórbico incorporado a la alimentación diaria de ratas y ratones en cantidades de 40 a 90 mg/Kg de peso corporal no produce efectos desfavorables. En otro ensayo continuado durante dos años, la alimentación administrada a las ratas contenía 1.5% y en otros casos 10% de ácido sórbico. En los animales a los que se les suministraron concentraciones más bajas no se observaron anomalías. La adición de 10% provocó un ligero incremento de peso y también un agrandamiento de la glándula tiroides, del hígado y del riñón.

El sorbato de potasio no tiene acción carcinogénica, mutagénica o teratogénica.

- **Acido benzoico** (C_6H_5COOH , peso molecular: 122.1) o sus derivados, benzoato de sodio (C_6H_5COONa , peso molecular: 144.1) o ésteres de p-hidroxibenzoico (parabenos), son importantes preservadores de alimentos. La molécula no disociada (responsable de la actividad antimicrobiana, Tabla 1.8) difunde a través de la membrana celular, se disocia provocando la acidificación de la célula. Esto interfiere con el transporte de sustratos y con el sistema de fosforilación oxidativa. Es efectivo contra bacterias, hongos y levaduras, en medio ácido a un nivel de 1 g/kg, en medio neutro a 2 g/kg, pero es inactivo en medio alcalino.

Tabla 1.8: Efecto del pH sobre la disociación del ácido benzoico ($pK_a = 4.19$)

pH	Acido no disociado (%)
3	93.5
4	59.3
5	12.8
6	1.44
7	0.144

El ácido benzoico es uno de los preservadores químicos más antiguos que se han usado en la industria alimenticia. Su acción preservadora parece haber sido descrita por primera vez en 1875. Debido a que inicialmente no podía producirse sintéticamente en grandes cantidades; no fue introducido como preservador de alimentos hasta alrededor del 1900. Las ventajas de su bajo costo, su fácil incorporación a los productos y su relativa baja toxicidad hicieron que el ácido benzoico se convirtiera en el preservador más ampliamente usado. Es soluble en un limitado rango en agua (0.18, 0.27 y 2.2 g cuando se disuelve en 100 ml de agua a 4, 18 y 75°C, respectivamente) y está presente naturalmente en algunas frutas como ciruelas y almendras, y ha sido reportado también en manzanas.

El benzoato de sodio es un polvo blanco cristalino. Es mucho más soluble en agua que el ácido benzoico (62.8, 66.0 y 74.2 g cuando se disuelven en 100 ml de agua a 0, 20 y 100°C, respectivamente) y por esta razón, es preferido para su uso en muchos casos. Considerado GRAS, según el Código Alimentario Argentino debe ser usado hasta un máximo de 1.00 g/Kg en jugos vegetales (CAA, Art. N°1040, Res. 2067, 11.10.88).

El ácido benzoico es un ácido lipofílico. Su acción antimicrobiana se basa en la interferencia con la permeabilidad de la membrana celular microbiana, provocando el desacoplamiento del transporte de sustratos y fosforilación oxidativa del sistema transportador de electrones. Además, puede inhibir sistemas enzimáticos específicos dentro de las células. También actuaría como consumidor de radicales libres y como inhibidor del transporte pasivo de aniones.

Debido a que la cantidad de ácido no disociado disminuye con el incremento del pH (Tabla 1.8), el uso del ácido benzoico o del benzoato de sodio como preservador en alimentos ha sido limitado a aquellos productos ácidos por naturaleza. Comúnmente, estos compuestos fueron usados primeramente como agentes antimicóticos, y la mayoría de los hongos y levaduras son inhibidos por 0.5-1 g/l de ácido no disociado. Los patógenos y bacterias formadoras de esporas son generalmente inhibidas por 0.01-0.02% de ácido no disociado, pero muchas bacterias de deterioro son mucho más resistentes. El espectro antimicrobiano del ácido benzoico se presenta en la Tabla 1.9.

Tabla 1.9: Espectro antimicrobiano del ácido benzoico

Microorganismos	Concentración* (g/l en la solución)
Bacillaceae	0.2
Enterobacteriaceae	0.1
Micrococcaceae	0.1
Hongos	1.0
Levaduras	0.5
Virus	>10

*Concentración de ácido no disociada requerida para inhibir el crecimiento de la mayoría de las cepas en medios microbiológicos

Concentraciones inhibitorias mínimas para algunas bacterias, levaduras y hongos involucrados en intoxicaciones alimenticias y deterioro se muestran en las Tablas 1.10, 1.11 y 1.12, respectivamente.

Tabla 1.10: Acción inhibitoria del ácido benzoico en bacterias

Microorganismo	pH	Concentración inhibitoria mínima (g/kg)
<i>Pseudomonas</i> sp.	6.0	0.20-0.48
<i>Micrococcus</i> sp.	5.5-5.6	0.05-0.10
<i>Streptococcus</i> sp.	5.2-5.6	0.20-0.40
<i>Lactobacillus</i> sp.	4.3-6.0	0.30-1.80
<i>Escherichia coli</i>	5.2-5.6	0.05-0.12
<i>Bacillus cereus</i>	6.3	0.50

Tabla 1.11: Acción inhibitoria del ácido benzoico en levaduras

Microorganismo	pH	Concentración inhibitoria mínima (g/kg)
Esporogéneas.	2.6-4.5	0.02-0.20
Aesporogéneas	4.0-5.0	0.07-0.15
<i>Candida krusei</i>		0.30-0.70
<i>Torulopsis</i> sp.		0.20-0.50
<i>Rhodotorula</i> sp.		0.10-0.20
<i>Pichia pastori</i>		0.30

Tabla 1.12: Acción inhibitoria del ácido benzoico en hongos

Microorganismo	pH	Concentración inhibitoria mínima (g/kg)
<i>Penicillium</i> sp.	2.6-5.0	0.03-0.28
<i>Penicillium glaucum</i>	5.0	0.40-0.50
<i>Aspergillus</i> sp.	3.0-5.0	0.02-0.30
<i>Cladosporium herbanum</i>	5.1	0.10

El ácido benzoico y el benzoato de sodio son los más adecuados para alimentos y bebidas que naturalmente están en un rango de pH inferior a 4.5 o que pueden ser llevadas a ese rango por acidificación (Tabla 1.13). Sin embargo, debido al estrecho rango de pH en el cual son activos, el off-flavor que imparten a los alimentos y sus propiedades toxicológicas comparadas con otros preservadores, han contribuido para sustituirlos por otros con mejores características. En bebidas de naranjas no carbonatadas se ha reportado que las levaduras crecieron en un amplio rango de temperatura y no fueron inhibidas por el nivel de ácido benzoico de 0.2 g/kg permitido en Australia. Por ello se sugirió que las bebidas deberían pasteurizarse para mantener su vida útil.

Tabla 1.13: Aplicaciones del ácido benzoico y benzoato de sodio como aditivo en alimentos.

Alimento	Nivel para uso general (g/kg)
Bebidas carbonatadas	0.3-0.5
no carbonatadas	1
jugos de fruta	1
Otros ensaladas, aderezos	1

El benzoato de sodio muestra propiedades antipardecimiento dependientes de la concentración en jugo de manzanas *Granny Smith* (Sapers y col., 1989b). Combinaciones de 1 g/kg de benzoato de sodio y 0.2 g/kg de ascorbato de sodio o ascórbico-2-fosfato parece tener un efecto sinérgico en la prevención del pardecimiento del jugo por 24 hs. El principal efecto de la combinación fue incrementar el tiempo de latencia para el desarrollo del pardecimiento. Trozos de manzanas *Granny Smith* sumergidas en soluciones conteniendo benzoato solo o en combinación con ácido ascórbico mostró protección a corto plazo pero, promovió un pardecimiento severo en muestras almacenadas por más de 6 hs. Como en el caso del cinamato, el benzoato podría ser lentamente convertido en un sustrato de la PPO.

El benzoato no parece acumularse en el cuerpo, no tiene efecto teratogénico, carcinogénico ni antigénico.

- **Otros ácidos aromáticos carboxílicos:** Son inhibidores de la PPO debido a sus similares estructuras con los sustratos fenólicos. En sistemas modelo, el tipo de inhibición observado depende del sustrato evaluado y se clasifica en competitiva, no competitiva o mixta (Janovitz-Klapp y col., 1990). Usando 4-metilcatecol como sustrato, la inhibición de PPO de uva por ácido cinámico o benzoico fue competitiva, pero con ácido cafeico como sustrato el modo de inhibición fue no competitiva (Gunata y col., 1987). El ácido cinámico y sus análogos, ácidos *p*-cumárico, ferúlico y sinápico, resultaron ser potentes inhibidores de la PPO de manzanas (Pifferi y col., 1974; Walker y Wilson, 1975), con valores de K_i desde 2 a 30 veces menores respecto al ácido benzoico y sus análogos, ácidos *p*-hidroxibenzoico, vainíllico y siríngico. La insaturación, como en la cadena lateral del ácido cinámico, es un importante determinante estructural en la potencia del inhibidor. Los derivados del ácido benzoico fueron más efectivos inhibidores respecto del ácido fenilacético, fenilpropiónico y *p*-hidroxifenilpropiónico (Janovitz-Klapp y col., 1990). Para las series de compuestos de ácidos cinámico y

benzoico, la sustitución *p*-hidroxi incrementó débilmente las características inhibitorias, mientras que la adición de uno o dos grupos metoxi en posición meta reduce las propiedades inhibitorias de estos compuestos. La esterificación del grupo carboxilo de los ácidos benzoico o cinámico produce una considerable reducción de la inhibición (Gunata y col., 1987; Pifferi y col, 1974). El grado de inhibición por los ácidos es pH dependiente, se incrementa cuando el pH disminuye. Robb y col. (1966) han postulado que es necesario el grupo carboxilo no disociado para formar un complejo con el cobre en el sitio activo de la enzima.

Se probaron varias concentraciones de ácidos cinámico, *p*-cumárico y benzoico en jugo de manzana fresco con aireación para promover el pardeamiento, y se observó que el cinámico en nivel de 0.01% o menor fue el más efectivo inhibidor por un largo período de tiempo.

Combinaciones de 0.1-0.4 g/kg de cinamato de sodio (sal más soluble) con 0.2 g/kg de ácido ascórbico fueron más efectivas respecto a los compuestos individuales en prevenir el pardeamiento de jugo de manzanas *Granny Smith* (Sapers y col., 1989b).

El tratamiento de trozos de manzanas *Winesap* con cinamato de sodio (2 g/kg) mostró inhibición del pardeamiento a corto plazo, pero después de 24 hs de almacenamiento lo promovió. La combinación de ácido cinámico y ascórbico en inmersión fue más efectiva respecto del ácido ascórbico solo y resultó en una significativa extensión del tiempo de latencia para el desarrollo del pardeamiento de trozos de manzanas. La tendencia del ácido cinámico o su sal de sodio para inducir el pardeamiento es un problema importante para el uso de este compuesto. El lento incremento del pardeamiento en el alimento sugiere que el cinamato exógeno en la superficie cortada es gradualmente convertido en un sustrato de la PPO por cinamato hidroxilasas u otras enzimas involucradas en la biosíntesis de polifenoles (Robinson, 1983). La hidroxilación del cinamato forma ácido *p*-cumárico, un inhibidor de la PPO, que puede ser hidroxilado después para dar ácido cafeico, un sustrato (Zenk, 1966).

- **Acido propiónico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$):** previene el crecimiento de hongos en productos de panadería, quesos, etc. La acción antimicrobiana es similar el benzoato no disociado. El pKa del propionato es 4.87 y a un pH de 4.0 el 88% del compuesto está no disociado mientras a pH de 6.0 sólo el 6.7% permanece sin disociar. Como estos compuestos no tienen una tendencia hacia la disociación son útiles en alimentos poco ácidos. Este compuesto parece actuar como fungistático más que fungicida. Son considerados GRAS tanto el ácido como sus sales.

- **Acido acético ($C_2H_4O_2$):** antimicrobiano, complejante, modifica el sabor y aroma, lo que primeramente limita su uso. Es GRAS, efectivo a pH 4.5 sobre todo para levaduras y bacterias, pero menos sobre hongos. Su acción es reducir el pH por debajo del óptimo para el desarrollo de los microorganismos y provocar la inhibición del metabolismo por acción de la molécula no disociada. Una concentración del 1-2% del ácido no disociado es suficiente para inhibir o eliminar los microorganismos de un alimento.

- **Acido láctico ($C_3H_6O_3$):** disminuye el pH por debajo del rango de pH de crecimiento y la molécula no disociada provoca inhibición metabólica. Lo más importante en el tratamiento con este ácido es la acidez titulable más que la concentración de protones por sí, ya que la ionización es incompleta aún a bajos valores de pH. A pesar de no estar normalmente presente en alimentos, se forma durante la fermentación por bacterias ácido lácticas. Como aditivo, se usa principalmente como acidulante y agente del flavor. La sal de este ácido (de sodio o potasio) ha demostrado tener propiedades antimicrobianas. Los lactatos son considerados GRAS por la FDA.

- **Acidos adípico, caprílico, málico, succínico y tartárico:** están aprobados como sustancias GRAS para su uso en alimentos. La mayoría tiene efecto antimicrobiano por reducir el pH.

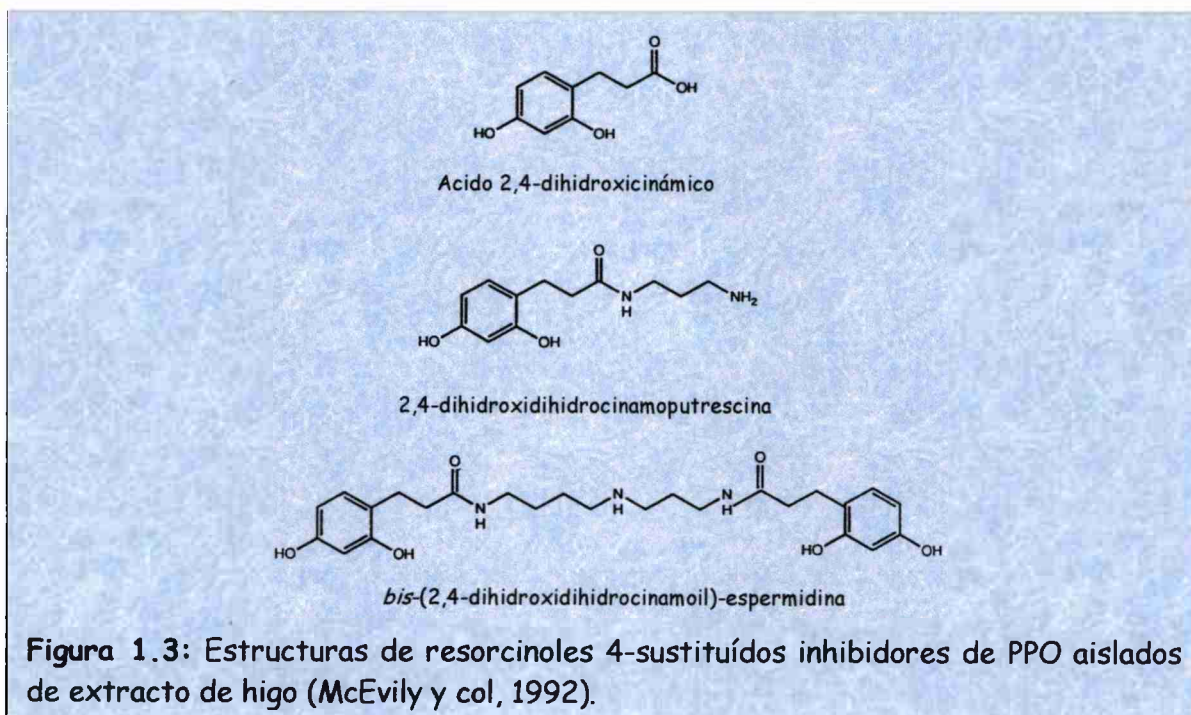
- **Acido Etilendiaminotetracético (EDTA):** un agente quelante ampliamente usado, no fue un inhibidor muy efectivo en PPO de duraznos (Wong y col., 1971) y no inhibió el pardeamiento en rodajas de manzanas (Sapers, 1993). Sus formas aprobadas como aditivo son las sales EDTA calcio-disódico y EDTA disódico. Por acción del EDTA se forman complejos altamente estables con prooxidantes como hierro, cobre o calcio. La máxima eficacia se logra al mayor valor de pH donde los grupos carbonilos están disociados.

● Resorcinolos sustituidos

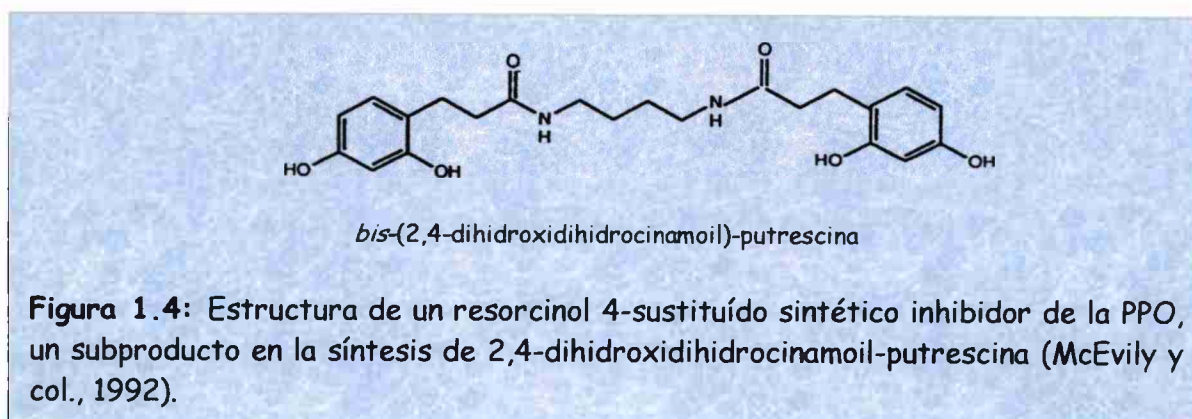
Preparaciones de proteasas, especialmente ficina, la proteasa de latex de higo (*Ficus* sp.), parece funcionar como inhibidora del pardeamiento en varios sistemas alimenticios (Anónimo, 1990). La preparación de ficina empleada fue parcialmente purificada y posiblemente exista un componente que no es proteasa en la preparación responsable del efecto antipardeamiento observado. Más aún, preparaciones tanto de ficina inactivada por calor como extracto ultrafiltrado de higo libre de ficina, fueron

efectivos en inhibir la PPO como la preparación conteniendo la proteasa activa (McEvily, 1991).

Se han aislado tres inhibidores de las preparaciones de ficina por cromatografía convencional y por HPLC (McEvily y col., 1991). En base a los datos analíticos de preparaciones homogéneas, los inhibidores presentes en el extracto de higo fueron análogos resorcinoles 4-sustituídos. Los compuestos fueron identificados como ácido 2,4-dihidroxi-dihidrocinámico, 2,4-dihidroxi-dihidrocinamoilputrescina, y *bis*-(2,4-dihidroxi-dihidrocinamoil)-espermidina, metabolitos secundarios de la planta (Figura 1.3) (McEvily y col., 1991).



Un inhibidor de PPO estructuralmente relacionado, *bis*-(2,4-dihidroxi-dihidrocinamoil)-putrescina, fue producido por una reacción secundaria durante la síntesis *in vitro* de 2,4-dihidroxi-dihidrocinamoil-putrescina (Figura 1.4).



Los valores de I_{50} (concentración de inhibidor a la cual se obtiene un 50% de inhibición de la actividad de la enzima PPO) para los inhibidores naturales y el sintético fueron determinados usando PPO de hongos en un sistema de ensayo *in vitro* (McEvily y col., 1991). Los resultados se muestran en la Tabla 1.14.

Tabla 1.14: Valores de I_{50} para resorcinolos 4-sustituídos como inhibidores de PPO (McEvily y col., 1992).

Componente	I_{50} μM
Acido 2,4-dihidroxi-dihidrocinámico	25
2,4-dihidroxi-dihidrocinamoil-putrescina	5
bis-(2,4-dihidroxi-dihidrocinamoil)-putrescina	5
bis-(2,4-dihidroxi-dihidrocinamoil)-espermidina	5

Además de los componentes naturales, se han probado resorcinolos 4-sustituídos sintéticos en su eficacia como inhibidores de PPO. En la Tabla 1.15 se presentan los valores de I_{50} determinados. El resorcinol es un pobre inhibidor de PPO con un I_{50} en el rango milimolar; sin embargo, sustituciones en la posición 4 producen un descenso de I_{50} . El menor valor fue obtenido con sustituyentes hidrofóbicos en la posición 4, como 4-hexil-, 4-dodecil-, y 4-ciclohexilresorcinol, con valores de I_{50} de 0.5, 0.3 y 0.2, respectivamente.

Tabla 1.15: Valores de I_{50} para resorcinolos 4-sustituídos sintéticos como inhibidores de PPO (McEvily y col., 1992).

R	I_{50} μM
H	2700
Hexanoil	750
Carboxil	150
Etil	0.8
Hexil	0.5
Dodecil	0.3
Ciclohexil	0.2

Derivados de resorcinol con sustituciones en posiciones 5-, 2- y 1,3- también fueron evaluados como inhibidores de PPO. Resorcinolos sustituídos en la posición 5- mostraron una tendencia inhibitoria similar a la observada con resorcinolos 4-sustituídos:

sustituyentes hidrofóbicos de mayor largo de cadena producen inhibidores con menores valores de I_{50} . A pesar de que los resorcinoles 5-sustituídos parecen ser efectivos como inhibidores de PPO *in vitro* y varios están presentes en la naturaleza, su uso en alimentos no fue continuado debido a las propiedades tóxicas e irritantes asociadas con esta clase de compuestos. Sustituciones en las posiciones 2- y 1,3- producen un gran incremento en los valores de I_{50} en relación al resorcinol. Estos compuestos muestran bajos niveles de inhibición de PPO aún al límite de sus respectivas solubilidades (McEvily y col., 1991).

De los resorcinoles 4-sustituídos, el 4-hexilresorcinol tiene un gran potencial para su uso en la industria alimenticia debido a su bajo I_{50} en un sistema de ensayo espectrofotométrico, resultados preliminares positivos de ensayos en sistemas alimenticios, y el hecho de que este compuesto posee una larga y segura historia de uso en humanos en aplicaciones no alimenticias. Numerosos estudios toxicológicos sobre el 4-hexilresorcinol dan base potencial para su uso en alimentos (Frankos y col., 1991). La eficacia de este compuesto en mantener la alta calidad de camarones ha sido demostrada tanto en ensayos de laboratorio como en campo bajo una variedad de condiciones de proceso (McEvily y col., 1991^a; Otwell y col., 1991). Además de ser soluble en agua y estable, es no carcinogénico y es GRAS para su uso en la prevención de melanosis en camarones (McEvily y col., 1992).

Resultados preliminares de estudios de laboratorio mostraron que el 4-hexilresorcinol inhibe el pardeamiento de rodajas de manzanas y papas frescas y secadas en aire caliente, en palta y en un sistema líquido como jugos de manzana y uva blanca (McEvily y col., 1992). Debe destacarse que el 4-hexilresorcinol parece funcionar bien en la prevención del pardeamiento de jugo de manzana, mientras que el resorcinol no ha sido reportado como sustrato ni como inhibidor de la PPO de manzana, sin embargo en otro estudio, se encontró que estimulaba la oxidación del ácido clorogénico catalizada por PPO de manzana.

Los resorcinoles 4-sustituídos poseen varias ventajas sobre los sulfitos para su uso en alimentos. Entre otras, estas incluyen:

- (1) son potentes inhibidores específicos de PPO permitiendo su uso a concentraciones mucho menores que los sulfitos;
- (2) son químicamente más estables respecto a los sulfitos.

Debido a las menores concentraciones de derivado de resorcinol requeridas, estos agentes son también competitivos en costos con los sulfitos.

● Alcoholes alifáticos

Montedaro y Cantarelli (1969) y Kidron y col. (1978) estudiaron la inhibición de la PPO por etanol, pero la inhibición por otros alcoholes alifáticos no había sido estudiada tan extensivamente. Valero y col. (1990) han reportado la inhibición por alcoholes alifáticos naturales sobre la PPO de uva. Aparentemente la inhibición se incrementa con el número de átomos de carbono del alcohol alifático (de uno a cinco átomos de carbono). El orden de efectividad para algunos parece ser alcohol primario > secundario > terciario.

● Aminoácidos, péptidos y proteínas

Se ha estudiado la inhibición del pardeamiento en rodajas de manzanas, jugo de uva y sistemas modelo por miel (Oszmianski y Lee, 1990; Lee y Kime, 1990). Uvas blancas y rodajas de fruta sumergidas en una solución 20% de miel antes de la conversión a pasas amarillas o el secado de la fruta mantuvo su flavor natural, textura y color, comparado con sulfitos, no adquiriendo sabor a miel. Como las soluciones de azúcar inhiben el pardeamiento reduciendo la concentración de oxígeno disuelto y la velocidad de difusión del oxígeno dentro de la fruta (Joslyn y Ponting, 1987), se compararon las velocidades de pardeamiento de rodajas de manzanas después del tratamiento con 8% de sacarosa (nivel de azúcar en miel 10%) y con 10% de miel. Los resultados mostraron que las rodajas de manzana tratadas con miel tenían la menor cantidad de pardeamiento. Esto sugirió que la miel contiene un inhibidor de la PPO además del azúcar. La purificación de la miel mediante columnas de Bio-Gel P-2 y Sephadex G-15 produjo una fracción con alta actividad inhibitoria. El compuesto responsable parece ser un péptido pequeño con un peso molecular aproximado de 600 Da. Alternativamente, se ha sugerido que complejos de proteínas de la abeja con taninos de la fruta prevendrían la alteración de color oxidativa.

Las proteínas, péptidos o aminoácidos pueden afectar el pardeamiento catalizado por la PPO por directa inhibición de la enzima y por reacción con productos quinoides. Concentraciones milimolares de L-aminoácidos, lisina, glicina, histidina y fenilalanina (en orden de efectividad creciente) inhibieron levemente la PPO de hongos, con una inhibición máxima del 60%. Asimismo, la formación de pigmentos, fue disminuyendo por triglicina, diglicina y glicina (en orden decreciente de efectividad). De todos los aminoácidos ensayados, la L-cisteína resultó ser la más efectiva. La cisteína previene la formación de pigmentos marrones por reaccionar con intermediarios quinona para formar compuestos estables menos coloreados. Estudios recientes han sugerido que el

glutathion reducido y la N-acetilcisteína son casi tan efectivos como el sulfito en controlar el pardeamiento en manzanas, papas, y jugos de frutas frescas.

Enzimas (proteasas) se han postulado como inhibidores efectivos para manzanas, papas y camarones. La actividad de la PPO en jugo de ciruela fue disminuída significativamente cuando el jugo fue pasado por una columna conteniendo proteasas inmovilizadas. Un extracto libre de proteasa de latex de higo presentó un componente de menos de 5000 Da que inhibió el pardeamiento enzimático.

● Aniones

Los haluros inorgánicos son inhibidores bien conocidos del pardeamiento, aunque otros aniones (sulfato, nitrato) no tienen efecto. Esto podría deberse al mayor radio iónico de estos últimos. El uso de estos compuestos es GRAS pero limitado por su efecto sobre el sabor del producto.

La inhibición por haluros es pH dependiente y disminuye cuando el pH se incrementa, con inhibición máxima en el rango 3.5-5.0. El efecto del pH sobre la inhibición por haluros fue explicada por la interacción entre la carga negativa del inhibidor y la carga positiva del grupo imidazol en el sitio activo de la PPO (Janovitz-Klapp y col., 1990). El orden de poder inhibitorio decreciente de los haluros es $F > Cl > Br > I$. Esto es exactamente el orden decreciente del radio iónico y, por ello, los efectos estéricos podrían explicar estas diferencias. El orden de efectividad de haluros como inhibidores de la PPO dependería también de la fuente de la enzima. Se ha postulado que el efecto observado sería la combinación de la accesibilidad del sitio activo-cobre al haluro, y la estabilidad del complejo cobre-haluro así formado.

El cloruro de sodio es un componente de algunos inhibidores comerciales. La inhibición a pH 4.5 del cloruro de sodio sería no competitiva, mientras que otros haluros en el mismo pH presentan un modo de inhibición competitiva.

De las sales de haluros, las más comunmente usadas en la industria alimenticia para inhibir el pardeamiento son los cloruros de sodio y calcio, en concentraciones de 2 a 4% p/v. El uso de la sal de calcio tiene la ventaja adicional de mantener la firmeza del tejido por su interacción con la pectina de la pared celular del alimento tratado.

Recientemente, se ha reportado que el cloruro de zinc sería aún más efectivo, especialmente en combinación con cloruro de calcio, ácido ascórbico y ácido cítrico.

● Acido kójico [5-hidroxi-2-(hidroxymetil)- γ -pirona]: es un metabolito producido por varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Parrish y col., 1966; Kinoshita y Shikata,

1964), y se encuentra en muchos alimentos japoneses fermentados. Es un agente antibacteriano y antifúngico, un agente reductor y antioxidante, que ha demostrado ser un inhibidor de la PPO de hongos comestibles (Saruno y col., 1979). Parece tener un tipo mixto de inhibición: inhibición directa de la PPO y reducción de pigmentos (*o*-quinonas) o sus precursores a compuestos menos coloreados.

A pesar que este compuesto, en ciertos alimentos, es originado por fermentación natural, su amplio uso como aditivo alimenticio para inhibir el pardeamiento está muy cuestionado debido a su asociada toxicidad. Ha presentado efectos de toxicidad aguda en varios modelos animales, como nefrosis y letalidad, así como toxicidad genética en células de hígado de rata y teratogenicidad en embriones de pollo. Otros estudios indicaron que el ácido kójico es mutagénico para *Salmonella typhimurium* (Wei y col., 1991).

Además de los problemas de toxicidad, el uso del ácido kójico en la industria alimenticia podría ser restringido por la dificultad de su producción a gran escala y su elevado costo.

● Sporix: agente quelante descrito como un polifosfato acídico, ha demostrado ser un efectivo inhibidor del pardeamiento en varias frutas y vegetales (Gardner y col., 1991). Este compuesto aún no ha sido aprobado para su uso en alimentos por la FDA.

● Ciclodextrinas (polisacáridos cíclicos): pueden formar complejos de inclusión o atrapar sustratos polifenólicos de la PPO o sus productos. La adición de ciclodextrinas solubles al jugo o tratando el jugo en columnas de ciclodextrinas insolubles podría prevenir el pardeamiento (Sapers y col., 1989b). Las ciclodextrinas no han sido aún aprobadas para alimentos por la FDA. Sin embargo, una compañía que planifica el uso de β -ciclodextrinas para eliminar el colesterol de la yema de huevo, ha solicitado a la FDA la aceptación como GRAS para esta aplicación (FDA, 1992).

● Quitosanos: polímero natural de N-acetilglucosamina, inhibe el pardeamiento enzimático de jugos de manzanas y peras (Sapers, 1991). La inhibición fue observada en jugo de manzanas McInstonsh que habían sido tratadas con 200 ppm de quitosano y posteriormente filtrado por tierras de diatomea. Niveles mayores fueron necesarios para alcanzar resultados comparables en jugos de peras Bosc y Bartlett. El modo de acción del quitosano en esta aplicación no está del todo claro, pero se debería a la adsorción de la PPO, de los sustratos o productos, o la combinación de estos procesos.

Como para las ciclodextrinas, el uso del quitosano como agente antipardeamiento estaría limitado a sistemas líquidos.

● Enzimas

Oxigenasas clivadoras de anillo: Se ha propuesto una alternativa para inhibir el pardeamiento que involucraría una modificación irreversible en los sustratos fenólicos. Consistiría en tratar jugo de manzana con una enzima bacteriana (una dioxigenasa), que cataliza la reacción oxidativa con apertura de anillo y la ortofisión del catecol. Los jugos tratados con la enzima (Pcasa) en presencia de ácido ascórbico no se oscurecieron en comparación con una muestra control de jugo no tratado. Este procedimiento sería muy costoso, además se ha demostrado que la velocidad de fisión del anillo de ácido clorogénico, el principal sustrato responsable del pardeamiento en manzanas, es demasiado lenta.

o-metil transferasa: Se observó que tratando jugo de manzana con o-metiltransferasa y S-adenosilmetionina, los sustratos de PPO, ácido cafeico y clorogénico, eran convertidos en ácido ferúlico (un inhibidor de la PPO) y en ácido feruloilquínico, respectivamente. Desafortunadamente este procedimiento es demasiado costoso para su uso comercial.

● **Polisacáridos sulfatados:** Se han aplicado en películas comestibles para prevenir el pardeamiento enzimático en rodajas de hongos (Nisperos-Carriedo y col., 1991). Algunos polisacáridos sulfatados, incluyendo los carragenanos, amilosa sulfato y xilansulfatos, fueron inhibidores efectivos en jugo y cubos de manzanas (Tong y Hicks, 1991). La inmersión en soluciones conteniendo ácido ascórbico y goma xantano, ha sido usada para extender la vida útil de frutas y vegetales usados en ensaladas (Wyss y col., 1990). Estos tratamientos lograban cubrir la fruta o vegetal con una barrera impermeable al oxígeno y/o incrementar la cantidad de ácido ascórbico retenido por el producto después de la inmersión.

● Combinación de agentes antipardeamiento

El mecanismo de inhibición es bastante diferente para cada categoría de inhibidores del pardeamiento enzimático discutido hasta aquí, como la reducción química, quelación, inhibición enzimática, etc. Estas diferencias permitirán el uso de combinaciones de inhibidores, lo que resultaría en un incremento de la actividad respecto al uso de cada agente individualmente. Debido a los numerosos factores que

afectan la eficacia de un agente o combinación de estos (por ejemplo, penetración en el tejido, pH, procesos de competencia, reacciones secundarias, etc.) la eficacia de los agentes combinados debe ser evaluada para cada tipo de alimento tratado.

Una combinación típica podría incluir un reductor químico (ácido ascórbico), un acidulante (ácido cítrico) y un quelante (EDTA). En muchos casos, el incremento en la actividad de los ingredientes combinados es aditivo, y en otros, sinérgico.

La mayoría de las combinaciones de agentes antipardeamiento citados en la literatura o disponibles comercialmente son composiciones basadas en ácido ascórbico. Ponting y col. (1972) han descrito el uso de una solución conteniendo ácido ascórbico (0.5-1%), cloruro de calcio (0.05-0.1%) y bicarbonato para mantener el pH entre 7 y 9 para la conservación de rodajas de manzanas. Esta combinación fue sinergista en rodajas de manzanas Newton Pippin almacenadas por 2 meses. Una combinación de ácido ascórbico y una goma (xantano, guar, tragacanto) fue efectiva en disminuir el deterioro y pardeamiento de frutas y vegetales utilizados en ensaladas en restaurant de comidas rápidas (Wyss y col., 1990). Mezclas de ácido ascórbico y ciclodextrinas fueron efectivas en la inhibición del pardeamiento de jugo de manzanas Granny Smith. Una solución conteniendo ácido ascórbico (0.25-1%), cloruro de calcio (0.5-1%), ácido cítrico (0.25-1%) y pirofosfato ácido de sodio (0.5-2%) parecería inhibir el pardeamiento en papas, peras, manzanas y lechuga (Warren, 1991). Una combinación de ácido ascórbico, ácido cítrico y sorbato de potasio junto con el envasado al vacío parece disminuir la velocidad de pardeamiento en rodajas de papas, pero dentro de los 30 min posteriores a la apertura del envase, se alcanza el máximo de pardeamiento (Langdon, 1987).

● Azúcares: sacarosa, glucosa, fructosa, etc. Tienen actividad antimicrobiana en concentración mayor a la normalmente usada en frutas mínimamente procesados refrigerados, por eso deben combinarse con otras barreras de preservación.

1.2.1.2 Temperatura

Calor: El principal problema en productos mínimamente procesados refrigerados es que el calor está asociado con pérdida del flavor, textura, color y calidad nutricional de dichos productos.

Refrigeración: La reducción de la temperatura disminuye el crecimiento microbiano y la actividad enzimática. La velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas está controlada por la temperatura con $Q_{10} = 2$. Esto significa que la refrigeración debe ser continua en productos mínimamente procesados refrigerados. El crecimiento de

microorganismos psicrótrofos para alimentos refrigerados es tan perjudicial como el producido por mesófilos o termófilos. Se debe prestar atención a microorganismos que crecen por debajo de 6°C, como *C. botulinum* tipo E y cepas no proteolíticas B y F, cepas de *V. parahaemolyticus*, y *Y. enterocolítica*.

El principal problema con frutas y vegetales MPR es la variación de temperatura que ocurre durante la distribución, etc.

1.2.1.3 Actividad acuosa: La Tabla 1.16 muestra los valores de a_w mínimos para el desarrollo de diferentes microorganismos.

Tabla 1.16: Valores de a_w mínimos para el desarrollo microbiano

Microorganismos	a_w
bacterias	0.90
levaduras	0.88
hongos	0.80

La mayoría de las frutas y verduras tienen un a_w de 0.98 o mayor, y son sensibles a una reducción de ella.

El método principal involucra una remoción de humedad del producto mediante deshidratación o por adición de ingredientes con alta presión osmótica que formen un complejo con el agua del producto. Sin embargo el producto tendría características no deseables como demasiado sabor dulce o salado por la alta concentración de azúcar o sal necesaria para la deshidratación osmótica.

1.2.1.4 Potencial de óxido-reducción: la presión parcial de oxígeno en la atmósfera alrededor del alimento tiene un gran efecto en el crecimiento de los microorganismos. Se relaciona con el envasado en atmósferas controladas o modificadas.

En frutos MPR, es importante mantener condiciones de reducción (más anaeróbicas) que son menos favorables para el crecimiento aeróbico de hongos y levaduras, los principales problemas de estos productos.

Los compuestos que tienden a mantener condiciones reducidas en frutas y vegetales son el ácido ascórbico o los azúcares reductores.

Las oxidoreductasas tienden a catalizar tanto la oxidación como la reducción de sustratos. A pesar de ello, la mayoría catalizan la oxidación de los mismos; éstas incluyen a la PPO (activa sobre o-difenoles), catalasa, lipoxigenasa, que colectivamente o

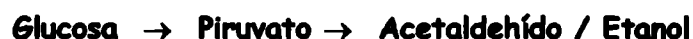
individualmente afectan el color y flavor de frutas MPR y de frutas intactas si no son adecuadamente controladas por métodos de conservación.

1.2.1.5 Envasado

El envasado de un producto permite proteger a éste de daños físicos, cambios químicos, contaminación bacteriana y otras alteraciones que conduzcan a un rechazo del producto por los consumidores. Un envase alimenticio debe proteger y contener al producto desde el lugar y fecha de elaboración hasta su consumo.

Para productos frescos se usan películas poliméricas, perforadas o no. Permiten establecer una atmósfera modificada alrededor del producto como método de conservación. El uso de envases poliméricos sellados, no perforados, con una permeabilidad gaseosa selectiva característica, en combinación con un adecuado preenvasado (cocción, preparación y tratamiento sanitario) es la principal herramienta utilizada para lograr una adecuada vida útil para productos no procesados y mínimamente procesados.

Cuando se envasan frutas o vegetales mínimamente procesados en películas plásticas selladas de baja permeabilidad al O_2 , la concentración de O_2 disminuye y la de CO_2 aumenta como consecuencia de la respiración del tejido. Eventualmente, la concentración de O_2 se reduce a niveles que inducen la anoxia tisular mientras aumenta el CO_2 intensificando un ambiente anaeróbico en la atmósfera del envase. Esto resulta en una respiración anaeróbica que produce deterioro del producto:



Esto puede evitarse con el uso de películas con adecuada permeabilidad al O_2 y CO_2 , que resulte en una atmósfera con concentraciones de O_2 mayores del 8% y de CO_2 menores de 1-2%, que tiene un moderado potencial para retardar la respiración y extender la vida útil del producto.

El envasado al vacío permite reducir el volumen de aire en contacto con el alimento; los cambios en las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono tienen un efecto selectivo sobre la flora microbiana que desarrolla, así como en la preservación del color de los alimentos.

Como el oxígeno es requerido para que el pardeamiento enzimático ocurra, esta reacción puede ser inhibida por exclusión del oxígeno en contacto con el producto. Esto se realizó por más de 50 años mediante impregnación bajo vacío de rodajas de frutas con almíbar, a veces conteniendo ácido ascórbico. Mientras que este tratamiento resulta efectivo en productos destinados a ser congelados, no es aplicable a rodajas

conservadas por refrigeración, ya que se tornan traslúcidos (water-logged) (Ponting y Jackson, 1972; Sapers y col., 1990).

La concentración de oxígeno en la atmósfera que rodea un producto como lechuga o hongos puede reducirse mediante el envasado con atmósfera modificada. Estas condiciones demorarían el pardeamiento, pero la excesiva reducción de oxígeno dañaría el producto por inducción de metabolismo anaeróbico, con la consecuente alteración del flavor (Ballantyme y col., 1988). La remoción de oxígeno además tiene el riesgo de que las condiciones dentro del producto se tornen favorables para el desarrollo de *Clostridium botulinum*. Para evitar dicho riesgo, los envases para hongos frescos deben contener orificios que admitan aire, de modo que este producto, que posee una alta velocidad de respiración, no se convierta en anaeróbico (Nichols, 1985).

1.3 FRUTAS QUE INTEGRAN EL SISTEMA BAJO ESTUDIO: MANZANAS (*Malus domestica*) Y NARANJAS (*Citrus sinensis*)

El sistema estudiado en el presente trabajo de tesis, que constituye un sistema modelo de ensaladas de frutas conservadas en fresco sin tratamiento térmico, fue elaborado con cubos de manzanas, de las variedades Red Delicious y Granny Smith, mantenidas en jugo de naranjas Valencia, con adición de agentes químicos en los mínimos niveles posibles compatibles con la calidad del producto, envasados en películas plásticas de diferente permeabilidad gaseosa y almacenados a 10°C. Estos parámetros dependen de las frutas utilizadas para su elaboración, por lo que aquí se describen sus características de producción, estructurales, fisiológicas y de composición.

1.3.1 Producción

Las manzanas (*Malus domestica*) constituyen uno de los cultivos hortícolas más importantes en el mundo. En términos de toneladas anuales de frutas, las manzanas ocupan el tercer lugar en los Estados Unidos y cuarto lugar en el mundo (Luo y Barbosa-Cánovas, 1994). A pesar de ser reconocidas más de 10000 variedades de manzanas, sólo unos pocos son utilizados con fines comerciales (Knee, 1993). Tradicionalmente, las principales variedades extensivamente sembradas son Red Delicious y Golden Delicious. Otros, como McIntosh, Granny Smith, Rome Beauty y Jonathan, también son cultivadas en gran escala dependiendo del país y región. Algunas variedades son cultivadas específicamente para procesamiento.

Las frutas frescas pueden ser usadas directamente en la elaboración de pasteles y compotas, o pueden ser parcialmente procesadas y almacenarse para la elaboración

futura de productos. Pueden congelarse rodajas de manzanas, procesarse térmicamente en latas, o tratarse con sulfito y mantenerse refrigeradas. Otra importante operación de procesamiento involucra la extracción de jugo, para su consumo directo, o para fermentación alcohólica.

La industria más importante de la cadena productiva de las manzanas de nuestro país es la de jugo concentrado de manzana, con aproximadamente 70 mil toneladas anuales y de las cuales se exporta el 97%, por valor de U\$S 110 millones, siendo el principal comprador USA. La actividad industrial se concentra en el Alto Valle de Río Negro, Neuquén y Mendoza. Las empresas productoras de jugos para beber, se localizan en distintas provincias. En la Figura 1.5 se observa la cadena productiva de manzanas de Argentina.

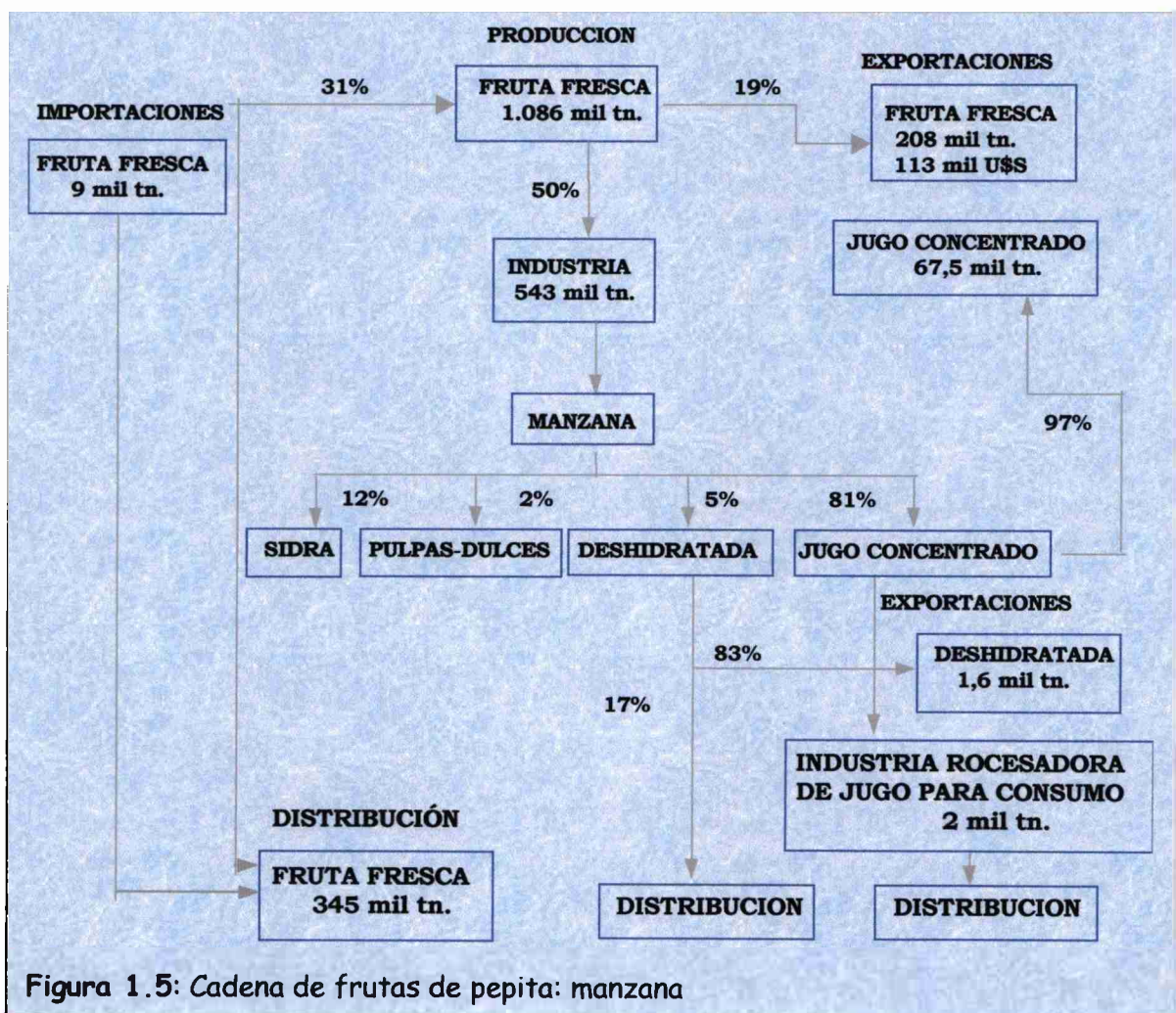


Figura 1.5: Cadena de frutas de pepita: manzana

Los cítricos son importantes en el consumo por su flavor y propiedades nutricionales. Son originarios del sudeste de Asia y ahora se cultivan en zonas tropicales y subtropicales. Tienen un lugar importante en la producción mundial de frutas.

Pertenecen a la familia *Rutaceae* y a la subfamilia *Aurantioideae* (Baldwin, 1993) que contiene a las naranjas y frutas tipo limón clasificadas como hesperidium o berrys de estructura especial. Se caracterizan por su jugosa pulpa formada por vesículas dentro de segmentos. Sólo tres géneros en esta subfamilia (*Citrus*, *Fortunella*, y *Poncirus*) producen vesículas comestibles de jugo. Las naranjas dulces comunes corresponden a los frutos de *Citrus sinensis*. La variedad más importante dentro de este grupo es la Valencia, debido a su adaptabilidad, abundante jugo de excelente color y flavor, poco contenido de semillas y su extenso período postcosecha.

De la producción mundial de cítricos, las naranjas llegan a un 80%, de las cuales el 50% proviene de Brasil y de Estados Unidos. Además de las frutas frescas (naranja dulce, mandarina, limón y lima), existen muchos productos cítricos procesados.

El jugo de naranjas concentrado congelado es el producto procesado más importante obtenido de la mayoría de las naranjas de Brasil y Estados Unidos (Baldwin, 1993). La popularidad de dicho jugo está en disminución, en favor de jugos más convenientes "listos para servir", elaborados "a partir de concentrado" o elaborados "no a partir de concentrado". Estos últimos han ganado importancia en estos últimos tiempos, debido a las preferencias de los consumidores actuales por productos naturales con procesamiento mínimo. Otros productos cítricos incluyen jugos frescos no pasteurizados, segmentos procesados, pulpas, pectinas, aceites esenciales y flavonoides de la piel, ácido cítrico de limones y limas, etc.

Los jugos no pasteurizados son mucho más susceptibles al deterioro microbiano que los pasteurizados bajo un régimen normal tiempo/temperatura. Los jugos cítricos no pasteurizados se basan sólo en su bajo pH, bajas temperaturas e higiene para inhibir la contaminación microbiana y proliferación durante su manipulación, almacenamiento y distribución.

La National Food Processors Associations estableció que los jugos como productos o como ingredientes deben ser pasteurizados o deben recibir un proceso equivalente que asegure la producción de jugo libre de microorganismos patógenos debido a los brotes de enfermedades alimentarias provocadas por microorganismos como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *Criptosporidium* (Matthys, 1999).

El lavado de la piel de las naranjas con agua clorada se recomienda para eliminar el polvo de productos frescos. Si el lavado se realiza adecuadamente, la población microbiana puede reducirse (Ayhan y col., 1998).

Las levaduras predominan en el deterioro de productos de frutas ácidas debido a su alta tolerancia ácida y a la capacidad de la mayoría de ellas de crecer

anaeróbicamente. Levaduras, hongos y bacterias ácido lácticas han sido implicadas en el deterioro de jugos de fruta (Deak y Beuchat, 1993).

Las modificaciones tecnológicas en el procesamiento de cítricos podrían influir en la frecuencia de deterioro fúngico en jugos. El uso de envases con barrera al oxígeno permitió alcanzar períodos de vida útil más largos de jugos refrigerados; la reducida tensión de oxígeno afecta negativamente la velocidad de crecimiento fúngico, sin embargo, el micelio puede desarrollarse bajo condiciones de bajo oxígeno in vitro (Parish, 1991).

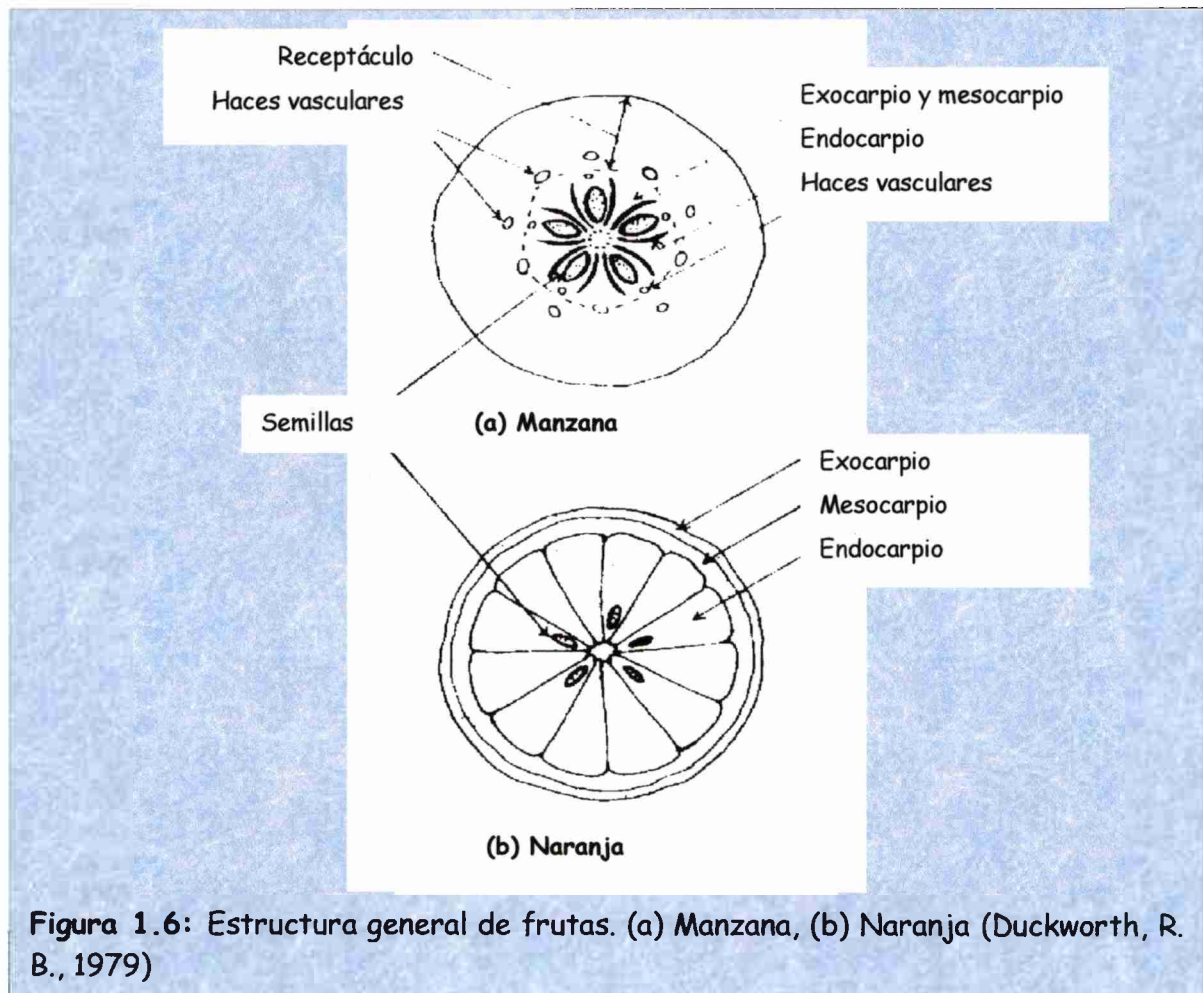
Las bebidas no alcohólicas y las frutas en conserva, generalmente requieren la adición de preservadores químicos para incrementar su estabilidad durante el almacenamiento. Estos aditivos deben ser utilizados cuidadosamente y sólo cuando existe una clara necesidad de incrementar la vida útil, prevenir el deterioro, o minimizar el riesgo de intoxicación alimentaria. La aplicación de ácido cítrico para prolongar la vida útil de naranjas peladas ha sido reportada por Pao y Petracek (1997). La infusión de las frutas con solución de ácido cítrico (0.1, 0.25, 0.5, y 1.0 % p/v) durante el proceso de pelado redujo el pH superficial de las frutas peladas (de 6.0 a valores inferiores a 4.6) y extendió su vida útil en comparación con frutas que sólo se sometieron a infusión con agua.

1.3.2 Estructura de frutos

Existe una gran diversidad de formas estructurales de frutas, las que se pueden clasificar en distintos grupos. Las manzanas y naranjas pertenecen al grupo de frutas de pulpa simples ("fleshy fruits"), ya que se desarrollan a partir de un carpelo único o de un gineceo sincárpico de una flor única. Ambas frutas pertenecen al subgrupo de "frutas de muchas semillas", siendo las manzanas del tipo de frutas de pepita, las cuales se caracterizan porque su pulpa se desarrolla desde un receptáculo que rodea un corazón compartimentalizado más duro que contiene las semillas, mientras que las naranjas, del tipo "Hesperidium", son frutas tipo "berrys" del género "Citrus". En la Figura 1.6 se presentan las estructuras de manzanas y naranjas.

En las frutas, cada tejido está estructuralmente adaptado para desarrollar una función fisiológica particular. La mayoría de la actividad metabólica normal de la planta es llevada a cabo en el parénquima, un tejido relativamente no especializado, que generalmente abarca la mayor parte del volumen de la estructura blanda comestible de la planta. La capa externa, la epidermis, que en muchos casos es reemplazada por una fina capa de tejido subceroso, está estructuralmente modificada para proteger la

superficie del órgano. El soporte mecánico está desarrollado por tejidos altamente especializados, el colénquima y el esclerénquima. El agua, los minerales y los productos orgánicos del metabolismo son transportados desde una parte a otra de la planta a través del tejido vascular, xilema y floema, que también presentan un alto grado de especialización. La pulpa de las frutas está generalmente formada por tejido blando parenquimatoso, mientras que los tejidos de conducción y de soporte están, en la mayoría de los casos, pobremente desarrollados.



El tejido parenquimatoso está compuesto por células grandes indiferenciadas, que se desarrollan directamente del tejido meristemático de los puntos de crecimiento. Durante el desarrollo, cada célula incrementa enormemente su tamaño, adquiere una pared celular prominente y la mayor parte de su volumen interno está ocupada generalmente por una enorme vacuola llena de savia. En parénquima maduro, las células son generalmente más o menos isodiamétricas y poliédricas en forma, las diferentes caras -entre 11 y 20, dependiendo del tamaño y posición relativa- representan las áreas de contacto con células adyacentes individuales o con el exterior. Los contactos

intercelulares no están generalmente completos, los espacios llenos de aire varían entre un 1%, por ejemplo en papas, y un 25%, en manzanas, del volumen total del tejido (Duckworth, R. B., 1979).

En las manzanas, los espacios intercelulares más grandes son realmente de mayor tamaño que las células que los rodean. El rango de tamaños y formas es característico de la especie y variedad. Una apariencia microscópica del tejido parenquimatoso típico se observa en la Figura 1.7.

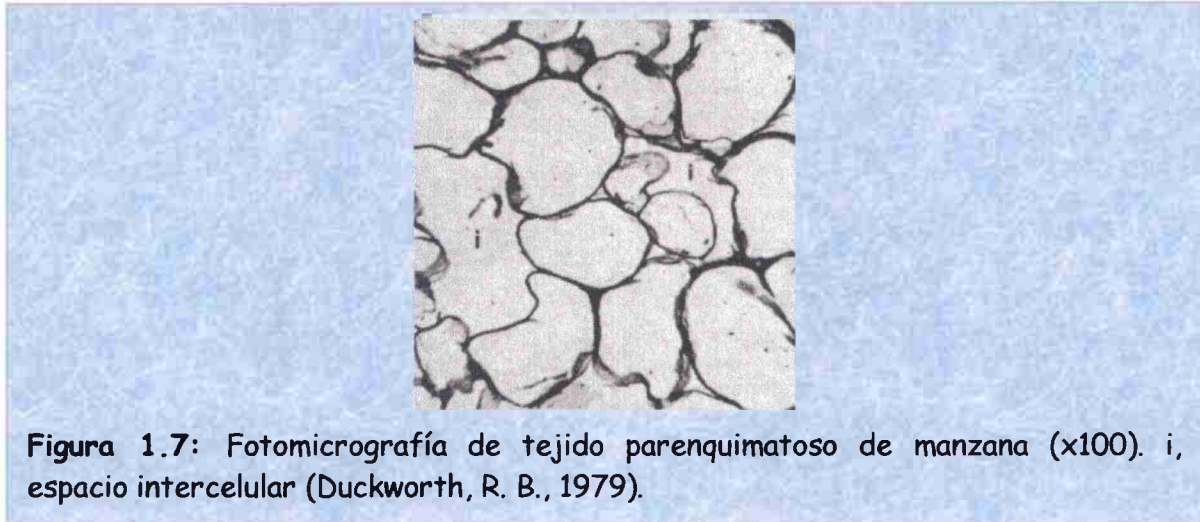


Figura 1.7: Fotomicrografía de tejido parenquimatoso de manzana (x100). i, espacio intercelular (Duckworth, R. B., 1979).

Las proteínas y materiales lipídicos en dichas células están en su mayoría contenidos en una delgada capa de citoplasma ubicado entre la pared celular y la vacuola. El citoplasma, que además contiene el núcleo de la célula, tiene la consistencia de un fluido viscoso, y mientras está en un estado vivo intacto, presenta propiedades de semipermeabilidad, responsables del comportamiento osmótico de la célula.

Los polisacáridos, además del almidón, están limitados a la pared celular. Incluyen celulosa, hemicelulosas y pectinas. Entre paredes de células adyacentes se encuentra una fina capa de material, denominada laminilla media, formada principalmente por pectinas, que actuaría como cemento intercelular. Su composición determina principalmente la firmeza con la cual se adhieren las células adyacentes, que tiene importancia en la textura de la fruta; es común la insolubilización del material péctico de la laminilla media por entrecruzamiento con iones metálicos divalentes, principalmente calcio y magnesio.

1.3.3 Fisiología

Por lo general, la maduración de las frutas, tal como se realiza sobre la planta o después de la cosecha, conduce a un equilibrio óptimo de sus caracteres organolépticos.

Para muchas frutas, este estado va seguido inmediatamente por una desorganización de los tejidos. Por esta razón, cuando se desea prolongar el almacenamiento de las frutas para su consumo fresco, se recogen antes de su completa maduración o se retarda ésta mediante la refrigeración, asociada con una atmósfera controlada.

Los caracteres organolépticos y nutricionales de los alimentos vegetales dependen de numerosos factores: especie y variedad, condiciones de cultivo, estado de maduración, condiciones y duración del almacenamiento, tratamientos tecnológicos, etc. La elección de estos factores está determinada, en gran parte, por consideraciones de carácter agronómico y económico, tales como rendimientos, resistencia a las enfermedades, mecanización y amplitud de cosecha, situación del mercado, etc., pero también por criterios de tecnología alimentaria.

El sabor y el aroma de las frutas depende de la relación de contenido de azúcares y ácidos, de la riqueza en taninos (astringentes) y de la presencia de numerosos compuestos más o menos volátiles, tales como los ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, terpenos, etc.. Esta composición varía durante la maduración, del mismo modo que también ocurre durante los tratamientos tecnológicos.

El color de las frutas se debe a los pigmentos localizados en cromoplastos, vacuolas y el líquido citoplasmático de las células, muchas veces limitado sólo a las células epidérmicas (por ejemplo algunas variedades de uvas). Los pigmentos más característicos pertenecen a tres grandes grupos:

- las *clorofilas*, verdes y liposolubles
- los *carotenoides*, amarillos y anaranjados, también liposolubles. Ejemplos de ellos son el β -caroteno, precursor de la vitamina A, el licopeno de los tomates, las xantófilas, etc. Los carotenoides son relativamente resistentes al calor y a pH extremos; sin embargo, estos agentes pueden provocar una transformación parcial cis-trans de ciertos dobles enlaces, lo que puede modificar el color o valor nutritivo. Por el contrario, los carotenoides son muy resistentes a la oxidación por el oxígeno del aire, reacción catalizada por la luz, lipoxidasas y peróxidos lipídicos.

- las *antocianinas* son rojas o azules e hidrosolubles. Estos pigmentos son poco estables y resisten mal a los diversos tratamientos tecnológicos.

El contenido en pigmentos de las frutas resulta completamente modificado durante la maduración.

La textura de las frutas es la resultante de la naturaleza de las células del parénquima y de los demás componentes estructurales. La *rigidez* de debe, en parte, a las microfibrillas cristalinas de la celulosa, que constituyen el 25% o más del residuo

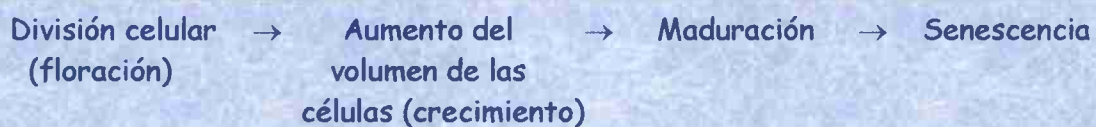
seco, así como las microfibrillas de diversas hemicelulosas, xilanos, ligninas (polímeros de fenoles). Estas fibrillas están presentes en las paredes de las distintas células, en particular de las de tejidos vasculares de soporte y protección. Prácticamente, los tratamientos tecnológicos no modifican las microfibrillas a pesar de la disminución de la cristalinidad de la celulosa, bajo el efecto del calor húmedo. La *turgencia*, que confiere a las frutas su firmeza y succulencia, depende del agua, que, retenida por ósmosis en las células, puede alcanzar hasta el 96% del peso del tejido. La ósmosis resulta de fuertes concentraciones intracelulares, de sustancias solubles de bajo peso molecular; la hinchazón por absorción de agua está, sin embargo, limitada por la resistencia mecánica de la pared celular. La permeabilidad de las membranas celulares y por consiguiente la textura, se modifican por la maduración, almacenamiento, cocción, congelado.

Asimismo, la textura también está influenciada por los geles de almidón y por los geles de pectinas de la laminilla media, que asegura la ligazón entre paredes celulares vecinas. La cohesión de estos geles puede reducirse por las actividades amilolíticas y pectinolíticas, que intervienen durante la maduración, así como después de la cosecha. Por otro lado, los tratamientos térmicos provocan un incremento en la gelatinización del almidón, lo que contribuye al ablandamiento de los tejidos vegetales durante la cocción (Cheftel, 1976).

Cuando una fruta se separa de la planta, no recibe más agua ni nutrientes y la fotosíntesis cesa. Sin embargo, prosigue la respiración del tejido, así como otras diversas reacciones enzimáticas, entre las que se incluyen la síntesis de pigmentos e incluso de enzimas. La respiración en los tejidos vegetales consiste en la oxidación de los hidratos de carbono; por tanto, origina una pérdida de materia seca y también frecuentemente una disminución del sabor azucarado. Consume oxígeno y, por eso, en este aspecto, es importante que las frutas almacenadas tengan oxígeno a su disposición, debido a que la anaerobiosis presupone la formación de etanol, tóxico para los tejidos (manchas pardas internas en las manzanas, negras en las papas), que resultan desagradables desde el punto de vista gustativo. La respiración desprende anhídrido carbónico, produce agua y mantiene la transpiración de los tejidos; pero es preciso evitar que esta agua se acumule en la superficie de las frutas, porque un exceso de humedad favorece el desarrollo de microorganismos. La respiración también desprende calor, que conviene eliminar, pues un aumento de temperatura aceleraría estos diversos fenómenos, y por tanto, el deterioro. La ventilación de los lugares de almacenamiento permite atenuar algunos de los efectos de la respiración; no obstante, con el fin de no provocar una evaporación demasiado rápida del agua contenida en las frutas, que

conduciría a una pérdida de turgencia, se mantiene entre 85 y 95% de humedad relativa, el aire en los lugares de almacenamiento.

Las frutas, una vez alcanzada la madurez, están muy expuestas al deterioro, debido a enfermedades fisiológicas, tales como el pardeamiento superficial de la manzana, o bien ataque por microorganismos, por ejemplo la alteración de cítricos por mohos. Al estado de madurez óptimo (desde el punto de vista organoléptico) sigue inmediatamente la desorganización y senescencia de los tejidos; ablandamiento excesivo, pardeamiento enzimático, etc. Esquemáticamente se puede considerar la vida de una fruta como formada por cuatro fases:



En algunas frutas, como la manzana y los cítricos, esas fases son bastante lentas, debido, sin duda, a su baja actividad respiratoria; por eso tienen un almacenamiento relativamente fácil. Por el contrario, con otras frutas (frutillas, frambuesas, cerezas) las dos últimas fases son muy cortas y los problemas de almacenamiento muy delicados.

Desde el punto de vista del metabolismo, la fase de maduración sería un período de diferenciación del tejido, acompañado de la síntesis específica de ciertas enzimas, responsables de los cambios de color, textura y sabor. Esta explicación, una más entre las numerosas que se han propuesto, parece la más verdadera después de descubierta la función hormonal del etileno y otras sustancias, y el estudio detallado de los fenómenos respiratorios. El período de diferenciación casi siempre va seguido rápidamente de la desorganización del aparato metabólico del tejido y más concretamente del aparato respiratorio, constituido por las mitocondrias celulares.

Entre las considerables diferencias que existen entre las diversas frutas, hay que citar las que conciernen a la actividad respiratoria, el lapso de maduración y vejez, el comportamiento después de la cosecha cuando se recogen antes de la maduración, etc.; se pueden distinguir dos grupos:

🍎 Climatéricas: entre las que se halla la manzana, pera, tomate, que presentan un aumento transitorio de la actividad respiratoria, llamado "pico climatérico", que, en general, coincide con las principales modificaciones de color, textura y sabor característicos de la maduración. El pico climatérico surge en la planta o bien durante la maduración, después de la cosecha y constituye un medio cómodo, aunque incompleto,

para valorar el estado de maduración de diversas frutas; no se produce por modificaciones ambientales, pues se debe a reacciones endógenas. El pico climatérico condiciona la presencia de oxígeno como indispensable para que se produzca maduración. En general, estas frutas son las que se cosechan antes de la maduración.

● No climatéricas: especialmente uvas, cerezas, fresas, higos, cítricos (naranja), piñas -así como la mayor parte de las legumbres- no presentan el pico climatérico; su respiración progresa más lentamente y, por lo general, se les deja madurar sobre la planta.

Entre las principales reacciones bioquímicas de la maduración, están las modificaciones de los *constituyentes glucídicos*. En general, el contenido de "osas" y el sabor azucarado aumentan en el curso de la maduración, a pesar del consumo de una parte de esas "osas" por oxidación respiratoria. Esas osas provienen de la hidrólisis, por ejemplo, del almidón (plátano, banana, pera) o de hemicelulosas de paredes celulares (cítricos, manzanas, pera). Se sabe que la glucosa, fructosa y sacarosa son interconvertibles, en los tejidos vegetales; en la manzana, la pera, la uva, se observa una acumulación más o menos grande, de fructosa; por el contrario, en cerezas, piña, es el contenido en sacarosa el que aumenta durante la maduración. Los azúcares constituyen el "residuo seco soluble" de los jugos de frutas, lo que permite valorar su calidad por refractometría.

Por lo general, la maduración presupone un descenso de la *acidez*, de esta forma la relación azúcares/ácidos aumenta durante la maduración de la mayor parte de las frutas; en el caso de la naranja, que se recoge madura, ese fenómeno prosigue durante el almacenamiento.

Las variaciones del contenido en ácido ascórbico no presentan la misma regularidad. Durante la maduración de frutilla o del tomate hay una síntesis activa de vitamina C, a partir de la glucosa; en el caso de esta última fruta, el período de recogida influye sobre el contenido en ácido ascórbico. En general, en la mayoría de las frutas decrece durante el almacenamiento.

Las *sustancias pécticas* resultan profundamente modificadas durante el crecimiento y maduración de frutas, tales como la manzana, pera, tomate. La protopectina, insoluble, se transforma en pectina soluble y ésta posteriormente se demetoxila y depolimeriza parcialmente debido, en parte, a una síntesis acelerada de pectinasas. Estos cambios afectan a las paredes celulares y motivan un ablandamiento, algunas veces excesivo, de las frutas.

Los *pigmentos*, también sufren durante la maduración considerables modificaciones. Por lo general, el pasaje de verde a amarillo (cítricos, peras, ciertas variedades de manzanas, ciruelas) o al rojo (tomate), corresponden al desenmascaramiento de los pigmentos carotenoides, debido a la destrucción de la clorofila. Al mismo tiempo, hay frecuentemente una síntesis de carotenoides (en el tomate la proporción de licopeno se multiplica por 10 durante la maduración) o de pigmentos antociánicos. La síntesis de carotenoides puede proseguir durante el almacenamiento, pero esos pigmentos son, al mismo tiempo, destruídos progresivamente por oxidación, especialmente por la luz.

La maduración origina un gran número de compuestos orgánicos volátiles, que, en parte, son responsables del *aroma* de las frutas. Entre los compuestos no volátiles que contribuyen al sabor de las frutas, se deben mencionar preferentemente los flavonoides, constituyentes fenólicos astringentes, que desaparecen, en parte, durante la maduración.

Además del etileno, se demostró la presencia de otras hormonas de la maduración, citoquininas, auxinas, giberelinas y ácido abscísico.

1.3.4 Composición

Azúcares

Las frutas han sido valoradas por mucho tiempo por su atractivo "flavor", apariencia y textura. Su contenido en vitaminas ha sido reconocido también como una importante característica. En todas estas propiedades, los azúcares, tanto en estado libre o en forma de derivados, juegan un papel importante. El flavor es fundamentalmente el balance entre azúcares y ácidos y, los constituyentes específicos del flavor son siempre glicósidos; el color atractivo de muchas frutas es debido a derivados azucarados de antocianidinas y la textura es gobernada por polisacáridos estructurales.

El contenido de azúcares varía ampliamente entre las distintas frutas. En la mayoría, constituye el principal material de reserva. El contenido de azúcares de una especie particular puede variar considerablemente con la variedad, suelo y condiciones climáticas durante su vida en la planta. Las frutas climatéricas, en particular, muestran considerables cambios en el contenido de azúcares entre su madurez de cosecha y de consumo.

La medida de azúcares reductores indica el total de monosacáridos, si se evita la inversión de la sacarosa, ya que ésta, un azúcar no reductor, es el principal disacárido.

Su concentración se determina por diferencia entre los azúcares reductores antes y después de su inversión.

En la Tabla 1.17 se presentan los contenidos de azúcares en algunas frutas.

Tabla 1.17: Contenido de azúcares en frutas.

	Azúcares reductores (%)	Sacarosa (%)
Manzana	6.3-10.7	1.3-6.7
Naranja (jugo)	2.6-5.8	1.9-5.1

Las principales hexosas son glucosa y fructosa. En la mayoría de las frutas la concentración de glucosa excede la de fructosa. En la manzana, la cantidad de fructosa es hasta 3 veces mayor que la glucosa (glucosa: 1.7-1.8%, fructosa 5.01-6.08% y sacarosa 3.62%).

Entre los derivados de azúcares, el ácido D-galacturónico se encuentra raramente en su estado libre, pero como D-xilosa se halla en frutas de la familia Rosaceae. En manzanas para sidra se encontraron trazas, pero cuando ha ocurrido ataque microbiano, el ácido galacturónico está acompañado por di-, tri- y mayores ácidos oligogalacturónicos.

Entre los polioles, el sorbitol llega a niveles de 300-800 mg/100 ml en jugo de manzanas.

Los niveles de azúcares en jugos cítricos varían entre 1 y 2.3% de glucosa, 1 y 2.8% de fructosa y 2 a 6% de sacarosa, para naranjas y mandarinas. Cuando la mayoría de las frutas cítricas maduran, los azúcares, especialmente la sacarosa, se incrementan.

Los sólidos solubles, que corresponden a los °Brix, son en su mayoría azúcares (70-85%), con una pequeña proporción de otros compuestos en el jugo, como lípidos, compuestos que contienen N y P, y especialmente pectinas.

En frutas no climatéricas, la cosecha es generalmente en la madurez o un poco después, ya que muestran un lento cambio en el contenido de azúcares. Los cítricos pueden mostrar un incremento inicial (°Brix) durante el almacenamiento como resultado del metabolismo de polisacáridos de pared celular por galactosidasas y glucosidasas presentes en ellos. En la naranja, la concentración de azúcares en el jugo y en la corteza inicialmente se incrementa, y luego la concentración en la corteza disminuye.

Los frutos climatéricos como la manzana, por otro lado, son cosechadas antes de alcanzar su madurez, a la que llegan sólo durante o después del pico climatérico de la respiración. En manzanas se observó una hidrólisis inicial de almidón, con la consecuente

aparición de sacarosa, pero el incremento en sacarosa es más grande que lo que se puede atribuir a la hidrólisis del almidón. Los azúcares reductores también se incrementan inicialmente y luego decrecen. Durante el almacenamiento a bajas temperaturas, la fructosa es reducida a D-glucitol. El ácido galacturónico se incrementa notablemente entre manzanas maduras y sobremaduras.

Acidos orgánicos

Numerosos ácidos orgánicos están naturalmente presentes en las frutas, generalmente disueltos en el agua de la célula, tanto libres como combinados como sales, ésteres, glicósidos, etc., como puede observarse en la Tabla 1.18. Son una importante fuente de energía respiratoria en la célula de la planta.

Tabla 1.18: Acidos naturales de frutas (Wiley, 1994)

Frutas	Acidos
Ananá	Cítrico y málico
Banana	Málico, cítrico, tartárico y trazas de acético y fórmico.
Cereza	Málico, cítrico, tartárico, succínico, quínico, shikimico, glicérico y glicólico.
Durazno	Cítrico, málico, tartárico y oxálico
Frutilla	Cítrico, málico, shikimico, succínico, glicérico, glicólico y aspártico.
Limón	Cítrico, málico, tartárico y oxálico.
Manzana	Málico, quínico, α -cetoglutárico, oxalacético, cítrico, pirúvico, fumárico, láctico y succínico.
Naranja	Cítrico, málico y oxálico
Pera	Cítrico, málico, tartárico y oxálico

Otros constituyentes de las frutas podrían tener propiedades ácidas, como fenoles y ácido ascórbico, en los que la acidez es debida a dos grupos enoles.

A pesar que en la mayoría de las frutas no hay una distinción de forma entre piel y pulpa, existen diferencias en el contenido de ácidos entre las áreas externas y las internas de las frutas, generalmente más blandas. En frutas cítricas la piel es más pobre en acidez total que la pulpa. Lo contrario ocurre en manzanas, especialmente en relación al ácido quínico. Es probable que la mayoría de los ácidos en las células de las frutas estén en las vacuolas, ya que el pH del citoplasma no es tan bajo como debería ser de acuerdo con el alto contenido de ácidos y bajo pH del jugo exprimido (4 o aún menor). El prensado progresivo de frutas permite obtener fracciones de variada acidez, lo que indica la presencia de gradientes a través de la fruta.

Las manzanas son comercialmente cosechadas cuando empiezan a madurar, antes de alcanzar el pico climatérico. En la mayoría de las frutas (excepto en la banana) se

pierden ácidos durante la maduración después de la cosecha. Durante el almacenamiento en atmósfera controlada (C.A.) de manzanas, el contenido de ácidos es influenciado por la composición de la atmósfera. En naranjas almacenadas, los ácidos decrecen más rápido que los azúcares, por lo que la fruta debería ser un poco más dulce al final del mismo.

La cantidades de ácido cítrico abarcan la mayoría de la acidez en jugos cítricos. Niveles característicos de ácidos orgánicos para jugos cítricos se dan en la Tabla 1.19 (Baldwin, 1993).

Tabla 1.19: Ácidos orgánicos en jugos cítricos

	Acido Cítrico		Acido Málico	
	g/100ml	% Total ácidos	g/100ml	% Total ácidos
Naranja/Mandarina	0.5-1.5	75-88	0.06-0.20	9-23
Limón	4.0-5.0	87-88	0.17-0.26	11-12

El ácido málico es el siguiente ácido más abundante en jugos cítricos. En estudios sobre 42 especies de Citrus, cantidades menores de acetato, piruvato, oxalato, glutarato, fumarato, formiato, succinato y α -cetoglutarato llegan a un 2% del total de los ácidos orgánicos.

Los jugos cítricos son una importante fuente de vitamina C, ya que jugos de naranja o mandarina contienen 44-59 mg/100g ácido ascórbico. Este componente decrece con la maduración o permanece constante. Sólo una cuarta parte del ácido ascórbico presente en la fruta entera se encuentra en el jugo, el resto estaría presente en la piel, especialmente en el flavedo (150-340 mg/100g) y albedo (30-200 mg/100g) de la naranja (Figura 1.8).

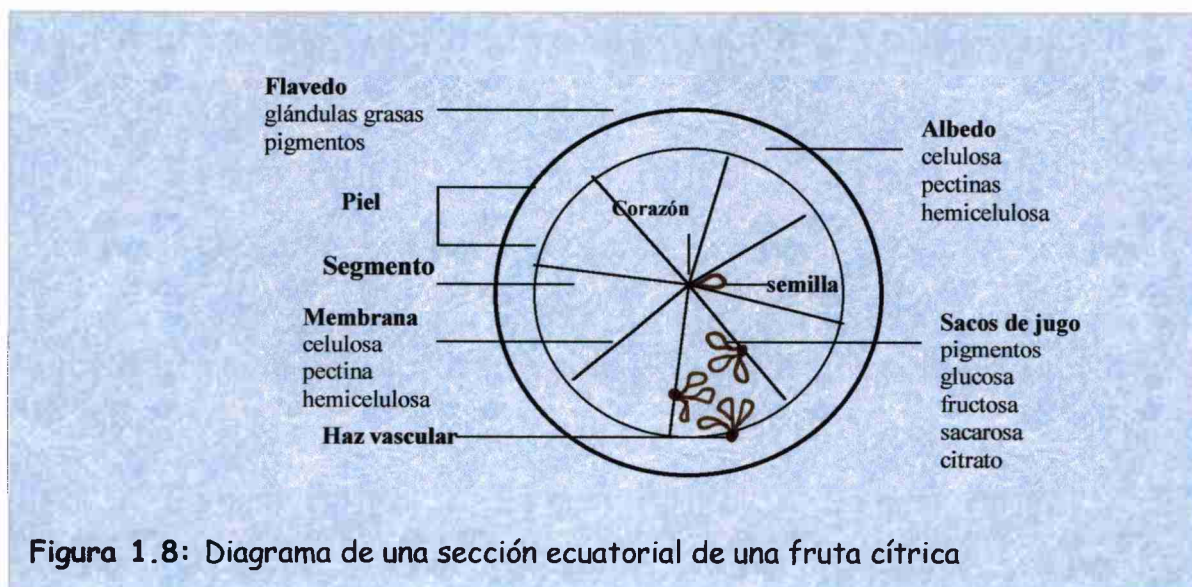


Figura 1.8: Diagrama de una sección ecuatorial de una fruta cítrica

Vitaminas

La principal contribución de las frutas y sus productos procesados a la nutrición humana es indudablemente su aporte de vitamina C o ácido L-ascórbico. Los requerimientos diarios de esta vitamina varían entre 30 y 60 mg para lactantes y adultos, respectivamente (Sauberlich, 1991). Factores como el tabaquismo, la ingesta de aspirina, la tensión y las altas temperaturas aumentan el requerimiento, por lo que se consideran cercanos a los 100 mg/día.

Varias frutas son también buenas fuentes de β -carotenos (pro-vitamina A) como los duraznos, melones y cerezas (Tabla 1.20). Muchas frutas contienen cantidades moderadas de ácido pantoténico (damascos, grosellas, higos y cítricos), así como moderadas cantidades de biotina. También están presentes en pequeñas cantidades los ácidos nicotínico y fólico, así como tiamina y riboflavina. Sin embargo, estas últimas vitaminas están en baja concentración comparado con otros alimentos animales o vegetales, por lo que su contribución con los requerimientos diarios, en muchos casos, es despreciable. Tanto la vitamina D (tocoferol) como la vitamina B₁₂ están ausentes o en muy baja concentración en frutas.

Tabla 1.20: Contenido de carotenos y vitamina B en manzanas y peras

	Caroteno	Contenido de Vitamina B (μ g/100g fruta)				
		Biotina	Acido nicotínico	Acido pantoténico	Rivoflavina	Tiamina
Manzana	74.3	0.25	690	50-200	40	40
Pera	19.8	0.10	100-400	20-50	70	50

El ácido L-ascórbico está naturalmente presente en frutas. Su concentración en las mismas varía en un amplio rango (Tabla 1.21). Las manzanas y peras contienen sólo 2-30 mg/100g.

Tabla 1.21: Contenido de Acido Ascórbico en frutas (fracción comestible)

Fruta	Acido Ascórbico (mg/100g)
manzana	2-10
banana	10-30
limón	50
melón	25-35
naranja	50
mandarina	30
ananá	25

La concentración de vitamina C en frutas se ve afectada por las condiciones ambientales durante su crecimiento, así como también varía ampliamente en los distintos tejidos de la fruta; en manzanas la concentración de vitamina C es 2 a 3 veces mayor en la piel que en la pulpa.

Las frutas poseen una ventaja sobre los alimentos vegetales en que la estabilidad de la vitamina es mucho mayor en el medio ácido de sus jugos que en aquellos más neutros de los vegetales. Además, la mayoría de las frutas se consumen crudas y enteras, con la consecuente ingesta del total de las vitaminas, en cambio, los procedimientos de cocción necesarios en la mayoría de los vegetales acarrearán pérdidas debido a su destrucción o liberación al líquido de cocción. Por lo tanto, una ingesta diaria de fruta, es suficiente para cubrir los requerimientos.

Hay, al menos, cuatro enzimas presentes en frutas que serían responsables de la destrucción oxidativa de la vitamina C; éstas son: ascórbico oxidasa, fenolasa, citocromo oxidasa y peroxidasa. Sólo con la primera hay una reacción directa entre enzima-sustrato y O_2 , las otras tres oxidan la vitamina C indirectamente. Así, la fenolasa cataliza la oxidación de mono y dihidroxifenoles, que después, como quinonas, reaccionan directamente con el ácido ascórbico. La citocromo oxidasa oxida el citocromo C y la forma oxidada de éste reacciona directamente con el ácido ascórbico. La peroxidasa, en combinación con compuestos fenólicos, utilizan el peróxido de hidrógeno para efectuar la oxidación. Así, cualquiera de estas enzimas puede iniciar la destrucción oxidativa de la vitamina. En la fruta intacta, estos sistemas enzimáticos están controlados, sólo cuando ocurre una desorganización celular, como resultado de daño mecánico, podredumbre o senescencia, se hacen efectivas estas actividades oxidativas.

La estabilidad de la vitamina C en jugos de fruta se debe a la presencia, siempre en alta concentración, de ácidos polibásicos o polihidroxilados como cítrico y málico, que por su poder de quelar iones metálicos, reducen la actividad catalítica de los metales como hierro y cobre. Los azúcares, por su concentración en jugos de frutas, podrían también contribuir, en parte, a la estabilidad de la vitamina C, en vista de su tendencia a quelarse con iones metálicos.

Se observó que en manzanas inmaduras el 50% del total de la vitamina C está presente como forma oxidada, ácido dehidroascórbico. Cuando la fruta madura, la relación de ascórbico oxidado con la forma totalmente reducida cae gradualmente hasta que en la madurez sólo el 5% está presente como dehidroascórbico.

Teóricamente, la inhibición de las enzimas oxidativas, o estimulación de los

sistemas reductores tenderían a preservar la vitamina en su forma reducida. En la práctica, sin embargo, es más fácil generalmente inhibir el primer sistema que potenciar el segundo. Como resultado de la estabilidad de ácido ascórbico en jugos de frutas, sólo pequeñas pérdidas ocurren durante las técnicas de procesamiento actuales.

Fenoles

Los fenoles son compuestos con intensa actividad fisiológica, que juegan un papel importante en el metabolismo de las frutas. Están relacionados con la astringencia, y con el fenómeno de pardeamiento, debido a la oxidación enzimática de fenoles endógenos en quinonas, las que luego polimerizan dando productos marrones.

Muchos autores han pensado establecer una relación entre el grado de pardeamiento, el contenido de fenoles y el contenido de enzimas oxidativas de las frutas. La susceptibilidad de las manzanas al pardeamiento ilustra la compleja interacción entre la actividad de la polifenoloxidasa (PPO) y el contenido de fenoles. Algunos investigadores indicaron que la actividad enzimática era el principal factor involucrado en el pardeamiento, otros indicaban que era el contenido de fenoles, y algunos, que ambos factores contribuyen al pardeamiento.

El primer problema recae en el método usado para determinar la susceptibilidad al pardeamiento. La cuantificación del pardeamiento es difícil, básicamente, puede ser evaluada por métodos de espectrometría de absorción o reflectancia. El segundo problema es que las manzanas contienen diferentes clases de fenoles con diferente susceptibilidad a la oxidación enzimática. El contenido de fenoles de manzanas ha sido cuantitativamente elucidado, y se han reportado los parámetros cinéticos de la PPO de manzanas contra estos fenoles (Hulme, 1970). Las proantocianidinas, junto a los derivados de ácido hidroxicinámico (cafeico, cumárico y ferúlico) son los componentes fenólicos más abundantes en manzanas. Los ácidos hidroxicinámicos no se encuentran en forma libre, sino, generalmente como constituyentes de compuestos más complejos, como el ácido clorogénico. La segunda clase de fenoles en importancia son los flavan-3-oles, por ejemplo, catequinas y procianidinas.

La pulpa de la manzana es rica en ácidos hidroxicinámico, localizado principalmente en tejidos parenquimatosos, mientras que la piel está caracterizada por un contenido alto en flavonoles.

Los valores de contenido de polifenoles en manzanas varían ampliamente, según la variedad, condiciones de cultivo, etc., y también de acuerdo con la metodología analítica utilizada para la determinación de los mismos.

En general, la concentración de fenoles en manzanas disminuye durante la maduración de las mismas, mostrando un rápido descenso transcurridos 90 días desde la fructificación.

En estudios de almacenamiento refrigerado, se ha encontrado que la concentración de fenoles en manzanas disminuye ligeramente en algunas variedades, mientras que otros autores han indicado que el nivel inicial se mantiene, e incluso aumenta ligeramente. Para manzanas Red Delicious cultivadas en la República Argentina (Ferreyra y Tomás, 1984), almacenadas durante 9 meses en cámaras, con atmósfera normal, a $1 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura y 90-95% de humedad relativa, se encontró que el contenido polifenólico aumentó en un 47%, correspondiendo, en su mayor parte, a las proantocianidinas de mayor peso molecular. El contenido de estas últimas aumentó de 34.4 a 63.8mg/100g ácido clorogénico, que correspondió a un incremento relativo de 41.5 a 52.1% sobre el total de fenoles. El mayor aumento se produjo en el contenido de ácido p-cumarilquínico, de 3.2 a 7.7 mg/100g ácido clorogénico. Se encontraron aumentos menores en el caso de la (-) epicatequina y ácido clorogénico, mientras que no se observaron cambios en los porcentajes de ácido p-cumárico y proantocianidinas. Esto indicó que durante el almacenamiento refrigerado se produce un aumento notable de los componentes fenólicos de mayor peso molecular, lo que da lugar a una disminución de la cantidad relativa de los componentes de peso molecular menor.

1.4 OBJETIVOS

En este trabajo de Tesis se seleccionó para su estudio un sistema compuesto por manzanas, peladas y cortadas en cubos, sumergidas en jugo de naranjas, de forma tal de simular el sistema de "ensalada de frutas artesanal", de gran demanda en el mercado, de venta directa, sin ningún tipo de control ni preservadores agregados. La demanda actual por parte de los consumidores, de este tipo de alimentos, hace necesario aplicar procesos de preservación para obtener productos sin tratamiento térmico, con la adición de preservadores inocuos y naturales, y sólo en caso de extrema necesidad, la incorporación de preservadores químicos en los niveles más bajos, que conserven los atributos de los alimentos frescos y sanitariamente seguros.

Se utilizan dos variedades de manzanas, Red Delicious y Granny Smith, y diferentes jugos de naranjas (fresco, pasteurizado) con el fin de cumplir los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

●🔄 Seleccionar los preservadores químicos naturales (ácidos orgánicos) más adecuados que permitan reemplazar al bisulfito de sodio para mantener los parámetros de calidad de manzanas peladas y cortadas mantenidas en jugo de naranjas durante el almacenamiento a 10°C, analizando asimismo el efecto de la permeabilidad gaseosa de la película de envase utilizada.

●🔄 Determinar los niveles óptimos de los preservadores más adecuados compatibles con la calidad microbiológica y adecuados atributos físicos y organolépticas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

●🔄 Determinar las características fisicoquímicas de las materias primas utilizadas, (manzanas y jugos de naranjas) mediante determinación del pH, acidez titulable, contenido de ácidos orgánicos, sólidos y azúcares en las mismas a los efectos de vincular las formulaciones óptimas con las características propias de cada sistema.

En los jugos de naranjas:

●🔄 Estudiar el desarrollo microbiano durante el almacenamiento refrigerado de los jugos de naranjas, fresco y pasteurizado, envasados en películas de diferente permeabilidad gaseosa.

●🔄 Evaluar el efecto del procedimiento del lavado de la piel de las naranjas utilizadas para la obtención del jugo fresco, sobre la calidad microbiológica del mismo.

●🔄 Evaluar el efecto del agregado de preservadores químicos (ácidos ascórbico y cítrico, sorbato y benzoato) y de la permeabilidad de la película plástica de envase sobre el desarrollo microbiano en los jugos de naranjas fresco y pasteurizado, envasados y almacenados a 10°C. Modelar matemáticamente el desarrollo de los microorganismos predominantes en los jugos. Calcular de los Indices de inhibición y períodos de Vida útil de los distintos jugos naturales obtenidos. Evaluar la calidad sanitaria obtenida en cada caso.

En el producto formulado a base de manzanas y jugo de naranjas:

● Analizar el efecto del agregado de ácidos orgánicos (ácido ascórbico, cítrico y sus combinaciones) en el jugo de naranjas pasteurizado o fresco, empleado para la formulación del producto, y de la permeabilidad gaseosa de la película de envase sobre los parámetros de calidad de las manzanas :

- color superficial
- textura instrumental
- desarrollo microbiano

durante su almacenamiento a 10°C en películas plásticas.

● Optimizar mediante panel no entrenado el sabor del producto final por agregado de azúcar o edulcorante.

● Evaluar el efecto del agregado de preservadores químicos (sorbato o benzoato) sobre el desarrollo microbiano y calidad global del producto envasados en películas plásticas y almacenados a 10°C.

● Analizar la composición de la atmósfera gaseosa en contacto con el producto envasado en películas de baja permeabilidad gaseosa durante el almacenamiento a 10°.

● Determinar la estabilidad de la vitamina C (ácido L-ascórbico) durante el almacenamiento a 10°C de los productos formulados.

● Caracterizar e identificar los principales géneros bacterianos y fúngicos presentes en el producto.

● Modelar el desarrollo de los microorganismos predominantes en el producto.

● Calcular los índices de inhibición para el desarrollo de los microorganismos predominantes en los distintos productos analizados.

● Evaluar el efecto del abuso térmico sobre los recuentos microbianos de los productos formulados de mejor calidad.

- 🕒 Analizar la supervivencia de *Escherichia coli* O157:H7 mediante ensayos de inoculación en los productos formulados que resultaron de mayor calidad.

- 🕒 Evaluar la Calidad sanitaria obtenida en los distintos casos.

- 🕒 Determinar los períodos de vida útil de las diferentes formulaciones. Optimizar la concentración de preservador utilizado, a los efectos de lograr con los mínimos niveles, calidad sanitaria, adecuados atributos de calidad y los mayores períodos de vida útil.

2. MATERIALES Y METODOS

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIAS PRIMAS Y REACTIVOS

Se utilizaron en el presente trabajo de Tesis, manzanas frescas de las variedades Red Delicious y Granny Smith; naranjas Valencia para la obtención de jugo fresco, jugo de naranjas pasteurizado (Cepita Peñaflor S. A., Argentina) y jugo de naranjas esterilizado (Baggio, Argentina). Se trabajó con partidas de frutas (manzanas y naranjas) adquiridas en el comercio local durante los meses marzo-diciembre, de cuatro años consecutivos. Las frutas y jugos fueron almacenados durante 24 hs en cámara de 10°C antes de realizar los diferentes ensayos.

Los reactivos utilizados en las distintas formulaciones fueron de grado analítico: ácidos ascórbico, eritórbito y cítrico (Cicarelli, Argentina), bisulfito de sodio (Mallinckrodt, USA), sorbato de potasio y benzoato de sodio (Inmobal); se utilizó sacarosa (Ledesma, Argentina) y aspartame (Nutrasweet) como endulzantes.

Las películas plásticas de envase utilizadas fueron:

● Polietileno de baja densidad: es resistente, transparente, presentando una permeabilidad relativamente baja al vapor de agua (4-10 g/cm²/24 hs a 38°C y 100% HR, según el espesor de la película). Es químicamente inerte y carece prácticamente de olor y sabor. Su principal ventaja es la facilidad con la que puede cerrarse térmicamente. Presenta gran resistencia al desgarramiento y al impacto. Puede usarse también en un amplio rango de temperatura (desde -50°C hasta 20°C, aproximadamente). Presenta además una permeabilidad alta a gases como el oxígeno (1000-4000 cm³/24 hs/atm a 22°C, según el espesor de la película) y el dióxido de carbono.

● EVA-SARAN-EVA (ESE) (GRACE Argentina): es una película coextrudada compuesta por SARAN (copolímero de cloruro de vinilo y cloruro de vinilideno) y EVA (etil-vinil acetato) que se utilizó en las muestras envasadas al vacío.

En la Tabla 2.1 se presentan las propiedades de las películas mencionadas.

La permeabilidad al oxígeno de la película compuesta decrece a bajas temperaturas, siguiendo la relación de Arrhenius (Eustace, 1981), siendo generalmente a 3.5°C menor que el 10% del valor a 25°C.

Tabla 2.1: Propiedades de las películas plásticas utilizadas para el envasado

Propiedades	Polietileno	ESE
Permeabilidad al O ₂ (cm ³ /m ² /24 hs/atm/23°C)	5000	50
Permeabilidad al CO ₂ (cm ³ /m ² /24 hs/atm/23°C)	1200	105
Transmisión del vapor de agua (gr/m ² /24 hs/%/HR/30°C)	12	7.2
Espesor (μ)	60	60

2.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS MATERIAS PRIMAS

La caracterización fisicoquímica de las materias primas utilizadas en las diferentes formulaciones de los productos se llevó a cabo mediante las siguientes determinaciones: pH, acidez titulable, concentración de ácidos orgánicos, azúcares reductores, no reductores y totales, y sólidos solubles, insolubles y totales.

2.2.1 Métodos para expresar la acidez

El pH de un extracto es una manera de expresar la acidez de una fruta; para jugos de fruta es generalmente bajo, por ejemplo, entre 2 y 4 para limón y tomate respectivamente. Los ácidos débiles libres y asociados con sus sales constituyen sistemas buffers, que juegan un papel importante en la célula, particularmente en relación con sus proteínas, especialmente enzimas.

La acidez libre, o acidez titulable, se mide neutralizando extractos de fruta con una base fuerte (NaOH 0.1N, por ejemplo). El pH aumenta durante la neutralización y es posible trazar una curva de titulación cuya pendiente decrece cuando el efecto buffer del extracto se incrementa (Figura 2.1).

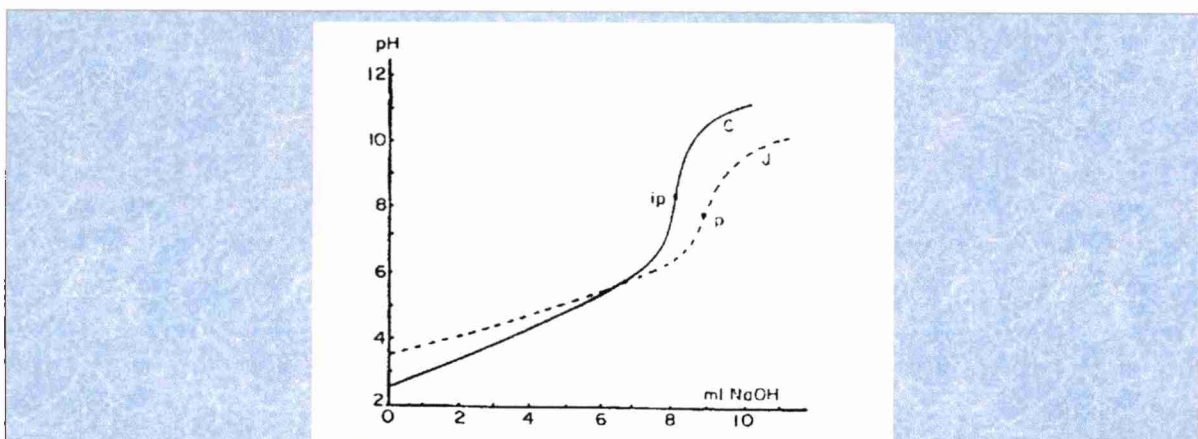


Figura 2.1: Curvas de titulación de jugo de naranjas Valencia (J) y de una solución de ácido cítrico puro (C), ip = punto de inflexión.

La acidez titulable es calculada a partir de la cantidad de base necesaria para alcanzar el pH determinado por el punto final del ensayo (puntos de inflexión en la Figura 2.2). El problema es determinar ese punto final; el objetivo es medir la neutralización de todos los grupos ácidos incluidos fenoles, aminoácidos y otros constituyentes que se podrían combinar con el álcali. En la práctica, el punto final es tomado a pH=8.5, usando fenoftaleína por ejemplo, como indicador (rango 8.2-9.9). Bajo estas condiciones, los ácidos orgánicos y sólo una parte del ácido fosfórico y fenoles están incluidos en el resultado final. Los valores de titulación están generalmente expresados en miliequivalentes de ácido por unidad de volumen del extracto o de peso fresco de tejido.

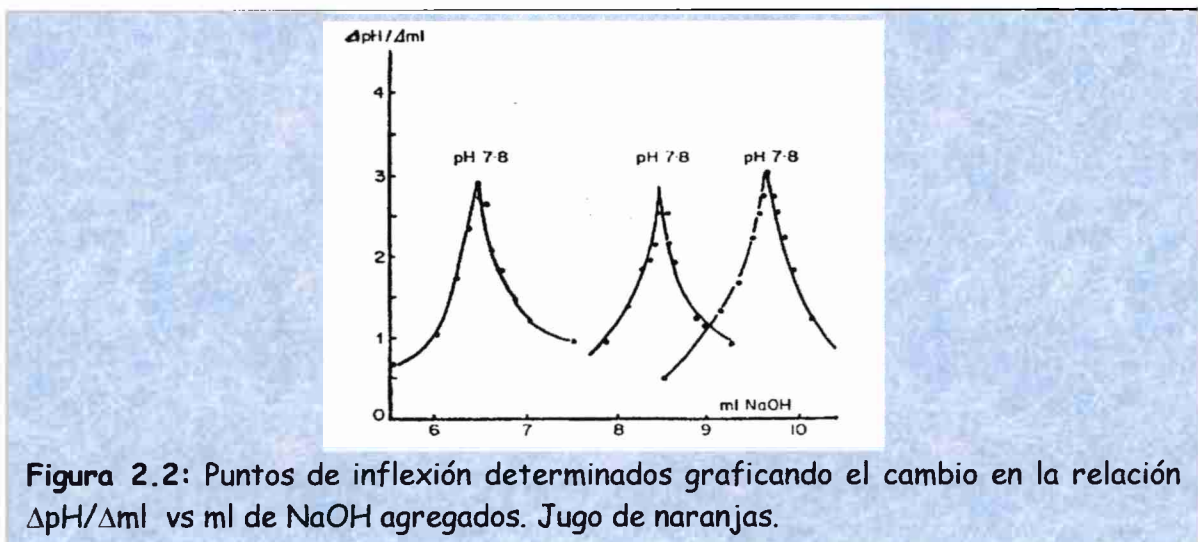


Figura 2.2: Puntos de inflexión determinados graficando el cambio en la relación $\Delta\text{pH}/\Delta\text{ml}$ vs ml de NaOH agregados. Jugo de naranjas.

La acidez total representa la suma de todos los ácidos presentes, libres o combinados con cationes. Es expresada como la cantidad de un ácido, del cual se asume que es el único ácido presente (cítrico, málico) por unidad de volumen del extracto, o por unidad de peso fresco de la fruta. Como los ácidos están generalmente presentes en mezclas complejas, es más correcto, cuando se expresa la acidez total o la acidez titulable, expresar el resultado en miliequivalentes.

2.2.1.1 Determinación del pH

En el caso de manzanas, se tomaron para cada variedad dos frutos y se realizó un homogenato en un Procesador de tejidos, al cual se midió el pH mediante pHmetro. En el caso de las muestras de jugos, el pH de los mismos se determinó con un pHmetro sobre una alícuota de cada muestra previamente homogeneizada.

2.2.1.2 Determinación de Acidez Titulable

La determinación de la acidez titulable se realizó según el método 22058 de la AOAC (1984). Las muestras se prepararon según el método 22008 de la AOAC (1984) para frutas frescas, que consiste en tomar 10 g del homogenato de manzanas o 10 ml de las muestras de jugos y llevar a 100 ml con agua destilada en matraz aforado. Las muestras así preparadas se calentaron 3 minutos a 100°C, se enfriaron y se titularon con NaOH 0.1N usando 0.3 ml de solución alcohólica de fenolftaleína al 1% por cada 100 ml de solución a titular, hasta lograr un rosado persistente (pH: 8.1). Se realizaron duplicados para cada determinación. La acidez titulable se expresó como meq de ácido cítrico/100 g de muestra.

2.2.2 Determinación de ácidos orgánicos

Se determinaron los contenidos de ácidos orgánicos en las dos variedades de manzanas así como en los jugos de naranjas fresco y pasteurizado.

2.2.2.1 HPLC (Cromatografía líquida de alta presión)

Las concentraciones de los ácidos orgánicos presentes en las manzanas y en los jugos de naranjas utilizados fueron determinadas por HPLC usando una columna AMINEX HPX-87H (BIORAD Labs) y detector Waters 996 (Millipore Corporation). Se utilizó H₂SO₄ 0.009 N como fase móvil, velocidad de flujo 0.7 ml/min y temperatura 58-62°C.

Para obtener el extracto de muestra se tomaron 40 g de puré de dos manzanas de cada variedad, o 50 ml de jugo de naranjas de cada uno, se filtraron por papel y centrifugaron a 11.000 rpm. Los sobrenadantes obtenidos se filtraron por filtro de membrana de 0.80 µm, y luego por 0.45 µm, de diámetro de poro.

Se analizaron los espectros de absorción a 214 nm para obtener los picos correspondientes al ácido cítrico y al ácido málico, y a 245 nm para el ácido ascórbico. Se prepararon patrones de los ácidos mencionados de distintas concentraciones (0.050-1.5 g/L) con el fin de construir las curvas de calibración correspondientes.

2.2.2.2 Determinación de ácido L-ascórbico: método enzimático-colorimétrico

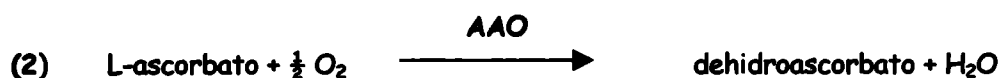
El contenido de ácido L-ascórbico en las muestras fue también determinado mediante el método enzimático-colorimétrico (Boehringer).

El ácido L-ascórbico (L-ascorbato) y sustancias más reducidas (X-H₂) reducen la

sal de tetrazolium MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolyl-2-2,5-difeniltetrazolium] en la presencia de un transportador de electrones PMS (metasulfato de 5-metilfenazinium) a pH: 3.5 a formazán . En la cubeta con la muestra se mide la suma de las sustancias reductoras (1):



Para la determinación específica del L-ascorbato, en la determinación del blanco de muestra, sólo se remueve la fracción L-ascorbato como parte de todas las sustancias reductoras presentes en la muestra, oxidándola por la ascorbato oxidasa (AAO) en la presencia de oxígeno (2). El dehidroascorbato formado no reacciona con MTT/PMS.



La diferencia de absorbancia de la muestra menos la diferencia de absorbancia del blanco de muestra es equivalente a la cantidad de L-ascorbato en la muestra. El MTT formazán es el parámetro de medida y es determinado midiendo la luz absorbida en el rango visible a 578 nm.

Técnica

	Blanco muestra	Muestra
Solución 1 (llevada a 37 °C)	1 ml	1 ml
Agua bidestilada	1.5 ml	1.5 ml
Solución muestra	0.1 ml	0.1 ml
Espátula AAO	1	-
Mezclar e incubar 6' a 37 °C en oscuridad, mezclando el contenido del blanco de muestra cada 2' por ~ 5" con la espátula incorporando aire.		
Retirar la espátula de AAO y leer la absorbancia del blanco de muestra y de la muestra (A ₁) a 578 nm (Hg).		
Iniciar la reacción por adición de:		
Solución 3	0.1 ml	0.1 ml
Mezclar (con espátula o cerrando con parafilm) y llevar la solución 15' a 37 °C en oscuridad. Leer las absorbancias del blanco de muestra y de la muestra una inmediatamente después de la otra (A ₂).		

Cálculos

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco muestra}}$$

$$C_{\text{L-ascórbico g/L}} = 0.2814 \Delta A$$

Multiplicar por el factor de dilución si es necesario.

Límite de detección del método: 0.3 mg/l, correspondiente a una diferencia en absorbancia de 0.015 y un volumen máximo de muestra de 1.600 ml.

2.2.3 Determinación de azúcares

Los azúcares totales y reductores se determinaron espectrofotométricamente mediante una modificación del método de Somogyi-Nelson (Southgate, 1976). Los azúcares no reductores se calcularon como diferencia entre los azúcares totales y los azúcares reductores. Se prepararon los siguientes reactivos:

➤ **Reactivo Cuprotartárico:**

(A) 20g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 120g Na_2SO_4 anhidro → llevar a 1 L con A.D.

(B) 30g CO_3Na_2 + 15g tartrato de Na y K + 120g Na_2SO_4 anhidro: llevar a 1 L con A.D.

En el momento de usar, mezclar 1 volumen (A) + 1 volumen (B) (Agregar Na_2SO_4 sobre el agua, poco a poco, con casi todo el volumen de H_2O). Se puede guardar (A) y (B) separados.

➤ **Reactivo Arseno-molíbdoco:**

(A) Disolver 50g Molibdato de NH_4 en 900 ml de A.D. Agregar 42 ml de H_2SO_4 c.

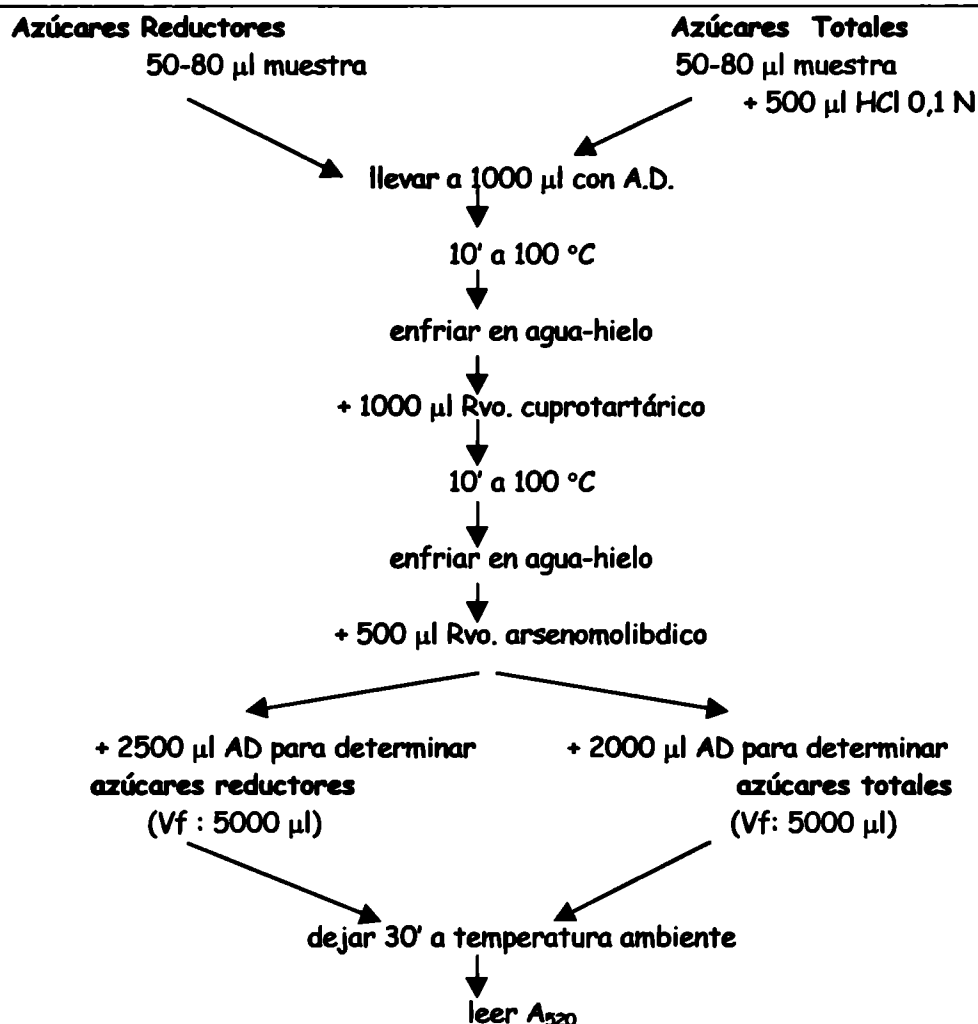
(B) Disolver 6g $\text{AsO}_4\text{HNa}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 50 ml de A.D.

Mezclar (A) y (B) y mantener a 37°C durante 24 hs. Guardar en frasco color caramelo.

Se realizó una Curva de Calibración preparando un patrón de glucosa que contenía 0.5 % P/V (5000 g/ml) y se prepararon diluciones seriadas de la misma con niveles entre 25 y 300 $\mu\text{g/ml}$ de glucosa

Junto con las muestras, se preparó un blanco de reactivos, colocando agua destilada en lugar de muestra.

Técnica



Preparación de las muestras

Manzanas: Se tomaron 2-4 manzanas de cada variedad y se homogeneizaron en procesador de tejidos. Se pesaron exactamente 10 g del puré obtenido en cada caso. Se agregaron 25 ml de etanol, se homogeneizaron nuevamente y se llevaron 10 minutos a baño de agua a 100°C; luego se filtraron por papel y llevaron a 100 ml con agua destilada.

Jugos: A 10 ml de cada tipo de jugo se agregaron 25 ml de etanol, se homogeneizaron y se llevaron 10 minutos a baño de agua a 100°C; se filtraron por papel y llevaron a 100 ml con agua destilada.

Para la determinación de azúcares se tomaron 80 µl de cada muestra preparada de la forma antes descripta.

2.2.4 Sólidos solubles, insolubles y totales

Los sólidos solubles se determinaron a 20°C por refractometría mediante un refractómetro Abbe según el método de la AOAC (1980).

Los sólidos totales se determinaron sobre alícuotas de aproximadamente 2 g del homogenato de manzanas o 2 ml de las muestras de jugos, acondicionadas en cápsulas previamente pesadas en estufa de vacío a 60°C. Se secaron hasta peso constante y por diferencia de pesada se calcularon los residuos totales.

Los sólidos insolubles se calcularon como diferencia entre los sólidos totales y los sólidos solubles.

2.3 PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Se abordaron distintas etapas en el estudio de los sistemas propuestos. En la primera etapa se analizaron los jugos de naranja, pasteurizado y fresco (a utilizar posteriormente en la formulación del producto conteniendo los cubos de manzanas) en cuanto a sus aspectos microbiológicos. Se determinaron los efectos dependientes del procedimiento de lavado de la piel de las naranjas, para el caso del jugo fresco, así como sus respectivos períodos de vida útil para las dos películas plásticas utilizadas (polietileno y ESE) para su almacenamiento refrigerado. A los resultados obtenidos se aplicaron los modelos matemáticos de Gompertz o Lineal, para evaluar los efectos de los diferentes preservadores agregados, sobre la flora microbiana predominante en los jugos analizados.

Los jugos de naranja utilizados se indican con la siguiente notación:

- Jugo de naranjas pasteurizado (P) (Cepita, Peñaflor S.A., Argentina).
- Jugo de naranjas esterilizado (E) (Baggio, Argentina)
- Jugo de naranjas fresco (N): Se obtuvo exprimiendo naranjas Valencia inmediatamente antes de su envasado. Se siguieron dos procedimientos de lavado de la piel de las naranjas:

Con agua potable: Se lavaron las naranjas con agua potable y se obtuvo el jugo mediante exprimidor.

Con hipoclorito de sodio: Se lavaron las naranjas con solución de hipoclorito de sodio 0.25 g/L (Ayhan y col., 1998) recién preparada, mediante cepillado de la superficie de la fruta, durante 60 segundos, y luego se lavaron con agua potable. Con dicha solución de hipoclorito se lavaron también el cuchillo y el exprimidor utilizados.

Por otro lado, se analizaron los sistemas formulados con cubos de manzanas, Red Delicious y Granny Smith, mantenidos en jugo de naranjas de distintos tipos (fresco, pasteurizado y esterilizado) mediante una selección preliminar por panel no entrenado. A partir de estos resultados se prosiguió el estudio sobre aquellos sistemas seleccionados y optimizados, evaluándose sus parámetros de calidad (color superficial, textura y desarrollo microbiano) y el efecto del agregado de preservadores, con el fin de establecer sus períodos de vida útil a 10°C, en ambas películas de envase utilizadas (polietileno y ESE). Dentro de los aspectos microbiológicos abordados, se realizó la identificación de los microorganismos propios del producto; a los resultados obtenidos de desarrollo de los microorganismos predominantes se aplicaron los modelos matemáticos de Gompertz y Lineal, y a las mejores condiciones obtenidas se les simuló un abuso térmico y se realizaron ensayos de inoculación de *Escherichia coli* O157:H7.

Se prepararon las muestras a base de cubos de manzanas como se indica a continuación:

● Cubos de manzanas: las manzanas de las variedades Red Delicious y Granny Smith se lavaron con agua potable, se pelaron con cuchillo previamente esterilizado con alcohol y se cortaron en rodajas sin incluir el centro, sobre una bandeja de acero previamente esterilizada de igual forma. Luego se cortaron en cubos con una cortadora metálica. Todo el procedimiento fue realizado lo más rápidamente posible con el fin de evitar el pardeamiento de la fruta durante el mismo.

● Cubos de manzanas sumergidos en jugo de naranjas: Se pesaron porciones de 30 g de cubos de manzanas de ambas variedades y se colocaron en bolsas de polietileno. Posteriormente a cada bolsa se adicionaron 30 ml de cada jugo a ensayar. La mitad de las bolsas de polietileno así preparadas fueron posteriormente envasadas en películas de baja permeabilidad al oxígeno, ESE, a la que se le practicó vacío obteniendo una presión dentro del envase de 40 mm Hg, y se realizó un cerrado térmico.

Todas las muestras se almacenaron en cámara de 10°C, durante un período máximo de 32 días.

2.4 DETERMINACION DE LOS PARAMETROS DE CALIDAD

2.4.1 Análisis sensorial

Los niveles máximos de ácido cítrico y ascórbico en los jugos formulados para ambas variedades de manzanas y las concentraciones de endulzantes (sacarosa y aspartame) fueron determinados mediante ensayos sensoriales preliminares. Quince

panelistas no entrenados evaluaron las diferentes muestras de a pares, analizando el color superficial, la textura y el aroma al abrir el envase, a 1, 4 y 7 días de almacenamiento a 10°C. Se utilizó una escala de cuatro puntos: MB= muy bueno, B= bueno, R=regular y M= malo.

Para evaluar el sabor, de los mejores tratamientos seleccionados en este ensayo preliminar, se prepararon nuevas muestras y se testeó su sabor a las 24 hs de almacenamiento. En base a los resultados obtenidos en esta etapa y que se presentarán posteriormente, se prosiguió evaluando otras posibles formulaciones, con el fin de optimizarlas.

En el caso de la variedad Red Delicious se comparó el efecto del agregado de ácido ascórbico con el del agregado de ácido eritórbito, ambos combinados con ácido cítrico, sobre la calidad del producto (manzanas en jugo de naranjas). Se prepararon soluciones equivalentes en el contenido de ambos ácidos (ascórbico o eritórbito, 30 mg/100ml), ambas con ácido cítrico (0.2 g/100 ml) y se preparó el producto de la forma antes mencionada. Además se probaron las mismas formulaciones con agregados de azúcar o edulcorante.

Para la variedad Granny Smith se evaluó el efecto del agregado de azúcar ó edulcorante sobre la optimización del sabor del producto obtenido.

En ambos casos, se analizó el sabor a las 24 hs de almacenamiento a 10°C, y a 4, 7 y 15 días de dicho almacenamiento, se evaluó su color superficial y aroma al abrir el envase, tomándose fotografías de las distintas muestras.

Los productos formulados obtenidos finalmente mediante todos los estudios de los diversos parámetros de calidad, fueron evaluados a través de panel no entrenado. Se utilizó una escala hedónica de 5 puntos: 0= me disgusta extremadamente; 2=no me gusta ni me disgusta; 4=me gusta extremadamente. El producto fue considerado inaceptable cuando se obtuvieron valores por debajo de 2 puntos.

2.4.2 Determinación intrumental de la coloración superficial

Para evaluar el grado de pardeamiento en productos vegetales se usan generalmente técnicas espectrofotométricas. Sin embargo son procedimientos destructivos y lentos respecto a la velocidad del pardeamiento enzimático en frutas y vegetales y no son aplicables para la evaluación del pardeamiento en trozos o purés (Mastrocola y Lerici, 1991). La colorimetría reflectancia triestímulo ha sido usada para seguir la extensión del pardeamiento enzimático en jugos, en superficies cortadas de

manzanas y peras, y en purés de distintas frutas, y ha sido correlacionado con la respuesta espectrofotométrica. Asimismo, los valores triestímulo han sido correlacionados con resultados visuales con el fin de investigar su relación con la evaluación subjetiva y, en varios experimentos se ha encontrado una elevada correlación.

Mastrocola y Letici (1991) encontraron que el parámetro L^* , en puré de manzana, disminuye al incrementarse el pardeamiento enzimático y no-enzimático, mientras que el parámetro a^* aumenta. El parámetro b^* tiene un comportamiento peculiar. Las curvas de las tres coordenadas de color en todas las muestras evaluadas tienden a un valor constante luego que el pardeamiento se ha completado. En una evaluación subjetiva y no-estadística, la variación de L^* y a^* fue mejor correlacionada respecto a b^* con los cambios visuales (oscurecimiento) de color del puré durante el pardeamiento.

Las mediciones colorimétricas de las manzanas cortadas se llevaron a cabo con un colorímetro triestímulo Minolta CR-300 (Minolta CR-300, Minolta Corp., Ramsey, New Jersey, USA). Es un analizador compacto triestímulo del color reflejado por superficies, el cual consta del respectivo cabezal de medida y un procesador de datos DP-301. El cabezal de medida tiene un área de medición de 8 mm de diámetro y usa iluminación difusa y un ángulo de inspección de 0° (incluido el componente especular) para medidas adecuadas de una amplia variedad de objetos. Una lámpara de arcos de xenon pulsada en la cámara de mezclado provee la iluminación sobre la superficie de la muestra. Seis fotocélulas siliconadas de alta sensibilidad, filtradas para su adaptación a la respuesta del observador estándar CIE (Commission Internationale de l'Eclairage), son usadas por el sistema de medida doble-haz retroalimentado para medir la luz incidente y la reflejada. El medidor detecta así cualquier pequeña desviación en el rendimiento de la luz por la lámpara de arcos de xenon pulsada, y la compensa automáticamente.

Pueden obtenerse medidas absolutas como Y_{xy} (CIE 1931), $L^*a^*b^*$ (CIE 1976), $L^*C^*H^*$, Hunter Lab, o los valores triestímulos XYZ; así como las diferencias de color, como valores $\Delta(Y_{xy})$, $\Delta(L^*a^*b^*)/\Delta E^*_{ab}$, $\Delta(L^*C^*H^*)/\Delta E^*_{ab}$, o Hunter $\Delta(Lab)/\Delta E$. Los datos pueden ser convertidos entre sistemas de color o entre medidas absolutas y diferencias por el procesador de datos, y cada medición puede ser impresa en todos los espacios de color si se desea. Para las medidas pueden usarse tanto el iluminante CIE C o D_{65} .

El color es descripto a través de la luminosidad L^* y la cromaticidad por los

parámetros a^* y b^* . El parámetro L^* varía desde 100 para un blanco perfecto y 0 para el negro, a^* representa rojo cuando es positivo, y verde cuando es negativo, y b^* representa amarillo cuando es positivo y azul cuando es negativo.

Las determinaciones del color superficial de las diferentes muestras fueron realizadas durante almacenamiento refrigerado a 10°C de los distintos productos, sobre 16 cubos de manzanas sin piel de 1.5 cm de lado. El color inicial fue medido sobre cubos de manzanas de ambas variedades, mantenidas en los correspondientes jugos durante 2 hs a 10°C. También se midió el color de cubos de manzanas sin tratar (sin jugo) sobre 10 cubos de manzanas de 1.5 - 2 cm de lado, por lo menos sobre dos lados.

2.4.3 Determinación de textura

Las propiedades de textura de los alimentos está influenciada por su estructura interna. No se ha descrito totalmente la relación entre las propiedades viscoelásticas y la estructura celular en vegetales. Las microfibrillas celulósicas conforman la pared celular y los espacios intercelulares están ocupados por distintos materiales, como pectinas, hemicelulosa, lignina, etc. de acuerdo al tipo de tejido.

Las determinaciones de textura se basan en medir la resistencia que opone el alimento a las fuerzas de deformación que se le aplican.

La resistencia a la compresión de las manzanas fue determinada a 25°C con una Prensa INSTRON Modelo 1011 (Instron Corp., Canton, M. A.) usando una celda de compresión de 50 kg (500 N), velocidad de descenso de 10 mm/min, con un 35% de compresión.

Se realizaron las determinaciones correspondientes a distintos tiempos de almacenamiento para los distintos tipos de tratamientos elegidos para ambas variedades de manzanas. A cada tiempo de almacenamiento se midió la fuerza máxima de compresión (F) de las muestras, por cuadruplicado, sobre cilindros de manzanas sin piel de 1.5 cm de diámetro y 2 cm de altura. Se determinó el Ablandamiento relativo del producto tratado y envasado en las diferentes películas analizadas durante el almacenamiento refrigerado respecto a las muestras sin tratar (cuatro cilindros recién cortados de cada manzana) de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Ablandamiento relativo} = (F_2 - F_1) / F_1 \quad (1)$$

donde: F_2 = fuerza máxima de compresión de las manzanas tratadas medidas a distintos tiempos (Newtons), F_1 = fuerza máxima de compresión del producto inicial (Newtons).

● Observación del tejido de las manzanas mediante Microscopía Electrónica Ambiental de Barrido (ESEM)

Para evaluar el efecto del procesamiento sobre la estructura del tejido de los cubos de manzanas, se observaron a diferentes tiempos de almacenamiento, cubos de las distintas condiciones analizadas, mediante Microscopía Electrónica Ambiental de Barrido (ESEM) (Philips 2010). Esta técnica requiere condiciones de alto vacío en la columna de electrones, donde se utilizan altos voltajes para generar y acelerar el haz de electrones. El alto vacío es también necesario a través de la columna, donde las moléculas de gas pueden dispersar los electrones y degradar el haz. La columna permanece en alto vacío mientras la celda puede mantener presiones tan altas como 50 Torr. ESEM ofrece imágenes electrónicas secundarias de alta resolución en un ambiente gaseoso de prácticamente cualquier composición en un amplio rango de presiones y temperaturas. ESEM tiene ventajas significativas en el caso de muestras biológicas: la ionización del gas en la celda de la muestra elimina los artefactos típicamente observados en muestras no conductoras; ESEM puede ver muestras húmedas y purificadas de gases; los contaminantes no dañan el instrumento ni degradan la calidad de imagen; ESEM elimina la necesidad de cubiertas conductoras y la mayoría de otras preparaciones de muestra. Este método está especialmente diseñado para observar muestras que deben permanecer hidratadas con el fin de mantener su estructura. Las claves de la técnica ESEM son: el ambiente de vacío de la columna de electrones está separado del ambiente de la celda de la muestra; se usa un detector de electrones secundario; trabaja en el ambiente de no-vacío de la muestra. Electrones secundarios brindan imágenes de la más alta resolución. El detector secundario ambiental utiliza la ionización del gas para amplificar la señal electrónica secundaria.

Para la observación del tejido, se tomaron a distintos tiempos de almacenamiento de los productos, cubos de manzanas de las dos variedades analizadas, se cortaron finos trozos de tejido y se observaron las superficies expuestas a los diferentes jugos de naranja utilizados, al microscopio electrónico.

2.4.4 Estudios microbiológicos

2.4.4.1 Recuentos microbianos

Se realizaron recuentos microbianos sobre i) el jugo pasteurizado y el jugo fresco con distintos procedimientos de lavado de las naranjas y diferentes preservadores y endulzantes agregados al mismo, ii) sobre los cubos de manzanas, iii) sobre los cubos de manzanas mantenidas en las distintas formulaciones de jugos, para los dos tipos de películas de envase utilizadas durante el almacenadas a 10°C.

A diferentes tiempos de almacenamiento se tomaron 20 g de muestra (jugo, cubos de manzanas o cubos de manzanas con jugo), por duplicado y se homogeneizaron con 80 ml de peptona 0.1% en Stomacher durante 60 segundos. Se realizaron diluciones seriadas de las diferentes muestras en peptona 0.1% y se sembraron placas de los siguientes medios, en profundidad:

- **Plate Count Agar (PCA, Oxoid):** para recuento de microorganismos totales o psicrótrofos:

peptona de caseína	5 g/l
extracto de levadura	2.5 g/l
glucosa	1 g/l
agar	14 g/l
pH=	7.0 ± 0.2

Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Incubación a 30°C durante 48 hs para recuento de microorganismos totales y a 4°C durante 7 días para recuento de microorganismos psicrótrofos. Los resultados fueron expresados como UFC/g ó UFC/ml según correspondiera.

- **Agar Cloranfenicol, Extracto de levadura, Glucosa (YGC):** para recuento de hongos y levaduras:

extracto de levadura	5 g/l
glucosa	20 g/l
cloranfenicol	0.1 g/l
agar	14.9 g/l

Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Incubación a 25-30°C durante 5 días. Los resultados fueron expresados como UFC/g ó UFC/ml según correspondiera.

- **Agar Suero de Naranja (OSA, Difco) (Parish, 1998):** para recuento de microorganismos de deterioro, ácido-tolerantes, en jugos de frutas, simples o concentrados, especialmente de frutas cítricas:

peptona de caseína	10.0 g/l
extracto de levadura	3.0 g/l
extracto de naranja	5.0 g/l
D(+)-glucosa	4.0 g/l
hidrogenofosfato dipotásico	3.0 g/l
agar	17.0 g/l
pH=	5.5 ± 0.1

Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Incubación a 25-30°C durante 3 ó hasta 5 días si se

sospecha la presencia de hongos.

- **Agar de Man Rogosa and Sharpe (M.R.S) (Oxoid):** para recuento de *Lactobacillus* sp.:

peptona universal	10 g/l
extracto de carne	5 g/l
extracto de levadura	5 g/l
D (+) glucosa	20 g/l
K ₂ HPO ₄	2 g/l
Tween 80	1 g/l
citrato ácido de amonio	2 g/l
acetato de sodio	5 g/l
MgSO ₄	0.1 g/l
MnSO ₄	0.05 g/l
agar	12 g/l
pH =	6.5 ± 0.1

Se sembró 1 ml en profundidad. La incubación se realizó a 30°C, durante 48 hs en jarra para anaerobiosis.

- **Agar Bilis Rojo Violeta Glucosa (ABRV) :** para recuento de *Enterobacteriaceae*:

peptona de carne	7 g/l
extracto de levadura	3 g/l
ClNa	5 g/l
D-(+)-Glucosa	10 g/l
sales biliares	1.5 g/l
rojo neutro	0.03 g/l
crystal violeta	0.002 g/l
agar	13 g/l
pH =	7.3 ± 0.1

Se esteriliza a vapor fluente (B.M) media hora. Se sembró 1 ml en profundidad. La incubación se realizó a 37°C, durante 24 hs.

2.4.4.2 Calidad sanitaria

La calidad sanitaria del producto final se determinó por:

● **Recuento de Coliformes Totales:** se realizó siguiendo la técnica del Número Más Probable (NMP). Este recuento está basado en la distribución de Poisson que se practica en muestras con baja concentración. Se han elaborado tablas para series de 3 y 5 tubos con los correspondientes límites de confianza de 95%. El medio de cultivo usado fue Caldo MacConkey (Merck) con campanita de Durham para visualizar la producción de gas. Se sembraron las tres primeras diluciones de cada muestra analizada, colocando 10 ml de la primera y 1 ml de las siguientes, por triplicado. La incubación se realizó a 37°C durante 24 hs. Se consideran positivos los tubos que presentaron crecimiento y formación de gas.

- Caldo MacConkey (Merck):

peptona de caseína	20.0 g/l
lactosa	10.0 g/l
bilis de buey, desecada	5.0 g/l
púrpura de bromocresol	0.01 g/l
pH= 7.1 ± 0.1	

Se distribuye en tubos, se colocan sendas campanitas de Durham y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

En los casos donde se encontraron tubos positivos, se procedió al recuento de los coliformes fecales de la siguiente manera:

● Recuento de Coliformes Fecales: se realizó por la técnica del NMP, empleando como medio de cultivo el Caldo EC con campanita de Durham. Se sembraron los tubos positivos del recuento de Coliformes Totales, pasando 0,1 ml de los mismos a respectivos tubos de caldo EC. Se incubaron a 44.5°C durante 24 hs. Se consideraron positivos los tubos que presentaron crecimiento y formación de gas.

- Caldo EC:

Triptosa	20 g/l
Lactosa	5 g/l
Sales biliares	1.3 g/l
Fosfato dipotásico	4 g/l
Fosfato monopotásico	1.5 g/l
Cloruro sódico	5 g/l
pH: 6.9	

Se distribuye en tubos, se colocan sendas campanitas de Durham y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

En caso de obtener resultados positivos para el recuento de Coliformes Fecales, se debe proseguir con la identificación de *Escherichia coli*.

● Identificación de *Escherichia coli*: los tubos positivos obtenidos del recuento de Coliformes Fecales se repicaron con ansa en sendas placas de Petri con agar EMB como medio de cultivo selectivo para *Escherichia coli*.

- Agar EMB (eosina-azul de metileno-lactosa):

Peptona	10 g/l
Hidrogenofosfato dipotásico	2 g/l
Lactosa	10 g/l
Eosina amarillenta	0.4 g/l

Azul de metileno	0.065 g/l
Agar	13.5 g/l
pH: 7	

Se incubó durante 24-48 hs a 37°C, y se observó la aparición de colonias típicas de *Escherichia coli*: verdes con brillo metálico.

Luego, sobre dichas colonias se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: IMViC (Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer, Citrato) (AOAC, 1984):

- **Prueba del Indol:** se inocularon tubos con caldo triptona o agua peptonada, a partir de cultivos puros y se incubaron a 37°C por 24-48 hs. Se añadió a cada tubo 0.2-0.3 ml del Reactivo de Kovacs o Erlich y luego de unos minutos se realizó la lectura.

Indol (+): anillo rosado en superficie

Indol (-): no hay cambio de color

- **Reactivo de Kovacs:**

p-dimetilaminobenzaldehído	5 g
alcohol amílico	75 ml
HCl (conc)	25 ml

El reactivo debe ser color amarillo.

- **Prueba del Rojo de Metilo:** se inocularon tubos de caldo glucosa tamponada a partir de cultivos puros y se incubaron a 35-37°C por 24-48 hs. Se añadieron 5 gotas de la solución acuosa de Rojo de metilo al 0.04 % y se agitó.

Rojo de Metilo (+): coloración roja, indica fermentación de la glucosa con acidificación del medio

Rojo de Metilo (-): coloración amarilla

- **Prueba de Voges-Proskauer:** se inocularon tubos con caldo glucosado tamponado a partir de cultivos puros y se incubaron a 35-37°C por 24-48 hs. Se añadieron 0.6 ml de solución de α -naftol al 6% en ETOH 60° y 0.2 ml de KOH, se agitó y se dejó reposar no menos de 10 min. Luego se observaron.

Voges-Proskauer (+): disco rosado en superficie

Voges-Proskauer (-): no se observa disco rosado en superficie

- **Prueba del Citrato:** se inoculó un tubo con agar Citrato de Simmons usando un ansa recta. Se incubó a 35-37°C por 24-48 hs.

Citrato (+): viraje del medio al azul

Citrato (-): medio verde (color original)

- Agar Citrato de Simmons:

sulfato de magnesio	0.2 g/l
fosfato monoamónico	1 g/l
fosfato bipotásico	1 g/l
citrato sódico	2 g/l
cloruro sódico	5 g/l
azul de bromotimol	0.08 g/l
agar	15 g/l
pH: 6.9	

● Recuento de microorganismos sulfito reductores: se realizó según la técnica NMP sembrando 1 ml del homogenato en series de 3 tubos de agar sulfito polimixina sulfadiacina (Merck). La incubación se realizó a 37°C durante 24-48 hs en forma anaeróbica.

- Agar sulfito polimixina sulfadiacina (Merck)

peptona de caseína	15 g/l
extracto de levadura	10 g/l
hierro (III) citrato	0.5 g/l
sulfito de sodio	0.5 g/l
polimixina-B-sulfato	0.01 g/l
sulfadiacina sódica	0.12 g/l
agar	13.9 g/l
pH: 7.0 ± 0.1	

Se esteriliza en autoclave 15' a 121°C.

● Determinación de la Calidad Sanitaria mediante el método de recuento en placas de Petrifilm™ (3M™)

Otro método aplicado para evaluar la calidad sanitaria de los productos analizados fue el empleo de las placas Petrifilm™ (3M™) para recuento de *Enterobacteriaceae* y de *Escherichia coli*. En cada placa Petrifilm se sembró 1 ml de la dilución correspondiente a cada muestra preparada para realizar los recuentos microbianos antes descriptos, e incubadas a 37°C durante 24 hs.

El análisis de las colonias obtenidas en cada caso se realizó según las Guía de Interpretación correspondiente a cada tipo de placa Petrifilm provista con las mismas.

En el caso del recuento de *Enterobacteriaceae*, las placas poseen un indicador rojo que colorea todas las colonias, y el film superior atrapa el gas si es producido por las bacterias. Las bacterias productoras de ácido aparecen como colonias rojas

rodeadas por una zona amarilla asociada a la producción de ácido que es detectado por el indicador de pH del medio. Las colonias de *Enterobacteriaceae* pueden producir colonias rojas asociadas a burbujas de gas, colonias rojas asociadas a zonas ácidas, o colonias rojas asociadas a una zona ácida y a burbujas de gas.

Escherichia coli produce glucuronidasa, la cual reacciona con un indicador en la placa de recuento y se produce una precipitación azul alrededor de la colonia. La mayoría de las cepas de *E. coli* producen gas, el cual es atrapado por la película superior. Los coliformes diferentes a *E. coli* forman colonias de color rojo asociadas a burbujas de gas, y las colonias no-coliformes son de color rojo pero no están asociadas a burbujas de gas.

2.4.4.3 Identificación de la flora microbiana

Flora microbiana natural de manzanas

Para evaluar en forma preliminar los tipos de microorganismos predominantes en las manzanas, se lavó con agua potable una manzana Red Delicious y se quitó la piel con cuchillo esterilizado con alcohol. Se tomaron 20 g de muestra, por duplicado y se homogeneizaron con 80 ml de peptona 0.1% durante 60 segundos en Stomacher. Se realizaron diluciones seriadas en peptona 0.1% y se sembraron placas de PCA, YGC, MRS y ABRV. Además se determinó la calidad sanitaria de la forma antes descrita.

Flora microbiana del producto

Con la finalidad de determinar la flora microbiana que predomina en las manzanas mantenidas en jugo fresco de naranjas al final del almacenamiento, se prepararon dos muestras de cada variedad, se envasaron en polietileno y se almacenaron en cámara de 20°C durante 5 días (condiciones de almacenamiento acelerado). A dicho tiempo, se tomaron 20 g de muestra (manzana y jugo) y se homogeneizaron con 80 ml de peptona 0.1% durante 60 segundos en Stomacher. Se realizaron diluciones seriadas en peptona 0.1% y se sembraron placas de los distintos medios de cultivo antes mencionados (PCA, YGC, MRS, ABRV).

2.4.4.3.1 Identificación de bacterias

De las placas de PCA realizadas para recuentos microbianos del producto formulado con cubos de manzanas y jugo fresco de naranjas con los preservadores

seleccionados oportunamente, se tomaron con ansa en anillo las colonias aisladas de distinta forma, color y aspecto, y se realizaron coloraciones de Gram. Luego se inocularon placas de PCA mediante el método de aislamiento por agotamiento. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 hs.

De los tubos positivos realizados para determinar la calidad sanitaria mediante el método del NMP, se inocularon placas de ABRV por agotamiento en superficie para obtener colonias aisladas de Enterobacterias. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 hs.

- Coloración de Gram:

Reactivos:

Cristal violeta	10 g/l en agua destilada
Safranina (Solución madre)	25 g/l en etanol
Safranina (Solución de trabajo)	Sol. madre diluída 1:10
Lugol	10gI ₂ + 20gKI en 1l A.D.
Decolorante	etanol:acetona (4:1)

Las soluciones se filtran antes de utilizarlas.

Técnica:

Realizar un extendido fijado por calor de la colonia aislada y seguir el siguiente protocolo:

	Tiempo de exposición
Cristal violeta	120 seg.
Lugol	30 seg.
Lugol	30 seg.
Lavar con agua	
Decolorante	10 seg.
Lavar con agua	
Safranina	120 seg.

Observar por inmersión a 1000X.

- Agar Bilis Rojo Violeta Glucosa (ABRV): para recuento de Enterobacteriaceae:

peptona de carne	7 g/l
extracto de levadura	3 g/l
CINa	5 g/l
D(+)-Glucosa	10 g/l
sales biliares	1.5 g/l
rojo neutro	0.03 g/l
cristal violeta	0.002 g/l
agar	13 g/l
pH= 7.3 ± 0.1	

Sobre los cultivos puros obtenidos de las distintas cepas, se realizaron las siguientes pruebas:

- **Coloración de Gram** para determinar su comportamiento positivo o negativo frente a la misma, morfología y agrupación característica.
- **Presencia de enzima oxidasa** poniéndola en evidencia mediante tiras reactivas.
- **Identificación de Enterobacterias y otras bacterias Gram (-), oxidasa (-)** mediante placa de microtitulación EM-Ident E (Merck) que consiste en 21 reacciones bioquímicas, las cuales se evalúan e interpretan después de incubar durante 24-48 hs a 35-37°C. La evaluación manual se hace determinando un código numérico de siete dígitos, el cual se busca en el correspondiente libro de códigos de referencia EM-Ident E.

Pruebas bioquímicas de la placa de microtitulación EM-Ident E:

Triptofano desaminasa	Voges-Proskauer
Acido sulfhídrico	Ramnosa
Esculina	Sacarosa
Indol	Adonitol
Urea	Inositol
Lisina descarboxilasa	Xilosa
Ornitina descarboxilasa	Sorbitol
Arginina dehidrolasa	ONPG (o-nitrofenil β-galactósido)
Glucosa	ONPX (o-nitrofenil-xilopiranosido)
Citrato	PGUR (p-nitrofenil β-glucurónido)
Malonato	

2.4.4.3.2 Identificación de levaduras y hongos

De las placas de YGC realizadas para recuentos microbianos del producto formulado con cubos de manzanas y jugo fresco de naranjas con los preservadores seleccionados oportunamente, se tomaron con ansa en anillo las colonias aisladas de distinta forma, color y aspecto, y se realizaron coloraciones de Gram y Azul de metileno. Luego se inocularon en placas de YGC mediante el método de aislamiento por agotamiento. Las placas se incubaron a 30°C durante 5 días.

- Coloración de Azul de Metileno:

Reactivos: Azul de metileno en alcohol

Técnica: Realizar un extendido fijado por calor de la colonia aislada y colorear durante 3'. Lavar con agua y secar. Observar por inmersión.

2.4.4.3.2.1 Levaduras: Para la identificación de las levaduras aisladas de la forma antes descripta, se realizaron los siguientes estudios:

- **Crecimiento en medio sólido:** para la observación de las características macroscópicas de las colonias. Se inocularon cultivos jóvenes de las cepas aisladas a estudiar en placas de YGC y Sabouroud por agotamiento con ansa, se incubaron a 30°C durante 7-10 días y luego se observó la textura, el color, borde y forma de las colonias aisladas.

Agar Sabouroud 2% Glucosa:

peptona	10 g/l
D(+) G lucosa	20 g/l
agar	17 g/l
pH: 5.6 ± 0.1	

Autoclavar 15' a 121°C.

- **Crecimiento en medio líquido:** para la observación de las características morfológicas. Se inocularon cultivos jóvenes de las cepas aisladas a estudiar en tubos con caldo Sabouroud y se incubaron entre 2-3 días a 30°C. Luego se examinaron al microscopio los cultivos, teñidos con Azul de metileno, en cuanto a forma, tamaño y disposición de las células.

Caldo Sabouroud 2% Glucosa:

peptona	10 g/l
D(+) G lucosa	20 g/l
A.D.	csp 1l
pH: 5.6 ± 0.1	

Autoclavar 15' a 121°C.

- **Crecimiento a 37°C:** Se sembró cada una de las cepas aisladas a estudiar en dos tubos de agar Sabuoroud, de los cuales uno se incubó a 30°C (control) y el otro a 37°C. Se observaron hasta que hubo desarrollo en el tubo control. Se considera resultado positivo cuando se observa igual o mayor desarrollo a 37°C que a 30°C.
- **Fermentación de compuestos carbonados:** se basa en la propiedad que tienen ciertas levaduras de utilizar azúcares en anaerobiosis. Para realizar esta prueba, se inocularon tubos con el medio de fermentación y el azúcar a determinar, se inocularon a 30°C y se observó a los 3, 5 y 15 días la acumulación de CO₂ en la campana de Durham (resultado (+): presencia de gas en la campana)

- **Medio base para la fermentación de azúcares**

extracto de levadura	4.5 g/l
peptona	7.5 g/l

Fraccionado en tubos con campana de Durham y esterilizado en autoclave 15 minutos a 120°C. En el momento de usar se agregó 1 ml de la solución del azúcar a ensayar (Glucosa, Galactosa, Sacarosa, Maltosa y Lactosa) al 6%, esterilizada por filtración.

- **Asimilación de compuestos carbonados:** se determina la capacidad que tienen las levaduras de utilizar oxidativamente (asimilar) determinados compuestos carbonados. Se realiza una prueba de difusión en placa en un medio base sobre el cual se colocan discos de papel impregnados con soluciones de distintas fuentes de carbono. La asimilación es positiva cuando se observa un halo de desarrollo alrededor del disco.

- **Medio base para la asimilación de compuestos carbonados**

sulfato de amonio	5 g/l
sulfato monopotásico	1 g/l
sulfato de magnesio.7H ₂ O	0.5 g/l
agar	20 g/l

- **Asimilación de compuestos nitrogenados:** se determina la capacidad que tienen las levaduras de asimilar diversas fuentes de nitrógeno. Se realiza una prueba de difusión en placa en un medio base sobre el cual se colocan discos de papel impregnados con soluciones de distintas fuentes de nitrógeno. Se considera positiva cuando se observa un halo de desarrollo alrededor del disco.

- **Medio base para la asimilación de compuestos nitrogenados**

glucosa	20 g/l
sulfato monopotásico	1 g/l
sulfato de magnesio.7H ₂ O	0.5 g/l
agar	20 g/l

- **Crecimiento en medio libre de vitaminas:** se basa en la habilidad que tienen las levaduras para crecer en un medio mínimo desprovisto de vitaminas. Se inocula un tubo que contenga medio Vitamin-free yeast base Difco, se incuba a 25-30°C durante 7 días y se observa: si no hubo desarrollo se considera negativo, si hay crecimiento debe confirmarse transfiriendo una ansada a un nuevo tubo con medio libre de vitaminas y procediendo de la forma indicada anteriormente.

- **Discos impregnados con fuente de carbono y nitrógeno:** Se marcan los discos de papel de filtro de 9 mm de diámetro (Scheicher & Schull GmbH N° 2668) con una letra que identifique la fuente de carbono o nitrógeno con la que se va a impregnar. Se colocan en una placa de Petri todos los discos a ser impregnados con la misma fuente y se esterilizan en autoclave a 120°C durante 15 minutos. Se secan en estufa a 37°C. Se preparan las soluciones y se esterilizan por filtración.

Nitrato de potasio	3 %	Inositol	20 %
Peptona	3 %	Xilosa	20 %
Glucosa	20 %	Trehalosa	20 %
Galactosa	20 %	Eritritol	20 %
Sacarosa	20 %	L-Sorbosa	20 %
Maltosa	20 %	L-Arabinosa	20%
Lactosa	20 %	Rafinosa	40 %
Melibiosa	20 %	Melezitosa	40 %
Acido cítrico	20 %	Celobiosa	20 %
(pH = 5.6)			
Almidón	20 %		

Se deben usar drogas de alta pureza que no contengan trazas de otras fuentes de C/N. Se cargan los discos en forma estéril con 0.06 ml de la solución correspondiente y se dejan secar en placa de Petri a 37°C. Se guardan en tubos estériles con silicagel a 4°C.

Se determinaron género y especie de las levaduras aisladas de acuerdo a las claves de identificación propuestas por el Departamento de Micología del Instituto de Microbiología Dr. Carlos Malbrán, basado en los criterios descriptos por Kreger-Van Rij (1984).

2.4.4.3.2 Hongos filamentosos: Para la identificación de los hongos filamentosos aislados se realizaron los siguientes estudios:

➤ **Crecimiento en medio sólido:** para la observación de las características macroscópicas de las colonias. Se inocularon cultivos jóvenes de las cepas a estudiar en placas de YGC por agotamiento con ansa, se incubaron a 30°C durante 7-10 días y luego se observó la textura, el color, borde y forma de las colonias aisladas. Luego se repicaron las colonias aisladas, con ansa recta a tubos en pico de flauta con agar Sabouroud, y se incubaron a 30°C durante 7 días, con el mismo objetivo.

- **Crecimiento en medio líquido:** para la observación de las características morfológicas. Se inocularon cultivos jóvenes de las cepas a estudiar en tubos con caldo Sabourud y se incubaron entre 2-3 días a 30°C. Luego se examinaron al microscopio los cultivos, teñidos con Azul de metileno, en cuanto a forma, tamaño y disposición de las células.

- **Crecimiento a 37°C:** Se sembró cada una de las cepas a estudiar en dos tubos de agar Sabuoroud, de los cuales uno se incubó a 30°C (control) y el otro a 37°C. Se observaron hasta que hubo desarrollo en el tubo control. Se considera resultado positivo cuando se observa igual o mayor desarrollo a 37°C que a 30°C.

2.4.4.4 Observaciones microscópicas

🔍 **Microscopio Optico:** Se observaron extendidos de las colonias aisladas, fijados por calor sobre portaobjetos, mediante inmersión.

🔍 **Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM) (Philips 2010):**

Las colonias obtenidas de placa YGC fueron observadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM) (Philips 2010). Una fina porción de agar YGC (5 mm) conteniendo la colonia aislada en su superficie fue cortada y procesada por ESEM (Presión en la cámara de muestra: 9.68 torr; Temperatura: 5.0°C).

Mediante esta técnica los microorganismos pueden ser observados evitando distorsiones, sin fijación y deshidratación de las muestras.

2.4.4.5 Modelado matemático del desarrollo microbiano

Una curva de crecimiento microbiano general incluye una fase de latencia (lag), una fase exponencial y una fase estacionaria, que pueden ser modeladas tanto por regresión lineal como no lineal.

La necesidad de asegurar la calidad microbiológica de los productos alimenticios ha estimulado el interés en el uso de modelos matemáticos para cuantificar y predecir el comportamiento microbiano. La microbiología predictiva es una poderosa herramienta para determinar la vida útil de alimentos; se basa en el desarrollo de modelos matemáticos que describen la influencia de factores de control predominantes (como son temperatura, pH, actividad acuosa, atmósfera gaseosa y preservadores) sobre la fase de latencia (lag) y velocidad de crecimiento de microorganismos patógenos y de

deterioro. Estas predicciones, sin embargo, pueden hacerse sólo a través de interpolación entre el rango de factores examinados (Ross y McMeekin, 1991).

Uno de los modelos recomendados (Gibson y col., 1988) es la ecuación modificada de Gompertz, cuya expresión es:

$$\log N = a + c \exp(-\exp(-b(t-m))) \quad (1)$$

donde $\log N$ es el logaritmo decimal del recuento microbiano [$\log(\text{UFC/ml})$] a tiempo t , a es el logaritmo del recuento asintótico cuando el tiempo disminuye indefinidamente (aproximadamente equivalente al log del nivel inicial de bacterias) [$\log(\text{UFC/ml})$], c es el incremento del log del recuento cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, o sea el número de ciclos logarítmicos de crecimiento [$\log(\text{UFC/ml})$], m = tiempo requerido para alcanzar la velocidad de crecimiento máxima [días], b = velocidad relativa de crecimiento a tiempo m [1/días].

De estos parámetros derivan la velocidad de crecimiento exponencial ($\mu = b.c/e$) [$\log(\text{UFC/ml})/\text{día}$], con $e = 2.7182$), duración de la fase de latencia ($\text{LPD} = m - (1/b)$ [días]) y la máxima densidad de población ($\text{MPD} = \log N_0 + c$ [$\log(\text{UFC/ml})$]). En la Figura 2.3 se presentan los parámetros asociados a la ecuación de Gompertz.

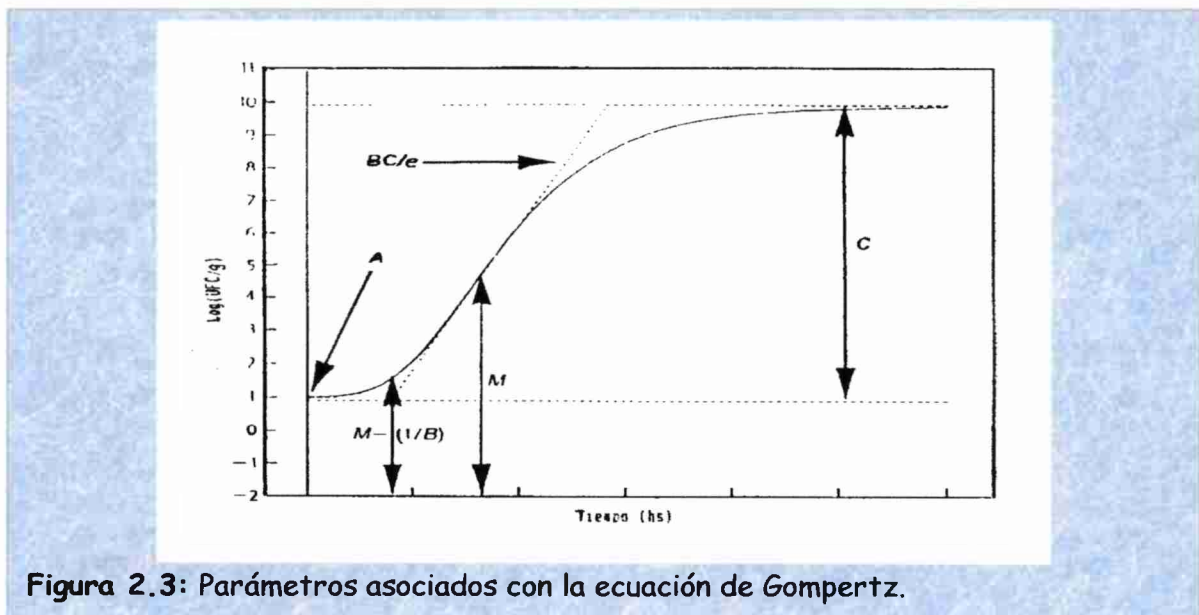


Figura 2.3: Parámetros asociados con la ecuación de Gompertz.

La ecuación de Gompertz fue aplicada a todos los cultivos en que se detectó crecimiento microbiano. La ecuación fue ajustada a los datos de crecimiento usando el módulo de regresión no lineal del programa Systat (Systat, Evanston, IL, USA). El

algoritmo elegido calcula el conjunto de parámetros con el menor residuo de suma de cuadrados (RSS) y un 95% de intervalo de confianza para el crecimiento microbiano.

Cuando los preservadores produjeron efecto bacteriostático o bactericida, se aplicó un modelo lineal:

$$\log N = \log N_0 + R (t - \text{LPD}) \quad t < t_i \quad (2)$$

donde N: es el número de microorganismos (UFC/ml), N_0 : es el número inicial de microorganismos (UFC/ml), R: es la velocidad de decaimiento ($\log(\text{UFC/ml})/\text{día}$), que adopta valores negativos cuando el efecto es bactericida, LPD: es el tiempo de latencia (días) y t_i : es el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria (días).

2.4.4.6 Índice de Inhibición

Con el fin de analizar la acción inhibitoria de los preservadores químicos aplicados al producto, sobre los microorganismos predominantes, se definió un Índice de Inhibición (II) según la expresión:

$$\text{II} = 1 - (\log(N/N_0)_{\text{tratado}} / \log(N/N_0)_{\text{control}}) \quad (3)$$

donde N= número de microorganismos a tiempo t y N_0 = nivel inicial de microorganismos. Los valores de $\log(N/N_0)_{\text{tratado}}$ y $\log(N/N_0)_{\text{control}}$ fueron evaluados al tiempo en que el control alcanza la fase estacionaria. Debe destacarse que, si el Índice de Inhibición es igual a 1, entonces los microorganismos en las muestras tratadas permanecen en fase lag ($N = N_0$); cuando el II es mayor a 1, ocurre una acción bactericida y el $\log(N/N_0)_{\text{tratado}}$ tiene un valor negativo mientras, $\text{II} = 0$, indica un crecimiento microbiano similar al de la muestra control. Aun más, valores de II entre 0 y 1 reflejan un crecimiento microbiano definido a una velocidad menor respecto a la del control debido a la acción del preservador. Los Índices de Inhibición fueron calculados para cada condición ensayada.

2.4.4.7 Determinación de la composición de la atmósfera gaseosa en el interior del envase mediante cromatografía gaseosa

Se tomaron con jeringa Hamilton 500 μl de gas de la atmósfera interna de las muestras y se inyectaron en un Cromatógrafo de gases Shimadzu GC6A (Shimadzu,

Tokio, Japon) equipado con una columna CTR 1 (Alltech, Deerfield, IL), usando He como carrier.

Se realizaron también inyecciones de distintos volúmenes de patrones de CO_2 y de O_2 puros (300, 400 y 500 μ l) con el fin de construir las curvas de calibración correspondientes a cada gas.

El porcentaje de CO_2 y de O_2 en las muestras se calculó a partir de las áreas correspondientes a cada pico, comparándolas con las áreas obtenidas para los patrones de cada gas puro.

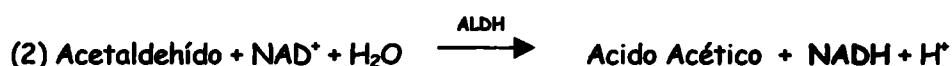
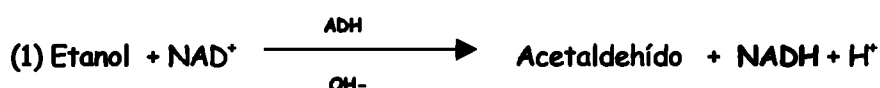
2.4.4.8 Determinación del contenido de vitamina C durante el almacenamiento

Con el objeto de evaluar la estabilidad de la vitamina C propia del producto y agregada al mismo (en el caso de la variedad Red Delicious) se determinó el contenido de ácido L-ascórbico de los productos seleccionados por sus mejores características de calidad, durante el almacenamiento refrigerado en ambas películas de envase mediante el método enzimático-colorimétrico, dado que resultó de fácil aplicación y debido a que el contenido de esta vitamina en los sistemas fue muy superior al límite de detección de este método (ver sección 2.2.2.2).

2.4.4.9 Determinación de Etanol por método enzimático-UV durante el almacenamiento

Sobre manzanas sumergidas en jugo fresco de naranjas, envasadas en Polietileno y ESE, y almacenadas durante 20 días a $10^\circ C$, con signos evidentes de fermentación (hinchamiento del envase), se realizaron determinaciones de Etanol por método enzimático-UV.

El método se basa en las siguientes reacciones:



El NADH producido se determina por su absorbancia a 340 nm.

Técnica

	Blanco	Muestra
Solución 2	3 ml	3 ml
Agua bidestilada	0.1 ml	-

Muestra	-	0.1 ml
Solución 3	Mezclar y esperar 3' - Leer la A ₁ 0.05 ml Mezclar y esperar 5' - Leer la A ₂	0.05 ml

Cálculos

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco}}$$

$$C \text{ (gETOH/lmuestra)} = 0.7256 \cdot A \cdot f_{\text{dilución}} / 6.3$$

Preparación de las muestras

Se tomó el jugo de las bolsas que presentaron hinchamiento y se ajustó su pH a 8-9 con NaOH. Se centrifugaron a 12000 rpm 4' y se diluyeron 1:1000 con A.D.

2.4.4.10 Abuso térmico

A los productos formulados con cubos de manzanas de ambas variedades con jugo de naranjas natural y los correspondientes agregados de ácidos orgánicos, endulzantes y preservadores químicos, que lograron una vida útil a 10°C adecuada, para ambas películas plásticas utilizadas, se los sometió a una mayor temperatura (20°C), simulando un almacenamiento del producto en condiciones extremas, a el fin de evaluar su comportamiento microbiológico frente a un "abuso térmico". A diferentes tiempos de dicho almacenamiento se tomaron muestras y se realizaron los recuentos microbianos en PCA e YGC, así como la evaluación de la calidad sanitaria mediante recuento de *Enterobacteriaceae* y de *E. coli*, utilizando placas de Petrifilm.

2.4.4.11 Inoculación con *Escherichia coli* O157:H7

Para realizar los estudios de inoculación se trabajó en un flujo laminar de seguridad (Telstar BIO II-A CE Serie 6943) del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM). Se utilizó una cepa de *Escherichia coli* O157:H7. El cultivo fue crecido en caldo nutritivo durante 12 hs a 37°C. Se realizaron diluciones seriadas en peptona 0.1% del cultivo obtenido y se inoculó 1 ml del mismo sobre cada una de las muestras recién preparadas de cubos de manzanas en jugo de naranjas fresco (30 g cubos:30 ml jugo): N7 y N9, para Red Delicious, y N1 y N17 para Granny Smith. Se envasaron en Polietileno y se almacenaron a 10°C. Sobre 1 ml de jugo correspondiente a cada muestra se realizaron los recuentos microbianos durante el almacenamiento a 10°C, en placas Petrifilm™ *E. coli* (3M™) incubando a 37°C por 48 hs. Este método fue

apropiado debido a la ausencia de coliformes en los productos no inoculados y a que cada muestra se inoculó con una sola especie de microorganismo (Raghubeer y col. 1995).

Caldo nutritivo:

peptona de carne	5 g/L
Extracto de carne	3 g/L
Agar	12 g/L

2.4.5 Vida útil

La vida útil de un alimento es el período de tiempo para el cual el producto comienza a ser inaceptable desde el punto de vista sensorial, nutritivo o sanitario. El criterio correspondiente al final de la vida útil está determinado por requerimientos legales, por atributos de aceptabilidad del consumidor (color, sabor, aroma, etc.), por requerimientos de distribución en el mercado y por costos. Una definición universal de vida útil es virtualmente imposible de establecer debido a los complejos mecanismos de deterioro de un alimento y a la imposibilidad de generalizar el grado de aceptación de distintos consumidores, en consecuencia se define una vida útil para cada tipo de producto (Fu y Labuza, 1993).

Para la obtención de manzanas peladas y cortadas en jugo con características organolépticas aceptables deben evaluarse los atributos de calidad de las mismas. Estos se refieren al mantenimiento del color superficial, buenas condiciones en la textura del producto y la inexistencia de alteraciones del sabor debidas a la aplicación de preservadores químicos, así como una buena calidad sanitaria.

Se definió la vida útil del producto como el tiempo de almacenamiento refrigerado para el cual los recuentos de hongos y levaduras (microorganismos predominantes en el mismo) resultaron ser menores de 10^6 UFC/g (Howard y Dewi, 1995), la diferencia de cromaticidad mantuvo un valor constante (≤ 6 , cambio de color aceptable) y el ablandamiento relativo fue menor a $-0,6$, siendo simultáneamente aceptables por un panel sensorial no entrenado.

2.5 ANALISIS ESTADISTICO

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el Análisis de varianza (ANAVA) y el test de comparación de medias Fisher LSD, con niveles de significación de 0.05 y 0.01. En todos los casos se utilizó un paquete estadístico para computadora (SYSTAT Inc., 1990, versión 5.0, USA).

**3. CARACTERIZACION
FISICOQUIMICA DE LAS MATERIAS
PRIMAS**

3. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LAS MATERIAS PRIMAS

3.1 Acidez titulable y pH

Las materias primas (manzanas Red Delicious y Granny Smith, y jugo de naranjas fresco y pasteurizado), utilizadas para la elaboración de los distintos productos fueron caracterizadas analizándose el pH y la acidez titulable. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Acidez titulable y pH de las materias primas utilizadas

Materia prima	pH*	Acidez titulable* (meq/kg)
Manzanas Red Delicious	4.05 (0.01)	33.35 (1.35)
Manzanas Granny Smith	3.40 (0.04)	90.50 (3.70)
Jugo fresco de naranjas	4.15 (0.02)	60.85 (0.07)
Jugo pasteurizado de naranjas	3.98 (0.03)	111.65 (0.02)

*Error estandar entre paréntesis

Como pudo observarse en base a estos resultados, la variedad Granny Smith presentó valores de pH menores y de acidez titulable mayores, respecto a la variedad Red Delicious.

En cuanto a los jugos de naranja analizados, el pasteurizado presentó menores valores de pH y mayores de acidez titulable, respecto a los valores obtenidos para el jugo fresco de naranjas Valencia.

3.2 Acidos orgánicos

Los resultados obtenidos para los contenidos de ácidos orgánicos más abundantes en las materias primas utilizadas, mediante los distintos métodos aplicados se detallan a continuación.

3.2.1 HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Presión)

Las curvas de calibración realizadas para los ácidos cítrico y málico a 214 nm se presentan en la Figura 3.1 a y b, respectivamente.

3. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LAS MATERIAS PRIMAS

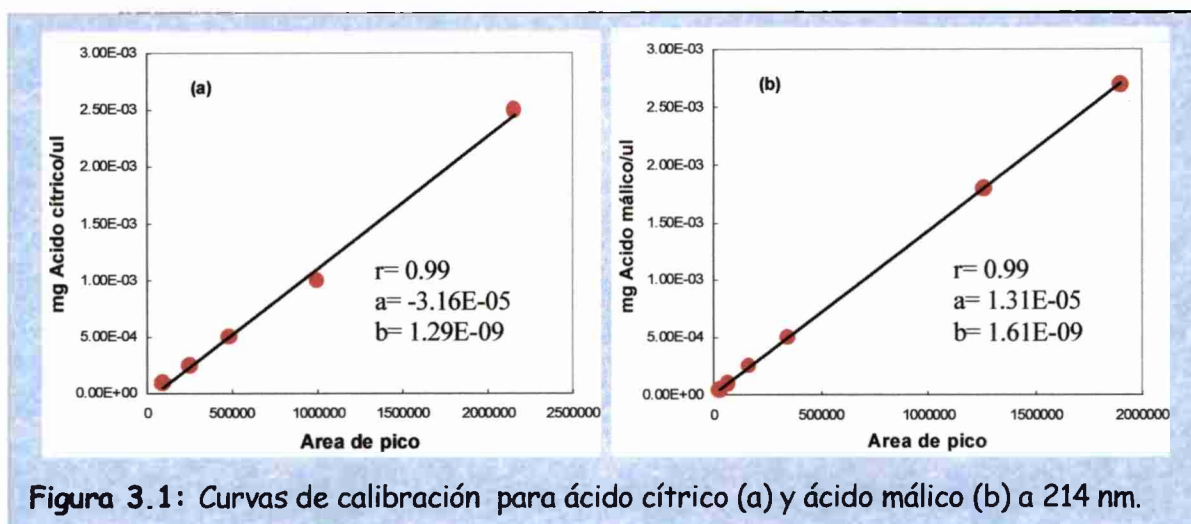


Figura 3.1: Curvas de calibración para ácido cítrico (a) y ácido málico (b) a 214 nm.

En la Figura 3.1 puede observarse el ajuste obtenido ($r > 0,99$) para las curvas de calibración correspondientes a cada ácido analizado, en el rango de concentraciones utilizadas. Los tiempos de retención medidos fueron: 6.510 min para ácido cítrico y 7.685 min para ácido málico a 214 nm.

Para las determinaciones de los mismos ácidos realizadas sobre las materias primas se obtuvieron perfiles cromatográficos como los que se presentan en las Figuras 3.2 a, b y 3.3 a, b para las manzanas y los jugos de naranjas analizados, respectivamente.

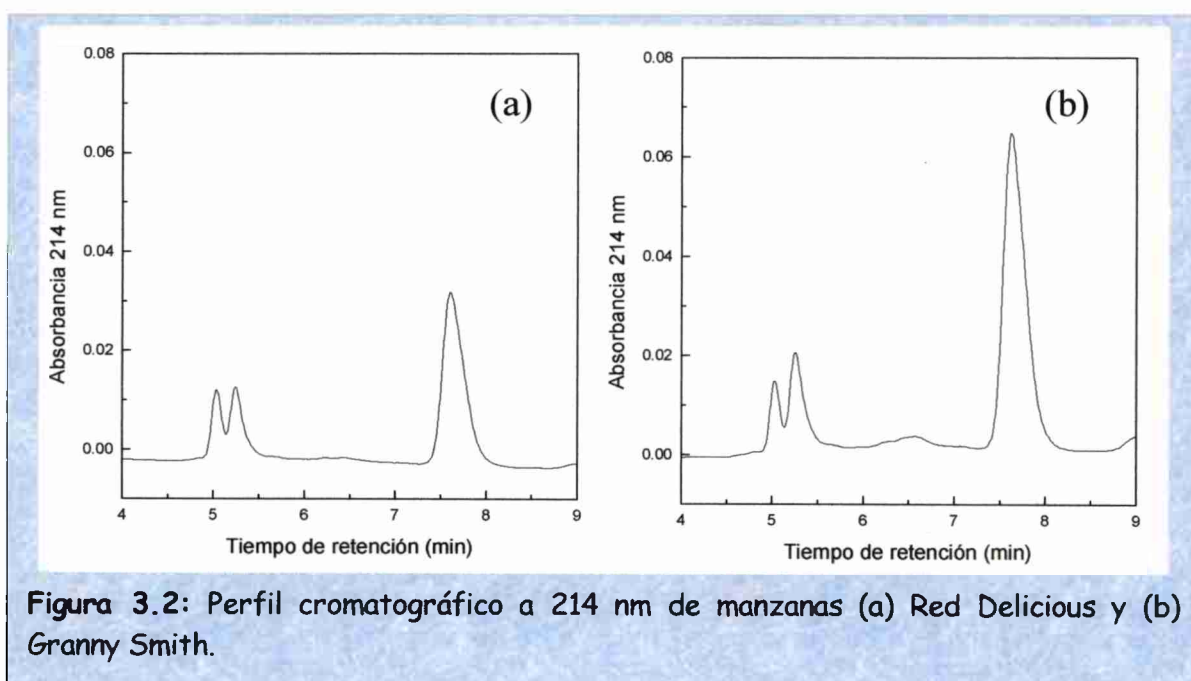
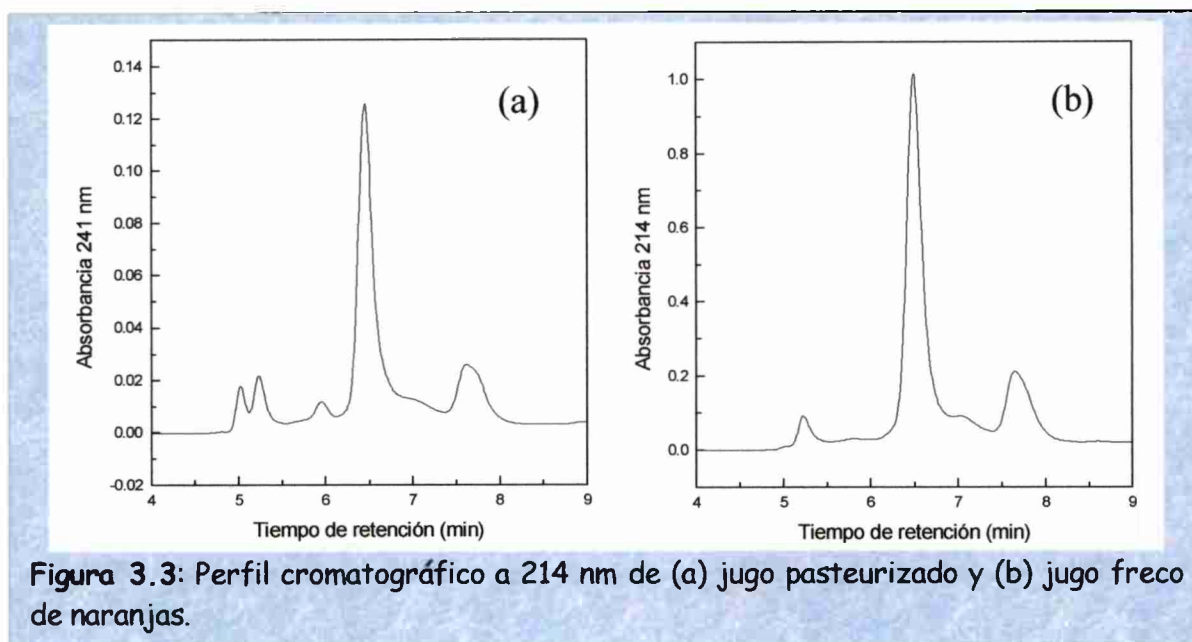


Figura 3.2: Perfil cromatográfico a 214 nm de manzanas (a) Red Delicious y (b) Granny Smith.

En la Figura 3.2 a, puede observarse, para la variedad Red Delicious, a 214 nm, un pico importante a 7.7 min. correspondiente al ácido málico, y un pico mucho más pequeño

correspondiente al ácido cítrico, a los 6.51 min. Para la variedad *Granny Smith* (Figura 3.2 b) se observó un perfil similar a éste, con un pico importante de ácido málico a los 7.685 min y uno pequeño correspondiente al ácido cítrico, a los 6.52 min. Esto indicó que, para ambas variedades de manzanas, el ácido predominante fue el málico, mientras que el cítrico se encontró en mucha menor proporción, respecto al primero.



En las Figuras 3.3, a y b, se puede observar que, a 214 nm, ambos jugos presentaron un pico importante a 6.5 min correspondiente al ácido cítrico, y otro más pequeño a los 7.7 min correspondiente al ácido málico.

Los resultados de los contenidos de ácidos orgánicos obtenidos mediante este método se presentan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Niveles de ácidos orgánicos determinados mediante HPLC en las materias primas

Materia prima	Acido cítrico* (g/kg)	Acido málico* (g/kg)
Red Delicious	0.40 (0.02)	4.62 (0.33)
Granny Smith	0.59 (0.12)	9.56 (1.43)
Jugo fresco de naranjas	8.75 (0.05)	3.32 (0.01)
Jugo pasteurizado de naranjas	9.95 (0.45)	4.72 (0.12)

*Error estandar entre paréntesis

En la Tabla 3.2 puede observarse que, la variedad *Granny Smith* presentó un mayor nivel de ácido cítrico y de ácido málico, principalmente este último, respecto de la variedad *Red Delicious*.

Los jugos analizados mostraron también diferencias en cuanto a los niveles de ácidos orgánicos obtenidos, siendo mayores en el jugo pasteurizado respecto al jugo fresco. Otros autores (Nisperos-Carriedo y col., 1992) han encontrado, para jugo fresco de naranjas, niveles de ácido cítrico de 1% y de ácido málico de 0.1%, que resultaron comparables con los obtenidos en el presente trabajo.

Los contenidos de ácido ascórbico fueron determinados mediante HPLC a 245 nm, siendo el tiempo de retención obtenido de 7.2 min. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3: Niveles de ácido ascórbico obtenidos mediante HPLC.

Materia Prima	Acido ascórbico* (mg/kg)
Manzana <i>Red Delicious</i>	1.45 (0.02)
Manzana <i>Granny Smith</i>	0.05 (0.01)
Jugo fresco de naranjas	400.08 (25.03)
Jugo pasteurizado de naranjas	155.05 (2.50)

*Error estandar entre paréntesis

Del análisis del contenido de ácido ascórbico se observó que ambas variedades de manzanas presentaron niveles muy bajos de esta vitamina (< 2 mg/kg), mientras que en los jugos, los niveles obtenidos fueron de 155 y 400 mg/kg para el jugo pasteurizado y fresco, respectivamente.

Los resultados obtenidos en términos de acidez titulable y pH concuerdan con los datos obtenidos de niveles de ácidos orgánicos, ya que la variedad *Granny Smith* presentó una acidez titulable mayor, un pH menor y mayores niveles de ácidos orgánicos, principalmente de ácido málico, respecto de la variedad *Red Delicious*.

Entre los jugos analizados, el pasteurizado presentó una mayor acidez titulable, menor pH y mayor contenido de ácidos cítrico y málico, respecto del jugo fresco. Asimismo, estos valores son comparables con datos bibliográficos que indicaron una acidez titulable para naranjas Valencia de 5-28 meq % y un pH de 3.1-4.2 (Ctifi, 1994). Sin embargo, el jugo fresco presentó el mayor nivel de vitamina C (ácido ascórbico).

3.2.2 Determinación de ácido L-ascórbico: método enzimático-colorimétrico

Los contenidos de ácido L-ascórbico en las materias primas utilizadas fueron determinados mediante un método enzimático-colorimétrico. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4: Niveles de ácido ascórbico obtenidos por método enzimático-colorimétrico (nd: no detectable)

Materia prima	Acido ascórbico* (mg/kg)
Red Delicious	nd
Granny Smith	nd
Jugo fresco de naranjas	425.01 (25.10)
Jugo pasteurizado de naranjas	180.10 (30.05)

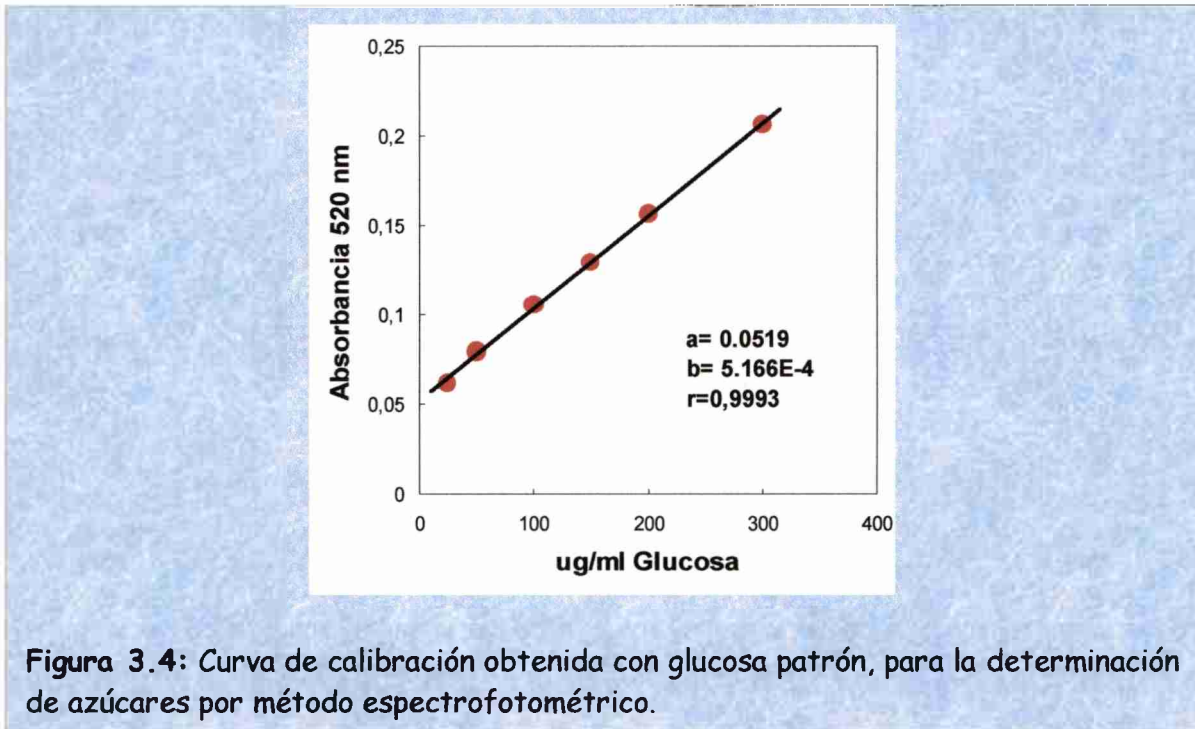
*Error estandar entre paréntesis

Puede verse en la Tabla 3.4, que el jugo fresco presentó un nivel muy superior al obtenido para el jugo pasteurizado, y que dichos valores fueron comparables con datos bibliográficos, que indicaron una concentración de ácido ascórbico en naranjas de 50 mg/100g (Hulme, 1970). Para la determinación en manzanas, los niveles de ácido ascórbico no fueron detectables mediante este método, y por datos bibliográficos (Vanderslice y Higgs, 1991) éstos oscilarían entre 0 y 2 mg/100g en jugo de manzana, niveles muy inferiores a los encontrados en naranjas.

Estos resultados mostraron que el método enzimático-colorimétrico puede aplicarse para determinar el contenido de vitamina C en jugos, ya que los niveles medidos resultaron comparables a los obtenidos mediante HPLC (Tabla 3.3).

3.3 Azúcares

El contenido de azúcares reductores y totales se determinó mediante un método espectrofotométrico. La curva de calibración elaborada con un patrón de glucosa, se presenta en la Figura 3.4.



En la Figura 3.4 puede verse el ajuste obtenido ($r=0,9993$) para el rango de concentraciones de glucosa patrón utilizadas. Mediante esta curva se calcularon los contenidos de azúcares totales y reductores de las materias primas, y por diferencia entre estos valores, se calcularon los azúcares no reductores. Estos resultados se presentan en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5: Contenido de azúcares reductores, no reductores y totales de las materias primas analizadas.

Materia prima	Azúcares reductores* (g/kg)	Azúcares no reductores* (g/kg)	Azúcares totales* (g/kg)
Red Delicious	34.55 (0.22)	52.05 (0.25)	87.80 (0.60)
Granny Smith	45.55 (0.22)	24.15 (0.52)	70.25 (0.57)
Jugo fresco de naranjas	25.10 (0.50)	51.05 (0.22)	75.35 (0.22)
Jugo pasteurizado de naranjas	52.90 (0.35)	44.65 (0.27)	96.75 (0.12)

* Error estandar entre paréntesis



IN 57452

En la Tabla 3.5 puede observarse para la variedad Red Delicious un mayor contenido de azúcares totales y no reductores, respecto de la variedad Granny Smith. Estos valores concuerdan con datos de bibliografía que indicaron un contenido de azúcares totales (5-13 % peso fresco), reductores (6,33-10,67 % peso fresco) y de no reductores (1,28-6,64 % peso fresco) para manzanas (Hulme, 1970).

Para los jugos analizados, el pasteurizado presentó niveles mayores de azúcares reductores, pero inferiores de azúcares no reductores, respecto al jugo fresco de naranjas.

3.4 Sólidos solubles, insolubles y totales

Otro estudio realizado para completar la caracterización química de las materias primas utilizadas fue la determinación del contenido de sólidos solubles mediante refractometría a 20°C, sólidos totales por secado en estufa de vacío a 60°C, y sólidos insolubles por diferencia entre los sólidos totales y solubles. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6: Contenido de sólidos solubles, insolubles y totales de las materias primas utilizadas

Materia prima	Sólidos solubles a 20°C* (°Brix)	Sólidos insolubles* (g/kg)	Sólidos totales* (g/kg)
Red Delicious	16.45 (0.25)	126.75 (0.93)	291.25 (2.18)
Granny Smith	11.85 (0.27)	119.80 (1.80)	238.30 (4.55)
Jugo fresco de naranjas	9.15 (0.07)	2.50 (0.02)	94.50 (0.25)
Jugo pasteurizado de naranjas	11.05 (0.02)	3.55 (0.17)	114.05 (0.42)

* Error estandar entre paréntesis

Puede verse (Tabla 3.6) que la variedad Red Delicious presentó mayores niveles de sólidos solubles e insolubles, respecto a la variedad Granny Smith, lo que concuerda con lo obtenido para los contenidos de azúcares en las mismas.

Para los jugos analizados, el pasteurizado presentó niveles de sólidos solubles e insolubles mayores que el jugo fresco, acorde a lo obtenido para los azúcares, encontrándose dentro del rango descripto por otros autores (7-18 %) (Ctifl, 1994).

Por lo tanto, en base a todos los resultados encontrados en cuanto a la composición de las materias primas utilizadas, se concluyó que:

● la variedad **Granny Smith** presentó un mayor contenido de ácidos orgánicos, principalmente málico, una mayor acidez titulable y un menor pH, así como un menor contenido de sólidos y azúcares totales, respecto a la variedad **Red Delicious**.

● entre los jugos analizados, el pasteurizado presentó un menor pH, una mayor acidez titulable, un mayor contenido de ácidos orgánicos, principalmente cítrico, así como un mayor contenido de sólidos y azúcares totales, respecto al jugo fresco de naranjas. Sin embargo, este último presentó un mayor contenido de vitamina C.

4. CALIDAD DE LOS JUGOS

4. CALIDAD DE LOS JUGOS

4.1 JUGOS ANALIZADOS

En el presente capítulo se analizan, en sus aspectos microbiológicos, los diferentes tipos de jugo de naranjas (pasteurizado o fresco) que posteriormente serán evaluados en el sistema formulado con manzanas en jugo de naranjas (Capítulo 5). Además se analiza el efecto del procedimiento de lavado de la piel de las naranjas utilizadas para obtener el jugo fresco, así como el agregado al jugo de distintos preservadores.

Se compararon dos procedimientos de lavado: con agua potable, y con solución de hipoclorito de sodio 0.25 g/L (Ayhan y col., 1998) y posteriormente con agua potable para eliminar el cloro residual. Se evaluaron los agregados de sacarosa (40.00-80.00 g/L), de ácidos orgánicos (cítrico y ascórbico) y de distintos niveles de sorbato de potasio o benzoato de sodio.

En la Tabla 4.1 se presentan las distintas formulaciones de jugos de naranjas fresco o pasteurizado analizados, así como el procedimiento de lavado de la piel de las naranjas aplicado previo a la obtención del jugo fresco.

Tabla 4.1: Formulación de los jugos de naranjas analizados.

Jugo	Proceso de lavado de piel	Aditivos químicos en el jugo					pH
		Acido cítrico (g/L)	Acido ascórbico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Sorbato de potasio (g/L)	Benzoato de sodio (g/L)	
P1	-	-	-	-	-	-	3.98 (0.03)
Na	Agua potable	-	-	-	-	-	4.15 (0.05)
Nh	hipoclorito de sodio (0.25 g/L) + agua potable	-	-	-	-	-	4.15 (0.05)
Nh1	hipoclorito de sodio (0.25 g/L) + agua potable	-	-	80.00	-	-	3.62 (0.27)
Nh2	hipoclorito de sodio (0.25 g/L) + agua potable	2.00	0.30	40.00	-	-	3.57 (0.22)
Nh3	hipoclorito de sodio (0.25 g/L) + agua potable	2.00	0.30	40.00	0.25	-	3.60 (0.10)
Nh4	hipoclorito de sodio (0.25 g/L) + agua potable	2.00	0.30	40.00	0.50	-	3.65 (0.10)
Nh5	hipoclorito de sodio (0.25 g/L) + agua potable	2.00	0.30	40.00	1.00	-	3.55 (0.12)
Nh6	hipoclorito de sodio (0.25 g/L) + agua potable	2.00	0.30	40.00	-	0.25	3.59 (0.12)
Nh7	hipoclorito de sodio (0.25 g/L) + agua potable	2.00	0.30	40.00	-	0.50	3.61 (0.13)
Nh8	hipoclorito de sodio (0.25 g/L) + agua potable	2.00	0.30	40.00	-	1.00	3.55 (0.05)

P: jugo de naranjas pasteurizado; N: jugo de naranjas fresco

Las distintas formulaciones analizadas fueron evaluadas mediante panel sensorial no entrenado en forma preliminar, y en todos los casos fueron obtenidos resultados con puntajes mayores de 2, indicando la aceptabilidad de las mismas.

4.2 ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS

4.2.1 Jugo de naranjas pasteurizado

Los recuentos microbianos realizados sobre muestras de jugo de naranjas pasteurizado, envasado en Polietileno y ESE, no mostraron ningún desarrollo de microorganismos en los medios empleados (PCA para recuento de microorganismos totales y psicrótrofos, YGC para recuento de hongos y levaduras, OSA para recuento de microorganismos de deterioro en jugos de fruta), aún a los 14 días de su almacenamiento a 10°C; este resultado es atribuible al proceso de pasteurización al que fue previamente sometido.

Dado que en los productos artesanales se utiliza normalmente jugo de naranjas fresco, se procedió a analizar dicho jugo, durante su almacenamiento a 10°C, en películas de distinta permeabilidad gaseosa, evaluándose el efecto del agregado de diferentes preservadores (Tabla 4.1) sobre su calidad microbiológica.

4.2.2 Jugo de naranjas fresco

4.2.2.1 Efecto del procedimiento de lavado de la piel de las naranjas

El desarrollo microbiano en jugo de naranjas fresco, obtenido de naranjas lavadas con agua potable o con hipoclorito de sodio y posteriormente con agua potable (jugos Na y Nh, respectivamente, Tabla 4.1) se analizó durante su almacenamiento a 10°C en las distintas películas plásticas.

En la Figura 4.1 a, b, c y d, se presentan los recuentos microbianos obtenidos en los diferentes medios de cultivo (PCA a 4° y 30°C, YGC, OSA), para dichos jugos de naranjas, envasados en películas de diferente permeabilidad gaseosa, y almacenados a 10°C. Los valores de $LSD_{0.05}$ obtenidos fueron incluidos en la leyenda de la Figura.

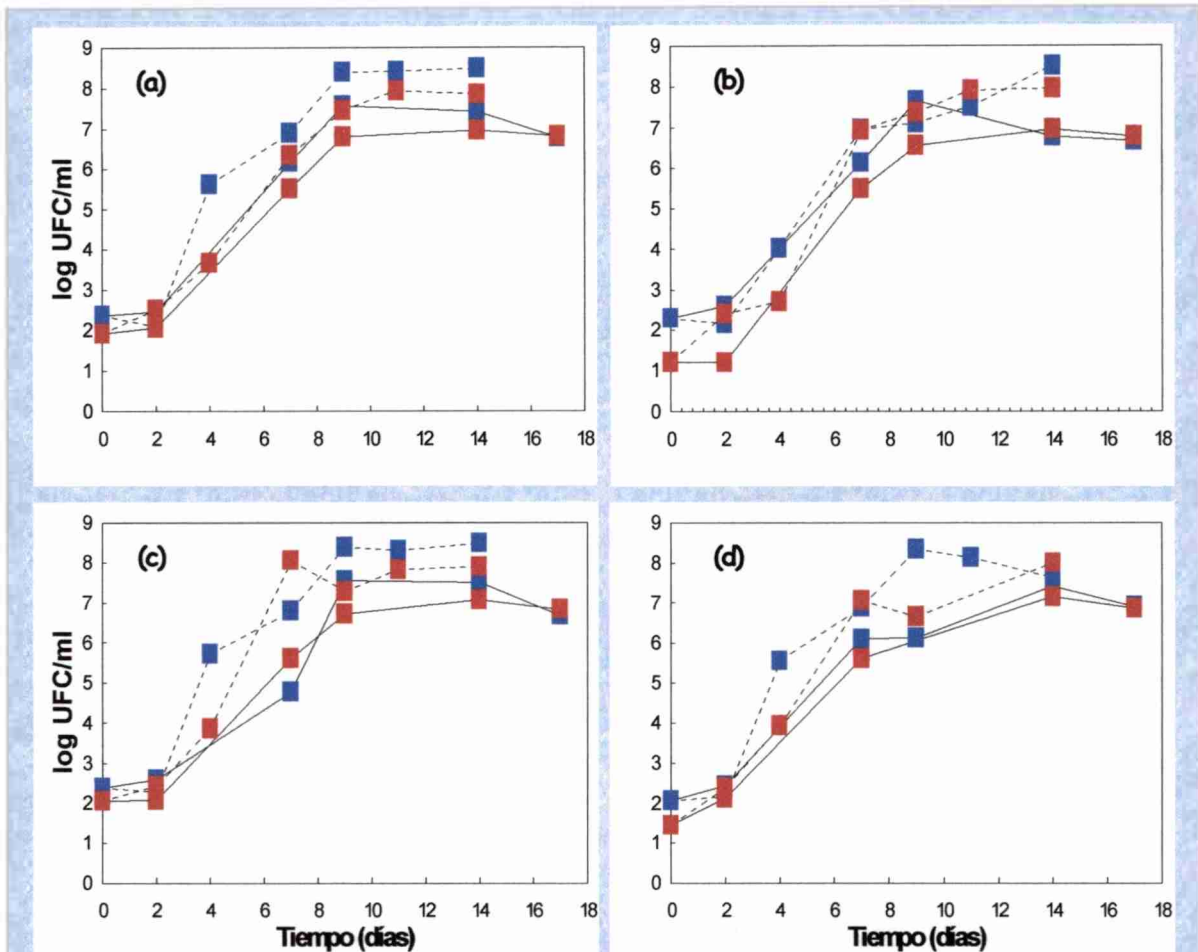


Figura 4.1: Recuento de microorganismos totales (a), hongos y levaduras (b), totales en OSA (c) y psicrótrofos (d) de: (■) jugo fresco de naranjas lavadas con agua potable (jugo Na), (■) jugo fresco de naranjas lavadas con hipoclorito de sodio y posteriormente con agua potable (jugo Nh). Película de envase: (----) Polietileno, (—) ESE. Temperatura de almacenamiento: 10°C.

a: $LSD_{0.05} = 0.49$; b: $LSD_{0.05} = 0.51$; c: $LSD_{0.05} = 0.50$; d: $LSD_{0.05} = 0.45$.

Los recuentos microbianos totales iniciales en jugos frescos obtenidos de naranjas cuya piel fue lavada con agua (jugo Na) o con 0.25 g/L de hipoclorito de sodio y posteriormente con agua potable (jugo Nh) variaron entre 10^1 - 10^2 UFC/ml, siendo este valor inferior a lo reportado por Parish (1998) y similar a lo obtenido por Petrel y col. (1998) para porciones de naranjas peladas.

Los recuentos microbianos realizados en jugos frescos de naranjas lavadas con agua y envasados en polietileno alcanzaron niveles de 1.10^6 UFC/ml entre los 4 y 6 días de almacenamiento a 10°C (Figura 4.1), para microorganismos totales en PCA, hongos y levaduras, psicrótrofos y totales en OSA. Para dicho jugo, pero envasado en película de

baja permeabilidad gaseosa (ESE), niveles similares de recuentos se alcanzaron a los 7 días de almacenamiento, para los mismos microorganismos analizados.

El jugo fresco de naranjas lavadas con hipoclorito de sodio y posteriormente con agua mostró recuentos microbianos similares a los hallados para el jugo fresco de naranjas lavadas con agua solamente.

Del análisis de las Figuras 4.1 a, b, c y d, se puede concluir que los microorganismos predominantes en estos productos fueron los hongos y levaduras. En todos los medios analizados se obtuvieron colonias de similares características (color, aspecto) y su observación microscópica indicó que se trataba de hongos y levaduras, lo cual está en coincidencia con las referencias bibliográficas de este tipo de frutas (Wiley, 1994).

La calidad sanitaria de los jugos frescos, obtenidos a partir de naranjas lavadas con agua o con hipoclorito y agua (jugos Na y Nh), fue evaluada al inicio y al final del almacenamiento en polietileno a 10°C, mediante el Recuento de Coliformes Totales. En todos los casos se obtuvieron valores inferiores a 2 NMP/ml para ambos tipos de jugos, lo cual indicó su seguridad higiénico-sanitaria. Para las muestras envasadas en ESE, se evaluó el nivel de microorganismos sulfito reductores al final del almacenamiento, resultando ser en todos los casos, inferiores a 2 NMP/ml, lo que asegura un jugo apto para el consumo.

4.2.2.2 Efecto de la adición de ácidos orgánicos

Con el objeto de evaluar el efecto del agregado de diferentes preservadores químicos (ácidos ascórbico o cítrico) y de sacarosa, sobre el desarrollo microbiano en el jugo fresco de naranjas cuya piel fue lavada con hipoclorito de sodio y posteriormente con agua potable, se realizaron los recuentos de microorganismos totales en PCA, hongos y levaduras, microorganismos totales en OSA, y microorganismos psicrótrofos en PCA, para las diferentes condiciones analizadas, a distintos tiempos de almacenamiento a 10°C.

En la Figura 4.2 se presentan los resultados obtenidos durante el almacenamiento a 10°C para: jugo fresco sin ningún tipo de aditivos (jugo Nh), jugo fresco conteniendo 80 g/L de sacarosa (jugo Nh1), jugo fresco conteniendo 2 g/L de ácido cítrico, 0.3 g/L de ácido ascórbico y 40 g/L de sacarosa (jugo Nh2). El efecto de la película de envase (polietileno con alta permeabilidad gaseosa y EVA-SARAN-EVA con baja permeabilidad gaseosa) también puede ser analizado en la Figura 4.2. Los valores de $LSD_{0.05}$ obtenidos fueron incluidos en la leyenda de la Figura.

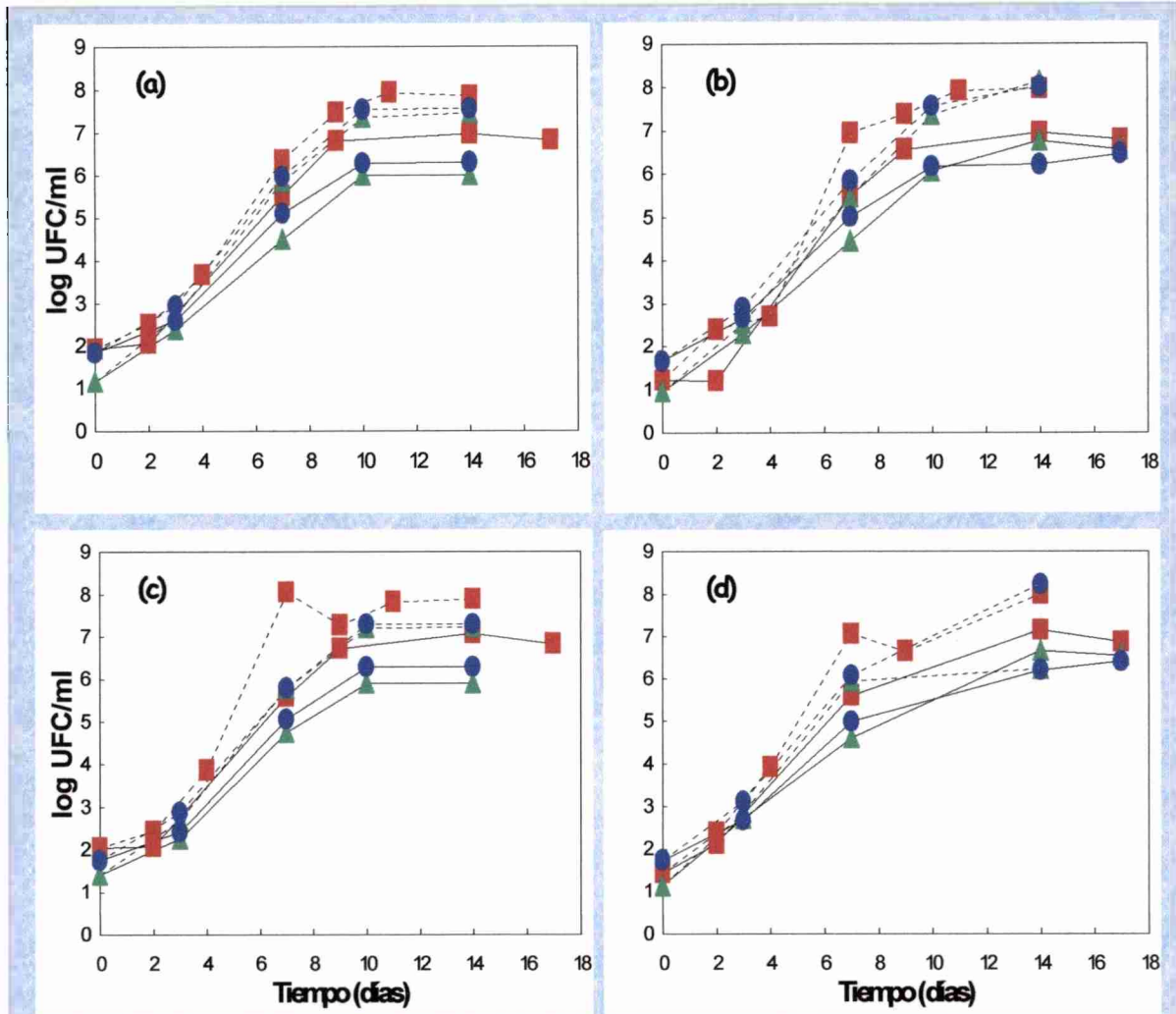


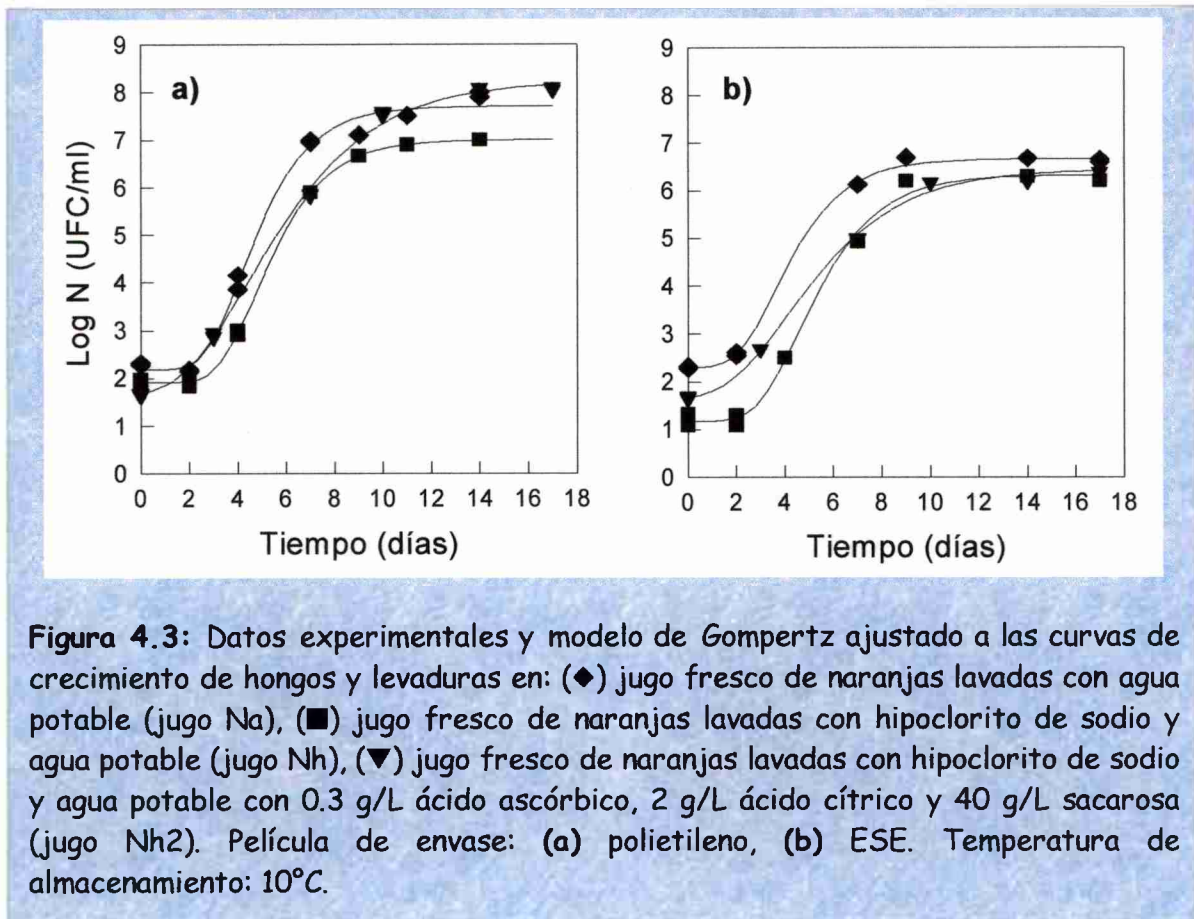
Figura 4.2: Recuento de microorganismos totales (a), hongos y levaduras (b), totales en OSA (c) y psicrótrofos (d) de: (■) jugo fresco de naranjas (jugo Nh), (▲) jugo fresco de naranjas con sacarosa (jugo Nh1), (●) jugo fresco de natural con ácido ascórbico, cítrico y sacarosa (jugo Nh2). Película de envase: (----) Polietileno, (—) ESE. Temperatura de almacenamiento: 10°C.

a: $LSD_{0.05} = 0.12$; b: $LSD_{0.05} = 0.17$; c: $LSD_{0.05} = 0.16$; d: $LSD_{0.05} = 0.19$.

El agregado de sacarosa (40 g/L) y ácidos ascórbico (0.30 g/L) y cítrico (2 g/L) al jugo fresco de naranjas lavadas con hipoclorito de sodio y agua potable (jugo Nh2), no mostró diferencias significativas en los recuentos ($P > 0,05$) respecto a dicho jugo sin agregados (Nh). Sin embargo, el agregado de sacarosa en concentración de 80 g/L (jugo Nh1) sí resultó significativo ($P < 0,001$) respecto al jugo fresco sin agregados (Nh).

Los recuentos microbianos de hongos y levaduras obtenidos en YGC (microorganismos predominantes en los jugos de naranjas) fueron modelados empleando

la ecuación de Gompertz. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.3, donde las líneas continuas representan los ajustes del modelo a los datos experimentales.



La Tabla 4.2 muestra los parámetros de Gompertz (a , b , c , m) y parámetros derivados (velocidad de crecimiento exponencial, μ ; duración de la fase de latencia, LPD; máxima densidad de población, MPD= $a+c$), y pendiente (R) del modelo lineal obtenidos para los diferentes jugos analizados.

El efecto de la permeabilidad de la película de envase fue evidenciado por un descenso de la máxima densidad de población (MPD) en los jugos Na y Nh envasados en ESE (MPD entre 6.33-6.67 log(UFC/ml)) respecto a los mismos jugos envasados en polietileno (MPD entre 7.01-7.71 log(UFC/ml)) (Tabla 4.2). La adición de 2 g/L de ácido cítrico y 0.3 g/L de ácido ascórbico al jugo fresco de naranjas (jugo Nh2) disminuyó marcadamente los valores de μ de los hongos y levaduras (Tabla 4.2), en ambas películas plásticas.

4.2.2.3 Efecto del agregado de sorbato de potasio y benzoato de sodio sobre la microflora en jugo fresco de naranjas

El efecto del agregado de diferentes concentraciones de sorbato de potasio y benzoato de sodio sobre la flora microbiana del jugo fresco de naranjas conteniendo ácido ascórbico, cítrico y sacarosa (jugo Nh2), en función del tiempo de almacenamiento a 10°C se presenta en la Figura 4.4; los modelos de Gompertz y lineal (líneas continuas) fueron ajustados a los datos experimentales. Los parámetros de Gompertz y parámetros derivados obtenidos se presentan en la Tabla 4.2.

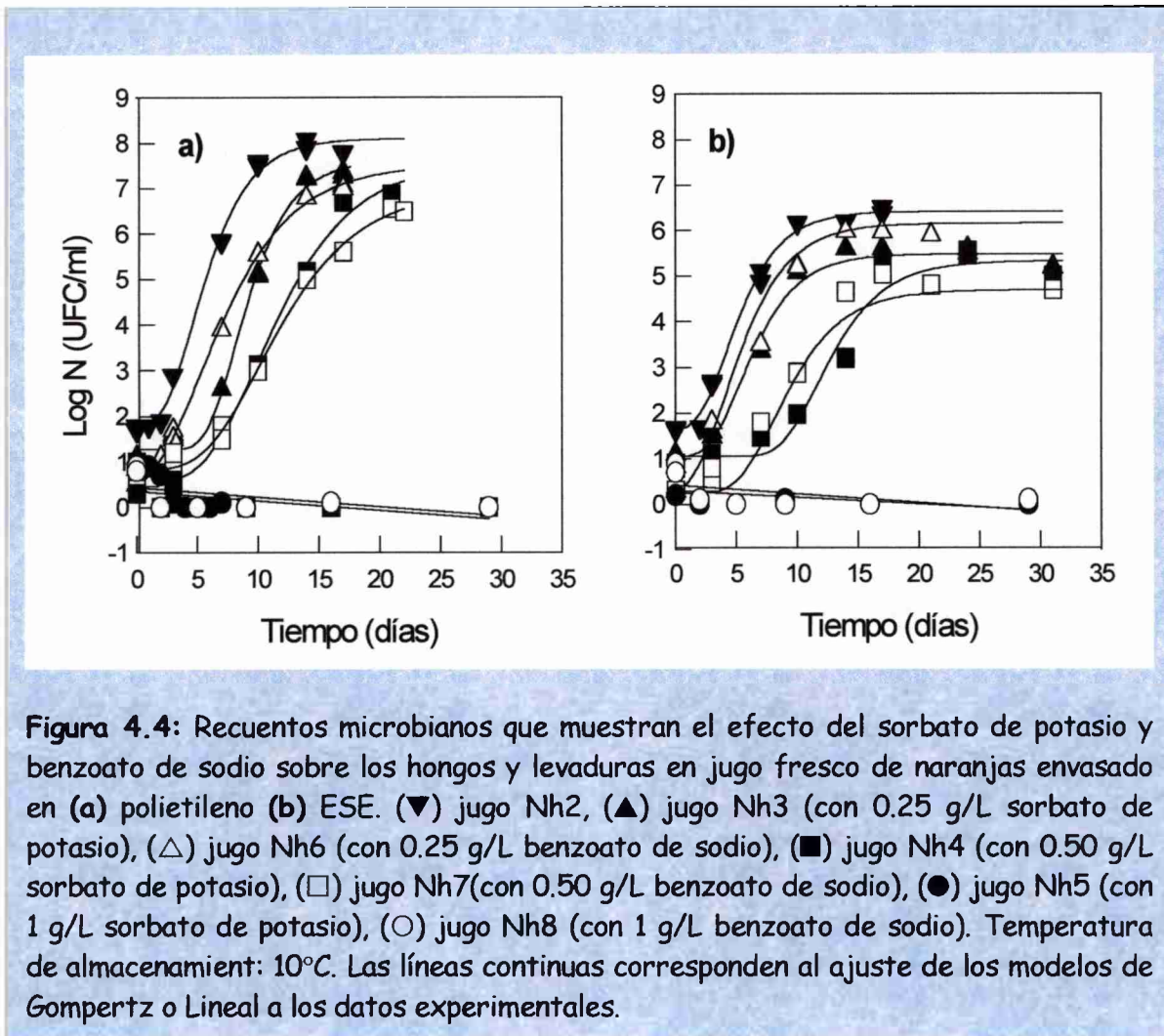
Tabla 4.2: Modelado matemático del crecimiento de hongos y levaduras en jugo fresco de naranjas, envasadas en polietileno (PE) o EVA-SARAN-EVA (ESE), y almacenadas a 10°C. Parámetros de Gompertz (a, b, c, m), parámetros derivados (velocidad de crecimiento exponencial (μ), duración de la fase de latencia (LPD), máxima densidad de población (MPD= a+c)) y pendiente (R) del modelo lineal. Claves de composición de jugos en Tabla 4.1.

Jugo	Película	Parámetros de Gompertz y derivados						Modelo Lineal	
		a	b	c	m	μ	LPD	MPD	R
Na		2.19±0.02	0.65±0.01	5.52±0.34	4.18±0.13	1.32±0.25	2.64±0.43	7.71±0.60	-
Nh		1.92±0.03	0.62±0.03	5.09±0.06	4.76±0.05	1.16±0.33	3.15±0.50	7.01±0.30	-
Nh2		1.63±0.01	0.35±0.02	6.61±0.15	4.49±0.15	0.85±0.35	1.63±1.22	8.24±0.40	-
Nh3	PE	1.28±0.14	0.40±0.07	6.34±0.29	8.21±0.26	0.93±0.62	5.71±1.73	7.62±0.66	-
Nh4		0.56±0.14	0.23±0.03	7.04±0.42	9.91±0.36	0.60±0.45	5.56±3.33	7.60±0.75	-
Nh5		-	-	-	-	-	-	-	-0.02±0.01
Nh6		0.28±0.18	0.24±0.02	7.24±0.28	5.29±0.24	0.64±0.38	1.12±2.50	7.52±0.68	-
Nh7		0.83±0.11	0.22±0.02	6.15±0.27	10.08±0.31	0.50±0.32	5.53±2.97	6.98±0.62	-
Nh8		-	-	-	-	-	-	-	-0.02±0.01
Na		2.30±0.06	0.63±0.07	4.37±0.08	3.61±0.17	1.01±0.43	2.02±0.78	6.67±0.37	-
Nh		1.17±0.12	0.56±0.07	5.16±0.19	4.61±0.21	1.06±0.51	2.82±0.96	6.33±0.56	-
Nh2		1.64±0.09	0.39±0.03	4.81±0.13	4.15±0.17	0.69±0.31	1.59±1.21	6.45±0.47	-
Nh3		1.04±0.19	0.39±0.06	4.44±0.23	5.34±0.471	0.64±0.41	2.78±1.75	5.48±0.65	-
Nh4	ESE	1.05±0.19	0.33±0.09	4.28±0.31	0.12±0.76	0.52±0.48	8.67±2.89	5.33±0.71	-
Nh5		-	-	-	-	-	-	-	-0.01±0.01
Nh6		0.20±0.74	0.31±0.08	5.96±0.89	4.09±0.97	0.68±0.63	0.86±3.10	6.16±1.28	-
Nh7		0.53±0.19	0.33±0.08	4.45±0.30	8.13±0.51	0.54±0.47	5.10±2.69	4.98±0.70	-
Nh8		-	-	-	-	-	-	-	-0.02±0.01

a (log(UFC/ml)), b (1/días), c (log(UFC/ml)), m (días), μ (log(UFC/ml)/día), LPD (días), MPD (log(UFC/ml)) R (log(UFC/ml)/día)

El jugo Nh3 mostró que el agregado de 0.25 g/L de sorbato de potasio al jugo Nh2 produjo un marcado incremento en la duración de la fase de latencia (LPD), principalmente en jugos envasados en polietileno. El uso de similares niveles de benzoato de sodio (jugo Nh6) no produjo cambios significativos en los valores de μ obtenidos ni en los valores de LPD. Mayores concentraciones de preservador (0.5 g/L sorbato o benzoato, jugos Nh4 y Nh7) incrementaron la duración de la fase de latencia y disminuyeron μ en ambas películas

plásticas. Los valores de MPD, en polietileno fueron similares a los obtenidos para el jugo Nh2, sin embargo, en ESE la MPD disminuyó



La reducción de la máxima densidad de población (MPD) fue más marcada para el envasado en películas con baja permeabilidad gaseosa (ESE). La concentración máxima aplicada (1 g/L) de sorbato o benzoato (jugos Nh5 y Nh8, respectivamente) produjo un efecto débilmente bactericida; en este caso se aplicó un modelo lineal, y la pendiente R adoptó valores negativos pero cercanos a cero.

Pudo observarse que la máxima densidad de población (MPD) disminuyó significativamente cuando la concentración del preservador fue incrementada. El uso de películas de baja permeabilidad gaseosa incrementó la eficacia de los preservadores, obteniéndose menores valores de MPD, en comparación con los jugos envasados en polietileno.

4.2.2.4 Índice de Inhibición

Se calcularon los Índice de Inhibición (II) sobre el desarrollo de hongos y levaduras para cada jugo analizado, a partir de los datos experimentales, según la expresión:

$$II = 1 - (\log(N/N_0)_{\text{tratado}} / \log(N/N_0)_{\text{control}})$$

donde N= número de microorganismos a tiempo t y No= nivel inicial de microorganismos. Los valores de $\log(N/N_0)_{\text{tratado}}$ y $\log(N/N_0)_{\text{control}}$ fueron evaluados al tiempo en que el control sin preservadores alcanzó la fase estacionaria. Dichos resultados se presentan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3: Índices de Inhibición para los hongos y levaduras en los diferentes jugos frescos de naranjas analizados, en ambas películas de envase (Claves para la notación de jugos en Tabla 4.1). Temperatura de almacenamiento: 10°C.

Jugo	g preservador/L	Índice de Inhibición (II)	
		Polietileno	ESE
Nh3	0.25 sorbato	0	0
Nh4	0.50 sorbato	0.2	0.8
Nh5	1.00 sorbato	1.0	1.1
Nh6	0.25 benzoato	0	0.2
Nh7	0.50 benzoato	0.3	0.4
Nh8	1.00 benzoato	1.0	1.1

Concentraciones de 0.25 g/L de sorbato de potasio o benzoato de sodio (jugos Nh3 y Nh6) no tuvieron efecto inhibitorio sobre hongos y levaduras. Los Índices de Inhibición para hongos y levaduras se incrementaron cuando se agregaron 0.5 g/L de sorbato de potasio o benzoato de sodio (jugos Nh4 y Nh7); este efecto fue más significativo en ESE respecto a polietileno. El agregado de 1 g/L de sorbato o benzoato (jugos Nh5 y Nh8) produjo un débil efecto bactericida sobre la flora microbiana en ambas películas plásticas, caracterizado por un Índice de Inhibición >1 (Tabla 4.3).

4.2.2.5 Vida útil

Se definió la vida útil del jugo como el tiempo de almacenamiento refrigerado para el cual los recuentos de hongos y levaduras (microorganismos predominantes en el mismo) resultaron ser menores de 10⁶ UFC/g (Howard y Dewi, 1995). Los límites de confianza de la vida útil fueron calculados considerando el error experimental promedio en los recuentos microbianos, que fue de ±0.2 log UFC/ml.

Los períodos de vida útil a 10°C obtenidos para los diferentes jugos y condiciones de envasado se presentan en la Tabla 4.4. Los recuentos microbianos en el jugo fresco obtenido de naranjas cuya piel fue lavada con agua potable (jugo Na) alcanzaron niveles de 10^6 UFC/ml después de 5.7 días cuando se utilizó polietileno como película de envase; en ESE este nivel de contaminación fue alcanzado después de 6.7 días de almacenamiento (Tabla 4.4). Lavando la piel de las naranjas con solución de hipoclorito de sodio (jugo Nh) y usando simultáneamente películas de baja permeabilidad gaseosa, se logró extender la vida útil del jugo de 7.4 a 9.7 días. El agregado de preservadores naturales al jugo (jugo Nh2) no produjo un efecto significativo sobre los valores de vida útil, en comparación con el jugo Nh, en ambas películas de envase.

Períodos de vida útil de entre 11.5 y 15.7 días fueron obtenidos para jugos Nh3 y Nh4, envasados en polietileno y tratados con sorbato de potasio en concentraciones de 0.25 y 0.50 g/L, respectivamente. Para el envasado al vacío en ESE, la vida útil alcanzó valores mayores a 20 días para ambos jugos. El uso de niveles similares de benzoato de sodio (jugos Nh6 y Nh7) permitió alcanzar períodos de vida útil de 11.5 y 19.5 días, en polietileno. Con el empleo de películas de baja permeabilidad gaseosa (ESE), dichos períodos de vida útil pudieron extenderse a 14 y más de 20 días, para los jugos Nh6 y Nh7, respectivamente. Períodos de vida útil mayores de 20 días fueron obtenidos con 1 g/L de sorbato de potasio o benzoato de sodio (jugos Nh5 y Nh8, respectivamente), para ambas películas de envase.

Tabla 4.4: Períodos de Vida útil (días) de los diferentes jugos frescos de naranja analizados, envasados en películas de diferente permeabilidad gaseosa y almacenados a 10°C. (Clave para la notación de jugos en Tabla 4.1)

Jugo	Vida util (días)	
	Polietileno	ESE
Na	5.7 ± 0.2	6.7 ± 0.7
Nh	7.4 ± 0.4	9.7 ± 1.4
Nh2	7.5 ± 0.5	10.4 ± 1.5
Nh3	11.5 ± 0.5	>20
Nh4	15.7 ± 0.7	>20
Nh5	>20	>20
Nh6	11.5 ± 0.5	14.0 ± 2.2
Nh7	19.5 ± 2.7	>20
Nh8	> 20	>20

El efecto combinado de los preservadores químicos (sorbato de potasio o benzoato de sodio) y la película de baja permeabilidad gaseosa permitió extender la vida útil del jugo fresco de naranjas (no pasteurizado).

La evaluación de la calidad microbiana de los jugos frescos de naranjas, realizada al final del almacenamiento a 10°C, en todas las condiciones analizadas (jugos Na-Nh8), envasados en ambas películas plásticas, presentó valores inferiores a 2 NMP/ml para Coliformes Totales y Clostridium sulfito reductores, indicando las buenas condiciones sanitarias de dichos jugos.

**5. CALIDAD DEL SISTEMA:
MANZANAS EN JUGOS DE BAJO PH**

5. CALIDAD DEL SISTEMA: MANZANAS EN JUGOS DE BAJO pH

En el presente Capítulo se desarrolló el estudio de los sistemas formulados con manzanas de ambas variedades mantenidas en jugo de naranjas, envasadas en películas de diferente permeabilidad gaseosa y almacenadas a 10°C.

Con el objeto de seleccionar los preservadores que mejor mantenían el color, la textura y el aroma del producto, para cada variedad de manzana, se realizaron estudios sensoriales de las diferentes opciones. Asimismo, se completó el análisis sensorial evaluándose el sabor (Sección 5.1). Una vez seleccionadas las formulaciones se prosiguió el estudio con determinaciones de color superficial, textura mediante ensayos de compresión, estudios microbiológicos (recuentos microbianos, modelado matemático, identificación de microorganismos predominantes, abuso térmico, inoculación de *E. Coli* O157:H7) y evaluación de los índices de inhibición para el desarrollo microbiano y de los períodos de vida útil de los diferentes sistemas (Sección 5.2).

5.1 ANALISIS SENSORIAL PRELIMINAR

En la Tabla 5.1 se presentan las distintas formulaciones de productos a base de manzanas (variedad Red Delicious y Granny Smith) y jugo de naranjas pasteurizado (P), esterilizado (E) o fresco (N), analizados en forma preliminar mediante un panel sensorial no entrenado, con el objetivo de seleccionar las mejores condiciones que mantuvieran buenas características organolépticas.

5.1.1 Evaluación sensorial (color, textura y aroma) de los sistemas

Se evaluaron subjetivamente los distintos productos respecto de su color superficial (C), su textura (T) y su aroma al abrir la bolsa (A), para cada variedad de manzana analizada, a los 4 y 7 días de almacenamiento a 10°C, en películas de diferente permeabilidad gaseosa (polietileno y EVA-SARAN-EVA, ESE). Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 5.2 y 5.3, para Red Delicious y Granny Smith, respectivamente.

Tabla 5.1: Formulaciones analizadas en las dos variedades de manzanas.

Jugo	Aditivos químicos en el producto			pH
	Bisulfito de sodio (g/kg)	Acido cítrico	Acido ascórbico (g/kg)	
P1	-	-	-	4.01 (0.08)
P2	-	-	0.075	3.70 (0.05)
P3	-	hasta pH: 3.20	0.075	3.20 (0.01)
P4	-	hasta pH: 3.20	-	3.20 (0.01)
P5	0.005	-	-	3.70 (0.05)
P6	0.025	-	-	4.09 (0.02)
N1	-	-	-	4.65 (0.45)
N2	-	-	0.075	5.07 (0.04)
N3	-	hasta pH: 3.20	0.075	3.20 (0.01)
N4	-	hasta pH: 3.20	-	3.20 (0.01)
N5	0.005	-	-	4.86 (0.04)
N6	0.025	-	-	4.81 (0.03)
E1	-	-	-	4.11 (0.04)
E2	-	-	0.125	4.05 (0.04)
E3	-	hasta pH: 3.20	0.125	3.20 (0.01)
E4	-	hasta pH: 3.20	-	3.20 (0.01)
E5	0.005	-	-	4.05 (0.03)
E6	0.025	-	-	4.06 (0.04)

P: jugo de naranjas pasteurizado; N: jugo fresco de naranjas; E: jugo de naranjas esterilizado.

En la Tabla 5.2, se puede ver para la variedad Red Delicious, que sólo las muestras sumergidas en jugos con los dos ácidos orgánicos agregados, ácido ascórbico y ácido cítrico (P3, N3, E3), o con agregado de ácido cítrico solamente (P4, N4, E4), mantuvieron un buen color superficial durante el almacenamiento a 10°C, así como las que contenían 0.025 g bisulfito de sodio/kg producto (P6, N6, E6), mientras que las sumergidas en jugos sin ácidos agregados sufrieron pardeamiento, dando como resultado un color inaceptable para el panel.

Tabla 5.2: Evaluación sensorial de: color superficial (C), textura no instrumental (T) y aroma al abrir el envase (A) de los productos formulados para la variedad Red Delicious, envasados en polietileno y ESE, mediante un panel no entrenado. Claves para las formulaciones en Tabla 5.1.

Tratamiento	Polietileno						ESE					
	4 Días			7 Días			4 Días			7 Días		
	C	T	A	C	T	A	C	T	A	C	T	A
P1	R	MB	R	M	B	M	R	MB	R	M	R	R
P2	R	MB	R	R	B	M	B	MB	B	B	R	B
P3	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	B	MB	MB	B	MB
P4	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	B	MB	MB	R	MB
P5	R	MB	R	M	B	M	R	R	B	M	R	MB
P6	B	B	B	R	B	B	R	B	B	R	R	B
N1	M	B	R	M	B	M	Nd	nd	nd	nd	nd	nd
N2	M	MB	R	M	MB	M	MB	MB	B	MB	R	MB
N3	MB	MB	B	MB	MB	B	MB	M	B	MB	M	B
N4	MB	MB	B	MB	MB	B	MB	M	B	MB	M	B
N5	M	M	R	M	M	M	B	M	B	B	M	B
N6	B	B	R	B	B	M	B	M	B	B	M	B
E1	M	R	R	nd	nd	nd	B	R	B	B	R	B
E2	R	R	R	nd	nd	nd	B	R	B	B	B	B
E3	R	R	R	nd	nd	nd	B	R	B	B	R	B
E4	B	B	R	nd	nd	nd	MB	R	B	MB	R	B
E5	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E6	B	R	R	nd	nd	nd	MB	R	B	MB	R	B

N: jugo fresco; E: jugo esterilizado; P: jugo pasteurizado;
 MB: muy bueno; B: bueno; R: regular; M: malo; nd: no determinado.

De estas formulaciones, se decidió continuar el estudio con aquellas elaboradas con jugos de naranjas, pasteurizado y fresco, y no con la opción del jugo esterilizado, ya que éste no fue el preferido por el panel debido a que, por sus características (jugo reconstituido de jugo concentrado de naranjas, con menor contenido de pulpa respecto al jugo pasteurizado o fresco) no representaba al sistema modelo buscado de "ensalada de frutas frescas", las cuales no reciben ningún tratamiento térmico en su elaboración.

En la Tabla 5.3, se puede observar para la variedad Granny Smith, que aún las muestras sumergidas en jugo de naranja sin agregados (P1, N1, E1) mantuvieron un buen color superficial durante el almacenamiento a 10°C, por lo que se concluyó que, para esta variedad de manzanas no era necesario el agregado de ácidos orgánicos ni bisulfito de sodio al jugo de naranjas para obtener buenas características organolépticas en los productos.

Tabla 5.3: Evaluación sensorial de: color superficial (C), textura no instrumental (T) y aroma al abrir el envase (A) de los productos formulados para la variedad *Granny Smith*, envasadas en polietileno y ESE, mediante un panel no entrenado. Claves para las formulaciones en Tabla 5.1.

Tratamiento	Polietileno						ESE					
	4 Días			7 Días			4 Días			7 Días		
	C	T	A	C	T	A	C	T	A	C	T	A
P1	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	B	MB
P2	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	B	MB
P3	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	B	MB
P4	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	B	MB
P5	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	MB	B	MB
P6	MB	MB	MB	MB	MB	B	MB	MB	MB	MB	B	MB
N1	MB	MB	B	MB	MB	B	MB	B	MB	MB	R	MB
N2	MB	MB	B	MB	MB	B	MB	R	MB	MB	R	MB
N3	MB	MB	B	MB	MB	B	MB	R	MB	MB	R	MB
N4	MB	MB	R	MB	MB	M	MB	R	MB	MB	R	MB
N5	MB	MB	R	MB	MB	M	MB	R	MB	MB	R	MB
N6	MB	MB	R	MB	MB	M	MB	B	MB	MB	B	MB
E1	MB	MB	MB	nd	nd	nd	MB	MB	MB	MB	B	MB
E2	MB	MB	B	nd	nd	nd	MB	MB	MB	MB	B	MB
E3	MB	MB	MB	nd	nd	nd	MB	MB	MB	MB	B	MB
E4	MB	MB	B	nd	nd	nd	MB	MB	MB	MB	B	MB
E5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E6	MB	MB	B	nd	nd	nd	MB	MB	MB	MB	B	MB

N: jugo fresco; E: jugo esterilizado; P: jugo pasteurizado
 MB: muy bueno; B: bueno; R: regular; M: malo; nd: no determinado.

Amiot y colaboradores (1992) también reportaron que las manzanas *Granny Smith* presentaron menor susceptibilidad al pardeamiento respecto a las manzanas *Red Delicious*. Esta característica fue atribuida a la relación excepcionalmente alta de flavan-3-oles/ácidos hidroxicinámicos, y a la menor actividad de la polifenoloxidasasa (PPO) de la variedad *Granny Smith*, comparada con la actividad de PPO de la variedad *Red Delicious*.

Al igual que para la variedad *Red Delicious*, para la variedad *Granny Smith*, el producto elaborado con jugo de naranjas esterilizado no fue considerado para su análisis posterior.

5.1.2 Evaluación sensorial (color y sabor) y reformulación de los sistemas

Para completar el análisis sensorial preliminar de los productos seleccionados en esta primera etapa, se evaluó su sabor a las 24 hs del almacenamiento a 10°C, mediante el panel sensorial no entrenado.

Para la variedad Red Delicious, las muestras que contenían jugo de naranjas, pasteurizado o fresco, y agregado de ácido cítrico hasta pH \approx 3.2 (P3, P4, N3, N4), no fueron bien aceptadas (puntaje <2) debido a su marcado sabor astringente. Por lo tanto, se decidió cambiar la formulación por una de jugo de naranjas (pasteurizado o fresco) con una cantidad mayor de ácido ascórbico, que no alterara el sabor, y con una cantidad de ácido cítrico tal que no produjera sabor astringente.

Los cubos de manzanas de ambas variedades (Red Delicious y Granny Smith) mantenidas en jugo pasteurizado de naranjas con distintos preservadores agregados fueron evaluadas por un panel no entrenado (Tabla 5.4). Se evaluaron los sistemas de cubos de ambas variedades con jugo pasteurizado sin agregados (P1) y con agregado de: 0.025 g/kg de bisulfito de sodio (P6), 0.15 g/kg de ácido ascórbico (P7), 1.00 g/kg de ácido cítrico + 0.15 g/kg de ácido ascórbico (P8), y 1.00 g/kg de ácido cítrico (P9).

Tabla 5.4: Evaluación sensorial de los sistemas formulados con manzanas en jugo pasteurizado de naranjas: sin agregados (P1), con 0.025 g/kg de bisulfito de sodio (P6), con 0.15 g/kg de ácido ascórbico (P7), con 1.00 g/kg de ácido cítrico + 0.15 g/kg de ácido ascórbico (P8), y con 1.00 g/kg de ácido cítrico (P9).

Manzana	Jugo	Puntaje del Panel*			
		Polietileno			
		Color	Textura	Sabor	Calidad
Red Delicious	P1	1.70(0.21)	3.40(0.17)	2.50(0.28)	1.90(0.25)
	P7	1.70(0.22)	3.00(0.22)	2.10(0.25)	1.70(0.25)
	P8	3.00(0.22)	3.15(0.22)	3.30(0.23)	3.60(0.17)
	P9	2.88(0.18)	3.09(0.21)	3.17(0.21)	3.12(0.12)
	P6	2.82(0.25)	2.90(0.25)	3.00(0.22)	3.20(0.27)
Granny Smith	P1	3.06(0.17)	3.13(0.20)	2.86(0.22)	3.13(0.13)
	P7	3.60(0.18)	3.82(0.12)	3.59(0.22)	3.33(0.18)
	P8	3.49(0.15)	3.60(0.18)	3.45(0.25)	3.44(0.23)
	P9	3.18(0.23)	3.90(0.17)	3.65(0.21)	3.56(0.25)
	P6	3.43(0.19)	3.73(0.22)	3.51(0.15)	3.29(0.11)
ESE					
Red Delicious	P1	1.75(0.24)	3.56(0.17)	1.78(0.22)	3.22(0.22)
	P7	3.11(0.26)	3.33(0.17)	3.11(0.19)	3.15(0.20)
	P8	3.55(0.18)	3.00(0.17)	3.55(0.17)	3.22(0.22)
	P9	3.33(0.24)	3.00(0.24)	3.55(0.18)	3.22(0.22)
	P6	2.11(0.26)	2.89(0.26)	3.00(0.17)	3.11(0.20)
Granny Smith	P1	3.56(0.18)	3.68(0.17)	3.78(0.15)	3.78(0.15)
	P7	3.55(0.16)	3.75(0.12)	3.57(0.18)	3.66(0.17)
	P8	3.80(0.21)	3.71(0.10)	3.83(0.22)	3.57(0.12)
	P9	3.63(0.17)	3.44(0.25)	3.56(0.15)	3.55(0.16)
	P6	3.71(0.11)	3.61(0.17)	3.15(0.17)	3.68(0.10)

* Error standard entre paréntesis

Para la variedad *Red Delicious*, los cubos mantenidos en jugo de naranjas pasteurizado suplementado con ácido cítrico (jugo P9), con ácido ascórbico y ácido cítrico (jugo P8) y con bisulfito de sodio (P6), presentaron un color superficial y sabor aceptable a las 24 hs de almacenamiento a 10°C, para ambas películas de envase. Los cubos de manzanas con jugo pasteurizado sin agregado de ácidos orgánicos (jugo P1) fueron rechazados por el panel sensorial debido al pardeamiento producido. Para esta variedad de manzanas, se agregaron 20 g de sacarosa ó 1 g de edulcorante (aspartame)/kg producto, obteniéndose productos de sabor aceptado por el panel.

Los cubos de manzanas de la variedad *Granny Smith* presentaron color superficial y sabor aceptable, aún para los sumergidos en jugo de naranjas sin agregado de ácidos orgánicos (jugo P1) a las 24 hs de almacenamiento a 10°C, en ambas películas de envase. Así, para esta variedad de manzanas no fue necesario suplementar el jugo de naranjas con ácidos orgánicos para preservar buenas características organolépticas. Se agregaron 40 g de sacarosa ó 2 g de edulcorante (aspartame)/kg producto, dando productos de sabor aceptado por el panel.

La evaluación sensorial, en términos de textura, para ambas variedades de manzanas, produjo una buena aceptabilidad de los productos en todas las condiciones evaluadas (Tabla 5.4).

Con el fin de comparar la efectividad en inhibir el pardeamiento enzimático del ácido ascórbico con la de su isómero, el ácido eritórbico, se preparó el producto seleccionado para la variedad *Red Delicious*, con ácido ascórbico (0.150 g/kg producto), ácido cítrico (1 g/kg producto), y un producto equivalente pero reemplazando el ácido ascórbico por eritórbico, en igual concentración. A los 4 y 7 días de almacenamiento a 10°C, se evaluó su color y aroma, encontrándose, en los envasados en polietileno, que el producto cuya formulación contenía ácido eritórbico no mantenía un buen color, mientras que el formulado con ácido ascórbico si lo hacía. El efecto no fue tan marcado en los productos envasados en ESE, ya que el color desarrollado en este caso, fue aceptado por el panel. Con estos resultados se decidió continuar el estudio empleando ácido ascórbico y no eritórbico, por su mayor efectividad contra el pardeamiento y sus excelentes propiedades nutricionales (Vitamina C).

5.2 PARAMETROS DE CALIDAD

5.2.1 Formulaciones analizadas

En la Tabla 5.5 se presentan las formulaciones de los productos seleccionados previamente, y que fueron objeto de estudio en esta etapa del trabajo. Se evaluaron los sistemas elaborados con manzanas de ambas variedades y jugo de naranjas pasteurizado sin agregados (P1) o con agregado de bisulfito de sodio (P6), ácido ascórbico (P7), ácido cítrico (P9) y la combinación ascórbico+cítrico (P8). Asimismo, se evaluaron los mejores sistemas obtenidos en jugo pasteurizado de naranjas (para Red Delicious con agregado de ascórbico y cítrico, P8, y para Granny Smith sin agregados, P1) pero formulados en jugo fresco de naranjas y se incorporaron al mismo diferentes preservadores, sorbato de potasio o benzoato de sodio, comunmente utilizados en este tipo de productos, en niveles inferiores a 1 g/kg, acorde a lo permitido por el Código Alimentario Argentino.

Tabla 5.5: Composición de los sistemas estudiados (manzanas + jugo de naranjas) aplicados sobre ambas variedades de manzanas (P: jugo pasteurizado; N: jugo fresco (no pasteurizado). Las concentraciones de los agregados están expresadas en el producto final (manzana + jugo).

Jugo	Aditivos químicos en el producto (manzana + jugo)					pH
	Bisulfito de sodio (g/kg)	Acido cítrico (g/kg)	Acido ascórbico (g/kg)	Sorbato de potasio (g/kg)	Benzoato de sodio (g/kg)	
P1	-	-	-	-	-	4.01(0.04)
P6	0.025	-	-	-	-	4.09(0.01)
P7	-	-	0.150	-	-	3.99(0.04)
P8	-	1.00	0.150	-	-	4.12(0.01)
P9	-	1.00	-	-	-	4.11(0.01)
N7	-	1.00	0.150	-	-	3.57(0.11)
N8	-	1.00	0.150	0.125	-	3.62(0.06)
N9	-	1.00	0.150	0.250	-	3.70(0.07)
N10	-	1.00	0.150	0.375	-	3.60(0.10)
N11	-	1.00	0.150	0.500	-	3.55(0.05)
N12	-	1.00	0.150	-	0.125	3.61(0.07)
N13	-	1.00	0.150	-	0.250	3.65(0.07)
N14	-	1.00	0.150	-	0.375	3.70(0.06)
N15	-	1.00	0.150	-	0.500	3.55(0.02)
N1	-	-	-	-	-	4.06(0.04)
N16	-	-	-	0.125	-	3.35(0.07)
N17	-	-	-	0.250	-	3.50(0.05)
N18	-	-	-	0.375	-	3.50(0.12)
N19	-	-	-	0.500	-	3.60(0.05)
N20	-	-	-	-	0.125	3.60(0.05)
N21	-	-	-	-	0.250	3.62(0.04)
N22	-	-	-	-	0.375	3.70(0.05)
N23	-	-	-	-	0.500	4.05(0.02)

* Para manzanas Red Delicious, las formulaciones incluyen 20 g sacarosa/kg producto.

** Para manzana Granny Smith, las formulaciones incluyen 40 g sacarosa/kg producto.

5.2.2 Color superficial

Las funciones $Croma^* = ((a^{*2} + b^{*2})^{1/2})$ y $Diferencia\ de\ Cromaticidad = ((\Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2})$ fueron seleccionadas debido a que interpretaron las observaciones visuales realizadas previamente por el panel no entrenado. En la Figura 5.1 se presentan los valores de $Croma^*$ obtenidos para los sistemas formulados en jugo pasteurizado de naranjas para Red Delicious y Granny Smith, respectivamente (Figura 5.1 a y b). Los valores de $LSD_{0.05}$ obtenidos fueron incluidos en las leyendas de las figuras.

Las muestras envasadas en polietileno fueron evaluadas hasta (i) desarrollo microbiano evidenciado por formación de gas; (ii) observación de crecimiento superficial de hongos; o (iii) fueron rechazadas por el panel sensorial debido al pardeamiento.

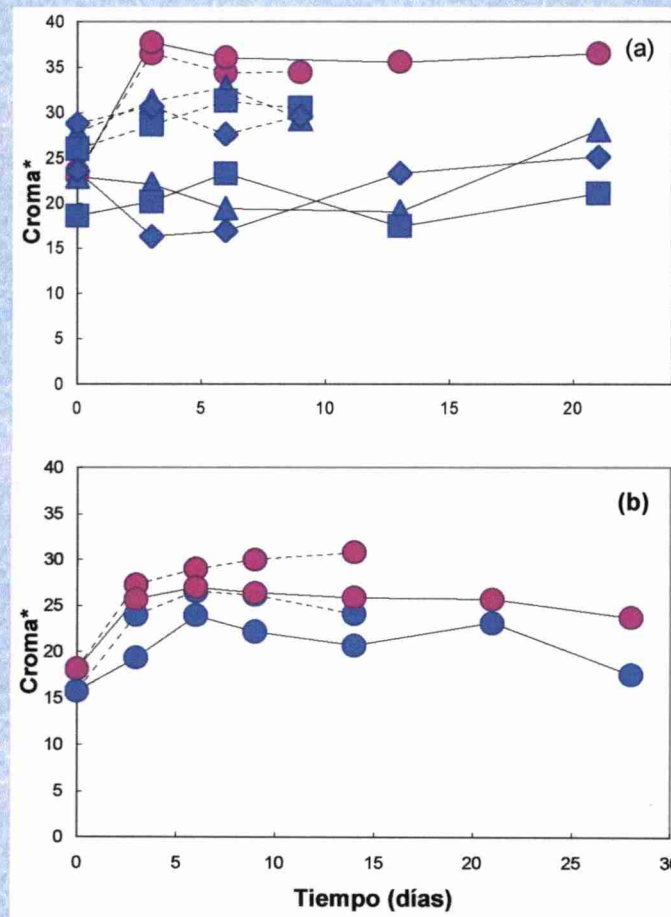


Figura 5.1: Valores de $Croma^*$ como función del tiempo de almacenamiento a $10^{\circ}C$ para cubos de manzanas mantenidos en formulaciones de jugo pasteurizado en diferentes películas de envase. a: Red Delicious; b: Granny Smith. (----) Polietileno. (—) ESE. a: $LSD_{0.05} = 1.25$; b: $LSD_{0.05} = 1.27$. ● sin jugo; ● P1; ■ P8; ▲ P9; ◆ P6. Claves para las formulaciones en Tabla 5.5.

Para manzanas Red Delicious, los menores valores de Cromax fueron observados para los cubos mantenidos en jugo pasteurizado de naranjas conteniendo i) ácido cítrico (P9), ii) ácido cítrico y ascórbico (P8), o iii) bisulfito de sodio (P6), tanto en polietileno como en ESE (Figura 5.1 a) presentando buen color. Otros autores encontraron similares resultados cuando trataron trozos de manzanas con ácidos ascórbico y cítrico alcanzando un 36% de inhibición de la polifenoloxidasasa (Pizzocaro y col., 1993).

Estos resultados concordaron con el análisis sensorial y demostraron que es posible reemplazar una concentración de 0.025 g bisulfito/kg en el producto, por ácido cítrico (1 g/kg), o una combinación de ácido ascórbico (0.15 g/kg) y ácido cítrico (1 g/kg) para evitar el pardeamiento enzimático y mantener el color de las manzanas Red Delicious durante el almacenamiento refrigerado, en ambas películas de envase.

En las Figuras 5.2 y 5.3 se presentan fotografías de los productos obtenidos para la variedad Red Delicious.





Figura 5.3: Producto formulado con cubos de manzanas Red Delicious en jugo pasteurizado de naranjas con agregado de bisulfito de sodio (0.025 g/kg) y sacarosa (20 g/kg) (P6) envasado en polietileno (izquierda) y ESE (derecha), almacenados a 10°C durante 4 días.

Se observó, de acuerdo a lo obtenido mediante medidas del color superficial (Figura 5.1), que los productos formulados con cubos de manzanas Red Delicious en jugo de naranjas pasteurizado con agregados de ácido ascórbico (0.15 g/kg), ácido cítrico (1 g/kg) y sacarosa (20 g/kg) (P8) lograron un buen mantenimiento del color durante su almacenamiento a 10°C en ambas películas de envase utilizadas (Figura 5.2) y por comparación con la Figura 5.3, se concluyó que fue posible reemplazar al bisulfito de sodio en la formulación de los productos, para esta variedad de manzanas.

Con respecto a *Granny Smith*, los valores de *Croma** mostraron que el jugo pasteurizado sin aditivos (P1) permitió un buen mantenimiento del color para ambas películas de envase (Figura 5.1 b).

En la Figuras 5.4 se observa, para manzanas de la variedad *Granny Smith*, que el jugo pasteurizado de naranjas sin ácidos orgánicos agregados con 40 g/kg de sacarosa (P1) logró mantener un color superficial aceptable, luego de 7 días de almacenamiento a 10°C, en películas de alta y baja permeabilidad gaseosa.

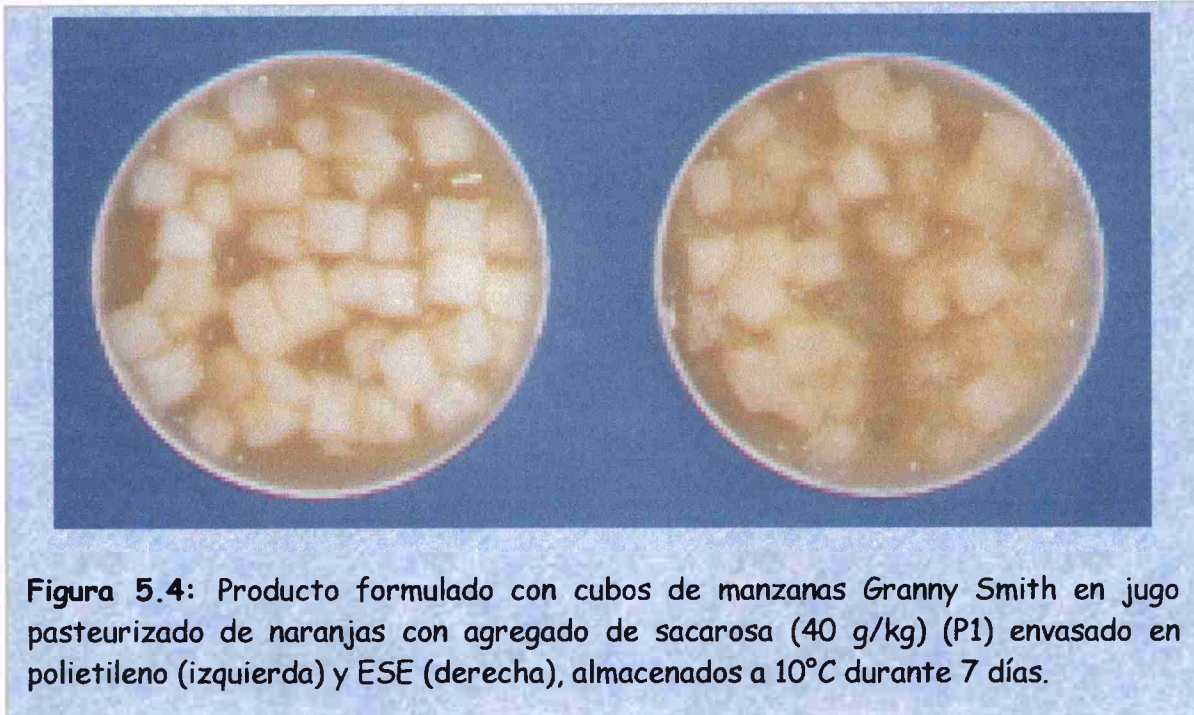


Figura 5.4: Producto formulado con cubos de manzanas *Granny Smith* en jugo pasteurizado de naranjas con agregado de sacarosa (40 g/kg) (P1) envasado en polietileno (izquierda) y ESE (derecha), almacenados a 10°C durante 7 días.

En la Figura 5.5 a,b,c,d se presentan los valores de Diferencia de Cromaticidad obtenidos para manzanas *Red Delicious* (Figura 5.5 a,b) y *Granny Smith* (Figura 5.5 c,d) en las diferentes formulaciones de jugo fresco de naranjas, envasados en ambas películas plásticas (polietileno y ESE, respectivamente). Los valores de $LSD_{0.05}$ obtenidos fueron incluidos en las leyendas de las figuras. Las formulaciones en jugo fresco analizadas corresponden a las mencionadas en la Tabla 5.5, algunas de las cuales contienen diferentes niveles de sorbato de potasio o benzoato de sodio.

Cuando se emplearon formulaciones de jugo fresco de naranjas (Figura 5.5 a,b,c,d) el benzoato de sodio produjo deterioro del color, para ambas variedades. Estos resultados concuerdan con Sapers y col. (1989) quienes reportaron que manzanas *Granny Smith* sufrieron un severo pardeamiento inducido por benzoato que podría ser atribuido a su lenta conversión en sustrato de la polifenoloxidasas. Debido a estos resultados negativos, el benzoato de sodio fue descartado como preservador en estas aplicaciones (sistemas formulados con jugos N12-N15 para *Red Delicious*, y N20-N23 para *Granny Smith*).

Niveles de sorbato de potasio entre 0.125-0.25 g/kg de producto (sistemas formulados con jugo N8 y N9 para Red Delicious, y con jugo N16 y N17 para Granny Smith) produjeron buena retención del color para ambas variedades de manzanas; sin embargo niveles de 0.375-0.50 g/kg produjeron pardeamiento severo (sistemas con jugos N10 y N11 para Red Delicious, y con N18 y N19 para Granny Smith).

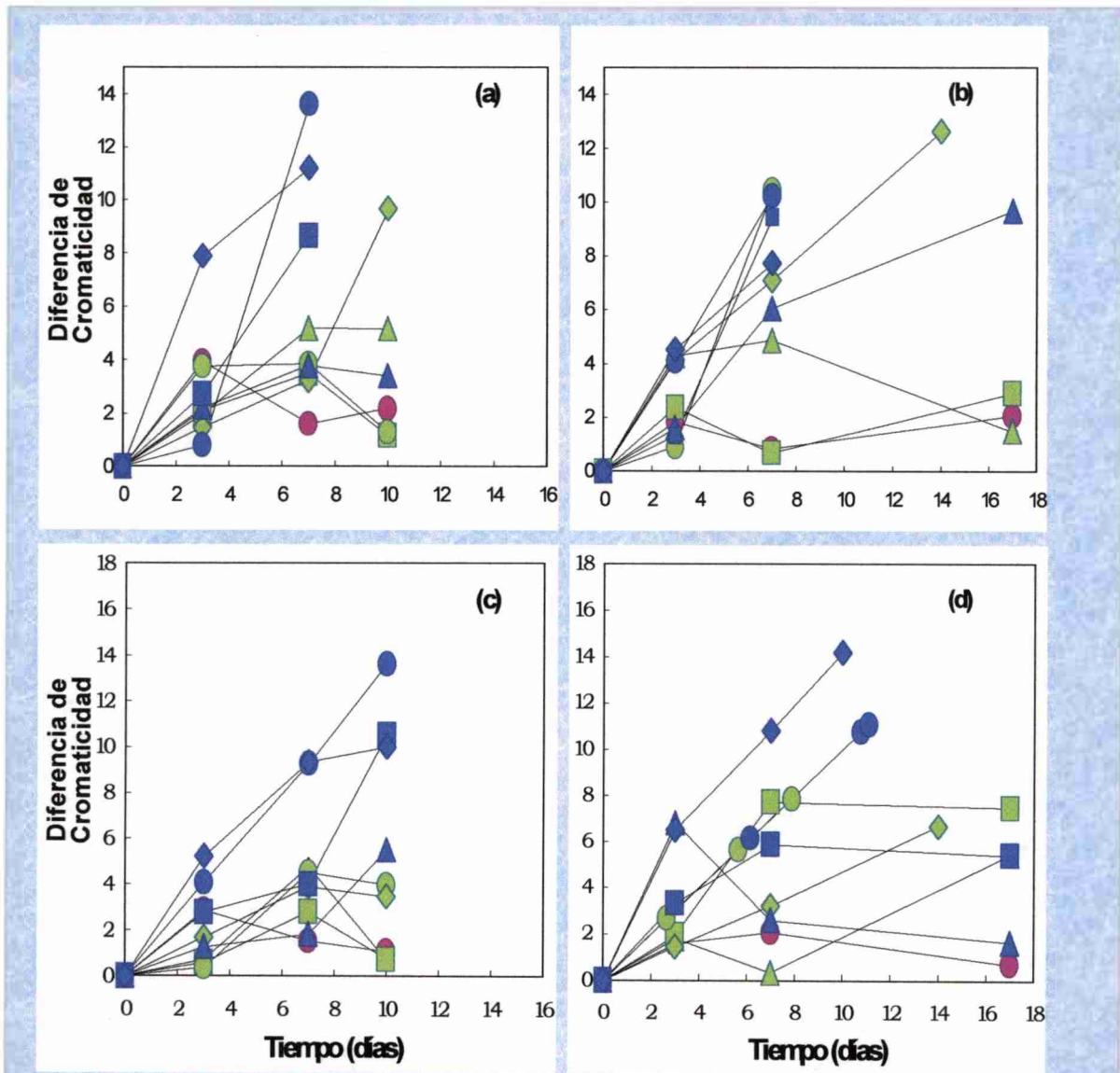


Figura 5.5: Diferencia de Cromaticidad como función del tiempo de almacenamiento a 10°C de cubos de manzanas mantenidos en formulaciones de jugo fresco en diferentes películas de envase.

a,b: Red Delicious; c,d: Granny Smith. a,c: Polietileno. b,d: ESE.

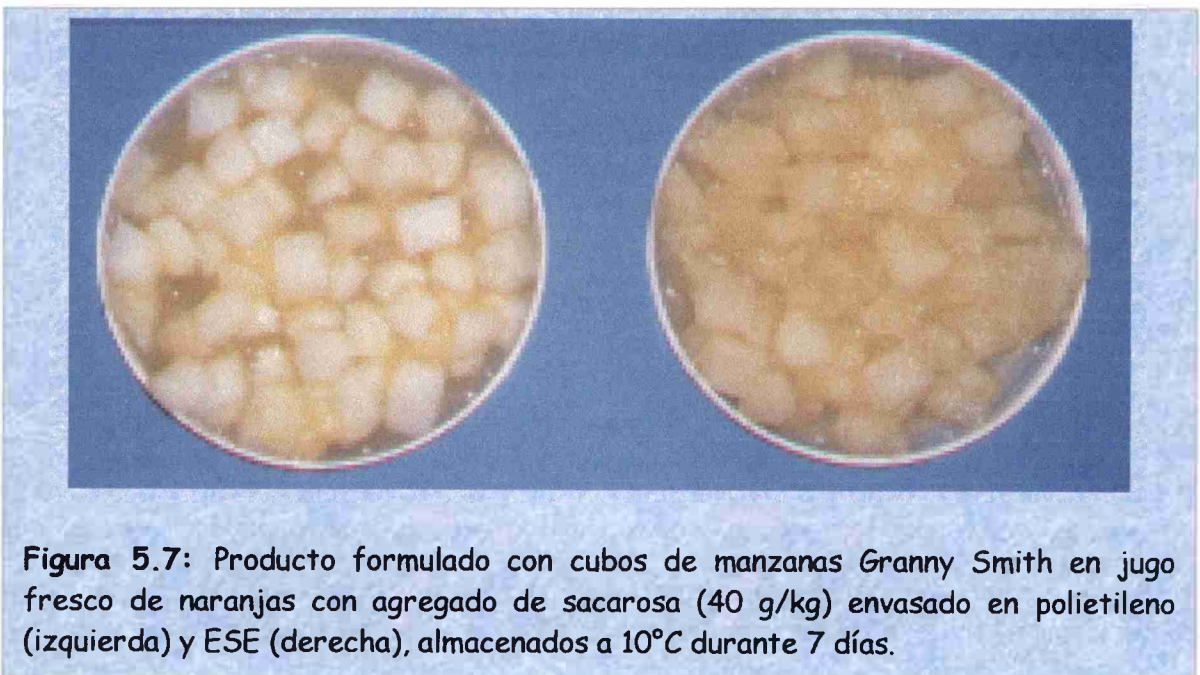
a: $LSD_{0.05} = 0.95$; b: $LSD_{0.05} = 0.91$; c: $LSD_{0.05} = 0.81$; d: $LSD_{0.05} = 0.83$.

a,b: ●N7; ▲N8; ■N9; ●N10; ◆N11; ▲N12; ■N13; ●N14; ◆N15

c,d: ●N1; ▲N16; ■N17; ●N18; ◆N19; ▲N20; ■N21; ●N22; ◆N23

Claves para las formulaciones en Tabla 5.5.

En las Figuras 5.6 y 5.7 se presentan fotografías de los sistemas formulados con jugo fresco de naranjas para ambas variedades de manzanas, donde pueden observarse las buenas características mantenidas en los mismos.



Los valores de Diferencia de Cromaticidad fueron menores en ESE respecto a polietileno ($p < 0.01$) para ambas variedades, mostrando que el empleo de la película de baja permeabilidad al oxígeno logró un mejor mantenimiento del color de las manzanas.

Asimismo, produjo cubos de manzanas con una apariencia traslúcida ("waterlogged appearance") al final del período de almacenamiento a 10°C, con mayores valores de ΔL^* , para ambas variedades de manzanas, mantenidas en las formulaciones de los diferentes jugos. Dichos resultados se presentan en la Figura 5.8. Sapers (1993) describió un efecto similar en manzanas cortadas. Sin embargo, estos cambios que produjeron manzanas más traslúcidas cuando se envasan en películas de baja permeabilidad, no produjeron rechazo por el panel sensorial.

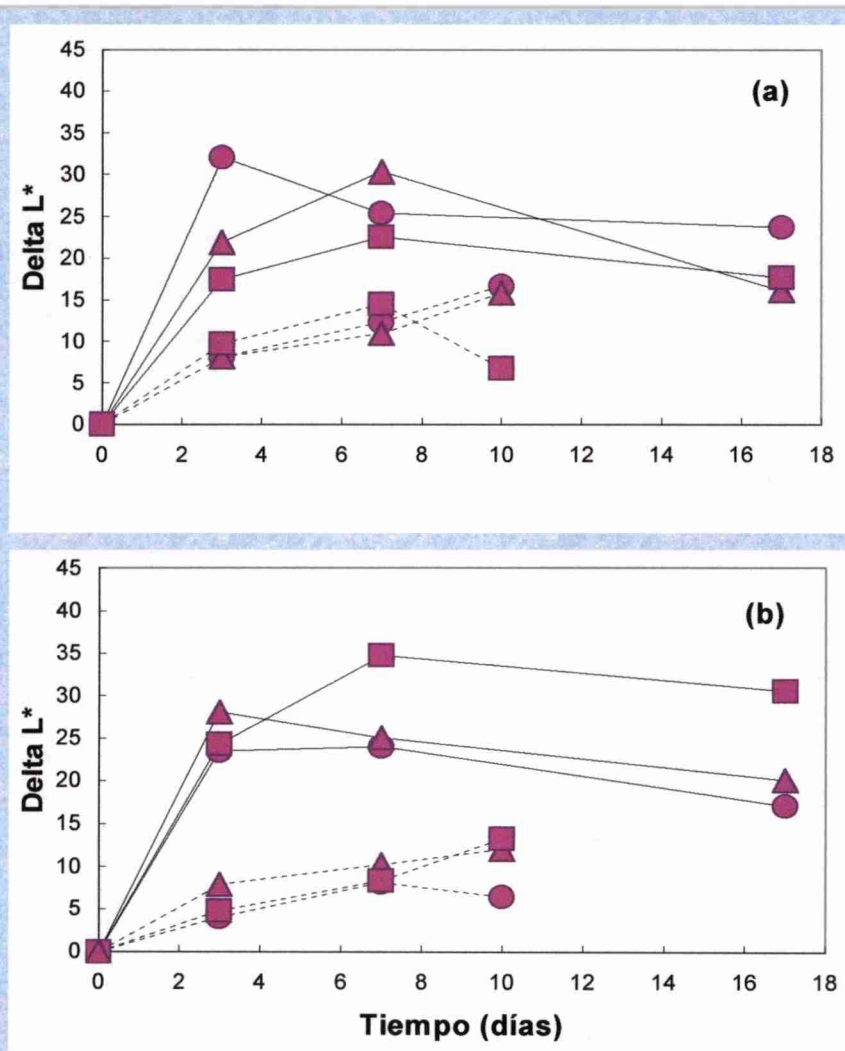


Figura 5.8: Valores de ΔL^* como función del tiempo de almacenamiento a 10°C para cubos de manzanas mantenidos en formulaciones de jugo fresco, envasados en diferentes películas plásticas. a: Red Delicious; b: Granny Smith. (---) Polietileno; (—) ESE. a: $LSD_{0.05} = 2.26$; b: $LSD_{0.05} = 2.55$.

a: ●N7; ▲N8; ■N9

b: ●N1; ▲N16; ■N17

Claves para la formulación de los productos en Tabla 5.5.

5.2.3 Textura

En la Figura 5.9 a,b se presentan las curvas típicas de fuerza máxima de compresión (F) en función de la distancia, obtenidas de respectivos ensayos en Prensa Instron, sobre manzanas *Granny Smith* frescas y mantenidas en jugo de naranjas pasteurizado con sacarosa, envasadas en ESE y almacenadas a 10°C durante 25 días, respectivamente.

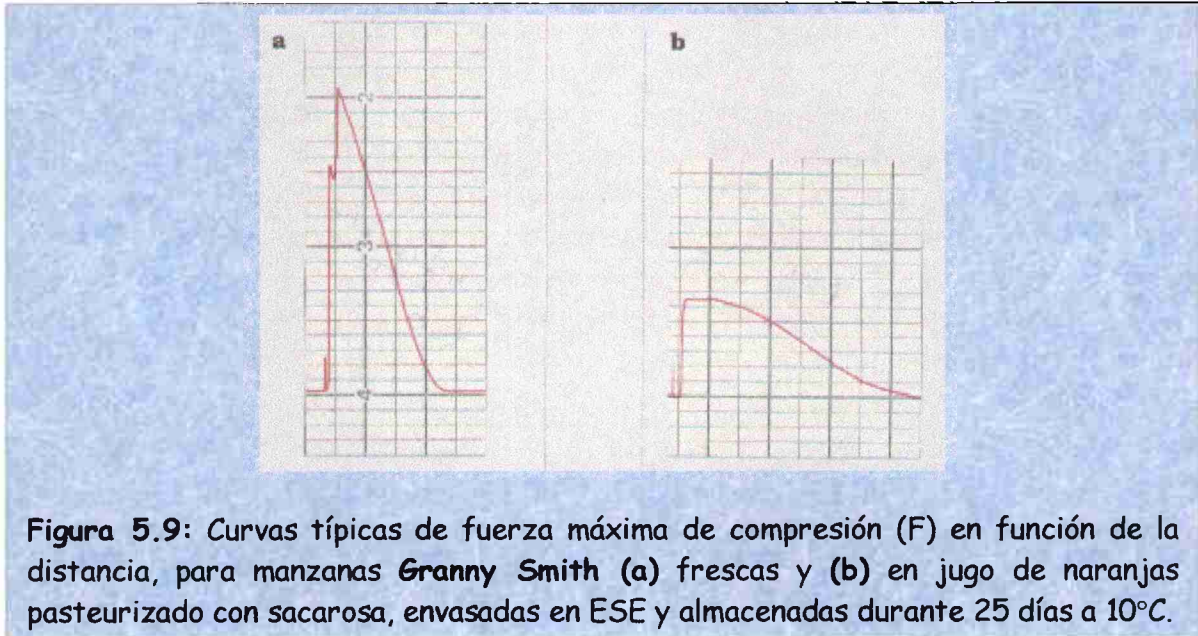


Figura 5.9: Curvas típicas de fuerza máxima de compresión (F) en función de la distancia, para manzanas *Granny Smith* (a) frescas y (b) en jugo de naranjas pasteurizado con sacarosa, envasadas en ESE y almacenadas durante 25 días a 10°C.

Puede observarse, para manzanas *Granny Smith* frescas (Figura 5.9 a) una fuerza máxima de compresión relativamente alta, típica de las manzanas recién cortadas. En la Figura 5.9 b se puede ver, para la misma variedad de manzanas, sobre muestras tratadas, una menor fuerza máxima de compresión, debido al ablandamiento del tejido vegetal luego de 25 días de almacenamiento en jugo de naranjas pasteurizado, a 10°C.

Se estudió la firmeza de las manzanas tratadas durante el almacenamiento refrigerado para evaluar la calidad de los productos. La variación en la textura (Ablandamiento relativo) durante el almacenamiento a 10°C para los productos formulados con manzanas mantenidas en los los diferentes jugos de naranja utilizados (pasteurizado y fresco, seleccionados anteriormente), envasadas en diferentes tipos de películas plásticas, se presentan en la Figura 5.10, para las dos variedades estudiadas. Los valores de $LDS_{0.05}$ obtenidos fueron incluidos en la leyenda de la figura.

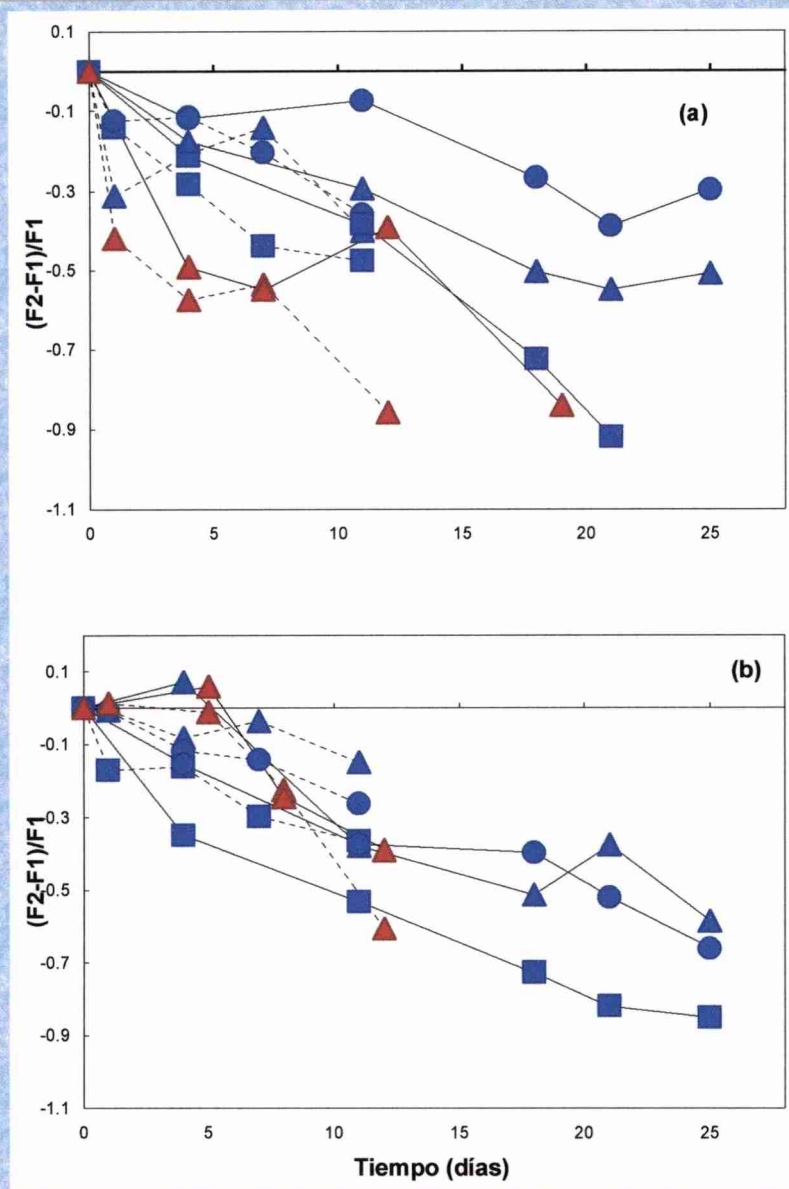


Figura 5.10: Ablandamiento Relativo como función del tiempo de almacenamiento a 10°C de cubos de manzanas (a) Red Delicious y (b) Granny Smith en diferentes formulaciones de jugo, envasados en distintas películas plásticas: (---) Polietileno; (—) ESE.

a: (■) P8* (▲) P8** (●) P8*** (▲) N7**. $LSD_{0.05} = 0.030$

b: (■) P1* (▲) P1** (●) P1*** (▲) N1**. $LSD_{0.05} = 0.021$

Claves para la formulación de los productos en Tabla 5.5. *sin endulzantes; **con sacarosa: (a) 20 g/kg (b) 40 g/kg; *** con edulcorante: (a) 1 g/kg (b) 2 g/kg

En la Figura 5.10 puede observarse que, hasta los 4 y 8 días de almacenamiento, las diferencias en los valores de ablandamiento relativo para las variedades Red Delicious y Granny Smith, en ambas películas de envase y bajo todos los tratamientos analizados,

fueron no significativas ($p > 0.05$). La película plástica utilizada no fue un factor significativo ($p < 0.05$) para ambas variedades de manzanas.

El ablandamiento relativo para las manzanas Red Delicious fue significativamente menor ($p < 0.05$) en jugo de naranjas pasteurizado con ácido cítrico, ácido ascórbico y sacarosa (P8) respecto al jugo fresco de naranjas con dichos aditivos (N7) (Figura 5.10 a). Para la variedad Granny Smith, el tipo de jugo no presentó diferencias significativas en la textura de las manzanas (Figura 5.10 b).

● Observación del tejido de las manzanas mediante ESEM

Los cubos de manzanas de ambas variedades fueron observados mediante Microscopía Electrónica Ambiental de Barrido (ESEM), con el fin de visualizar el efecto de los tratamientos sobre las características del tejido vegetal.

En las Figura 5.11 y 5.12 se presentan, a modo de ejemplo, micrografías de tejidos de ambas variedades de manzanas (Red Delicious y Granny Smith, respectivamente) recién cortadas y mantenidas en diferentes jugos de naranjas, envasadas en películas plásticas y almacenadas a 10°C .



Figura 5.11: Tejidos de manzanas Red Delicious recién cortadas (izquierda, barra= $450\ \mu\text{m}$) y mantenidas en jugo de naranjas pasteurizado (P8) en polietileno durante 2 días a 10°C (derecha, barra= $200\ \mu\text{m}$), observados mediante ESEM.

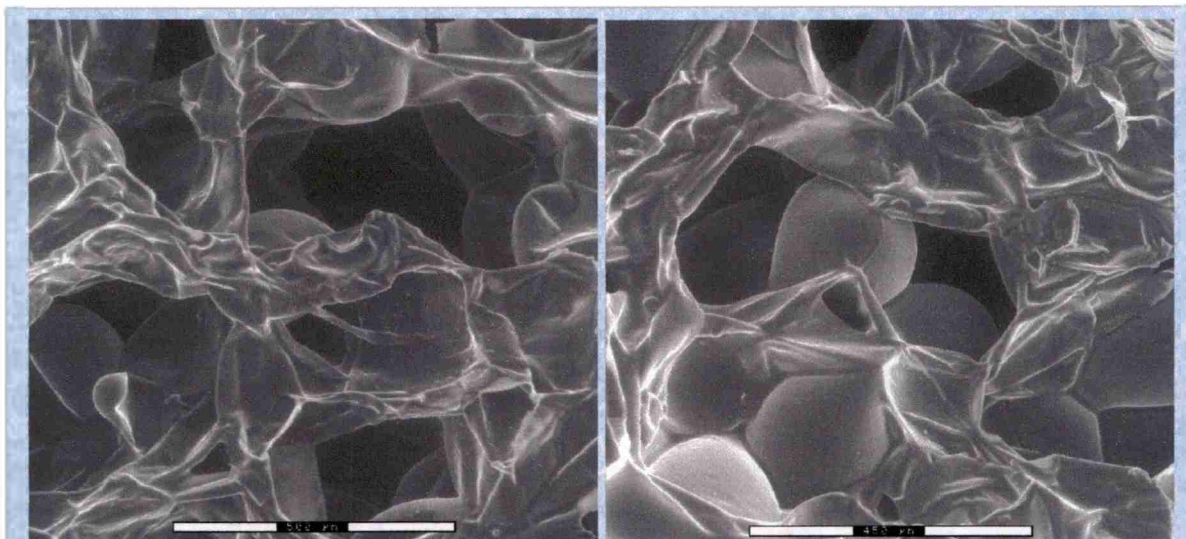


Figura 5.12: Tejidos de manzanas *Granny Smith* recién cortadas (izquierda, barra= 500 µm) y mantenidas en jugo fresco de naranjas (N1) en polietileno durante 2 días a 10°C (derecha, barra= 450 µm) observados mediante ESEM.

Como puede observarse en las Figuras 5.11 y 5.12, para ambas variedades de manzanas analizadas, no se observaron importantes cambios en sus tejidos, para ninguno de los tratamientos evaluados, en ambas películas de envase utilizadas.

5.2.4. Estudios microbiológicos

5.2.4.1 Identificación de la Flora microbiana

Flora natural de manzanas sin jugo

En la Tabla 5.6 se presentan los resultados obtenidos en los diferentes medios de cultivo analizados.

Tabla 5.6: Flora microbiana natural de manzanas peladas y cortadas

Microorganismos	UFC/g
Microorg. que crecen en PCA a 30°C	8 10 ¹
Microorg. que crecen en PCA a 4°C	5 10 ¹
Microorg. que crecen en YGC	3 10 ²
Microorg. que crecen en MRS	2 10 ² (*)
Microorg. que crecen en ABRV	5 10 ² (*)

(*) Mediante la coloración de Gram practicada a las colonias obtenidas, se comprobó que las que desarrollaban en agar MRS y ABRV eran hongos y levaduras, características por su gran tamaño.

Puede observarse en la Tabla 5.6 que la flora natural estuvo principalmente compuesta por hongos y levaduras, como datos bibliográficos (Wiley, 1994).

Para ambas variedades de manzanas mantenidas en jugo fresco de naranjas con los preservadores seleccionados anteriormente, envasados en polietileno y almacenado a 20°C durante 4 días (condiciones de almacenamiento acelerado), se observó producción de gas dentro del envase ("envase hinchado") y al abrirlo, aroma a "fermentado". En la Tabla 5.7 se presentan los resultados obtenidos para los distintos medios de cultivo utilizados, para ambas variedades de manzanas analizadas.

Puede verse (Tabla 5.7), que en este tipo de sistemas, integrado por manzanas frescas y jugo fresco de naranjas, la flora microbiana predominante al final del almacenamiento consistió en hongos y levaduras, coincidiendo con lo encontrado anteriormente para los cubos de manzanas sin jugo de naranjas, y alcanzando niveles de 10⁸ UFC/g, con alteraciones en el aroma y aspecto del producto, desagradables para el consumidor.

● Identificación de microorganismos presentes en el sistema: manzanas en jugo fresco de naranjas

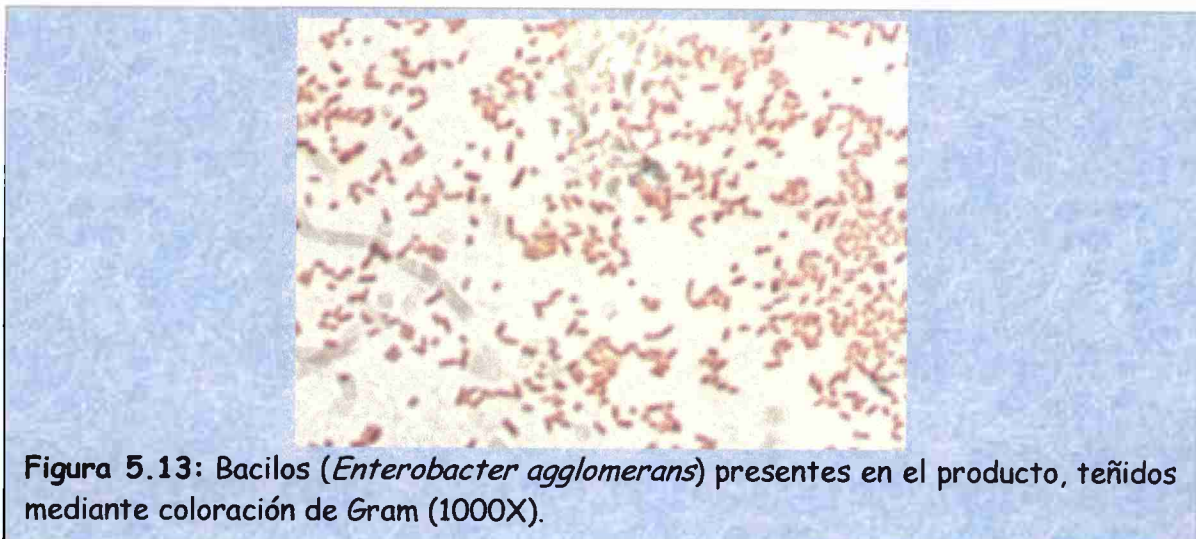
> Identificación de bacterias

De las placas de agar PCA (realizadas para recuentos, resultados que se presentaran posteriormente) se aislaron dos colonias bacterianas con distintas características, las que fueron sometidas a una serie de pruebas mediante un kit de identificación para bacterias Gram (-), oxidasa (-). Las características de las bacterias aisladas se presentan en la Tabla 5.8.

Tabla 5.8: Características de las bacterias aisladas del sistema de manzanas en jugo fresco de naranjas

	Cepa A	Cepa B
Morfología de las colonias	húmedas de color amarillo	húmedas incoloras
Coloración de Gram	(-)	(-)
Prueba de la oxidasa	(-)	(-)
Pruebas bioquímicas:		
TDA (Triptofano desaminasa)	(-)	(-)
H ₂ S	(-)	(-)
Esculina	(+)	(+)
Indol	(-)	(-)
Urea	(-)	(+)
LDC (Lisina decarboxilasa)	(-)	(-)
ODC (Ornitina decarboxilasa)	(-)	(+)
ADH (Arginina dehidrolasa)	(-)	(+)
Glucosa	(+)	(+)
Citrato	(+)	(+)
Malonato	(+)	(+)
Voges-Proskauer	(+)	(+)
Rhamnosa	(+)	(+)
Sucrosa	(+)	(+)
Adonitol	(-)	(+)
Inositol	(-)	(-)
Xilosa	(+)	(+)
Sorbitol	(-)	(+)
ONPG (o-nitrofenil β-galactósido)	(-)	(+)
ONPX (o-nitrofenol-xilopiranosido)	(-)	(+)
P _g ur (p-nitrofenil β-glucurónido)	(-)	(-)

En base a todos estos datos se concluyó que la cepa A era *Enterobacter agglomerans* (probabilidad del 99%) y la cepa B, *Enterobacter cloacae* (probabilidad del 99%). Una fotografía al microscopio óptico se presenta en la Figura 5.13.



➤ **Identificación de levaduras y hongos**

🍄 **Levaduras**

Para la identificación de levaduras, se aislaron colonias provenientes de placas de agar YGC realizadas para recuentos. Las mismas fueron sometidas a diferentes pruebas de crecimiento y de fermentación, cuyos resultados se presentan en la Tabla 5.9.

Tabla 5.9: Características de las levaduras aisladas (Cepas A y B).

	Cepa A	Cepa B
Morfología de las colonias	Mucosa, bordes redondeados, pigmento rosado	Mucosa, bordes redondeados, sin pigmento
Morfología celular	Elipsoidales	Elipsoidales
Tipo de reproducción	Brotación	Brotación
Crecimiento a 37°C	variable (v)	+
Fermentación de Glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa y galactosa	-----	+-----
Asimilación de NO ₃ ⁻	-	-
Hidrólisis de urea	-	-
Asimilación de:		
Galactosa	v	+
L-sorbitol		+
Sacarosa	+	+
Maltosa	v	+
Celobiosa	v	-
Trehalosa	+	+
Lactosa	-	-
Melibiosa	-	-
Rafinosa	+	-
Melezitosa	v	+
D-xilosa	+	+
L-arabinosa	v	-
D-ribosa	v	-
D-manosa	v	+
Inositol	-	-

Se determinaron género y especie de las levaduras aisladas de acuerdo a las claves de identificación propuestas por el Departamento de Micología del Instituto de Microbiología Dr. Carlos Malbrán, basado en los criterios descriptos por Kreger-Van Rij, 1984. Con todos estos datos, se concluyó que la cepa A era *Rhodotorula rubra* y, la cepa B, *Cándida quercitrusa*, ambas pertenecientes a las levaduras generalmente presentes en frutas, según datos de bibliografía (Brackett, 1994). Los cultivos en medio

Sabouroud, así como la morfología de estas cepas se presentan en la Figura 5.14 y 5.15, respectivamente.



Figura 5.14: Levaduras identificadas en medio Sabouroud. Derecha: *Rhodotorula rubra*, Izquierda: *Cándida quercitrusa*.

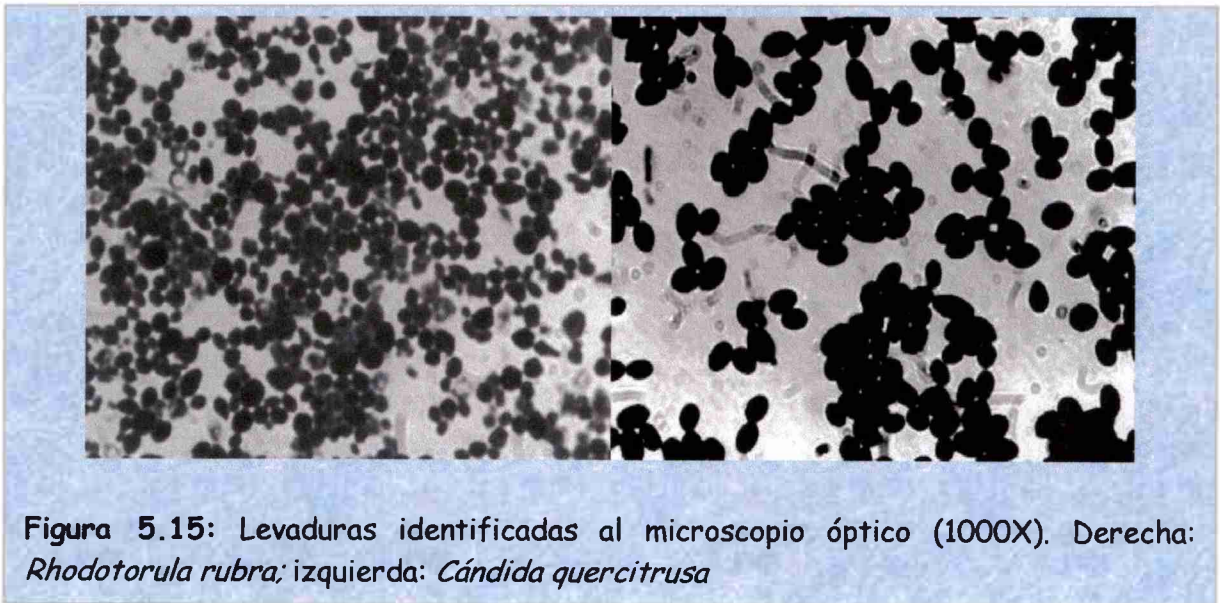


Figura 5.15: Levaduras identificadas al microscopio óptico (1000X). Derecha: *Rhodotorula rubra*; izquierda: *Cándida quercitrusa*

● Hongos filamentosos

La identificación de hongos se realizó a partir de colonias provenientes de placas de recuento en agar YGC. Las características de los mismos se presentan en la Tabla 5.10.

Tabla 5.10: Características de los hongos filamentosos aislados

Cepa	Aspecto en medio solido	Características microscópicas
1	negro, reverso negro	micelio filamentososo, ramificado, tabicado con hifas pigmentadas; conidios unicelulares, ovals y elongados
2	gris, reverso claro	micelio filamentososo, ramificado y tabicado con conidióforos en forma de pincel y conidios esféricos
3	claro, reverso pardo y pigmento pardo que difunde	micelio filamentososo, ramificado y tabicado con conidióforos en forma de pincel y conidios esféricos
4	gris, reverso gris	micelio filamentososo, ramificado, tabicado; conidióforos oscuros en racimos, conidios redondios
5	gris parduzca, reverso pardo	micelio filamentososo, ramificado, tabicado color marrón, conidióforos simples, conidios terminales oscuros
6	parda, reverso pardo y pigmento que difunde	micelio ramificado, conidióforos simples, conidios con fructificación en racimos

Los hongos filamentosos aislados resultaron ser:

- cepa 1.....*Cladosporium* sp.
- cepa 2.....*Penicillium* sp.
- cepa 3.....*Penicillium* sp.
- cepa 4.....*Epicoccum* sp.
- cepa 5.....*Stemphylium* sp.
- cepa 6.....*Drechslera* sp.

En la Figura 5.16 se presentan fotografías de los hongos filamentosos aislados crecidos en medio Sabouroud.



Figura 5.16: Hongos filamentosos aislados crecidos en agar Sabouroud a 30°C

Asimismo en la Figura 5.17 se muestran microfotografías de dichos hongos obtenidas mediante ESEM. Mediante esta técnica los microorganismos pudieron ser observados evitando distorsiones, sin fijación y deshidratación de las muestras.

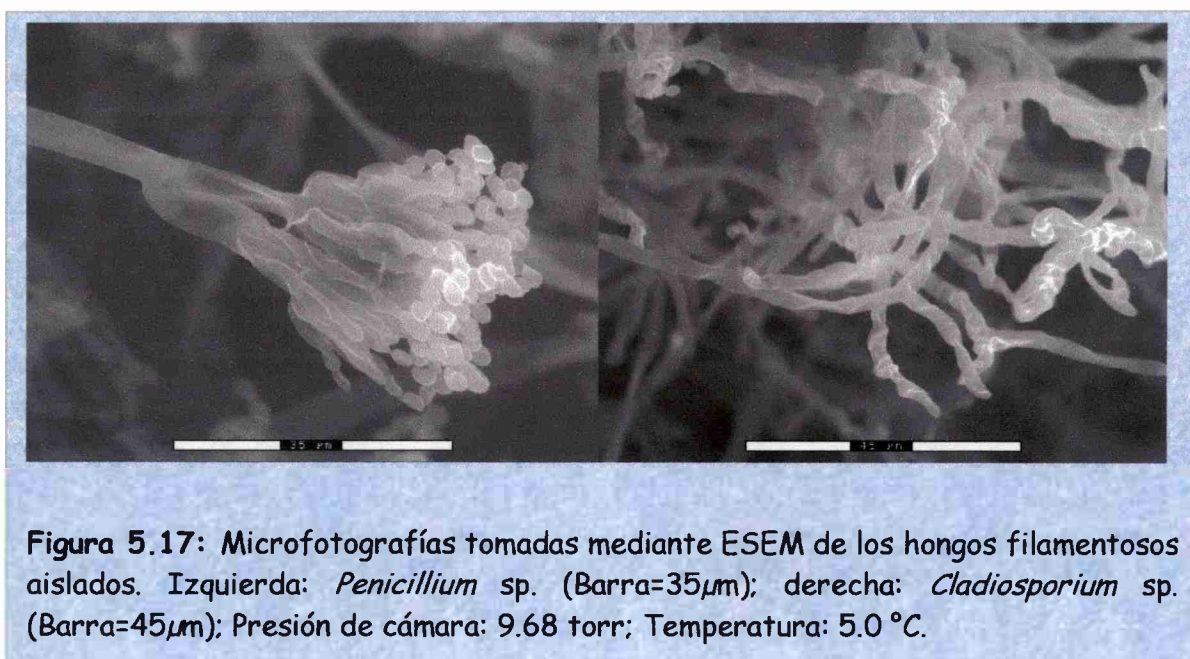


Figura 5.17: Microfotografías tomadas mediante ESEM de los hongos filamentosos aislados. Izquierda: *Penicillium* sp. (Barra=35µm); derecha: *Cladosporium* sp. (Barra=45µm); Presión de cámara: 9.68 torr; Temperatura: 5.0 °C.

Parish y Higgins (1989) aislaron de jugo de naranja no pasteurizado hongos tales como *Cándida maltosa*, *C. sake*, *Fusarium* sp., *Geotricum* sp., *Hanseniaspora* sp., *H. guilliermondii*, *Penicillium* sp., *Pichia membranaefaciens*, *Sacharomyces cerevisiae*,

Schwanniomyces occidentalis, y *Torulasporea delbrueckii*, coincidiendo con los resultados antes presentados. Sin embargo, reportaron la presencia de *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum*, *L. thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Le. dextransicum* en productos cítricos, no aislándose dichos microorganismos en los sistemas analizados en este trabajo y almacenados a 10°C o 30°C, para ambas películas de envase.

5.2.4.2 Recuentos microbianos

Manzanas sin jugo

A efectos de evaluar el desarrollo microbiano en los cubos de manzanas sin agregados de jugo de naranja, se realizaron los recuentos de hongos y levaduras (microorganismos predominantes) durante su almacenamiento a 10°C en ambas películas plásticas. En la Figura 5.18 se presentan los resultados obtenidos.

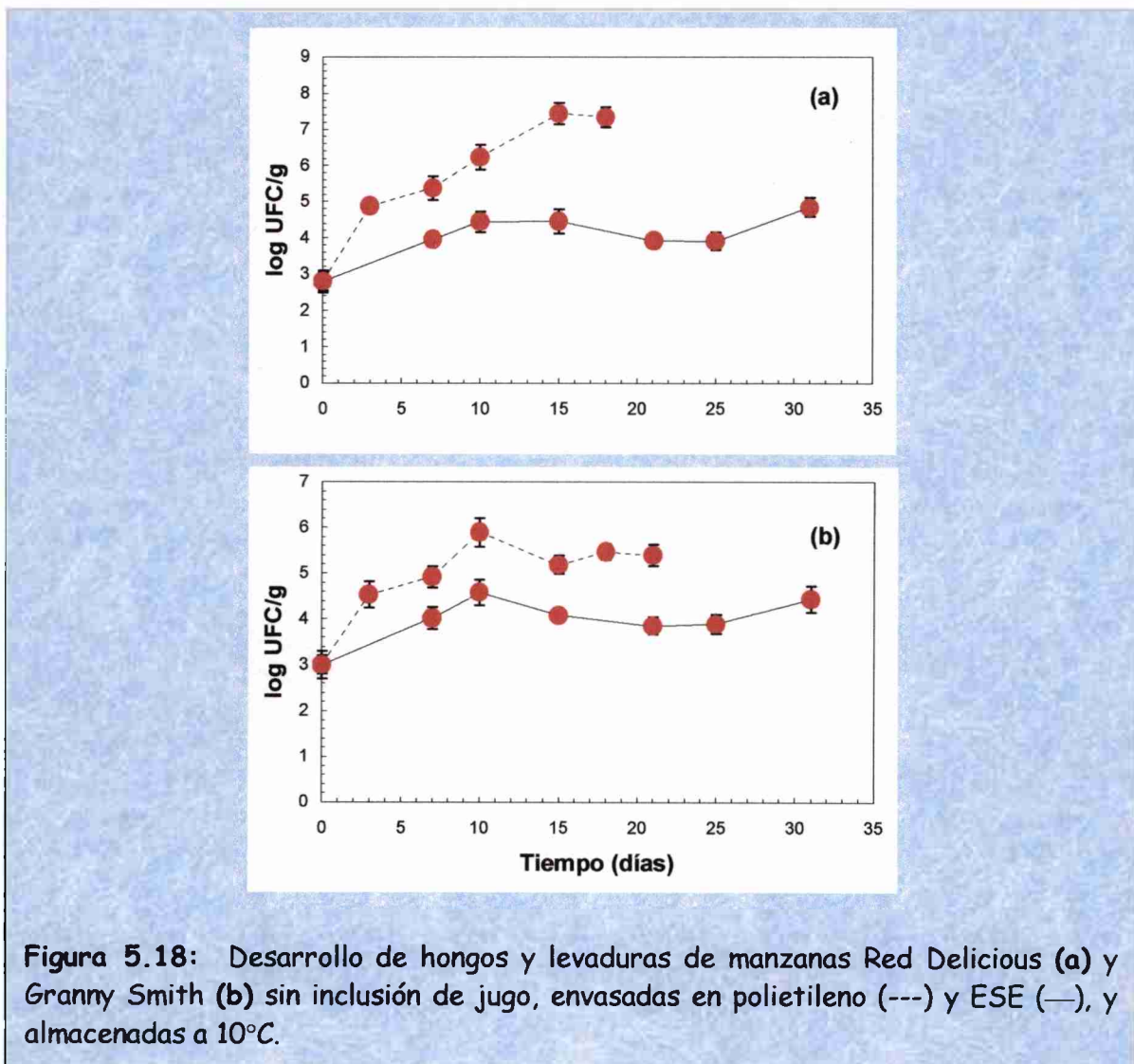


Figura 5.18: Desarrollo de hongos y levaduras de manzanas Red Delicious (a) y Granny Smith (b) sin inclusión de jugo, envasadas en polietileno (---) y ESE (—), y almacenadas a 10°C.

Los recuentos microbianos iniciales (hongos y levaduras) en los cubos de manzanas de ambas variedades sin jugo de naranjas, variaron entre 10^2 - 10^3 UFC/g. Similares resultados fueron informados por Brackett (1994).

Puede verse, que para los cubos de la variedad Red Delicious sin jugo de naranja, envasados en polietileno, los recuentos de hongos y levaduras alcanzan niveles de 10^6 UFC/g a los 9 días de almacenamiento a 10°C , mientras que en ESE, se alcanzaron recuentos de 10^5 UFC/g a los 32 días de almacenamiento a la misma temperatura.

Para los cubos de la variedad Granny Smith sin jugo de naranjas, en ambas películas de envase utilizadas, los niveles de hongos y levaduras fueron inferiores a 10^6 UFC/g aún al final del almacenamiento a 10°C , siendo menores en un ciclo logarítmico, en ESE respecto a polietileno.

La calidad sanitaria de los cubos de manzanas sin jugo de naranjas, envasados en polietileno, expresada como Recuento de Coliformes Totales, resultaron ser inferiores a 2 NMP/g, a los 21 días de almacenamiento a 10°C , para ambas variedades. Asimismo, para los cubos de ambas variedades envasados en ESE, los recuentos de microorganismos sulfito reductores fueron inferiores a 2 NMP/g, al final del almacenamiento refrigerado.

Manzanas en jugo de naranjas pasteurizado con agregado de preservadores químicos naturales

Se realizaron los recuentos de microorganismos totales en PCA a 30°C , hongos y levaduras en YGC a 30°C , y microorganismos psicrótrofos en PCA a 4°C durante el almacenamiento a 10°C de los sistemas elaborados con cubos de manzanas y jugo de naranjas pasteurizado, con agregado de ácido ascórbico (0.15 g/kg) y ácido cítrico (1 g/kg) (jugo P8), para la variedad Red Delicious, y sin agregado de ácidos para la variedad Granny Smith (jugo P1), con o sin agregado de endulzantes (sacarosa y aspartame, en los niveles seleccionados previamente por el panel). En las Figuras 5.19 y 5.20 se presentan los resultados obtenidos para cada tipo de microorganismo analizado para manzanas Red Delicious y Granny Smith, respectivamente.

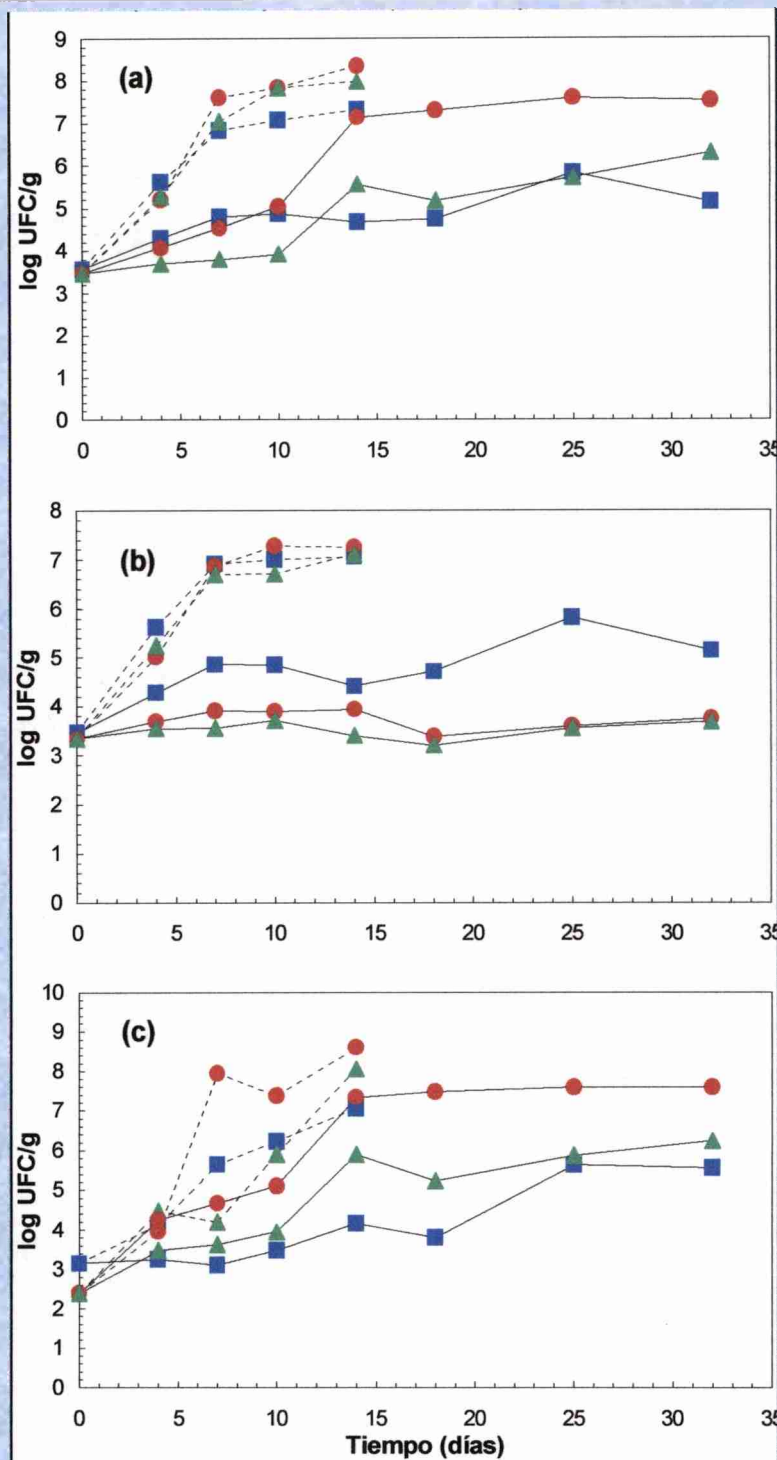


Figura 5.19: Desarrollo de microorganismos totales (a), hongos y levaduras (b) y microorganismos psicrótrofos (c) en cubos de manzanas Red Delicious mantenidas en: (■) jugo de naranjas pasteurizado con ácido ascórbico (0.15 g/kg), ácido cítrico (1 g/kg) (jugo P8); (●) jugo P8 con 20 g/kg de sacarosa; (▲) jugo P8 con 1 g/kg de aspartame. Película de envase: (---) Polietileno; (—) ESE. Temperatura de almacenamiento: 10°C. Claves para la formulación de los productos en Tabla 5.5.

a: $LSD_{0.05} = 0.27$; b: $LSD_{0.05} = 0.24$; c: $LSD_{0.05} = 0.30$.

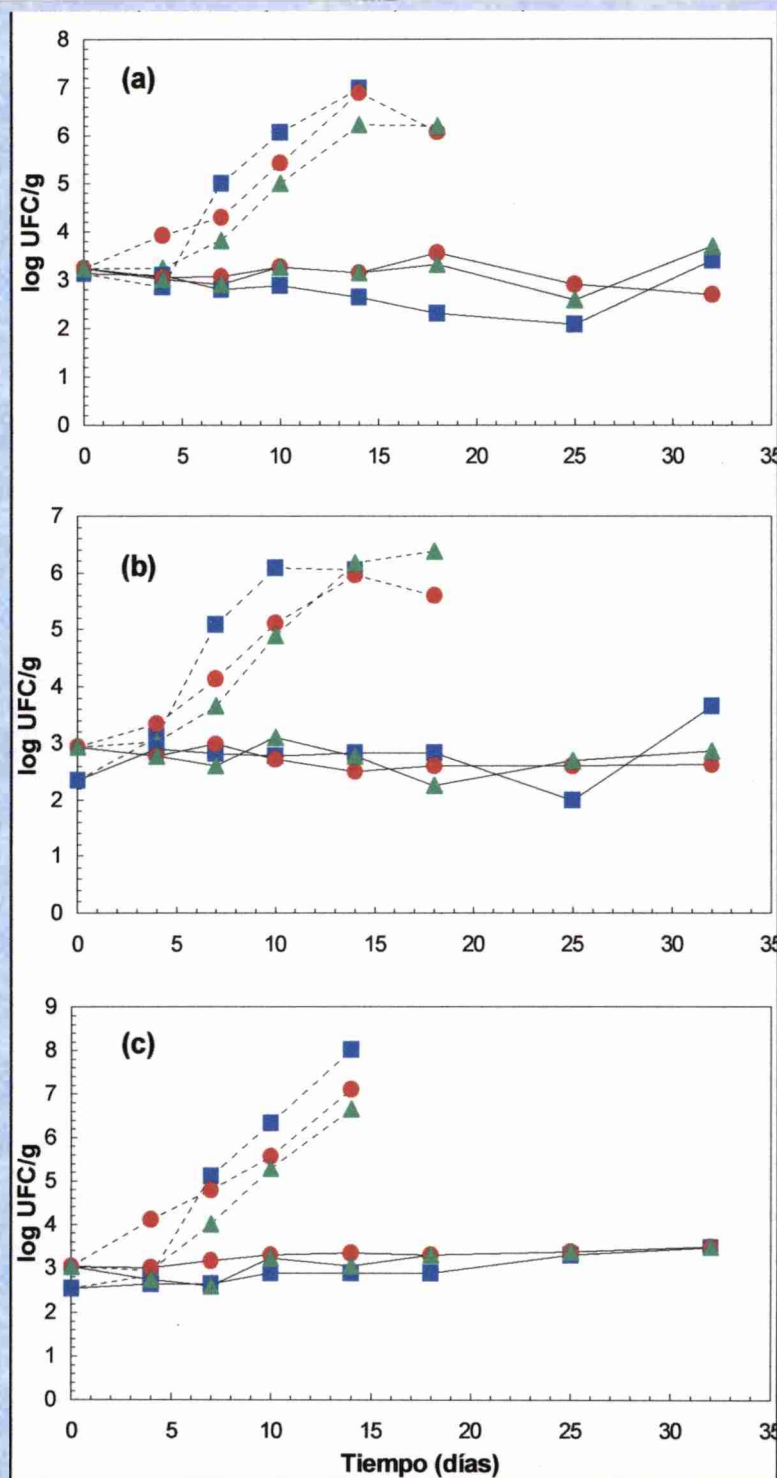


Figura 5.20: Desarrollo de microorganismos totales (a), hongos y levaduras (b) y microorganismos psicrótrofos (c) en cubos de manzanas Granny Smith mantenidas en: (■) jugo de naranjas pasteurizado (jugo P1); (●) jugo P1 con 20 g/kg de sacarosa; (▲) jugo P1 con 1 g/kg de aspartame. Película de envase: (---) Polietileno; (—) ESE. Temperatura de almacenamiento: 10°C. Claves para la formulación de los productos en Tabla 5.5.

a: $LSD_{0.05} = 0.27$; b: $LSD_{0.05} = 0.24$; c: $LSD_{0.05} = 0.28$.

Los recuentos de microorganismos totales, hongos y levaduras, así como de microorganismos psicrótrofos mostraron igual comportamiento durante el almacenamiento refrigerado, para ambas variedades de manzanas analizadas (Figuras 5.19 y 5.20). Enterobacteriaceae y Lactobacillus sp. presentaron, en todos los sistemas analizados, recuentos menores a 10^2 UFC/g.

En las Figuras 5.19 y 5.20 puede verse claramente el efecto de la permeabilidad de la película de envase sobre el desarrollo microbiano en manzanas Red Delicious y Granny Smith, respectivamente. El empleo de películas de baja permeabilidad gaseosa (ESE) ejerció un fuerte efecto inhibitor sobre los microorganismos totales, psicrótrofos y sobre los hongos y levaduras, para todos los tratamientos evaluados.

Así, las manzanas de la variedad Red Delicious mantenidas en jugo pasteurizado con ácidos ascórbico y cítrico (P8), con o sin agregado de endulzantes, envasada en ESE alcanzaron recuentos de hongos y levaduras entre 10^4 y $5 \cdot 10^5$ UFC/g al final del almacenamiento refrigerado, mientras que para la variedad Granny Smith mantenidas en jugo pasteurizado (P1), con o sin agregado de endulzantes, los recuentos permanecieron en 10^3 UFC/g durante los 30 días de almacenamiento a 10°C .

En polietileno, en cambio, se alcanzaron recuentos de hongos y levaduras de 10^6 UFC/g a los 5 días de almacenamiento para la variedad Red Delicious en jugos P8 con diferentes agregados de sacarosa o aspartame, mientras que iguales recuentos se obtuvieron a los 10 y 12 días para la variedad Granny Smith en jugos P1, con o sin agregados de sacarosa o aspartame.

El recuento de microorganismos sulfito reductores realizado sobre las manzanas envasadas en ESE y el recuento de coliformes totales realizado sobre las manzanas envasadas en ambas películas, al final del almacenamiento, fueron menores a 2 NMP/g para las dos variedades de manzanas estudiadas, lo que indicó que es un producto seguro microbiológicamente.

☉ Sistema de manzanas en jugo fresco de naranjas. Efecto del agregado de sorbato de potasio. Modelado matemático

Se estudió el efecto del agregado de diferentes niveles de sorbato de potasio sobre el recuento microorganismos totales y de hongos y levaduras, durante el almacenamiento a 10°C de los productos formulados a base de manzanas (de ambas variedades) en jugo fresco con los preservadores seleccionados en primera etapa, envasados en películas de alta y baja permeabilidad gaseosa. Asimismo, se compararon dichos resultados con lo obtenido en los sistemas formulados con jugo pasteurizado.

En la Figura 5.21 a, b, c y d se presentan los recuentos obtenidos para los recuentos de hongos y levaduras como función del tiempo de almacenamiento a 10°C. Los modelos de Gompertz y Lineal fueron ajustados a los resultados experimentales. Las líneas continuas en la Figura 5.21 corresponden a los ajustes de los modelos matemáticos (Gompertz o Lineal) para las diferentes condiciones estudiadas. Los resultados para Red Delicious en Polietileno y ESE se muestran en la Figura 5.21 a y b, respectivamente; similares resultados para Granny Smith se presentan en la Figura 5.21 c y d.

Los valores obtenidos de los parámetros de Gompertz ($\log N = a + c \exp(-\exp(-b(t-m)))$), ec. 1 de Materiales y Métodos) (a , b , c , m), los parámetros derivados (velocidad de crecimiento exponencial (μ); duración de la fase de latencia (LPD), máxima densidad de población (MPD)) en los casos en que se observó crecimiento microbiano y, pendiente (R) del modelo lineal, se presentan en la Tabla 5.11.

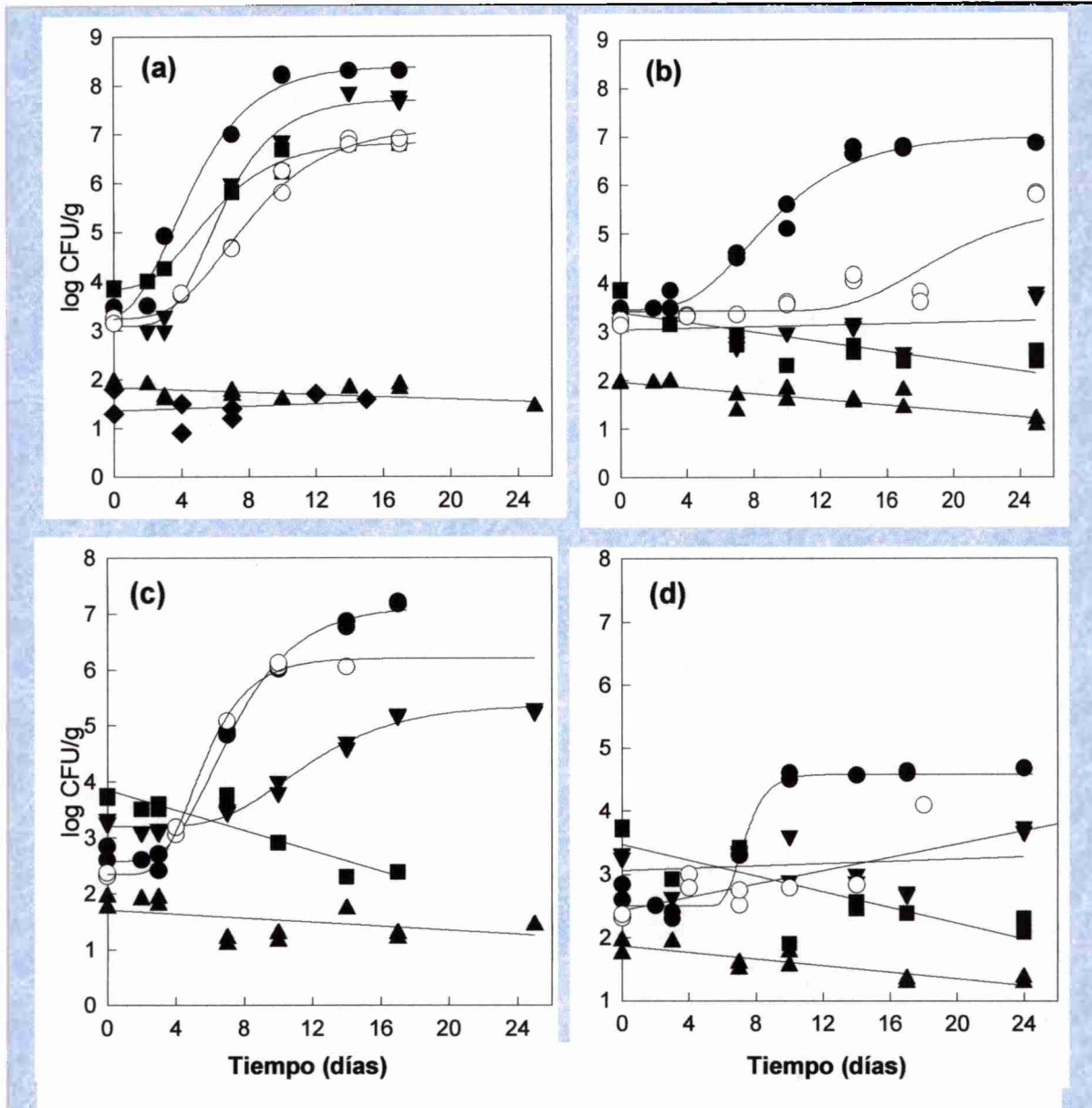


Figura 5.21: Recuentos de hongos y levaduras como función del tiempo de almacenamiento a 10°C. Las líneas continuas corresponden al ajuste de los modelos matemáticos (Gompertz o Lineal) para las diferentes condiciones estudiadas. a,b: Red Delicious; c,d: Granny Smith. a,c: Polietileno. b,d: ESE.

a,b: (●) N7; (▼) N8; (■) N9; (◆) N10; (▲) N11; (○) P8.

c,d: (●) N1; (▼) N16; (■) N17; (▲) N19; (○) P1.

Claves para la formulación de los productos en Tabla 5.5.

5. CALIDAD DEL SISTEMA: MANZANAS EN JUGOS DE BAJO pH

Tabla 5.11: Parámetros de los ajustes de las ecuaciones a los recuentos de hongos y levaduras en cubos de manzanas Red Delicious y Granny Smith, mantenidas en diferentes jugos de naranja con preservadores, envasados en polietileno o ESE y almacenados a 10°C. Parámetros de Gompertz (a, b, c, m) y parámetros derivados (velocidad específica de crecimiento (μ); duración de la fase de latencia (LPD), máxima densidad de población (MPD) obtenidos en los casos de crecimiento microbiano, y pendiente (R) del modelo lineal cuando se observó efecto bacteriostático o bactericida.

Variedad de manzana	Película de envase	Jugo	Modelo de Gompertz				Parámetros Derivados			Modelo Lineal
			a [log(UFC/g)]	b [días ⁻¹]	c [log(UFC/g)]	m [días]	μ [log(UFC/g)/día]	LPD [días]	MPD [log(UFC/g)]	R [log(UFC/g)/día]
Red Delicious	Polietileno	P8	3.21(0.123)	0.265(0.049)	4.27(0.421)	7.03(0.45)	0.42	3.46	7.48	-
		N7	3.19(0.26)	0.395(0.06)	5.2(0.34)	3.59(0.36)	0.76	1.06	8.39	-
		N8	3.09(0.14)	0.45(0.08)	4.62(0.22)	5.55(0.35)	0.76	3.33	7.71	-
		N9	3.84(0.08)	0.38(0.003)	2.99(0.12)	4.76(0.27)	0.42	2.13	6.83	-
		N10	-	-	-	-	-	-	-	0.012
		N11	-	-	-	-	-	-	-	-0.012
	ESE	P8	3.42(0.17)	0.25(0.14)	2.15(0.58)	17.73(2.18)	0.20	13.73	5.57	-
		N7	3.45(0.12)	0.286(0.05)	3.54(0.21)	7.69(0.45)	0.37	4.19	6.99	-
		N8	-	-	-	-	-	-	-	0.007
		N9	-	-	-	-	-	-	-	-0.049
		N11	-	-	-	-	-	-	-	-0.030
Granny Smith	Polietileno	P1	2.35(0.09)	0.55(0.06)	3.86(0.14)	4.89(0.17)	0.78	3.07	6.21	-
		N1	2.58(0.104)	0.38(0.05)	4.55(0.19)	6.24(0.26)	0.64	3.61	7.13	-
		N16	3.2(0.05)	0.27(0.036)	2.17(0.1)	10.26(0.37)	0.22	6.56	5.37	-
		N17	-	-	-	-	-	-	-	-0.091
		N19	-	-	-	-	-	-	-	-0.018
	ESE	P1	-	-	-	-	-	-	-	0.052
		N1	2.5(0.059)	1.14(0.55)	2.08(0.08)	6.99(0.11)	0.87	6.11	4.58	-
		N16	-	-	-	-	-	-	-	0.009
		N17	-	-	-	-	-	-	-	-0.062
N19	-	-	-	-	-	-	-	-0.026		

*Error estándar entre paréntesis

Claves para las formulaciones en Tabla 5.5.

El sorbato de potasio mostró un efecto inhibitorio sobre los hongos y levaduras en los cubos de manzanas de ambas variedades mantenidas en los jugos de naranjas formulados durante el almacenamiento a 10°C.

En polietileno, se observó que, cuando la concentración de sorbato de potasio se incrementaba, la velocidad de crecimiento exponencial (μ) disminuía, la duración de la fase de latencia (LPD) aumentaba y la máxima densidad de población (MPD) alcanzada resultaba menor. En los sistemas envasados en ESE, niveles de sorbato de potasio mayores de 0.125 g/kg, mostraron efectos bacteriostático o bactericida (Tabla 5.11).

En la Figura 5.22 se presentan los valores obtenidos para la velocidad de crecimiento exponencial (μ) del modelo de Gompertz o pendiente (R) del modelo lineal para las formulaciones analizadas con distintos niveles de sorbato de potasio, así como también las formulaciones en jugo fresco o pasteurizado sin agregado de sorbato, para cada variedad de manzana y película de envase utilizada.

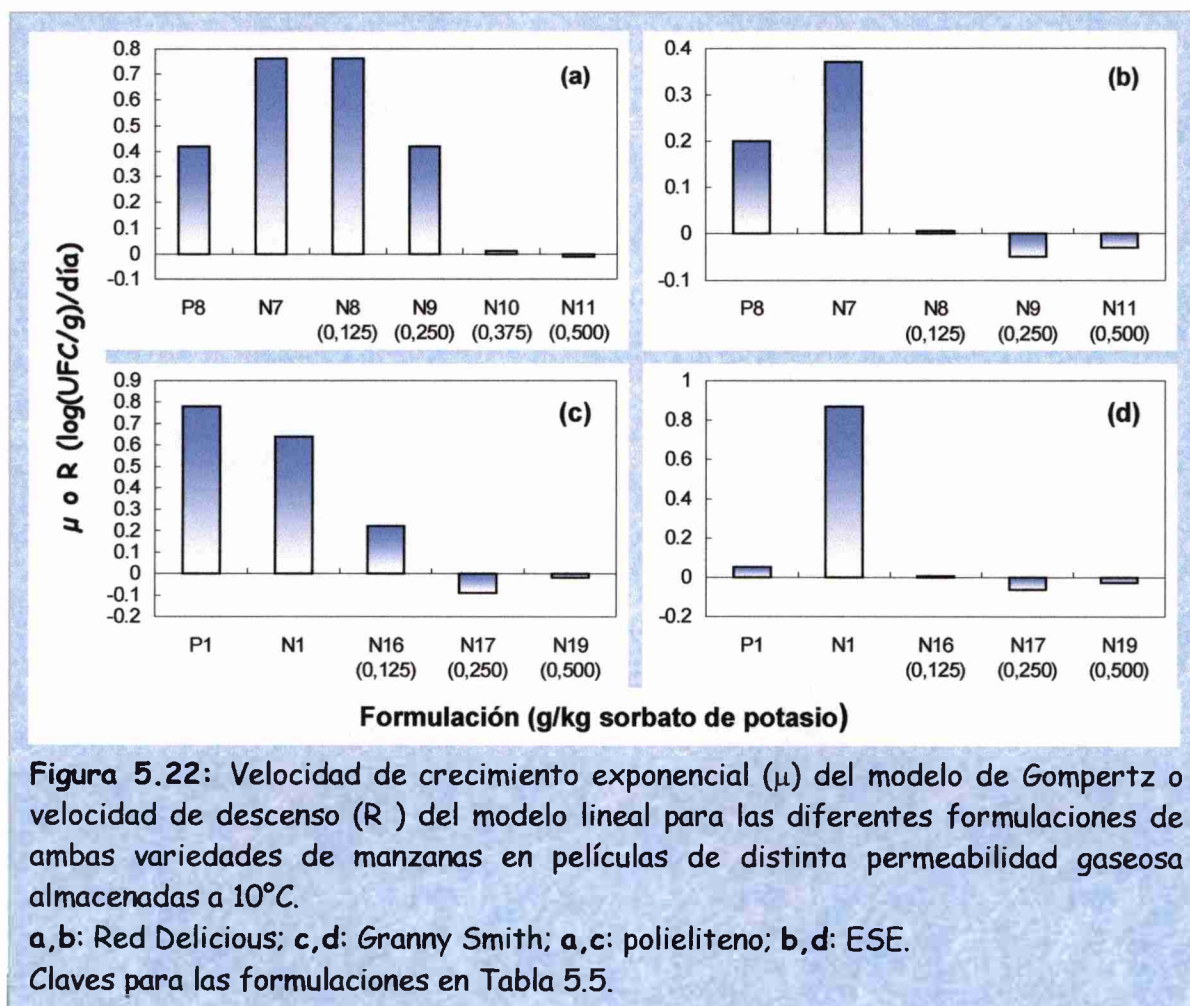


Figura 5.22: Velocidad de crecimiento exponencial (μ) del modelo de Gompertz o velocidad de descenso (R) del modelo lineal para las diferentes formulaciones de ambas variedades de manzanas en películas de distinta permeabilidad gaseosa almacenadas a 10°C.

a,b: Red Delicious; c,d: Granny Smith; a,c: polietileno; b,d: ESE.

Claves para las formulaciones en Tabla 5.5.

En el caso de cubos de Red Delicious en polietileno, con jugo fresco de naranjas conteniendo ácidos cítrico y ascórbico, y sacarosa, el agregado de 0.125 g de sorbato de potasio/kg (N8) produjo un descenso de los recuentos finales (MPD = 7.71 logUFC/g) en comparación con el jugo N7 sin preservadores (MPD = 8.39 logUFC/g), mientras que 0.250 g de sorbato/kg (N9) redujeron los valores de μ y MPD (Tabla 5.11 y Figura 5.22).

En ESE, sin embargo, el agregado de sorbato de potasio en niveles de 0.125 g/kg (N8) y 0.250 g/kg (N9) produjo efecto bacteriostático y bactericida, respectivamente (se obtuvieron valores de R de cero o levemente negativos). Cuando los cubos de manzanas Red Delicious fueron mantenidos en jugo pasteurizado (P8) y envasados en

polietileno, los valores obtenidos de μ (0.42 log(UFC/g)/día) y MPD (7.48 logUFC/g) fueron similares a los obtenidos con jugo fresco conteniendo 0.250 g sorbato de potasio/kg (N9) (Tabla 5.11 y Figura 5.22).

Para *Granny Smith* en polietileno (Figura 5.21 c) en jugo fresco con sacarosa, el agregado de 0.125 g sorbato de potasio/kg (N16) produjo un menor valor de MPD (5.37 logUFC/g) y μ (0.22 log(UFC/g)/día), en comparación con el sistema conteniendo jugo pasteurizado (P1) o jugo fresco de naranjas (N1) sin preservadores. Cuando se incorporaron 0.250 g sorbato de potasio/kg (N17), se observó un efecto bactericida (valores de R negativos).

En ESE, el agregado de los menores niveles de sorbato de potasio evaluados (0.125 g/kg, N16) produjo efecto bacteriostático.

Para ambas variedades de manzanas y películas de envase, concentraciones de 0.50 g sorbato de potasio/kg (N11 y N19) mostraron un débil efecto letal sobre la flora microbiana y un descenso de los niveles microbianos iniciales (Figura 5.21).

Todas las muestras, envasadas en ambas películas plásticas, presentaron valores inferiores a 2 NMP/ml para los recuentos de Coliformes Totales y *Clostridium sulfitorreductores*, indicando las condiciones sanitarias seguras de los productos.

La evaluación sensorial de ambas variedades de manzanas en las formulaciones con jugo fresco de naranjas, con agregado de ácidos orgánicos en el caso de *Red Delicious*, y de diferentes niveles de sorbato de potasio, para el color, la textura, sabor y calidad, indicó buena aceptabilidad (puntaje mayor de 2) en todas las condiciones analizadas (Tabla 5.12).

Tabla 5.12: Análisis sensorial de las formulaciones en jugo fresco envasadas en polietileno y almacenadas a 10°C durante 24 hs.

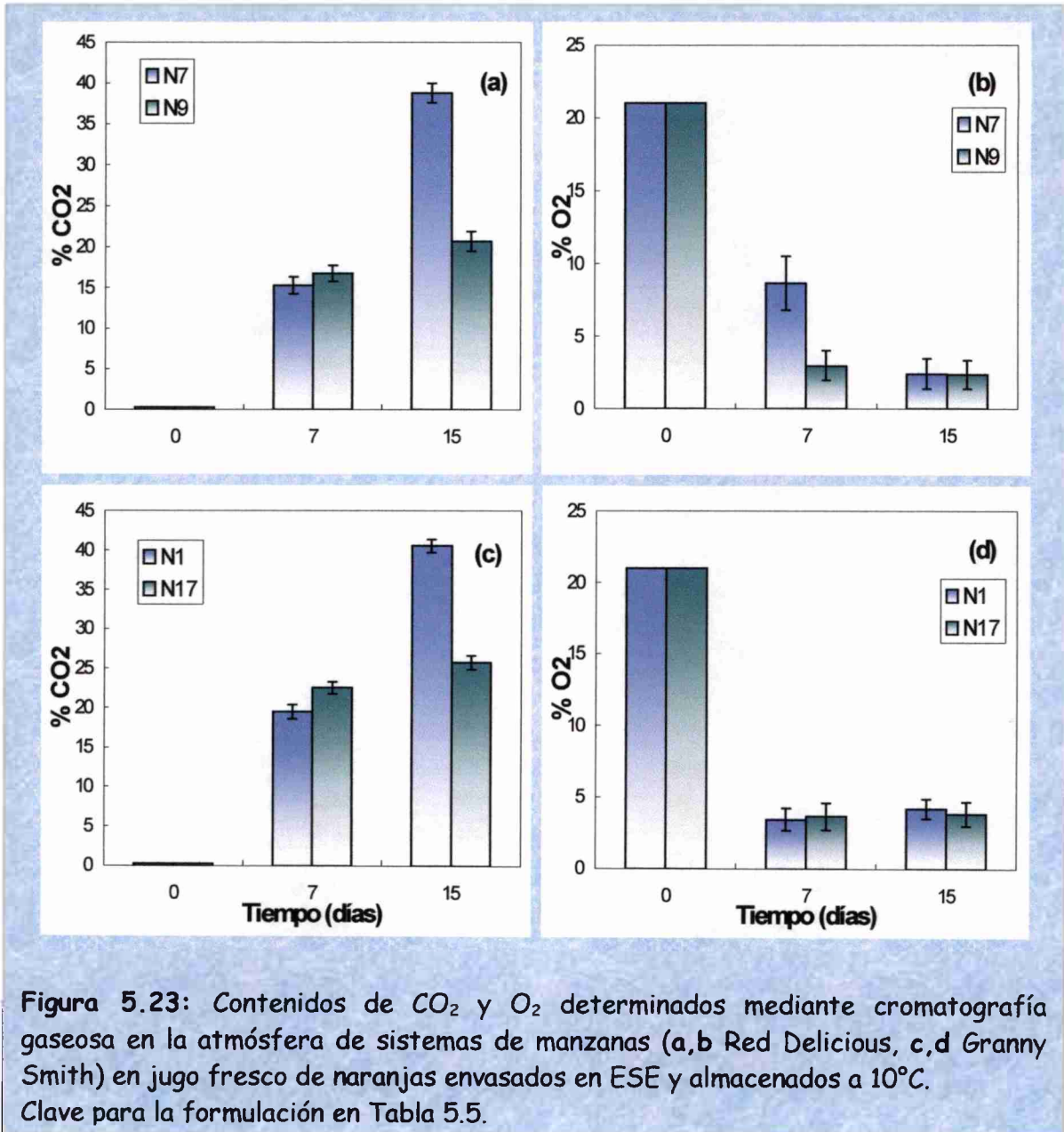
Manzana	Jugo	Puntaje del panel*			
		Color	Textura	Sabor	Calidad
<i>Red Delicious</i>	N7	3.67(0.17)	2.78(0.40)	2.78(0.32)	2.72(0.32)
	N8	3.00(0.37)	2.67(0.37)	2.22(0.40)	2.06(0.31)
	N9	3.33(0.24)	2.44(0.24)	2.44(0.29)	2.37(0.26)
	N10	3.55(0.18)	3.22(0.28)	2.56(0.24)	2.75(0.31)
	N11	3.33(0.18)	2.89(0.33)	2.33(0.25)	2.37(0.35)
<i>Granny Smith</i>	N1	3.20(0.25)	3.20(0.33)	2.90(0.31)	2.78(0.32)
	N16	3.50(0.17)	3.30(0.21)	3.30(0.15)	3.00(0.01)
	N17	3.40(0.16)	3.00(0.33)	2.80(0.29)	2.89(0.20)
	N19	3.10(0.23)	3.30(0.26)	2.80(0.20)	2.89(0.26)

*Error estándar entre paréntesis

Claves para las formulaciones en Tabla 5.5.

5.2.5 Contenido de CO₂ y O₂ en el interior del envase

Se determinaron los contenidos de CO₂ y O₂ de la atmósfera en el interior de la película de baja permeabilidad (ESE) de los sistemas formulados con manzanas y jugo fresco de naranjas durante el almacenamiento a 10°C mediante cromatografía gaseosa. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 5.23.



Puede verse en la Figura 5.23 a y c, que el contenido de CO₂ en la atmósfera gaseosa de los sistemas de manzanas de ambas variedades, en contacto con jugo fresco de naranjas con distintos preservadores agregados, aumentó significativamente desde

un 0.3% (contenido inicial del aire) hasta niveles de 40% en los jugos sin agregado de sorbato de potasio (N7 para Red Delicious y N1 para Granny Smith), y de 20-25% en los sistemas con 0.250 g/kg de dicho preservador (N9 para Red Delicious y N17 para Granny Smith), a los 15 días del almacenamiento a 10°C.

Los contenidos de O₂ en la atmósfera disminuyeron a niveles de 2-3% (partiendo de 21%, composición del aire) en todos los sistemas analizados para ambas variedades de manzanas (Figura 5.23 b y d).

Estos resultados demostraron que durante el almacenamiento a 10°C de todos los productos formulados hubo consumo de O₂ y producción de CO₂, resultado de procesos como respiración del tejido vegetal o de los microorganismos, y fermentación microbiana. Dadas las características de estos productos y los estudios microbiológicos antes realizados, se pudo concluir que el proceso preponderante fue el de fermentación por parte de los microorganismos predominantes, los hongos y levaduras. El sorbato de potasio inhibió en forma parcial la fermentación, ya que los niveles de CO₂ alcanzados fueron inferiores a los obtenidos sin el preservador.

Brackett (1994) citó similares resultados para zanahorias frescas envasadas bajo vacío; los cambios ocurridos en la atmósfera fueron, de la ambiente a un máximo de 35% de CO₂ y un mínimo de 2% de O₂ durante el almacenamiento.

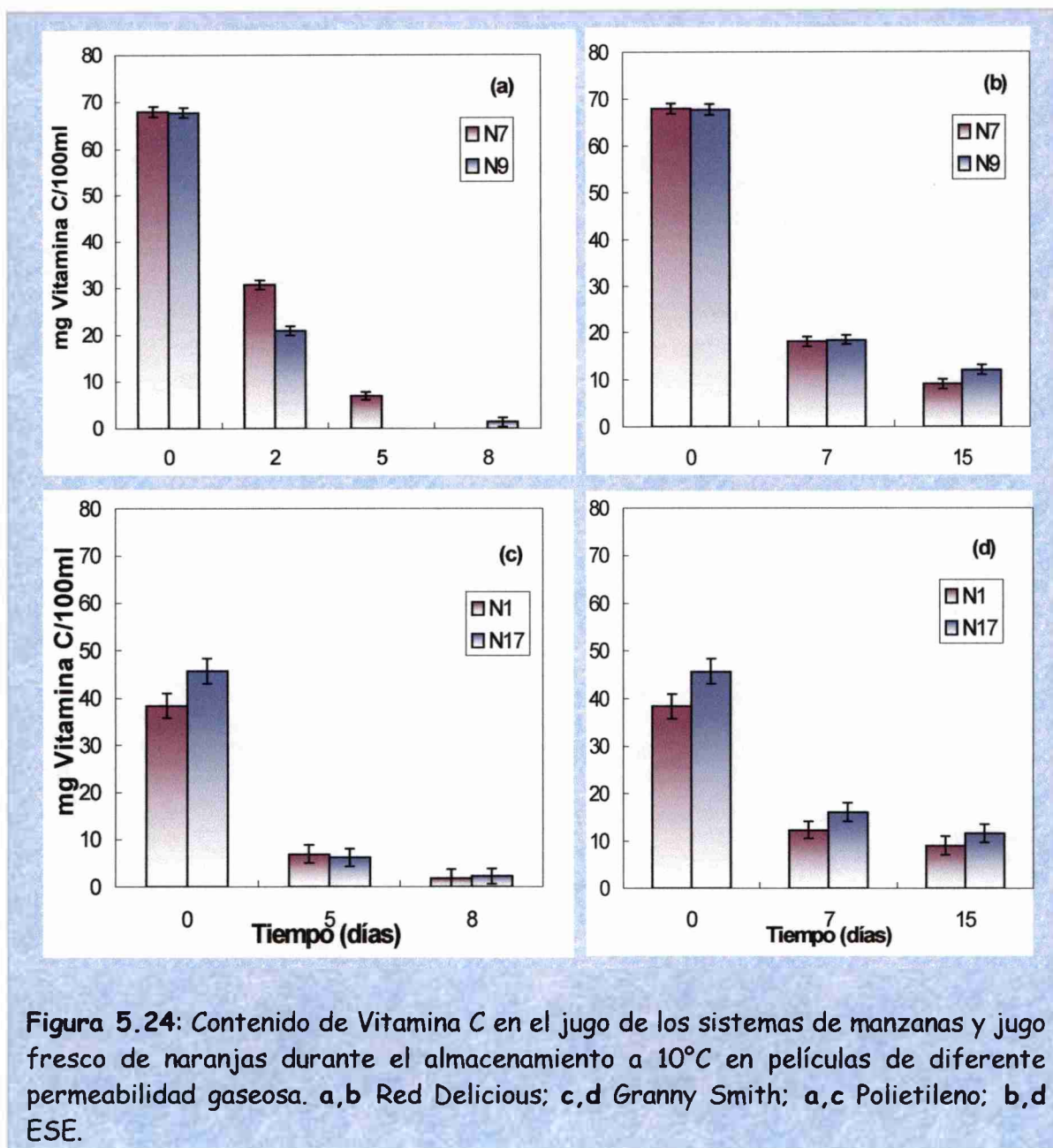
5.2.6 Medida del contenido de vitamina C en el producto

Con la finalidad de evaluar el contenido de vitamina C en los productos recién elaborados y durante su almacenamiento a 10°C, se analizaron los sistemas que presentaron los mejores atributos de calidad en los estudios anteriores y se determinaron los niveles de ácido L-ascórbico mediante el método enzimático-colorimétrico descrito en Materiales y métodos (2.2.2.2) sobre el jugo de cada condición, dado que, como se pudo evaluar anteriormente, las manzanas no presentaron niveles detectables de esta vitamina.

Para manzanas Red Delicious se evaluaron los cubos en jugo fresco de naranjas con agregado de ácidos cítrico, ascórbico y sacarosa (N7), y con similares agregados y 0.250 g/L de sorbato de potasio (N9).

Para manzanas Granny Smith se evaluaron los cubos en jugo fresco de naranjas con sacarosa (N1) y con sacarosa y 0.250 g/L de sorbato de potasio (N17).

En la Figura 5.24 se presentan los resultados obtenidos para cada sistema evaluado.



Puede verse, que los contenidos iniciales de ácido ascórbico de los productos formulados con manzanas Granny Smith y jugo fresco de naranjas N1 o N17 oscilaron entre 38 y 46 mg/100ml, acorde a los resultados obtenidos en el Capítulo 3 (Tabla 3.3). Los productos formulados con manzanas Red Delicious y jugo fresco de naranjas N7 o N9, mostraron niveles de 67-68 mg/100ml, como era de esperar debido a que en estos jugos se agregaron 30 mg de ácido ascórbico/100ml al jugo fresco.

Durante el almacenamiento a 10°C, los niveles de ácido L-ascórbico disminuyeron en todos los productos y películas analizados. A los 8 días de almacenamiento en

polietileno, el contenido de vitamina C resultó inferior a 3 mg/100 ml en todos los casos, mientras que en ESE para similares períodos, los niveles fueron mayores (12-18 mg/100ml). A los 15 días de almacenamiento en ESE, se obtuvieron niveles entre 9 y 12 mg/100 ml para todos los sistemas analizados (Figura 5.24). Estos resultados demostraron la importancia de la permeabilidad de la película de envase en preservar la calidad nutricional de los productos, sometidos a bajos niveles residuales de O_2 (ver Figura 5.23).

Estudio de productos de fermentación en sistemas con signos de deterioro

Durante el almacenamiento a $10^{\circ}C$ se observó que muchas de las muestras preparadas con jugo fresco de naranjas mostraban marcado hinchamiento del envase, que probablemente era debido a la fermentación microbiana. En la Figura 5.25 se observan muestras de manzanas sumergidas en jugo fresco de naranjas con evidentes signos de deterioro.



Figura 5.25: Manzanas Red Delicious mantenidas en jugo fresco de naranjas, envasadas en ESE y almacenadas a $10^{\circ}C$ durante 22 días.

Se determinó en estos sistemas con hinchamiento, el contenido de CO_2 mediante cromatografía gaseosa. Para Red Delicious en jugo N7 envasada en ESE y almacenada 22 días a $10^{\circ}C$ (envase hinchado) se obtuvieron niveles de 49% de CO_2 , y para Granny Smith en jugo N1 envasada en ESE y almacenada 15 días a $10^{\circ}C$, 23% de CO_2 .

En base a estos resultados pudo comprobarse la fermentación ocurrida en todos los sistemas analizados, provocado por la microflora propia del producto (hongos y levaduras). Resultados similares fueron reportados por Ctifl (1994).

Además se evaluó la producción de Etanol por método enzimático-UV con el fin de confirmar la fermentación microbiana en los productos deteriorados. Así, para Red Delicious en jugo N7 envasada en ESE y almacenada 20 días a 10°C el nivel obtenido de etanol fue de 25.26 g/l, mientras que para Granny Smith en jugo N1 en ESE el nivel alcanzado fue de 18.11 g/l a los 20 días de almacenamiento a 10°C. Esto indicó que el proceso de fermentación ocurrido fue de tipo alcohólica. Estos resultados son comparables a los obtenidos por otros autores, que han reportado niveles de etanol de 800 mg/l a los 8 días de almacenamiento a 8°C para productos similares (Ctifl, 1994).

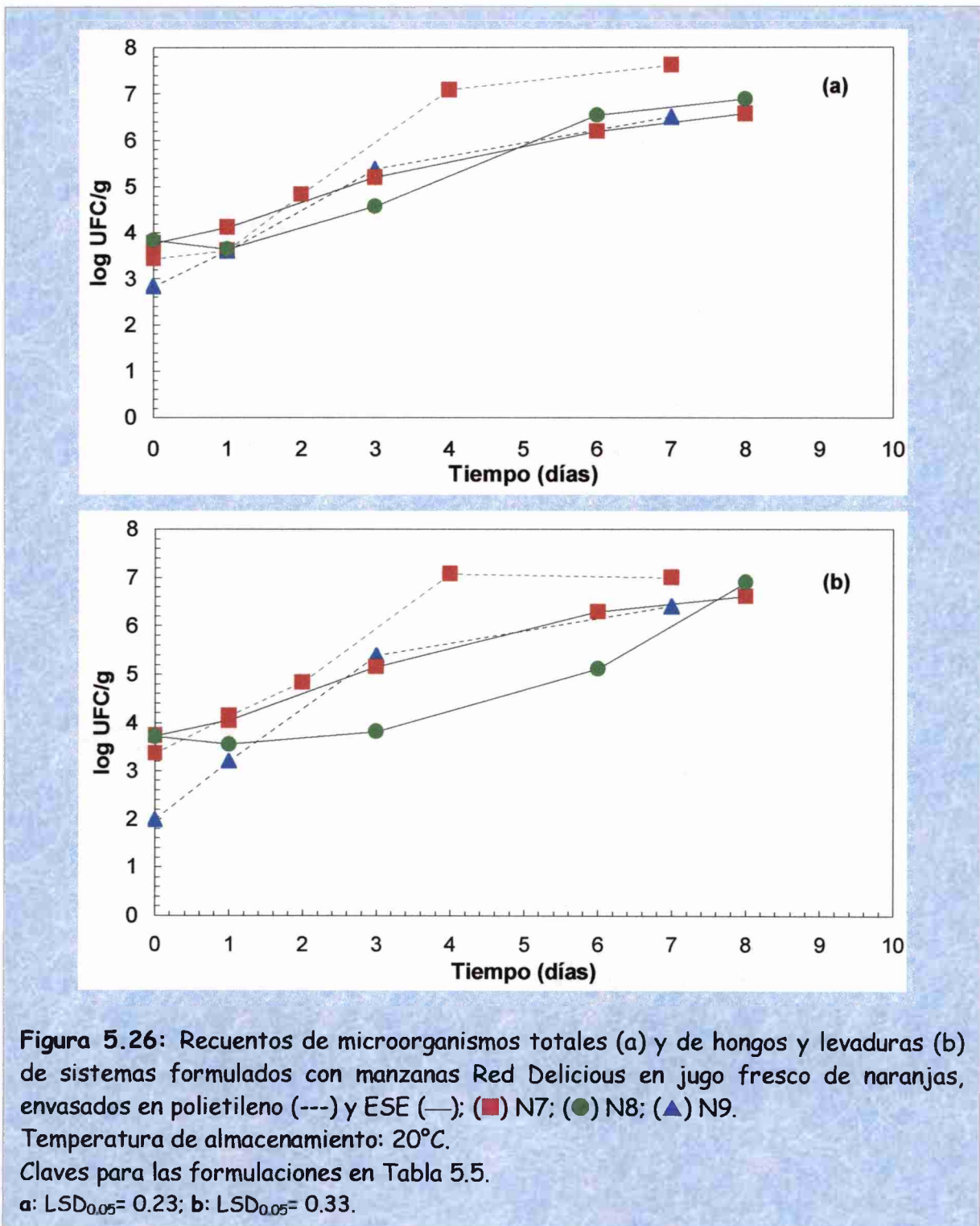
5.2.7 Abuso térmico

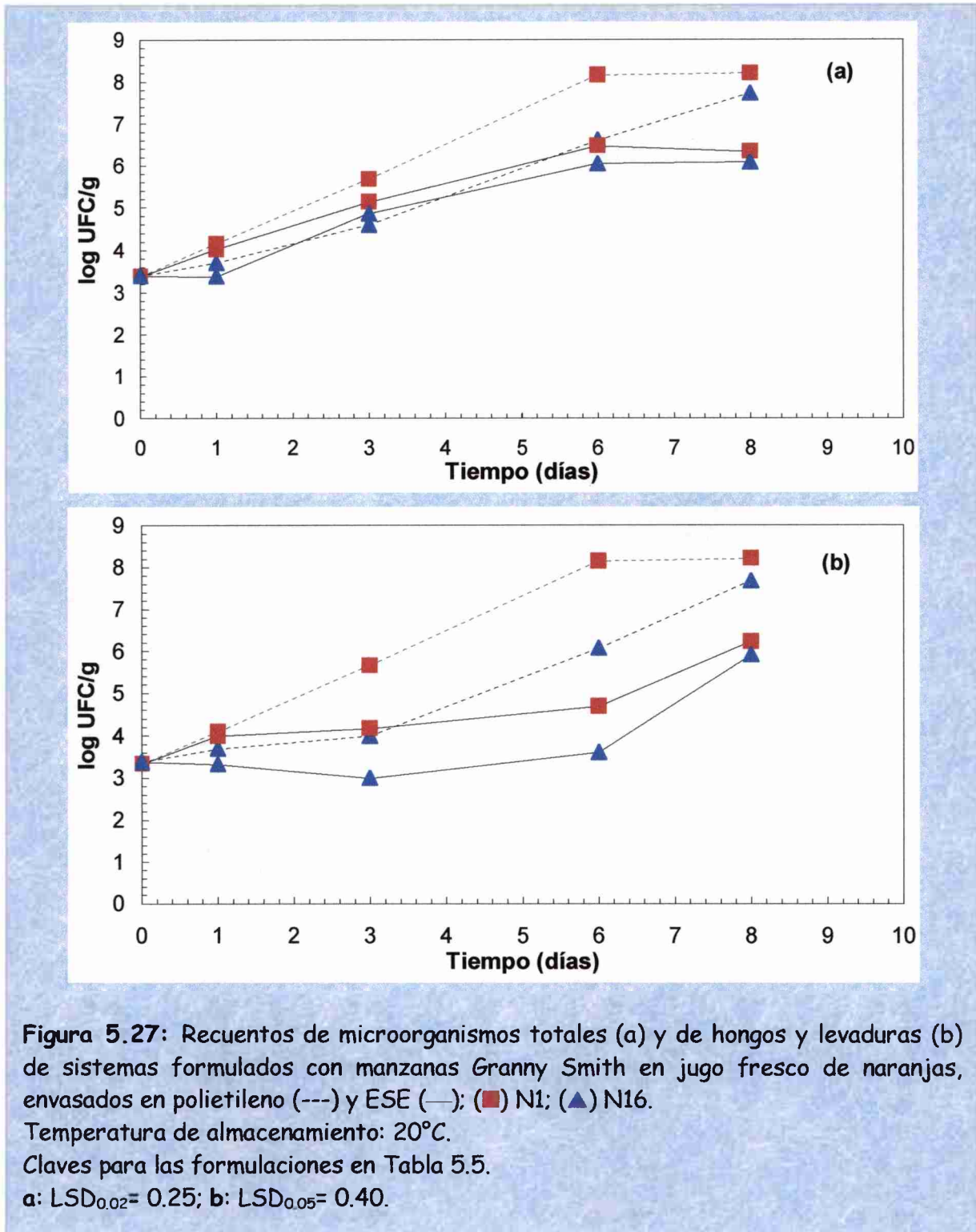
Los sistemas seleccionados por presentar las mejores condiciones de calidad (color, textura, etc) fueron sometidos a un almacenamiento en condiciones adversas de temperatura (20°).

Para la variedad Red Delicious se evaluaron los sistemas en jugo fresco de naranjas con agregado de ácido ascórbico (0.15g/kg), ácido cítrico (1 g/kg) y sacarosa (20 g/kg), (N7), envasado en polietileno y en EVA-SARAN-EVA (ESE); en jugo fresco con iguales agregados y con sorbato de potasio en dos niveles: 0.125 g/kg (N8), envasado en ESE y 0.250 g/kg (N9), envasado en polietileno.

Para la variedad Granny Smith, los sistemas evaluados fueron con jugo fresco de naranjas con agregado de sacarosa (40 g/kg) (N1), y con sacarosa en igual nivel y sorbato de potasio 0.125 g/kg (N16), envasados en polietileno y ESE.

Los resultados obtenidos para los recuentos de microorganismos totales y hongos y levaduras, para ambas variedades, en los correspondientes sistemas seleccionados (N7, N8, N9 para Red Delicious, y N1, N16 para Granny Smith), se presentan en las Figuras 5.26 y 5.27, respectivamente. Los valores de $LSD_{0.05}$ obtenidos fueron incluídos en las leyendas de las Figuras.





Puede verse (Figuras 5.26 y 5.27) que, para ambas variedades de manzanas en jugo fresco de naranjas con los preservadores seleccionados para las diferentes películas de envase, cuando se someten a un almacenamiento a temperaturas mayores (20°C) la vida útil disminuye.

Para la variedad Red Delicious en jugo fresco de naranjas con ácido ascórbico, cítrico, y sacarosa (N7) los tiempos requeridos a 20°C para lograr recuentos de hongos y levaduras de 10⁶ UFC/g (valor que limita su vida útil) fueron de 3 y 5 días, para el envasado en polietileno y ESE, respectivamente. Cuando se agregaron al sistema 0.250 g sorbato de potasio/kg (N9) y se utilizó polietileno como película de envase, dichos niveles se alcanzaron en 5 días; el agregado de 0.125 g sorbato de potasio/kg (N8) y el empleo de EVA-SARAN-EVA (ESE) como película de envase, requirió un tiempo de 7 días para alcanzar dichos niveles (Figura 5.26 b). Estos resultados demostraron el efecto adverso de la elevada temperatura sobre los productos, aún en los envasados en películas de baja permeabilidad gaseosa.

Para la variedad Granny Smith en jugo fresco con sacarosa (N1) el almacenamiento a 20°C produjo niveles de hongos y levaduras de 10⁶ UFC/g a los 3 y 8 días para el envasado en polietileno y ESE, respectivamente. El agregado de 0.125 g sorbato de potasio/kg (N16) extendió dicho tiempo a 6 días en polietileno, no modificando los resultados en ESE. Estos períodos también resultaron ser mucho menores a los obtenidos para los mismos sistemas a 10°C, para ambas películas de envase utilizadas (Figura 5.27 b).

Además, en todos los casos se controló la calidad sanitaria de los productos mediante recuento de *Enterobacteriaceae* y *E. coli* en placas de Petrifilm™, no observándose en ningún caso presencia de este tipo de microorganismos, lo cual indicó productos seguros desde el punto de vista microbiano.

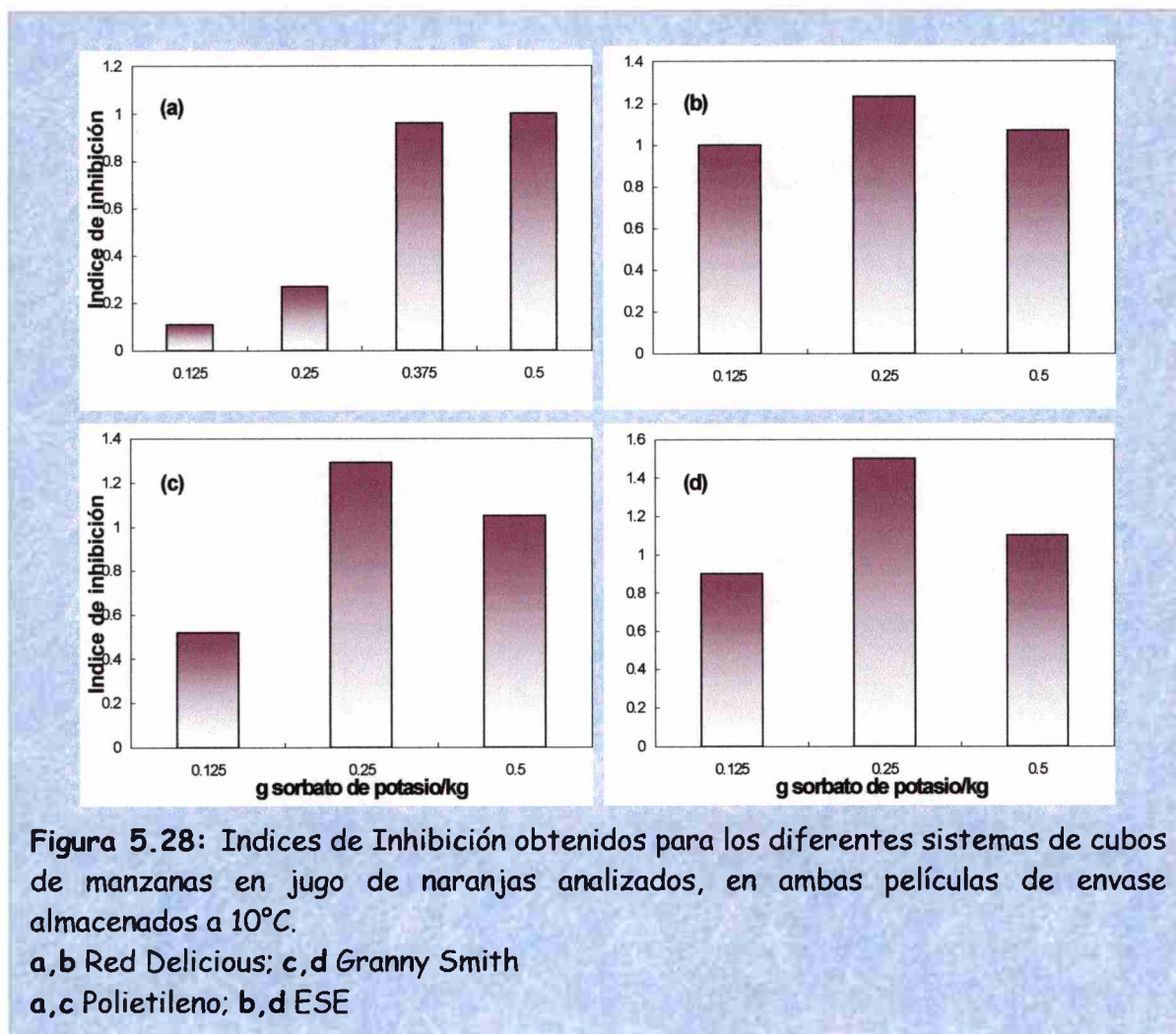
5.2.8 Índice de inhibición

Se calcularon los valores para los Índices de Inhibición (II) de los diferentes sistemas analizados, según la expresión:

$$II = 1 - (\log(N/N_0)_{\text{tratado}} / \log(N/N_0)_{\text{control}}) \quad (1)$$

donde N= número de microorganismos a tiempo t y N₀= nivel inicial de microorganismos. Los valores de log(N/N₀)_{tratado} y log(N/N₀)_{control} fueron evaluados al tiempo en que el control (sin preservadores) alcanzó la fase estacionaria.

Los resultados obtenidos para ambas variedades de manzanas en los diferentes sistemas formulados para ambas películas de envase utilizadas almacenadas a 10°C, se presentan en la Figura 5.28.



Como puede observarse, para el almacenamiento a 10°C, el agregado de sorbato de potasio al jugo fresco de naranjas produjo efecto inhibitorio sobre los hongos y levaduras de los cubos de ambas variedades de manzanas, en todos los sistemas analizados. Además, pudo comprobarse, que el empleo simultáneo del sorbato de potasio junto con el envasado en la película de baja permeabilidad gaseosa (ESE) incrementó el efecto observado sobre los hongos y levaduras de los productos, para esta temperatura de almacenamiento.

Para los cubos de la variedad Red Delicious envasados en polietileno y almacenados a 10°C, niveles de sorbato de potasio entre 0.125 y 0.375 g/kg (N8-N10) produjeron efectos inhibitorios sobre el desarrollo de los microorganismos

predominantes, los cuales fueron mayores cuanto mayor era la concentración del preservador en el producto. Niveles de 0.5 g sorbato de potasio/kg (N11) produjeron efecto bacteriostático, en dicha película de envase y a 10°C. En ESE, sin embargo, todos los niveles testeados del preservador condujeron a efectos bacteriostáticos (para 0.125 g sorbato/kg, N8) o bactericidas (para 0.25 - 0.5 g/kg, N9-N11) sobre los hongos y levaduras (Figura 5.28), a 10°C.

Para la variedad *Granny Smith*, niveles de sorbato de potasio de 0.125 g/kg (N16) produjeron, para ambas películas a 10°C, efectos inhibitorios sobre los hongos y levaduras; mayores concentraciones del preservador (0.25-0.5 g/kg, N17-N19) mostraron efectos bactericidas. (Figura 5.28).

En la Figura 5.29 se presentan los valores de los Índices de inhibición para el desarrollo de hongos y levaduras a 10 y 20°C de los mejores sistemas, para cada variedad de manzana y película de envase utilizada.

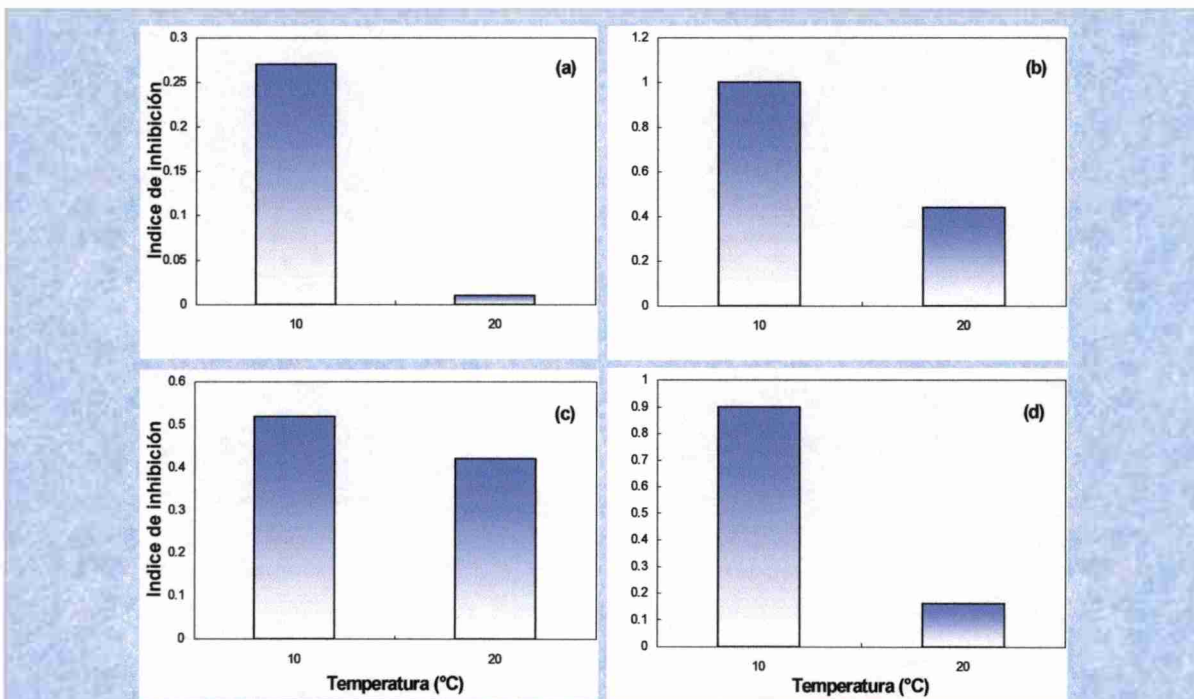


Figura 5.29: Índices de Inhibición obtenidos para los diferentes sistemas de cubos de manzanas en jugo de naranjas analizados, en ambas películas de envase almacenados a 10 y 20°C.

(a) Red Delicious en jugo N9 en polietileno; (b) Red Delicious en jugo N8 en ESE
 (c) Granny Smith en jugo N16 en polietileno; (d) Granny Smith en jugo N16 en ESE
 Claves para las formulaciones en Tabla 5.5.

Se pudo observar que, cuando los sistemas seleccionados de ambas variedades eran sometidos a un abuso térmico (20°), los efectos inhibitorios del sorbato de potasio resultaban inferiores, aún en películas de baja permeabilidad gaseosa, llegando a ser nulos en ciertos casos (Figura 5.29). Por ejemplo, niveles de 0.125 g/kg de sorbato de potasio (N8) sobre cubos de Red Delicious en ESE, que a 10°C presentaban efecto bacteriostático (II=1), a 20°C la inhibición observada fue de sólo 0.44. Esto demostró la importancia de un buen almacenamiento refrigerado para este tipo de productos.

5.2.9 Vida útil

La Tabla 5.12 muestra los períodos de vida útil obtenidos para ambas variedades de manzanas, envasadas en diferentes películas y expuestas a los diferentes tratamientos y temperaturas de almacenamiento.

Tabla 5.12: Vida útil (días) a 10°C y 20°C de cubos de ambas variedades de manzanas mantenidos en jugos formulados de naranja y envasadas en diferentes películas.

Manzana	Jugo	Sorbato de potasio (g/kg)	Vida útil (días)			
			10°C		20°C	
			Poliétileno	ESE	Poliétileno	ESE
Red Delicious	P8	-	10.5 (1.5)	>25	-	-
	N7	-	5.0 (1.0)	12.5 (2.0)	3.1 (0.5)	5.8 (1.8)
	N8	0.125	7.5 (1.0)	> 15	-	7.0 (0.6)
	N9	0.250	8.5 (2.0)	> 15	5.5 (2.1)	-
	N10	0.375	10.0 (1.0)**	-	-	-
	N11	0.500	8.5 (1.0)**	>15	-	-
Granny Smith	P1	-	10.5 (3.0)	>25	-	-
	N1	-	10.0 (1.5)	> 15	3.4 (0.6)	7.5 (0.5)
	N16	0.125	> 10	> 15	5.8 (0.8)	7.8 (0.2)
	N17	0.250	> 10	> 15	-	-
	N19	0.500	7.0 (1.0)**	9.0 (1.0)**	-	-

** Vida útil limitada por modificaciones adversas del color.

Claves para las formulaciones en Tabla 5.5.

En todos los casos para ambas variedades, la vida útil fue mayor en la película de baja permeabilidad gaseosa (ESE) que en polietileno.

Para manzanas Red Delicious fue necesario agregar ácido cítrico, o una combinación de ácido cítrico y ascórbico, al jugo de naranjas (pasteurizado o fresco) para obtener un aceptable color superficial en ambas películas de envase; el bisulfito de sodio pudo ser reemplazado por estos ácidos. Para Granny Smith en ambas películas, el color fue mantenido utilizando jugo de naranjas pasteurizado o fresco sin agregado de preservadores.

Ambas variedades de manzanas presentaron similares períodos de vida útil a 10°C cuando se emplearon jugos pasteurizados (P1, P8) y polietileno como película de envase; el deterioro fue debido principalmente al desarrollo microbiano. Sin embargo, no fueron detectados microorganismos patógenos (Coliformes o Sulfito-reductores) en ninguna de las películas usadas. Con jugo pasteurizado y ESE, los períodos de vida útil para el almacenamiento a 10° fueron mayores de 25 días para ambas variedades, sin agregado de sorbato o benzoato.

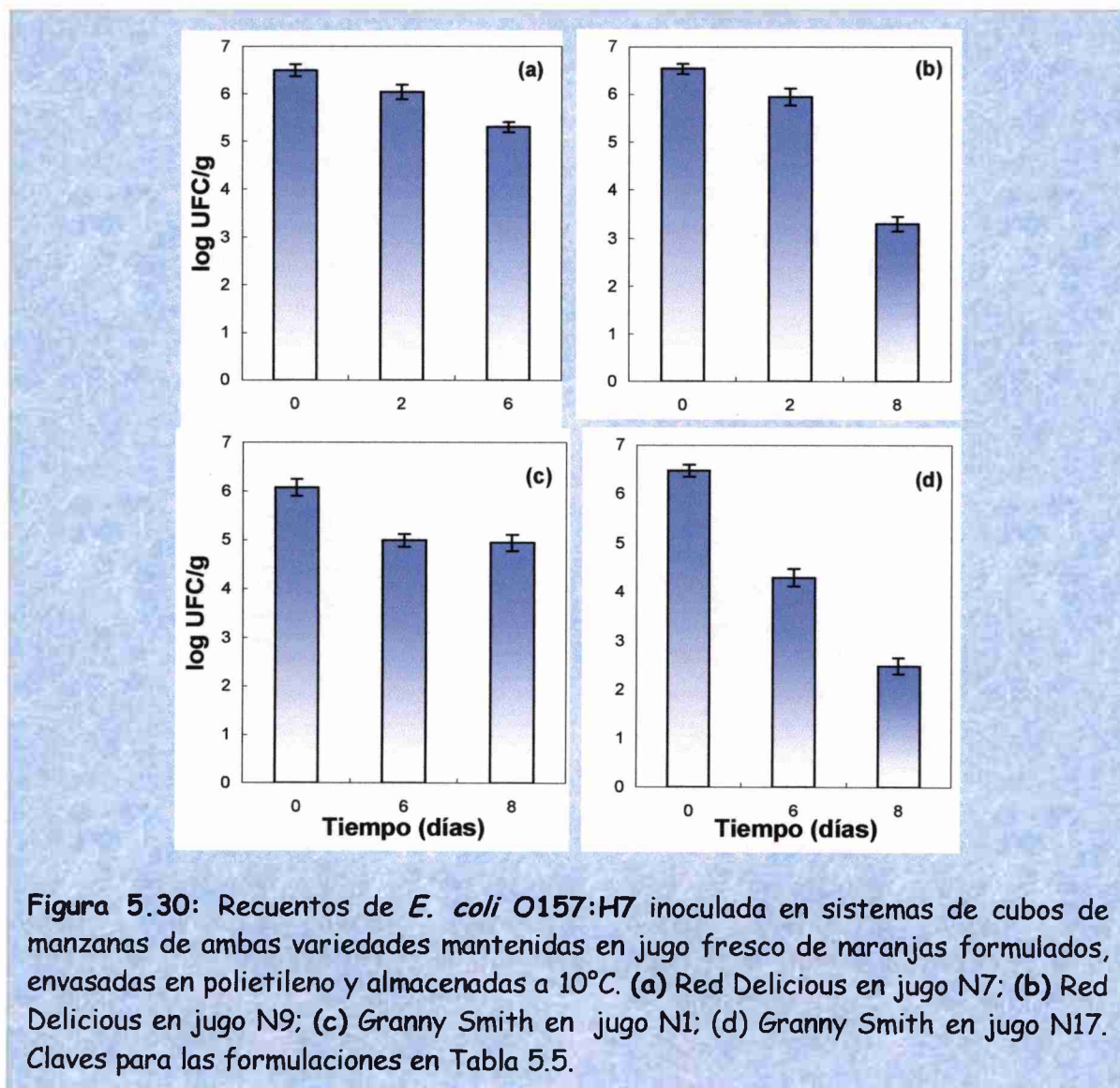
El empleo de jugo fresco de naranjas requirió el agregado de sorbato de potasio para controlar el desarrollo microbiano en manzanas Red Delicious almacenadas a 10°C. Sin embargo, en manzanas Granny Smith, la calidad pudo mantenerse durante 10 días en polietileno y por más de 15 días en ESE, sin agregado de preservadores, y conteniendo sólo sacarosa (40 g/kg) en el jugo fresco de naranjas (N1).

Cuando se utilizó jugo fresco (no pasteurizado) de naranjas en las formulaciones, el agregado de sorbato de potasio en concentraciones de 0.125-0.250 g/kg de producto, produjo tiempos de vida útil a 10°C similares a los obtenidos con jugo pasteurizado. Para Red Delicious, se obtuvieron períodos de vida útil de 7.5-8.5 días en polietileno y mayor de 15 días en ESE; en el caso de manzanas Granny Smith y usando los mismos niveles de sorbato de potasio, la vida útil fue mayor de 10 días en polietileno y mayor de 15 días en ESE.

A 20°C, los períodos de vida útil observados para los sistemas analizados fueron la mitad o menores respecto a los períodos obtenidos a 10°C para ambas variedades en ambas películas (Tabla 5.12).

5.2.10 Inoculación con *Escherichia coli* O157:H7

Se evaluó, en los sistemas que presentaban las mejores características de calidad, la supervivencia de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada (patógeno ácido-tolerante) durante el almacenamiento a 10°C en polietileno. En la Figura 5.30 se presentan los recuentos de *E. coli* O157:H7 obtenidos.



Como puede verse, en todos los casos se obtuvieron niveles de inoculación similares, que oscilaron entre $1.20 \cdot 10^6$ y $3.47 \cdot 10^6$ UFC/ml. Además se observó durante el almacenamiento que dichos niveles disminuían, tanto en los sistemas con agregado de preservadores como en los que no tenían agregados, y esta disminución resultaba mayor en los que contenían 0.250 g de sorbato de potasio/kg (N9 y N17).

Para manzanas Red Delicious en jugo N7, el nivel alcanzado a los 6 días de almacenamiento a 10°C fue de 2.0 10⁵ UFC/ml. Esto indicó que la acidez del producto provocó un leve efecto antimicrobiano sobre *E. coli* O157:H7. Con agregado de 0.250 g de sorbato de potasio/kg (N9) los niveles de dicho microorganismo no superaron los 2.0 10³ UFC/ml a los 8 días de almacenamiento a 10°C, mostrando el mayor efecto antimicrobiano de este preservador sobre el patógeno analizado.

Para manzanas Granny Smith se observó un efecto similar, siendo más importante la inhibición, lo que pudo atribuirse a la mayor acidez de las muestras.

Por lo tanto se puede concluir que la acidez del sistema combinada con el sorbato de potasio agregado al mismo produjo una cierta acción antimicrobiana sobre *E. coli* O157:H7, en las formulaciones analizadas.

Dado que este patógeno es anaerobio facultativo, similares resultados son esperables si las muestras se envasaran en ESE bajo vacío.

Zhao y col. (1993) evaluaron el efecto del agregado de 0.1% de sorbato de potasio a la sidra fresca de manzanas sobre la supervivencia de *E. coli* O157:H7 a 8 y 25°C, no encontrando efecto antimicrobiano.

5.2.11 Estado sanitario del producto formulado

Los resultados expuestos demostraron la importancia de las buenas condiciones sanitarias en las que deben ser elaborados los productos frescos de este tipo, ya que aunque se observó que los niveles del patógeno analizado, *Escherichia coli* O157:H7, disminuyeron en todos los casos (con y sin preservador), en ninguna situación llegó a eliminarse por completo, sabiendo que sólo unas pocas células bacterianas (2-2000) son capaces de provocar la enfermedad (Buchanan y Doyle, 1997).

Todas las muestras (envasadas en ambas películas) presentaron recuentos de Coliformes Totales y *Clostridium* sulfito-reductores menores de 2 NMP/ml, indicando las buenas condiciones sanitarias de los productos.

Estos resultados mostraron la importancia de una buena combinación de factores (preservador, película de envase y temperatura) para lograr un producto seguro.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

● Caracterización fisicoquímica de las materias primas:

- La variedad de manzanas *Granny Smith* presentó un mayor nivel de ácidos orgánicos, principalmente ácido málico, mayor acidez titulable y menor pH, respecto a la variedad *Red Delicious*.
- La variedad de manzanas *Red Delicious* presentó un nivel de azúcares y sólidos totales mayor que la variedad *Granny Smith*.
- El jugo pasteurizado de naranjas presentó mayor contenido de ácidos orgánicos (ácido cítrico y málico), menor contenido de ácido ascórbico, mayor acidez titulable y menor pH, respecto al jugo fresco de naranjas. Asimismo, el jugo pasteurizado presentó mayor contenido de azúcares y sólidos, que el jugo fresco.

● Calidad de los jugos:

- No se observó desarrollo microbiano durante el almacenamiento a 10°C en el jugo pasteurizado, para ambas películas de envase.
- La flora microbiana presente en el jugo fresco de naranja resultó ser predominantemente, hongos y levaduras psicrótrofos.
- El agregado de sacarosa al jugo fresco de naranja, disminuyó significativamente el desarrollo microbiano durante su almacenamiento a 10°C.
- El jugo fresco envasado en películas de baja permeabilidad gaseosa alcanzó niveles de 10⁶ UFC/ml, para hongos y levaduras, a los 12 días de almacenamiento a 10°C, mientras que en polietileno este nivel se alcanzó a los 7 días.
- El empleo de películas de baja permeabilidad gaseosa produjo un descenso en la máxima densidad de población, tanto en el jugo fresco de naranjas lavadas con agua como en las lavadas con hipoclorito de sodio, respecto a los jugos envasados en polietileno.

- El agregado de ácido ascórbico y cítrico al jugo fresco de naranjas disminuyó significativamente la velocidad de crecimiento exponencial de los microorganismos predominantes (hongos y levaduras), en ambas películas de envase.
- El agregado de 0.25 g/L de sorbato de potasio al jugo fresco produjo un incremento en la fase de latencia de los microorganismos, principalmente en polietileno. El benzoato de sodio agregado al jugo en igual concentración, no mostró ningún efecto. Mayores concentraciones (0.5 g/L) de ambos preservadores aumentaron la fase de latencia y disminuyeron la velocidad de crecimiento exponencial, en ambas películas. Niveles de 1 g/L de sorbato o benzoato produjeron un leve efecto bactericida.
- La máxima densidad de población obtenida en los jugos analizados disminuyó significativamente cuando la concentración de preservador fue incrementada (0.25-1.00 g sorbato de potasio/L); la disminución fue aún más cuando se envasaron en ESE.
- El lavado de la piel de las naranjas con hipoclorito de sodio y el empleo simultáneo de películas de baja permeabilidad gaseosa permitió extender la vida útil del jugo fresco durante el almacenamiento a 10°C a 9 días.
- Con el agregado de diferentes concentraciones de preservador (sorbato o benzoato, 0.25 - 1.00 g/L) al jugo fresco de naranjas se alcanzaron períodos de vida útil que variaron entre 7 y más de 20 días en polietileno, y entre 9 y más de 20 días en ESE.

● Calidad del sistema: manzanas en jugos de bajo pH:

- Para el caso de las manzanas Red Delicious, fue necesario el agregado de ácido cítrico o una combinación de ácidos cítrico y ascórbico al jugo de naranjas (pasteurizado o fresco) para lograr un color superficial aceptable en ambas películas de envase; el bisulfito de sodio pudo ser reemplazado por estos preservadores naturales.
- Para las manzanas Granny Smith, el color se pudo mantener adecuadamente usando jugo de naranjas fresco o pasteurizado sin el agregado de preservadores químicos, para ambas películas de envase.

- Para ambas variedades de manzanas, se logró un mejor mantenimiento del color superficial en películas de baja permeabilidad gaseosa.
- Para la variedad Red Delicious, el ácido eritórico agregado al jugo de naranjas en igual proporción que al ácido ascórbico, no fue tan efectivo para mantener adecuadamente el color superficial, en ambas películas, durante el almacenamiento a 10°C.
- Los niveles seleccionados de endulzante fueron de 20 y 40 g de sacarosa/kg de producto, y de 1 y 2 g de aspartame/kg de producto, para las variedades Red Delicious y Granny Smith, respectivamente.
- El sorbato de potasio aplicado en niveles entre 0.125-0.25 g/kg permitió una buena retención de color; mayores concentraciones (0.375-0.50 g/kg) a pesar de presentar significativa acción antimicrobiana, produjeron modificaciones adversas en el color.
- El benzoato de sodio fue descartado como preservador en este producto debido a que afectó el color superficial produciendo pardeamiento severo en ambas variedades de manzanas.
- La película de envase utilizada no fue un factor significativo en las modificaciones de textura, para ambas variedades de manzanas. En el caso de la variedad Red Delicious, el ablandamiento relativo fue menor en jugo pasteurizado con preservadores, respecto al sistema elaborado con jugo fresco. Para la variedad Granny Smith, el tipo de jugo empleado no produjo diferencias en las modificaciones de textura.
- El contenido de CO₂ en la atmósfera en el interior del envase de los sistemas con películas de baja permeabilidad gaseosa (ambas variedades de manzanas en jugo fresco de naranjas) alcanzó niveles de 40%; cuando se agregaron 0.250 g de sorbato de potasio/kg los niveles de CO₂ llegaron a 20-25% a los 15 días de almacenamiento a 10°C. El contenido de O₂ disminuyó hasta 2-3%, en todos los sistemas analizados. Esto fue atribuido a los procesos de respiración (del tejido vegetal o de los microorganismos) y de fermentación microbiana ocurridos, comprobado este último por los niveles de etanol medidos en productos alterados. El sorbato de potasio inhibió en forma parcial la fermentación, ya que los niveles de CO₂ alcanzados fueron inferiores a los obtenidos sin el preservador.

- El contenido inicial de vitamina C de los productos formulados con manzanas Granny Smith y jugo fresco de naranjas osciló entre 38 y 46 mg/100ml, mientras que para manzanas Red Delicious y jugo fresco con agregado de ácidos cítrico y ascórbico, fue de 67-68 mg/100ml. A los 8 días de almacenamiento a 10°C, los niveles de vitamina C disminuyeron a 2-3 mg/100ml y 12-18 mg/100ml, en polietileno y ESE, respectivamente. A los 15 días en ESE, se obtuvieron niveles de 9-12 mg/100 ml para todos los sistemas analizados, mostrando el efecto de la permeabilidad de la película de envase en preservar la calidad nutricional de los productos.
- Los microorganismos predominantes en las manzanas frescas como en las tratadas, envasadas en ambas películas, fueron los hongos y levaduras psicrótrofos, en coincidencia con los datos de la literatura. Las levaduras aisladas fueron identificadas como *Rhodotorula rubra* y *Cándida quersitrusa*, los hongos filamentosos encontrados fueron *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Epicoccum* sp., *Stemphylium* sp., y *Dreschlera* sp. Las bacterias aisladas resultaron ser *Enterobacter agglomerans* y *Enterobacter cloacae*, contaminantes comunes de este tipo de productos.
- Los recuentos de hongos y levaduras para cubos de manzanas Red Delicious sin jugo alcanzaron niveles de 10⁶ UFC/g, en polietileno, a los 9 días de almacenamiento a 10°C, mientras que en ESE, estos niveles de contaminación no fueron alcanzados, aún al final del almacenamiento. Para la variedad Granny Smith, los recuentos llegaron a niveles inferiores a 10⁶ UFC/g, al final de su almacenamiento, en ambas películas de envase.
- Para los sistemas de ambas variedades de manzanas en jugo fresco envasados en polietileno y almacenadas a 10°C, a mayor concentración de sorbato de potasio agregado (0.125-0.500 g/kg), la velocidad de crecimiento exponencial disminuyó, la duración de la fase de latencia aumentó y la máxima densidad de población alcanzada resultó menor. En ESE, niveles de sorbato de potasio mayores de 0.125 g/kg produjeron efectos bacteriostáticos o bactericidas.
- En polietileno, ambas variedades de manzanas presentaron similares períodos de vida útil (10 días) a 10°C cuando se emplearon jugos pasteurizados, sin agregados para Granny Smith y con ácidos orgánicos para Red Delicious; el deterioro fue debido principalmente al desarrollo microbiano. En ESE, los períodos de vida útil fueron mayores de 25 días para ambas variedades, debido al deterioro en la textura.

- El empleo de jugo fresco de naranjas requirió el agregado de sorbato de potasio para controlar el desarrollo microbiano en manzanas Red Delicious almacenadas a 10°C. Sin embargo, en manzanas Granny Smith, la calidad pudo mantenerse durante 10 días en polietileno y por más de 15 días en ESE, sin agregado de preservadores, y conteniendo sólo sacarosa (40 g/kg) en el jugo fresco de naranjas.

- El agregado de 0.125-0.250 g de sorbato de potasio/kg de producto al sistema de manzanas Red Delicious en jugo fresco, condujo tiempos de vida útil de 7.5-8.5 días en polietileno y mayor de 15 días en ESE a 10°C, similares a los obtenidos con jugo pasteurizado; en el caso de manzanas Granny Smith y usando los mismos niveles de sorbato de potasio, la vida útil fue mayor de 10 días en polietileno y mayor de 15 días en ESE.

- Todos los productos analizados presentaron buena calidad sanitaria ya que los recuentos de Coliformes Totales y Clostridium sulfito reductores, presentaron valores inferiores a 2 NMP/ml, al final del almacenamiento.

- Los ensayos de inoculación con *Escherichia coli* O157:H7 mostraron que los niveles del patógeno disminuían durante el almacenamiento a 10°C, tanto en los sistemas con agregado de 0.250 g de sorbato de potasio/kg como en los sistemas sin el preservador, para ambas variedades de manzanas. Sin embargo, en ningún caso se eliminó completamente dicho patógeno, y sabiendo que con unas pocas células puede provocar enfermedad, resulta imprescindible, en estos productos, contar con buenas condiciones sanitarias de elaboración.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ☞ Alzamora, S. M. (1994). Fundamentos del método de conservación por factores combinados. En "Aplicación de factores combinados en la conservación de alimentos". CYTED. Universidad Politécnica de Valencia. (ed) Fito Maupoey, P.; Andrés Grau, A. y Chiralt Boix, A.
- ☞ Amiot, M. J., Tacchini, M., Aubert, S. y Nicolas, J. (1992) Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *Journal of Food Science* 57 (4) 958-962.
- ☞ Anónimo (1990) Researchers intensify search for sulfite replacers. *Prep. Foods*, August, 114.
- ☞ Anónimo (1991) Report of decision by U.S. Court of Appeals for the 3rd Circuit. *Food Chemical News* 33 (13): 2, May 27.
- ☞ AOAC (1980) *Official Methods of Analysis* 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington D. C.
- ☞ AOAC (1984) *Official Methods of Analysis* 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington D. C.
- ☞ Ayhan, Z.; Chism, G. W. y Richter E. R. (1998). The shelf-life of minimally processed fresh cut melons. *Journal of Food Quality*, 21, 29-40.
- ☞ Baldwin, E. A. (1993) Citrus fruit. En "Biochemistry of fruit ripening". (Ed) Seymour, G.B., Taylor, J.E. y Tucker, G.A. Chapman & Hall, 2-6 Bounday Row, London SE1 8HN.
- ☞ Ballantyme, A., Stark, R. y Salman, J. D. (1988) Modified atmosphere packaging of shredded lettuce. *Intl. J. Food Sci. Technol.* 23, 267-274.
- ☞ Becker, R. y Gray, G. M. (1992) Evaluation of a water jet cutting system for slicing potatoes. *J. Food Sci.* 57, 132-137.
- ☞ Benjamin, M. M. y Datta, A. T. (1995) Acid tolerance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (4), 1669-1672.
- ☞ Brackett, R. E. (1994). Microbiological spoilage and pathogens in Minimally Processed Refrigerated fruits and vegetables. En "Minimally Processed Refrigerated Fruits & Vegetables" (Wiley, R. C. ed.) pp. 269-312, Chapman & Hall, New York.
- ☞ Buchanan, R. L. y Doyle, M. P. (1997) Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other Enterohemorrhagic E. coli. *Food Technology* 51 (10), 69-76.
- ☞ Código Alimentario Argentino. (1996). De la Canale y Asociados.

- ☞ Cort, W. M. (1982) Antioxidant properties of ascorbic acid in foods, in *Advances in Chemistry Series 200, Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism and Uses*. Seib, P. A. and Tolbut. B. M.; Eds., American Chemical Society, Washington; D. C. 533.
- ☞ Coseteng, M. Y. y Lee, C. Y. (1987) Changes in apple polyphenol oxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *J. Food Sci.* 52, 985-989.
- ☞ Ctifl (Centre technique interprofessionnel des fruits et legumnes) Study of the characteristics of raw material for the manufacture of ready-to-use fruits. Informe Final 1990-1994. 22, rue Bergere - 75009 Paris, Francia.
- ☞ Cheftel, H. (1976). "Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos" Editorial Acribia, Zaragoza (España).
- ☞ Deak, T. y Beuchat, L. R. (1993). Yeast Associated with Fruit Juices Concentrates. *J. Food Protection*, 56, 777-782.
- ☞ Duckworth, R. B. (1979) Structure. Physiology. En: "Fruit & Vegetables", Pergamon Press. New York
- ☞ Eustace, I. J. (1981). Some factors affecting oxygen transmission rates of plastic films for vacuum packaging of meat. *J. Food Technol.* 16, 73.
- ☞ FASEB (1985) The reexamination of the GRAS status of sulfiting agents. Select committee on GRAS substances. Life Sciences Research Office, federation of American Societes for Experimental Biology. Prepared under FDA contract 223-83-2020, Jan. 28.
- ☞ FDA (1982) Sulfiting agents; Proposed affirmation of GRAS status with specific limitations; Removal from GRAS status as direct human food ingredient. *Food and Drug Admin., Fed. Reg.* 47:29956.
- ☞ FDA (1986) Sulfiting agents; Revocation of GRAS status for use on fruits and vegetables intended to be served or sold raw to consumers. *Food and Drug Admin., Fed. Reg.* 51:25021-25026.
- ☞ FDA (1988a) Sulfiting agents in standarized foods; labeling requirements. *Food and Drug Admin., fed. Reg.* 53:51062-51065.
- ☞ FDA (1988b) Sulfiting agents; Affirmation of GRAS status. *Food and Drug Admin., fed. Reg.* 53:51065-51084.
- ☞ FDA (1990) Sulfiting agents; Revocation of GRAS status for use on "fresh" potatoes served or sold unpackaged or unlabeled to consumers. *Food and Drug Admin., Fed. Reg.* 55:9826-9833.
- ☞ FDA (1992) Michael Foods, Inc.; Filing of petition for affirmation of GRAS status. *Food and Drug Admin., Fed. Reg.* 57:10767.

- ☐ Ferreyra, R. M. y Tomás, J. O. (1984) Contenido de polifenoles en manzanas Red Delicious y cambios de los mismos durante el almacenamiento refrigerado. *Rev. Agroquim. Technol. Aliment.*, 24 (2), 278-285.
- ☐ Frankos, V. H., Schmitt D. F., Haws, L. C., McEvily, A. J., Iyengar, R., Miller, S. A., Munro, I. C., Clydesdale, F. M., Forbes, A. L. y Sauer, R. M. (1991) Generally recognized as safe (GRAS) evaluation of 4-hexylresorcinol for use as a processing aid for prevention of melanosis in shrimp. *Reg. Toxicol. Pharm.* 14, 202.
- ☐ Fu, B. y Labuza, T. P. (1993) Shelf life prediction, theory and application. *Food Control* 4, (3), 125.
- ☐ Gardner, J., Monohar, S. y Borisend, W. S. (1991) Method and composition for preserving fresh peeled fruits and vegetables. U.S. Patent, 4,988,523.
- ☐ Gibson, A. M., Bratchell N. y Roberts T. A. (1988). Predicting microbial growth: growth response of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Int. J. Appl. Microbiol.* 6: 155-178.
- ☐ Gunata, Y. Z., Sapis, J. C. y Moutounet, M (1987) Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grape polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 26, 1573.
- ☐ Howard, L. R. y Dewi, T. (1995) Sensory, microbiological and chemical quality of mini-peeled carrots as affected by edible coating treatment. *Journal of Food Science* 60 (1) 142-144.
- ☐ Hulme, A. C. (1970) The biochemistry of fruits and their products. Edited by A. C. Hulme. ARC Food Research Institute, Norwich, England. Academic Press. London and New York Capítulos I, IV, XIII, XI.
- ☐ Huxsoll, C. C., Bolin, H. R. y King, A. D. Jr. (1989) Physicochemical changes and treatments for lightly processed fruits and vegetables. En "Quality Factors of Fruits and Vegetables. Chemistry and Technology". ed. J.J. Jen, ACS Symp. series 405, 203-215 - Am. Chem. Soc., Washington, D. C.
- ☐ Janovitz-Klapp, A. H., Richard, F. C., Goupy, P. M. y Nicolas, J. J. (1990) Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 38, 926.
- ☐ Joslyn, M. A. y Ponting, J. P. (1987) Enzyme-catalyzed oxidative browning of fruit products. *J. Agric. Food Chem.* 35, 257.
- ☐ Kidron, M., Harel, E. y Mayer, A. M. (1978) Catechol oxidase activity in grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 29, 30.
- ☐ Kim, D. M., Smith, N. L. y Lee, C. Y. (1993). Quality of minimally processed apple slices from selected cultivars. *J. Food Sci.* 58 (5): 1115.

- ☐ Kinosita, R. y Shikata, R. (1964) On toxic moldy rice, in *Mycotoxins in Foodstuffs*, Morgan G. N., Ed. MIT Press, Cambridge.
- ☐ Knee, M. (1993) Pome Fruits. En: "Biochemistry of Fruit Ripening", Ed. G. B. Seymour, J. E. Taylor y G. A. Tucker. Chapman & Hall. London.
- ☐ Kreeger-van Rij, N. J. W. (1984). *The yeast, a taxonomic study*. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam.
- ☐ Langdon, T. T. (1987) Preventing of browning in fresh, prepared potatoes, without the use of sulfiting agents. *Food Technol.*, May, 64.
- ☐ Lee, C. Y. y Kime, R. W. (1990) Stabilization of wine with honey and SO₂. U.S. patent. 4, 900,564.
- ☐ Luo, Y. y Barbosa-Cánovas, G. (1994). "Enzymatic Browning of New and Traditional Apple Cultivars and its inhibition by 4-Hexylresorcinol". Department of Biological Systems Engineering, Washington State University, Pullman, WA 99164-6120.
- ☐ Ma, S., Silva, J. L., Hearnbergu, J. O. y Garner, J. O. Jr. (1992) Prevention of enzymatic darkening in frozen sweet potatoes [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by water blanching: relationship among darkening, phenols, and polyphenol oxidase activity. *J. Agric. Food Chem.* 40, 864-867.
- ☐ Marth, E. H. (1998) Extended shelf life refrigerated foods: Microbiological quality and safety. *Food Technology*, 52 (2), 57-62.
- ☐ Mastrocola, D. y Lerici, C. L. (1991) Colorimetric measurements of enzymatic and non-enzymatic browning in apple purees. *Italian Journal of Food Science* 3, 219-229.
- ☐ Mattila, M.; Ahvenainen, R.; Hurme, E. y Hyvonen, L. (1993) Respiration rates of some minimally processed vegetables. *Proceedings of Workshop COST94. Post-Harvest Treatment of Fruit and Vegetables*. Leuven. Belgium.
- ☐ Matthys, A. (1999) Jugos de frutas y vegetales en los Estados Unidos. *La Alimentación Latinoamericana* 229, 56-59.
- ☐ McEvily, A. J. (1991) Method of preventing browning in foods utilizing protease free latex extracts particularly from Figs; U.S. Patent 4, 981, 708.
- ☐ McEvily, A. J., Iyengar, R. y Gross A. T. (1991) Inhibition of polyphenol oxidase by phenolic compounds, in *ACS Symposium Series*, Ho. C.-T., Ed., American Chemical Society, Washington, D. C.
- ☐ McEvily, A. J.; Iyengar, R. y Otwell W. S. (1991a) Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. *Food Technology*, 45, 80-86.
- ☐ McEvily, A. J.; Iyengar, R. y Otwell W. S. (1992) Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32 (3): 253-273.

- Montedaro, G. y Cantarelli, C. (1969) *Richerche sulla polifenolossiasi della uve. III. Stabilita ed inattivazione dell'enzima. Ind. Agrar.* 7, 323.
- Mossel, D. A. A. y Moreno García, B. (1985). *Microbiología de los Alimentos.* (Ed) Acribia. 77-78.
- Nichols, R. (1985) *Post-harvest physiology and storage.* In "The Biology and Technology of the cultivated Mushroom", ed. P. B. Flegg, D. M. Spencer, and D. A. Wood, 195-210. John Wiley & Sons Ltd., New York.
- Nisperos-Carriedo, M. O., Baldwin, E. A. y Shaw, P. E. (1991) *Development of an edible coating for extending postharvest life of selected fruits and vegetable.* Proc. Florida State Hort. Soc., No. 104, 122-125.
- Nisperos-Carriedo, M. O.; Buslig, B. S. y Shaw, P. E. (1992) *Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic, and some organics acids in fruits and vegetables by HPLC.* J. Agric. Food Chem. 40, 1127-1130.
- O'Connor-Shaw, R. E.; Roberts, R.; Ford, A. L. y Nottingham, S. M. (1994) *Shelf life of minimally processed Honeydeu, Kiwifruit, Papaya, Pineapple and Cantaloupe.* J. Food Science, 59 (6), 1202-1206, 1215.
- Oszmianski, J. y Lee, C. Y. (1990) *Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey.* J. Agric. Food Chem. 38, 1892.
- Otwell, W. S., Iyengar, R. y McEvily, A. J. (1991) *Inhibition of shrimp melanosis by 4-hexylresorcinol.* J. Aquatic Food Prod. Technol. 1, 53.
- Pao, S. y Petracek, P. D. (1997) *Shelf life extension of peeled oranges by citric acid treatment.* Food Microbiology, 14, 485-491.
- Parish M. E. (1998). *Orange juice quality after treatment by thermal pasteurization or isostatic high pressure.* Lebensm.-Wiss.u.-Technol., 31, 439-442.
- Parish, M. E. (1991). *Microbiological concerns in citrus juice processing.* Food Technology, April, 128-133.
- Parish, M. E. y Higgins D. (1988). *Isolation and identification of Lactic Acid Bacteria from samples of citrus molasses and unpasteurized orange juice.* Journal of Food Science, 53, 2, 645-646.
- Parish, M. E. y Higgins D. (1989). *Yeasts and molds isolated from spoiling citrus products and by-products.* Journal of Food Protection, 52, 261-263.
- Parrish, F. W., Wiley, B. J., Simmons, E. G. y Long, L. (1966) *Production of aflatoxins and kojic acid by species of Aspergillus and Penicillium.* Appl. Microbiol., 14, 139.

- ☐ Petrel, M. T.; Fernández, P. S.; Romojaro, F. y Martínez, A. (1998). The effect of modified atmosphere packaging on ready-to-eat oranges. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 31, 322-328.
- ☐ Pifferi, P. G., Baldassari, L. y Cultrera, R. (1974) Inhibition by carboxylic acids of an o--diphenol oxidase from *Prunus avium* fruit. *J. Sci. Food Agric.* 25, 263.
- ☐ Pizzocaro, F., Torreggiani, D. y Gilardi, G. (1993) Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. *Journal of Food Processing and Preservation*, 17, 21-30.
- ☐ Ponting, J. D. y Jackson, R. (1972) Prefreezing processing of Golden Delicious apple slices. *J. Food Sci.* 37:812-814.
- ☐ Ponting, J. D., Jackson, R. y Watters, G. (1972) Refrigerated apple slices: preservative effects of ascorbic acid, calcium and sulfites. *J. Food Sci.* 37, 434.
- ☐ Raghubeer, E. V.; Ke, J. S.; Campbell, M. L. y Meyer, R. S. (1995) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and other coliforms in commercial mayonnaise and refrigerated salad dressing. *Journal of Food Protection*, 58 (1), 13-18.
- ☐ Robb, D. A., Swain, T. y Mapson, L. W. (1966) Substrates and inhibitors of the activated tyrosinase of broad bean (*Vicia faba* L.). *Phytochemistry* 5, 665.
- ☐ Robinson, T. (1983) The organic constituents of higher plants. Their chemistry and interrelationships, 5th ed., Cordus Press, Amherst, 79.
- ☐ Rocha, A.M.C.N., Brochado, C.M. y Morais, A.M.M.B. (1998) Influence of chemical treatment on quality of cut apple (cv. Jonagored). *Journal of Food Quality* 21, 13-28.
- ☐ Ross, T. y McMeekin, T. A. (1991). Predictive microbiology application of square-root model. *Food Aust.* 43, 202-207.
- ☐ Santerre, C. R. , Cash, J. N. y Vannorman, D. J. (1988). Ascorbic acid/citric acid combinations in the processing of frozen apple slices. *J. Food Sci.* 53: 1713/1716, 1736.
- ☐ Sapers, G. M. (1991) Effects of chitosan on control of enzymatic browning in apple and pear juices by filtration and centrifugation, presented at Inst. Food Technol. Annu. Meet., Dallas, 359.
- ☐ Sapers, G. M. (1993) Browning of Foods: Control by sulfites, antioxidants, and other means. Scientific Status Summary. *Food Technology*, Octubre, 75-84.
- ☐ Sapers, G. M. y Douglas, F. W. (1987) Measurement of enzymatic browning at the cut surface and in raw apple and pear fruits. *J. Food Sci.* 52, 1258.
- ☐ Sapers, G. M. y Miller, R. L. (1992) Enzymatic browning control in potato with ascorbic acid-2-phosphates. *J. Food Sci.* 57, 1132-1135.

- ☐ Sapers, G. M. y Ziolkowski, M. A. (1987) Comparison of erythorbic and ascorbic acid as inhibitor of enzymatic browning in apples. *Journal of Food Science*, 52, (6) 1732-1733, 1747.
- ☐ Sapers, G. M., Douglas, F. W. J., Bilyh, A., Hsu, H. F., Dower, H. W., Garzarella, L. y Kozempel, M. (1989a) Enzymatic browning in Atlantic potatoes and related cultivars. *J. Food Sci.* 54, 362-365.
- ☐ Sapers, G. M., El-Atawy, Y. A., Hicks, K. B. y Garzarella, L. (1989) Effect of emulsifying agents on inhibition of enzymatic browning in apple juice by ascorbyl palmitate, laurate and decanoate. *J. Food Sci.* 54, 1096.
- ☐ Sapers, G. M.; Garzarella, L. y Pilzota, V. (1990) Application of browning inhibitors to cut apple and potato by vacuum and pressure infiltration. *Journal of Food Science*, 55, 1049-1053.
- ☐ Sapers, G. M.; Hicks, K. B.; Phillips, J. G.; Garzarella, L.; Pondish, D. L.; Matulaitis, R. M.; McCormack, T. J.; Sondey, S. M.; Seib P. A. y El-Ataway, Y. S. (1989b) Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenol oxidase inhibitors, and complexing agents. *Journal of Food Science* 54, 997-1002.
- ☐ Saruno, R., Kato, F. y Ikeno, T. (1979) Kojic acid, a tyrosinase inhibitor from *Aspergillus albus*. *Agric. Biol. Chem.* 43, 1337.
- ☐ Sauberlich, H. E. (1991) Acido ascórbico. Capítulo 15, pag. 152. En: "Conocimientos actuales sobre nutrición" 6^{ta} Ed. Copublicación OPS-ILSI. Washington D. C. 20037 USA.
- ☐ Schlimme, D. V. (1995) Marketing lightly processed fruits and vegetables. *Hort Science*, 30 (1), 15-17.
- ☐ Sofos J. N. y Busta F. F. (1983) Sorbates in "Antimicrobials in foods". Branen A. L., Davidson P. M. New York. Marcel Dekker. 141-175.
- ☐ Southgate, D. A. T. (1976) Determination of Food Carbohydrates. *Applied Science*: London, 105-106.
- ☐ Splittstoesser, D. F. (1987) Fruits and Fruits Products. En "Food and Beverage Mycology". 2da. Ed. (Ed.) Beuchat, L. R. Depart. of Food Science Agricultural Experiment Station, University of Georgia. Experiment, Georgia 30212.
- ☐ Tapia, M. S.; Elguezábal, L. G. y Díaz, R. V. (1994). Ecología microbiana de alimentos conservados por métodos combinados. En "Aplicación de Factores Combinados en la Conservación de Alimentos". CYTED. Universidad Politécnica de Valencia. (Ed) Fito Maupoey, P.; Andrés Grau, A. y Chiralt Boix, A.
- ☐ Tong, C. B. S. y Hicks, K. B. (1991) Sulfated polysaccharides inhibit browning of apple juice and diced apples. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1719-1722.

- ☐ Valero, E., Varon, R. y García-Carmona, F. (1990) Inhibition of grape polyphenol oxidase by several natural aliphatic alcohols. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1097.
- ☐ Vamos-Vigyazo, L. (1981) Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15, 49-127.
- ☐ Vanderslice, J. T. y Higgs, D. J. (1991) Vitamin C content of foods: sample variability. *Am. J. Clin. Nutr.* 54, 1323S-7S.
- ☐ Walker, J. R. L. y Wilson, E. L. (1975) Studies on the enzymatic browning of apple. Inhibition of apple o-diphenol oxidase by phenolic acids. *J. Sci. Food Agric.* 26, 1825.
- ☐ Warren, B. Z. (1991) Food Preservative Composition. U. S. Patent 4,988,522..
- ☐ Wei, C. I., Fernando, S. Y. y Huang, T. S. (1991) Mutagenicity studies of kojic acid. *Proc. 15th Trop. Subtrop. Fish. Technol. Conf. Fla. Sea Grant Publ. No. 105*, 464.
- ☐ Wiley, R. C. (1994a). Introducción to Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables. En "Minimally Processed Refrigerated Fruit & Vegetables" (Ed) Wiley, R. C.
- ☐ Wiley, R. C. (1994). Preservation Methods for Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables. En "Minimally Processed Refrigerated Fruit & Vegetables" (Ed) Wiley, R.C.
- ☐ Wong, T. C., Luh, B. S. y Whitaker, J. R. (1971) Isolation and characterization of polyphenol oxidase isozymes of clingstone peach. *Plant Physiol.* 48, 19-23.
- ☐ Wyss, C. R., McGuire, M. T. y Frost, J. R. (1990) Composition for extending shelf life of fruits and vegetables. U. S. Patent. 4, 959, 230.
- ☐ Zenk, M. H. (1966) Biosynthesis of C₆-C₁ compounds, in *Biosynthesis of Aromatic Compounds*, Billek, G., Ed., Pergamon Press, Oxford, 45.
- ☐ Zhao, T., Doyle, M. P. y Besser, R. E. (1993) Fate of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Applied and Environmental Microbiology* 59, (8), 2526-2530.



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.