

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

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

CONSERVACIÓN DE VEGETALES LISTOS
PARA USAR POR LA TECNOLOGÍA DE
FACTORES COMBINADOS

por

Andrea Marcela PIAGENTINI

Instituto de Tecnología de Alimentos - F.I.Q. - U.N.L.

Director de Tesis: Ing. Daniel Raúl GÜEMES

Miembros del Jurado:

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Daniel Raúl Güemes por permitirme realizar esta tesis bajo su dirección, por su orientación y predisposición para compartir sus conocimientos.

Al Ing. Jorge Hugo Di Pentima, quien fuera inicialmente director de esta tesis junto al Ing D. R. Güemes, por su ecuanimidad, y recordar su optimismo y generosidad.

Al Instituto de Tecnología de Alimentos que con su infraestructura contribuyó a la realización de este trabajo.

Al Departamento de Microbiología del Instituto de Tecnología de Alimentos por su inestimable y valiosa colaboración.

A cada uno de los miembros del panel de evaluación sensorial del Instituto de Tecnología de Alimentos por su permanente y desinteresada colaboración.

Al Lic. Ricardo Bertone por su orientación y consejos, y a mis compañeros del Instituto de Tecnología de Alimentos por su apoyo y estímulo.

A los Téc. Clive del Popolo, Manuel Fernández y Marcelo Espósito por su asistencia en los equipos de planta piloto.

A mi familia por el constante apoyo, estímulo y confianza brindados durante todos mis estudios, y a mis amigos por la comprensión y el afecto recibido.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	xi
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Consideraciones generales sobre vegetales listos para usar.....	1
1.2 Composición y características de la espinaca.....	8
1.3 Principales causas de deterioro en vegetales listos para usar.....	10
1.3.1 Desórdenes fisiológicos.....	11
1.3.2 Reacciones químicas catalizadas por enzimas.....	12
1.3.3 Desarrollo microbiológico.....	17
1.4 Métodos de conservación para vegetales listos para usar.....	21
1.4.1 Conservación refrigerada.....	22
1.4.2 Tratamientos químicos.....	24
1.4.2.1 Antimicrobianos.....	25
1.4.2.2 Antioxidantes.....	28
1.4.3 Envasado en atmósfera modificada.....	30
1.4.3.1 Efecto de la AM sobre la fisiología y reacciones bioquímicas de los vegetales listos para usar.....	32
1.4.3.2 Efecto de las AM sobre el desarrollo microbiológico en vegetales listos para usar.....	34
1.5 Tecnología de los factores combinados.....	36
1.6 Objetivos.....	39

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Procesamiento de espinaca.....	40
2.1.1 Materia prima.....	40
2.1.2 Acondicionamiento y cortado.....	40
2.1.3 Lavado y enjuague.....	41
2.1.4 Tratamiento químico.....	41
2.1.4.1 Metodología para la determinación del dominio experimental.....	42
2.1.4.2 Determinación del dominio experimental.....	45
2.1.5 Escurrido.....	51
2.1.6 Envasado.....	53
2.1.6.1 Factores para el diseño de un envase de atmósfera modificada (AM).....	53
2.1.6.2 Selección del material y tipo de envase.....	55
2.1.7 Almacenamiento.....	57
2.2 Diseño experimental.....	58
2.3 Análisis estadístico.....	61
2.4 Toma de muestras durante el procesamiento.....	61
2.5 Análisis microbiológico.....	63
2.6 Determinación del pH.....	63
2.7 Análisis de la composición gaseosa en el interior del envase.....	63
2.7.1 Determinación de la concentración de los gases.....	64
2.7.2 Cálculo de los factores de respuesta.....	65
2.7.2.1 Cálculo del factor de respuesta para CO ₂	65
2.7.2.2 Cálculo del factor de respuesta para O ₂	68
2.7.2.3 Cálculo del factor de respuesta para N ₂	70
2.8 Evaluación sensorial.....	72
2.9 Determinación de clorofila.....	75
2.9.1 Medida espectrofotométrica.....	76
2.9.2 Cálculo de las concentraciones.....	76
2.10 Pérdida de peso.....	79

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Flora aerobia mesófila.....	80
3.1.1 Efecto del tratamiento químico, tipo de envase y tiempo de conservación sobre FAM.....	82
3.1.2 Modelo para flora aerobia mesófila.....	83
3.1.3 Verificación del modelo para FAM.....	91
3.1.4 Determinación de las condiciones de trabajo.....	92
3.1.5 Efectos de las etapas de procesamiento sobre FAM.....	95
3.2 pH de espinaca.....	99
3.2.1 Efecto del tratamiento químico, tipo de envase y tiempo de conservación sobre el pH de espinaca.....	101
3.2.2 Modelos para pH de espinaca envasada en bolsas de OPP y LDPE.....	102
3.2.3 Verificación de los modelos para pH.....	111
3.2.4 pH y Flora Aerobia Mesófila.....	112
3.3 Composición gaseosa.....	116
3.3.1 Efecto del tratamiento químico, tipo de envase y tiempo de conservación sobre la composición gaseosa.....	118
3.3.2 Modelos para las concentraciones de CO ₂ y O ₂	120
3.3.3 Verificación de los modelos para las concentraciones de CO ₂ y O ₂	129
3.3.4 Composición gaseosa y Flora Aerobia Mesófila.....	130
3.3.5 Composición gaseosa y pH.....	132
3.4 Evaluación sensorial.....	133
3.4.1 Efecto del tratamiento químico, tipo de envase y tiempo de conservación sobre los atributos sensoriales.....	136
3.4.2 Modelos para el desarrollo de <i>off-odors</i> en espinaca envasada en bolsas de OPP y LDPE.....	138
3.4.3 Modelos para apariencia general, marchitamiento, amarronamiento y color en espinaca mínimamente procesada envasada en OPP y LDPE.....	144
3.4.4 Verificación de los modelos para los atributos sensoriales.....	150
3.5 Retención de Clorofila.....	152
3.5.1 Efecto del tratamiento químico y tipo de envase sobre la retención de clorofila.....	153

3.6 Pérdida de peso.....	155
3.6.1 Efecto del tratamiento químico, tipo de envase y tiempo de conservación sobre la pérdida de peso.....	156
3.7 Factores que limitan la vida útil de espinaca mínimamente procesada.....	157
4. CONCLUSIONES.....	160
5. ANEXO	
5.1 Comprobación de la validez del modelo seleccionado.....	165
5.1.1 Consideraciones generales.....	165
5.1.2 Comprobación de la idoneidad del modelo.....	166
5.2 Gráficos de diagnósticos.....	167
6. NOMENCLATURA.....	182
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	185

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 <i>Composición de espinaca por 100 g de porción comestible.....</i>	9
Tabla 1.2 <i>Efecto relativo del CO₂ en el desarrollo de varios microorganismos.....</i>	35
Tabla 2.1 <i>Concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico usadas por otros autores.....</i>	42
Tabla 2.2 <i>Variables independientes no codificadas y codificadas. Símbolos y niveles usados para la determinación del dominio experimental.....</i>	44
Tabla 2.3 <i>Resultados experimentales para el pH de espinaca.....</i>	45
Tabla 2.4 <i>Análisis de variancia para el modelo propuesto para pH.....</i>	46
Tabla 2.5 <i>Valores de los coeficientes de regresión de la ecuación de 2^{do} orden para pH.....</i>	47
Tabla 2.6 <i>Valores predichos y experimentales para la verificación del modelo para pH.....</i>	50
Tabla 2.7 <i>Calor de respiración de espinaca entera.....</i>	54
Tabla 2.8 <i>Especificaciones de las películas plásticas.....</i>	57
Tabla 2.9 <i>Variables independientes no codificadas y codificadas. Símbolos y niveles usados.....</i>	60
Tabla 2.10 <i>Valores experimentales para la determinación del F_{RCO₂}.....</i>	66
Tabla 2.11 <i>Estimación de los parámetros de regresión y resultados del t-test para el CO₂.....</i>	67
Tabla 2.12 <i>Análisis de variancia para el modelo lineal correspondiente al CO₂.....</i>	67
Tabla 2.13 <i>Valores experimentales para la determinación del F_{RO₂}.....</i>	68
Tabla 2.14 <i>Estimación de los parámetros de regresión y resultados del t-test para el O₂.....</i>	69
Tabla 2.15 <i>Análisis de variancia para el modelo lineal correspondiente al O₂.....</i>	69
Tabla 2.16 <i>Valores experimentales para la determinación del F_{RN₂}.....</i>	70
Tabla 2.17 <i>Estimación de los parámetros de regresión y resultados del t-test para el N₂.....</i>	71
Tabla 2.18 <i>Análisis de variancia para el modelo lineal correspondiente al N₂.....</i>	71
Tabla 2.19 <i>Factores de respuesta obtenidos.....</i>	72
Tabla 3.1 <i>Resultados experimentales para la FAM de espinaca.....</i>	81
Tabla 3.2 <i>Análisis de variancia multifactorial para FAM.....</i>	82
Tabla 3.3 <i>Análisis de variancia para el modelo propuesto para FAM.....</i>	84

Tabla 3.4 Valores de los coeficientes de regresión de la ecuación de 2 ^{do} orden para FAM.....	85
Tabla 3.5 Valores predichos y experimentales para la verificación del modelo para FAM.....	92
Tabla 3.6 Resultados experimentales de FAM para el día 0.....	95
Tabla 3.7 Análisis de variancia para FAM de las muestras TQ seleccionadas.....	96
Tabla 3.8 Análisis de variancia para FAM en las diferentes etapas de procesamiento.....	97
Tabla 3.9 Análisis de rango múltiple de Duncan para FAM en las diferentes etapas de procesamiento.....	98
Tabla 3.10 Resultados experimentales para el pH de espinaca.....	100
Tabla 3.11 Análisis de variancia para pH espinaca.....	101
Tabla 3.12 Análisis de variancia para el modelo propuesto para pH _{OPP}	103
Tabla 3.13 Análisis de variancia para el modelo propuesto para pH _{PE}	104
Tabla 3.14 Valores de los coeficientes de las ecuaciones 3.2 y 3.3 para pH _{OPP} y pH _{PE}	105
Tabla 3.15 Valores predichos y experimentales para la verificación del modelo para pH _{OPP}	111
Tabla 3.16 Valores predichos y experimentales para la verificación del modelo para pH _{PE}	111
Tabla 3.17 Resultados experimentales para la composición gaseosa en los envases de espinaca.....	117
Tabla 3.18 Análisis de variancia multifactorial para %CO ₂	118
Tabla 3.19 Análisis de variancia multifactorial para %O ₂	119
Tabla 3.20 Análisis de variancia para los modelos propuestos para % CO ₂ y % O ₂ en OPP.....	120
Tabla 3.21 Análisis de variancia para los modelos propuestos para % CO ₂ y %O ₂ en LDPE.....	121
Tabla 3.22 Valores de los coeficientes de las ecuaciones de 2 ^{do} orden para % CO ₂ y % O ₂ en los envases de OPP y LDPE.....	123
Tabla 3.23 Valores predichos y experimentales para la verificación de los modelos para la composición gaseosa para c _C =0.20% y c _A = 1.00%.....	130
Tabla 3.24 Resultados experimentales para la evaluación sensorial de espinaca mínimamente procesada envasada en bolsas de OPP.....	134
Tabla 3.25 Resultados experimentales para la evaluación sensorial de espinaca mínimamente procesada envasada en bolsas de LDPE.....	135

Tabla 3.26 <i>Análisis de variancia multifactorial para los atributos sensoriales.....</i>	136
Tabla 3.27 <i>Análisis de variancia para los modelos propuestos para off-odors.....</i>	138
Tabla 3.28 <i>Valores de los coeficientes de regresión de las ecuaciones de 2^{do} orden para el desarrollo de off-odors.....</i>	139
Tabla 3.29 <i>Análisis de variancia para los modelos propuestos para los atributos sensoriales visuales.....</i>	145
Tabla 3.30 <i>Valores de los coeficientes de regresión de las ecuaciones de 2^{do} orden para los atributos sensoriales visuales.....</i>	146
Tabla 3.31 <i>Valores predichos y experimentales para la verificación de los modelos para los atributos sensoriales para $c_C = 0.20\%$ y $c_A = 1.00\%$.....</i>	151
Tabla 3.32 <i>Resultados experimentales para la retención de clorofila total a los 14 días de almacenamiento.....</i>	152
Tabla 3.33 <i>Análisis de variancia multifactorial para retención de clorofila total.....</i>	153
Tabla 3.34 <i>Resultados experimentales para la pérdida de peso de espinaca mínimamente procesada envasada en bolsas de OPP y LDPE.....</i>	155
Tabla 3.35 <i>Análisis de variancia multifactorial para pérdida de peso (%).....</i>	156

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 <i>Reacción de amarronamiento enzimático</i>	13
Figura 1.2 <i>Degradación de sustancias pécticas por acción enzimática</i>	16
Figura 2.1 <i>Superficie de respuesta para pH</i>	48
Figura 2.2 <i>Gráfica de Contornos para pH de espinaca</i>	49
Figura 2.3 <i>Datos experimentales y predichos por el modelo de pH($c_A = 1.50\%$)</i>	50
Figura 2.4 <i>Determinación del peso de espinaca para calcular I_e</i>	52
Figura 2.5 <i>Índice de escurrido teórico y experimental</i>	52
Figura 2.6 <i>Diagrama de flujo y toma de muestras durante el procesamiento de espinaca mínimamente procesada</i>	62
Figura 2.7 <i>Recta de regresión para CO_2</i>	66
Figura 2.8 <i>Recta de regresión para O_2</i>	68
Figura 2.9 <i>Recta de regresión para N_2</i>	70
Figura 2.10 <i>Planilla para la evaluación sensorial de espinaca mínimamente procesada</i>	74
Figura 2.11 <i>Espectros de absorción para los extractos de espinaca</i>	78
Figura 3.1 <i>Gráficos de superficies de respuesta y de contornos para FAM ($t = constante$)</i>	87
Figura 3.2 <i>Gráficos de superficies de respuesta y de contornos para FAM ($c_C = constante$)</i>	90
Figura 3.3 <i>Gráfica datos experimentales y predichos por el modelo para FAM ($c_C = 0.20\%$, $c_A = 1.00\%$)</i>	91
Figura 3.4 <i>Recuento de FAM para el día 0</i>	93
Figura 3.5 <i>Recuentos promedios de FAM para las diferentes etapas de procesamiento</i>	99
Figura 3.6 <i>Gráficos de Superficie de respuesta y de Contorno para pH_{OPP} ($t = constante$)</i>	107
Figura 3.7 <i>Gráficos de Superficie de respuesta y de Contorno para pH_{OPP} ($c_C = constante$)</i>	108
Figura 3.8 <i>Gráficos de Superficie de respuesta y de Contorno para pH_{PE} ($c_A = constante$)</i>	110
Figura 3.9 <i>Gráficas de contornos para pH y FAM ($t = 0$)</i>	113
Figura 3.10 <i>Gráficas de contornos para pH y FAM ($c_A = constante$)</i>	115

Figura 3.11 Gráficos de Superficie de respuesta para % CO ₂ y % O ₂ en bolsas de OPP ($c_A = 0.50\%$).....	124
Figura 3.12 Gráficos de Superficie de respuesta para % CO ₂ y % O ₂ en bolsas de LDPE ($c_A = 0.50\%$).....	126
Figura 3.13 Concentración de CO ₂ en envases de OPP y LDPE ($c_C = c_A = 0.50\%$)....	129
Figura 3.14 Gráfica de pH para los dos tipos de envases ($c_C = c_A = 0.5\%$).....	133
Figura 3.15 Superficie de respuesta para off-odors de espinaca envasada en bolsas de OPP.....	140
Figura 3.16 Gráficos de contorno para off-odors de espinaca envasada en bolsas de OPP.....	141
Figura 3.17 Superficie de respuesta para off-odors de espinaca envasadas en bolsas de LDPE.....	143
Figura 3.18 Gráficos de contorno para off-odors en espinaca envasada en bolsas de LDPE.....	144
Figura 3.19 Gráficos de contornos para Apariencia General.....	147
Figura 3.20 Gráficos de contornos para Marchitamiento.....	148
Figura 3.21 Gráficos de contornos para Amarronamiento.....	149
Figura 3.22 Gráficos de contornos para Color.....	150
Figura 3.23 Gráficos de contornos superpuestos para Apariencia General y FAM.....	158
Figura 5.1 Gráficos de diagnóstico para el modelo de pH.....	168
Figura 5.2 Gráficos de diagnóstico para el modelo de FAM de espinaca.....	169
Figura 5.3 Gráficos de diagnóstico para el modelo de pH de espinaca envasada en OPP.....	170
Figura 5.4 Gráficos de diagnóstico para el modelo de pH de espinaca envasada en LDPE.....	171
Figura 5.5 Gráficos de diagnóstico para el modelo de CO ₂ de espinaca envasada en OPP.....	172
Figura 5.6 Gráficos de diagnóstico para el modelo de O ₂ de espinaca envasada en OPP.....	173
Figura 5.7 Gráficos de diagnóstico para el modelo de CO ₂ de espinaca envasada en LDPE.....	174
Figura 5.8 Gráficos de diagnóstico para el modelo de O ₂ de espinaca envasada en LDPE.....	175
Figura 5.9 Gráficos de diagnóstico para el modelo de off-odors de espinaca envasada en OPP.....	176
Figura 5.10 Gráficos de diagnóstico para el modelo de off-odors de espinaca envasada en LDPE.....	177
Figura 5.11 Gráficos de diagnóstico para el modelo de Apariencia General de	

	<i>espinaca mínimamente procesada</i>	178
Figura 5.12	<i>Gráficos de diagnóstico para el modelo de Marchitamiento de espinaca mínimamente procesada</i>	179
Figura 5.13	<i>Gráficos de diagnóstico para el modelo de Amarronamiento de espinaca mínimamente procesada</i>	180
Figura 5.14	<i>Gráficos de diagnóstico para el modelo de Color de espinaca mínimamente procesada</i>	181

RESUMEN

Para satisfacer la creciente demanda de productos vegetales que conserven su calidad de frescos y puedan ser directamente utilizados, aparecen en el mercado los productos de la 4^{ta} gama, "listos para usar" ó "mínimamente procesados". El objetivo es ofrecer al consumidor un producto con apariencia similar a la del vegetal fresco, con vida útil extendida y al mismo tiempo producir un alimento seguro y que mantenga su calidad sensorial y nutritiva.

Algunos de los procedimientos para conservar alimentos, utilizados individualmente en vegetales listos para usar, pueden inadvertidamente conducir a un producto potencialmente peligroso para el consumidor. Teniendo en cuenta la calidad, no es conveniente realizar un único tratamiento en condiciones extremas para inhibir el desarrollo de microorganismos y la actividad enzimática. Además, se debe considerar que las células vegetales están vivas y deben permanecer así, o el tejido perderá su deseable calidad de fresco.

La tecnología de factores combinados es una metodología adecuada al efecto. Propone usar una combinación apropiada de diversos tratamientos individualmente subinhibitorios que mantengan la seguridad, calidad sensorial y nutritiva, y extiendan la vida útil.

Por ello, se analizó el efecto combinado de un agente antimicrobiano como el ácido cítrico, un agente antioxidante como el ácido ascórbico y el tipo de envase utilizado, sobre la calidad de espinaca mínimamente procesada durante el almacenamiento refrigerado.

Se desarrollaron modelos matemáticos que permitieron analizar y predecir el efecto de las concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico, y del tiempo de almacenamiento sobre el desarrollo de la flora aerobia mesófila (FAM), el pH de espinaca, la concentración de CO₂ y O₂ en la atmósfera desarrollada en el envase y los atributos sensoriales de calidad.

Se determinó que las atmósferas desarrolladas en los envases de polipropileno monoorientado (OPP) y polietileno de baja densidad (LDPE), ejercieron el mismo efecto sobre la FAM. La FAM disminuyó con el aumento de la concentración de ácido cítrico. El ácido ascórbico redujo la FAM, principalmente a bajas concentraciones de ácido cítrico. El modelo para FAM permitió determinar las concentraciones del tratamiento químico que darían recuentos inferiores a 5.10^5 UFC/g ($FAM \leq 5.70$), límite impuesto a la fecha de elaboración.

Durante el procesamiento, no se encontraron diferencias entre la FAM de la materia prima y de la materia prima acondicionada, pero ambas fueron superiores a las obtenidas para espinaca lavada (STQ) y la tratada químicamente (TQ). La FAM de las muestras TQ fueron significativamente inferiores a las de las muestras STQ. Las muestras TQ presentaron recuentos inferiores al límite establecido.

El pH de espinaca disminuyó con el aumento de la concentración de ácido cítrico y ácido ascórbico. Este efecto fue menor luego de 7 y 14 días. El pH aumentó durante el almacenamiento. El pH de espinaca envasada en OPP fue mayor al de la envasada en LDPE. No se obtuvieron valores de pH inferiores a 4.

La composición gaseosa de la atmósfera desarrollada fue significativamente diferente para los 2 envases. En ambos casos, %CO₂ aumentó y %O₂ disminuyó durante el almacenamiento. En los envases de OPP, se alcanzaron %CO₂ superiores y %O₂ inferiores a los obtenidos en los envases de LDPE.

La calidad sensorial disminuyó con el tiempo de conservación refrigerada. El tipo de *film* afectó significativamente el desarrollo de *off-odors*, pero no afectó los atributos sensoriales visuales.

La retención de clorofila no fue afectada por el tratamiento químico ni por el tipo de envase. Ambos tipos de *films* redujeron efectivamente la pérdida de peso.

El desarrollo de FAM, *off-odors* ó la apariencia general, serían los factores que limitan la vida útil de espinaca mínimamente procesada, dependiendo del tipo de envase y tratamiento químico.

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS VEGETALES LISTOS PARA USAR

En los últimos años se ha observado una demanda creciente de productos vegetales que conserven su calidad de frescos y puedan ser directamente utilizados, ahorrando el tiempo que insume el acondicionamiento, corte, lavado, de los vegetales enteros.

Para satisfacer esta demanda aparecen en el mercado los productos de la 4^{ta} gama, también llamados "listos para usar" o "mínimamente procesados". Esta denominación de 4^{ta} gama es atribuida en consideración a otras tres gamas o formas de comercialización de vegetales:

- 1^{ra} gama: frescos enteros
- 2^{da} gama: productos esterilizados por calor
- 3^{ra} gama: productos congelados

El objetivo de los vegetales listos para usar es ofrecer al consumidor un producto con apariencia similar a la del vegetal fresco, con una vida útil extendida y al mismo tiempo producir un alimento seguro y que mantenga su calidad sensorial y nutritiva.

Los vegetales listos para usar surgieron en los Estados Unidos hace 30 años, principalmente para atender la demanda de alimentos institucionales y la industria de comidas rápidas. Posteriormente, se desarrollaron en Europa para el mercado minorista.

Los productos listos para usar son actualmente un segmento de rápido crecimiento dentro de la industria frutihortícola. A pesar de que no existen estadísticas definitivas para esta industria, algunos economistas estiman que las ventas de productos mínimamente procesados representan el 8 - 10 % del mercado total de frutas y verduras. Algunos miembros de la industria anticipan que más del 25 % de todos los productos frutihortícolas se comercializarán en la forma de "listos para usar" en los próximos 5 - 10 años (Cantwell, 1996).

Se estima que los vegetales mínimamente procesados representaron en 1995 el 10% del volumen total de hortalizas comercializadas y de ese volumen, se considera que más del 90 % lo constituyeron las hortalizas de hojas (Fox, 1995). Las ensaladas frescas precortadas y envasadas constituyen el segmento individual de más rápido crecimiento dentro de los alimentos de conveniencia (Kaufman, 1996) y hasta de la industria alimentaria (Lin, 1996). En Argentina se comercializan principalmente en las grandes cadenas de hipermercados, donde representan un 20 % de las ventas de verduras (Gorodish, 1997).

La calidad de los vegetales mínimamente procesados está dada por una combinación de atributos que determinan su valor como alimento. Estos factores de calidad incluyen apariencia visual (frescura, color, defectos y decaimiento), textura (crujibilidad, turgencia, firmeza e integridad del tejido), *flavor* (sabor y aroma), valor nutritivo (vitamina A y C, minerales y fibra dietaria), y seguridad (ausencia de residuos químicos y contaminación microbiana). La calidad de los productos mínimamente procesados depende de la calidad del producto intacto, del método de elaboración, y de las subsecuentes condiciones de manejo (Kader, Mitcham, 1996).

Los vegetales listos para usar son más perecederos que las materias primas no procesadas de las que se obtienen; es decir, el procesamiento mínimo que reciben frecuentemente aumenta la perecibilidad en vez de hacer a los productos más estables (Shewfelt, 1987). Esto contrasta con la mayoría de los sistemas de procesamiento, en los cuales la conservación se acrecienta por los tratamientos del proceso.

Los vegetales listos para usar son productos frescos, metabólicamente activos, que tienen un tratamiento postcosecha que puede incluir las siguientes etapas de procesamiento: acondicionamiento, cortado, lavado, escurrido, envasado, almacenamiento, expedición (Huxsoll, Bolin, 1989; Mazollier, Leteinturier, 1991).

Las etapas de elaboración y el tratamiento específico usado para cada etapa de este procesamiento dependerán de cuál sea el producto. No obstante, se presentan a continuación los aspectos generales a considerar para los vegetales listos para usar.

La primera etapa que se realiza para la elaboración de los vegetales mínimamente procesados es el acondicionamiento inicial. Esta etapa tiene dos objetivos: eliminar las partes dañadas, no comestibles, o que no puedan conservarse; y debe permitir efectuar más fácilmente las operaciones siguientes (Mazollier, Leteinturier, 1991). Se realizan usualmente pelado, retoques, recorte y corte. La mayoría de estas etapas son operaciones mecánicas y deberá evitarse dañar el producto, ya que los daños ocasionados conducirán indefectiblemente, al igual que en los productos frescos, a la pérdida de calidad y tiempo de vida útil (Huxsoll, Bolin, 1989). Esta etapa del proceso será, pues, determinante para el costo y la calidad del producto acabado. Una buena calidad comercial y un estado sanitario satisfactorio de la materia prima facilitarán mucho esta operación. Un vegetal muy degradado ocasiona pérdidas importantes en materia prima y en productividad. Esta operación produce una pérdida del 20-70% del producto dependiendo del vegetal (Scandella, Leteinturier, 1989).

A continuación, el vegetal acondicionado es cortado. Esta operación da la forma definitiva al producto. Es una operación traumatizante que disminuye fuertemente las posibilidades de conservación. La ruptura de tejidos eleva la velocidad de respiración, producción de etileno y transpiración, lo que conduce a una degradación rápida de la calidad. Además, el corte aumenta las áreas de tejido dañado disponible para la degradación microbiana (Priepke et al., 1976). Por otra parte, el corte expone los tejidos internos del producto, permitiendo a los microorganismos alterantes superar las capas protectoras; y que los microorganismos normalmente inoocuos actúen como agentes deteriorantes oportunistas. En general, la vida útil de la mayoría de los productos puede incrementarse reduciendo los impactos máquina-producto y producto-producto.

Posteriormente el vegetal es lavado. Esta operación no sólo es indispensable para eliminar tierra y otros elementos extraños, sino también para reducir la carga microbiana inicial. El lavado permite remover los contenidos celulares que han sido liberados durante el cortado y que a través de reacciones enzimáticas pueden afectar desfavorablemente la calidad de los vegetales listos para usar, en especial en verduras de hoja. Estos fluidos contienen polifenoloxidasas (PPO) y compuestos fenólicos responsables del amarronamiento (Bolin et al., 1977).

La operación de lavado-desinfección puede realizarse usando agua clorada (Mazollier, 1988; Zuang et al., 1995). La eficacia desinfectante de una solución clorada está relacionada con diferentes parámetros: concentración, tiempo de contacto, pH, naturaleza del agua a usar y temperatura. Una parte del cloro agregado será consumido (20%) por la materia orgánica y minerales presentes en el agua, y por lo tanto no actuará como desinfectante (Scandella, Leteinturier, 1989). La temperatura afecta la solubilidad y la capacidad germicida del cloro. Se sugiere realizar esta operación a temperaturas menores a 10 °C. La acción del agua clorada se ve favorecida en medio ácido, ya que la capacidad germicida del cloro está asociada a su presencia como ácido hipocloroso (HOCl). A medida que el pH disminuye, será mayor la proporción de HOCl sin disociar en solución. Sin embargo si el pH es demasiado bajo ($\text{pH} < 4$) provocará que parte del cloro escape como gas de la solución. Para lograr una buena proporción de ácido hipocloroso y conservar la efectividad de la solución, el pH no debería ser superior a 7 ni inferior a 4 (Pirovani, 1998). En cuanto al tiempo de contacto se debe tener en cuenta que la mayor parte de la acción sanitizante del cloro se realiza en los primeros minutos de exposición. La exposición prolongada en soluciones concentradas de cloro puede producir un blanqueo superficial.

Mazollier (1988) sugirió una concentración de 120 ppm de cloro activo y 1-2 min para el lavado desinfección de vegetales de hoja. Pirovani (1998) determinó que concentraciones superiores a 90 ppm y tiempos de 2-8 min eran adecuadas para el lavado desinfección de espinaca destinada a mínimamente procesada.

Luego de la operación de lavado desinfección se realiza un enjuague con agua de calidad microbiológica que permite la remoción del cloro residual.

El agua líquida residual que está en contacto con los vegetales debido a la operación previa de lavado, afecta la microflora presente. Envasar un producto muy húmedo favorecería el desarrollo de microorganismos (Bracket, 1994). Por lo tanto se debe eliminar el exceso de agua que se encuentra sobre el vegetal, permitiendo envasar un producto con mínima humedad residual. El método elegido en la industria de los vegetales mínimamente procesados es la centrifugación (Gorny, 1996). Bolin et al. (1977) encontraron que el escurrido centrífugo extendía la vida útil de lechuga cortada. Esta operación se realiza habitualmente en un equipo centrífugo y puede llegar a ser traumatizante si no se controla adecuadamente. Una centrifugación excesiva puede resultar en daño celular y causar una pérdida posterior de fluido celular del producto. De acuerdo a Ryall y Lipton (1979) se nota un deterioro apreciable en textura si la pérdida de humedad excede el 5%.

La cantidad de agua eliminada por el escurrido centrífugo es función de la fuerza de centrifugación y del tiempo de centrifugado. Fuerzas de centrifugación de 3-340 G (102-1082 rpm) aplicadas durante 5 min fueron efectivas para lechuga cortada (Bolin et al., 1977). Pirovani (1998) encontró que el tiempo de centrifugación no influye significativamente sobre la cantidad de agua extraída, independientemente de la velocidad de centrifugación y sugiere una velocidad de 756 rpm y 5.8 min para espinaca.

A continuación, el producto debe envasarse para facilitar su distribución y venta. Un envase adecuado debe ayudar a mantener la estabilidad y extender la vida útil de los vegetales mínimamente procesados. Un envase apropiado debe proteger al producto del daño físico y la abrasión superficial causada por la manipulación, debe tolerar los ambientes de almacenamiento rutinarios sin pérdida de funcionalidad y debe ser compatible con el producto a envasar, prevenir la contaminación microbiana, regular la evaporación de agua del producto, el marchitamiento, a la vez que mejorar su presentación y facilitar el autoservicio.

Las películas poliméricas plásticas son el material utilizado para el envasado de vegetales mínimamente procesados (Schlimme, Rooney, 1994). Existen dos tipos básicos de envases para estos productos: envases preformados; y envases que se forman, llenan y sellan (*form-fill-seal*) en una etapa en un equipo de envasado automático. Ambos tipos de envases son diferentes en su practicidad, función y conveniencia (Myers, 1989).

Las bolsas de películas poliméricas son el tipo de envase preformado más común y reconocible, teniendo como clara ventaja su conveniencia y disponibilidad en cualquier tamaño. Además pueden manufacturarse en un amplio rango de permeabilidades.

Otro tipo de envase preformado son las bandejas formadas de un material rígido y selladas en la parte superior con una película plástica. A pesar de tener algún atractivo estético, tienen algunas desventajas muy serias. Están formadas de un material rígido grueso que no permite el suficiente intercambio gaseoso a través de él. Eso significa que todo el O₂ debe entrar a través de la tapa usada. Esto prueba ser altamente impráctico porque el área superficial no es usualmente lo suficientemente grande para permitir que entre la cantidad apropiada de O₂. Este sistema es el más difundido, hasta la fecha, en nuestro país.

El tipo de envase de mayor crecimiento y más eficiente para los productos mínimamente procesados es aquel que se forma, llena y sella en una etapa en equipos de envasado automático. Las máquinas pueden ser verticales para producir bolsas flexibles tipo almohada (*pillow-bag*), o máquinas horizontales que realizan el termoformado de bandejas semirrígidas, las llenan y recubren con un film. Este sistema de envasado requiere mayor inversión de capital y se utiliza principalmente para altos volúmenes de producción.

Debido a que los productos frescos son metabólicamente activos, tienen la capacidad de cambiar ellos mismos el ambiente que los rodea. Mientras el producto respira (consume O₂ y produce CO₂) se genera en el interior del envase una atmósfera modificada (AM). Después de la refrigeración, el envasado en AM es considerado el segundo método más efectivo para extender la vida útil de productos vegetales frescos y mínimamente procesados (Schlimme, Rooney, 1994).

Estas AM generadas en el interior del envase, pueden reducir la velocidad de respiración, demorar la senescencia, retardar el ablandamiento y hacer más lentos los cambios composicionales. No obstante, la exposición a niveles de CO₂ elevados puede causar daños fisiológicos y a bajos niveles de O₂, conducir a una respiración anaerobia y desarrollo de sabores y olores extraños (Kader, 1986; Zagory, Kader, 1988).

Paradójicamente, los mismos principios de las AM que justifican sus beneficios son, a la vez, la principal causa de controversia alrededor de los riesgos a la salud que esas AM conllevan (Beuchat, Brackett, 1990; Corlett, 1989). La flora aeróbica, que normalmente deteriora organolépticamente el producto y previene el desarrollo de patógenos, están ahora en una atmósfera desventajosa y su desarrollo es inhibido. Este hecho, en combinación con la emergencia de nuevas especies de patógenos que desarrollan en condiciones de refrigeración, han puesto un gran énfasis en desarrollar sistemas globales de alimentos seguros (Hao, Brackett, 1993; King, Bolin, 1989).

La AM generada en el envase resulta de un equilibrio dinámico entre la actividad respiratoria del producto y la difusión de los gases a través de la película plástica. La correcta combinación del material de envase, peso de producto y composición gaseosa óptima dentro de un envase son los componentes críticos que deben determinarse para cada producto para mantener la calidad y extender la vida útil. El envasado no puede corregir un manejo no sanitario del producto, abuso de la temperatura o pobre calidad de la materia prima. La elección incorrecta del material de envase puede causar un deterioro acelerado del producto (Gorny, 1996).

Finalmente el producto debe almacenarse y comercializarse bajo temperatura de refrigeración. El almacenamiento refrigerado ha sido y es ampliamente usado para preservar frutas y hortalizas sin procesar (Wills, et al., 1981; Shewfelt, 1986). También resulta fundamental para preservar vegetales frescos mínimamente procesados (Bolin, et al., 1977; Chambroy, 1987; King, Bolin, 1989), tanto por su efecto sobre las reacciones químicas y fisiológicas, como sobre la velocidad de reproducción de microorganismos (Willocx et al., 1994).

La vida útil de los vegetales mínimamente procesados depende de la temperatura del producto. La integridad de la cadena de frío desde la elaboración, durante la distribución y hasta su consumo, es el componente más crítico para alcanzar la máxima vida útil, mantener la calidad, permitir que actúe correctamente el envasado en atmósfera modificada y obtener un alimento seguro (Thompson, Suslow, 1996). Por lo tanto, una condición primordial para el éxito del desarrollo de la 4^{ta} gama es preservar ininterrumpidamente la cadena de frío.

En Francia, los vegetales mínimamente procesados deben ser conservados a 0/4°C (Anónimo, 1989). En Holanda su legislación exige una cadena de frío de 4/6 °C y en Bélgica se comercializan a 8 °C (Carbonell, 1990). La responsabilidad por el mantenimiento de la cadena de frío recae en el productor y el distribuidor, así como también en el consumidor, siendo las exhibidoras de ventas y las heladeras domésticas los puntos críticos de la misma.

1.2 COMPOSICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA ESPINACA

La espinaca (*Spinacia oleracea L.*) es el vegetal de hoja seleccionado para la realización de la presente tesis. Es una planta anual de tallo recto, hueco, ramoso; con hojas radicales alternas, rugosas, algo espesas pero tiernas; de color verde oscuro brillante, más pálido en la parte inferior.

Existen tres tipos comerciales de espinacas, clasificadas de acuerdo a su tipo de hoja:

- De hoja lisa o plana: el limbo de la hoja presenta desniveles leves con respecto a sus nervaduras. Se utiliza para procesamiento.
- Crespa (tipo *savoy*): el limbo de la hoja presenta desniveles manifiestos con sus nervaduras. Se utiliza para el mercado en fresco.
- Semi-*savoy*: presenta características intermedias entre las dos anteriores. Se usa tanto para mercado en fresco como para procesamiento.

Las variedades comerciales más importantes son Híbrida 424, Viroflay, Ultraflay, Super Dorrego, Virginia Savoy, Super Green, Samos F1.

La espinaca está disponible casi todo el año. Existe un ligero aumento en la producción durante los meses de mayo a septiembre y una disminución en los meses de verano (diciembre a marzo).

En nuestro país, la espinaca se produce en la zona del Gran Buenos Aires, Mar del Plata y Santa Fe. En la provincia de Santa Fe se produce espinaca en el denominado Corredor Frutihortícola. En los departamentos La Capital, Rosario, Constitución y San

Lorenzo se sembraron 419 has, con una producción de 3633.5 ton durante el período 97/98 (Anónimo, 1999).

En los últimos años los nutricionistas han puesto énfasis en el uso de vegetales de hojas en la dieta, debido a sus cualidades saludables (*health-giving*). Las hojas verdes juegan un importante rol en la dieta humana como fuentes vitales de proteínas, fibra, minerales y vitaminas.

Tabla 1.1
Composición de espinaca por 100 g de porción comestible

Agua	90.7 g
Proteína	3.2 g
Grasas	0.3 g
Hidratos de carbono	4.3 g
Ca	93.0 mg
P	51.0 mg
Fe	3.1 mg
Na	71.0 mg
K	470.0 mg
Mg	88.0 mg
Provitamina A	8100 UI
Tiamina	0.1 mg
Riboflavina	0.2 mg
Niacina	0.6 mg
Vitamina C	51.0 mg
Energía	26 Cal

Salunkhe, Desai, 1984

La espinaca es rica en provitamina A (β caroteno) y contiene apreciables cantidades de ácido ascórbico, riboflavina, y una pequeña cantidad de tiamina (Tabla 1.1). También contiene cantidades significativas de calcio, hierro y fósforo, pero la disponibilidad de calcio se cree que es baja debido a su reacción con el ácido oxálico para formar oxalato de calcio (Salunkhe, Desai, 1984).

Las principales formas de comercializar la espinaca son como lista para cocinar, o cortada y mezclada con vegetales para ensalada como la lechuga. Esta última forma, consumir espinaca cruda, permite un mayor aprovechamiento de los nutrientes presentes en este vegetal (Salunkhe, Desai, 1984).

1.3 PRINCIPALES CAUSAS DE DETERIORO EN VEGETALES LISTOS PARA USAR

Actualmente el mayor desafío para la industria de vegetales mínimamente procesados es la extensión de la vida útil, brindando al consumidor un producto sanitariamente seguro.

El deterioro de vegetales mínimamente procesados puede resultar de la pérdida o degradación de las características físicas, color, textura, sabor y aroma, así como también, inaptitud del producto por degradación microbiológica. La vida útil del producto está determinada como el tiempo requerido para que alguna de estas características de calidad se degrade hasta un nivel inaceptable. La importancia relativa de cada factor de calidad varía de producto a producto y de mercado a mercado (Huxsoll, Bolin, 1989).

Los vegetales listos para usar, al igual que los vegetales enteros, comienzan a deteriorarse desde la cosecha debido al envejecimiento fisiológico y al deterioro microbiológico. La ruptura del tejido vegetal durante el procesamiento produce también descompartmentalización o deslocalización de enzimas y sustratos que conducen a varias reacciones bioquímicas deteriorantes tal como amarronamiento, *off-flavors*, y cambios de textura (Varoquax, Wiley, 1994).

En las frutas y vegetales enteros, el agua en los espacios intercelulares no está directamente expuesta a la atmósfera externa. Cuando el tejido vegetal es dañado por el corte o pelado, quedan expuestos los tejidos internos y aumenta la velocidad de evaporación del agua. La relación entre la velocidad de pérdida de agua del tejido dañado y del tejido intacto varía de 5 a 10 veces para órganos como la zanahoria; de 10 a 100 veces para las hojas de espinaca; hasta 500 veces para tubérculos como la papa (Brecht, 1995). La pérdida de agua en vegetales listos para usar por evaporación reduce la calidad sensorial causando marchitamiento, arrugamiento y pérdida de turgencia que induce a la pérdida de crujibilidad (Schlimme, 1995). Por lo tanto uno de los aspectos críticos para mantener una apariencia visual aceptable es evitar la deshidratación.

1.3.1 Desórdenes fisiológicos

El efecto más marcado de la ruptura del tejido vegetal es la activación de su

metabolismo. Las principales manifestaciones de este fenómeno son el aumento en la velocidad de respiración y en algunos casos, en la producción de etileno (Rosen, Kader, 1989). Este aumento en el metabolismo producirá un aumento en la velocidad de deterioro.

El aumento en la velocidad de respiración produce una más rápida pérdida de azúcares y otros compuestos que determinan el sabor y aroma. Además, el aumento del metabolismo de vegetales mínimamente procesados resulta en un consumo más rápido de O₂ en el envase. La velocidad de respiración de lechuga cortada es 2-3 veces mayor que la de la lechuga entera (Cantwell, 1996). La velocidad de consumo de O₂ de endibia cortada es solamente 1.2 veces mayor que la del vegetal entero. Esta relación aumenta a 3-7 veces cuando se compara la velocidad de respiración de zanahoria rallada con zanahoria entera (Varoquax, 1991).

Los cambios degradativos que ocurren durante la senescencia son inducidos o acelerados por el procesamiento mínimo que reciben los vegetales. Esta respuesta se nota particularmente en las células o tejidos adyacentes a aquellos que han sido dañados por la acción del corte. El etileno producido en estas condiciones puede aumentar la permeabilidad de las membranas y tal vez reducir la biosíntesis de fosfolípidos, que pueden alterar los procesos dinámicos de las estructuras celulares e integridad de las membranas (Watada, et al. 1990).

La producción de etileno inducida por los tejidos dañados afecta principalmente a las frutas ya que el etileno contribuye a la síntesis de numerosas enzimas involucradas en la maduración. La estimulación de la síntesis de etileno por estrés ocurre generalmente después de un tiempo *lag* de 10-30 minutos, alcanzando un pico dentro de las 6 a 12 horas y cediendo posteriormente (Varoquax, 1991).

El etileno producido puede acelerar el deterioro y senescencia en tejidos vegetales. El etileno generado por los tejidos dañados durante el procesamiento fue suficiente para acelerar el ablandamiento de banana y kiwi, y la pérdida de clorofila en espinaca, pero no en brócoli (Abe, Watada, 1991).

1.3.2 Reacciones químicas catalizadas por enzimas

Las enzimas y los sustratos se encuentran normalmente localizados en diferentes compartimentos celulares, separados por membranas semipermeables, y su transferencia está activamente regulada. La membrana celular rodea el citoplasma de la célula y establece un límite entre la célula y su ambiente externo. La membrana que rodea el compartimento más grande, la vacuola, separa el citoplasma con sus enzimas, de los ácidos orgánicos y compuestos fenólicos almacenados en ella. El daño físico que se produce al tejido vegetal durante el procesamiento no sólo daña físicamente estas membranas lípido-proteicas, sino que también altera sus funciones de manera que compuestos incompatibles se mezclan y producen reacciones incontrolables y no deseadas (Salveit, 1996).

Las reacciones enzimáticas en las células dañadas son responsable del desarrollo de cambios en la calidad sensorial del producto tales como el desarrollo de *off-flavor*, cambios en el color y pérdida de firmeza.

Algunas enzimas como la peroxidasa y ácido ascórbico oxidasa catalizan la oxidación de vitamina C (ácido ascórbico), afectando el valor nutritivo de las frutas y vegetales listos para usar (Fennema, 1996).

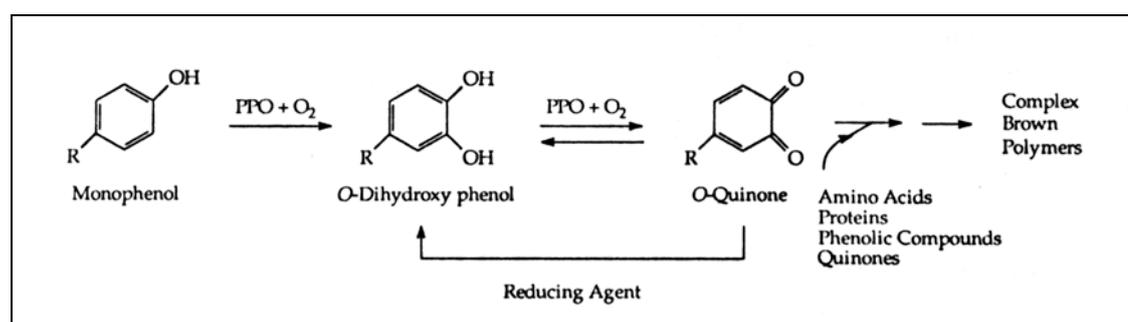
Modificaciones en el color

La principal alteración del color en los tejidos de frutas y hortalizas cortadas es el amarronamiento enzimático. El amarronamiento oxidativo en la superficie del corte es el factor que limita la vida útil de muchas frutas y vegetales mínimamente procesados (Carlin et al.; 1990).

Esta reacción, como se ilustra en la figura 1.1, tiene lugar cuando los compuestos monofenólicos de los tejidos vegetales, en presencia de oxígeno atmosférico y polifenoloxidasas (PPO), son hidroxilados a o-difenoles. Posteriormente, son oxidados, también en presencia de O₂ y PPO, a o-quinonas. Estas o-quinonas son químicamente muy reactivas e inestables en medio acuoso. Ellas condensan y reaccionan no enzimáticamente con los numerosos constituyentes celulares como los aminoácidos, compuestos fenólicos y entre ellas, para producir pigmentos de estructura indeterminada,

denominados genéricamente como melaninas (Sapers, 1993). La hidroxilación de monofenoles es el paso lento o determinante de la velocidad de amarronamiento. Las o-quinonas pueden retrogradarse a los compuestos fenólicos iniciales en presencia de un compuesto reductor (Fennema, 1996).

Figura 1.1
Reacción de amarronamiento enzimático



Sapers, 1993

La PPO, la enzima más importante en frutas y vegetales listos para usar, es también conocida como tirosinasa, o-difenol oxidasa, catecol oxidasa. Esta enzima tiene un pH óptimo de 5-7 y una temperatura óptima de 25 °C (Mathewson, 1998).

La enzima es relativamente lábil al calor y puede inhibirse por ácidos, haluros, ácidos fenólicos, sulfitos, agentes quelantes, agentes reductores tal como ácido ascórbico, y cisteína. Una gran variedad de compuestos fenólicos son oxidados por la PPO; los sustratos más importantes son catequinas, ésteres del ácido cinámico, 3,4-hidroxifenilalanina (DOPA), tirosina, ácido cafeico y ácido clorogénico entre otros (Sapers, 1993).

Las reacciones enzimáticas involucradas en el amarronamiento aún están en investigación. Las actividades enzimáticas dependen marcadamente del pH; una reducción de 0.5 en el valor del pH natural de manzana resulta en una disminución del 50% en la actividad de la polifenoloxidasa (Varoquax, Wiley, 1994).

El daño producido al tejido induce la biosíntesis de algunas de las enzimas involucradas en las reacciones de amarronamiento o biosíntesis de sustratos. Así la

intensidad del amarronamiento en diversos tejidos puede estar afectada por las actividades relativas de las oxidasas y las concentraciones de sustratos (Brecht, 1995).

Los métodos para inhibir el amarronamiento enzimático se basan en la eliminación de la reacción de uno o más de sus componentes esenciales que son O₂, enzima, sustrato o Cu que se encuentra en la enzima como grupo prostético. El amarronamiento enzimático puede controlarse en algunas frutas y vegetales por escaldado para inactivar la PPO. Pero no puede usarse con algunos productos ya que afectaría adversamente el sabor, olor y textura. Consecuentemente, deben usarse otros tratamientos tales como exclusión de O₂ y/o aplicación de inhibidores de amarronamiento (Sapers, 1993).

Otras reacciones pueden alterar el color natural de frutas y vegetales frescos (Varoquax, 1991). La pérdida de color verde en frutas y hortalizas procesadas, y listas para usar está asociada con la disminución en la calidad de tales productos. La clorofila, el pigmento responsable del color verde de varias frutas y hortalizas, puede degradarse a compuestos tales como feoforbido y feofitina. En esta degradación participan un ácido o la enzima clorofilasa que produce la remoción de la cadena de fitol de la clorofila. El feoforbido puede posteriormente metabolizarse a compuestos sin color en tejidos metabólicamente activos. La conversión incluye la descomposición del anillo de porfirina y es un probable resultado de la acción de una dioxigenasa. Por lo tanto, la velocidad y camino para la degradación de la clorofila diferirá entre alimentos altamente procesados, que pierden su actividad metabólica, y alimentos mínimamente procesados, que aún mantienen actividad metabólica (Heaton, Marangoni, 1996).

Las clorofilas también son blanqueadas en presencia de lipoxigenasa, ciertos ácidos grasos y oxígeno. Los antioxidantes ascorbil palmitato y ácido ascórbico reducen el blanqueo. Esto indica que el oxígeno está involucrado en el proceso de degradación de la clorofila (Baardseth, von Elbe, 1989).

De todas maneras, el camino de degradación de la clorofila probablemente difiere entre las distintas especies de plantas. El sistema peroxidasa-peróxido de hidrógeno parece estar involucrado en el camino de degradación de la clorofila en espinaca, basado en la alta actividad notada y la presencia de un compuesto fenólico, *apigenin*, que es necesario para que la reacción de degradación prosiga (Watada et al. 1990).

La clorofila no se degrada por acción de la luz durante la fotosíntesis en las células vegetales sanas porque está protegida por los carotenoides y otros lípidos que la rodean. Una vez que esta protección se pierde por senescencia o por daño celular causado por el procesamiento, las clorofilas son susceptibles a la fotodegradación. Cuando estas condiciones prevalecen y están presentes luz y O₂, las clorofilas se decoloran irreversiblemente (von Elbe, Schwartz, 1996).

La lipoxigenasa también oxida pigmentos como los β-carotenos y xantófilas; y la peroxidasa cataliza la degradación de carotenoides en ausencia de ácidos grasos insaturados y la decoloración de las antocianinas (Fennema, 1996).

Pérdida de firmeza

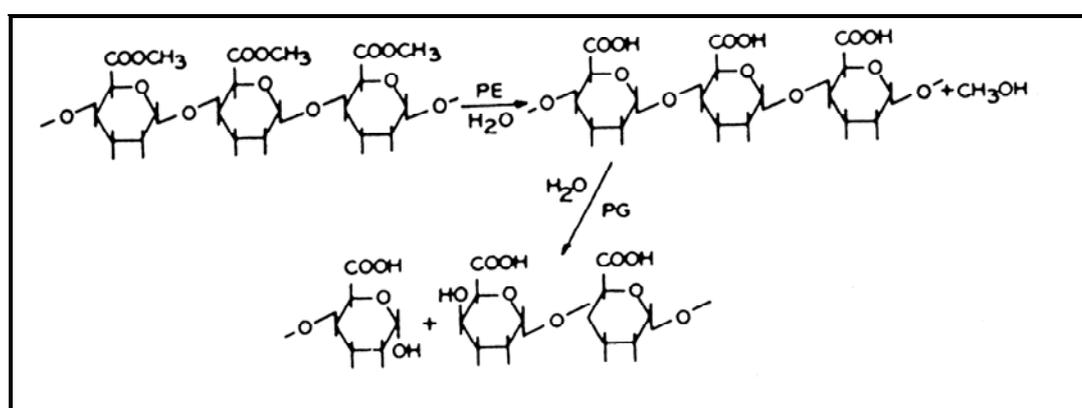
La pared de las células de tejidos vegetales está compuesta principalmente por fibras celulósicas embebidas en una matriz de hemicelulosas y sustancias pécticas. Las sustancias pécticas dan a la pared celular la capacidad de absorber grandes cantidades de agua y contribuyen a su textura, mientras la celulosa da rigidez a las células. Entre las células individuales está la laminilla media, que contiene principalmente sustancias pécticas que sirven de material de cementación para mantener las células unidas entre sí. Existe una variación sustancial en la composición de la pared celular entre los tejidos de frutas y hortalizas y aún entre varios grupos botánicos (King, Bolin, 1989).

Cuando la red polimérica de las células se rompe irreversiblemente, ocurre un debilitamiento de las células, resultando en una pérdida de turgor celular y textura. Durante la senescencia puede ocurrir conversión de protopectina insoluble a pectina, disminución en la cristalinidad de la celulosa, disminución en ácido galacturónico, reducción en volumen celular, adelgazamiento y/o replegado de las paredes celulares.

Las enzimas pécticas hidrolizan los compuestos pécticos, resultando en pérdida de turgor celular. La sensibilidad del tejido vegetal a la hidrólisis enzimática varía considerablemente entre cultivares y aún con la madurez del tejido o composición mineral.

La pectin esterasa (PE) y las poligalacturonasas (PG) son las principales enzimas endógenas presentes en los tejidos vegetales que pueden alterar las sustancias pécticas (Figura 1.2). Las enzimas pécticas producidas por microorganismos pueden ser también responsables del deterioro de frutas y vegetales frescos y mínimamente procesados (Fennema, 1996).

Figura 1.2
Degradación de sustancias pécticas por acción enzimática



Fennema, 1996

La pectin esterasa (PE), remueve los grupos metoxilos de las unidades de ácido galacturónico esterificado, dando pectina de bajo metoxilo o ácido poligalacturónico. Esta enzima también se conoce como pectasa, pectin demetoxilasa y pectin metil esterasa. Las poligalacturonasas (PG) hidrolizan los enlaces glicosídicos del ácido poligalacturónico preferentemente en las unidades desmetiladas. El pH óptimo de estas enzimas se encuentra en el rango de 4.5-7.5, y tienen una temperatura óptima de 30-35 °C (Mathewson, 1998).

Enzimas tales como β -galactosidasa y exo-PG inician la mayoría de los cambios indeseables en textura. Ambas solubilizan la pectina y degradan la pared celular (King, Bolin, 1989).

El rol de la celulasa en el ablandamiento de la pared celular no es claro. Se presume que hidroliza la celulosa, debilitando estructuralmente la pared celular. La celulasa puede complementar la acción de la pectin esterasa y poligalacturonasa (Fennema, 1996). Su pH óptimo es de 4.5-6.5 y su temperatura óptima de 45 °C (Mathewson, 1998).

Desarrollo de *off-flavors*

Entre los diferentes tipos de alteraciones bioquímicas del aroma propio de un órgano vegetal, la peroxidación enzimática de ácidos grasos poliinsaturados es una de las más rápidas. Esta reacción, catalizada por la lipoxigenasa, conduce a la formación de numerosos compuestos volátiles aldehídicos y cetónicos que confieren un aroma desagradable (Carlin et al.; 1990). También las enzimas peroxidasa (PO) y catalasa están primariamente asociadas con cambios en sabor y aroma (Wiley, 1994).

La lipoxigenasa cataliza la peroxidación de ciertos ácidos grasos para formar hidroperóxidos conjugados, generando radicales libres que pueden atacar membranas celulares intactas y así causar una posterior ruptura de la membrana. La actividad de la lipoxigenasa está también involucrada en la producción de volátiles responsables del aroma (Brecht, 1995). La lipoxigenasa tiene un pH óptimo de 7-8 y temperatura óptima de 25 °C (Mathewson, 1998).

1.3.3 Desarrollo microbiológico

La proliferación y acción de los microorganismos es una de las principales causas de alteración de los productos vegetales listos para usar. Los microorganismos alterantes pueden causar hasta un 15% de las pérdidas postcosecha. Además de los microorganismos que producen pérdida de calidad, pueden estar también presentes microorganismos patógenos para el hombre, afectando la seguridad de estos productos.

La microflora presente en los vegetales listos para usar incluye un gran número de especies de hongos, levaduras y bacterias. Entre las bacterias Gram-negativas prevalecen las familias de las *Pseudomonas* y *Enterobacterias* (Varoquax, Wiley, 1994). También se han detectado bacterias Gram-positivas, principalmente representadas por bacterias lácticas, y numerosas especies de levaduras, en mezclas para ensaladas y zanahoria rallada (Denis, Picoche, 1986).

Sin embargo las proporciones entre las diferentes floras (*Enterobacterias*, *Pseudomonas*, flora láctica, levaduras, hongos) dependen de varios factores, todos relacionados con la capacidad invasiva de los microorganismos para establecerse y crecer:

composición de la materia prima, contaminación inicial, condiciones de procesamiento, almacenamiento y expedición (King, Bolin, 1989).

El tipo de microorganismos presentes en los productos vegetales frescos varía ampliamente. Estos microorganismos acceden a los productos a través del polvo o tierra, aire, agua de irrigación, abonos, insectos, o animales.

Por su contenido en nutrientes, los vegetales son capaces de permitir el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias. El elevado contenido de agua de estos productos favorece la proliferación de bacterias productoras de alteración, y las proporciones relativamente bajas de carbohidratos y grasas, son índices de que la mayor parte de este agua se encuentra en forma disponible para el crecimiento de virtualmente todos los microorganismos.

Los niveles de pH de la mayoría de los vegetales se encuentran comprendidos dentro de los límites de crecimiento de gran número de bacterias y hongos ($\text{pH} > 4$). No obstante, como consecuencia del temprano y más rápido crecimiento de las bacterias, los hongos son escasos, por lo que no resulta sorprendente que las bacterias sean los agentes que originen más frecuentemente alteraciones en estos productos vegetales (Brackett, 1994).

Microorganismos alterantes

Una amplia variedad de microorganismos pueden ser aislados de los vegetales de hoja listos para usar. Muchas de las bacterias aisladas son pectinolíticas y causan deterioro de los tejidos. Las principales bacterias pectinolíticas encontradas son *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas fluorescens*. Otras bacterias pectinolíticas son *Bacillus spp* y *Xanthomonas campestris*. Estos microorganismos crecerán a bajas temperaturas donde muchas otras no lo harán (King, Bolin, 1989).

Estos productos contienen también bacterias que no necesariamente son destructivas para los tejidos, tal como *Enterobacter spp*, *Pseudomonas no fluorescens* y bacterias ácido lácticas.

Entre las bacterias aisladas en el producto final, una parte importante de la microflora posee un neto poder de alteración. La microflora representada en su mayoría

por bacterias gram-negativas, representa la esencia de la flora de alteración. Los dos principales grupos los constituyen las *Enterobacterias* y las *Pseudomonas* (Varoquax, 1991).

La flora láctica es relativamente débil y está constituida principalmente por los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacilos* en proporciones similares. Las corynebacterias y levaduras se encuentran en bajas proporciones.

Las *Enterobacterias* están esencialmente representadas por las coliformes y más precisamente por el género *Erwinia* que se encuentran en una proporción del 80-85%. El 15-20% restante está representado por el género *Enterobacter*.

Las *Pseudomonas* corresponden en su mayoría a las especies *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas pútida*, *Pseudomonas marginalis* y *Pseudomonas viridiflava*.

La flora láctica, como ya se mencionó, se compone de géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. Las especies más frecuentemente encontradas son *Lactobacillus brevis* y *Leuconostoc mesenteroides* (Denis, Picoche, 1986).

La *Erwinia carotovora* y las *Pseudomonas* como la *Pseudomonas marginalis* son responsables de la podredumbre blanda bacteriana. Estos microorganismos descomponen las pectinas dando lugar al reblandecimiento, con disminución de la firmeza del tejido.

La podredumbre blanda producida por la bacteria *Erwinia carotovora* es la principal enfermedad de las espinacas recolectadas (Namesny, 1993). Babic et al. (1996) encontraron que la mayoría de las bacterias aisladas en espinaca cortada pertenecían al género *Pseudomonas*. La principal especie se identificó como *Pseudomonas fluorescens*. El 80 % de las *Pseudomonas* aisladas tenía actividad pectinolítica, proteolítica, y lipolítica.

Los hongos presentan poblaciones despreciables y no ocasionan problemas particulares durante la conservación. En espinaca fresca se mencionan dos hongos como importantes: *Penospora spinaciae*, causante del mildiu pulverulento y *Botrytis*, causante de la podredumbre gris (Namesny, 1993).

Microorganismos patógenos

Los vegetales pueden estar contaminados por un gran número de microorganismos patógenos para el hombre. *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* enteropatógena, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolítica* y *Aeromonas hydrophila* son las más frecuentemente aisladas de productos vegetales (Carlin, et al.; 1990).

Sin embargo, los vegetales listos para usar, son conservados bajo cadena de frío y, además, se trata de productos frescos, portadores de una abundante microflora saprófita, susceptible de eliminar los microorganismos poco competitivos y de alterar rápidamente la calidad del producto antes que desarrollen los microorganismos peligrosos (Brackett, 1994).

Los riesgos para la salud por esta clase de productos se deben pues a microorganismos que pueden desarrollarse a 4 °C y competir con la microflora saprófita. Por esta razón, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolítica*, *Aeromonas hydrophila*, *Shigella*, *Clostridium botulinum* y *Escherichia coli* 0157:H7 enteropatógena presentan un riesgo potencial en los productos listos para usar.

Además, existen otras bacterias que sobrevivirán largos períodos a 5 °C, como *Campilobacter jejuni* y *Brucella spp.*

Otro grupo de bacterias patógenas crecerán a temperaturas más altas que 5 °C y podrían ser un peligro para la salud si los alimentos refrigerados son mantenidos a temperaturas abusivas. Este grupo incluye *Bacillus cereus*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus* (King, Bolin, 1989).

La mayoría de los microorganismos de interés en vegetales crecerán mejor a pH cercanos a la neutralidad.

El pH óptimo de crecimiento de *Yersinia enterocolítica* está comprendido entre 7-8. El *Clostridium botulinum* usualmente no crecerá a pH <4.6 (Brackett, 1994).

La acidez es un factor importante en el desarrollo de *Listeria monocytogenes*. La bacteria no se desarrolla a pH de 4.4 - 4.6 a 10 °C y 5.0 - 5.2 a 4 °C. La presencia de

aniones orgánicos como el citrato elevan el valor de pH mínimo de crecimiento (Carlin, et al.; 1990).

Por lo tanto, una acidificación compatible con el mantenimiento de la calidad de los vegetales listos para usar podría reducir los riesgos para la salud asociados a estas bacterias.

1.4 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN PARA VEGETALES LISTOS PARA USAR

Un objetivo anhelado por los tecnólogos de alimentos ha sido extender la vida útil de productos frescos. Hasta hace poco tiempo, la investigación estuvo principalmente dedicada a extender la vida útil de frutas y hortalizas enteras. El nuevo desafío es extender y expandir el conocimiento sobre las frutas y hortalizas mínimamente procesadas. La producción de alimentos mínimamente procesados crecerá rápidamente en los próximos años, si se desarrollan nuevas técnicas para extender la vida útil mientras se asegura la inocuidad del alimento. El desarrollo de estas nuevas técnicas para producir y comercializar frutas y hortalizas listas para usar es un desafío para la industria de alimentos.

Como se mencionó en el apartado anterior, la extensión de la vida útil de frutas y hortalizas mínimamente procesadas confronta dos problemas básicos. Primero el tejido vegetal es un tejido vivo que respira, en donde muchas reacciones químicas están interaccionando. Algunas de las reacciones, si no se controlan, pueden conducir a rápida senescencia o cambios de calidad. Segundo, la proliferación microbiana debe retardarse. El crecimiento de microorganismos patógenos es de interés para la seguridad del alimento, especialmente con vegetales de mayor pH en contraste con el menor pH de las frutas. El crecimiento visible u olor causado por microorganismos es estéticamente inaceptable (King, Bolin, 1989).

Para resolver estos problemas, deben superarse numerosas barreras técnicas. El control de la fisiología del tejido vegetal y el crecimiento microbiológico es crítico para frutas y hortalizas mínimamente procesadas. El tejido debe permanecer vivo y mantener la calidad con razonable vida útil. El envasado debe también desarrollarse para ayudar a alcanzar estos objetivos.

La distribución necesita responder a las demandas que seguramente serán requeridas para presentar estos productos al consumidor.

Finalmente, deben desarrollarse las regulaciones que asegurarán la inocuidad de estos productos y permitirán el desarrollo comercial de esta industria.

Los métodos de conservación para extender la vida útil de vegetales mínimamente procesados pueden utilizar muchos de los procedimientos clásicos para conservar alimentos. Estos métodos pueden ser: refrigeración; tratamiento químico con acidulantes, antioxidantes, o antimicrobianos; envasado en atmósfera modificada.

En algunos casos, la reducción de la actividad de agua (a_w) por remoción de la humedad reduciría seriamente la turgencia y apariencia de fresco de los vegetales mínimamente procesados. En cambio, si la reducción de a_w se produce por el agregado de agentes osmóticos como azúcar o sal, el producto resultante podría tener sabor y aroma indeseables, diferentes al del vegetal fresco (Huxsoll, Bolin, 1989).

La conservación por congelación tiende a causar cambios en textura y otras características del vegetal fresco.

Los tratamientos térmicos necesarios para la eliminación de *Listeria monocytogenes*, numerosas especies de *Salmonella* y eliminación de la producción de toxina de *C. botulinum* podrían ser perjudiciales para preservar el sabor, aroma, textura, color y calidad nutritiva del vegetal fresco (Wiley, 1994).

Los tratamientos con radiaciones ionizantes (irradiación) son frecuentemente propuestos como un medio para extender la vida útil de frutas y vegetales frescos. Desafortunadamente, los niveles de radiación que se requieren para prevenir el deterioro microbiológico inducen el ablandamiento de tejidos (Huxsoll, Bolin, 1989).

1.4.1 Conservación refrigerada

El almacenamiento refrigerado a temperatura por encima de la temperatura de congelación, durante la distribución y venta, es una etapa necesaria en los vegetales mínimamente procesados. Las temperaturas de refrigeración disminuyen la velocidad de crecimiento microbiológico y son efectivas para reducir la actividad enzimática. La mayoría de las reacciones metabólicas de los microorganismos patógenos para el hombre

y fitopatógenos, están catalizadas por enzimas. La importancia de la actividad enzimática en los vegetales mínimamente procesados hace que temperaturas de refrigeración sean una necesidad absoluta para estos productos. La velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas está controlada en gran medida por la temperatura. Por cada 10°C de aumento de temperatura (en el rango biológico) existe un aumento de 2-4 veces en la velocidad de reacción. Esto es conocido como el coeficiente de temperatura Q_{10} . Inversamente, cada 10°C de reducción de temperatura se obtiene una disminución similar en la velocidad de la actividad biológica. La baja temperatura es efectiva en disminuir la velocidad metabólica y así demorar el deterioro del tejido. Esto indica que la refrigeración debe ser un factor continuo en la conservación de vegetales mínimamente procesados (Wills, et al.;1981; Wiley, 1994).

La reducción de la temperatura disminuye la velocidad de respiración y retarda la senescencia. A temperaturas superiores a 10°C, la generación de CO₂ aumenta marcadamente debido al aumento en el metabolismo y desarrollo microbiano.

La disminución de la temperatura reduce el desarrollo de *off-flavor* en arvejas y la pérdida de firmeza en rodajas de kiwi (Varoquax, Wiley, 1994). También reduce los cambios de color en los tejidos dañados, reduciendo la actividad de las enzimas tirosinasa y o-difeniloxidasas. La pérdida de color verde en lechuga cortada es mucho menor a 2°C que a 10 °C (Bolin et al., 1977). La pérdida de vitamina C en espinaca se reduce de 79 % a 33 % cuando la temperatura de almacenamiento se disminuye de 20 °C a 4 °C (Fennema, 1975).

Paralelamente, la disminución de la temperatura de almacenamiento permite disminuir el crecimiento del conjunto de la microflora de los vegetales listos para usar. Reducir la temperatura efectivamente aumenta el tiempo *lag* y disminuye la velocidad de reproducción o tiempo de generación de microorganismos (King, Bolin, 1989). La población de microorganismos mesófilos en muestras de repollo mínimamente procesado luego de 10 días de almacenamiento a 4°C fue 100 a 1000 veces menor que las poblaciones observadas en las muestras almacenadas a 12°C y 20°C (Piagentini et al., 1997).

Pero los microorganismos presentan reacciones diferentes a la disminución de la temperatura de conservación. En los vegetales de hoja almacenados a baja temperatura, la

flora está principalmente formada por bacterias Gram-negativas, y a medida que la temperatura aumenta la flora cambia a bacterias Gram-positivas productoras de ácido láctico (King, Bolin, 1989).

En el pasado, una temperatura de 6°C era considerada segura para evitar el desarrollo de las bacterias patógenas. No obstante, con el advenimiento de alimentos mínimamente procesados que exhiben vida útil extendida, se debe prestar mucha atención a microorganismos que crecen debajo de 6°C tales como *C. botulinum* tipo E y cepas no proteolíticas B y F, cepas de *V. parahaemolyticus*, y *Y. enterocolitica* (Wiley, 1994)

Otra enfermedad transmitida por alimentos es la causada por *L. monocytogenes*, un anaerobio facultativo, capaz de sobrevivir y multiplicarse a temperaturas de 1°C hasta 45°C con una temperatura óptima de crecimiento de 30-37°C y se ha convertido en uno de los principales problemas de seguridad en vegetales mínimamente procesados, ya que puede desarrollar a temperaturas cercanas a 0°C y hasta -1.5 °C.

Un mayor problema asociado a frutas y vegetales mínimamente procesados es la posibilidad de abuso de temperatura durante la distribución, transporte, almacenamiento o venta. Las frutas y hortalizas son normalmente clasificadas como alimentos de vida útil extendida y bajo las mejores condiciones deberían tener indicadores de tiempo/temperatura que alerten tanto a consumidores como elaboradores sobre el abuso de temperatura (Wiley,1994).

1.4.2 Tratamientos químicos

Para la realización de tratamientos químicos, se han utilizado compuestos químicos naturales o sintéticos que controlan el deterioro y mantienen la calidad de los productos. Existen compuestos antimicrobianos, y antioxidantes que previenen el amarronamiento, la decoloración de pigmentos, y protegen contra la pérdida de sabor y aroma, cambios en la textura y pérdida de la calidad nutritiva.

La acción del compuesto antimicrobiano depende del tipo, género y especie de microorganismo. La eficiencia de un antimicrobiano depende en gran medida también de otros factores tales como el pH, actividad de agua, temperatura, atmósfera gaseosa, carga microbiana inicial y tipo de alimento.

La eficiencia de los compuestos que actúan como antioxidantes depende de numerosos factores: pH, actividad de agua, temperatura, luz, tipo y actividad del sistema enzimático, atmósfera gaseosa, tipo de alimento y contenido de metales pesados. La efectividad de los antioxidantes está controlada por las condiciones ambientales del sistema alimenticio, su concentración, y permanencia durante el almacenamiento o vida útil del producto.

En los vegetales mínimamente procesados se debe considerar el uso de ambos compuestos, antimicrobianos y antioxidantes, para proveer un producto seguro o inocuo y de alta calidad de fresco durante toda su vida útil. Esto sugiere que las barreras de conservación usadas para vegetales mínimamente procesados deben actuar tanto sobre la carga de flora microbiana como sobre las enzimas claves que podrían causar problemas de calidad.

1.4.2.1 Antimicrobianos

Muchos compuestos encontrados naturalmente en los alimentos tienen actividad antimicrobiana. El desafío es utilizarlos como conservantes sin afectar adversamente a los alimentos a los que son agregados.

Los compuestos antimicrobianos, ya sean naturalmente presentes en los alimentos, agregados a los alimentos o formados en respuesta a un esfuerzo físico o químico pueden contribuir a extender la vida útil de alimentos no procesados y procesados.

Ácidos orgánicos y compuestos relacionados

Los ácidos orgánicos, ya sea que estén presentes naturalmente en los alimentos, acumulados como resultado de fermentación, o intencionalmente agregados durante el procesamiento, se han utilizado por años para controlar el deterioro microbiano. Algunos ácidos orgánicos se comportan principalmente como fungicidas o fungistáticos, mientras otros tienden a ser más efectivos al inhibir el crecimiento bacteriano. Los datos actuales sugieren que el modo de acción de los ácidos orgánicos es atribuido a la directa reducción del pH del sustrato, reducción del pH interno celular por ionización de la molécula de ácido no disociada, o la interrupción del mecanismo de transporte a través de la membrana celular (Beuchat, Golden, 1989).

Ya que la forma no disociada de la molécula de ácido es en primer lugar responsable de la actividad antimicrobiana, la efectividad depende de la constante de disociación (pKa) del ácido. Debido a que el pKa de la mayoría de los ácidos orgánicos está entre 3 y 5, los ácidos orgánicos son generalmente más efectivos a valores de pH bajos. Así, la acidificación de alimentos de baja acidez mejora grandemente las características antimicrobianas del alimento. No obstante, este mecanismo depende de la completa difusión del ácido a través de la muestra y al centro de cada partícula de alimento involucrada en la acidificación (Wiley, 1994).

Numerosos ácidos orgánicos han sido utilizados como antimicrobianos en diferentes tipos de alimentos: ácidos cítrico, succínico, málico, tartárico, acético, sórbico, benzoico, láctico y propiónico, entre otros. A continuación se detalla el efecto del ácido cítrico sobre el desarrollo microbiológico. El ácido cítrico es un compuesto que se presenta naturalmente en frutas y hortalizas, es considerado GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro); utilizado en concentraciones adecuadas no afecta adversamente las características sensoriales, nutritivas y la seguridad del vegetal fresco, y es el recomendado por numerosos autores para ser usado en vegetales mínimamente procesados (Wiley, 1994; Gorny, 1996; Sapers, 1993).

Ácido cítrico

Se encuentra presente en numerosas frutas, especialmente las cítricas, y en hortalizas. Se ha encontrado que la acción del ácido cítrico fue más efectiva que la de los ácidos acético y láctico para inhibir el crecimiento de bacterias termófilas. El ácido cítrico es inhibitorio de la bacteria *flat-sour* aislada del jugo de tomate, y es más inhibitorio de la bacteria *Salmonella* que los ácidos lácticos y clorhídrico. También se demostró que el ácido cítrico a concentraciones tan bajas como 0.3% reducía efectivamente la población de *Salmonella* viable en carcasas de pollo (Beuchat, Golden, 1989).

Se encontró que una combinación de ácido ascórbico y ácido cítrico inhibe el crecimiento y la producción de toxina de *Clostridium botulinum* tipo B en papas cocidas envasadas en vacío. El ácido cítrico también es efectivo al reducir poblaciones de bacterias en huevos duros cocidos (Beuchat, Golden, 1989).

La reducción del pH influye sobre el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*. Estas bacterias no se desarrollarían a pH bajo. Para *Listeria monocytogenes* el valor de pH mínimo de crecimiento se eleva en presencia de aniones orgánicos como el citrato (Carlin et al., 1990).

Omary et al. (1993) trataron repollo cortado con una solución de ácido cítrico y eritorbato de sodio. Este tratamiento tuvo un efecto antibacteriano sobre *Listeria innocua*, posiblemente al haber reducido el pH del sistema.

Wolters, et al. (1993) encontraron que el agregado de ácido cítrico aumentaría la biodisponibilidad de calcio, magnesio y zinc en numerosos alimentos.

Como ya se ha indicado, los antimicrobianos en general, y el ácido cítrico en particular, reducen el pH del alimento, inhibiendo la actividad enzimática (Langdon, 1987). Esto puede mejorar la estabilidad de algunos alimentos, especialmente aquellos vegetales con un pH natural en el rango de 5-7, donde el deterioro microbiológico es rápido y es el rango óptimo de numerosas enzimas que provocan la pérdida de calidad de los vegetales. El pH de las soluciones de tratamiento fue un factor importante en la conservación de lechuga cortada. La lechuga tratada con las soluciones de menor pH tuvieron una vida útil más larga (Bolin et al., 1977). Desafortunadamente, cuando el pH del vegetal se disminuye por debajo de 3.5 – 4.0 se pierden las características organolépticas de fresco (Huxsoll, Bolin, 1989).

Numerosos estudios han indicado que la actividad antimicrobiana del ácido cítrico se debe a la quelación de iones metálicos esenciales para el crecimiento microbiológico. El ácido cítrico forma complejos con agentes prooxidantes tal como los iones cobre y hierro a través del par de electrones no compartido de su estructura molecular.

El ácido cítrico es un agente quelante GRAS, y se usa conjuntamente con ácido ascórbico para quelar prooxidantes que podrían causar rancidez e inactivar enzimas tal como las PPO que causa reacciones de amarronamiento (Wiley, 1994). Estas enzimas contienen cobre como grupo prostético (parte no proteica de la enzima). Como un ejemplo de esta aplicación, la tirosinasa, que oxida la tirosina a dihidroxifenol y conduce a la formación de pigmentos marrones, contiene cobre en su estructura molecular. El amarronamiento se previene cuando el cobre enzimático es secuestrado por el ácido cítrico. El ácido cítrico cuando se usa conjuntamente con el ácido ascórbico, ejerce un

efecto protector sobre este último, haciendo más lenta su autooxidación y secuestrando los metales trazas que tendrían efectos negativos sobre el ácido ascórbico (Dziezak, 1986).

Castañer et al. (1996) encontraron que el tratamiento de lechuga con soluciones de ácido cítrico fue efectivo para inhibir el amarronamiento enzimático. Los resultados mostraron que la disminución en el valor de pH fue importante, debido a que se modificó el pH del rango óptimo para la PPO de la lechuga.

1.4.2.2 Antioxidantes

La FDA (*Food and Drug Administration* - USA) ha definido a los antioxidantes como sustancias usadas para conservar a los alimentos, retardando la rancidez deteriorante o decoloración debida a la oxidación. En vegetales mínimamente procesados existen numerosos tipos de reacciones oxidativas. Estas reacciones causan amarronamiento, decoloración de pigmentos endógenos, pérdida o cambio de sabor u olor del producto, cambios en la textura, y pérdida del valor nutritivo por destrucción de vitaminas A, C, D, ó E y ácidos grasos esenciales tal como el ácido linoleico. En las reacciones de oxidación intervienen numerosos factores como oxígeno, luz, metales, pigmentos, condiciones alcalinas (Dziezak, 1986).

Los compuestos más importantes usados para estabilizar frutas y vegetales mínimamente procesados son los agentes reductores y ciertos agentes quelantes, que si bien no son estrictamente antioxidantes, contribuyen a prevenir las reacciones oxidativas en frutas y hortalizas. Los sulfitos han sido usados efectivamente para conservar la calidad de fresco de frutas y hortalizas cortados, pero están sujetos a restricciones regulatorias debido a sus efectos adversos sobre la salud. La FDA ha modificado la clasificación de los agentes sulfitantes, estableciendo que los sulfitos no son GRAS para el uso sobre frutas y vegetales que han de servirse o venderse como crudos. Los alimentos que contengan un nivel de agente sulfitante detectable, definido como 10 ppm, deben declarar su contenido en la etiqueta. Estos requerimientos tienen la intención de proveer alguna protección a los individuos sensibles al sulfito (Dziezak, 1986).

Con la restricción del uso de sulfitos sobre frutas y vegetales que van a consumirse o venderse crudos al consumidor, o presentados como frescos, mucha investigación está siendo conducida para encontrar sustituyentes adecuados. Los sulfitos son agentes

multifuncionales. La búsqueda de alternativas ha conducido a compuestos que son sustitutos efectivos solamente para una o más de las funciones obtenidas con los sulfitos. Probablemente la mejor alternativa al sulfito es el ácido ascórbico o combinaciones de ácido ascórbico con ácido cítrico u otros ácidos orgánicos (Wiley, 1994; Sapers, 1993; Gorny, 1996; Barrett, 1996).

Acido ascórbico

El ácido ascórbico es un agente reductor, un antioxidante. Inhibe el amarronamiento en varias frutas y vegetales (Borenstein, 1987; Sapers, Ziolkowski, 1987; King, Bolin, 1989).

El ácido ascórbico (vitamina C) también funciona como un secuestrante (*scavenger*) de oxígeno, haciéndolo particularmente útil en productos que tienen aire en el espacio de cabeza. Alrededor de 3.5 mg de ácido ascórbico se requiere para secuestrar el oxígeno en 1 cm³ de aire de espacio de cabeza (Dziezak, 1986).

El ácido ascórbico y varias de sus sales neutras y otros derivados han sido utilizados como antioxidantes GRAS en frutas y vegetales y sus jugos para prevenir el amarronamiento y otras reacciones oxidativas. El O₂ secuestrado por el ácido ascórbico hace que el mismo se oxide para formar ácido dehidroascórbico perdiendo así su actividad antioxidante. El ácido ascórbico es considerado GRAS y no tiene restricciones sobre su nivel de uso (Dziezak, 1986).

El ácido ascórbico se agrega junto con el ácido cítrico que tiende a mantener más ácido el nivel de pH y también actúa como un agente quelante sobre enzimas que contienen cobre como la PPO. El ácido ascórbico es un compuesto reductor moderadamente fuerte, es de naturaleza ácida, forma sales neutras con las bases, y es muy soluble en agua. Debido a que niveles tan bajos como 100 ppm de ácido ascórbico pueden inducir efectos prooxidativos, se sugiere usar niveles de 2000 ppm para prevenir estas reacciones (Wiley, 1994; Dziezak, 1986).

El ácido ascórbico es un inhibidor altamente efectivo del amarronamiento enzimático, en principio debido a su capacidad de reducir las quinonas, generadas por la oxidación catalizada por la PPO de los polifenoles, hacia los compuestos fenólicos, antes que continúen la reacción que conduce al amarronamiento (Figura 1.1). No obstante una

vez que el ácido ascórbico agregado ha sido completamente oxidado a ácido dehidroascórbico por esta reacción, las quinonas pueden acumularse y conducir al amarronamiento. A altas concentraciones el ácido ascórbico también puede inhibir directamente la PPO (Sapers, 1993).

El agregado de antioxidantes, como el ácido ascórbico, previene la degradación de clorofila en espinaca (Baardseth, von Elbe, 1989; Heaton, Marangoni, 1996).

El agregado de ácido ascórbico aumentaría la biodisponibilidad de hierro en numerosos alimentos (Wolters et al., 1993).

Los tratamientos realizados sumergiendo papas peladas enteras o en rodajas en soluciones de ácido ascórbico y ácido cítrico fueron efectivos para reducir el amarronamiento, manteniendo la apariencia, olor y textura del producto fresco (Langdon, 1987; Sapers, Miller, 1993).

Sapers y Ziolkowski (1987) determinaron que las soluciones de ácido ascórbico y ácido cítrico utilizadas para el tratamiento de manzana cortada y jugo de manzana fueron efectivas para reducir el amarronamiento. El amarronamiento enzimático de pulpas de manzana pudo prevenirse con el uso de ácido ascórbico (Lozano et al., 1994).

Los tratamientos con soluciones de ácido cítrico y ácido ascórbico podrían extender la vida útil de repollo cortado, principalmente evitando los cambios de color (Chen, Peng, 1980).

1.4.3 Envasado en atmósfera modificada

A las herramientas para la conservación de vegetales mínimamente procesados mencionadas en párrafos anteriores, se debe sumar el envasado en atmósfera modificada (EAM). Estas herramientas trabajan juntas para mantener la frescura, extender la vida útil, asegurar la sanidad y promover las ventas. Ni las bajas temperaturas, ni los tratamientos químicos, ni el EAM pueden actuar solos para ofrecer al consumidor un producto con todo su valor (Zagory, 1996).

Después de la conservación refrigerada, el EAM es considerado el segundo método más efectivo para extender la vida útil de productos mínimamente procesados. No obstante se reconoce que el EAM no puede reemplazar a un adecuado control de la

temperatura, y la modificación de la temperatura es el factor más importante en controlar la respiración (Shewfelt, 1986). El EAM es frecuentemente incluido como uno de los pasos cruciales en la secuencia o etapas de conservación que caracteriza a los productos mínimamente procesados (Huxsoll, Bolin, 1989). El EAM de un producto vegetal es un proceso dinámico donde el envase sellado interactúa con el producto contenido (bajo cuidadoso control de la temperatura) para proveer una atmósfera interna de equilibrio que reducirá la velocidad de respiración, la sensibilidad al etileno y la pérdida de humedad así como también extender la fase *lag* del crecimiento microbiano y aumentar el tiempo de generación de la microflora (Schlimme, Rooney, 1994).

Otro de los beneficios del envasado en AM es el mantenimiento de alta humedad relativa (HR) ambiental alrededor del producto. Muchas barreras naturales son removidas durante el procesamiento, dejando a los productos muy susceptibles a la deshidratación. La selección del material de envase apropiada puede reducir significativamente la velocidad de pérdida de agua de productos mínimamente procesados creando un ambiente que está cercano al 100% de HR. No obstante, la condensación de agua dentro del envase promoverá el crecimiento de microorganismos alterantes. Esto puede evitarse seleccionando un film flexible con una apropiada velocidad de transmisión de vapor de agua y/o incorporando aditivos antiempañamiento (Gorny, 1997; Zagory, Kader, 1988).

La selección de un EAM para productos mínimamente procesados debe incluir ensayos empíricos bajo condiciones que simulen operaciones comerciales. Los avances en el diseño y manufactura de películas poliméricas con un amplio rango de permeabilidad a los gases ha estimulado el interés en crear y mantener atmósferas modificadas (AM) dentro de los envases con películas flexibles.

Debido a que la atmósfera modificada es considerada un tratamiento inocuo en sí mismo, y no deja residuos indeseables sobre el producto, el uso de AM para vegetales mínimamente procesados aumentará y será necesaria mucha investigación para establecer las condiciones óptimas para cada producto (Huxsoll, Bolin, 1989)

Dada la alta variabilidad de las respuestas de los distintos productos y distintos cultivares a las modificaciones en la concentración de oxígeno y anhídrido carbónico, resulta imprescindible la determinación experimental de las combinaciones ideales para cada producto (Gorny, 1997).

1.4.3.1 Efecto de las AM sobre la fisiología y reacciones bioquímicas de los vegetales listos para usar

Los tejidos de los vegetales mínimamente procesados son tejidos vivos. Para mantener la vida, sus procesos metabólicos deben generar energía, principalmente a través del proceso de respiración. La respiración incluye el consumo, de O₂ atmosférico, de carbohidratos y ácidos orgánicos y la consecuente producción de energía metabólica, calor, y CO₂, etileno y vapor de agua. La mejor manera de reducir el metabolismo respiratorio y así conservar las reservas de carbohidratos, ácidos y humedad de la planta, es reducir la temperatura. Teniendo un excelente control de la temperatura, puede usarse el envasado en AM (Zagory, 1996).

La reducción de los niveles de O₂ y el enriquecimiento en CO₂ pueden reducir la intensidad de respiración, retrasar la maduración, disminuir la producción y la sensibilidad al etileno, retrasar la pérdida de textura, reducir los cambios de la composición asociados con la maduración, reducir la degradación de la clorofila y el pardeamiento enzimático paliando las alteraciones fisiológicas y los daños por frío, manteniendo el color, y protegiendo las vitaminas de los productos frescos, de ese modo se consigue la calidad durante una vida útil más amplia. Los efectos de la reducción de los niveles de O₂ y el enriquecimiento en CO₂ sobre la respiración y la maduración de frutas son aditivos y pueden ser sinérgicos. Sin embargo, la exposición de los productos frescos a niveles de O₂ o de CO₂ fuera de los límites de tolerancia de un producto concreto puede iniciar la respiración anaerobia con la producción de olores y sabores indeseables, así como provocar otras alteraciones fisiológicas (Kader et al., 1989; Day, 1995).

A medida que el O₂ cae por debajo del 10%, la respiración comienza a disminuir. Esta disminución de la respiración continúa hasta que el O₂ alcanza el 2-4 % para la mayoría de los productos. Si el O₂ disminuye más, dependiendo del producto y la temperatura, comienza el metabolismo fermentativo que reemplaza el metabolismo aeróbico normal y se produce la consecuente acumulación de etanol, ácido láctico o aldehídos, causando olores y sabores desagradables (*off-flavors, off-odors*), y volátiles indeseables (Kader et al., 1989). En concentraciones bajas de oxígeno, la proporción de CO₂/O₂ puede aumentar como resultado de reacciones de fermentación.

Similarmente, a medida que el CO₂ aumenta por encima del 0.03% encontrado en el aire, se produce una disminución de la respiración en el producto (Zagory, 1996; Varoquax, 1994).

La tolerancia de frutas y vegetales a bajas concentraciones de O₂ y altas de CO₂ ha sido determinada generalmente para los productos enteros. Las frutas y hortalizas mínimamente procesadas difieren de ellos por tener niveles de actividad metabólica más altos, incluyendo mayores velocidades de respiración y producción de etileno. Así, existe una razonable expectativa que la tolerancia de los vegetales mínimamente procesados a las AM difiera significativamente de aquellos productos enteros (Brecht, 1995).

Las atmósferas modificadas disminuyen la degradación de la clorofila, reteniendo el color verde de los vegetales (Kader et al., 1989). Se encontró que una atmósfera enriquecida con 10% de CO₂ retardaba el amarillamiento de espinaca entera y extendía la vida útil del producto en una semana a 5°C. También se observó que la espinaca entera podría tolerar un nivel elevado de CO₂, pero se recomendó un nivel del 10 %, ya que por encima de ese nivel no existirían beneficios adicionales y podrían ocurrir desórdenes fisiológicos (Salunkhe, Desai, 1984).

Las AM pueden inhibir los sistemas enzimáticos responsables del deterioro de la calidad. La disminución de O₂ en la atmósfera reduce la velocidad de las reacciones de oxidación catalizadas por enzimas, debido a que el O₂ es uno de los sustratos. Así un producto envasado en una atmósfera con muy baja concentración de O₂ no presentará amarronamiento (Varoquax, Wiley, 1994).

El CO₂ puede inhibir la actividad de la PPO. El uso de AM ha sido muy efectivo para disminuir la velocidad de amarronamiento producido por la PPO en lechuga y papa mínimamente procesadas. Además las altas concentraciones de CO₂ también inhiben la biosíntesis de los sustratos de reacción del amarronamiento enzimático (compuestos fenólicos) (Gorny, 1997).

Otro efecto importante del CO₂ es que aumenta la acidez en los tejidos vegetales. Debido a que los valores del pH celular están normalmente regulados entre un límite estrecho, solamente elevadas concentraciones de CO₂ (tanto como el 5%) disminuirían el pH intracelular, afectando la actividad enzimática. Como los productos mínimamente

procesados deben conservarse bajo temperatura de refrigeración, en esas condiciones el CO₂ es más soluble, favoreciendo su acción (Varoquax, Wiley, 1994).

Las AM reducen la actividad de la enzima poligalacturonasa, lo que produce una reducción en la descomposición de sustancias pécticas y por lo tanto disminuye el ablandamiento de los tejidos vegetales. También reduce las pérdidas de provitamina A (β -caroteno) y de vitamina C (ácido ascórbico) (Kader et al., 1989).

1.4.3.2 Efecto de las AM sobre el desarrollo microbiológico en vegetales listos para usar

Las AM pueden tener un efecto directo o indirecto sobre los microorganismos y consecuentemente influir sobre la incidencia y severidad del deterioro que producen. Tanto las bajas concentraciones de O₂ como las altas de CO₂ en un envase de AM influirán en la velocidad de crecimiento y tipo de microorganismos que proliferarán en un producto mínimamente procesado. Ambientes con una concentración de CO₂ superior al 10% tiene efecto fungistático, demoran el ablandamiento de tejido y aumenta la resistencia al deterioro microbiológico. No obstante, el EAM no disminuirá el crecimiento de patógenos para el hombre sobre productos mínimamente procesados. Además, debe tenerse en cuenta que la reducción de O₂ puede alterar el equilibrio de la microflora en favor de bacterias anaeróbicas. Ambientes con extremadamente baja concentración de O₂ en un envase de AM de productos mínimamente procesados tienen el riesgo potencial, respecto a la seguridad del alimento, de permitir el crecimiento de *Clostridium botulinum*. Entonces deberían tomarse precauciones para asegurar absolutamente que condiciones anaeróbicas no ocurran en estos productos (Gorny, 1997).

En general, concentraciones menores de O₂ y mayores de CO₂ reprimirán a las bacterias Gram-negativas y hongos, pero seleccionarán a las bacterias ácido lácticas y levaduras (Tabla 1.2). Si las concentraciones de O₂ son suficientemente bajas, crecerán bacterias anaerobias (Farber, 1991).

Tabla 1.2
Efecto relativo del CO₂ en el desarrollo de varios microorganismos

Microorganismos	Desarrollo microbiano		
	No inhibido	Inhibido	Estimulado

Bacterias Gram-Negativas			
<i>Aeromonas hydrophila</i>		+	
<i>Campylobacter jejuni</i>	+		+
<i>Enterobacter spp.</i>	+	+	
<i>Escherichia coli</i>		+	
<i>Pseudomonas spp.</i>		+	
<i>Salmonella spp.</i>		+	
<i>Vibrio spp.</i>		+	
<i>Yersinia enterocolítica</i>		+	
Bacteria Gram-positivas			
<i>Clostridium botulinum</i>	+		+
<i>Lactobacillus spp.</i>	+		+
<i>Listeria monocytogenes</i>	+		
Levaduras	+		
Hongos		+	

Adaptado de Farber, 1991

Concentraciones de CO₂ del 10-15 % son efectivas para inhibir el crecimiento de *Botrytis* en frutillas y otras frutas (Wills et al, 1981).

Debido a que condiciones de anoxia de la AM pueden favorecer el crecimiento de anaerobios facultativos y/o obligados sobre los microorganismos aerobios deteriorantes, el envasado de alimentos en atmósferas con muy baja concentración de oxígeno podría resultar en una ausencia peligrosa de olores nocivos u otros signos de deterioro producidos por los microorganismos aerobios, que alerten al consumidor sobre un potencial peligro microbiológico (Kader et al., 1989).

En general se necesita más del 5% de CO₂ para reprimir el crecimiento microbiano. Las AM mejoran la calidad sensorial aparente del producto al inhibir el crecimiento de las bacterias que causan deterioro al vegetal, pero algunos microorganismos patógenos para el hombre pueden sobrevivir.

Por lo tanto la atmósfera a la cual los microorganismos son expuestos puede tener un efecto profundo sobre su crecimiento y supervivencia.

1.5 TECNOLOGÍA DE LOS FACTORES COMBINADOS

En el pasado reciente se consideraba que las temperaturas de refrigeración controlarían el crecimiento de microorganismos patógenos y psicrótrofos alterantes. Actualmente existe considerable evidencia de que las bajas temperaturas no son suficientes para controlar algunos microorganismos psicrótrofos. Las nuevas especies de patógenos que crecerían bajo condiciones de refrigeración, han hecho que se realicen mayores esfuerzos para desarrollar sistemas alimenticios seguros. Tales sistemas prevendrían el desarrollo de cualquier peligro potencial para la salud por la incorporación de barreras de seguridad adicionales (Zagory, Kader, 1988).

Los vegetales mínimamente procesados han sido calificados como productos altamente perecederos, mínimamente procesados, envasados y que deben ser refrigerados por razones de seguridad. Además son productos con un $\text{pH} > 4.6$; actividad de agua, $a_w > 0.85$; que no reciben un tratamiento térmico adecuado para inactivar patógenos; que podrían causar un peligro para la salud bajo condiciones de abuso moderado de temperatura durante el almacenamiento y distribución; que no tienen barreras impartidas por factores intrínsecos o factores extrínsecos (por ej. tratamiento térmico) científicamente demostrado para eliminar o prevenir el crecimiento de patógenos (Wiley, 1994). Los vegetales mínimamente procesados reúnen estas características, y por lo tanto podrían potencialmente ser un peligro para la salud pública si se los maneja de manera inapropiada.

El uso de la refrigeración mantiene la calidad, pero provee una protección inadecuada contra los microorganismos patógenos. Numerosas bacterias patógenas pueden sobrevivir y aún reproducirse bajo condiciones de refrigeración.

Algunas de las tecnologías desarrolladas para extender la vida útil de los vegetales mínimamente procesados pueden inadvertidamente conducir a un producto que es potencialmente más peligroso para el consumidor (Hurst, 1995).

El acondicionamiento y lavado no sólo pueden reducir la presencia de la microflora alterante normalmente presente, sino también introducir y dar a los patógenos una ventaja competitiva para su crecimiento.

El cloro es ampliamente utilizado como sanitizante en la etapa de lavado de vegetales mínimamente procesados. No obstante, su efectividad está limitada con algunos productos. El lavado con agua clorada no reprime el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en lechuga cortada (Beuchat, Brackett, 1990). Tampoco elimina completamente la *Salmonella montevideo* de tomates inoculados (Zhuang et al., 1995). Los resultados encontrados en el lavado con soluciones cloradas de espinaca cortada inoculada con *Salmonella hadar* indicaron que la bacteria puede sobrevivir y que las reducciones logradas fueron insuficientes para garantizar la inocuidad del producto (Pirovani, 1998).

Mientras las AM inhiben el desarrollo de muchos microorganismos alterantes, algunos patógenos, por ejemplo *Listeria monocytogenes*, pueden realmente prosperar bajo estas condiciones (Berrang et al., 1989). Cuando el producto se somete a condiciones abusivas de temperatura ($T > 8\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante el almacenamiento, distribución o venta, ocurrirá el crecimiento de otras bacterias patógenas como *Clostridium botulinum*, *Bacillus*, *Salmonella spp.*, y *Staphylococcus aureus* (Corlett, 1989; Piagentini et al., 1997).

De esta manera, deben considerarse otros tratamientos para asegurar la inocuidad de los vegetales mínimamente procesados.

Las células vegetales son unidades vivas que están constantemente tomando nutrientes y expulsando desechos. En este proceso, los nutrientes tienen que pasar a través de la pared y la membrana celular. En los procesos de conservación tradicionales aplicados a las frutas y hortalizas (tratamiento térmico, congelación, secado) se mata a las células vegetales. En el producto mínimamente procesado, estas células vegetales están aún vivas y deben permanecer así, o el tejido perderá su deseable calidad de fresco (King, Bolin 1989). Por lo tanto los tratamientos de conservación aplicados a estos productos deben tener en cuenta estas características.

Una metodología interesante para inhibir el crecimiento de microorganismos y mejorar la estabilidad de los alimentos, es el desarrollo del concepto de barreras u obstáculos también conocida como tecnología de factores combinados. En esta metodología, los procesos de degradación deben superar la barrera u obstáculo que le

presenta cada tratamiento de conservación. De esta manera la velocidad de degradación va disminuyendo por la presencia de más obstáculos (Huxsoll, Bolin, 1989).

Se ha sugerido que no es productivo, desde el punto de vista de la calidad, realizar un sólo tratamiento en condiciones extremas para inhibir el desarrollo de los microorganismos y la actividad enzimática en los productos refrigerados. Se sugiere que una combinación apropiada de factores que limiten el crecimiento pueden usarse como método de conservación, y se considera que estos pueden incluir numerosos tratamientos individualmente subinhibitorios (Wiley, 1994).

La combinación de diferentes métodos de conservación puede producir tres tipos de resultados: sinergismo, efecto aditivo, y antagonismo. Las barreras provistas deben ser como mínimo aditivas en su acción (preferiblemente sinérgicos) y no antagónicas (Wiley, 1994).

La tecnología de factores combinados debe aplicarse cuidadosamente a los vegetales mínimamente procesados. Las barreras seleccionadas deben mantener la seguridad, la calidad sensorial y nutritiva, y extender la vida útil del producto.

El uso de la tecnología de factores combinados en vegetales mínimamente procesados es muy complejo debido a las enzimas y a los sistemas biológicos vivos de la planta con los que hay que tratar, así como también los microorganismos patógenos y alterantes, para extender la vida útil y proveer un producto con calidad de fresco.

Por lo tanto para lograr vegetales listos para usar seguros, especialmente aquellos de más alto pH, se deben incluir otras barreras en adición a la baja temperatura.

Por ello se ha pensado en la utilización de algunos de los métodos de conservación ya usados en otros alimentos como otra barrera para proveer vegetales listos para usar seguros, prevenir o reducir los factores que provocan alteración, manteniendo la calidad y extendiendo la vida útil. Estos métodos de conservación pueden incluir conservación química, comprendiendo acidulantes, antioxidantes, antimicrobianos; envasado en atmósfera modificada y conservación refrigerada.

1.6 OBJETIVOS

El objetivo de la presente tesis es analizar el efecto combinado de un agente antimicrobiano como el ácido cítrico, un agente antioxidante como el ácido ascórbico y el tipo de envase utilizado, sobre la calidad de espinaca mínimamente procesada durante el almacenamiento refrigerado.

Se desarrollarán modelos matemáticos que permitan analizar y predecir el efecto de las concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico, y del tiempo de conservación sobre el desarrollo de la flora aerobia mesófila, el pH de la espinaca, la concentración de CO₂ y O₂ en la atmósfera desarrollada en el envase y los atributos sensoriales de calidad.

Se analizará el efecto de cada etapa de procesamiento sobre la calidad microbiológica de espinaca mínimamente procesada.

Se determinará el efecto del tratamiento químico aplicado y el tipo de envase utilizado sobre la retención de clorofila y la pérdida de peso.

Se analizará cuál de los atributos de calidad analizados limita la vida útil de la espinaca mínimamente procesada.

Se determinarán combinaciones de las concentraciones de ácido cítrico, ácido ascórbico y material de envase que permitan mejorar la calidad y extender la vida útil de espinaca mínimamente procesada.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 PROCESAMIENTO DE ESPINACA

5.1.1. Materia prima

Se utilizó espinaca (*Spinacia oleracea L.*, var. Híbrida 424), procedente del departamento La Capital (Provincia de Santa Fe - Argentina). El producto recién cosechado se transportó por la mañana a temperatura ambiente, hasta el Instituto de Tecnología de Alimentos (I.T.A.), y se procesó inmediatamente. La materia prima presentaba hojas externas grandes, de color verde oscuro y las internas de tamaño menor y de color verde un poco más claro. En cada procesamiento se utilizaron 2600 - 3000 g de materia prima.

5.1.2. Acondicionamiento y cortado

La espinaca se acondicionó cuidadosamente, eliminando hojas dañadas, quebradas, manchadas o amarillentas, raíces y tallos. En esta etapa se produjo alrededor del 50 - 55 % de las pérdidas. A continuación el producto se cortó en trozos de 3 cm por 4 cm con cuchillo de acero inoxidable bien afilado.

5.1.3. Lavado y enjuague

Las condiciones para el lavado de espinaca se seleccionaron teniendo en cuenta los antecedentes ya mencionados en la introducción (Mazollier, 1988; Zuang et al., 1995; Scandella, Leteinturier, 1989; Pirovani, 1998).

Condiciones del agua de lavado:

- Concentración inicial de cloro: 120 mg/L
- Temperatura: 4 °C
- Tiempo: 2 minutos
- pH: 7, ajustado con solución de HCl 2N
- Relación [agua de lavado/peso de producto]: 17 L/Kg

El lavado se realizó colocando 630 - 650 g de espinaca cortada en un recipiente cilíndrico de polietileno de 12 L de capacidad, con perforaciones de 5 mm de diámetro (24 perforaciones/100 cm²). Este recipiente se sumergió en otro que contiene el agua de lavado preparada. Este último es cilíndrico, tiene un volumen total de 24 L y es de polietileno blanco.

Para la realización de esta etapa se contó con dos recipientes perforados para colocar la espinaca cortada, y dos para el agua de lavado, por lo tanto en cada procesamiento de espinaca se lavaron aproximadamente 1300 - 1400 g del vegetal cortado.

A continuación la espinaca se enjuagó por inmersión durante un minuto, con agua de red (0.2 mg de cloro total/L, 4 °C). Luego, la espinaca se dejó escurrir por gravedad durante 30 segundos en el recipiente perforado, y se realizó el tratamiento químico.

5.1.4. Tratamiento químico

El tratamiento químico se realizó por inmersión de la espinaca en soluciones de ácido cítrico y ácido ascórbico en las concentraciones y combinaciones que se indican en el Diseño Experimental (2.2). El tiempo de inmersión fue de 2 min., la temperatura de la solución de 4 °C y la relación [volumen de solución/peso de producto] se mantuvo en 17L/Kg.

5.1.4..1 Metodología para la determinación del dominio experimental

En la tabla 2.1 se presentan los antecedentes bibliográficos a partir de los cuales se preseleccionaron los rangos de concentración de ácido cítrico y ácido ascórbico para determinar el dominio experimental para la realización del tratamiento químico.

Tabla 2.1

Concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico usadas por otros autores

Producto	Ácido cítrico (g/100 ml)	Ácido ascórbico (g/100 ml)	Referencia
General	-	0.20	Wiley, 1994
	0.10 - 0.30	0.01 - 0.02	Dziedzak, 1986
	-	1.00	Gorny, 1996
	-	1.00	Barrett, 1996
Lechuga entera	1.00 - 10.00	5.00	Castañer et al., 1996
Endibia, lechuga	-	1.00	Priepke et al., 1976
Repollo	0.20	0.20	Chen, Peng; 1980a
Manzana	0.20	0.25	Monsalve-Gonzalez et al., 1993
	1.00	0.80 - 1.60	Sapers, Ziolkowski; 1987
Papa	0.30 - 1.00	0.30 - 1.00	Langdon, 1987
	1.00	2.50	Sapers, Miller; 1993

Para la determinación del dominio experimental se ensayaron soluciones de ácido cítrico y ácido ascórbico en el rango de concentraciones de 0.00 - 2.00 %.

Preparación de las muestras

La espinaca destinada a este ensayo se acondicionó, cortó, lavó y enjuagó en forma similar a la descrita en los incisos 2.1.2 y 2.1.3. Se obtuvieron aproximadamente 1000 g de espinaca lavada. Se separaron muestras de 40 - 50 g de espinaca y se realizó el

tratamiento químico en las concentraciones y combinaciones que se detallan a continuación en Diseño experimental. Luego las muestras fueron centrifugadas a 540 rpm por 3 minutos en el equipo que se describe en el punto 2.1.5, y finalmente se determinó el pH de las muestras de espinaca. El diseño experimental se realizó por duplicado y el promedio de los valores de pH obtenido se utilizó para realizar el análisis estadístico.

Diseño experimental

Para la determinación del dominio experimental para la realización del tratamiento químico se utilizó un diseño factorial con 2 variables en 3 niveles (3^2), con 2 repeticiones en el punto central.

Se supuso que existía una función matemática para la respuesta en función de las dos variables independientes de proceso.

$$Y_k = f_k (c_C, c_A) \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde: Y_k = Respuesta: pH de la espinaca

c_C = Concentración de ácido cítrico, [g/100ml]

c_A = Concentración de ácido ascórbico, [g/100ml]

Para aproximar las funciones se usaron ecuaciones polinomiales de 2^{do} orden:

$$Y_k = B_o + \sum_{i=1}^2 B_{k_i} \cdot X_i + \sum_{i=1}^2 B_{k_{ii}} \cdot X_i^2 + \sum_{j=i+1}^2 B_{k_{ij}} \cdot X_i \cdot X_j \quad \text{Ec. 2.2}$$

donde: B_o , B_{ki} , B_{kii} y B_{kij} ; son los coeficientes

X_i : son las variables codificadas.

Estas variables codificadas están linealmente relacionadas con los valores reales de las variables usadas (c_{Ci} , c_{Ai}).

Para la concentración de ác. cítrico : $X_1 = 2 (c_{Ci} - 1) / 2$

Para la concentración de ác. ascórbico : $X_2 = 2 (c_{Ai} - 1) / 1$

Las variables independientes, las variables codificadas y no codificadas, y sus niveles son presentados en la Tabla 2.2

Tabla 2.2
Variables independientes no codificadas y codificadas. Símbolos y niveles usados para la determinación del dominio experimental

Variables independientes	Símbolo		Niveles	
	No Codif.	Codificado	No codificado	Codificado
Concentración de ácido cítrico (g/100ml)	c_C	X_1	2	1
			1	0
			0	-1
Concentración de ácido ascórbico (g/100ml)	c_A	X_2	2	1
			1	0
			0	-1

Análisis estadístico

El análisis de los resultados experimentales se realizó con el programa estadístico STATGRAPHICS Plus 7.1. Dicho programa permitió ajustar la ecuación polinomial de 2^{do} orden a los datos experimentales, realizar el análisis de variancia (ANOVA) y graficar la superficie predicha a partir del modelo.

5.1.4..2 Determinación del dominio experimental

La Tabla 2.3 muestra los resultados experimentales del pH de la espinaca para los distintos ensayos experimentales.

Tabla 2.3

Resultados experimentales para la determinación del dominio experimental

Número de Ensayo	Niveles de las variables codificadas		pH
	X ₁ (c _C)	X ₂ (c _A)	
1	0	0	3.90
2	1	1	3.55
3	1	-1	3.58
4	-1	1	3.35
5	-1	0	4.65
6	1	0	3.58
7	-1	-1	6.25
8	0	0	4.12
9	0	-1	3.98
10	0	1	3.89
11	0	0	3.94

En primer lugar, se comprobó la idoneidad del modelo elegido con los tests de diagnósticos basados en los residuos. Los tres tests de diagnósticos se presentan en el Anexo, en la figura 5.1 a, b y c. Como puede verse, se cumple adecuadamente con las suposiciones de homogeneidad de la variancia (figura 5.1 a), independencia de los errores (figura 5.1 b) y normalidad de los errores (figura 5.1 c), por lo que se supone que no hay transgresiones severas y se puede aplicar el ANOVA (Tabla 2.4).

Tabla 2.4
Análisis de variancia para el modelo propuesto para pH

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calc.
Modelo	5.66735	5	1.13347	10.98**
X ₁ (c _C)	3.64627	1	3.64627	35.32**
X ₂ (c _A)	0.68649	1	0.68649	6.65*
X ₁ · X ₂	0.89623	1	0.89623	8.68*
X ₁ ²	0.37577	1	0.37577	3.64 ^{NS}
X ₂ ²	0.06254	1	0.06254	0.61 ^{NS}
Residuo	0.51616	5	0.103232	
F. de ajuste	0.48869	3	0.162897	11.86 ^{NS}
Error puro	0.027467	2	0.01373	
Coef. Determinación (R ²) 0.91269				

NS: no significativo; * significativo al 5%; ** significativo al 1%

La ecuación de 2^{do} orden propuesta como modelo es:

$$\text{pH} = \mathbf{b}_0 + \mathbf{b}_1 \cdot \mathbf{X}_1 + \mathbf{b}_2 \cdot \mathbf{X}_2 + \mathbf{b}_{11} \cdot \mathbf{X}_1^2 + \mathbf{b}_{22} \cdot \mathbf{X}_2^2 + \mathbf{b}_{12} \cdot \mathbf{X}_1 \cdot \mathbf{X}_2 \quad \text{Ec. 2.3}$$

donde: **b**₀, **b**_i y **b**_{ij} son los coeficientes

X_i son las variables codificadas.

Los subíndices de los coeficientes o variables codificadas indican: 1 = concentración de ácido cítrico y 2 = concentración de ácido ascórbico.

Los coeficientes de regresión del modelo de 2^{do} orden propuesto para el pH se presentan en la Tabla 2.5

Tabla 2.5

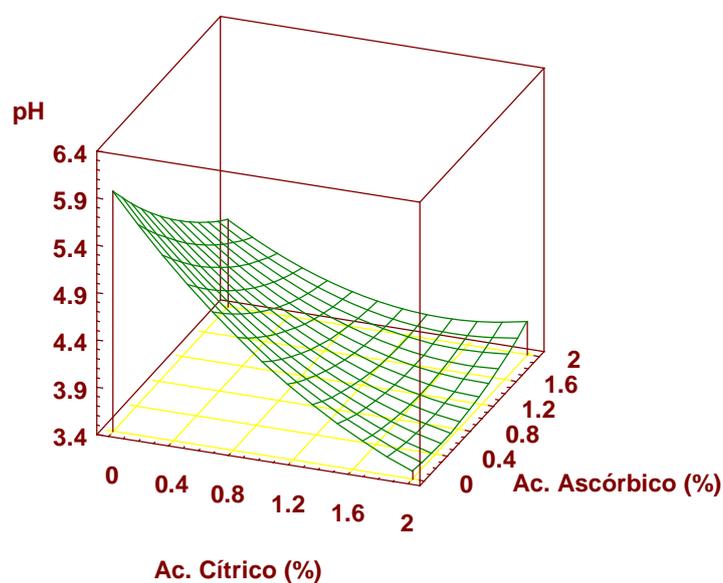
Valores de los coeficientes de regresión de la ecuación de 2^{do} orden para pH

Coeficientes	
b₀	3.909
b₁	-0.757
b₂	-0.337
b₁₁	0.323
b₂₂	0.143
b₁₂	0.468

A partir del ANOVA (Tabla 2.4) se puede ver que el modelo de predicción desarrollado para el pH de espinaca resultó significativo ($p < 0.01$) y adecuado, siendo la falta de ajuste no significativa ($p > 0.05$). Analizando el coeficiente de determinación (R^2) que orienta sobre el porcentaje de la variación que ha sido explicada por el modelo, se puede ver que el modelo explica el 91.27% de la variabilidad de los datos experimentales.

El término lineal de la concentración de ácido cítrico (X_1) es muy significativo ($p < 0.01$), y el término lineal de la concentración de ácido ascórbico (X_2) es significativo a $p < 0.05$. Esto puede verse en la Figura 2.1 que muestra la superficie de respuesta para el pH de espinaca. En ella se observa que el pH de la espinaca disminuye más rápidamente con el aumento de c_C que con el aumento de c_A . Además el término correspondiente a la interacción ($X_1 \cdot X_2$) es significativo a $p < 0.05$, lo que indica que el efecto de la c_A sobre el pH es diferente para los distintos niveles de c_C . Los términos cuadráticos de ambas variables independientes (X_1^2 y X_2^2) son no significativos ($p > 0.05$).

Figura 2.1
Superficie de respuesta para pH



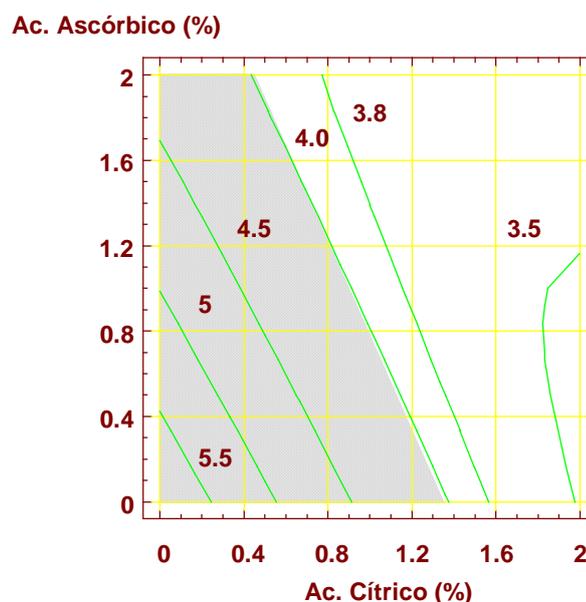
La Figura 2.2 muestra el gráfico de contorno para pH. El rango de concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico que podrían utilizarse para la realización de tratamientos químicos de espinaca se determina para aquellos tratamientos que no reducen el pH de la espinaca por debajo de 4, nivel debajo del cual se alterarían sus características organolépticas (Huxsoll, Bolin; 1989). En consecuencia, el área rayada ($\text{pH} > 4$) de la Figura 2.2 muestra el dominio experimental determinado.

Para estudiar el efecto de los tratamientos químicos sobre la conservación de espinaca mínimamente procesada, se seleccionó el siguiente rango de concentraciones dentro del área experimental determinada:

$$c_C : [0.00 - 1.00]$$

$$c_A : [0.00 - 1.00]$$

Figura 2.2
Gráfica de Contornos para pH de espinaca



Verificación del modelo para pH

Las condiciones experimentales para la verificación del modelo de predicción del pH se fijaron en $c_A = 1.50\%$, y $c_C = 0.00; 0.50; 1.00; 2.00\%$.

Los datos experimentales y los predichos con el modelo se encuentran graficados en la Figura 2.3.

En la Tabla 2.6 pueden verse los valores predichos (Y_k), los intervalos de confianza correspondientes con una probabilidad del 95%, los valores experimentales (y_k) y los errores porcentuales de cada uno de los valores estimados con el modelo [$100 \cdot (y_k - Y_k) / y_k$] (Bowker, Lieberman, 1985).

Figura 2.3
Datos experimentales y predichos por el modelo de pH
 ($c_A = 1.50\%$)

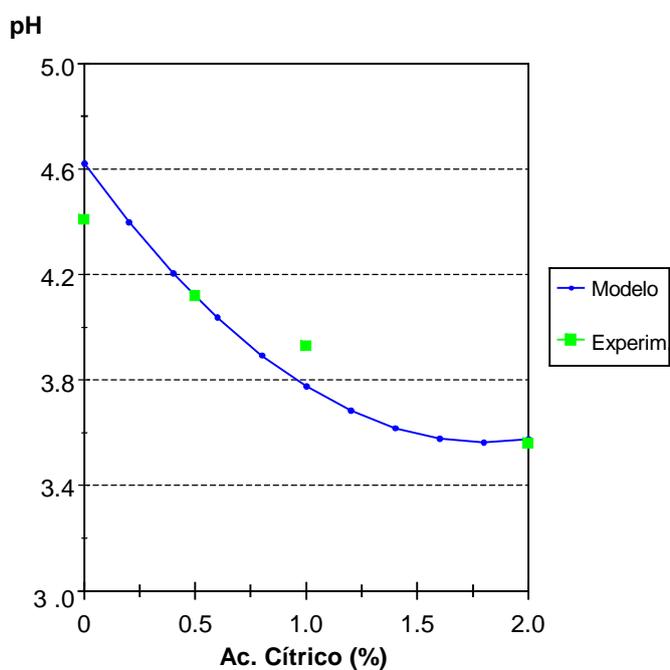


Tabla 2.6
Valores predichos y experimentales para la verificación del modelo para pH

c_C [g/100ml]	c_A [g/100ml]	pH modelo	Intervalo de confianza	pH experimenta l	Error [%]
0.00	1.50	4.62	[4.03;5.21]	4.41	-4.76
0.50	1.50	4.12	[3.71;4.52]	4.12	0.00
1.00	1.50	3.78	[3.36;4.19]	3.93	3.82
2.00	1.50	3.58	[2.99;4.16]	3.56	-0.56

Teniendo en cuenta los valores de los errores porcentuales y que todos los valores experimentales se encuentran dentro del intervalo de confianza correspondiente al valor estimado para cada valor puntual de las variables independientes, se puede aceptar al modelo como buen predictor del valor del pH de la espinaca.

5.1.5. Ecurrido

Basándose en los antecedentes recopilados, se construyó un escurridor centrífugo discontinuo para vegetales de hoja. Se diseñó para mantener la velocidad elegida constante, independientemente de la carga. El canasto removible es el mismo utilizado en la etapa de lavado:

- Recipiente cilíndrico con perforaciones de 5 mm de diámetro (24 perforaciones/100 cm²)
- Diámetro: 24 cm
- Altura: 26 cm

Antes de colocar el recipiente con la espinaca en la centrífuga, se deja escurrir por gravedad durante 30 segundos.

Se seleccionó la velocidad de 540 rpm y el tiempo de 3 minutos, teniendo en cuenta los antecedentes ya mencionados en la introducción. Para dichas condiciones se obtiene una fuerza centrífuga (Fc):

$$F_c = 1,42 \cdot 10^5 \cdot n^2 \cdot d \quad \text{Ec. 2.4}$$

Donde : Fc: Fuerza centrífuga, [G]

n : Velocidad de centrifugación, [rpm]

d : Diámetro del canasto removible, [pulgadas]

$$F_c = 39,13 \text{ G}$$

Se compararon los datos obtenidos según el modelo propuesto por Pirovani (1998) y los obtenidos experimentalmente, para el índice de escurrido (Ie) definido como:

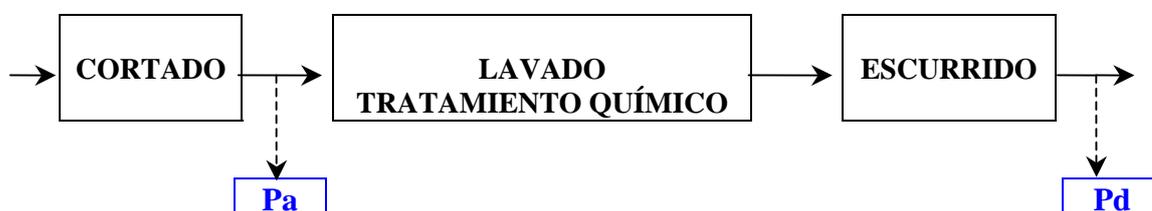
$$I_e = 100 \cdot (P_d - P_a) / P_a \quad \text{Ec. 2.5}$$

En la figura 2.4 puede verse que:

Pd: Peso de espinaca después del escurrido centrífugo, [g]

Pa: Peso de espinaca antes del lavado, [g]

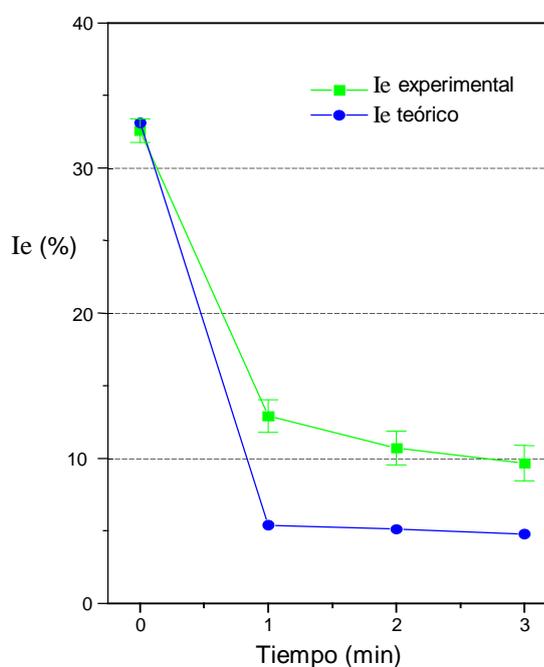
Figura 2.4

Determinación del peso de espinaca para calcular I_e 

El índice de escurrido así definido indicaría el porcentaje en peso que el producto ha ganado después de las operaciones de lavado, tratamiento químico y escurrido.

Se tomaron los pesos de la espinaca según esquema, después de diferentes tiempos de centrifugación (0, 1, 2, 3 minutos), y se calcularon los I_e , graficándose los valores promedios de 4 experiencias y los respectivos errores estándares (figura 2.5).

Figura 2.5

Índice de escurrido teórico y experimental

En la figura 2.5 se observa que el porcentaje de agua que quedó en las muestras de espinacas después de 3 minutos de centrifugado es mayor que el valor obtenido a través del modelo teórico. De todas maneras, de ambas gráficas se puede concluir que la mayor cantidad de agua es eliminada durante el primer minuto de escurrido y que no se logran descensos muy significativos en el valor de I_e después de los 2-3 minutos.

5.1.6. Envasado

5.1.6.1 Factores para el diseño de un envase de atmósfera modificada (AM)

La selección y diseño de un envase de AM tiene como objetivo obtener un equilibrio entre la velocidad de respiración del producto dentro del envase y la permeabilidad del film, para obtener y mantener una aceptable atmósfera de equilibrio dentro del envase, es decir una AM que demorará la madurez, senescencia y por lo tanto extenderá la vida útil del producto. Este equilibrio ocurre cuando la respiración del producto consume O_2 a la misma velocidad que el film permite entrar O_2 al envase, y la respiración del producto produce CO_2 a la misma velocidad que el envase permite al CO_2 salir. Para alcanzar este objetivo se depende del conocimiento de numerosos parámetros que afectan la atmósfera en el interior del envase.

Los factores que dependen del tipo de producto a envasar son la velocidad de respiración a la temperatura de almacenamiento, el cociente respiratorio a la temperatura de almacenamiento ($CR = R_{CO_2}/R_{O_2}$), cantidad de producto a envasar y las concentraciones óptimas de O_2 y CO_2 a alcanzar en el equilibrio (Schlimme, Rooney, 1994; Zagory, 1996).

La intensidad respiratoria de la espinaca es considerada extremadamente alta (Namesny, 1993), y en la tabla 2.7 puede verse el calor de respiración de espinaca entera a distintas temperaturas.

Tabla 2.7
Calor de respiración de espinaca entera

Temperatura (°C)	Calor de respiración (Kcal / t . 24 h)
0	1250 - 1700
5	2650 - 4100
10	4300 - 6450
20	13000 - 18500

Namesny, 1993

Los factores que dependen del material de envase son la permeabilidad al O₂, CO₂ y vapor de agua a la temperatura de almacenamiento; el efecto de la humedad relativa sobre la permeabilidad al O₂ y CO₂ del film; el área superficial total del envase sellado; la integridad del sello del envase y la resistencia mecánica del material de envase (Schlimme, Rooney, 1994; Zagory, 1996).

Otros factores que deben tenerse en cuenta son el volumen libre dentro del envase y la velocidad y humedad relativa del aire alrededor del envase.

Tanto la velocidad de respiración como la permeabilidad del film aumentan con un aumento de la temperatura. La velocidad de respiración aumenta generalmente mucho más rápido que la permeabilidad del film con el aumento de la temperatura. Debido a que tanto la velocidad de respiración como la permeabilidad del film dependen de la temperatura, pero responden a diferentes velocidades ante los cambios de ésta, solamente puede esperarse que el envase mantenga la atmósfera deseada dentro de un rango de temperatura específico. Si la temperatura cambia más que unos pocos grados, la atmósfera del envase también cambiará y puede volverse inapropiada o aún peligrosa para el producto (Zagory, 1996).

El embalaje tiene otros efectos adicionales a la AM. Al ser barreras al movimiento del vapor de agua, contribuyen a mantener una alta H.R.% y turgencia del vegetal. Por el

contrario, una inadecuada elección puede provocar la condensación interna de humedad creando condiciones ideales para el desarrollo de microorganismos (Zagory, Kader, 1988).

5.1.6.2 Selección del material y tipo de envase

El envasado en atmósfera modificada (EAM) de productos mínimamente procesados requiere de una cuidadosa selección del material polimérico de envase especialmente con respecto a su permeabilidad al O₂, CO₂ y vapor de agua. Es importante que el film del envase utilizado para vegetales mínimamente procesados tenga una relativamente alta relación de permeabilidades entre CO₂ y O₂, de manera de permitir que la concentración de oxígeno disminuya sin excesiva acumulación de anhídrido carbónico en el interior del envase (Schlimme, Rooney, 1994).

Es necesario que el film polimérico seleccionado sea 3 a 6 veces más permeable al CO₂ que al O₂. En general, la mayoría de los films empleados tienen una relación de permeabilidades de 3-5. Las películas poliméricas que potencialmente podrían usarse para EAM de productos mínimamente procesados son polietileno de baja densidad (LDPE), polietileno lineal de baja densidad (LLDPE), polietileno de mediana densidad (MDPE), polietileno de alta densidad (HDPE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC), y poliestireno (PS) (Schlimme, Rooney, 1994; Zagory, 1996).

Se pueden usar bandejas de poliestireno expandido o bandejas de plástico termoformado de PVC, PE ó PP, traslúcidas o pigmentadas. La película plástica usada para envolverlas debe quedar tensa para inmovilizar, en lo posible, al producto, manteniéndolo acomodado y evitando golpes y rebotes entre sí durante el manipuleo y transporte. Esto ha conducido al uso de películas plásticas estirables o termocontraíbles, las primeras basadas típicamente en PVC y las últimas en LDPE. Como ya se ha mencionado, en este tipo de envase todo el intercambio gaseoso se realiza a través de la tapa, la cual provee generalmente un área superficial insuficiente para permitir que ingrese la cantidad apropiada de oxígeno. Esta limitación no existe en los envases tipo bolsa flexible.

Los envases tipo bolsa flexible son muy utilizados en Estados Unidos, Francia y España para la venta al detalle, principalmente debido al bajo costo del material. Los materiales más usados son polietileno de baja densidad (LDPE) de 25-40 μm de espesor; polietileno de alta densidad (HDPE) de 12-20 μm ó polipropileno monoorientado (OPP) de 20-40 μm . El HDPE es menos transparente que el LDPE. El OPP presenta buenas características de brillo, transparencia y crujibilidad aunque su permeabilidad a los gases es, en muchos casos, insuficiente.

Di Pentima et al. (1996) utilizaron bolsas de OPP de 30 μm y de LDPE de 20 μm para envasar hojas enteras de espinaca. Los resultados encontrados indicaron que las bolsas de LDPE de 20 μm no modificaron significativamente la atmósfera interna del envase comparada con la del aire, luego de 8 días de almacenamiento a 4 °C (20.7 % O₂ y 0.5 % CO₂). En cambio las muestras envasadas en OPP presentaron una concentración de la atmósfera interna de 1.8 % de O₂ y 10.3 % de CO₂. Por otra parte, las muestras envasadas en OPP fueron calificadas como muy buenas en apariencia general (7.94 sobre una escala de 1: muy pobre, 9: excelente), mostrando diferencias significativas frente a las envasadas en LDPE. Sin embargo, la espinaca envasada en bolsas de OPP presentó la menor calificación en cuanto a olor (7.00 sobre una escala de 1: nauseabundo, 9: normal), mientras las muestras envasadas en LDPE de 20 μm obtuvieron una calificación de 9. En los demás atributos analizados no presentaron diferencias significativas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Di Pentima et al. (1996), y considerando que en el trabajo a desarrollar en esta tesis se trabajará con espinaca cortada la cual tendrá una intensidad respiratoria mayor, se propone utilizar bolsas preformadas de OPP de 30 μm y bolsas preformadas de LDPE de 40 μm (de menor permeabilidad que la de 20 μm) para analizar su efecto sobre la calidad de espinaca mínimamente procesada. Los datos de permeabilidad de las películas se presentan en la tabla 2.8.

Tabla 2.8
Especificaciones de las películas plásticas

Material	Espesor (μm)	Permeabilidad ($\text{cm}^3/\text{m}^2 \cdot 24\text{h} \cdot \text{atm}$)		Relación $P_{\text{CO}_2}/P_{\text{O}_2}$	Permeabilidad vapor de agua ($\text{g}/\text{m}^2 \cdot 24\text{h}$)
		O_2	CO_2		
OPP	30	2000	6000 - 7000	3 - 3.5	3 - 5
LDPE	20	7900	26000	3.3	20-25
	40	3500 - 4000	12000 - 15000	3 - 4.3	10

Di Pentima et al., 1996

Las bolsas de OPP de 30 μm y de LDPE de 40 μm utilizadas, fueron adquiridas en un comercio de la ciudad de Santa Fe.

Se colocó una cantidad de 70 g de espinaca escurrida en el interior de la bolsa correspondiente, se identificó y se controló el peso. Luego cada bolsa se termoselló, obteniéndose un área de intercambio de 600 cm^2 . El termosellado por impulso de las bolsas se realizó con una termoselladora marca KF modelo KF - 300H para bolsas de PP/PE.

La limpieza de la barra de sellado, la temperatura y el tiempo de sellado se controlaron cuidadosamente para asegurarse que se estaban realizando buenos sellos. También se controlaron la integridad de los sellos, así como los sellos laterales y de fondo en las bolsas preformadas. Un sellado apropiado es crítico para mantener la calidad del producto ya que las bolsas con sellados imperfectos tendrán concentraciones de O_2 más altas y amarronamiento acelerado (Gorny, 1996).

5.1.7. Almacenamiento

Finalmente, las muestras de espinaca envasadas se almacenaron en una exhibidora refrigerada comercial a 4°C y 90 % de HR.

5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el análisis conjunto del efecto de la concentración de ácido cítrico, la concentración de ácido ascórbico y el tiempo de conservación, se utilizó un diseño factorial con 3 variables en 3 niveles cada una (3^3), con 2 repeticiones en el punto central, ampliamente utilizados en investigación (Montgomery, 1991).

Se supuso que existía una función matemática para cada una de las respuestas (Y_k) en función de las tres variables independientes del proceso (c_C, c_A, t):

$$Y_k = f_k(c_C, c_A, t) \quad \text{Ec. 2.6}$$

donde: Y_k : Respuesta:

- Flora Aerobia Mesófila, FAM, [$\log(\text{UFC/g})$]
- pH de espinaca mínimamente procesada
- Concentración de CO_2 y O_2 en el interior del envase, [$\text{ml}/100 \text{ ml}$]
- Intensidad de los atributos sensoriales: *off-odor*, apariencia general, marchitamiento, amarronamiento y color.

c_C : Concentración de ácido cítrico, [$\text{g}/100\text{ml}$]

c_A : Concentración de ácido ascórbico, [$\text{g}/100\text{ml}$]

t : Tiempo de conservación a 4°C , [días]

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

Los diseños experimentales con tres niveles por cada variable independiente analizada permiten modelar con una función cuadrática la relación entre la respuesta y cada factor (Montgomery, 1991).

Se han utilizado polinomios de 2^{do} orden para modelar el recuento de bacterias en función del tiempo, nivel del inóculo y temperatura de almacenamiento. También se desarrollaron funciones cuadráticas para predecir el efecto de la concentración de NaCl, pH y temperatura (Roberts, 1989).

Yang y Chinnnan (1988) han desarrollado modelos de predicción expresando las velocidades de consumo de O₂ y producción de CO₂ como un polinomio de 2^{do} orden de las concentraciones de O₂ y CO₂, y el tiempo.

Watada et al. (1987) utilizaron funciones cuadráticas para analizar la variación de peso, contenido de clorofila, vitaminas C y B₁ durante el almacenamiento de pimiento y espinaca.

Por lo tanto, para aproximar la función (Ec. 2.6), se usaron ecuaciones polinomiales de 2^{do} orden:

$$Y_k = B_o + \sum_{i=1}^3 B_{k_i} \cdot X_i + \sum_{i=1}^3 B_{k_{ii}} \cdot X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 B_{k_{ij}} \cdot X_i \cdot X_j \quad \text{Ec. 2.7}$$

donde: B_o , B_{k_i} , $B_{k_{ii}}$ y $B_{k_{ij}}$; son los coeficientes

X_i ; son las variables independientes codificadas.

Estas variables codificadas están linealmente relacionadas con los valores reales de las variables usadas (c_{Ci} , c_{Ai} , t_i).

Para la concentración de ácido cítrico: $X_1 = 2 (c_{C1} - 0.5) / 1$

Para la concentración de ácido ascórbico: $X_2 = 2 (c_{A1} - 0.5) / 1$

Para el tiempo de conservación a 4°C: $X_3 = 2 (t_1 - 7) / 14$

Otra variable independiente del proceso que se analizó fue el tipo de envase (f). A diferencia de las otras tres variables estudiadas, la variable “tipo de envase” es una variable discreta. El diseño experimental anteriormente descrito se realizó tanto para las muestras envasadas en las bolsas de polipropileno monoorientado de 30 μm de espesor (OPP), como para aquellas muestras envasadas en bolsas de polietileno de baja densidad de 40 μm de espesor (LDPE).

Las variables independientes, las variables codificadas y sus niveles se presentan en la Tabla 2.9

Tabla 2.9

Variables independientes no codificadas y codificadas. Símbolos y niveles usados

Variables independientes	Símbolo		Niveles	
	No Codif.	Codificado	No codificado	Codificado
Concentración de ácido cítrico (g/100ml)	c_C	X_1	1 0.5 0	1 0 -1
Concentración de ácido ascórbico (g/100ml)	c_A	X_2	1 0.5 0	1 0 -1
Tiempo de conservación (días)	t	X_3	14 7 0	1 0 -1

5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados experimentales se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Plus 7.1

En primer lugar, para analizar el efecto de cada una de las variables independientes (concentración de ácido cítrico, c_C ; concentración de ácido ascórbico, c_A ; tiempo de conservación, t ; y tipo de envase, f), se realiza un análisis de variancia multifactorial.

Luego se comprueba la idoneidad de los modelos propuestos a través del análisis de los residuos. Se ajustan las ecuaciones polinomiales de 2^{do} orden a los datos experimentales correspondientes a cada tipo de envase, se realiza un análisis de variancia (ANOVA) y se grafican las superficies de respuesta predichas a partir de cada uno de los modelos obtenidos.

5.4. TOMA DE MUESTRAS DURANTE EL PROCESAMIENTO

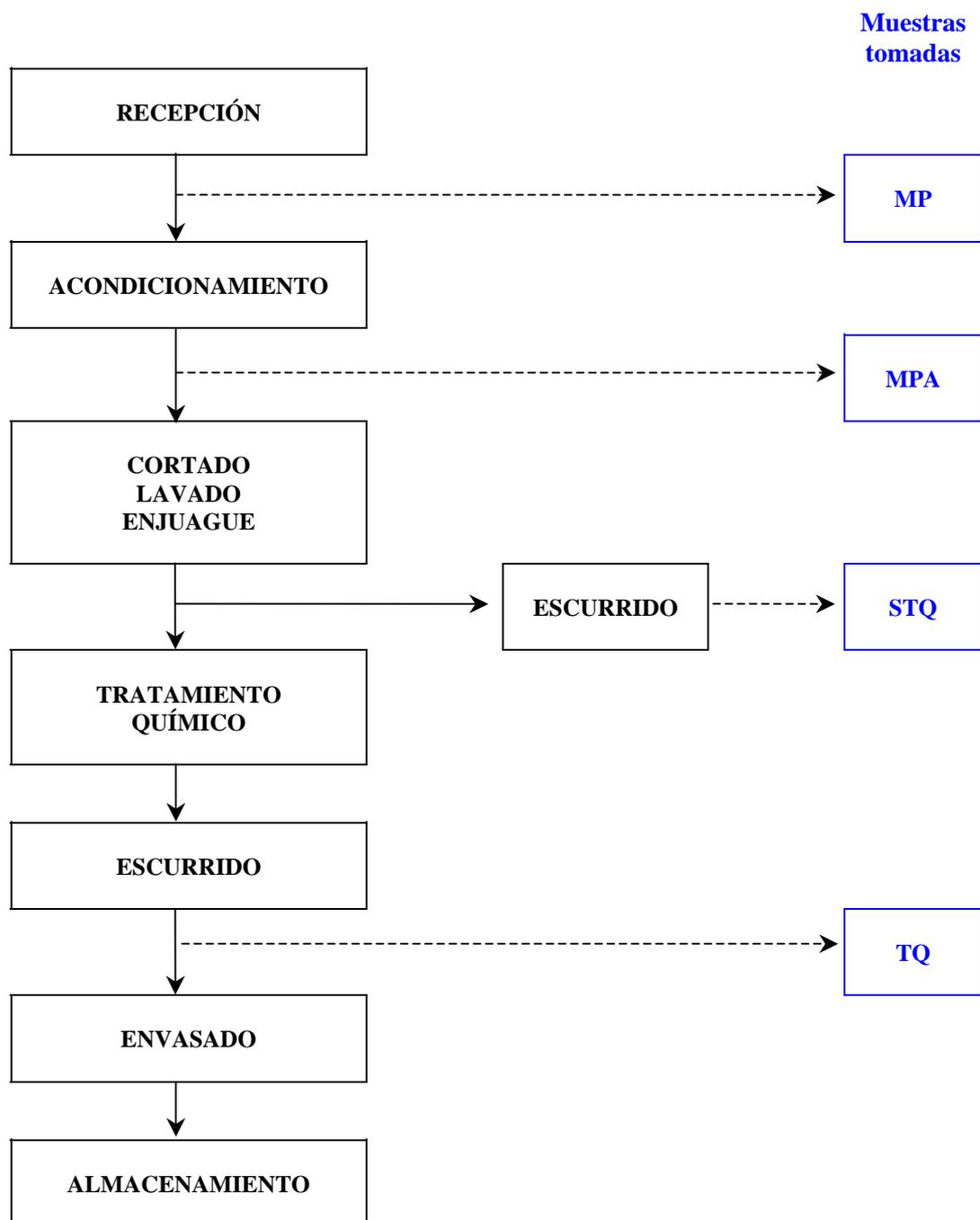
Para analizar el efecto de las diferentes etapas de procesamiento sobre la calidad microbiológica de la espinaca, se realizó el recuento de flora aerobia mesófila sobre la materia prima (MP), luego del acondicionamiento (MPA), del lavado y desinfección (STQ), y del tratamiento químico (TQ).

En la Figura 2.6 se detalla el diagrama de flujo para el procesamiento de espinaca mínimamente procesada y la denominación de las muestras tomadas.

Los resultados de los análisis microbiológicos de las muestras tomadas durante las diferentes etapas de procesamiento se evaluaron mediante el análisis de variancia (ANOVA) y el análisis de rango múltiple de Duncan para determinar diferencias significativas entre medias.

Figura 2.6

Diagrama de flujo y toma de muestras durante el procesamiento de espinaca mínimamente procesada



5.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Para la determinación de microorganismos aerobios mesófilos se aplicó la técnica de APHA (1984). Se tomaron 10 g de cada muestra y se homogeneizaron con 90 ml de agua de peptona al 0.1% durante 2 min en *stomacher*. Se efectuaron diluciones decimales con agua de peptona, sembrando 0.1 ml de las diluciones decimales, en la superficie de placas agarizadas (PCA) por duplicado. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 h. Los resultados se determinaron por recuento del número de colonias, expresándose como UFC/g. Para el análisis estadístico de los resultados se realizó la transformación de la respuesta en su logaritmo, es decir log UFC/g (FAM).

5.6. DETERMINACIÓN DEL pH

El pH de la espinaca mínimamente procesada se determinó tomando una muestra de 10-20 g de espinaca, la cual se trituró en molino, se filtró, y sobre el filtrado se determinó el pH utilizando el método del electrodo de vidrio (AOAC, 1995), con un pHmetro CARDY TWIN pH B-113 Horiba.

5.7. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN GASEOSA EN EL INTERIOR DEL ENVASE

Las muestras se analizaron por cromatografía en fase gaseosa en un cromatógrafo SRI, modelo 8610, usando un detector de conductividad térmica (TCD). La respuesta de este detector es proporcional a la diferencia de conductividad térmica entre el gas portador y la muestra. Cuanto mayor sea esta diferencia, mayor será la linealidad de la respuesta. La selectividad del TCD es universal.

El análisis de la composición gaseosa en el envase se realizó inyectando 1 ml de gas extraído de la bolsa con una jeringa Hamilton. Se usó una columna CTRI (concéntrica) Cat. N° 8700 que permitió la determinación simultánea de oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno. La temperatura del horno se fijó en 55°C, y el inyector y el detector se mantuvieron en 110°C. El flujo del gas portador utilizado (H₂) se mantuvo en 65 ml/min.

La señal del detector se procesa directamente con el Programa de integración cromatográfica Peaksimple II versión 3.91.

5.7.1. Determinación de la concentración de los gases

Para la determinación de la concentración de un determinado componente se utilizó el método de normalización de las áreas. Este método determina el porcentaje de un compuesto en una mezcla y consiste en referir el contenido de un determinado compuesto al total de áreas en el cromatograma (Ec. 2.8).

$$\% i = \frac{\text{Área de } i}{\text{Área total}} \cdot 100 = \frac{A_i}{\sum A_i} \cdot 100 \quad \text{Ec. 2.8}$$

donde: % i: Concentración del componente i, [ml/100 ml]

i: CO₂, O₂ ó N₂

A_i: Área bajo el pico de i, [mV.s]

Las áreas de los compuestos no son directamente proporcionales a la composición porcentual, es decir, el detector tienen respuestas diferentes para los diferentes compuestos, por lo tanto, es necesario determinar los factores de respuesta para cada sustancia (Browning, 1971). Una vez determinados, estos factores de respuesta pueden usarse para calcular la composición porcentual (Ec. 2.9).

$$\% i = \frac{(A_i / F_{Ri})}{\sum (A_i / F_{Ri})} \cdot 100 \quad \text{Ec. 2.9}$$

donde: F_{Ri}: Factor de respuesta del componente i, [mV.s/ml]

5.7.2. Cálculo de los factores de respuesta

Para la determinación de los factores de respuesta del dióxido de carbono, oxígeno y nitrógeno, se inyectan cantidades exactas de cada uno de ellos, dentro del rango de trabajo. Los valores de las áreas del pico correspondiente se grafican en función del volumen conocido inyectado. Esta gráfica debería ser lineal y pasar a través del origen (Ec. 2.10). La pendiente de dicha recta es el factor de respuesta correspondiente.

$$A_i = a_i + F_{Ri} \cdot V_i \quad \text{Ec. 2.10}$$

donde: a_i : ordenada al origen de la regresión lineal para i , [mV.s]

V_i : volumen inyectado de i , [ml]

La determinación de los factores de respuesta se realizó utilizando un gas patrón con las siguientes características:

- Tipo de gas: Mezcla.
- Composición porcentual: 5,2% CO₂; 21,2% O₂; 73,6% N₂.
- Certificado de Análisis N° 55297, Laboratorio de Control de Calidad de AGA S.A. División Gases Especiales, planta Pilar (Buenos Aires).

5.7.2.1 Cálculo del factor de respuesta para CO₂

En la tabla 2.10 se presentan los valores de áreas obtenidos como respuesta para diferentes volúmenes de CO₂. En la figura 2.7 se grafica la recta de regresión y los valores experimentales.

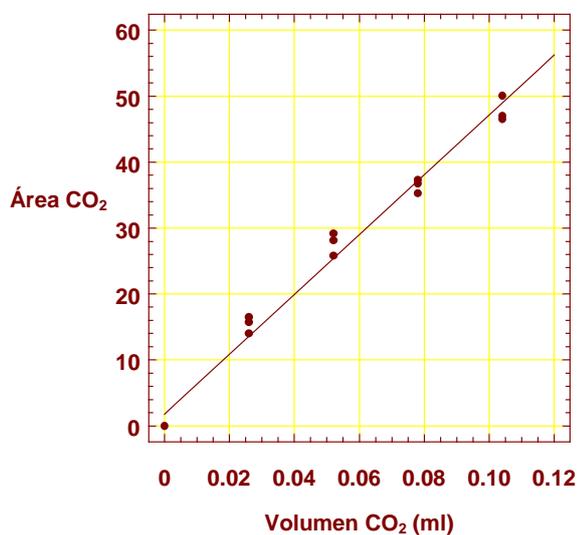
Tabla 2.10

Valores experimentales para la determinación del F_{RCO_2}

Volumen de CO_2 (ml)	Área de CO_2 (*) (mV.s)
0.000	0.00
0.026	15.43
0.052	27.72
0.078	36.46
0.104	47.88

(*) Los valores de área son el promedio de 3 determinaciones

Figura 2.7

Recta de regresión para CO_2 

La tabla 2.11 muestra el análisis de regresión para el modelo propuesto (Ec. 2.10). El test de *Student* (*t-test*) aplicado a los coeficientes del modelo indica que la ordenada al origen (a_{CO_2}) es no significativa ($p > 0.05$) y la pendiente (F_{RCO_2}) es altamente significativa ($P < 0.001$).

Tabla 2.11*Estimación de los parámetros de regresión y resultados del t-test para el CO₂*

Parámetros	Estimación	Error estándar	Valor t	P justo
a_{CO₂}	1.78444	0.869312	2.05271	0.0593
F_{RCO₂}	453.755	14.0975	32.187	0.0000

También se realizó un análisis de variancia (ANOVA) de una vía para comprobar la idoneidad del modelo lineal, analizando conjuntamente el coeficiente de determinación (R^2) que orienta sobre el porcentaje de la variación que ha sido explicada por el modelo (Tabla 2.12).

Tabla 2.12*Análisis de variancia para el modelo lineal correspondiente al CO₂*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calc.
Modelo	4697.4622	1	4697.4622	1036.003***
Residual	63.479010	14	4.534215	
Total (correg.)	4760.9412			
Coef. Correlación (R)	0.993311			
Coef. Determinación (R^2)	0.986667			

*** Significativo al 0.1%

El coeficiente de determinación indica que el 98.67 % de la variabilidad es explicada por el modelo y el ANOVA reafirma que el modelo elegido es altamente significativo ($p < 0.001$), es decir que la respuesta del detector es lineal en el rango ensayado.

5.7.2..2 Cálculo del factor de respuesta para O₂

Los valores experimentales obtenidos para el O₂ se presentan en la Tabla 2.13. En la Figura 2.8 se grafican los datos experimentales y la regresión lineal correspondiente.

Tabla 2.13

Valores experimentales para la determinación del F_{RO_2}

Volumen de O ₂ (ml)	Área de O ₂ (*) (mV.s)
0.000	0.00
0.106	119.43
0.212	245.92
0.318	374.72
0.424	499.06

(*) Los valores de área son el promedio de 3 determinaciones

Figura 2.8
Recta de regresión para O₂

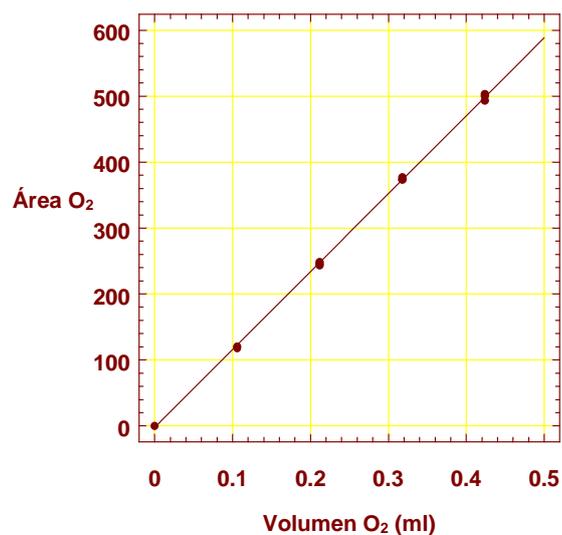


Tabla 2.14*Estimación de los parámetros de regresión y resultados del t-test para el O₂*

Parámetros	Estimación	Error estándar	Valor t	P justo
a_{O₂}	-2.37778	1.36804	-1.73809	0.10413
F_{RO₂}	1180.96	5.44167	217.022	0.0000

En la Tabla 2.14 se muestra el análisis de regresión. El *t-test* aplicado indica que la ordenada al origen (a_{O_2}) no es significativa ($p > 0.05$) y la pendiente (F_{RO_2}) es altamente significativa ($p < 0.001$).

El ANOVA (Tabla 2.15) confirma que el modelo lineal es altamente significativo ($p < 0.001$) y explica el 99.97 % de la variabilidad de los datos experimentales.

Tabla 2.15*Análisis de variancia para el modelo lineal correspondiente al O₂*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calc.
Modelo	528878.93	1	528878.93	47098.3***
Residual	157.20948	14	11.22925	
Total (correg.)	529036.14			
Coef. Correlación (R)	0.999851			
Coef. Determinación (R ²)	0.9997			

*** Significativo al 0.1%

5.7.2..3 Cálculo del factor de respuesta para N₂

En la Tabla 2.16 se presentan los valores experimentales obtenidos y en la Figura 2.9 se grafica la regresión lineal correspondiente.

Tabla 2.16

Valores experimentales para la determinación del F_{RN_2}

Volumen de N ₂ (ml)	Área de N ₂ (*) (mV.s)
0.000	0.00
0.368	119.43
0.736	929.08
1.104	1435.13
1.472	1919.68

(*) Los valores de área son el promedio de 3 determinaciones

Figura 2.9

Recta de regresión para N₂

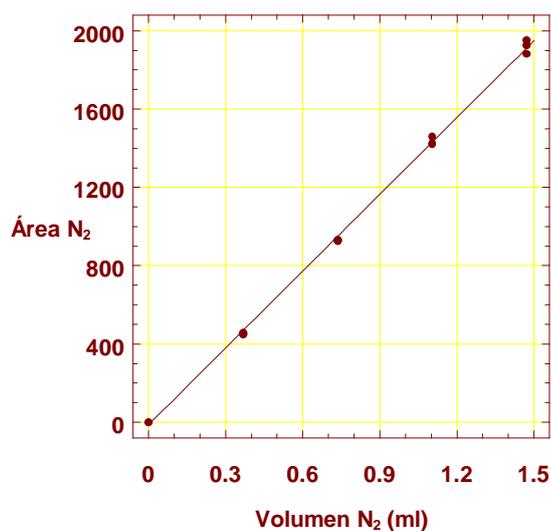


Tabla 2.17*Estimación de los parámetros de regresión y resultados del t-test para el N₂*

Parámetros	Estimación	Error estándar	Valor t	P justo
a_{N_2}	-14.3189	8.62988	-1.65922	0.11930
F_{RN_2}	1307.77	9.88771	132.262	0.00000

El análisis de regresión (Tabla 2.17) indica que la ordenada al origen (a_{N_2}) no es significativa ($p > 0.05$) y la pendiente (F_{RN_2}) es altamente significativa ($p < 0.001$).

El ANOVA (Tabla 2.18) confirma que el modelo lineal es altamente significativo ($p < 0.001$) y el 99.92 % de la variabilidad de los datos experimentales es explicada por el modelo.

Tabla 2.18*Análisis de variancia para el modelo lineal correspondiente al N₂*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calc.
Modelo	7816890.8	1	7816890.8	17493***
Residual	6255.8910	14	446.8494	
Total (correg.)	7823146.7			
Coef. Correlación (R)	0.9996			
Coef. Determinación (R ²)	0.9992			

*** Significativo al 0.1%

Finalmente, en la tabla 2.19 se presentan los valores de los factores de respuesta obtenidos para cada uno de los compuestos.

Tabla 2.19
Factores de respuesta obtenidos

F_{RCO2} : 453.76 [mV.s/ml]
F_{RO2} : 1180.96 [mV.s/ml]
F_{RN2} : 1307.77 [mV.s/ml]

5.8. EVALUACIÓN SENSORIAL

La evaluación sensorial de los atributos de calidad realizada por un panel experto es una técnica muy usada, cuando no se dispone de medidas físicas o químicas que se relacionen con dichos atributos.

Cada panelista debe ser calificado antes de su participación, y este requisito debe cumplirse para cada ensayo, más allá de experiencias previas. Para la realización de ensayos descriptivos, los panelistas deben demostrar su habilidad para percibir diferencias, expresarlas verbalmente, cuantificarlas y trabajar como grupo.

La primera etapa de la evaluación sensorial consistió en la selección y entrenamiento de los panelistas con vegetales mínimamente procesados, que se realizó dentro del marco del Proyecto CAI+D 12/H062, dirigido por el Ing. Jorge Di Pentima. La metodología utilizada y los resultados obtenidos se encuentran detallados en el trabajo de Pirovani, et al. (1997).

El panel seleccionado realizó un entrenamiento específico para evaluar espinaca mínimamente procesada. Se realizaron sesiones con todos los miembros del panel donde se seleccionaron los atributos de calidad a evaluar en este producto.

Los atributos seleccionados por consenso fueron: *off-odors*, apariencia general, marchitamiento, amarronamiento y color.

Off-odors: relacionado con la aparición o desarrollo de cualquier olor extraño (*off-odor*), diferente al olor natural del producto, en las muestras de espinaca mínimamente procesada.

Apariencia general: relacionada con la calidad de compra, compuesta por aquellas características que son importantes para el consumidor cuando decide comprar un producto en particular y cuál artículo seleccionar.

Marchitamiento: relacionado con la pérdida de turgencia a causa de la deshidratación por evaporación de agua.

Amarronamiento: relacionado con el desarrollo de coloración marrón, debida al amarronamiento enzimático, especialmente en los cortes de las hojas de espinaca.

Color: relacionado con los cambios de color, desde el verde oscuro al amarillo.

La evaluación sensorial de las muestras de espinaca mínimamente procesadas se realizó en el Área para Evaluación Sensorial que dispone el Instituto de Tecnología de Alimentos. Se disponen de 4 cabinas realizadas en madera recubierta con laminado plástico de color crema. Cada cabina consiste de una mesada ubicada a 80 cm del suelo con 3 paneles (2 laterales y 1 en el fondo), de 60 cm de altura por encima de la mesada. Cada panelista se ubica frente a la mesada correspondiente sin posibilidad de ver a otros panelistas. La iluminación se realiza con luz fluorescente, y la ventilación en la sala es adecuada.

Cada panelista evaluó las muestras identificadas con números aleatorios y completó una planilla similar a la de la figura 2.10. La intensidad de cada atributo se indicó colocando una marca sobre una escala lineal no estructurada, con términos ancla ubicados a 1 cm de cada extremo de la línea de 10 cm. La cuantificación de las respuestas se hizo midiendo la distancia desde el extremo izquierdo hasta la marca señalada por el panelista.

Figura 2.10

Planilla para la evaluación sensorial de espinaca mínimamente procesada

Nombre:	Fecha:
<p>Por favor, evalúe las muestras que se le presentan con respecto a los atributos mencionados a continuación. Coloque una línea vertical sobre la escala para indicar su calificación, y el número correspondiente a la muestra evaluada.</p> <p>Abra una bolsa por vez y evalúe el atributo <i>off-odor</i> inmediatamente, luego continúe con la evaluación de los demás atributos.</p>	
Off-odor	
Apariencia general	
Marchitamiento	
Amarronamiento	
Color	

5.9. DETERMINACIÓN DE CLOROFILA

Para la determinación de clorofila se utilizó el método espectrofotométrico de Vernon (1960). Este método permite determinar cuantitativamente clorofila a, clorofila b, clorofila total, feofitina a, feofitina b y feofitina total realmente presentes en las muestras.

Este método considera a los extractos de acetona al 80 % como sistemas de 4 componentes, lo que hace al método aplicable a cualquier tejido vegetal conteniendo cualquier relación de clorofila a / clorofila b.

Equipamiento y reactivos

- Espectrofotómetro SPECTRONIC^R GENESYSTM 5 de Milton Roy Company. Permite realizar espectros de absorción y medidas individuales a las longitudes de onda necesarias. Para las medidas se utilizan cubetas de vidrio con tapa.
- Licuadora con vaso de vidrio
- Filtro de vidrio poroso
- Kitasato, trampa de vacío
- Matraces aforados de 500 ml y 100 ml
- Solución de acetona:agua al 80 % en volumen
- Carbonato de calcio
- Ácido oxálico
- Papel de aluminio

Determinación

Se realizaron ensayos previos para ajustar detalles experimentales y determinar la cantidad de muestra necesaria para que los valores de absorbancia se encuentren en el rango de 0.22 a 0.69, donde el error fotométrico es mínimo.

Se elige el material vegetal cuidadosamente para asegurarse que sea una muestra representativa. Se pesan 7 g de espinaca y se colocan en el vaso de la licuadora. Se agregan 1g de CaCO₃ y 150 ml de solución acuosa de acetona al 80 %. Se tapa la licuadora y se licúa durante 3 min a máxima velocidad. Se filtra el extracto a través de un filtro de vidrio

poroso realizando vacío. Se lava el residuo con acetona al 80 % hasta que el tejido vegetal y los líquidos de lavados sean incoloros.

Se transfiere el filtrado a un matraz aforado de 500 ml y se diluye a volumen con acetona 80 %. Se homogeneiza y esta solución constituye la Muestra Original.

Se toman 100 ml de la Muestra Original y se transfieren a un matraz de 100 ml con 0.5g de ácido oxálico para pasar toda la clorofila a feofitina. Esta nueva solución constituye la Muestra Convertida.

Ambos matraces se tapan, se cubren con papel de aluminio y se mantienen en la oscuridad por tres horas a temperatura ambiente.

5.9.1. Medida espectrofotométrica

Se coloca cada una de las soluciones obtenidas en cubetas de vidrio y se tapan. La solución acuosa de acetona al 80 % se utiliza como blanco de referencia.

Se determinan las absorbancias de las Muestras Original y Convertida a 645, 662 y 700 nm. Además se mide la absorbancia de la Muestra Convertida a 536, 655 y 666 nm.

La lectura a 700 nm, donde existe poca absorción debido a las clorofilas, sirve para controlar la claridad óptica de las soluciones. Las muestras claras dan lecturas de absorbancia a 700 nm de 0.014 o menores. Las longitudes de onda de 662 y 645 se seleccionaron para medir los cambios en la absorbancia entre las dos muestras, que es proporcional a la clorofila realmente presente. Las longitudes de onda de 666 y 655 nm se seleccionaron para medir absorbancia después del tratamiento con ácido oxálico, que es proporcional a la clorofila total (Vernon, 1960). La clorofila total sería la suma de la clorofila y la feofitina realmente presentes en la muestra de espinaca analizada.

5.9.2. Cálculo de las concentraciones

Para el cálculo de las concentraciones de clorofila a , clorofila b y clorofila total se utilizan las ecuaciones 2.11, 2.12 y 2.13, propuestas por Vernon (1960).

$$\text{Cl a} = 25.38 (\Delta A_{662}) + 3.64 (\Delta A_{645}) \quad \text{Ec. 2.11}$$

$$\text{Cl b} = 30.38 (\Delta A_{645}) - 6.58 (\Delta A_{662}) \quad \text{Ec. 2.12}$$

$$\text{Cl t} = 18.80 (\Delta A_{662}) + 34.02 (\Delta A_{645}) \quad \text{Ec. 2.13}$$

donde: Cl a, Cl b, Cl t = Concentración de clorofila a, b y total realmente presente en la muestra de espinaca, [mg/L]

ΔA_{662} , ΔA_{645} = Indica la diferencia de absorbancia entre la Muestra original y Convertida a 662 y 645 nm respectivamente .

También se usaron las siguientes ecuaciones para determinar la concentración de feofitina a, feofitina b y feofitina total en los extractos de acetona al 80 % después de la conversión con ácido oxálico.

$$\text{F a} = 20.15 (A_{666}) - 5.87 (A_{655}) \quad \text{Ec. 2.14}$$

$$\text{F b} = 31.90 (A_{655}) - 13.40 (A_{666}) \quad \text{Ec. 2.15}$$

$$\text{F t} = 6.75 (A_{666}) + 26.03 (A_{655}) \quad \text{Ec. 2.16}$$

donde: F a, F b y F t = Concentración de feofitina a, b y total en el extracto convertido con ácido oxálico, [mg/L]

A_{666} , A_{655} = Absorbancia de la Muestra Convertida a 666 y 655 nm.

La lectura a 655 nm es poco exacta ya que se hace sobre una parte inclinada de la curva de absorción del extracto después de la adición de ácido oxálico, y un pequeño cambio en la longitud de onda produce un cambio relativamente grande en absorbancia. Esto puede observarse en la figura 2.11 donde se presentan los espectros de absorción para los extractos de espinaca en acetona al 80 % antes y después de la conversión con ácido oxálico.

Por eso se desarrollaron, similarmente a las anteriores, otra serie de ecuaciones donde se utilizaron las absorbancias determinadas a 666 y 536 nm después de la conversión. La elección de la longitud de onda de 536 nm para reemplazar a la de 655 nm

se hizo porque ocurre un pico de absorción de feofitina a, a esa longitud de onda, y también porque el cambio en la absorción de feofitina b en esta área fue pequeño (Vernon, 1960). Las ecuaciones así desarrolladas son las siguientes:

$$\mathbf{F a} = 21.67 (A_{666}) - 17.42 (A_{536}) \quad \text{Ec. 2.17}$$

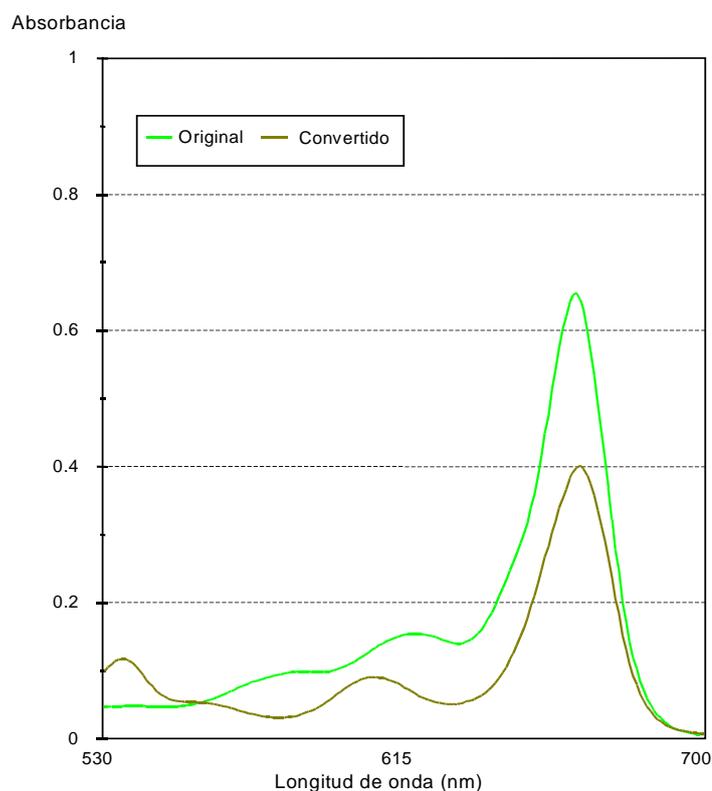
$$\mathbf{F b} = 95.00 (A_{536}) - 22.0 (A_{666}) \quad \text{Ec. 2.18}$$

$$\mathbf{F t} = 77.58 (A_{536}) - 0.33 (A_{666}) \quad \text{Ec. 2.19}$$

Vernon (1960) recomienda utilizar los valores promedios obtenidos de las ecuaciones 2.14 y 2.17 para F a; de las ecuaciones 2.15 y 2.18 para F b; y de las ecuaciones 2.16 y 2.19 para F t.

Figura 2.11

Espectros de absorción para los extractos de espinaca



Para determinar la concentración de feofitina a, b ó total realmente presente en la muestra de espinaca, se deben restar el valor promedio obtenido por las ecuaciones 2.14 y

2.17 del obtenido por la ecuación 2.11 para obtener el valor de feofitina a; el valor promedio obtenido por las ecuaciones 2.15 y 2.18 del obtenido por la ecuación 2.12 para obtener el valor de feofitina b; el valor promedio obtenido por las ecuaciones 2.16 y 2.19 del obtenido por la ecuación 2.13 para obtener el valor de feofitina total realmente presente en la espinaca.

Por otra parte, los resultados se expresarán como miligramos de clorofila o feofitina presentes por cada 100 gramos de vegetal fresco (% Cl j ó % F j), entonces,

$$\% \text{ Cl j} = \text{Cl j (mg/L)} \cdot 0.500 \text{ (L)} \cdot [100 \text{ (g)} / 7 \text{ (g)}] \quad \text{Ec. 2.20}$$

$$\% \text{ F j} = \text{F j (mg/L)} \cdot 0.500 \text{ (L)} \cdot [100 \text{ (g)} / 7 \text{ (g)}] \quad \text{Ec. 2.21}$$

donde: j = a, b, ó total

% Cl j; % F j = Concentración en el vegetal fresco, [mg/100g]

Las determinaciones se realizaron sobre las muestras de espinaca mínimamente procesada a los 0 y 14 días de almacenamiento. Se determinó, para cada muestra de espinaca, el porcentaje de retención con respecto a la cantidad inicial de clorofila presente el día 0:

$$\% \text{ R Cl j} = \frac{\% \text{ Cl j (día 14)} \cdot 100}{\% \text{ Cl j (día 0)}} \quad \text{Ec. 2.22}$$

5.10. PÉRDIDA DE PESO

Se determinó la pérdida de peso que sufren las muestras envasadas en las bolsas de OPP y en las bolsas de LDPE a los 7 y 14 días. Se pesaron las muestras a los 0, 7 y 14 días de almacenamiento. La pérdida de peso se expresó como porcentaje respecto al peso inicial (Ec. 2.23)

$$\% \text{ Pp}_x = 100 \cdot (M_0 - M_x) / M_0 \quad \text{Ec. 2.23}$$

donde: %Pp_x = pérdida de peso de la muestra a los x días, [g/100g]

M_0 = peso de la muestra a los 0 días, [g]

M_x = peso de la muestra a los x días, [g]

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 FLORA AEROBIA MESÓFILA

La calidad microbiológica de los productos de la 4^{ta} gama, como la de todo producto alimenticio, comprende no solamente la calidad higiénica que influye sobre la salud del consumidor, sino también la calidad de comercialización o de mercado que representa el potencial de conservación del producto (Scandella, Leteinturier, 1989).

Para la estimación de la calidad microbiológica de comercialización de los vegetales mínimamente procesados se recomienda realizar el recuento de flora aerobia mesófila, como indicador de flora capaz de afectar la calidad comercial (Denis, Picoche, 1986; Anónimo, 1989).

La Tabla 3.1 muestra los resultados experimentales de los recuentos de flora aerobia mesófila (FAM) de la espinaca, para los distintos ensayos experimentales y para los dos tipos de films utilizados.

Tabla 3.1

Resultados experimentales para la FAM de espinaca

Número De Ensayo	Niveles de las variables codificadas			OPP		LDPE	
	X ₁ (c _C)	X ₂ (c _A)	X ₃ (t)	N [UFC/g]	FAM [log(UFC/g)]	N [UFC/g]	FAM [log(UFC/g)]
1	0	0	0	40.10 ⁶	7.60	60.10 ⁷	8.78
2	1	1	1	70.10 ⁹	10.85	20.10 ⁹	10.30
3	0	0	0	45.10 ⁵	6.65	30.10 ⁷	8.48
4	0	1	0	20.10 ⁷	8.40	25.10 ⁷	8.40
5	0	-1	-1	70.10 ⁴	5.85	70.10 ⁴	5.85
6	1	0	-1	14.10 ⁴	5.15	14.10 ⁴	5.15
7	-1	-1	1	11.10 ¹²	13.04	16.10 ¹²	13.20
8	0	0	1	58.10 ¹⁰	11.76	17.10 ¹¹	12.23
9	0	0	0	15.10 ⁶	7.18	90.10 ⁶	7.95
10	-1	0	0	60.10 ⁶	7.78	65.10 ⁶	7.81
11	-1	1	-1	98.10 ⁴	5.99	98.10 ⁴	5.99
12	1	-1	0	40.10 ⁵	6.60	85.10 ⁵	6.93
13	0	1	-1	30.10 ⁴	5.48	30.10 ⁴	5.48
14	0	0	-1	24.10 ⁴	5.38	24.10 ⁴	5.38
15	-1	1	1	80.10 ¹¹	12.90	90.10 ¹⁰	11.95
16	-1	0	-1	80.10 ⁴	5.90	80.10 ⁴	5.90
17	0	-1	1	84.10 ¹⁰	11.92	32.10 ¹¹	12.51
18	1	-1	-1	57.10 ⁴	5.76	57.10 ⁴	5.76
19	1	0	1	20.10 ¹¹	12.30	16.10 ¹⁰	11.20
20	1	1	0	20.10 ⁶	7.30	20.10 ⁶	7.30
21	1	1	-1	62.10 ³	4.79	62.10 ³	4.79
22	-1	-1	0	38.10 ⁸	9.58	58.10 ⁸	9.76
23	0	1	1	80.10 ⁹	10.90	80.10 ⁹	10.90
24	0	-1	0	43.10 ⁵	6.63	52.10 ⁶	7.72
25	-1	1	0	62.10 ⁵	6.79	24.10 ⁷	8.38
26	1	-1	1	32.10 ¹¹	12.51	30.10 ¹⁰	11.48
27	-1	-1	-1	36.10 ⁵	6.56	36.10 ⁵	6.56
28	1	0	0	48.10 ⁶	7.68	50.10 ⁷	8.70
29	-1	0	1	24.10 ¹¹	12.38	90.10 ¹¹	12.95

3.1.1 Efecto del tratamiento químico, tipo de envase y tiempo de conservación sobre

FAM

El primer análisis que se realiza sobre los resultados experimentales es un análisis de variancia multifactorial para determinar el efecto de los cuatro factores estudiados sobre el desarrollo de flora aerobia mesófila. Los resultados del ANOVA se presentan en la tabla 3.2, donde:

X_1 (c_C) = Concentración de ácido cítrico

X_2 (c_A) = Concentración de ácido ascórbico

X_3 (t) = Tiempo de conservación refrigerada

X_4 (f) = Tipo de film

Tabla 3.2
Análisis de variancia multifactorial para FAM

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calc.
Efectos principales				
X_1 (c_C)	10.42952	2	5.2148	15.842***
X_2 (c_A)	3.55957	2	1.7798	5.407*
X_3 (t)	369.44294	2	184.7215	561.173***
X_4 (f)	0.24807	1	0.2481	0.754 ^{NS}
Interacciones				
$X_1.X_2$	3.14849	4	0.7871	2.391 ^{NS}
$X_1.X_3$	0.47864	4	0.1197	0.364 ^{NS}
$X_1.X_4$	0.62886	2	0.3144	0.955 ^{NS}
$X_2.X_3$	2.17983	4	0.5450	1.656 ^{NS}
$X_2.X_4$	0.13040	2	0.0652	0.198 ^{NS}
$X_3.X_4$	1.61505	2	0.8075	2.453 ^{NS}
Residuo	9.21676	28	0.3292	

NS: no significativo; * significativo al 5%; ** significativo al 1%; *** significativo al 0.1%

El análisis de variancia (Tabla 3.2) indica que la concentración de ácido cítrico (X_1) y el tiempo de conservación (X_3) influyen significativamente ($p < 0.001$) sobre la flora

aerobia mesófila. La concentración de ácido ascórbico (X_2) también es significativa pero a $p < 0.05$.

El análisis de variancia también indica que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los recuentos de flora aerobia mesófila de las muestras envasadas en bolsas de OPP y las envasadas en bolsas de LDPE. Esto significaría que la atmósfera modificada desarrollada pasivamente en los envases de OPP y LDPE no afectó significativamente el desarrollo de la FAM.

Resultados similares se obtuvieron en lechuga cortada almacenada bajo diferentes atmósferas controladas (Barriga et al., 1991); y para lechuga mínimamente procesada envasada en bolsas de OPP y en bandejas recubiertas con PVC (Pirovani et al., 1998).

Omary et al. (1993) tampoco encontraron diferencias en los recuentos de flora aerobia mesófila de repollo cortado, envasado en cuatro tipos de bolsas con diferentes permeabilidades a los gases.

Debido a que el tipo de film (f) no tiene efecto significativo ($p > 0.05$) sobre el recuento de FAM, y ninguna de las interacciones en las que interviene este efecto ($X_1.X_4$, $X_2.X_4$, $X_3.X_4$) es significativa ($p > 0.05$), se puede considerar que no existen diferencias entre los recuentos de FAM de espinaca envasada en bolsas de OPP y LDPE, es decir que ambas conforman una sola población (Montgomery, 1991). Por esta razón se propone modelar el efecto de la concentración de los ácidos cítrico (c_C) y ascórbico (c_A), y el tiempo de conservación refrigerada (t), en forma conjunta para ambos films.

3.1.2 Modelo para flora aerobia mesófila

En primer lugar, se comprobó la idoneidad del modelo elegido, con los tests de diagnósticos basados en los residuos. Los tres tests de diagnósticos se presentan en la Figura 5.2 a, b y c del Anexo. Como puede verse, se cumple adecuadamente con las suposiciones de homogeneidad de la variancia (Figura 5.2 a), independencia de los errores (Figura 5.2 b) y normalidad de los errores (Figura 5.2 c). Como no existen transgresiones severas podemos aplicar el ANOVA para el modelo propuesto para FAM (Tabla 3.3).

Tabla 3.3*Análisis de variancia para el modelo propuesto para FAM*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calc.
Modelo	193.09595	9	21.4551	69.87***
X ₁ (c _C)	4.93091	1	4.93091	16.06***
X ₂ (c _A)	1.79282	1	1.79282	5.84*
X ₃ (t)	179.25272	1	179.25272	583.73***
X ₁ · X ₂	0.17876	1	0.17876	0.58 ^{NS}
X ₁ · X ₃	0.10938	1	0.10938	0.36 ^{NS}
X ₂ · X ₃	0.19437	1	0.19437	0.63 ^{NS}
X ₁ ²	0.65833	1	0.65833	2.14 ^{NS}
X ₂ ²	0.02637	1	0.02637	0.09 ^{NS}
X ₃ ²	5.95230	1	5.95230	19.38***
Residuo	5.83451	19	0.30708	
F. de ajuste	5.57414	17	0.32789	2.52 ^{NS}
Error puro	0.26036	2	0.13018	
Coef. Determinación (R ²) 0.97067				

NS: no significativo; * significativo al 5%; ** significativo al 1%; *** significativo al 0.1%

A partir del ANOVA (Tabla 3.3) se puede ver que el modelo de predicción desarrollado para flora aerobia mesófila (FAM) resultó altamente significativo ($p < 0.001$) y adecuado.

El test F para la falta de ajuste en el análisis de variancia mide la falla del modelo en representar los datos en el dominio experimental. En la tabla 3.3 puede verse que la falta de ajuste, basada en el error puro, no es significativa ($p > 0.05$).

El coeficiente de determinación (R²) es la proporción de variabilidad en los datos explicada o tomada en cuenta por el modelo. En este caso el modelo desarrollado para FAM explica el 97.07 % de la variabilidad de los datos experimentales.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, se acepta el modelo propuesto para representar los cambios en FAM en espinaca mínimamente procesada. La ecuación de 2^{do} orden propuesta como modelo es:

$$\text{FAM} = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_3 \cdot X_3 + b_{11} \cdot X_1^2 + b_{22} \cdot X_2^2 + b_{33} \cdot X_3^2 + b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + b_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + b_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde: b_0 , b_i y b_{ij} son los estimadores de los parámetros de la ecuación

X_i son las variables codificadas

Los subíndices de los coeficientes o variables codificadas indican **1**: concentración de ácido cítrico; **2**: concentración de ácido ascórbico; y **3**: tiempo de conservación refrigerada.

Los coeficientes del modelo de 2^{do} orden propuesto para FAM se presentan en la Tabla 3.4

Tabla 3.4
Valores de los coeficientes de regresión de la ecuación de 2^{do} orden para FAM

Coeficientes	
b_0	7.7519
b_1	-0.5234
b_2	-0.3156
b_3	3.1557
b_{11}	0.2006
b_{22}	-0.0397
b_{33}	0.9462
b_{12}	0.1221
b_{13}	-0.0955
b_{23}	-0.1273

Las tres variables independientes estudiadas ejercen su efecto sobre los recuentos de flora aerobia mesófila.

Los términos lineales correspondientes a la concentración de ácido cítrico (X_1) y al tiempo de conservación refrigerada (X_3) son altamente significativos ($p < 0.001$). El término correspondiente a la concentración de ácido ascórbico (X_2) es significativo a $p < 0.05$.

Las interacciones de los factores ($X_1.X_2$, $X_1.X_3$, $X_2.X_3$) no son significativas ($p > 0.05$), al igual que los términos cuadráticos correspondientes a las concentraciones de ácido cítrico (X_1^2) y ácido ascórbico (X_2^2). En cambio el término cuadrático correspondiente al tiempo de conservación refrigerada (X_3^2) es altamente significativo ($p < 0.001$).

En la figura 3.1 se representan las superficies de respuestas y los gráficos de contornos de FAM (log UFC/g) en función de la concentración de ácido cítrico y ácido ascórbico obtenidos a los 0, 7 y 14 días de almacenamiento.

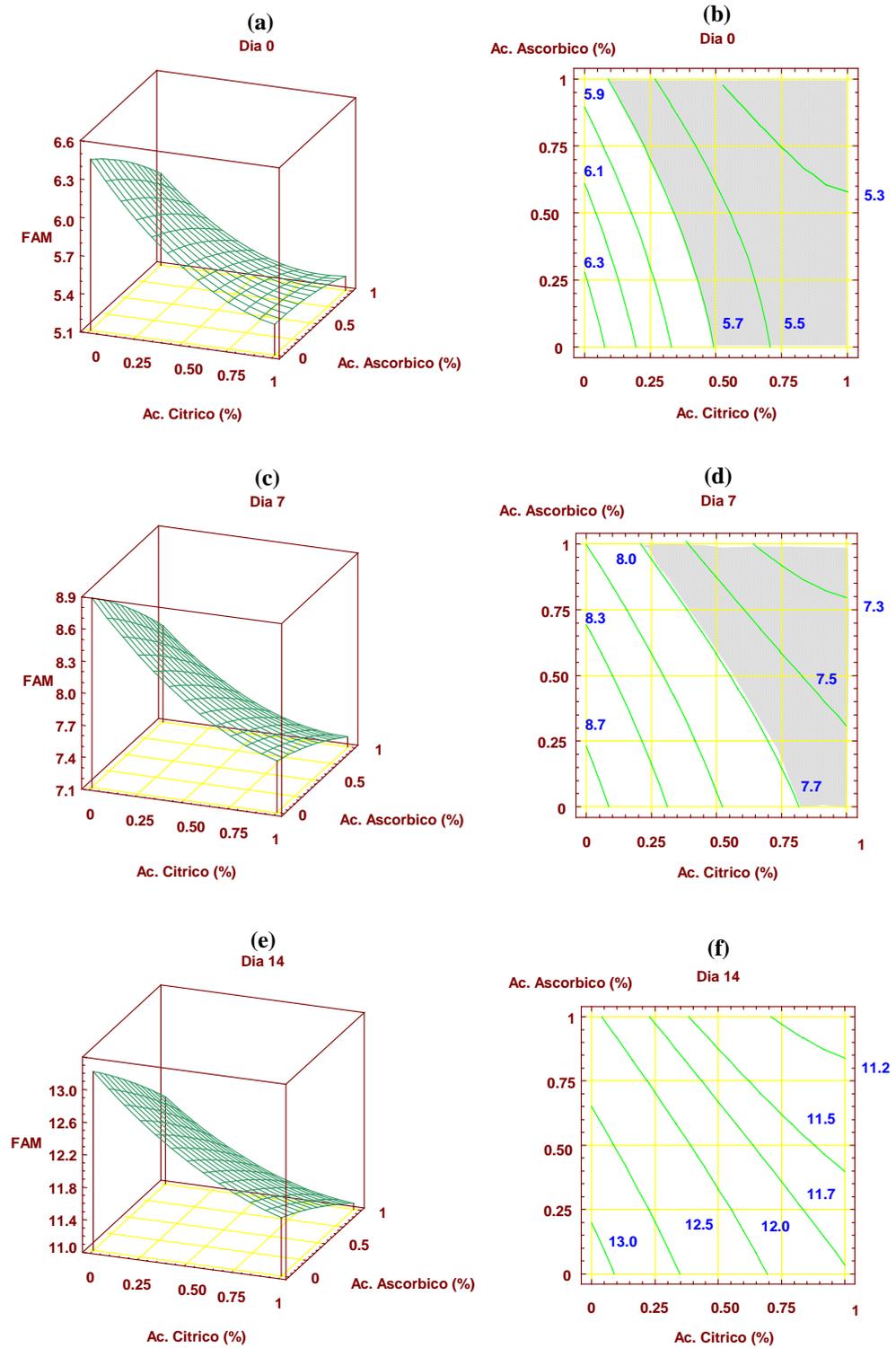
En ellos se observa que la flora aerobia mesófila disminuye a medida que aumenta la concentración de ácido cítrico. El ácido ascórbico también reduce la FAM, siendo su efecto más notable cuando se trabaja con bajas concentraciones de ácido cítrico.

De todas maneras la flora aerobia mesófila disminuye más rápidamente con el aumento de la concentración de ácido cítrico que con el aumento de la concentración de ácido ascórbico, aunque ambos actúan reduciendo el valor de FAM durante la conservación refrigerada de la espinaca mínimamente procesada.

Los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos iniciales, predichos por el modelo, se reducen de FAM = 6.17, para $c_C = 0.00\%$ y $c_A = 0.50\%$, a FAM = 5.31 cuando la concentración de ácido cítrico se aumenta a $c_C = 1.00\%$.

Después de 7 días de almacenamiento, se obtiene un recuento de FAM = 8.47, para $c_C = 0.00\%$ y $c_A = 0.50\%$, el cual se reduce a FAM = 7.43 al aumentar la c_C a 1.00% , de acuerdo al modelo de predicción desarrollado.

Figura 3.1
Gráficos de superficies de respuesta y de contornos para FAM (log UFC/g)
($t = \text{constante}$)



Por su solubilidad, sabor y baja toxicidad, los ácidos orgánicos de cadena corta como el ácido cítrico, son muy utilizados como conservadores o acidificantes. La actividad antimicrobiana de un ácido orgánico se debe a las moléculas no disociadas de este compuesto. Algunos ácidos orgánicos en su estado no disociado son muy solubles en las membranas celulares. Estos compuestos inhiben el crecimiento de los microorganismos, o los matan, por interferir con la permeabilidad de la membrana celular al producir un desacoplamiento en el transporte de sustratos y en la fosforilación oxidativa del sistema transportador de electrones. Este fenómeno da lugar a la acidificación del contenido celular, que es probablemente la principal causa de la inhibición y muerte de los microorganismos.

Los ácidos orgánicos se utilizan principalmente como agentes micostáticos. Sin embargo, a concentraciones elevadas (superiores al 1.00 %), resultan muy eficaces frente a diversos microorganismos (incluidos los virus) (ICMSF, 1980).

Chen y Peng (1980b) encontraron que una concentración de ácido cítrico del 0.20 % fue efectiva para reducir los recuentos iniciales de flora aerobia mesófila en repollo.

En pruebas de laboratorio se ha demostrado que las concentraciones de ácido cítrico no disociado necesarias para la inhibición del crecimiento de la mayor parte de cepas de levadura, hongos, *Enterobacteriaceae*, *Micrococcaceae* y *Bacillaceae* deben ser superiores a 0.005 % en medios microbiológicos en condiciones quasi-óptimas de crecimiento. También se encontró que una concentración de ácido cítrico no disociado de 0.001 % inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en condiciones anaeróbicas (ICMSF, 1980).

Por lo general, la utilización de ácidos orgánicos es compatible con la de otros conservadores o sistemas de conservación, y de hecho muchas combinaciones poseen un efecto sinérgico. Por ejemplo, muestran mayor eficacia como inhibidores microbianos a medida que disminuye la temperatura de almacenamiento y mayor como microbicidas a medida que la temperatura aumenta (ICMSF, 1980). Similarmente, los ácidos orgánicos, al igual que la mayor parte de los inhibidores microbianos, suelen ser más eficaces en condiciones anaeróbicas que aeróbicas.

En la figura 3.2 se presentan las superficies de respuesta y los gráficos de contornos para FAM (log UFC/g) en función de la concentración de ácido ascórbico y el tiempo de conservación refrigerada obtenidos para concentraciones de ácido cítrico de 0.00, 0.50 y 1.00 %.

En ellos se observa que a medida que transcurre el tiempo de conservación, la FAM aumenta significativamente. También se observa que el efecto del ácido ascórbico es significativo a bajas concentraciones de ácido cítrico.

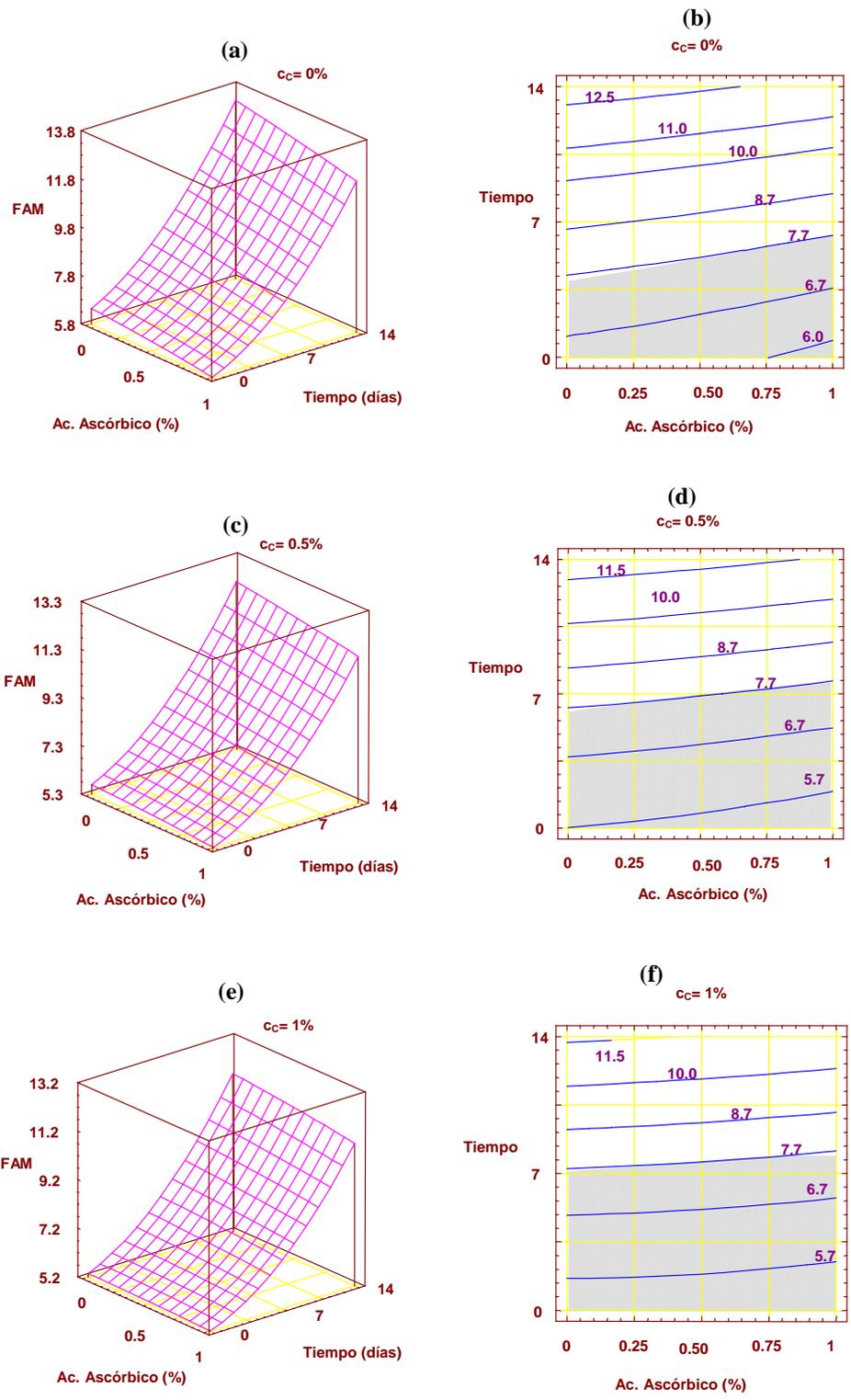
Si consideramos un tratamiento realizado con una solución con $c_C = 0.50\%$ y $c_A = 0.50\%$, el valor inicial de FAM resulta ser 5.54. Luego de 7 días de almacenamiento refrigerado los recuentos de FAM (log UFC/g) aumentan a 7.75, y a 11.85 después de 14 días, de acuerdo al modelo de predicción desarrollado.

El aumento de la población de microorganismos aerobios mesófilos durante la conservación refrigerada de vegetales listos para usar ha sido determinado por numerosos autores. Omary et al. (1993) encontraron que la flora aerobia mesófila desarrollada en repollo cortado, aumentó 4 órdenes logarítmicos, de 5.28 a 9.35 (log UFC/g), después de 14 días de almacenamiento a 11 °C. Barriga et al. (1991) reportaron que la flora aerobia mesófila aumentó 3 órdenes en lechuga cortada, almacenada durante 12 días a 4 °C.

En hojas de espinacas cortadas, la población de microorganismos aerobios mesófilos aumentó rápidamente durante los primeros 8 días de almacenamiento a 10 °C, 3 órdenes desde una población inicial de 10^7 UFC/g (Babic et al., 1996).

Babic y Watada (1996) reportaron que la flora aerobia mesófila aumentó 2-3 órdenes logarítmicos, desde 10^7 - 10^8 UFC/g, en espinaca cortada luego de 7 días de almacenamiento a 5°C. Similarmente, Mc Gill et al. (1966) reportaron que la población de microorganismos aerobios mesófilos, en hojas de espinaca, aumentó 2 órdenes después de 10 días de almacenamiento a 7 °C.

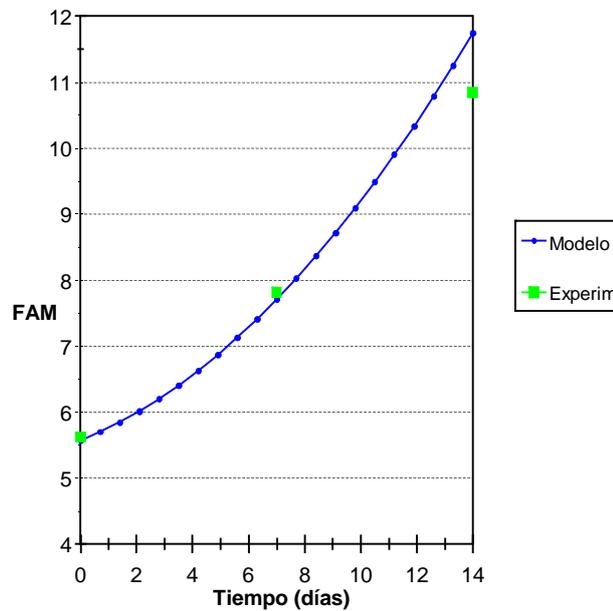
Figura 3.2
Gráficos de superficies de respuesta y de contornos para FAM
($c_c = \text{constante}$)



3.1.3 Verificación del modelo para FAM

Las condiciones experimentales para la verificación del modelo de predicción de la flora aerobia mesófila se fijaron en $c_C = 0.20\%$, $c_A = 1.00\%$ y $t = 0, 7, 14$ días. Los datos experimentales y los predichos con el modelo se encuentran graficados en la Figura 3.3.

Figura 3.3
Gráfica de datos experimentales y predichos por el modelo para FAM
($c_C = 0.20\%$; $c_A = 1.00\%$)



En la Tabla 3.5 pueden verse los valores predichos (Y_k), los intervalos de confianza correspondientes con una probabilidad del 95%, los valores experimentales (y_k) y los errores porcentuales de cada uno de los valores estimados con el modelo [$100 \cdot (y_k - Y_k) / y_k$] (Bowker, Lieberman, 1985).

Tabla 3.5*Valores predichos y experimentales para la verificación del modelo para FAM*

c_C [g/100ml]	c_A [g/100ml]	t [días]	FAM Modelo	Intervalo de confianza	FAM experimental	Error [%]
0.2	1.0	0	5.57	[4.87;6.27]	5.62	0.94
0.2	1.0	7	7.71	[7.15;8.27]	7.81	1.32
0.2	1.0	14	11.74	[10.81;12.67]	10.85	-8.27

Teniendo en cuenta los valores de los errores porcentuales y que todos los valores experimentales se encuentran dentro del intervalo de confianza correspondiente al valor estimado para cada valor puntual de las variables independientes, se puede aceptar al modelo como buen predictor del valor de FAM de la espinaca envasada en bolsas de OPP y LDPE.

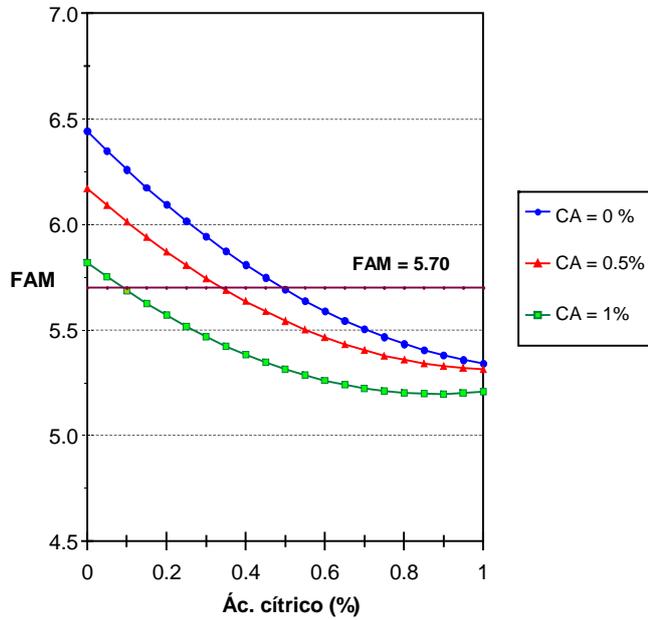
3.1.4 Determinación de las condiciones de trabajo

La legislación francesa ha impuesto como límites superiores para la flora aerobia mesófila los valores de $\log \text{UFC/g} = 5.70$ a la fecha de elaboración y $\log \text{UFC/g} = 7.70$ como límite de vida útil (Anónimo, 1989).

El área rayada de la figura 3.1b indicaría las posibles combinaciones de concentraciones de ácido cítrico (**c_C**) y ácido ascórbico (**c_A**) en las que se obtienen recuentos de FAM ≤ 5.70 .

En la figura 3.4 se grafican los recuentos de FAM iniciales en función de la concentración de ácido cítrico para las concentraciones de ácido ascórbico de 0.00; 0.50 y 1.00 %. También se indica en la gráfica el límite establecido por la legislación francesa para la fecha de elaboración, FAM = 5.70.

Figura 3.4
Recuento de FAM para el día 0



A partir de esto podemos determinar algunas combinaciones de concentraciones de las soluciones de ambos ácidos que podrían utilizarse para la realización del tratamiento químico de espinaca, para la condición inicial de que $FAM \leq 5.70$:

- $c_C \geq 0.50$ %
 $(X_1 \geq 0)$
 $c_A \geq 0.00$ % $(X_2 \geq -1)$
- $c_C \geq 0.35$ % $(X_1 \geq -0.3)$
 $c_A \geq 0.50$ % $(X_2 \geq 0)$
- $c_C \geq 0.10$ % $(X_1 \geq -0.8)$
 $c_A = 1.00$ % $(X_2 = 1)$

En las figuras 3.1 d; 3.2 b; 3.2 d; y 3.2 f se indica el área rayada correspondiente a $FAM \leq 7.70$.

En la figura 3.1 d, vemos que trabajando con combinaciones de concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico que se encuentren dentro del área rayada, se obtiene una vida útil, referida al límite impuesto por la legislación francesa de $FAM = 7.70$, de al menos 7 días. Los tiempos de vida útil para una determinada concentración de ácido cítrico y ácido ascórbico, pueden determinarse gráficamente o por resolución de la ecuación cuadrática 3.1 para $FAM = 7.70$

Si se considera una concentración $c_C = 0.50\%$ ($X_1 = 0$) y $c_A = 0.00\%$ ($X_2 = -1$), a partir de la figura 3.2 d se determina que la vida útil de la espinaca mínimamente procesada, tomando como límite $FAM = 7.70$, es aproximadamente de 6 días ($X_3 = -0.1$). Si se aumenta la concentración de ácido cítrico a 1.00% ($X_1 = 1$), de la figura 3.2 f, se tendría una vida útil, estimada por el modelo, de aproximadamente 7 días ($X_3 = 0.043$).

Si se trabaja en el límite del dominio experimental, es decir, $c_C = 1.00\%$ ($X_1 = 1$) y $c_A = 1.00\%$ ($X_2 = 1$), de la figura 3.2 f vemos que se obtiene un tiempo estimado de vida útil de 8 días ($X_3 = 0.17$).

La figura 3.2 b muestra un área rayada correspondiente a los recuentos de flora aerobia mesófila $FAM \leq 7.70$ para una concentración de ácido cítrico de 0.00% . Si analizamos las combinaciones de concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico que quedan determinadas imponiendo el límite de $FAM \leq 5.70$ al final de la producción ($t = 0$), se observa que para $c_C = 0.00\%$ ($X_1 = -1$) se obtienen recuentos superiores a dicho valor, cualquiera sea la concentración de ácido ascórbico empleada (Figura 3.1 b). Por lo tanto, para cumplir con ambas restricciones, se deberá trabajar como ya se ha indicado, con una concentración de ácido cítrico $c_C \geq 0.10\%$ ($X_1 \geq -0.8$) cuando la $c_A = 1.00\%$ ($X_2 = 1$), o una concentración de ácido cítrico $c_C \geq 0.50\%$ ($X_1 \geq 0$) cuando la $c_A \geq 0.00\%$ ($X_2 \geq -1$).

Finalmente, en la figura 3.1 f se puede ver que cualquiera sean las combinaciones de concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico que se utilicen, siempre se supera el límite impuesto por la legislación francesa después de 14 días de almacenamiento refrigerado de espinaca mínimamente procesada.

3.1.5 Efecto de las etapas de procesamiento sobre FAM

Las etapas fundamentales en la preparación de vegetales listos para usar pueden tener efectos dramáticos sobre la microflora, particularmente en el desarrollo microbiano. Las condiciones en que se realizan las diferentes etapas de elaboración de estos productos influyen sobre su calidad microbiológica.

Durante el procesamiento se tomaron muestras de espinaca correspondiente a cada etapa, de acuerdo a lo ya indicado en la figura 2.6.

Para evaluar la etapa de tratamiento químico (TQ) se analizaron los recuentos de flora aerobia mesófila obtenidos el día 0 (Tabla 3.6).

Tabla 3.6
Resultados experimentales de FAM para el día 0

Número de Ensayo	Niveles de las variables codificadas			N [UFC/g]	FAM [log(UFC/g)]
	X ₁ (C _C)	X ₂ (C _A)	X ₃ (t)		
5	0	-1	-1	70.10 ⁴	5.85
6	1	0	-1	14.10 ⁴	5.15
11	-1	1	-1	98.10 ⁴	5.99
13	0	1	-1	30.10 ⁴	5.48
14	0	0	-1	24.10 ⁴	5.38
16	-1	0	-1	80.10 ⁴	5.90
18	1	-1	-1	57.10 ⁴	5.76
21	1	1	-1	62.10 ³	4.79
27	-1	-1	-1	36.10 ⁵	6.56

Entre todas las muestras que se presentan en la tabla 3.6, se preseleccionaron aquellas cuyas combinaciones de concentración de ácido cítrico y ácido ascórbico se encuentran dentro del área de trabajo determinada anteriormente en el inciso 3.1.4.

A continuación se realiza un análisis de variancia para determinar si existen diferencias significativas entre los recuentos de flora aerobia mesófila de estas muestras (Tabla 3.7).

Tabla 3.7
Análisis de variancia para FAM de las muestras TQ seleccionadas

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calc.
Efectos principales				
X ₁ (c _C)	0.16935	1	0.1694	3.512 ^{NS}
X ₂ (c _A)	0.49894	2	0.2495	5.173 ^{NS}
Residuo	0.09645	2	0.0482	

NS: no significativo, $p > 0.05$

El resultado del análisis de variancia (Tabla 3.7) nos indica que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las muestras preseleccionadas, en las que se realizó el tratamiento químico en las condiciones que se establece en la tabla 3.6, y por lo tanto podemos considerarlas como muestras TQ para analizar el efecto de las diferentes etapas de procesamiento sobre el recuento de flora aerobia mesófila.

A continuación, se analiza el efecto de las etapas de procesamiento sobre el recuento de FAM. Para determinar si existen diferencias significativas en los recuentos de flora aerobia mesófila entre las diferentes etapas de procesamiento se realiza un análisis de variancia (Tabla 3.8).

Tabla 3.8

Análisis de variancia para FAM en las diferentes etapas de procesamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calc.
Muestra	57.99079	3	19.33026	31.955***
Residuo	12.09853	20	0.60493	

*** significativo al 0.1%

El análisis de variancia (ANOVA) para el recuento de flora aerobia mesófila (FAM) indica que existen diferencias significativas ($p < 0.001$) entre algunas de las etapas de procesamiento.

Para determinar cuáles son las etapas en que el recuento de flora aerobia mesófila es significativamente diferente se realiza el test de rango múltiple de Duncan (95%).

En la tabla 3.9 se presentan los valores promedios obtenidos para cada etapa. El test de rango múltiple de Duncan determina que no existen diferencias ($p > 0.05$) entre la materia prima (MP) y la materia prima acondicionada (MPA). Scandella y Leteinturier (1989) indican que un acondicionamiento bien realizado reduce a la mitad la carga microbiana de la materia prima. Analizando los valores para MP y MPA, se ve que el acondicionamiento reduciría a más de la mitad la carga microbiana de la MP, pero debido a la dispersión de los recuentos entre las distintas muestras analizadas, no pueden considerarse estadísticamente diferentes.

Los recuentos de flora aerobia mesófila de la MP y MPA difieren significativamente ($p < 0.05$) de las muestras de espinaca lavada (STQ) y las tratadas químicamente (TQ). Scandella y Leteinturier (1989) indican que el lavado dividiría el número de microorganismos por 100 a 500. De la tabla 3.9, se ve que con el lavado se logra reducir en aproximadamente 2 órdenes logarítmicos el recuento de FAM.

También se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras lavadas (STQ) y las tratadas químicamente (TQ). En la tabla 3.9 se observa que con el tratamiento químico se logra una reducción de más de un orden logarítmico.

Tabla 3.9

Análisis de rango múltiple de Duncan para FAM en las diferentes etapas de procesamiento

Muestra	Número de repeticiones	N [UFC/g]	FAM [log UFC/g]	Error estandar
MP	6	19.10 ⁸	9.27 ^a	0.3573
MPA	6	40.10 ⁷	8.60 ^a	0.4885
STQ	6	36.10 ⁵	6.55 ^b	0.1074
TQ	6	25.10 ⁴	5.40 ^c	0.1597

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por el test de Duncan

donde: MP: materia prima

MPA: materia prima acondicionada

STQ: materia prima acondicionada, cortada y lavada

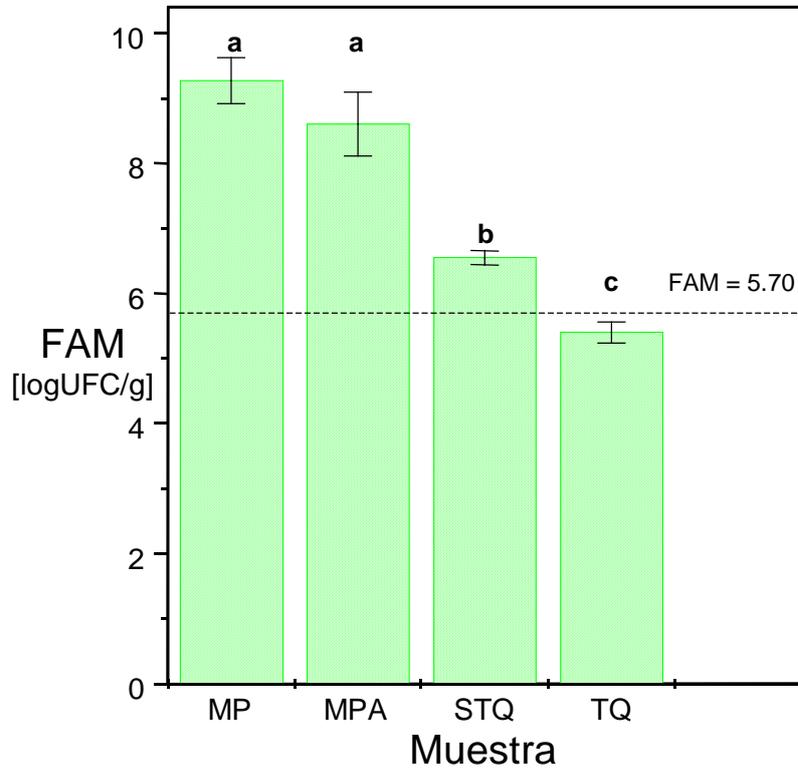
TQ: muestra STQ con tratamiento químico (c_C : 0.50-1.00 % y c_A : 0.00-1.00 %)

En la Figura 3.5 se presentan los valores promedios para la flora aerobia mesófila para cada etapa y el error estándar. También se indica el valor recomendado por la legislación francesa como límite superior para la flora aerobia mesófila (FAM = 5.70) a la fecha de elaboración.

Como puede observarse en la figura 3.5, las muestras tratadas químicamente fueron las únicas que presentaron recuentos inferiores al límite establecido.

Figura 3.5

Recuentos promedios de FAM para las diferentes etapas de procesamiento



(*) Las barras en cada columna indican el error estándar.
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por el test de Duncan

3.2 pH DE ESPINACA

El pH se utiliza como indicador de acidez. En general, la acidez de los tejidos vegetales disminuye durante la conservación debido a que los procesos metabólicos continúan desarrollándose. También, el pH puede modificarse por el tratamiento químico aplicado y la atmósfera modificada desarrollada en el envase.

La tabla 3.10 muestra los resultados experimentales del pH de espinaca obtenidos para los distintos ensayos y para los dos tipos de envases utilizados.

Tabla 3.10

Resultados experimentales para el pH de espinaca

Número de Ensayo	Niveles de las variables codificadas			pH	
	X ₁ (C _C)	X ₂ (C _A)	X ₃ (t)	OPP	LDPE
1	0	0	0	6.50	6.50
2	1	1	1	7.20	7.18
3	0	0	0	6.75	6.63
4	0	1	0	6.80	6.74
5	0	-1	-1	5.10	5.10
6	1	0	-1	4.52	4.52
7	-1	-1	1	7.15	6.79
8	0	0	1	7.29	6.81
9	0	0	0	6.72	6.65
10	-1	0	0	6.60	6.49
11	-1	1	-1	5.39	5.39
12	1	-1	0	6.79	6.50
13	0	1	-1	4.57	4.57
14	0	0	-1	4.66	4.66
15	-1	1	1	7.12	6.50
16	-1	0	-1	5.70	5.70
17	0	-1	1	7.23	6.51
18	1	-1	-1	4.60	4.60
19	1	0	1	7.25	6.79
20	1	1	0	6.80	6.74
21	1	1	-1	4.29	4.29
22	-1	-1	0	6.79	6.55
23	0	1	1	7.20	6.92
24	0	-1	0	6.83	6.50
25	-1	1	0	6.80	6.41
26	1	-1	1	7.28	6.43
27	-1	-1	-1	6.00	6.00
28	1	0	0	6.59	6.50
29	-1	0	1	7.20	6.90

3.2.1 Efecto del tratamiento químico, tipo de envase y tiempo de conservación sobre el pH de espinaca

El primer análisis que se realiza sobre los valores experimentales de pH obtenidos para los distintos ensayos, es un análisis de variancia multifactorial, para determinar el efecto de las cuatro variables estudiadas sobre el pH de espinaca. Los resultados del ANOVA se presentan en la tabla 3.11 donde:

$X_1 (c_C)$ = Concentración de ácido cítrico

$X_2 (c_A)$ = Concentración de ácido ascórbico

$X_3 (t)$ = Tiempo de conservación refrigerada

$X_4 (f)$ = Tipo de film

Tabla 3.11

Análisis de variancia para pH espinaca

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calc.
Efectos principales				
$X_1 (c_C)$	1.29204	2	0.64602	53.24***
$X_2 (c_A)$	0.10012	2	0.05006	4.125*
$X_3 (t)$	41.492429	2	20.7462	1709.74***
$X_4 (f)$	0.611204	1	0.61120	50.37***
Interacciones				
$X_1.X_2$	0.177821	4	0.044455	3.66*
$X_1.X_3$	3.640352	4	0.91009	75.00***
$X_1.X_4$	0.001719	2	0.00086	0.07 ^{NS}
$X_2.X_3$	0.744074	4	0.186019	15.33***
$X_2.X_4$	0.065425	2	0.032713	2.70 ^{NS}
$X_3.X_4$	0.47439	2	0.237193	19.55***
Residuo	0.339757	28	0.012134	

NS: no significativo; * significativo al 5%; ** significativo al 1%; *** significativo al 0.1%

El análisis de variancia (tabla 3.11) indica que las cuatro variables estudiadas influyen sobre el pH de la espinaca mínimamente procesada.

La concentración de ácido cítrico, el tiempo de conservación refrigerada y el tipo de film utilizado, son variables altamente significativas ($p < 0.001$). En cambio, la concentración de ácido ascórbico influye en menor medida sobre el pH de espinaca ($p < 0.05$).

Por lo tanto, se propone modelar el efecto de la concentración de ácido cítrico y ácido ascórbico, y el tiempo de conservación refrigerada sobre el pH de espinaca envasada en bolsas de OPP y envasada en bolsas de LDPE.

3.2.2 Modelos para pH de espinaca envasada en bolsas de OPP y LDPE

En primer lugar, se comprobó la idoneidad de los modelos elegidos a través de los tests de diagnósticos basados en los residuos. Los gráficos de diagnósticos correspondientes a los modelos elegidos para pH de espinaca envasada en bolsas de OPP y LDPE se presentan en las figuras 5.3 y 5.4 del Anexo, respectivamente.

Las figuras 5.3a y 5.4a muestran las gráficas de los residuos en función de los valores predichos, indicando que no existe ningún patrón inusual y que se cumple con la suposición de homogeneidad de la variancia.

Las figuras 5.3b y 5.4b indican que se cumple adecuadamente con la suposición de independencia de los errores, y a través de las figuras 5.3c y 5.4c se comprueba la suposición de normalidad de los errores.

Todos los tests de diagnósticos antes mencionados han demostrado la idoneidad de los modelos propuestos para el pH de espinaca envasada en bolsas de OPP ($\mathbf{pH_{OPP}}$) y para el pH de espinaca envasada en bolsas de LDPE ($\mathbf{pH_{PE}}$).

A continuación se aplicará el análisis de variancia para los modelos propuestos para $\mathbf{pH_{OPP}}$ (tabla 3.12) y para $\mathbf{pH_{PE}}$ (tabla 3.13).

Tabla 3.12*Análisis de variancia para el modelo propuesto para pH_{OPP}*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calc.
Modelo	27.43809	9	3.04769	84.12***
X ₁ (c _C)	0.65361	1	0.65361	18.03***
X ₂ (c _A)	0.15200	1	0.15200	4.39*
X ₃ (t)	22.43384	1	22.43384	619.00***
X ₁ · X ₂	0.00521	1	0.00521	0.14 ^{NS}
X ₁ · X ₃	1.29363	1	1.29363	35.69***
X ₂ · X ₃	0.14410	1	0.14410	3.98 ^{NS}
X ₁ ²	0.00023	1	0.00023	0.01 ^{NS}
X ₂ ²	0.00148	1	0.00148	0.04 ^{NS}
X ₃ ²	2.75400	1	2.75400	75.99***
Residual	0.68860	19	0.03624	
F. de ajuste	0.65133	17	0.03831	2.06 ^{NS}
Error puro	0.03727	2	0.01863	
Coef. Determinación (R ²) 0.97551				

NS: no significativo; * significativo al 5%; ** significativo al 1%; *** significativo al 0.1%

De los análisis de variancia correspondientes a los modelos propuestos para el pH de espinaca envasada en bolsas de OPP (**pH_{OPP}**) y para el pH de espinaca envasada en bolsas de LDPE (**pH_{PE}**) (tablas 3.12 y 3.13), se puede ver que ambos modelos de predicción resultan altamente significativos ($p < 0.001$) y la falta de ajuste de los dos modelos es no significativa ($p > 0.05$).

El valor del coeficiente de determinación (R²) indica que el modelo desarrollado para **pH_{OPP}** explica el 95.82 % de la variabilidad de los datos experimentales y el modelo desarrollado para **pH_{PE}** explica el 97.55 %.

Tabla 3.13

Análisis de variancia para el modelo propuesto para pH_{PE}

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calc.
Modelo	20.0649	9	2.22943	48.41***
X ₁ (c _C)	0.56357	1	0.56357	12.24**
X ₂ (c _A)	0.00320	1	0.00320	0.07 ^{NS}
X ₃ (t)	14.20445	1	14.20445	308.46***
X ₁ · X ₂	0.24510	1	0.24510	5.32*
X ₁ · X ₃	1.25777	1	1.25777	27.31***
X ₂ · X ₃	0.45241	1	0.45241	9.82**
X ₁ ²	0.00228	1	0.00228	0.05 ^{NS}
X ₂ ²	0.06764	1	0.06764	1.47 ^{NS}
X ₃ ²	3.26844	1	3.26844	70.98***
Residual	0.87493	19	0.04605	
F. de ajuste	0.86166	17	0.05069	7.64 ^{NS}
Error puro	0.01327	2	0.00663	
Coef. determinación (R ²) 0.95822				

NS: no significativo; * significativo al 5%; ** significativo al 1%; *** significativo al 0.1%

Las ecuaciones de 2^{do} orden propuestas como modelo son:

$$pH_{OPP} = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_3 \cdot X_3 + b_{11} \cdot X_1^2 + b_{22} \cdot X_2^2 + b_{33} \cdot X_3^2 + b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + b_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + b_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 \quad \text{Ec.3.2}$$

$$pH_{PE} = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_3 \cdot X_3 + b_{11} \cdot X_1^2 + b_{22} \cdot X_2^2 + b_{33} \cdot X_3^2 + b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + b_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + b_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 \quad \text{Ec.3.3}$$

donde b₀, b₁ y b_{ij} son los coeficientes y X_i son las variables codificadas.

Los subíndices de los coeficientes o variables codificadas indican 1: concentración de ácido cítrico; 2: concentración de ácido ascórbico; y 3: tiempo de conservación refrigerada.

Los coeficientes de los modelos de 2^{do} orden propuestos para el pH_{OPP} y pH_{PE} se presentan en la tabla 3.14.

Tabla 3.14

Valores de los coeficientes de las ecuaciones 3.2 y 3.3 para pH_{OPP} y pH_{PE}

Coefficientes	pH_{OPP}	PH_{PE}
b₀	6.6526	6.5399
b₁	-0.1906	-0.1769
b₂	-0.0892	-0.0133
b₃	1.1164	0.8883
b₁₁	0.0772	0.0697
b₂₂	0.0547	-0.0245
b₃₃	-0.6436	-0.7011
b₁₂	0.0208	0.1429
b₁₃	0.3283	0.3238
b₂₃	0.1096	0.1942

En el modelo desarrollado para el pH de espinaca envasada en bolsas de OPP (**pH_{OPP}**), las tres variables independientes consideradas son importantes (tabla 3.12), siendo la concentración de ácido cítrico (X_1) y el tiempo de conservación refrigerada (X_3) las que ejercen una mayor influencia sobre el pH ($p < 0.001$). También resultaron altamente significativas la interacción entre la concentración de ácido cítrico y el tiempo de conservación ($X_1 \cdot X_3$) y el término cuadrático del tiempo de conservación (X_3^2).

La figura 3.6 muestra los gráficos de superficies de respuesta y de contornos para el **pH_{OPP}** en función de la concentración de ácido cítrico y la concentración de ácido ascórbico para los días 0, 7 y 14 de conservación.

Puede verse que el pH de espinaca disminuye con el aumento de la concentración de ácido cítrico y ácido ascórbico. Sin embargo el efecto del aumento en la concentración de ácido cítrico sobre la disminución del pH es mucho más significativo que el efecto producido por el aumento de la concentración de ácido ascórbico.

Inicialmente ($t = 0$), el pH de espinaca envasada en bolsas de OPP, para una concentración de ácido cítrico $c_C = 0.00\%$ y de ácido ascórbico $c_A = 0.50\%$, disminuye de 5.49 a 4.45 cuando la concentración de ácido cítrico aumenta a 1.00% , de acuerdo al modelo de predicción desarrollado.

Sin embargo, en la figura 3.6 puede verse que el efecto que ejercen el ácido cítrico y el ácido ascórbico sobre el pH de espinaca es mucho menos importante a los 7 y 14 días de almacenamiento refrigerado. El pH de espinaca para $c_C = 0.00\%$ y $c_A = 0.50\%$, es a los 7 días 6.92. Cuando se aumenta la concentración de ácido cítrico a 1.00 %, el pH de la espinaca a los 7 días es 6.54 de acuerdo al modelo de predicción. Es decir, que la diferencia inicial, de más de una unidad de pH, no se mantiene durante el almacenamiento.

La figura 3.7 muestra las superficies de respuesta y sus contornos para el pH de espinaca envasada en OPP en función de la concentración de ácido ascórbico y el tiempo de conservación, para las concentraciones de ácido cítrico de 0.00, 0.50 y 1.00 %.

Como puede observarse, a medida que transcurre el tiempo de conservación se produce un aumento en el pH de la espinaca, independientemente de las concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico utilizadas en el tratamiento químico. De este modo, para una $c_C = 0.50\%$ y $c_A = 0.50\%$, el pH de la espinaca aumenta desde un pH inicial de 4.89 a 6.65 después de 7 días de almacenamiento, y a 7.13 a los 14 días de conservación refrigerada.

Los ácidos orgánicos se encuentran en constante dinámica metabólica en la mayoría de las frutas y hortalizas. Su contenido puede disminuir durante el almacenamiento ya que las células vegetales son capaces de utilizar a los ácidos orgánicos como sustrato para la respiración (Ulrich, 1970).

Babic y Watada (1996) encontraron que el pH de espinaca aumentó gradualmente durante 7 días de almacenamiento, desde 6.40 hasta 7.00 a 5°C y hasta 8.20 a 10°C.

Otros autores también registraron aumento de pH de espinaca durante el almacenamiento. Aworh et al. (1980) indicaron que el pH de espinaca aumentó de 6.40 a 7.72 y a 8.90 luego de 10 y 15 días de almacenamiento a 10°C respectivamente. Babic et al. (1996) reportaron un aumento del pH de espinaca de 6.40 a 7.30 a 10 °C.

Figura 3.6
Gráficos de Superficie de respuesta y de Contorno para pH_{OPP}
($t = \text{constante}$)

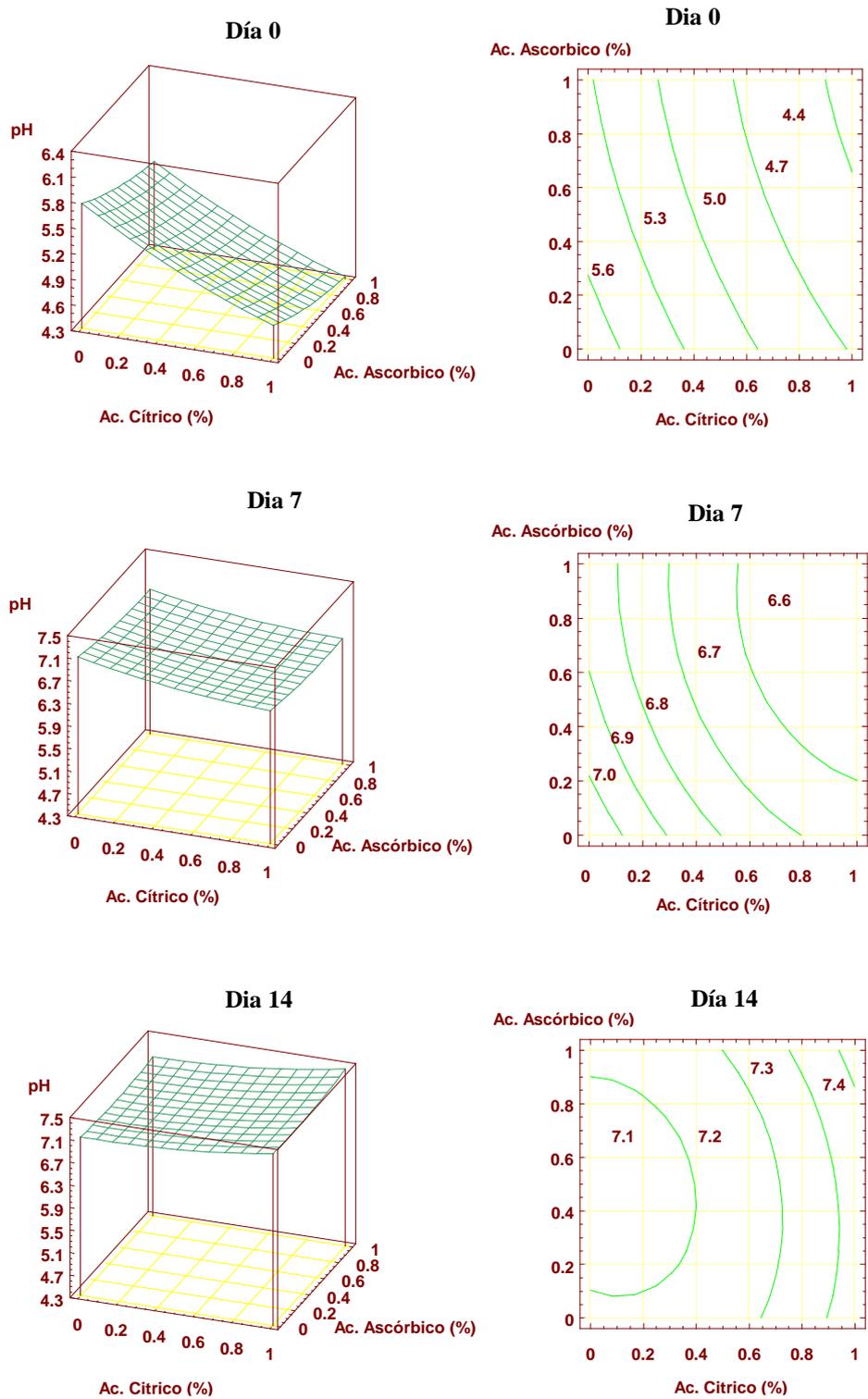
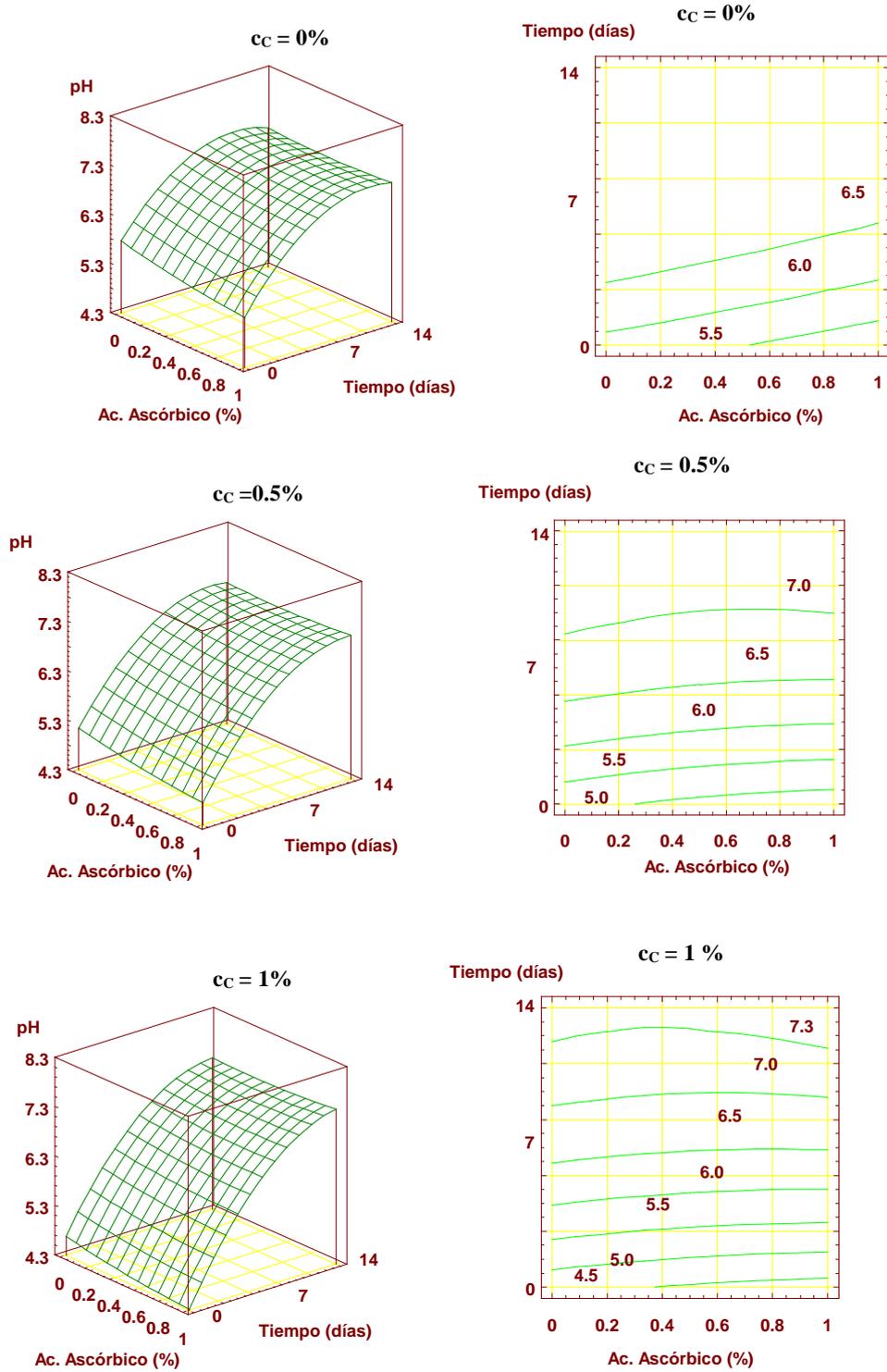


Figura 3.7
Gráficos de Superficie de respuesta y de Contorno para pH_{OPP}
($c_C = \text{constante}$)



El análisis de variancia para el modelo desarrollado para el pH de espinaca envasada en bolsas de LDPE (tabla 3.13) indica que los términos lineales significativos son los correspondientes a la concentración de ácido cítrico (X_1) ($p < 0.01$), y al tiempo de conservación (X_3) ($p < 0.001$). También resultó altamente significativo el término cuadrático correspondiente al tiempo (X_3^2).

El término correspondiente a la interacción ($X_1 \cdot X_2$) es significativo a $p < 0.05$. Esto indica que el efecto de la concentración de ácido ascórbico sobre el pH de espinaca es diferente para los distintos niveles de la concentración de ácido cítrico.

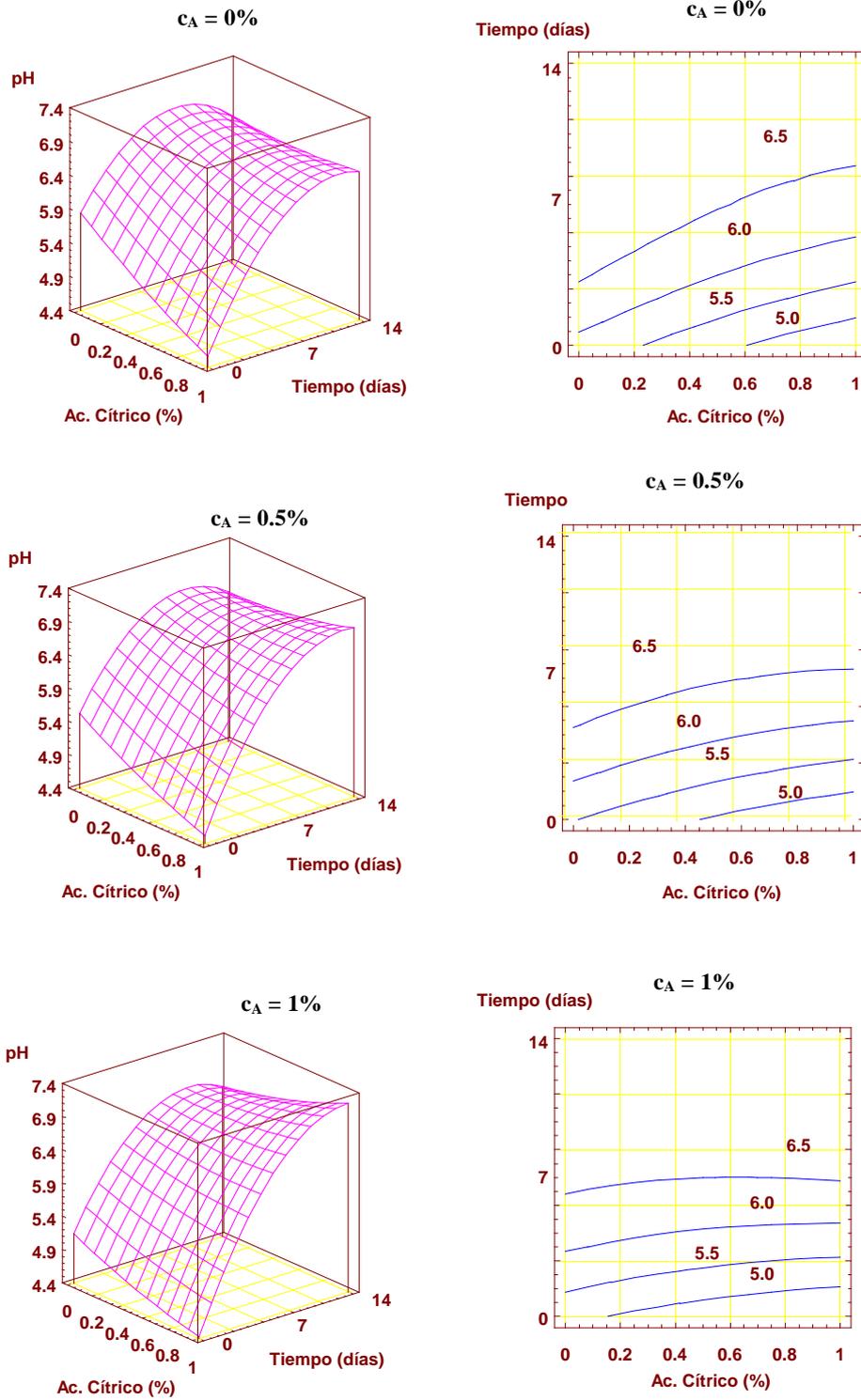
En la figura 3.8, que muestra los gráficos de superficie de respuesta y de contorno para el pH_{PE} , se ve que a medida que aumenta la concentración de ácido ascórbico se nota una ligera disminución en el valor del pH inicial de espinaca para aquellas muestras tratadas con soluciones de baja concentración de ácido cítrico. Para c_C altas, el ácido ascórbico no afecta el pH inicial de espinaca.

El ANOVA (tabla 3.13) también muestra que son significativas las interacciones $X_1 \cdot X_3$ ($p < 0.001$) y $X_2 \cdot X_3$ ($p < 0.01$), lo que indica que el efecto de c_C y c_A sobre el pH de espinaca envasada en LDPE es diferente para los distintos días de almacenamiento.

En la figura 3.8, se ve que el pH inicial de espinaca disminuye significativamente con el aumento de c_C . Una muestra tratada con una solución $c_C = 0.00\%$ y $c_A = 0.30\%$ tiene un pH inicial de 5.66. Si se aumenta la concentración de ácido cítrico a 1.00% , el pH inicial de la espinaca disminuirá a 4.54. Sin embargo, en la figura 3.8 puede verse que, similarmente a lo que sucede con el pH_{OPP} , el pH_{PE} se ve poco afectado por el ácido cítrico y el ácido ascórbico luego de 7 días de almacenamiento. El pH de espinaca para $c_C = 0.00\%$ y $c_A = 0.30\%$ a los 7 días es de 6.85, y disminuye a 6.38 para una muestra tratada con una solución con $c_C = 1.00\%$ y $c_A = 0.30\%$.

En la figura 3.8 también podemos ver que el pH_{PE} aumenta significativamente durante la conservación refrigerada, para cualquier combinación de concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico. Así, para $c_C = 0.50\%$ y $c_A = 0.30\%$, el pH inicial de espinaca es de 5.03, aumentando a 6.54 a los 7 días y a 6.65 luego de 14 días de conservación.

Figura 3.8
Gráficos de Superficies de respuesta y de Contornos para pH_{PE}
($c_A = \text{constante}$)



3.2.3 Verificación de los modelos para pH

Las condiciones experimentales para la verificación de los modelos de predicción del pH de espinaca envasada en bolsas de OPP y LDPE, se fijaron en: $c_C = 0.20 \%$, $c_A = 1.00 \%$ y $t = 0, 7, 14$ días.

En las Tablas 3.15 y 3.16 pueden verse los valores predichos (Y_k), los intervalos de confianza correspondientes con una probabilidad del 95%, los valores experimentales (y_k) y los errores porcentuales de cada uno de los valores estimados con los modelos $[100 \cdot (y_k - Y_k) / y_k]$, para pH_{OPP} y pH_{PE} respectivamente.

Tabla 3.15

Valores predichos y experimentales para la verificación del modelo para pH_{OPP}

c_C [g/100ml]	c_A [g/100ml]	t [día]	pH modelo	Intervalo de confianza	pH experimenta l	Error [%]
0.2	1.0	0	5.08	[4.74;5.41]	4.77	-6.50
0.2	1.0	7	6.75	[6.55;6.94]	6.80	0.74
0.2	1.0	14	7.13	[6.89;7.37]	7.15	0.23

Tabla 3.16

Valores predichos y experimentales para la verificación del modelo para pH_{PE}

c_C [g/100ml]	c_A [g/100ml]	t [día]	pH Modelo	Intervalo de confianza	pH experimenta l	Error [%]
0.2	1.0	0	4.96	[4.69;5.23]	4.77	-3.98
0.2	1.0	7	6.55	[6.33;6.77]	6.74	2.82
0.2	1.0	14	6.73	[6.46;7.01]	7.00	3.86

Teniendo en cuenta los valores de los errores porcentuales y que todos los valores experimentales se encuentran dentro del intervalo de confianza correspondiente al valor

estimado para cada valor puntual de las variables independientes, se puede aceptar a los modelos desarrollados para predecir los valores del pH de la espinaca envasada en bolsas de OPP y LDPE respectivamente.

3.2.4 pH y Flora Aerobia Mesófila

La homeostasis, o estabilidad de los fluidos celulares internos (composición y volumen), es vital para la supervivencia y crecimiento de los microorganismos. Los procesos de conservación utilizados, serán efectivos cuando ellos superen, temporaria o permanentemente, las numerosas reacciones homeostáticas que los microorganismos desarrollan para resistir los esfuerzos a los que fueron sometidos (Alzamora, 1998).

Como ya se ha mencionado, el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos están fuertemente influenciados por el pH y el contenido de ácidos orgánicos del alimento.

Los microorganismos necesitan mantener su pH intracelular (pH_i) dentro de cierto rango muy estrecho y cercano a la neutralidad, para poder crecer, es decir, tratan de lograr homeostasis con respecto al valor de pH citoplasmático (Alzamora, 1997).

Cuando el pH externo disminuye, aumenta el requerimiento energético de mantenimiento de la célula microbiana: aumenta la actividad de ATPasa, la síntesis de nuevas proteínas, y la síntesis de aminofosfolípidos cargados positivamente que imparten a la superficie de la membrana celular una neta carga positiva, actuando como una barrera a los protones externos y controlando, de esta manera, su pH_i . (Alzamora, 1998)

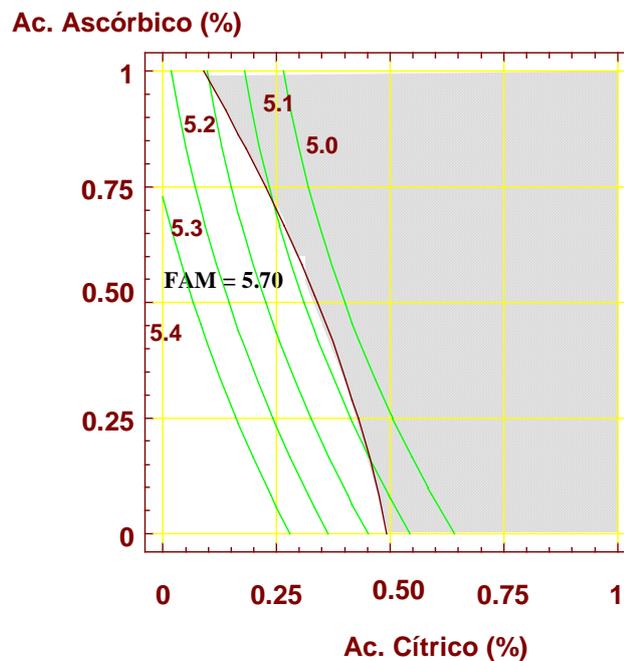
El valor de pH mínimo de crecimiento se alcanza cuando la velocidad de generación de energía es demasiado baja para permitir la síntesis de componentes celulares y la expulsión de protones. A valores de pH por debajo del mínimo de crecimiento, la célula muere o permanece dañada (Alzamora, 1997).

A continuación, se analizará la relación entre el pH de espinaca y la flora aerobia mesófila, a través de diferentes gráficas.

En la figura 3.9 se han superpuestos las gráficas de contornos para pH con la de flora aerobia mesófila, para el día 0. El área rayada indica las combinaciones de concentración de ácido cítrico y de ácido ascórbico que cumplen con lo estipulado por la legislación francesa a la fecha de elaboración, $FAM \leq 5.70$.

Se puede observar que las muestras de espinaca mínimamente procesadas tratadas con soluciones cuyas concentraciones se encuentran dentro del área de trabajo señalada, son aquellas cuyo pH inicial se reduce, por el tratamiento químico, desde un valor de 5.80 para la espinaca sin tratar ($c_C = c_A = 0.00$ %) a $pH \leq 5.2$ para las muestras tratadas químicamente.

Figura 3.9
Gráficas de contornos para pH y FAM
($t = 0$)



En la figura 3.10, se presentan las gráficas de contorno para el pH de espinaca mínimamente procesada envasada en bolsas de OPP y en bolsas de LDPE, en función de la concentración de ácido cítrico y el tiempo de conservación, para las concentraciones de ácido ascórbico de 0.00, 0.50 y 1.00 %, superpuestas con las gráficas de contorno para flora aerobia mesófila.

El área rayada de cada gráfica representa las condiciones de trabajo determinadas anteriormente en 3.1.4.

De esta manera, podemos estimar el valor de pH de espinaca mínimamente procesada al final de su vida útil, determinada por la condición $FAM = 7.70$.

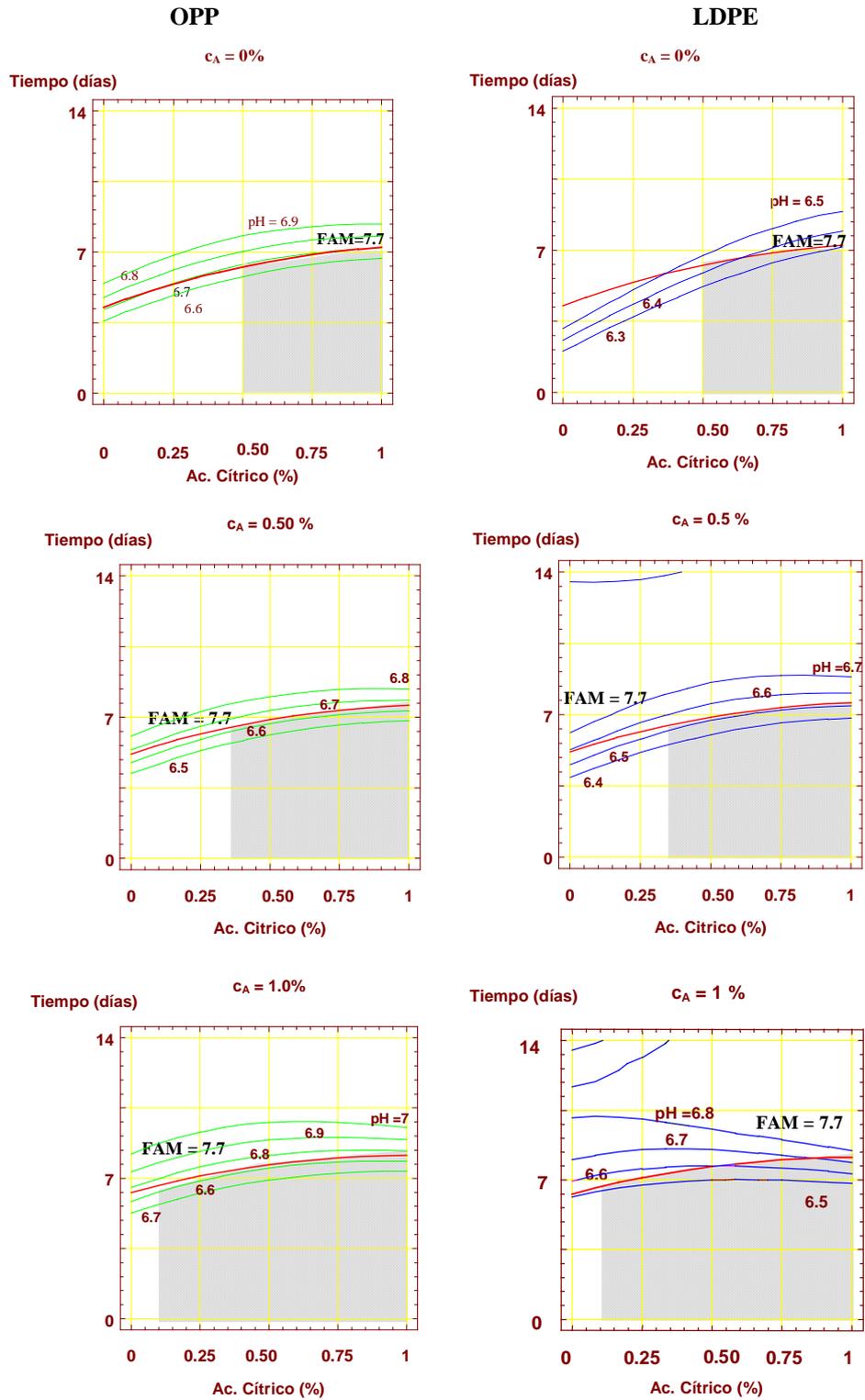
En la figura 3.11 vemos que para $c_A = 0.00$ %, los valores de pH de las muestras de espinaca a la fecha de vencimiento son $pH_{OPP} \leq 6.70$ y el $pH_{PE} < 6.50$. Para $c_A = 0.50$ %, el $pH_{OPP} < 6.70$ y el $pH_{PE} < 6.60$, y para $c_A = 1.00$ % el $pH_{OPP} < 6.80$ y el $pH_{PE} < 6.80$.

Como ya se mencionó, tanto los recuentos de flora aerobia mesófila como el pH de espinaca mínimamente procesada aumentaron durante el almacenamiento a 4 °C, para los 2 films utilizados.

Resultados similares se encontraron para zanahoria cortada en rodajas. El aumento del pH de zanahoria coincide con el aumento en los recuentos microbiológicos que podrían haber resultado en una mayor utilización de los ácidos orgánicos (Barry-Ryan, O'Beirne, 1998).

King et al. (1991) reportaron que el pH aumentó durante los 15 días de almacenamiento en lechuga mínimamente procesada, y este aumento fue paralelo al aumento en los recuentos microbiológicos.

Figura 3.10
Gráficas de contornos para pH y FAM
($c_A = \text{constante}$)



3.3 COMPOSICIÓN GASEOSA

El desarrollo de una atmósfera modificada en el interior de un envase depende, como ya se ha mencionado, de la interacción de numerosos factores. Entre ellos podemos citar la velocidad de respiración del producto envasado, la permeabilidad a los gases del material del envase, y la temperatura (Kader et al., 1989).

El uso satisfactorio de la tecnología del envasado en atmósfera modificada se basa fundamentalmente en conocer el tipo de atmósfera que es beneficiosa para un dado producto y luego seleccionar el correcto material de envase para crear tal atmósfera.

Para conocer la composición gaseosa óptima para un determinado producto es necesario realizar ensayos experimentales, ya que existe una amplia variabilidad en las respuestas, que dependen de numerosos factores, como el tipo de corte y cultivar del vegetal estudiado.

La composición gaseosa óptima para un determinado vegetal mínimamente procesado puede ser muy diferente de la óptima para el vegetal entero del que proviene, debido a los cambios fisiológicos que ocurren durante el procesamiento. La lechuga *Iceberg* cortada es un buen ejemplo de esto. La lechuga entera no tolera niveles elevados de CO₂, pero por el contrario, la lechuga cortada se envasa rutinariamente en una atmósfera con 10-15 % CO₂ para prevenir el amarronamiento de la superficie de corte (Gorny, 1997).

Los vegetales mínimamente procesados son extremadamente perecederos y más susceptibles al deterioro que los productos enteros de los cuales provienen. La composición gaseosa desarrollada en el interior del envase en combinación con un buen manejo de la temperatura, puede extender la vida útil de muchos vegetales mínimamente procesados por reducción de la pérdida de agua, velocidad de pérdida de la calidad sensorial y nutritiva, amarronamiento de la superficie de corte, velocidad de respiración, biosíntesis y acción de etileno así como también el desarrollo microbiológico.

A continuación, la tabla 3.17 presenta los resultados experimentales de la composición gaseosa desarrollada en los envases de espinaca mínimamente procesada envasada en bolsas de polipropileno monoorientado (OPP) y polietileno de baja densidad (LDPE), para los distintos ensayos realizados.

Tabla 3.17

Resultados experimentales para la composición gaseosa en los envases de espinaca

Número de Ensayo	Niveles de las variables			OPP		LDPE	
	X ₁ (C _C)	X ₂ (C _A)	X ₃ (t)	CO ₂ [ml/100ml]	O ₂ [ml/100ml]	CO ₂ [ml/100ml]	O ₂ [ml/100ml]
1	0	0	0	14.125	1.450	5.450	2.150
2	1	1	1	10.072	1.385	5.500	1.530
3	0	0	0	13.234	1.259	6.940	3.240
4	0	1	0	14.874	1.518	5.900	4.500
5	0	-1	-1	0.032	21.146	0.032	21.146
6	1	0	-1	0.050	21.506	0.050	21.506
7	-1	-1	1	9.058	1.560	4.976	2.268
8	0	0	1	11.405	3.679	4.253	3.658
9	0	0	0	12.865	1.205	5.940	2.240
10	-1	0	0	11.310	1.600	5.750	4.582
11	-1	1	-1	0.071	22.146	0.071	22.146
12	1	-1	0	14.402	1.190	5.535	4.430
13	0	1	-1	0.032	21.150	0.032	21.150
14	0	0	-1	0.0707	22.146	0.071	22.148
15	-1	1	1	11.053	1.756	4.000	4.119
16	-1	0	-1	0.032	21.146	0.032	21.146
17	0	-1	1	9.401	1.225	4.064	4.081
18	1	-1	-1	0.051	21.546	0.051	21.546
19	1	0	1	8.236	1.278	4.764	1.528
20	1	1	0	14.518	1.254	6.300	2.700
21	1	1	-1	0.032	21.150	0.032	21.150
22	-1	-1	0	14.303	1.190	4.855	4.865
23	0	1	1	10.145	1.678	4.700	1.300
24	0	-1	0	14.774	1.169	5.809	3.268
25	-1	1	0	16.291	1.155	5.290	3.012
26	1	-1	1	9.592	2.243	4.158	3.572
27	-1	-1	-1	0.052	21.546	0.052	21.546
28	1	0	0	12.250	1.245	5.925	2.280
29	-1	0	1	9.495	2.450	5.181	1.548

3.3.1 Efecto del tratamiento químico, tipo de envase y tiempo de conservación sobre la composición gaseosa

En primer lugar se realiza un análisis de variancia multifactorial para determinar el efecto de las cuatro variables estudiadas sobre las concentraciones de CO₂ y O₂.

Las tablas 3.18 y 3.19 presentan los resultados de los análisis de variancia para las concentraciones de CO₂ y O₂ respectivamente, donde:

X₁ (c_C)= Concentración de ácido cítrico

X₂ (c_A)= Concentración de ácido ascórbico

X₃ (t)= Tiempo de conservación refrigerada

X₄ (f)= Tipo de film

Tabla 3.18

Análisis de variancia multifactorial para %CO₂

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calc.
Efectos principales				
X ₁ (c _C)	0.43632	2	0.21816	0.420 ^{NS}
X ₂ (c _A)	3.48646	2	1.74323	3.359*
X ₃ (t)	929.62644	2	464.81322	895.82***
X ₄ (f)	273.44205	1	273.44205	526.997***
Interacciones				
X ₁ .X ₂	1.33578	4	0.333945	0.644 ^{NS}
X ₁ .X ₃	0.63965	4	0.159913	0.308 ^{NS}
X ₁ .X ₄	1.17139	2	0.585697	1.129 ^{NS}
X ₂ .X ₃	4.15210	4	1.038026	2.001 ^{NS}
X ₂ .X ₄	3.6684	2	1.834201	3.535*
X ₃ .X ₄	158.18216	2	79.091082	152.430***
Residuo	14.528326	28	0.5188688	

NS: no significativo; * significativo al 5%; ** significativo al 1%; *** significativo al 0.1%

Tabla 3.19

Análisis de variancia multifactorial para %O₂

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calc.
Efectos principales				
X ₁ (c _C)	1.4741	2	0.737	1.255 ^{NS}
X ₂ (c _A)	0.6247	2	0.3124	0.532 ^{NS}
X ₃ (t)	4399.1617	2	2199.5809	3743.96 ^{***}
X ₄ (f)	13.4077	1	13.4077	22.822 ^{***}
Interacciones				
X ₁ .X ₂	4.431737	4	1.1079344	1.886 ^{NS}
X ₁ .X ₃	0.9879	4	0.2469751	0.420 ^{NS}
X ₁ .X ₄	0.294603	2	0.1473017	0.251 ^{NS}
X ₂ .X ₃	0.994713	4	0.2486783	0.423 ^{NS}
X ₂ .X ₄	2.442484	2	1.2212418	2.079 ^{NS}
X ₃ .X ₄	12.308409	2	6.1542045	10.475 ^{***}
Residuo	16.450031	28	0.5875011	

NS: no significativo; * significativo al 5%; ** significativo al 1%; *** significativo al 0.1%

El análisis de variancia para las concentraciones de dióxido de carbono y oxígeno en el interior de los envases de espinaca mínimamente procesadas (tablas 3.18 y 3.19) indican que el tiempo de conservación y el material de envase utilizado influyen significativamente ($p < 0.001$) sobre la composición de la atmósfera interna. También resultó altamente significativa ($p < 0.001$) la interacción entre el tiempo de conservación refrigerada y el tipo de film (X₃.X₄).

El análisis de variancia para la concentración de CO₂ indica que la concentración de ácido ascórbico resultó significativa ($p < 0.05$) al igual que la interacción entre la concentración de ácido ascórbico y el tipo de film utilizado (X₂.X₄), esto señalaría que el efecto de la c_A sobre % CO₂ sería diferente para cada uno de los films utilizados.

Por lo tanto, se propone modelar el efecto de la c_C, la c_A y el tiempo de conservación sobre las concentraciones de CO₂ y O₂ en el interior de las bolsas de espinaca mínimamente procesada envasada en OPP y LDPE.

3.3.2 Modelos para las concentraciones de CO₂ y O₂

En primer lugar, se comprobó la idoneidad de los modelos elegidos con los tests de diagnósticos basados en los residuos. Los tests de diagnósticos se presentan en el Anexo en las Figuras 5.5 y 5.6 para la concentración de CO₂ y de O₂ en los envases de OPP, respectivamente; y en las figuras 5.7 y 5.8 para % CO₂ y % O₂ en los envases de LDPE, respectivamente. Como puede verse, no existen transgresiones severas a las suposiciones de homogeneidad de la variancia (figuras 5.5 a, 5.6 a, 5.7 a, 5.8 a), independencia de los errores (figuras 5.5 b, 5.6 b, 5.7 b, 5.8 b), y normalidad de los errores (figuras 5.5 c, 5.6 c, 5.7 c, 5.8 c). Por lo tanto, se puede aplicar el análisis de variancia a los modelos propuestos para las concentraciones de CO₂ y O₂ en el interior de los envases de OPP y LDPE (Tablas 3.20 y 3.21).

Tabla 3.20
Análisis de variancia para los modelos propuestos para % CO₂ y % O₂ en OPP

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	
		% CO ₂	% O ₂
Modelo	9	989.924***	2467.08***
X ₁ (c _C)	1	0.33598 ^{NS}	0.17012 ^{NS}
X ₂ (c _A)	1	1.63486 ^{NS}	0.0786 ^{NS}
X ₃ (t)	1	430.55464***	1725.32518***
X ₁ . X ₂	1	0.97749 ^{NS}	0.31674 ^{NS}
X ₁ . X ₃	1	0.23637 ^{NS}	0.00417 ^{NS}
X ₂ . X ₃	1	0.86354 ^{NS}	0.01453 ^{NS}
X ₁ ²	1	12.48060**	8.70341***
X ₂ ²	1	0.00771 ^{NS}	4.39070***
X ₃ ²	1	542.83296***	728.14368***
Residuo	19	16.39800	5.11654
Falta de ajuste	17	15.55878 ^{NS}	5.0834 ^{NS}
Error puro	2	0.83921	0.0331
Coef. Determinación (R ²)		0.98371	0.99793

NS: no significativo; * significativo al 5%; ** significativo al 1%, *** significativo al 0.1%

Tabla 3.21

Análisis de variancia para los modelos propuestos para % CO₂ y % O₂ en LDPE

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	
		% CO ₂	% O ₂
Modelo	9	177.224***	2123.90***
X ₁ (c _C)	1	0.24713 ^{NS}	1.38295 ^{NS}
X ₂ (c _A)	1	0.29221 ^{NS}	1.45426 ^{NS}
X ₃ (t)	1	94.18503***	1603.19814***
X ₁ . X ₂	1	0.56798 ^{NS}	1.89224 ^{NS}
X ₁ . X ₃	1	0.00681 ^{NS}	0.03733 ^{NS}
X ₂ . X ₃	1	0.08361 ^{NS}	0.84360 ^{NS}
X ₁ ²	1	1.40184*	8.45802**
X ₂ ²	1	2.24105**	13.5102***
X ₃ ²	1	78.19821***	493.12692***
Residuo	19	3.7395	16.5462
Falta de ajuste	17	2.58611 ^{NS}	15.8141 ^{NS}
Error puro	2	1.1534	0.7321
Coef. Determinación (R ²)		0.97934	0.99237

NS: no significativo; * significativo al 5%; ** significativo al 1%, *** significativo al 0.1%

Los análisis de variancia correspondientes a los modelos propuestos para %CO₂ y %O₂ en los envases de OPP (tabla 3.20) muestran que ambos modelos de predicción son altamente significativos (p<0.001).

Los tests F para las faltas de ajuste de los dos modelos no son significativas (p>0.05), y a través de los valores de los coeficientes de determinación (R²) se puede observar que el modelo para %CO₂ en bolsas de OPP explica el 98.37% de la variabilidad de los datos y el modelo para %O₂ en bolsas de OPP explica el 99.79%.

Las ecuaciones de 2^{do} orden propuestas como modelos para la composición gaseosa en el interior de los envases de OPP son:

$$\% \text{CO}_2 = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_3 \cdot X_3 + b_{11} \cdot X_1^2 + b_{22} \cdot X_2^2 + b_{33} \cdot X_3^2 + b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + b_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + b_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 \text{ Ec.3.4}$$

$$\% O_2 = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_3 \cdot X_3 + b_{11} \cdot X_1^2 + b_{22} \cdot X_2^2 + b_{33} \cdot X_3^2 + b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + b_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + b_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 \text{ Ec.3.5}$$

A partir de los análisis de variancia para los modelos propuestos para %CO₂ y %O₂ en los envases de LDPE (tabla 3.21) puede verse que los dos modelos de predicción desarrollados resultaron altamente significativos (p<0.001).

Los tests F para las faltas de ajuste, que miden la falla de los modelos en representar los datos en el dominio experimental, son no significativas (p>0.05).

Los coeficientes de determinación (R²) indican que el 97.93% y 99.23% de la variabilidad de los datos experimentales es tomada en cuenta por los modelos propuestos para %CO₂ y %O₂ en bolsas de LDPE, respectivamente.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores se pueden aceptar los modelos propuestos para representar los cambios en la composición gaseosa en los envases de LDPE de espinaca mínimamente procesada.

Las ecuaciones de 2^{do} orden propuestas como modelos para la composición gaseosa en el interior de los envases de LDPE son:

$$\% CO_2 = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_3 \cdot X_3 + b_{11} \cdot X_1^2 + b_{22} \cdot X_2^2 + b_{33} \cdot X_3^2 + b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + b_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + b_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 \text{ Ec.3.6}$$

$$\% O_2 = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_3 \cdot X_3 + b_{11} \cdot X_1^2 + b_{22} \cdot X_2^2 + b_{33} \cdot X_3^2 + b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + b_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + b_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 \text{ Ec.3.7}$$

donde b₀, b_i y b_{ij} son los coeficientes y X_i son las variables codificadas

Los subíndices de los coeficientes o variables codificadas indican 1: concentración de ácido cítrico; 2: concentración de ácido ascórbico; y 3: tiempo de conservación refrigerada.

Los coeficientes de los modelos de 2^{do} orden propuestos para la concentración de CO₂ y O₂ en las bolsas de espinaca envasadas en OPP y LDPE se presentan en la tabla 3.22.

Tabla 3.22
Valores de los coeficientes de las ecuaciones de 2^{do} orden
para % CO₂ y % O₂ en los envases de OPP y LDPE

Coeficientes	Bolsas de OPP		Bolsas de LDPE	
	% CO ₂	% O ₂	% CO ₂	% O ₂
b₀	13.592	1.5248	5.9097	3.117
b₁	-0.1366	-0.0972	0.1172	-0.277
b₂	0.3014	0.0209	0.1274	-0.284
b₃	4.8908	-9.790	2.2875	-9.438
b₁₁	-0.371	-0.1002	-0.0124	0.0102
b₂₂	0.943	-0.324	-0.2064	0.486
b₃₃	-9.036	10.465	-3.4295	8.612
b₁₂	-0.2854	-0.1625	0.2176	-0.397
b₁₃	-0.1404	-0.0187	0.0238	-0.0558
b₂₃	0.2683	-0.0348	0.0835	-0.265

Los análisis de variancia correspondientes a los modelos propuestos para la composición gaseosa desarrollada en los envases de polipropileno (OPP) indican que el factor que más influye sobre la concentración de CO₂ y O₂ es el tiempo de conservación (P<0.001). También resulta altamente significativo, para ambas concentraciones, el término cuadrático correspondiente al tiempo (X₃²). Para la concentración de O₂ también resulta significativo (p<0.001) el término cuadrático correspondiente a la concentración de ácido ascórbico (X₂²).

En la figura 3.11, se presentan las gráficas de superficie de respuesta para las concentraciones de CO₂ y O₂ en las bolsas de OPP, en función del tiempo y la concentración de ácido cítrico, para c_A = 0.50 %.

Puede observarse que la concentración de CO₂ aumenta durante el tiempo de almacenamiento desde una concentración inicial de 0.032%, que es la concentración de CO₂ en el aire, hasta una concentración de 13.59 % a los 7 días, para luego disminuir a

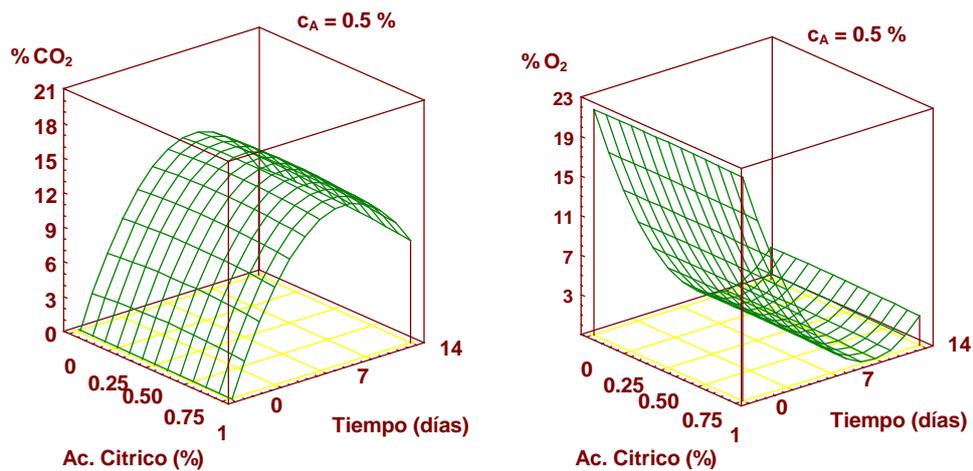
9.45% a los 14 días, para $c_C = c_A = 0.50\%$, de acuerdo al modelo de predicción desarrollado.

Otros autores también han reportado un comportamiento similar de la concentración de dióxido de carbono en el interior de los envases de otros productos vegetales. Piagentini et al.(1997) encontraron que la concentración de CO_2 aumentó a 12.00 % durante los primeros 4 días de almacenamiento a 4 °C, para luego disminuir a 7.40% a los 10 días, en el interior de las bolsas de OPP de repollo mínimamente procesado. Rij y Stanley (1987) indicaron que el % CO_2 en los envases de brócoli envueltos en PVC almacenados a 5°C, aumentó a 11.00-12.00% durante los dos primeros días y luego disminuyó hasta un nivel de equilibrio del 9.00%.

La concentración de O_2 disminuye de 21% (concentración O_2 en aire) a 1.52% a los 7 días, y 2.20% a los 14 días, para $c_C = c_A = 0.50\%$, de acuerdo al modelo de predicción desarrollado. De todas maneras, no existen diferencias significativas entre los valores de las concentraciones de oxígeno después de los 7 días de almacenamiento a 4 °C.

Figura 3.11

***Graficos de Superficie de respuesta para % CO_2 y % O_2 en bolsas de OPP
($c_A = 0.50\%$)***



Los ANOVA correspondientes a los modelos propuestos para la composición gaseosa en el interior de las bolsas de LDPE de espinaca mínimamente procesada, indican que el tiempo de conservación refrigerada influye significativamente ($p < 0.001$) sobre las concentraciones de CO_2 y O_2 , similarmente a lo encontrado en las bolsas de OPP. También resultó altamente significativo el término cuadrático correspondiente al tiempo (X_3^2).

A diferencia de lo encontrado para $\% \text{CO}_2$ en OPP, el término cuadrático correspondiente a la concentración de ácido ascórbico resultó significativo ($p < 0.01$) para la concentración de CO_2 en los envases de LDPE, de mayor permeabilidad a los dos gases que el OPP.

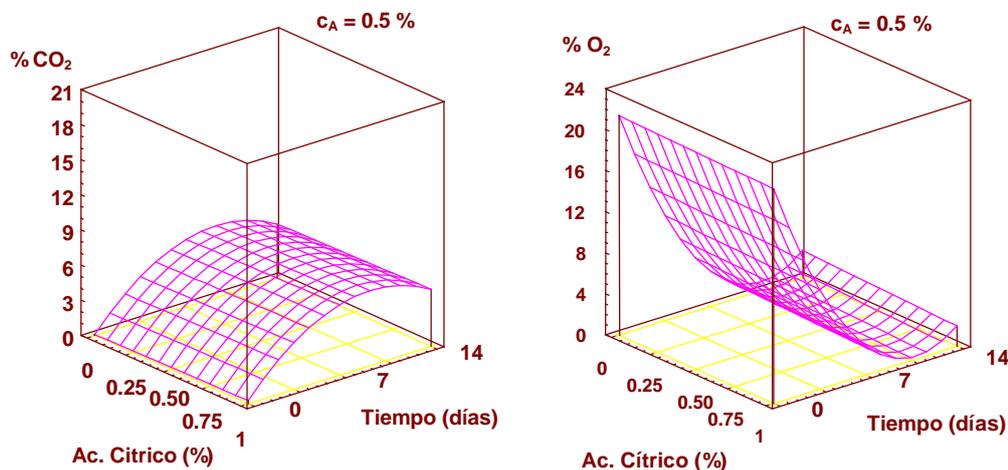
Berger et al. (1997) envasaron lechuga mínimamente procesada, tratada con una solución de 1.00% de ácido ascórbico, en bolsas con diferentes permeabilidades. De los resultados obtenidos, también encontraron que el ácido ascórbico afectó las concentraciones de CO_2 y O_2 cuando se utilizaron las bolsas de mayor permeabilidad a ambos gases. Sin embargo, para zanahoria en rodajas tratadas con una solución de 1.00% de ácido ascórbico, se determinó que éste no afectó las concentraciones de O_2 ó CO_2 en ninguno de los envases estudiados (Galetti et al., 1997).

En la figura 3.12 se presentan los gráficos de superficie de respuestas para las concentraciones de CO_2 y O_2 en las bolsas de LDPE, en función de la concentración de ácido cítrico y el tiempo, para una concentración de ácido ascórbico de 0.50%.

De manera similar a lo encontrado en los envases de OPP, la concentración de CO_2 aumenta durante los primeros 7 días de almacenamiento, pero alcanzando una concentración de 5.88 %, para disminuir a 4.75 % luego de 14 días, para $c_C = c_A = 0.50\%$, de acuerdo al modelo de predicción desarrollado.

Figura 3.12

***Graficos de Superficie de respuesta para % CO₂ y % O₂ en bolsas de LDPE
(c_A = 0.50%)***



En la figura 3.12, se ve que la concentración de O₂ disminuye durante el almacenamiento a 4°C, alcanzando una concentración de 3.12 % a los 7 días y de 2.29 % a los 14 días, para c_C = c_A = 0.50%, de acuerdo al modelo de predicción desarrollado. Con un nivel de confianza del 95%, se puede decir que la concentración de oxígeno no se modifica significativamente a partir de los 7 días de almacenamiento refrigerado.

Los tratamientos químicos pueden alterar los complejos mecanismos respiratorios de los vegetales frescos. Se ha encontrado que los tratamientos con soluciones de ácido cítrico estimularon el proceso respiratorio en semillas de ricino (Chen, Peng; 1980b). Cuando se investigó la actividad de la mitocondria de manzana frente a la adición de varios ácidos orgánicos, se observó que después del agregado de los ácidos cítrico, málico o succínico hubo una estimulación en el consumo de oxígeno (Ulrich, 1970).

De los resultados obtenidos, podemos decir que los tratamientos químicos aplicados a la espinaca no produjeron modificaciones muy significativas a las concentraciones de dióxido de carbono y oxígeno desarrolladas en el interior de los envases de OPP y LDPE.

Comparando la composición gaseosa alcanzada en los dos envases ensayados, vemos que se obtuvieron concentraciones superiores de CO₂ e inferiores de O₂ en las bolsas de polipropileno monoorientado, como resultado de su menor permeabilidad a los gases.

Los efectos beneficiosos del envasado en atmósfera modificada pueden revertirse si las concentraciones de O₂ son demasiado bajas o los niveles de CO₂ son demasiados altos. Por ejemplo, el aumento de la concentración de CO₂ hasta el 13% causó una rápida disminución en el contenido de ácido ascórbico y desarrollo de *off-odors* en espinaca almacenada a 7 °C (McGill et al., 1966). Atmósferas con baja concentración de oxígeno pueden ser efectivas en reducir la velocidad de respiración, pero si la concentración de O₂ cae por debajo del punto de extinción (el nivel crítico de O₂ al cual la producción de CO₂ es mínima), la atmósfera modificada podría tener efectos indeseables debido a la respiración anaeróbica (Ko et al., 1996).

Ko et al. (1996) determinaron que el punto de extinción para hojas enteras de espinaca fue menor de 0.40 % pero mayor de 0.20 % O₂ a 0 y 5°C. También reportaron que la velocidad de respiración de espinaca era menor en atmósferas con menor concentración de oxígeno y a menor temperatura. Indicaron que la velocidad de respiración de las hojas de espinaca mantenidas a 5°C en una atmósfera con 0.80 % de O₂ fue aproximadamente igual a la velocidad de respiración de las hojas mantenidas en aire a 0°C. Así, el uso de bajas concentraciones de O₂ (0.80%) bajo condiciones controladas podría, al menos parcialmente, compensar la exposición de la espinaca envasada a temperaturas de almacenamiento de 5°C. En cuanto al deterioro de las hojas de espinaca, informaron que se redujo de 30 a 54 % cuando la concentración de O₂ se reduce al 0.80%. Por lo tanto, la concentración de O₂ podría disminuirse hasta 0.80% en los envases de atmósfera modificada sin pérdida de la calidad debido a la respiración anaeróbica, siempre que la temperatura de almacenamiento no exceda los 5 °C y el % CO₂ no sea excesivo.

También se debe tener en cuenta que el efecto de las atmósferas modificadas puede ser distinto para las distintas temperaturas de almacenamiento. Izumi et al. (1997) han estudiado el efecto del almacenamiento en aire y en atmósferas de baja concentración de O₂ (0.50;1.00 y 2.00 %) a 0; 10 y 20 °C sobre la calidad de hojas de espinaca. Encontraron que la velocidad de respiración y la pérdida de ácido ascórbico en las hojas de espinaca

mantenidas en aire fue mayor a medida que aumentó la temperatura de almacenamiento. Las atmósferas con baja concentración de oxígeno redujeron la velocidad de respiración en las hojas almacenadas a 10 y 20 °C, siendo mayor el efecto a 20 que a 10°C, pero este efecto beneficioso no se encontró en las hojas de espinaca mantenidas a 0°C.

Namesny (1993) considera que la atmósfera más idónea para envasar hojas de espinaca es 7.00-10.00 % O₂ con 5.00-10.00 % CO₂ con una temperatura de 0-5 °C. Por otra parte, Gorny (1997) recomienda para espinaca fresca lavada una atmósfera con una concentración de O₂ de 0.80-3.00 % y de 8.00-10.00 % CO₂, ya que a concentraciones de O₂ inferiores a 0.40 % se producen olores y sabores desagradables, y por encima del 13 % de CO₂ se produce un rápido decaimiento.

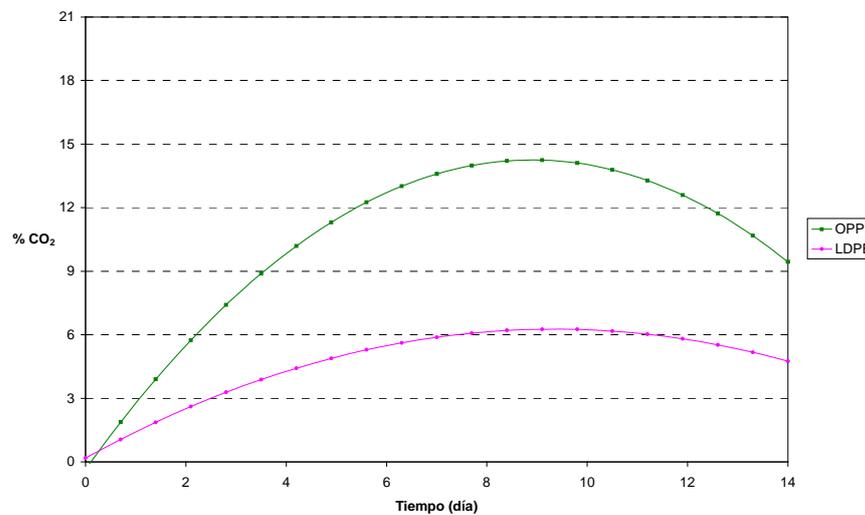
Teniendo en cuenta las condiciones de trabajo determinadas en el inciso 3.1.4, y considerando el recuento de FAM = 7.70 como determinante de la vida útil, se podría determinar a través de los modelos de predicción desarrollados, cuáles serían las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono alcanzadas.

Por ejemplo, si se considera una concentración de ácido cítrico de 0.35% y una concentración de ácido ascórbico de 0.50%, la vida útil estimada fue de aproximadamente 6 días ($X_3 = -0.0786$). Para dichas condiciones, y utilizando las ecuaciones 3.4 y 3.5, las concentraciones en el envase de OPP son de 13.16%CO₂ y 2.38 % O₂. Para la misma solución de ácido cítrico y ácido ascórbico, las concentraciones obtenidas en los envases de LDPE, utilizando las ecuaciones 3.6 y 3.7, son 5.67 %CO₂ y 4.00% O₂.

Si se aumenta la concentración de ácido cítrico a 1.00 % y se mantiene la de ácido ascórbico en 0.50%, el tiempo de vida útil estimado sería de casi 8 días ($X_3 = 0.0857$). Para esas condiciones se obtiene 13.43 %CO₂ y 0.56 % O₂ en los envases de OPP, y 6.19 % CO₂ y 2.10 % O₂ en los envases de LDPE.

Figura 3.13
Concentración de CO₂ en envases de OPP y LDPE

$$(c_C = c_A = 0.50\%)$$



De los resultados obtenidos, y observando la figura 3.13, se puede ver que para un tiempo de 6 a 8 días, que es el tiempo de vida útil estimado con anterioridad para el límite de FAM = 7.70, la concentración de CO₂ alcanzada en los envases de OPP supera el 10 % recomendado y aún el 13 % que se indica como límite a partir del cual se desarrollan olores y sabores desagradables. Por otro lado, para algunas de las combinaciones de concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico podrían obtenerse concentraciones de O₂ en el interior de los envases de OPP inferior al 0.80% recomendado.

Por otra parte, si se analizan los valores obtenidos en los envases de polietileno para los tiempos de vida útil estimados para espinaca mínimamente procesada, considerando el límite de FAM = 7.70, se puede ver que nunca se superan las concentraciones límites recomendadas de CO₂ y O₂ para espinaca.

3.3.3 Verificación de los modelos para las concentraciones de CO₂ y O₂

Las condiciones experimentales para la verificación de los modelos de predicción de las concentraciones de CO₂ y O₂, se fijaron en $c_C = 0.20\%$, $c_A = 1.00\%$ y $t = 7$ y 14 días.

En la Tabla 3.22 se presentan los valores predichos (Y_k), los intervalos de confianza correspondientes con una probabilidad del 95%, los valores experimentales (y_k) y los errores porcentuales de cada uno de los valores estimados con los modelos de predicción

desarrollados para la composición gaseosa en el interior de los envases de espinaca $[100 \cdot (y_k - Y_k) / y_k]$.

Tabla 3.23
Valores predichos y experimentales para la verificación de los modelos para la composición gaseosa para $c_C=0.20\%$ y $c_A= 1.00\%$

Film	Compuesto	t [día]	Concentración n Modelo [ml/100ml]	Intervalo de confianza	Concentración Experimental [ml/100ml]	Error [%]
OPP	CO ₂	7	14.96	[14.01;15.90]	15.22	1.783
		14	11.16	[9.99;12.34]	10.11	-10.437
	O ₂	7	1.34	[0.82;1.87]	1.31	-2.574
		14	1.99	[1.34;2.65]	2.37	15.923
LDPE	CO ₂	7	5.63	[5.16;6.08]	5.70	1.31
		14	4.55	[3.84;5.26]	5.23	12.954
	O ₂	7	3.73	[2.78;4.68]	4.50	17.17
		14	2.67	[1.49;3.85]	1.95	-36.94

En la tabla 3.23, se puede observar que la amplitud de los intervalos de confianza se hace cada vez más grande a medida que el valor de la variable independiente t se aleja de su valor medio, t = 7 días (Montgomery, 1991; Bowker, Lieberman, 1985). Esto hace que, a pesar de obtenerse mayores errores porcentuales, los valores experimentales en el día 14 se encuentren dentro del intervalo de confianza estimado. Por lo tanto, como todos los valores experimentales de las concentraciones de CO₂ y O₂ se encuentran dentro del intervalo de confianza correspondiente al valor estimado para cada valor puntual de las variables independientes, se pueden aceptar los modelos propuestos.

3.3.4 Composición gaseosa y Flora Aerobia Mesófila

La composición de la atmósfera a la cual los microorganismos son expuestos puede tener un profundo efecto sobre su actividad, crecimiento y supervivencia. Como ya se ha analizado en la sección 3.1.1, en la presente tesis no se obtuvieron diferencias significativas

entre los recuentos microbiológicos de espinaca mínimamente procesada envasada en bolsas de OPP y LDPE, a pesar de la diferencia que existe en la composición atmosférica desarrollada en ambos envases a 4 °C. Se podría inferir que ambas atmósferas ejercen el mismo efecto sobre el desarrollo de la flora aerobia mesófila.

Barriga et al. (1991) tampoco encontraron diferencias significativas entre los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos en lechuga cortada, almacenada a 4 °C durante 12 días en diferentes atmósferas: aire, 3 %O₂, (3 %O₂ + 5 %CO₂) ó (3 %O₂ + 10%CO₂). Sin embargo, las muestras almacenadas en (3 %O₂ + 10 %CO₂) mantuvieron su calidad visual a pesar de los altos recuentos microbiológicos. Los autores sugirieron que las altas concentraciones de CO₂ podrían controlar la actividad de los microorganismos sin afectar apreciablemente el desarrollo microbiológico.

McGill et al. (1966) compararon el efecto del envasado de espinaca en aire y en una atmósfera de 9.5% CO₂ y 3.3% O₂ a 1 y 7 °C sobre los recuentos de microorganismos aerobios. Encontraron que tanto la temperatura como la composición de la atmósfera afectaron los recuentos microbiológicos. También informaron que las muestras envasadas en la atmósfera de 9.5% CO₂ y 3.3% O₂ tuvieron recuentos menores que las muestras envasadas en aire a la misma temperatura.

Similarmente, Babic y Watada (1996) estudiaron el efecto del envasado en atmósferas controladas (0.8% O₂ y 0.8% O₂+10% CO₂) a 5 y 10 °C sobre los recuentos microbiológicos en hojas de espinaca. Se encontró que las poblaciones de microorganismos aumentaron durante los 7 días de almacenamiento en aire y en atmósfera controlada a 5 y 10 °C. Las atmósferas con bajas concentraciones de oxígeno, sola o en combinación con altas concentraciones de CO₂, redujeron el número de microorganismos aerobios mesófilos y psicrótrofos sobre hojas de espinaca en 10-100 veces comparada con aire a 5 °C, pero no tuvieron efecto a 10 °C. Nguyen-the y Carlin (1994) también reportaron que concentraciones de CO₂ más altas que la atmosférica reducen significativamente el desarrollo de bacterias mesófilas sobre hojas de achicoria a 2 y 6 °C, pero no tuvo efecto a 10 °C. También se encontró que atmósferas enriquecidas en dióxido de carbono tuvieron un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de microorganismos aerobios en brócoli mantenido a 4°C (Babic, Watada; 1996).

Babic y Watada (1996) encontraron que la atmósfera controlada (0.8% O₂ y 0.8% O₂+10% CO₂) usada en hojas de espinaca tuvo un mayor efecto inhibitorio sobre *Pseudomonadaceae* que sobre *Enterobacteriaceae* y *Micrococcaceae*. También encontraron que el efecto inhibitorio de la atmósfera controlada sobre los microorganismos no se debía a una acidificación del tejido interno, sino probablemente a la disminución de la disponibilidad de O₂. El factor limitante sobre el crecimiento de microorganismos aerobios sobre hojas de espinaca a 5°C parecería ser la baja concentración de O₂ más que la alta concentración de CO₂.

El crecimiento de bacterias anaerobias patógenas como *Clostridium botulinum* puede ocurrir en algunas hortalizas frescas cuando se disminuye la concentración de O₂ a temperaturas altas (Gorny, 1997). Por lo tanto una atmósfera con baja concentración de oxígeno podría usarse para controlar el desarrollo microbiológico en espinaca fresca solamente si la temperatura de almacenamiento no excede los 5 °C (Babic, Watada; 1996).

3.3.5 Composición gaseosa y pH

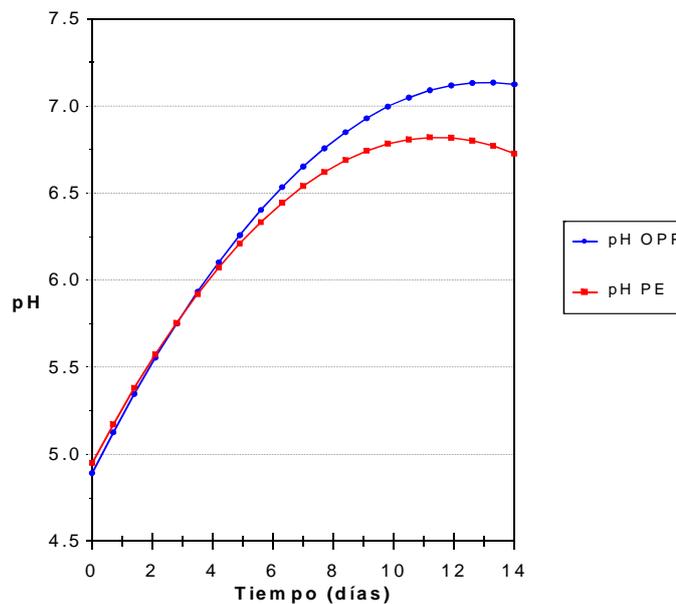
Uno de los mecanismos a través del cual podría actuar el CO₂ desarrollado en el interior de los envases, sería por acidificación de las células. Nguyen-the y Carlin (1994) indican que durante la exposición de lechuga a 15% de CO₂, se observó una disminución del pH de 0.1 en las vacuolas y de 0.4 en el citoplasma.

Contrariamente a lo esperado, el pH de la espinaca envasada en OPP es mayor al de la envasada en LDPE, donde la concentración de CO₂ es menor (figura 3.14).

Resultados similares fueron encontrados por Burgheimer et al. (1967). Reportaron que el pH de la espinaca aumentó por encima de 7 en almacenamiento en atmósfera controlada (9.2 %CO₂+4.0 %O₂), mientras el almacenamiento en aire causó solamente un ligero aumento en el pH. A 1°C, el pH cambió cerca de una unidad en atmósfera controlada después de 8-9 días, mientras en aire solamente aumentó 0.2. A 7 °C, el pH cambió 0.5-0.6 unidades en atmósfera controlada, mientras en aire se encontró un aumento solamente de 0.1 unidad.

Pantástico (1979) reportó que, para espárragos y brócoli almacenados a altas concentraciones de CO₂ y bajas de O₂, el pH aumentaba progresivamente con el incremento de la concentración de CO₂ en la atmósfera y paralelamente se observó una disminución en la acidez titulable.

Figura 3.14
Gráfica de pH para los dos tipos de envases
($c_C = c_A = 0.5\%$)



Burgheimer et al. (1967) sugiere que la composición de la atmósfera de almacenamiento podría causar una alteración en el metabolismo de los vegetales, modificando probablemente la composición de los ácidos orgánicos presentes. Por ejemplo, se observó que en duraznos almacenados en atmósfera controlada a 1°C, se acumulaba ácido succínico mientras los ácidos málicos y cítricos disminuían gradualmente durante el almacenamiento.

3.4 EVALUACIÓN SENSORIAL

Las tablas 3.24 y 3.25 muestran los resultados experimentales de la evaluación sensorial de espinaca mínimamente procesada envasada en bolsas de OPP y LDPE para los distintos ensayos experimentales, respectivamente.

Tabla 3.24
Resultados experimentales para la evaluación sensorial de espinaca mínimamente procesada envasada en bolsas de OPP

Número de Ensayo	Niveles de las variables codificadas			Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅
	X ₁ (C _C)	X ₂ (C _A)	X ₃ (t)	(Off-odors)	(Ap. Gral)	(Marchitamiento)	(Amarronamiento)	(Color)
1	0	0	0	8.50	8.20	8.20	7.90	8.20
2	1	1	1	5.80	4.00	6.60	5.00	6.00
3	0	0	0	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
4	0	1	0	8.00	6.40	7.80	7.20	8.30
5	0	-1	-1	9.00	8.60	8.70	8.80	8.80
6	1	0	-1	8.70	8.50	8.70	8.40	9.00
7	-1	-1	1	6.00	7.50	7.94	7.88	7.50
8	0	0	1	6.00	6.75	7.13	7.50	6.25
9	0	0	0	9.00	9.00	9.00	7.00	9.00
10	-1	0	0	8.00	8.40	8.60	8.60	8.30
11	-1	1	-1	9.00	8.80	9.00	8.80	9.00
12	1	-1	0	6.50	8.25	8.00	8.38	8.25
13	0	1	-1	9.00	9.00	8.60	8.70	9.00
14	0	0	-1	8.80	9.00	9.00	9.00	9.00
15	-1	1	1	5.00	5.13	6.50	5.38	6.88
16	-1	0	-1	8.80	8.80	8.80	8.70	8.70
17	0	-1	1	5.33	5.13	6.50	5.75	7.38
18	1	-1	-1	9.00	9.00	8.80	8.60	8.80
19	1	0	1	5.00	5.38	6.63	6.50	6.00
20	1	1	0	7.00	6.00	7.50	6.50	8.00
21	1	1	-1	8.80	8.50	9.00	8.50	8.80
22	-1	-1	0	7.75	8.75	8.40	8.55	8.14
23	0	1	1	5.50	4.00	6.30	5.50	6.00
24	0	-1	0	7.00	8.00	8.00	8.13	7.75
25	-1	1	0	5.50	7.13	7.25	7.25	7.88
26	1	-1	1	5.67	6.25	7.13	6.75	6.88
27	-1	-1	-1	9.00	8.50	9.00	9.00	8.50
28	1	0	0	7.33	7.20	8.10	7.00	8.00
29	-1	0	1	5.00	7.38	7.88	7.75	7.13

Tabla 3.25
Resultados experimentales para la evaluación sensorial de espinaca mínimamente procesada envasada en bolsas de LDPE

Número de Ensayo	Niveles de las variables codificadas			Y ₁ (Off-odors)	Y ₂ (Ap. Gral)	Y ₃ (Marchitamiento)	Y ₄ (Amarronamiento)	Y ₅ (Color)
	X ₁ (C _C)	X ₂ (C _A)	X ₃ (t)					
1	0	0	0	8.50	8.60	8.70	8.40	8.00
2	1	1	1	6.67	4.40	6.90	6.00	6.30
3	0	0	0	8.00	9.00	8.00	9.00	8.00
4	0	1	0	7.80	6.40	8.00	7.50	7.90
5	0	-1	-1	9.00	8.60	8.70	8.80	8.80
6	1	0	-1	8.70	8.50	8.70	9.00	9.00
7	-1	-1	1	7.44	6.80	7.50	7.50	7.08
8	0	0	1	7.00	6.10	7.00	7.30	6.38
9	0	0	0	9.00	8.00	9.00	8.00	9.00
10	-1	0	0	8.67	8.40	8.30	8.20	8.10
11	-1	1	-1	9.00	8.80	9.00	8.80	9.00
12	1	-1	0	8.67	8.00	8.00	8.10	8.13
13	0	1	-1	9.00	9.00	8.60	8.70	9.00
14	0	0	-1	8.80	9.00	9.00	9.00	9.00
15	-1	1	1	8.00	7.60	8.25	7.30	7.63
16	-1	0	-1	8.80	8.80	8.80	8.70	8.70
17	0	-1	1	8.00	7.40	7.38	7.50	7.75
18	1	-1	-1	9.00	9.00	8.80	8.60	8.80
19	1	0	1	7.00	5.30	6.25	6.80	5.75
20	1	1	0	6.80	6.20	7.60	6.60	7.60
21	1	1	-1	8.80	8.50	9.00	8.50	8.80
22	-1	-1	0	8.83	8.40	8.43	8.60	8.07
23	0	1	1	6.33	4.30	6.50	5.80	6.00
24	0	-1	0	9.00	7.60	8.25	8.30	8.13
25	-1	1	0	8.00	7.50	7.75	7.50	8.00
26	1	-1	1	8.50	7.80	8.00	7.50	7.50
27	-1	-1	-1	9.00	8.50	9.00	9.00	8.50
28	1	0	0	8.00	7.50	8.00	7.00	8.30
29	-1	0	1	7.00	6.60	7.75	7.50	7.00

3.4.1 Efecto del tratamiento químico, tipo de envase y tiempo de conservación sobre los atributos sensoriales

En primer lugar se realiza un análisis de variancia multifactorial para determinar el efecto de las cuatro variables estudiadas sobre los atributos sensoriales analizados.

La tabla 3.25 presenta los resultados del análisis de variancia para los 5 atributos sensoriales evaluados, donde:

X_1 (c_C)= Concentración de ácido cítrico

X_2 (c_A)= Concentración de ácido ascórbico

X_3 (t)= Tiempo de conservación refrigerada

X_4 (f)= Tipo de film

Tabla 3.26

Análisis de variancia multifactorial para los atributos sensoriales

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados				
		Y ₁ (Off-odors)	Y ₂ (Ap. Gral)	Y ₃ (Marchitam.)	Y ₄ (Amarrona.)	Y ₅ (Color)
Efectos Principales						
X ₁ (c_C)	2	0.6037 ^{NS}	5.4439 ^{***}	1.3989 ^{**}	3.1297 ^{***}	0.4921 [*]
X ₂ (c_A)	2	2.1001 [*]	13.0481 ^{***}	1.3048 ^{**}	7.5697 ^{***}	0.6994 [*]
X ₃ (t)	2	56.3181 ^{***}	69.2657 ^{***}	26.8964 ^{***}	35.7608 ^{***}	40.5782 ^{***}
X ₄ (f)	1	11.8817 ^{***}	0.4630 ^{NS}	0.3136 ^{NS}	0.5571 ^{NS}	0.0115 ^{NS}
Interacciones						
X ₁ .X ₂	4	0.4012 ^{NS}	4.2919 [*]	0.7912 ^{NS}	1.1128 ^{NS}	0.6107 ^{NS}
X ₁ .X ₃	4	1.1476 ^{NS}	3.7439 [*]	1.4472 [*]	1.2023 ^{NS}	1.6628 ^{**}
X ₁ .X ₄	2	0.5362 ^{NS}	0.0345 ^{NS}	0.0338 ^{NS}	0.0557 ^{NS}	0.0042 ^{NS}
X ₂ .X ₃	4	2.8987 [*]	7.3794 ^{***}	1.1470 [*]	3.2223 ^{**}	2.8977 ^{***}
X ₂ .X ₄	2	1.1757 ^{NS}	0.5921 ^{NS}	0.3590 ^{NS}	0.1869 ^{NS}	0.0354 ^{NS}
X ₃ .X ₄	2	7.6965 ^{***}	0.7791 ^{NS}	0.5174 ^{NS}	0.5174 ^{NS}	0.1127 ^{NS}
Residual	28	7.2372	7.4360	3.8860	3.8860	2.0479

NS: no significativo; * significativo al 5%; ** significativo al 1%, *** significativo al 0.1%

De la tabla 3.26, se puede observar que el tiempo de almacenamiento afecta significativamente ($p < 0.001$) a los 5 atributos sensoriales analizados. También resulta significativo sobre todos los atributos, el efecto de la concentración de ácido ascórbico. En cuanto a la concentración de ácido cítrico, la misma influye sobre la apariencia general, marchitamiento, amarronamiento y color, pero no sobre el desarrollo de *off-odors*.

El tipo de film utilizado para envasar espinaca mínimamente procesada, solo afectó significativamente ($p < 0.001$) el desarrollo de *off-odors*. Por lo que se propone modelar el efecto de la concentración de ácido cítrico y ácido ascórbico, y el tiempo de conservación refrigerada sobre el desarrollo de *off-odors* de espinaca mínimamente procesada envasada en bolsas de OPP y envasada en bolsas de LDPE.

Del análisis de variancia (tabla 3.26), puede verse que el tipo de film no tiene efecto significativo ($p > 0.05$) sobre los atributos sensoriales visuales: apariencia general, marchitamiento, amarronamiento y color. Tampoco son significativas ($p > 0.05$) las interacciones en las que interviene este efecto ($X_1.X_4$, $X_2.X_4$, $X_3.X_4$). Por lo tanto, se puede modelar el efecto de la concentración de los ácidos cítrico y ascórbico y el tiempo de conservación refrigerada sobre estos 4 atributos sensoriales visuales en forma conjunta para ambos tipos de film (Montgomery, 1991).

Otros autores también encontraron resultados similares. Di Pentima et al. (1996) estudiaron el comportamiento de brócoli, hojas enteras de espinaca y espárragos listos para usar, envueltos con diferentes láminas plásticas flexibles, conservados a 4 °C. Se encontró que no existían diferencias significativas en apariencia, color, amarronamiento y marchitamiento, cualquiera fuese la película empleada. En cambio, sí se encontraron diferencias en el desarrollo de *off-odors* de acuerdo al film utilizado, siendo mayor para el film de menor permeabilidad. Pirovani et al. (1997) reportaron resultados similares para repollo mínimamente procesado envasado en tres tipos de film, siendo el desarrollo de *off-odors* significativamente diferente de acuerdo al film utilizado.

3.4.2 Modelos para el desarrollo de *off-odors* en espinaca envasada en bolsas de OPP y LDPE

En primer lugar, se comprobó la idoneidad de los modelos elegidos con los tests de diagnósticos basados en los residuos. Los tests de diagnósticos se presentan en las figuras 5.9 y 5.10 a, b y c, del Anexo. Como puede verse, se cumple adecuadamente con las suposiciones de homogeneidad de la varianza (figuras 5.9 a y 5.10 a), de independencia de los errores (figuras 5.9 b y 5.10 b), y de normalidad de los errores (figuras 5.9 c y 5.10c). En consecuencia, como los tests de diagnósticos han demostrado la idoneidad de los modelos propuestos para el desarrollo de *off-odors* en espinaca envasada en bolsas de OPP (Y_{1OPP}) y en bolsas de LDPE (Y_{1PE}), se puede aplicar ANOVA para los dos modelos propuestos (tabla 3.27).

Tabla 3.27
Análisis de variancia para los modelos propuestos para off-odors

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	
		Y_{1OPP}	Y_{1PE}
Modelo	9	57.18231***	16.3123***
X_1 (c_C)	1	0.00347 ^{NS}	0.37556 ^{NS}
X_2 (c_A)	1	0.15125 ^{NS}	2.75342**
X_3 (t)	1	52.70222***	11.1392***
$X_1 \cdot X_2$	1	1.12853 ^{NS}	1.09808*
$X_1 \cdot X_3$	1	0.04941 ^{NS}	0.00008 ^{NS}
$X_2 \cdot X_3$	1	0.02083 ^{NS}	0.62563 ^{NS}
X_1^2	1	2.03097*	0.02533 ^{NS}
X_2^2	1	0.76761 ^{NS}	0.05255 ^{NS}
X_3^2	1	0.32801 ^{NS}	0.24249 ^{NS}
Residuo	19	7.31619	3.5635
Falta de ajuste	17	6.81619 ^{NS}	3.0635 ^{NS}
Error puro	2	0.5015	0.49789
Coef. determinación (R^2)		0.88657	0.82071

NS: no significativo; * significativo al 5%; ** significativo al 1%; *** significativo al 0.1%

De los análisis de variancia correspondientes a los modelos propuestos para el desarrollo de *off-odors* de espinaca envasada en bolsas de OPP y LDPE (tabla 3.27), se puede ver que ambos modelos de predicción resultan altamente significativos ($p < 0.001$) y la falta de ajuste de los 2 modelos no es significativa ($p > 0.05$).

El valor de los coeficientes de determinación (R^2) indica que el modelo desarrollado para Y_{1OPP} explica el 88.66 % de la variabilidad de los datos experimentales, y el modelo desarrollado para Y_{1PE} explica el 82.07 %.

Las ecuaciones de 2^{do} orden propuestas como modelos son:

$$Y_{1OPP} = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_3 \cdot X_3 + b_{11} \cdot X_1^2 + b_{22} \cdot X_2^2 + b_{33} \cdot X_3^2 + b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + b_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + b_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 \text{ Ec.3.8}$$

$$Y_{1PE} = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_3 \cdot X_3 + b_{11} \cdot X_1^2 + b_{22} \cdot X_2^2 + b_{33} \cdot X_3^2 + b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + b_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + b_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 \text{ Ec.3.9}$$

donde b_0 , b_i y b_{ij} son los coeficientes y X_i son las variables codificadas. Los subíndices de los coeficientes o variables codificadas indican: 1: concentración de ácido cítrico; 2: concentración de ácido ascórbico y 3: tiempo de conservación refrigerada.

Los coeficientes de los modelos de 2^{do} orden propuestos para el desarrollo de *off-odors* en espinaca envasada en OPP y LDPE se presentan en la tabla 3.28.

Tabla 3.28
Valores de los coeficientes de regresión de las ecuaciones de 2^{do} orden para el desarrollo de off-odors

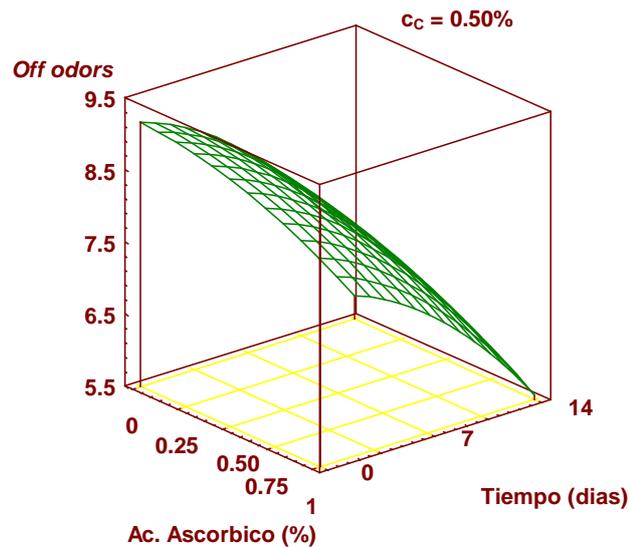
Coeficientes	Y_{1OPP}	Y_{1PE}
b₀	7.941	8.266
b₁	-0.014	-0.144
b₂	-0.092	-0.391
b₃	-1.711	-0.787
b₁₁	-0.480	-0.051
b₂₂	-0.314	0.109
b₃₃	-0.222	-0.191
b₁₂	0.307	-0.303
b₂₃	0.064	0.0025
b₂₃	-0.042	-0.228

En el modelo propuesto para el desarrollo de *off-odors* en espinaca envasada en bolsas de OPP, sólo el tiempo de conservación refrigerada resultó altamente significativo ($p < 0.001$).

La figura 3.15 muestra el gráfico de superficie de respuesta para el desarrollo de *off-odors* en bolsas de OPP en función de la concentración de ácido ascórbico y el tiempo, para una concentración de ácido cítrico de 0.50%. Se puede observar, que la calidad sensorial disminuye, desde ausencia o nada de *off-odors* (9.00) a un desarrollo de *off-odors* entre trazas y ligero (7.90) a los 7 días y a un *off-odors* moderado (6.00) a los 14 días de almacenamiento, para $c_C = c_A = 0.50\%$ de acuerdo al modelo de predicción.

Figura 3.15

Superficie de respuesta para off-odors de espinaca envasada en bolsas de OPP



En la figura 3.16 se han superpuestos los gráficos de contornos correspondientes al desarrollo de *off-odors* en bolsas de OPP, a la flora aerobia mesófila límite y a la concentración de CO_2 (figura 3.16 a) y O_2 (figura 3.16 b).

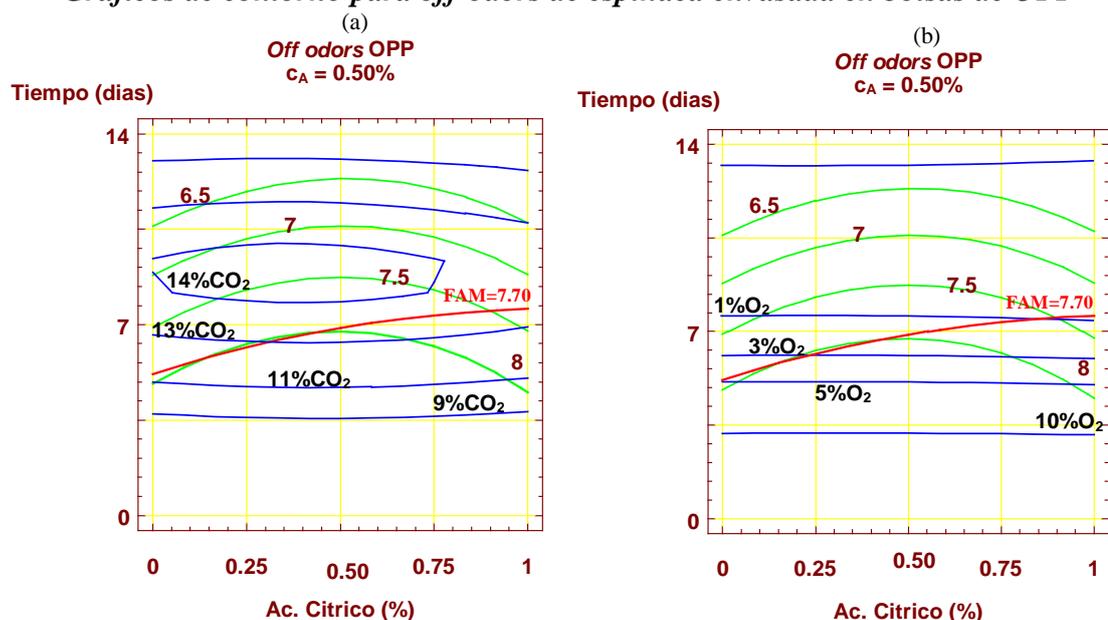
Si se observan las líneas correspondientes al desarrollo de *off-odors* (color verde), se puede notar que cuando se alcanza un recuento de FAM = 7.70, se obtiene un valor de *off-odors* entre 7-8 (ligero). Por ejemplo, para $c_C = 1.00\%$ y $c_A = 0.50\%$, se alcanza un

valor de *off-odors* de 7.3 (ligero) cuando se llega al valor límite de FAM = 7.70 luego de aproximadamente 8 días ($X_3 = 0.086$).

En la figura 3.16 a, se observa que, para cualquier concentración de ácido cítrico que se utilice dentro del rango de trabajo (0.35% a 1.00%), la concentración de CO₂ supera el 13.00 %, cuando se llega al valor límite de flora aerobia mesófila (FAM = 7.70). Coincidentemente con Gorny (1997), se encontró que ya a partir de esa concentración de CO₂, se obtienen valores de *off-odors* que indican que el desarrollo de olores desagradables comienza a hacerse notorio. En este caso, podríamos decir que la concentración de CO₂ junto con el desarrollo de *off-odors* son los factores limitantes y que determinarán la vida útil de espinaca envasada en OPP. Si se considera que el límite superior recomendado por Gorny (1997) y Namesny (1993) para el %CO₂ en la atmósfera modificada de envases de espinaca es de 10%, a través del modelo desarrollado para %CO₂ (Ec. 3.4) y en la figura 3.16 a, se puede ver que para ese %CO₂ (10.00%) se alcanza una vida útil de aproximadamente 4 días ($X_3 = -0.415/-0.378$), para $c_C = 0.35 - 1.00\%$ y $c_A = 0.50\%$. Como era de esperar, para esa vida útil e iguales condiciones de tratamiento químico, se obtienen valores de *off-odors* de 8.00 a 8.60, es decir no hay desarrollo de *off-odors*, de acuerdo al modelo de predicción desarrollado.

Figura 3.16

Gráficos de contorno para *off-odors* de espinaca envasada en bolsas de OPP



En cuanto a la concentración de O₂ (figura 3.16 b), se observa que, cuando se alcanza el valor límite de FAM = 7.70, la concentración disminuye por debajo del 3.00%, incluso se pueden alcanzar concentraciones inferiores al 1.00%.

También se ha encontrado que el desarrollo de *off-odors* en repollo mínimamente procesado ha sido el atributo que limitó su vida útil cuando se lo envasó en bolsas de OPP de 30 μm de espesor. La composición de la atmósfera alcanzó una concentración de equilibrio de 2.00 %O₂ y 13.00 %CO₂ durante el almacenamiento a 4 °C. Los otros dos tipos de films estudiados para envasar el repollo cortado, más permeables que el OPP, no modificaron significativamente la atmósfera en el interior de los envases, con respecto a la composición del aire, y tampoco desarrollaron *off-odors* (Pirovani et al., 1997).

Durante el almacenamiento de lechuga cortada en 0.2% O₂ y 15 % CO₂ a 5 °C, la misma mantuvo su apariencia visual, pero se obtuvieron altas concentraciones de acetaldehído y etanol, y de desarrollo de *off-odors*. En esta atmósfera, la concentración de etanol fue tres veces superior al producido en una atmósfera con 0.20 % O₂ y 7.50 % CO₂ (Peiser et al., 1997). Otros autores han encontrado que altas concentraciones de CO₂ producen etanol y acetaldehído en cabezas de lechuga intactas. Además, las concentraciones muy bajas de O₂, junto con altas concentraciones de CO₂, aumentaron la respiración anaeróbica produciendo una reducción en la calidad sensorial debido al desarrollo de *off-odors* en lechuga y brócoli (Forney, Rij, 1991; Heimdal et al., 1995).

En el modelo propuesto para el desarrollo de *off-odors* en espinaca envasada en bolsas de LDPE, la concentración de ácido ascórbico y el tiempo de conservación resultaron factores significativos (tabla 3.26).

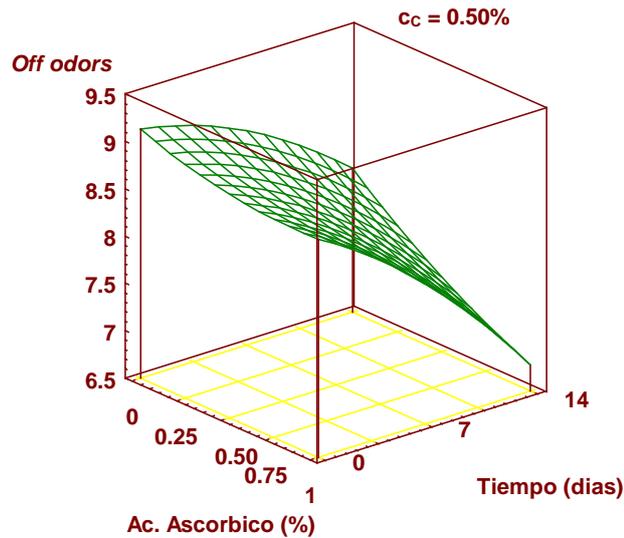
La figura 3.17 muestra el gráfico de superficie de respuesta para el desarrollo de *off-odors* en espinaca envasada en bolsas de LDPE, en función de la concentración de ácido ascórbico y el tiempo, para $c_C = 0.50\%$.

Se puede observar que existe un ligero desarrollo de *off-odors* después de 14 días de almacenamiento. La intensidad de los olores extraños desarrollados aumenta a medida que aumenta la concentración de ácido ascórbico, pero este efecto se hace notorio después de 7 días de almacenamiento y para concentraciones superiores al 0.50 %. De esta manera se puede ver que, una muestra tratada con $c_C = c_A = 0.50\%$, alcanza un valor de 8.3 (nada a

trazas de *off-odors*) luego de 7 días de almacenamiento, y de 7.3 (trazas a ligero *off-odors*) después de 14 días de almacenamiento.

Figura 3.17

Superficie de respuesta para off-odors de espinaca envasadas en bolsas de LDPE

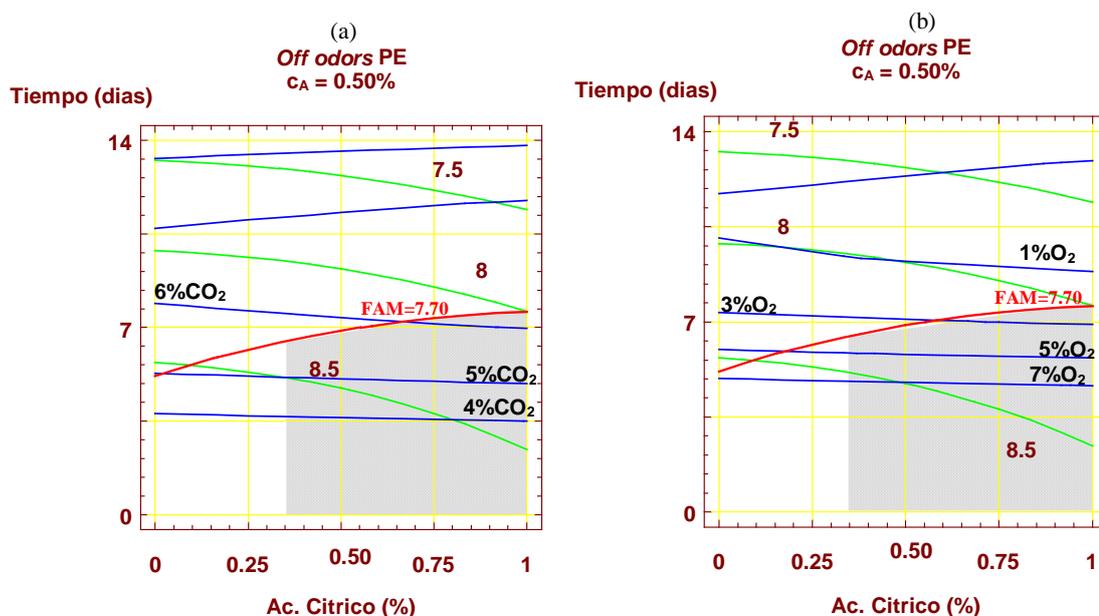


En la figura 3.18 se presentaron los gráficos de contornos correspondientes al desarrollo de *off-odors* de espinaca envasada en bolsas de LDPE, al valor límite de flora aerobia mesófila (FAM = 7.70) y a la concentración de CO₂ (figura 3.18 a) y O₂ (figura 3.18 b). El área rayada representa el área de trabajo determinada para $c_A = 0.50\%$. Si se observan las líneas correspondientes al desarrollo de *off-odors* (color verde), se obtienen valores iguales o superiores a 8 (nada a trazas de *off-odors*) para cualquier concentración de ácido cítrico, cuando se alcanza el límite de vida útil, determinado por FAM = 7.70. También, se observa que la composición de la atmósfera que se desarrolla en el interior del envase de LDPE es 5-7 %CO₂ y 2-5 %O₂.

A diferencia de los resultados obtenidos en las muestras envasadas en OPP, las muestras de espinaca envasadas en LDPE no desarrollaron *off-odors*, y la composición de la atmósfera se encontró dentro de los límites recomendados, por lo tanto, ni el desarrollo de *off-odors* ni la composición de la atmósfera limitan la vida útil de espinaca mínimamente procesada envasada en bolsas de LDPE.

Figura 3.18

Gráficos de contorno para off-odors en espinaca envasada en bolsas de LDPE



3.4.3 Modelos para apariencia general, marchitamiento, amarronamiento y color en espinaca mínimamente procesada envasada en OPP y LDPE

En primer lugar, se comprobó la idoneidad de los modelos elegidos con los tests de diagnósticos basados en los residuos. Los tests de diagnósticos se presentan en el Anexo en las figuras 5.11, 5.12, 5.13 y 5.14 a, b y c. Como puede verse, se cumple adecuadamente con las suposiciones de homogeneidad de la varianza (figuras 5.11 a, 5.12 a, 5.13 a, 5.14 a), de independencia de los errores (figuras 5.11 b, 5.12 b, 5.13 b, 5.14 b) y de normalidad de los errores (figura 5.11 c, 5.12 c, 5.13 c, 5.14c). Como no existen transgresiones severas, podemos aplicar el ANOVA para los modelos propuestos para los 4 atributos sensoriales visuales (tabla 3.29).

Tabla 3.29

Análisis de variancia para los modelos propuestos para los atributos sensoriales visuales

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados			
		Y ₂ (Ap. Gral)	Y ₃ (Marchitam.)	Y ₄ (Amarrona.)	Y ₅ (Color)
Modelo	9	50.5409***	15.4112***	24.2246***	22.1920***
X ₁ (c _C)	1	2.5689**	0.5548 ^{NS}	1.4337**	0.14103 ^{NS}
X ₂ (c _A)	1	5.7235***	0.5859*	3.5711***	0.4455 ^{NS}
X ₃ (t)	1	34.2792***	13.3119***	17.4838***	18.8334***
X ₁ . X ₂	1	1.0875*	0.0015 ^{NS}	0.0347 ^{NS}	0.4104 ^{NS}
X ₁ . X ₃	1	1.2659*	0.2685 ^{NS}	0.1121 ^{NS}	0.4361 ^{NS}
X ₂ . X ₃	1	2.8616**	0.2875 ^{NS}	1.0267*	1.2272**
X ₁ ²	1	0.0273 ^{NS}	0.0103 ^{NS}	0.01505 ^{NS}	0.0303 ^{NS}
X ₂ ²	1	1.8515*	0.2729 ^{NS}	0.5475 ^{NS}	0.00002 ^{NS}
X ₃ ²	1	0.8755 ^{NS}	0.1179 ^{NS}	0.0009 ^{NS}	0.6681*
Residuo	19	4.4933	2.4358	2.7750	2.5683
Falta de ajuste	17	3.9927 ^{NS}	1.9341 ^{NS}	2.2600 ^{NS}	1.9617 ^{NS}
Error puro	2	0.5006	0.5017	0.5150	0.6067
Coef. determinación (R ²)		0.91836	0.86352	0.89722	0.89627

NS: no significativo; * significativo al 5%; ** significativo al 1%, *** significativo al 0.1%.

A partir de los análisis de variancia puede verse que los modelos de predicción desarrollados para los atributos sensoriales visuales resultaron altamente significativos ($p < 0.001$) y la falta de ajuste de los 4 modelos no es significativa ($p > 0.05$).

Los modelos explican el 91.84 %; 86.35 %; 89.72 % y 89.63 % de la variabilidad de los datos experimentales para apariencia general, marchitamiento, amarronamiento y color, respectivamente.

Las ecuaciones de 2^{do} orden propuestas como modelos son:

$$Y_2 = b_0 + b_1.X_1 + b_2.X_2 + b_3.X_3 + b_{11}.X_1^2 + b_{22}.X_2^2 + b_{33}.X_3^2 + b_{12}.X_1.X_2 + b_{13}.X_1.X_3 + b_{23}.X_2.X_3 \quad (\text{Ec. 3.10})$$

$$Y_3 = b_0 + b_1.X_1 + b_2.X_2 + b_3.X_3 + b_{11}.X_1^2 + b_{22}.X_2^2 + b_{33}.X_3^2 + b_{12}.X_1.X_2 + b_{13}.X_1.X_3 + b_{23}.X_2.X_3 \quad (\text{Ec. 3.11})$$

$$Y_4 = b_0 + b_1.X_1 + b_2.X_2 + b_3.X_3 + b_{11}.X_1^2 + b_{22}.X_2^2 + b_{33}.X_3^2 + b_{12}.X_1.X_2 + b_{13}.X_1.X_3 + b_{23}.X_2.X_3 \quad (\text{Ec. 3.12})$$

$$Y_5 = b_0 + b_1.X_1 + b_2.X_2 + b_3.X_3 + b_{11}.X_1^2 + b_{22}.X_2^2 + b_{33}.X_3^2 + b_{12}.X_1.X_2 + b_{13}.X_1.X_3 + b_{23}.X_2.X_3 \quad (\text{Ec. 3.13})$$

donde b_0 , b_i y b_{ij} son los coeficientes y X_i son las variables codificadas. Los subíndices de los coeficientes o variables codificadas indican: 1: concentración de ácido cítrico; 2: concentración de ácido ascórbico. y 3: tiempo de conservación refrigerada.

Los coeficientes de los modelos de 2^{do} orden propuestos para los atributos sensoriales visuales de espinaca mínimamente procesada envasada en OPP y LDPE, se presentan en la tabla 3.30.

Tabla 3.30

Valores de los coeficientes de regresión de las ecuaciones de 2^{do} orden para los atributos sensoriales visuales

Coefficientes	Ap. Gral	Marchitam.	Amarronam	Color
b_0	8.025	8.191	7.968	8.136
b_1	-0.378	-0.176	-0.282	-0.089
b_2	-0.564	-0.180	-0.445	-0.157
b_3	-1.380	-0.860	-0.986	-1.023
b_{11}	0.0396	0.078	-0.0124	-0.033
b_{22}	-0.485	-0.187	-0.285	0.036
b_{33}	-0.363	-0.133	0.00087	-0.317
b_{12}	-0.301	0.0113	-0.054	-0.185
b_{13}	-0.325	-0.1496	-0.097	-0.191
b_{23}	-0.488	-0.155	-0.292	-0.3198

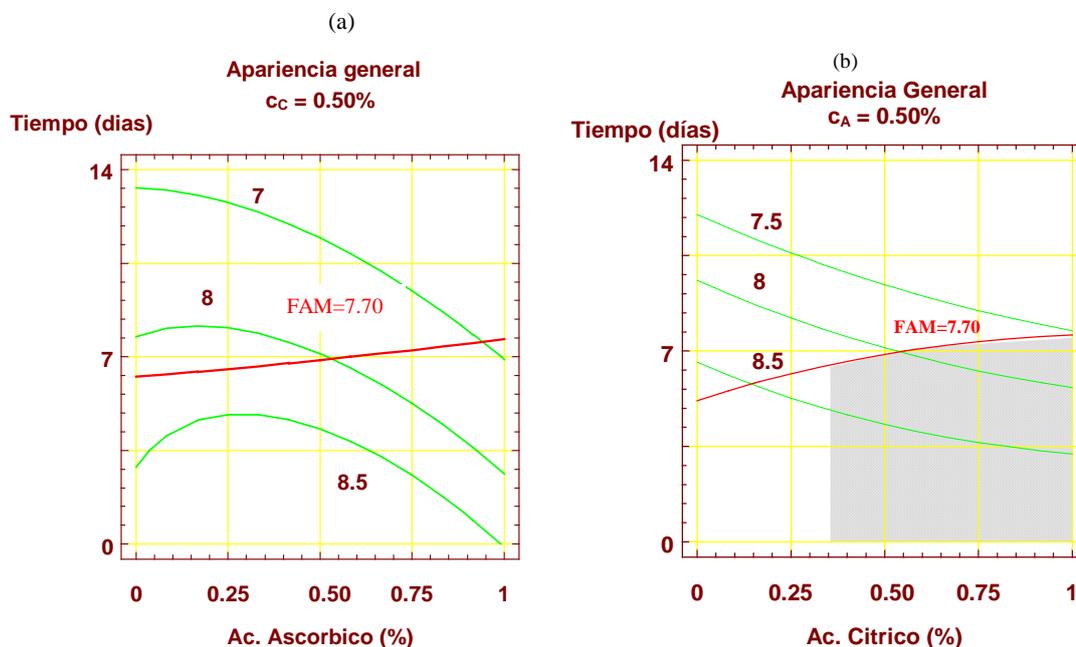
Las 3 variables independientes estudiadas ejercen su efecto sobre la apariencia general de espinaca. En la figura 3.19 se presentan los gráficos de contorno para apariencia general (color verde), y se ha incluido la gráfica correspondiente a FAM = 7.70 que es el límite impuesto por la legislación francesa a la fecha de vencimiento. De la figura 3.19 se ve que la apariencia general disminuye a medida que aumenta el tiempo de conservación.

En la figura 3.19 a se puede ver que la apariencia general no se modifica significativamente, y se mantiene en valores superiores a 8 (apariencia general muy buena) si la concentración de ácido ascórbico utilizada se encuentra entre 0.00 a 0.50% para

$c_C=0.50\%$. En cambio si $c_A > 0.50\%$, se produce una rápida disminución de este atributo. Si se analizan los extremos de la gráfica, se observa que para $c_C = 0.50\%$ y $c_A = 0\%$, se obtiene un valor de apariencia general de 8.19 cuando $FAM = 7.70$ (6 días). Si se aumenta la concentración a $c_A = 1.00\%$, el valor de apariencia general disminuye a 6.79 (buena/regular) cuando el desarrollo de flora aerobia mesófila llega a 7.70 (casi 8 días, $X_3 = 0.0972$).

Figura 3.19

Gráficos de contornos para Apariencia General



Por otra parte, se puede observar en la figura 3.19 b, que un aumento de la concentración de ácido cítrico de 0.00 a 0.50% produce una ligera disminución en el valor de la apariencia general, pero no existen diferencias significativas al trabajar con concentraciones superiores a 0.50%. Para $c_A = 0.50\%$, se puede ver que todas las muestras tienen una apariencia general entre buena y muy buena (7.5 a 8.3), al término de su vida útil determinada por $FAM = 7.70$, cualquiera sea la concentración de ácido cítrico utilizada.

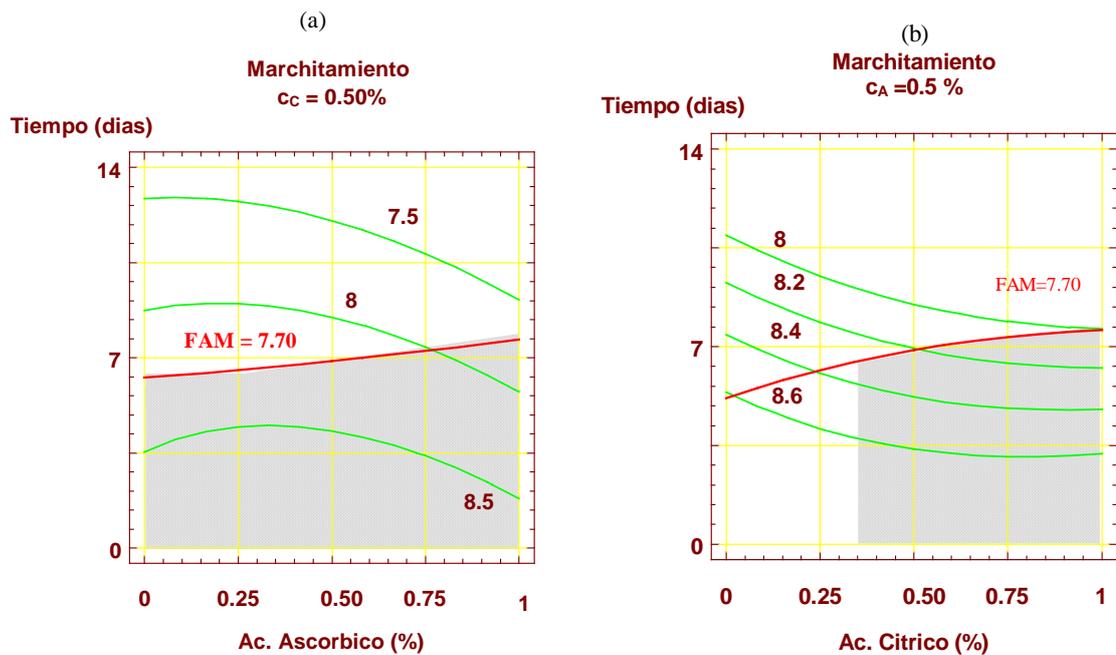
El ANOVA correspondiente al modelo propuesto para el marchitamiento (tabla 3.29), indica que sólo la concentración de ácido ascórbico y el tiempo de conservación influyen sobre este atributo.

En la figura 3.20 se puede ver que el valor del marchitamiento disminuye con el tiempo de conservación, desde un valor inicial de 8.5-9 (ninguno) a 7.5-8 (ligero), dependiendo del tratamiento químico realizado.

En la figura 3.20 a, se puede ver que el marchitamiento no se modifica para concentraciones de ácido ascórbico de 0.00 a 0.75% cuando $c_C = 0.50\%$, pero para concentraciones superiores se produce una disminución en el valor de este atributo. Si se trabaja con $c_C = 0.50\%$, al finalizar su vida útil, determinada por el valor de $FAM = 7.70$, las muestras tendrán un marchitamiento entre ligero y ninguno (valores superiores a 7.72).

Figura 3.20

Gráficos de contornos para Marchitamiento



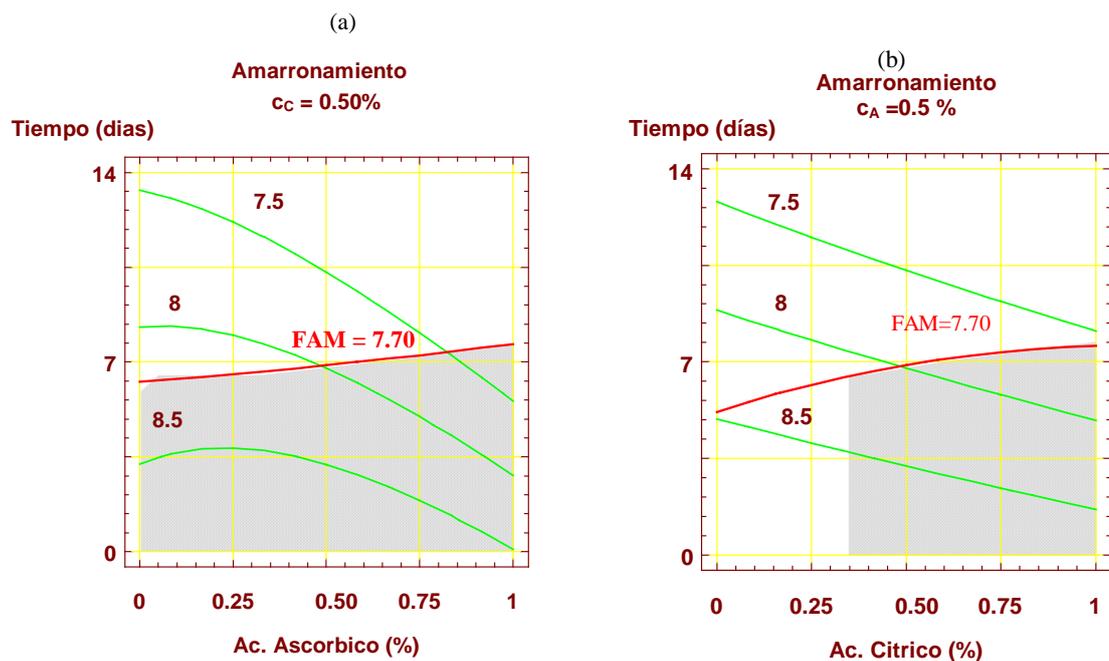
En la figura 3.20 b, se puede ver que la concentración de ácido cítrico no produce ningún efecto significativo sobre el marchitamiento, y si se trabaja con $c_A = 0.50\%$, todas las muestras tendrá un valor de calidad sensorial asociada al marchitamiento, superior a 8 (muy ligero a ninguno), cuando se alcanza el valor límite de $FAM = 7.70$.

El análisis de variancia para el modelo propuesto para el amarronamiento (tabla 3.29) indica que la concentración de los ácidos cítrico y ascórbico, y el tiempo influyen sobre este atributo.

En la figura 3.21, se puede observar que el valor del amarronamiento disminuye con el tiempo de conservación, desde ausencia (8.5-9.0) a ligero (7.0-7.5). La figura 3.21 a, muestra que la concentración de ácido ascórbico mantiene el valor del amarronamiento alrededor de los valores iniciales durante los primeros días, cuando la concentración no excede el 0.50%. Para $c_A > 0.50\%$, y contrariamente a lo esperado, se produce una ligera disminución en la evaluación de este atributo, comenzando a hacerse notorio el amarronamiento para un mismo tiempo de almacenamiento.

Figura 3.21

Gráficos de contornos para Amarronamiento



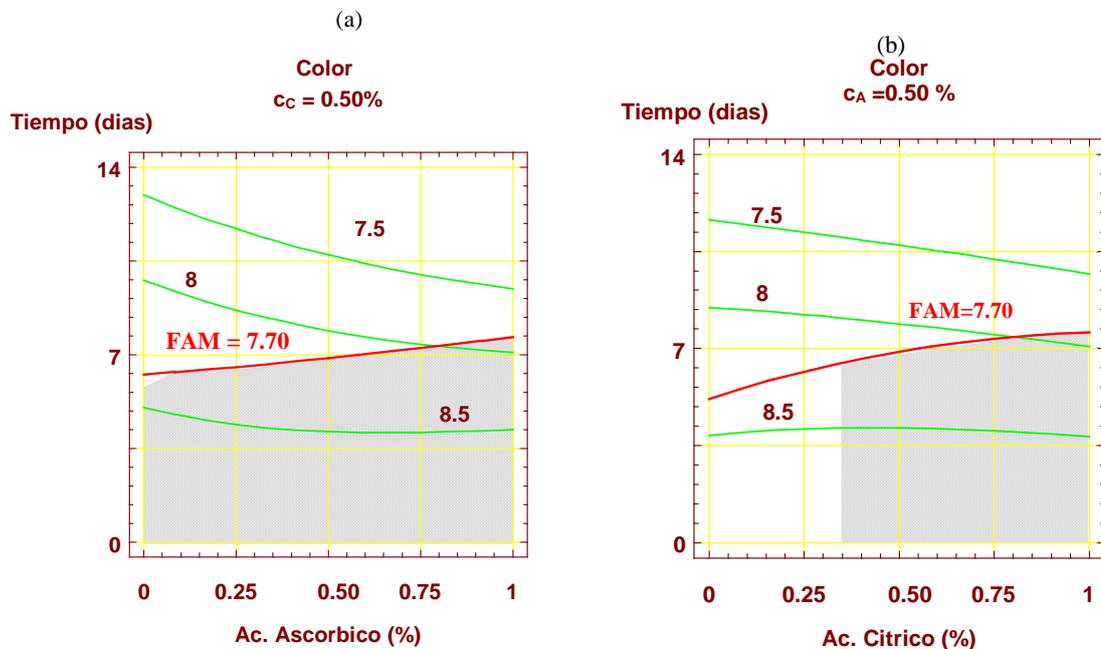
La figura 3.21 b muestra que disminuye el valor de este atributo, a medida que aumenta la concentración de ácido cítrico, aunque para ninguna concentración de ácido cítrico, si $c_A = 0.50\%$, se obtiene un valor inferior a 7.5 (ausencia a ligero) al término de su vida útil, determinada por el valor de $FAM = 7.70$.

El ANOVA para el modelo propuesto para el color de espinaca (tabla 3.29) indica que solamente el tiempo de almacenamiento influye significativamente ($p > 0.001$) sobre el color.

En la figura 3.22 se puede observar que el color de espinaca disminuye durante el tiempo de conservación desde un valor inicial de 9 (verde oscuro) a 7.3-8.5 (verde -verde suave), cuando se alcanza el valor límite de $FAM = 7.70$, independientemente del tratamiento químico utilizado.

Figura 3.22

Gráficos de contornos para Color



3.4.4 Verificación de los modelos para los atributos sensoriales

Las condiciones experimentales para la verificación de los modelos de predicción de los atributos sensoriales se fijaron en $c_C = 0.20\%$, $c_A = 1.00\%$ y $t = 7, 14$ días.

En la tabla 3.31 pueden verse los valores predichos (Y_k), los intervalos de confianza correspondientes con una probabilidad del 95%, los valores experimentales (y_k) y los errores porcentuales de cada uno de los valores estimados con el modelo $[100 \cdot (y_k - Y_k) / y_k]$.

Tabla 3.31

Valores predichos y experimentales para la verificación de los modelos para los atributos sensoriales para $c_C = 0.20\%$ y $c_A = 1.00\%$

Atributo	t [día]	Valor Modelo	Intervalo de confianza	Valor Experimental	Error [%]
Off-odors OPP	7	7.19	[6.56;7.82]	7.50	4.31
	14	5.17	[4.39;5.96]	5.60	7.68
Off-odors LDPE	7	8.23	[7.79;8.67]	8.50	3.18
	14	7.03	[6.48;7.57]	6.67	-5.40
Apariencia General	7	7.40	[6.90;7.89]	7.60	2.63
	14	5.36	[4.75;5.97]	4.80	-11.67
Marchitamiento	7	7.95	[7.59;8.31]	8.20	3.05
	14	6.89	[6.44;7.34]	6.65	-3.61
Amarronamiento	7	7.43	[7.05;7.82]	7.80	4.74
	14	6.21	[5.73;6.70]	5.90	-5.25
Color	7	8.14	[7.82;8.45]	8.25	1.33
	14	6.80	[6.43;7.17]	6.45	-5.43

En la tabla 3.31, se puede ver que todos los valores experimentales de los atributos sensoriales analizados, pertenecen al intervalo de confianza correspondiente al valor estimado para cada valor puntual de las variables independientes. Además, si se consideran los valores de los errores porcentuales obtenidos, se pueden aceptar a los modelos propuestos como buenos predictores de los valores de los atributos sensoriales para espinaca envasada en bolsas de OPP y LDPE.

3.5 RETENCIÓN DE CLOROFILA

La pérdida de color verde en espinaca fresca o mínimamente procesada, está asociada con la disminución de su calidad. La clorofila, el pigmento responsable de su característico color verde, puede degradarse a compuestos indeseables de color verde-oliva como feoforbidos o feofitinas, ó a compuestos incoloros en tejidos metabólicamente activos (Heaton, Marangoni, 1996).

Por esta razón, se determinó el porcentaje de retención de clorofila total para espinaca mínimamente procesada envasada en bolsas de OPP y LDPE después de 14 días de almacenamiento a 4 °C.

En la tabla 3.32, se presentan los resultados experimentales para la retención de clorofila total en espinaca después de 14 días de almacenamiento, para los distintos tratamientos químicos aplicados y para los dos tipos de films utilizados.

Tabla 3.32

Resultados experimentales para la retención de clorofila total a los 14 días de almacenamiento

Niveles de las variables codificadas		%R Cl total	
X ₁ (C _C)	X ₂ (C _A)	OPP	LDPE
0	0	96.68	93.74
1	1	93.12	90.76
0	1	92.20	98.77
0	-1	100.00	94.27
1	0	93.61	93.74
-1	-1	94.99	94.05
-1	0	98.78	100.00
-1	1	93.20	91.94
1	-1	97.97	95.27

3.5.1 Efecto del tratamiento químico y tipo de envase sobre la retención de clorofila

Se realizó un análisis de variancia para determinar el efecto de las concentraciones de ácido cítrico (X_1), ácido ascórbico (X_2) y el tipo de film (X_4) utilizado, sobre la retención de clorofila total.

Tabla 3.33

Análisis de variancia multifactorial para retención de clorofila total

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calc.
Efectos principales				
X_1 (c _C)	11.34188	2	5.67094	0.691 ^{NS}
X_2 (c _A)	30.47868	2	15.23934	1.857 ^{NS}
X_4 (f)	3.56445	1	3.56445	0.434 ^{NS}
Interacciones				
$X_1.X_2$	45.56647	4	11.39162	1.388 ^{NS}
$X_1.X_4$	1.38143	2	0.69072	0.084 ^{NS}
$X_2.X_4$	12.93873	2	6.46937	0.788 ^{NS}
Residuo	32.83069	4		

NS: no significativo; * significativo al 5%; ** significativo al 1%; *** significativo al 0.1%

El análisis de variancia (tabla 3.33), indica que los tratamientos químicos aplicados no afectaron significativamente ($p>0.05$) la retención de clorofila total en espinaca mínimamente procesada. Tampoco se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en la retención de clorofila total entre los dos tipos de films utilizados. Estos resultados coinciden con los obtenidos para la evaluación sensorial del color.

Luego de 14 días de almacenamiento a 4°C, se obtuvo un valor promedio de 95.17% de retención de clorofila total. Si comparamos los valores obtenidos para la evaluación sensorial del color de espinaca, vemos que para esta retención del 95.17% le corresponde una disminución en el valor sensorial del color desde el valor inicial de 9 (verde oscuro) a 6.5-7.5 (verde suave), luego de 14 días de almacenamiento.

La clorofila total, inicialmente presente en las muestras de espinaca, fue de 92.05mg/100 g de vegetal fresco. La relación inicial de clorofila a/clorofila b, fue de 3.00. Estos valores fueron similares a los publicados por Baardseth y von Elbe (1989) para espinaca. La relación entre clorofila a y b no se modificó luego de 14 días de almacenamiento a 4°C.

Una pequeña cantidad de feofitina b (1.62 mg/ 100 g vegetal fresco) fue encontrada en las muestras iniciales (t = 0) y, similarmente a lo reportado por Watada et al. (1990), no cambió luego de 14 días de almacenamiento. Tampoco se encontraron diferencias entre las distintas muestras y en ninguna de ellas se encontró feofitina a.

Se debe considerar que la velocidad y camino de degradación de la clorofila diferirá entre alimentos altamente procesados (por ejemplo, esterilizados) y alimentos mínimamente procesados. Los alimentos que han sido altamente procesados perderían su actividad metabólica, y así la degradación de clorofila sería afectada solamente por factores externos. Por otra parte, los alimentos mínimamente procesados aún mantienen actividad metabólica, y así la degradación podría estar influenciada conjuntamente por esta actividad y por los factores externos (Heaton, Marangoni, 1996).

El almacenamiento refrigerado y en atmósfera modificada aumentarían la retención de clorofila. Watada et al. (1987) informó que la retención de clorofila en espinaca envasada en LDPE perforado fue menor a 20 °C (40%) que a 10 °C (80%), luego de 5 días de almacenamiento. Además, indicó que las muestras envasadas en LDPE perforado retuvieron más clorofila (80%) comparadas con las que no fueron envasadas (70%), después de 5 días a 10 °C. Por otra parte, se ha reportado que concentraciones de gases similares a las obtenidas en las muestras envasadas en LDPE y OPP (2.50 a 10.00 %CO₂, y 2.50 %O₂) en la atmósfera de almacenamiento, aumenta la retención de clorofila durante la conservación (Pantástico, 1979).

3.6 PÉRDIDA DE PESO

Se determinó el porcentaje de pérdida de peso para las muestras de espinaca mínimamente procesadas envasadas en bolsas de OPP y LDPE.

En la tabla 3.34, se presentan los resultados obtenidos para las distintas muestras a los 7 y 14 días de almacenamiento.

Tabla 3.34

Resultados experimentales para la pérdida de peso de espinaca mínimamente procesada envasada en bolsas de OPP y LDPE

Niveles de las variables codificadas			Pérdida de peso (%)	
X ₁ (c _C)	X ₂ (c _A)	X ₃ (t)	OPP	LDPE
0	0	0	0.10	0.31
1	1	1	0.06	0.06
0	1	0	0.05	0.08
-1	-1	1	0.28	0.23
0	0	1	0.10	0.20
-1	0	0	0.08	0.25
1	-1	0	0.30	0.04
-1	1	1	0.35	0.38
0	-1	1	0.22	0.37
1	0	1	0.08	0.72
1	1	0	0.02	0.02
-1	-1	0	0.28	0.17
0	1	1	0.05	0.08
0	-1	0	0.08	0.22
-1	1	0	0.05	0.05
1	-1	1	0.28	0.36
1	0	0	0.14	0.08
-1	0	1	0.32	0.14

3.6.1 Efecto del tratamiento químico, tipo de envase y tiempo de conservación sobre la pérdida de peso

Se realizó un análisis de variancia multifactorial para determinar el efecto de las cuatro variables estudiadas sobre la pérdida de peso (tabla 3.35).

X_1 (c_C)= Concentración de ácido cítrico

X_2 (c_A)= Concentración de ácido ascórbico

X_3 (t)= Tiempo de conservación refrigerada

X_4 (f)= Tipo de film

Tabla 3.35

Análisis de variancia multifactorial para pérdida de peso (%)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calc.
Efectos principales				
X_1 (c_C)	0.0218	2	0.0109	0.536 ^{NS}
X_2 (c_A)	0.1168	2	0.0584	2.871 ^{NS}
X_3 (t)	0.1067	1	0.1067	5.245*
X_4 (f)	0.0235	1	0.0235	1.156 ^{NS}
Interacciones				
$X_1.X_2$	0.0576	4	0.0144	0.708 ^{NS}
$X_1.X_3$	0.0288	2	0.0144	0.708 ^{NS}
$X_1.X_4$	0.0278	2	0.0139	0.682 ^{NS}
$X_2.X_3$	0.0005	2	0.00025	0.012 ^{NS}
$X_2.X_4$	0.0419	2	0.02095	1.030 ^{NS}
$X_3.X_4$	0.0128	1	0.0128	0.631 ^{NS}
Residuo	0.3255	16	0.0203	

El análisis de variancia indica que el tratamiento químico y el tipo de envase no afectan significativamente ($p > 0.05$) la pérdida de peso de espinaca mínimamente procesada.

La pérdida de peso determinada a los 7 días de almacenamiento refrigerado es significativamente diferente ($p < 0.05$) de la encontrada después de 14 días.

A los 7 días de almacenamiento, la pérdida de peso fue de 0.13% y luego de 14 días fue de 0.24 %, cualquiera haya sido el film utilizado y el tratamiento químico aplicado.

De todas maneras, y de acuerdo a los bajos valores de pérdida de peso obtenidos, se puede indicar que los dos films utilizados redujeron efectivamente la pérdida de peso de espinaca mínimamente procesada durante el almacenamiento a 4 °C y 90 % H.R.

3.7 FACTORES QUE LIMITAN LA VIDA ÚTIL DE ESPINACA MÍNIMAMENTE PROCESADA

Considerando que los vegetales mínimamente procesados deben mantener las características organolépticas del vegetal fresco, se puede definir su vida útil como el tiempo de almacenamiento refrigerado al cual cualquiera de los atributos sensoriales alcanza un valor de 7 ó cuando los recuentos de flora aerobia mesófila superan el valor de 7.70 (5.10^7 UFC/g), límite establecido por la legislación francesa (Pirovani et al., 1997).

A continuación se analizará cuál de estas dos restricciones limitan la vida útil de espinaca mínimamente procesada envasada en bolsas de OPP y LDPE.

Ya se ha indicado que el desarrollo de *off-odors*, asociado a una concentración de CO₂ en el interior del envase superior al 10%, es el factor limitante para las muestras envasadas en bolsas de OPP.

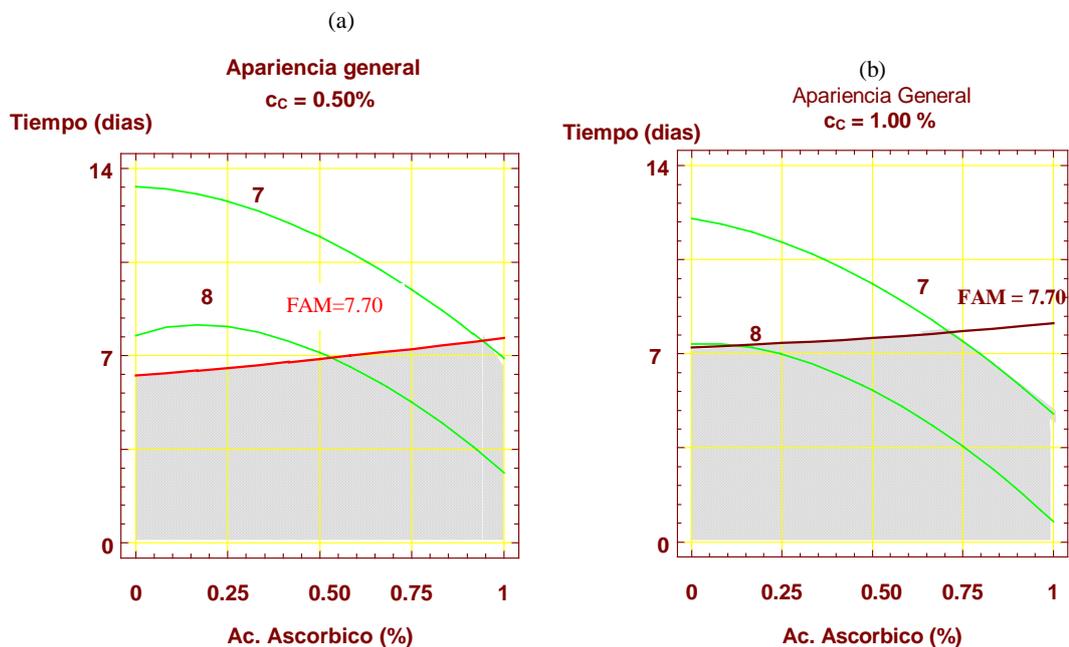
En cuanto a los atributos sensoriales visuales, el marchitamiento, el amarronamiento y el color, que no mostraron ser diferentes en ambos tipos de films, siempre tienen valores superiores a 7 cuando la flora aerobia mesófila alcanza el valor de 7.70 (figuras 3.20; 3.21 y 3.22). Por lo tanto, en ningún caso, el marchitamiento, el amarronamiento y el color determinarán la vida útil de espinaca mínimamente procesada almacenada a 4 °C.

Si analizamos la figura 3.23 a, se puede ver que para $c_C = 0.50\%$, el valor de apariencia general puede alcanzar valores menores a 7 antes de que $FAM = 7.70$. Esto sucede para $c_A \geq 0.94\%$ ($X_2 \geq 0.88$).

En la figura 3.23 b, se puede ver que para $c_C = 1.00\%$, la apariencia general es el factor que limita la vida útil, si la $c_A \geq 0.71\%$ ($X_2 \geq 0.41$).

Figura 3.23

Gráficos de contornos superpuestos para Apariencia General y FAM



En la figura 3.23, el área rayada indica el tiempo de vida útil que podrían alcanzar las muestras de espinaca, dentro del rango de concentraciones determinado en el inciso 3.1.4, que permite obtener inicialmente ($t = 0$) un recuento de $FAM \leq 5.70$. En ambas gráficas, se puede observar cómo cambia el factor que determina la vida útil a partir de una determinada concentración de ácido ascórbico.

Otros autores también han encontrado que el factor limitante puede ser distinto de acuerdo al film utilizado para envasar un producto vegetal. Como ya se ha mencionado, el desarrollo de *off-odors* fue el factor que limitó la vida útil de repollo mínimamente procesado envasado en OPP, pero cuando se lo envasó en films de mayor permeabilidad,

los factores que limitaron su vida útil fueron la apariencia general y el marchitamiento (Pirovani et al., 1997).

Por otra parte, si se realiza el tratamiento químico con $c_c < 0.50\%$, cualquiera sea la concentración de ácido ascórbico utilizada, dentro del rango de trabajo determinado ($FAM \leq 5.70$, a la fecha de elaboración), el factor que limita la vida útil de espinaca mínimamente procesada envasada en LDPE es el recuento de flora aerobia mesófila.

El consumidor de productos vegetales mínimamente procesados evalúa la calidad en el momento de la compra, a través de los atributos sensoriales visuales. Teniendo en cuenta esto, y considerando solamente los atributos sensoriales visuales, se puede observar que para algunas concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico se pueden obtener tiempos de vida útil de hasta 14 días. Es decir, que a pesar de no existir signos obvios de alteración, los recuentos de microorganismo pueden estar en concentraciones peligrosamente altas, sin que se presenten síntomas que alerten al consumidor.

CAPÍTULO 4
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El presente trabajo de tesis ha permitido analizar el efecto conjunto del ácido cítrico, del ácido ascórbico, tipo de envase y tiempo de conservación refrigerada sobre la calidad de espinaca mínimamente procesada.

Los recuentos de flora aerobia mesófila (FAM) de las muestras envasadas en bolsas de polipropileno monoorientado (OPP) no fueron significativamente diferentes a los recuentos de las muestras envasadas en bolsas de polietileno de baja densidad (LDPE). Esto significaría que ambas atmósferas desarrolladas pasivamente en los envases de OPP y LDPE ejercieron el mismo efecto sobre el desarrollo de FAM.

El modelo desarrollado para representar el efecto de las concentraciones de los ácidos cítrico y ascórbico, y el tiempo de conservación refrigerada, resultó adecuado para representar los cambios de FAM en espinaca mínimamente procesada. La FAM disminuye a medida que aumenta la concentración de ácido cítrico. Aunque en menor medida, el ácido ascórbico también reduce la FAM, siendo su efecto más notable cuando se trabaja con bajas concentraciones de ácido cítrico. Por otra parte, se observa que el recuento de flora aerobia mesófila aumenta con el tiempo de conservación.

El modelo para FAM permite determinar las combinaciones de concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico que darían recuentos inferiores a $5 \cdot 10^5$ UFC/g ($FAM \leq 5.70$), que es el límite impuesto por la legislación francesa a la fecha de elaboración ($t=0$). Para cumplir con esta restricción, se debería trabajar, por ejemplo, con una concentración de ácido cítrico $c_C \geq 0.10\%$ ($X_1 \geq -0.8$) cuando la concentración de ácido ascórbico es de $c_A=1.00\%$ ($X_2 = 1$), ó una concentración de ácido cítrico $c_C \geq 0.50\%$ ($X_1 \geq 0$) cuando $c_A \geq 0.00\%$ ($X_2 \geq -1$).

También se analizó el efecto de las etapas de procesamiento de espinaca mínimamente procesada sobre el recuento de FAM. Se determinó que no existen diferencias entre los recuentos de FAM de la materia prima ($FAM_{MP} = 9.27$) y de la materia prima acondicionada ($FAM_{MPA} = 8.60$). Pero los recuentos de FAM de estas dos muestras son significativamente superiores a los obtenidos para espinaca lavada con agua clorada (STQ) y la tratada químicamente (TQ). Los recuentos de FAM de la espinaca tratada químicamente ($FAM_{TQ} = 5.40$) son significativamente inferiores a los de las muestras STQ ($FAM_{STQ} = 6.55$). Las muestras TQ fueron las únicas que presentaron recuentos inferiores al límite establecido por la legislación francesa a la fecha de elaboración ($FAM \leq 5.70$).

Se encontró que las 4 variables estudiadas influyen sobre el pH de espinaca. Los modelos desarrollados para el pH de espinaca envasada en bolsas de OPP y envasada en bolsas de LDPE fueron adecuados. Como era de esperar, para ambos tipos de envases, el pH de espinaca disminuye con el aumento de la concentración de ácido cítrico y la concentración de ácido ascórbico, siendo el efecto de la concentración de ácido cítrico sobre el pH mucho más significativo que el efecto producido por el aumento de la concentración de ácido ascórbico. Sin embargo, el efecto que ejercen ambos ácidos es mucho menos importante a los 7 y 14 días de almacenamiento refrigerado. En ningún caso, se obtuvieron valores de pH inferiores a 4, que era el límite por debajo del cual se modificarían las características organolépticas del vegetal fresco.

El pH de espinaca envasada en bolsas de OPP y LDPE aumentó durante el almacenamiento, independientemente de las concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico utilizadas en el tratamiento químico.

Por otra parte, se encontró que el pH de espinaca envasada en bolsas de OPP fue mayor al pH de espinaca envasada en bolsas de LDPE.

La composición gaseosa de la atmósfera desarrollada pasivamente en el interior de los envases de espinaca mínimamente procesada fue significativamente diferente para los 2 tipos de bolsas utilizadas. En ambos casos, las concentraciones de CO₂ y O₂ se modificaron durante el almacenamiento refrigerado.

Los modelos propuestos para la concentración de CO₂ y O₂ en el interior de los envases de OPP y LDPE, resultaron adecuados para representar los cambios en la composición gaseosa en el interior de los envases de espinaca mínimamente procesada.

Durante el almacenamiento, la concentración de CO₂ aumentó y la concentración de O₂ disminuyó. En los envases de OPP, se alcanzaron concentraciones de CO₂ superiores y de O₂ inferiores a las obtenidas en los envases de LDPE, como resultado de la menor permeabilidad a los gases del OPP.

Las concentraciones de CO₂ y O₂ en el interior de los envases de OPP, a diferencia de las obtenidas en los envases de LDPE, superaron los límites recomendados para espinaca luego de 6-8 días de almacenamiento, alcanzando concentraciones de CO₂ superiores al 13.00 % y de O₂ inferiores al 0.80%.

La calidad sensorial de espinaca mínimamente procesada disminuyó con el tiempo de conservación refrigerada. El tipo de film utilizado para envasar espinaca sólo afectó significativamente el desarrollo de *off-odors*, no encontrándose diferencias entre los atributos sensoriales visuales de espinaca envasada en los dos films.

Los modelos de predicción propuestos para el desarrollo de *off-odors* en los envases de OPP y en los envases de LDPE, y para la apariencia general, marchitamiento, amarronamiento y color, resultaron adecuados.

Las muestras envasadas en OPP, a diferencia de las envasadas en LDPE, presentaron desarrollo de *off-odors* para las mismas condiciones de tratamiento químico y tiempo de almacenamiento.

La apariencia general y amarronamiento no se modificaron significativamente para concentraciones de ácido ascórbico de 0.00 a 0.50% cuando $c_C = 0.50\%$. Para c_A superiores a 0.50%, se produce una rápida disminución de la calidad sensorial asociada a estos atributos.

El marchitamiento fue afectado por el tiempo de conservación y en menor medida por la concentración de ácido ascórbico. Se encontró que concentraciones de ácido ascórbico superiores a 0.75 % afectaban el marchitamiento.

El color de espinaca, solamente se vió afectado por el tiempo de conservación.

La pérdida de color verde de espinaca, está asociada a la pérdida de clorofila. Similarmente a lo encontrado para la evaluación sensorial del color, la retención de clorofila, luego de 14 días de almacenamiento refrigerado no fue afectada por el tratamiento químico ni por el tipo de envase. Luego de 14 días, se obtuvo una retención de clorofila total del 95,17% (87.60 mg clorofila total/100 g vegetal fresco), a la que le correspondería un valor de 6.5-7.5 (verde suave) en la evaluación sensorial, de acuerdo al modelo de predicción. Durante el almacenamiento, se mantuvo la relación clorofila a/b = 3.00 y la cantidad de feofitina b (1.62 mg/100 g vegetal fresco), no encontrándose feofitina a en ningún caso.

No se encontraron diferencias en las pérdidas de peso de las muestras envasadas en OPP y LDPE. El tratamiento químico tampoco influyó sobre la pérdida de peso. Las muestras perdieron 0.13% y 0.24% de peso luego de 7 y 14 días de almacenamiento, respectivamente. Los bajos valores obtenidos indicaron que ambos tipos de films redujeron efectivamente la pérdida de peso.

Se consideró que la vida útil de espinaca mínimamente procesada podría estar limitada por los recuentos de FAM ($FAM \leq 7.70$), según la legislación francesa, ó por la intensidad de los atributos sensoriales (Intensidad atributo ≤ 7).

Se determinó que el desarrollo de *off-odors*, asociado a una concentración de CO₂ superior al 10 %, fue el factor limitante para las muestras envasadas en bolsas de OPP.

El marchitamiento, amarronamiento y color no fueron factores limitantes de la vida útil de espinaca mínimamente procesada almacenada a 4 °C, ya que siempre tuvieron valores superiores a 7 cuando la FAM alcanzó el valor límite de 7.70.

Dependiendo del tratamiento químico utilizado, la apariencia general podría ser el factor que limita la vida útil. Por ejemplo, para $c_C = 0.50\%$, el recuento de FAM es el factor limitante si $0.00\% \leq c_A < 0.94\%$, y para $c_A \geq 0.94\%$, el factor limitante es la apariencia general. De manera similar, si $c_C = 1.00\%$, FAM limita la vida útil si $0.00\% \leq c_A < 0.71\%$, y para $c_A \geq 0.71\%$, la apariencia general limita la vida útil. Esto indicaría, que para algunos tratamientos químicos donde no se presentan signos obvios de alteración, los recuentos de microorganismos pueden estar presentes en concentraciones peligrosamente altas.

A partir de este trabajo, se plantea la posibilidad de estudiar el efecto combinado de los tratamientos químicos y tipo de envase, dentro del rango de trabajo determinado, sobre el desarrollo de microorganismos patógenos que potencialmente podrían estar presentes en este tipo de productos, a través de ensayos de inoculación.

Además, se propone analizar el efecto de los factores combinados estudiados sobre la biodisponibilidad de hierro y calcio en espinaca, ya que el tratamiento con ácido cítrico y ácido ascórbico ha sido efectivo en otros alimentos.

Finalmente, se debería estudiar la efectividad de los tratamientos utilizados y la aplicabilidad de los modelos desarrollados en otros vegetales de hojas listos para usar.

ANEXO

ANEXO

5.1. COMPROBACIÓN DE LA VALIDEZ DEL MODELO SELECCIONADO

5.1.1. Consideraciones generales

Para poder utilizar el análisis de variancia (ANOVA), se requiere que se satisfagan ciertas suposiciones. Específicamente dichos supuestos consisten en que todas las observaciones sean descriptas adecuadamente mediante el modelo y que los errores sean independientes y estén normalmente distribuidos con media cero y variancia constante. Si estas suposiciones son válidas, el procedimiento de análisis de variancia constituye una prueba exacta.

Estas suposiciones pueden no cumplirse con exactitud en la práctica. En consecuencia, es imprudente depender del ANOVA mientras no se hayan comprobado estos supuestos. Las violaciones a estas suposiciones básicas y a la bondad del modelo pueden ser investigadas fácilmente examinando los residuos.

El residuo de la observación j del tratamiento i (e_{ij}) se define mediante,

$$e_{ij} = y_{ij} - Y_{ij}$$

donde: e_{ij} : residuo de la observación j del tratamiento i

y_{ij} : valor experimental de la observación j del tratamiento i

Y_{ij} : valor estimado con el modelo, de la observación j del tratamiento i

El examen de los residuos debe ser automático en el análisis de variancia. Si el modelo es adecuado, los residuos no deben tener estructura. En otras palabras, no debe haber patrones obvios.

5.1.2. Comprobación de la idoneidad del modelo

Las suposiciones que fundamentan el análisis de variancia son que los datos estén descriptos de manera adecuada por el modelo y que los errores sean independientes y estén normalmente distribuidos con media cero y variancia constante.

Las principales herramientas para el diagnóstico están basadas en los residuos. En otras palabras, los residuos del i -ésimo tratamiento se determinan restando el promedio del tratamiento a cada observación dentro del tratamiento. Usualmente la comprobación de idoneidad (o adecuación) del modelo consiste en graficar los residuos. Se recomienda que tal comprobación de diagnóstico sea un paso de rutina en cada proyecto de diseño experimental.

Suposición de igualdad u homogeneidad de la variancia

Si el modelo es correcto y las suposiciones se satisfacen, los residuos no deben tener algún patrón, ni deben estar relacionados con alguna otra variable, incluyendo la respuesta (y_{ij}). Una comprobación sencilla consiste en graficar los residuos contra los valores ajustados o predichos (Y_{ij}). En esta gráfica no debe revelarse ningún patrón obvio (Figuras 5. a).

Suposición de independencia

Graficar los residuos en función del orden de tiempo en el que se recopilaron los datos (número de ensayo), es útil para detectar alguna correlación entre ellos. Una tendencia a tener rachas positivas o negativas indica una correlación positiva. Esto implica que la suposición de independencia de los residuos ha sido violada (5. b).

Suposición de normalidad

Una forma para comprobar la suposición de normalidad consiste en construir una gráfica de probabilidad normal de los residuos. Es la representación de la distribución acumulada de los residuos sobre papel de probabilidad normal. Si la distribución de los errores es normal, esta gráfica parecerá una línea. Al visualizar dicha línea hay que poner más énfasis en los valores centrales de la gráfica que en los extremos.

Se dice que el análisis de variancia es consistente o robusto ante la suposición de normalidad porque la prueba F se ve muy poco afectada en este caso (5. c).

5.2. GRÁFICOS DE DIAGNÓSTICOS

A continuación se presentan los gráficos de diagnósticos correspondientes a los modelos de predicción seleccionados para cada respuesta.

Figura 5.1
Gráficos de diagnóstico para el modelo de pH

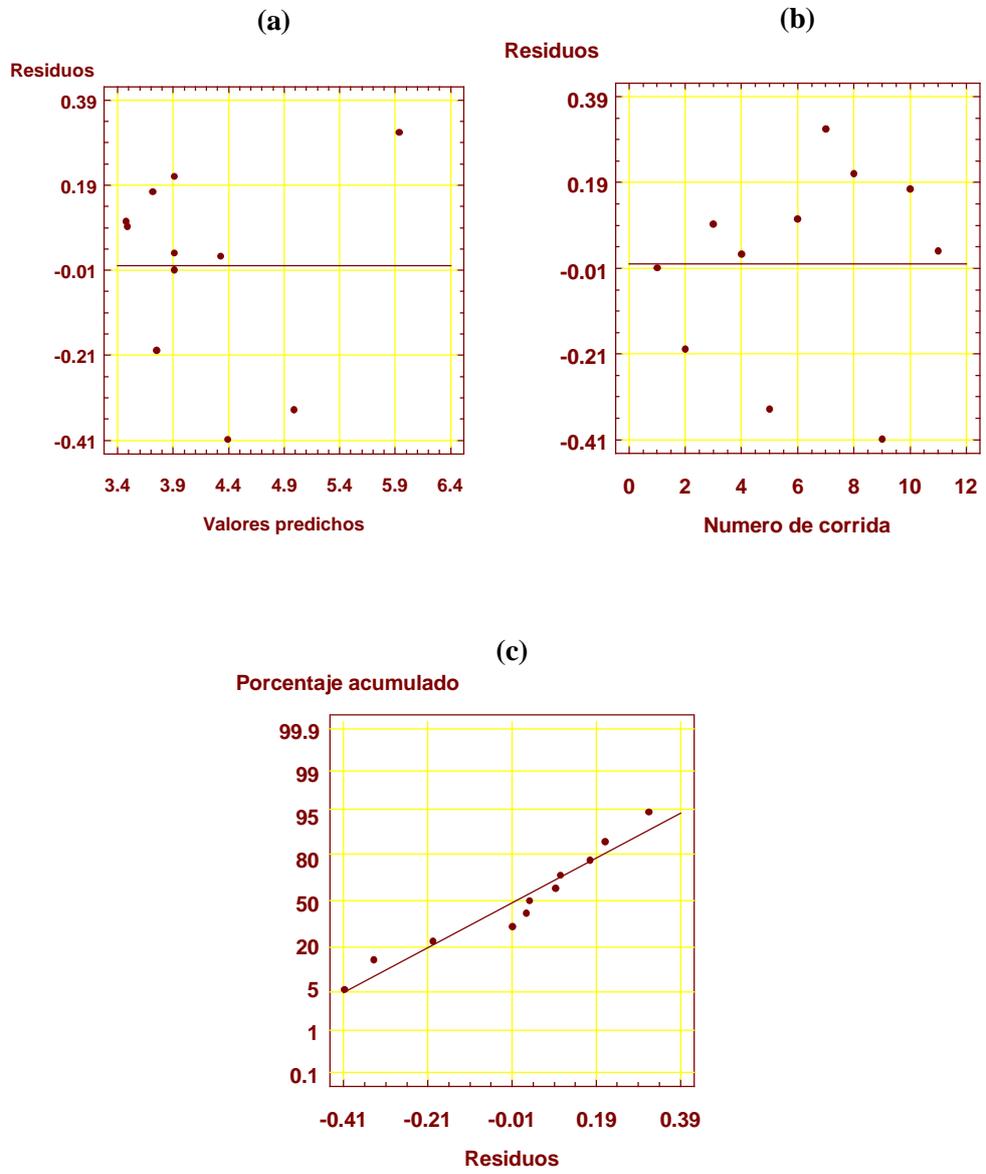


Figura 5.2

Gráficos de diagnóstico para el modelo de FAM de espinaca

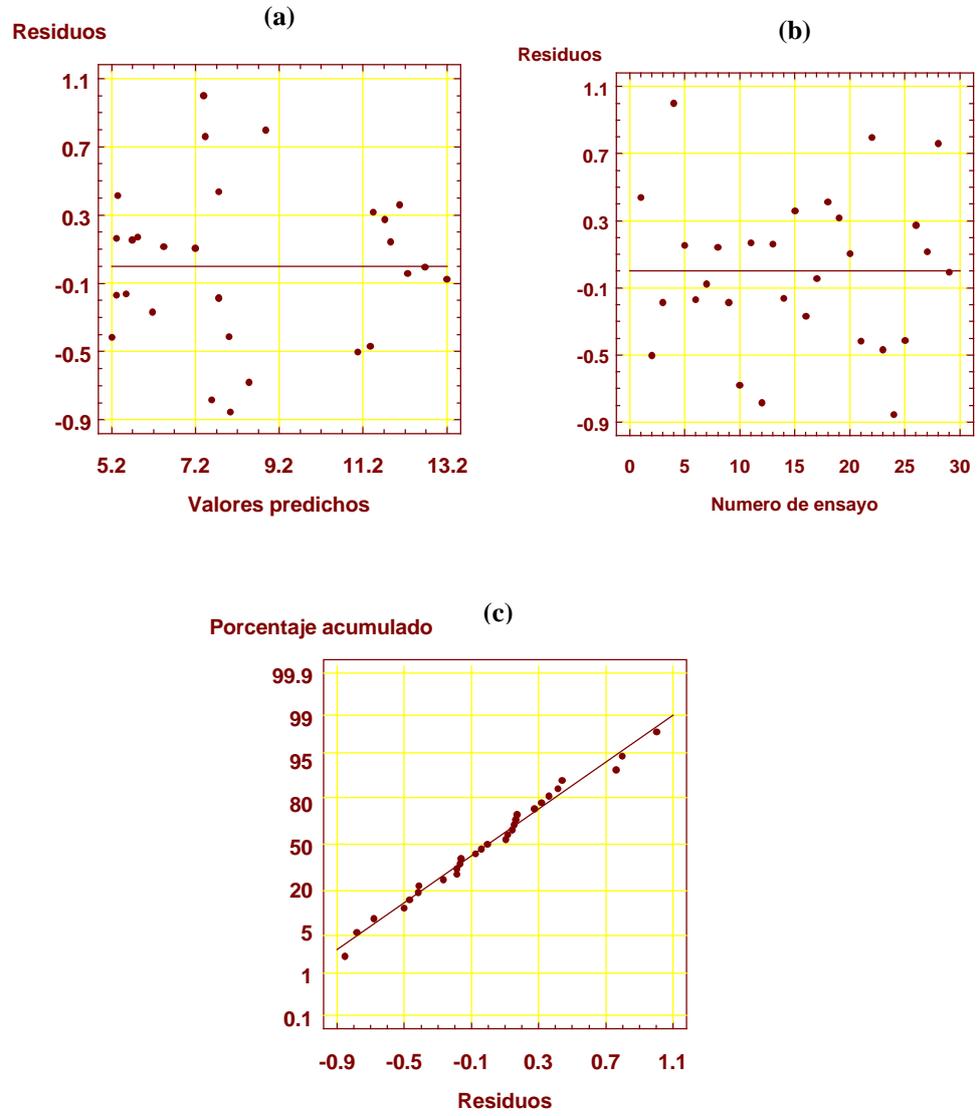


Figura 5.3

Gráficos de diagnóstico para el modelo de pH de espinaca envasada en OPP

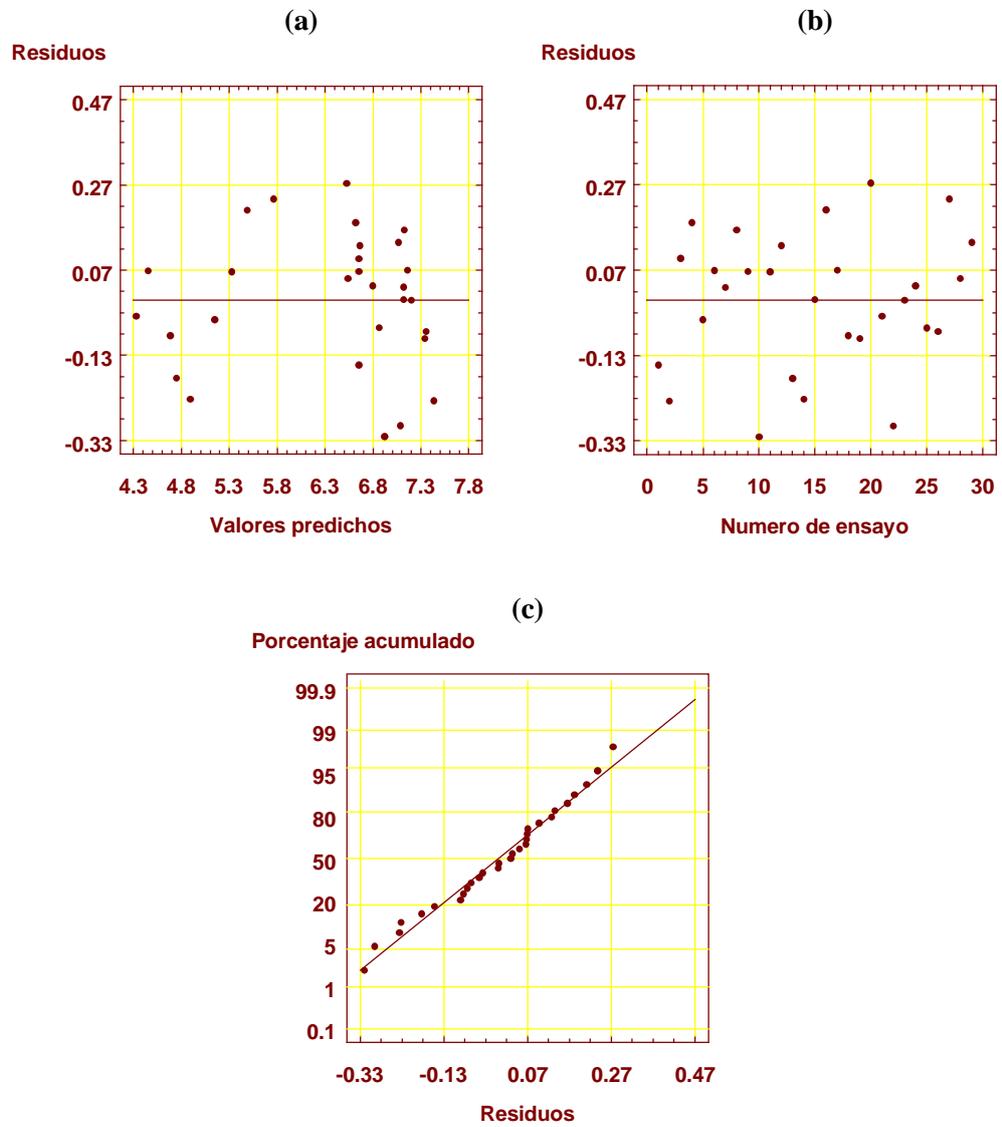


Figura 5.4
Gráficos de diagnóstico para el modelo de pH de espinaca envasada en LDPE

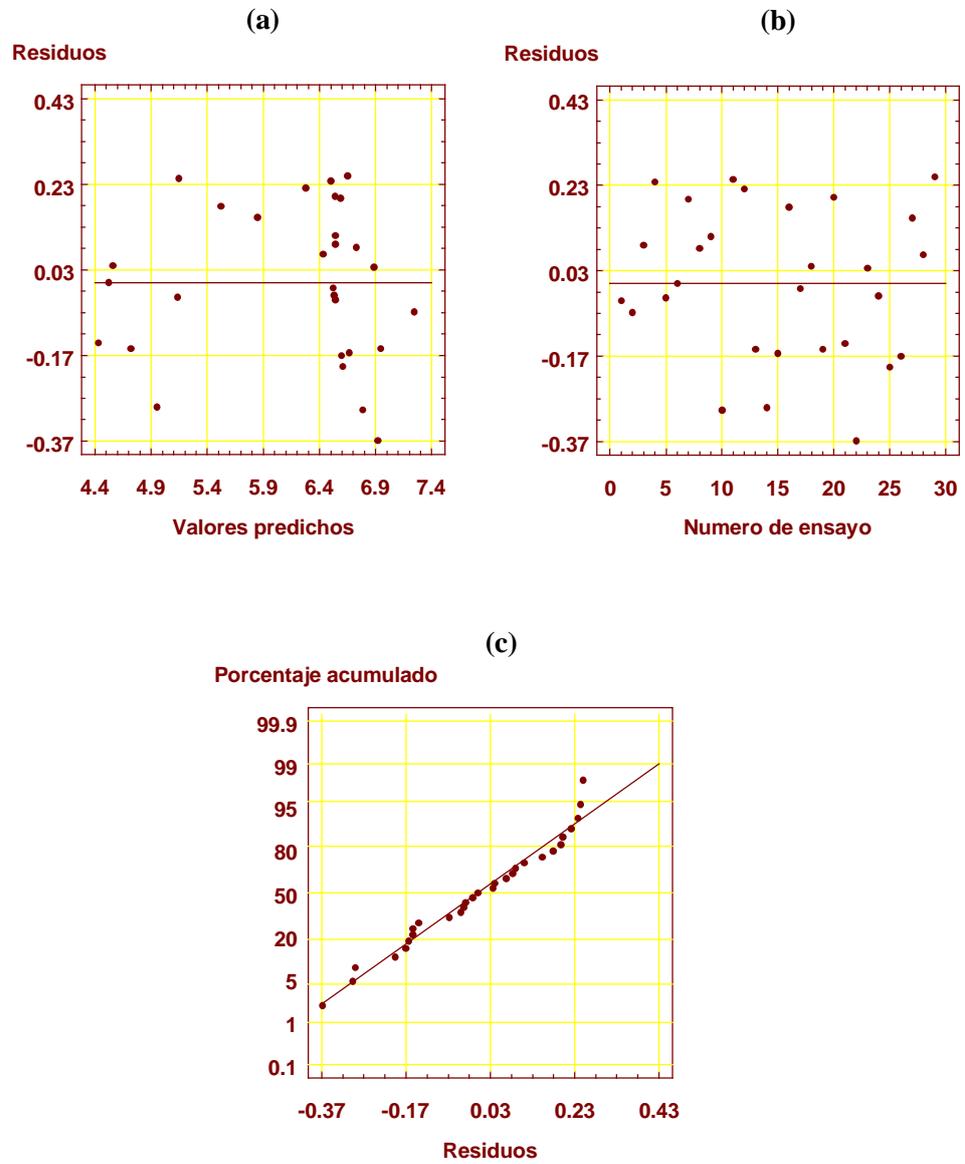


Figura 5.5

Gráficos de diagnóstico para el modelo de CO₂ de espinaca envasada en OPP

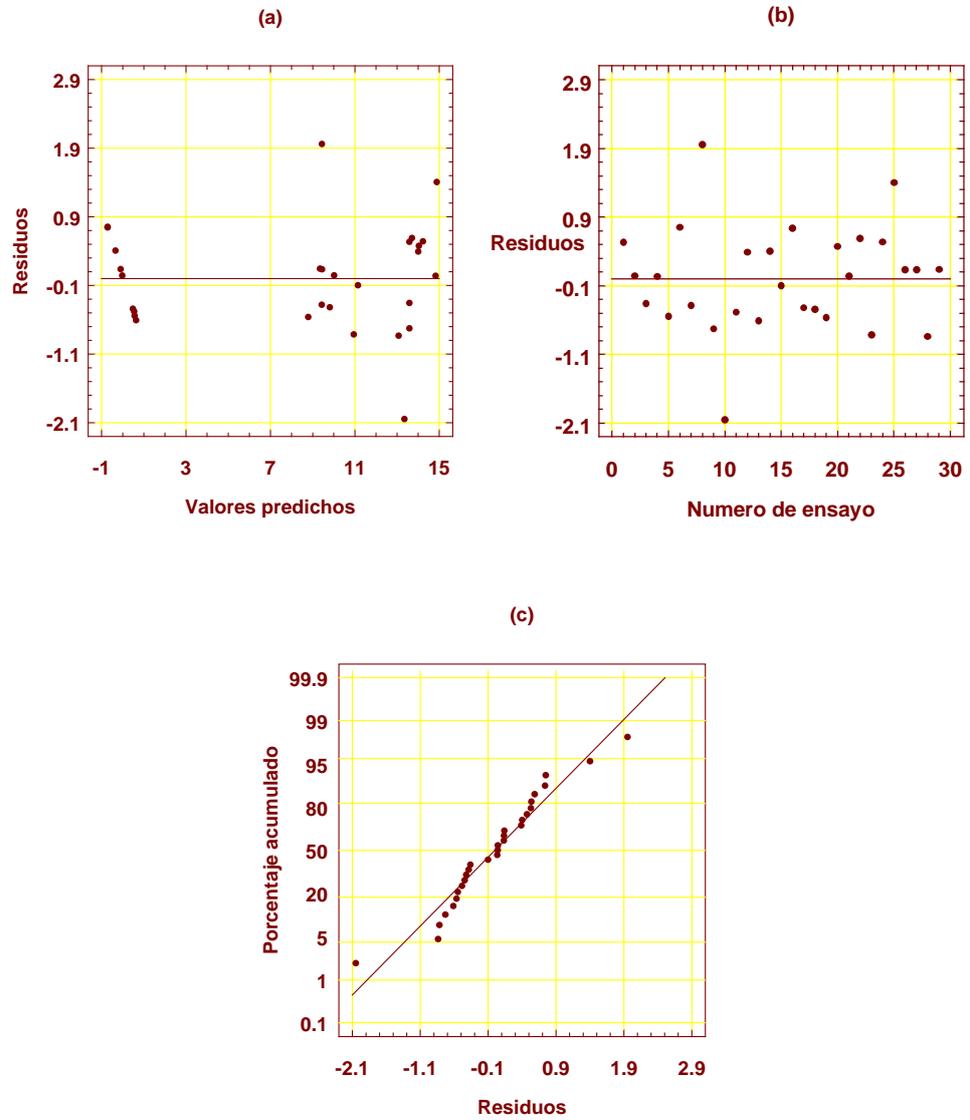


Figura 5.6
Gráficos de diagnóstico para el modelo de O_2 de espinaca envasada en OPP

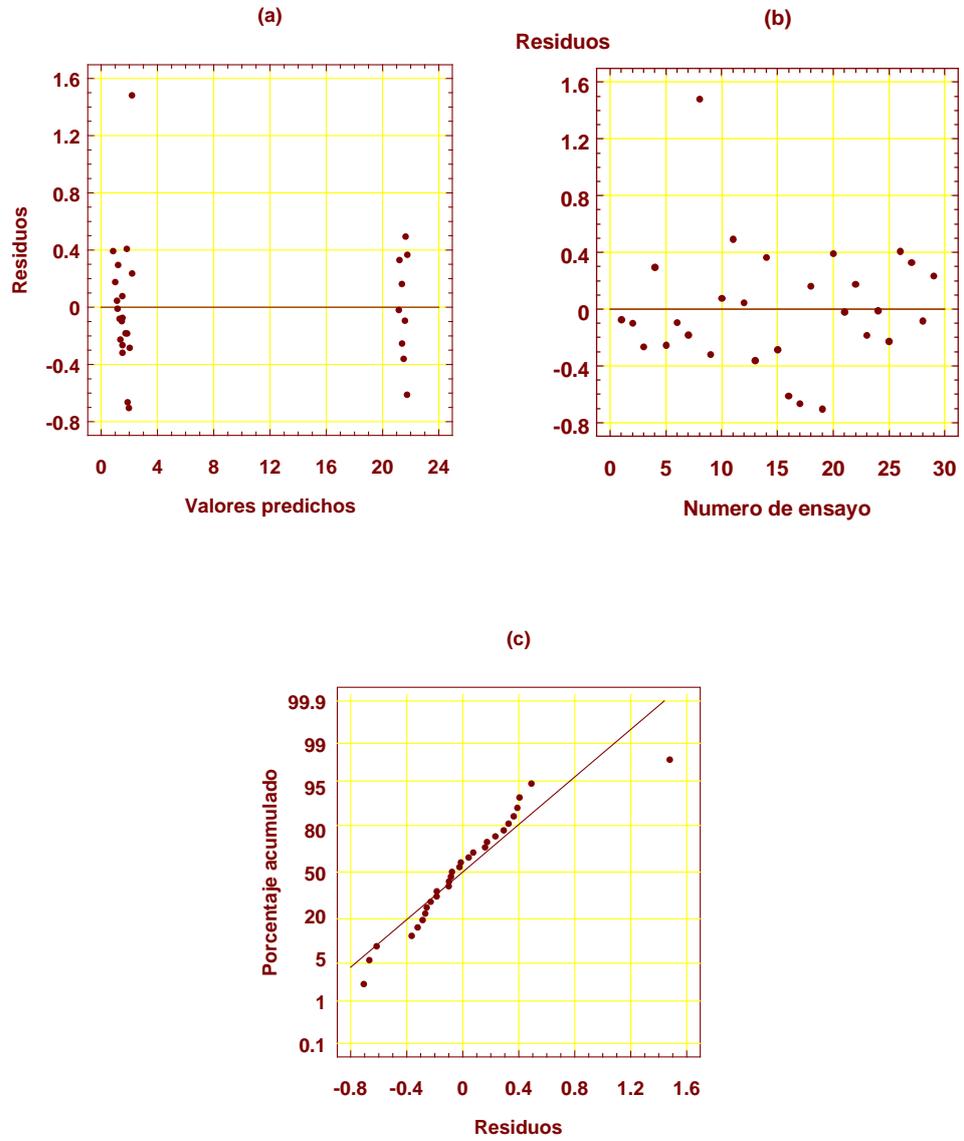


Figura 5.7

Gráficos de diagnóstico para el modelo de CO₂ de espinaca envasada en LDPE

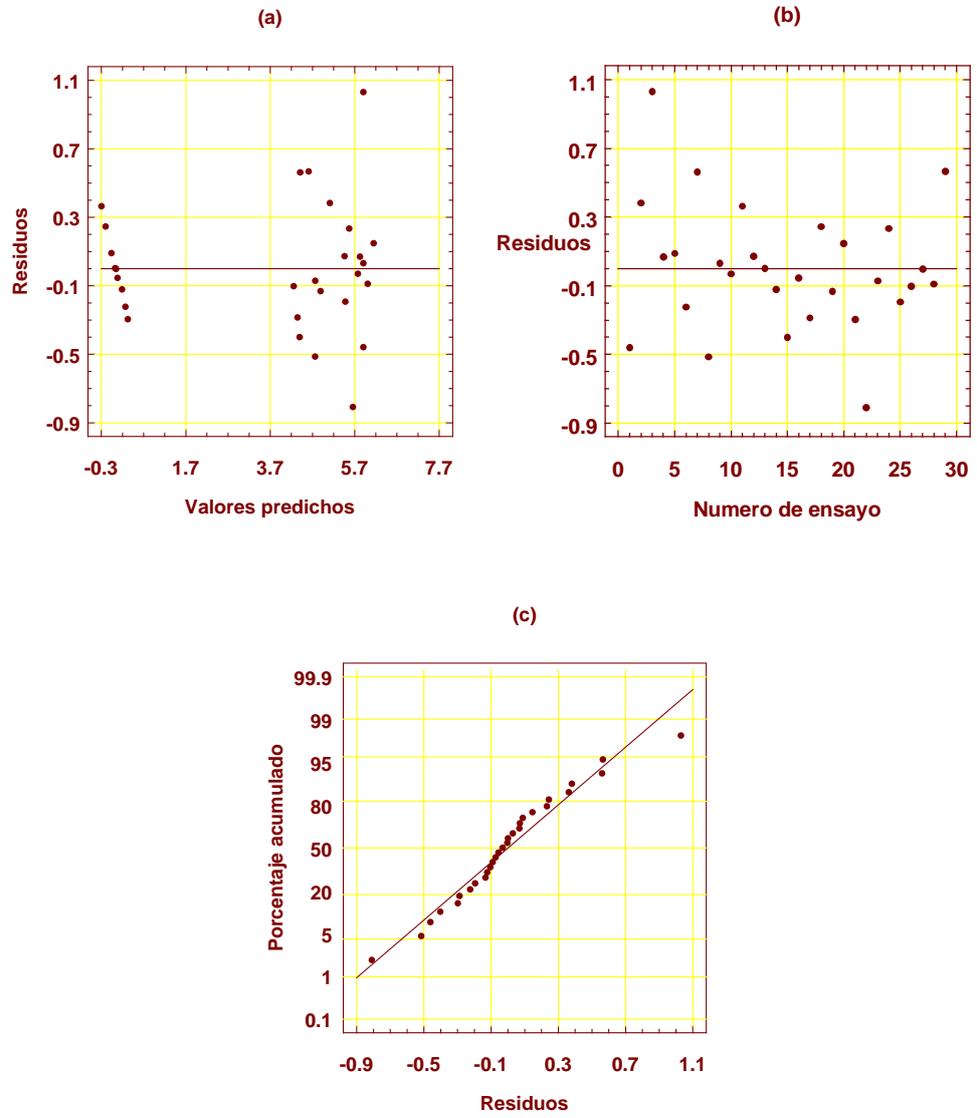


Figura 5.8

Gráficos de diagnóstico para el modelo de O_2 de espinaca envasada en LDPE

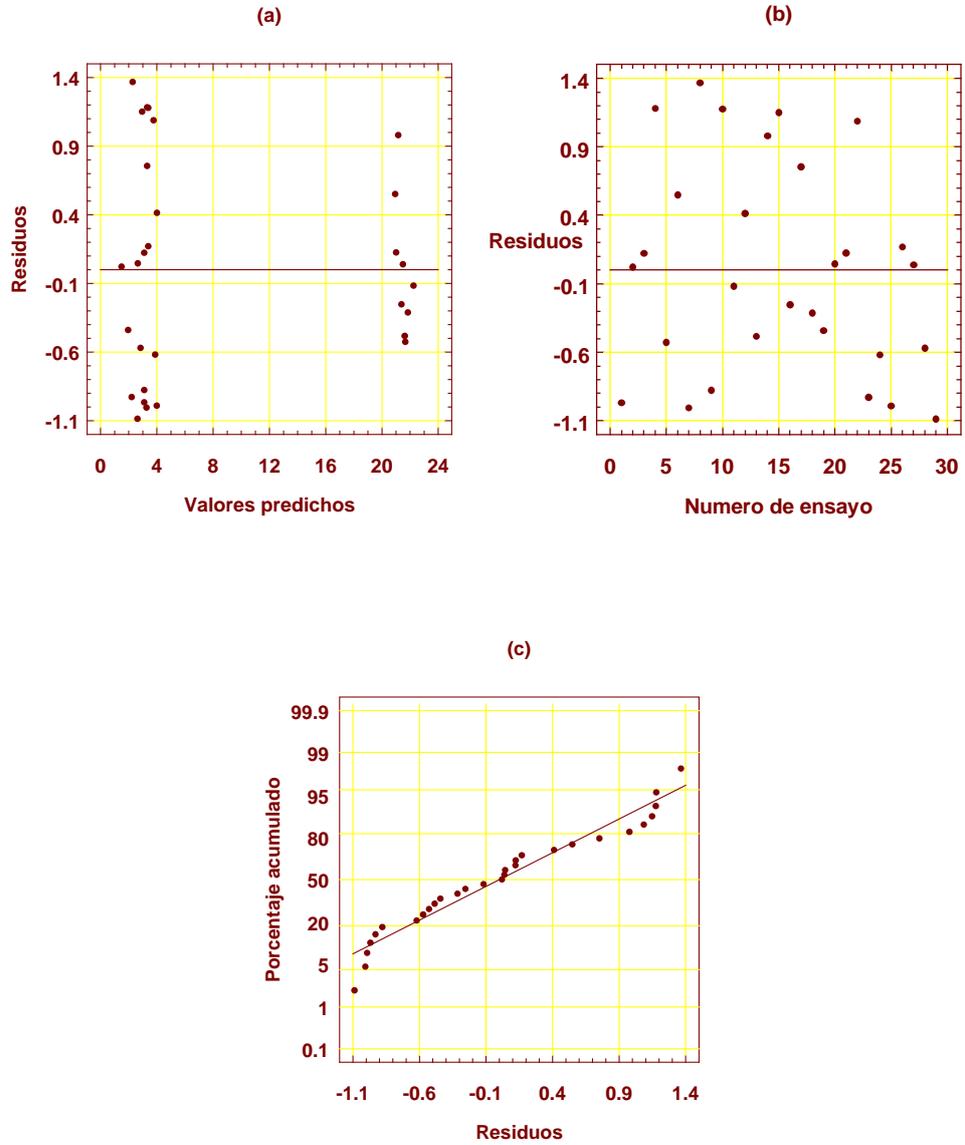


Figura 5.9

Gráficos de diagnóstico para el modelo de off-odors de espinaca envasada en OPP

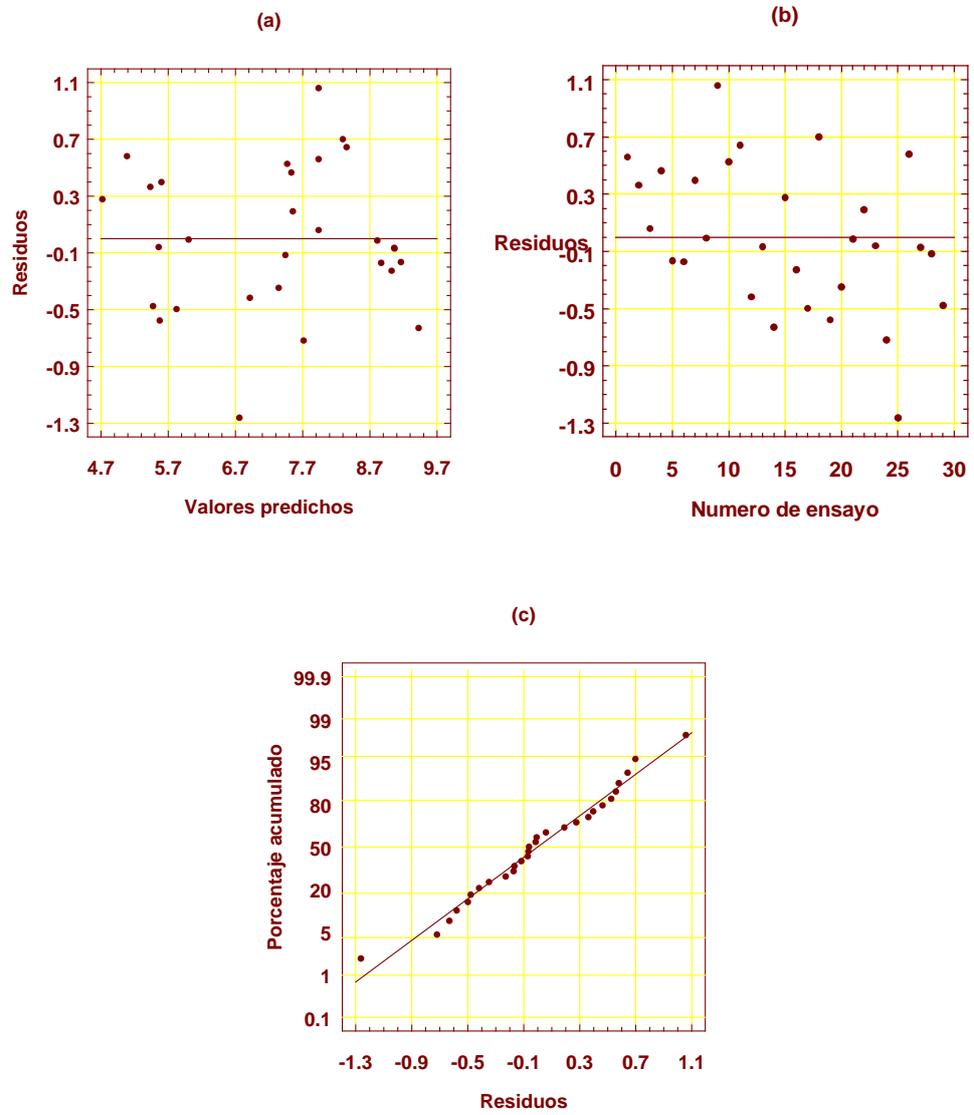


Figura 5.10

Gráficos de diagnóstico para el modelo de off-odors de espinaca envasada en LDPE

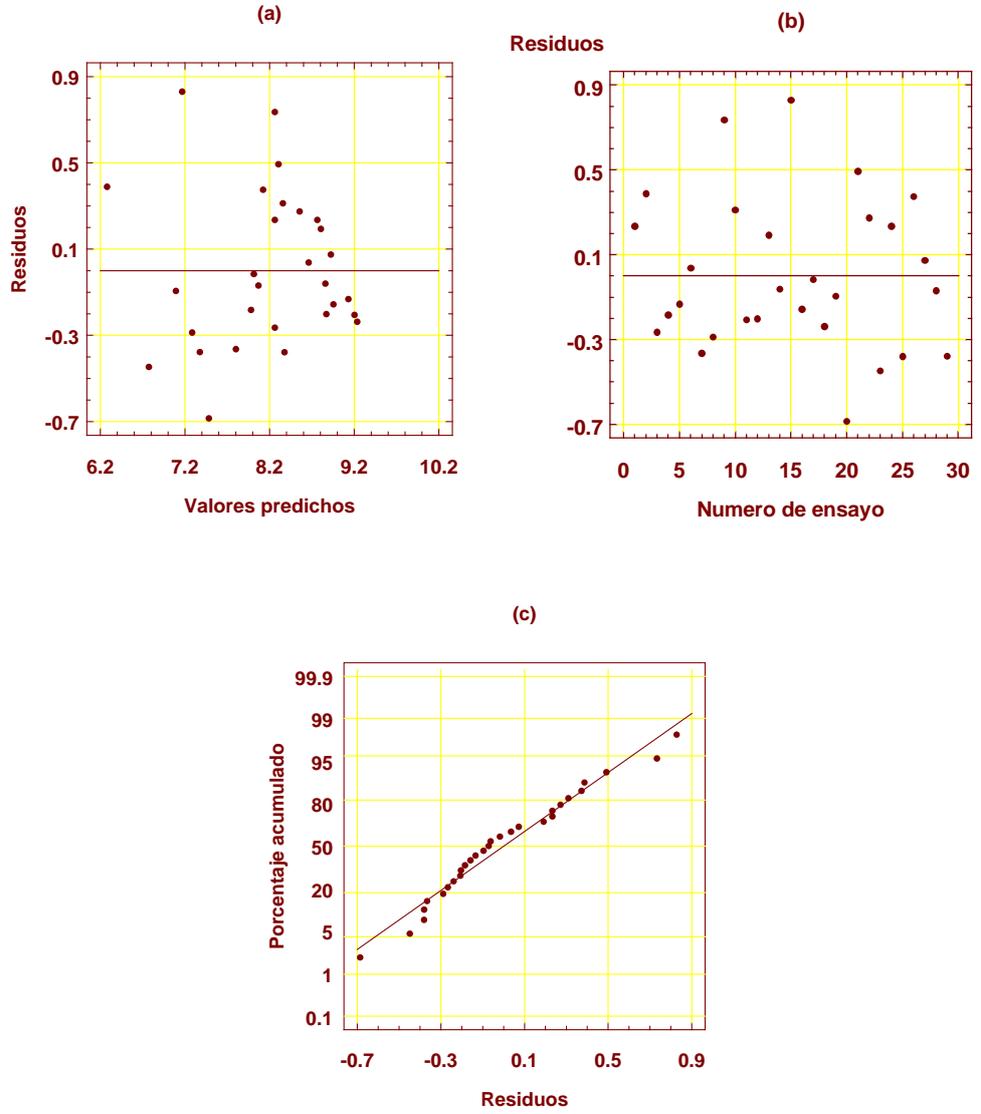


Figura 5.11

Gráficos de diagnóstico para el modelo de Apariencia General de espinaca mínimamente procesada

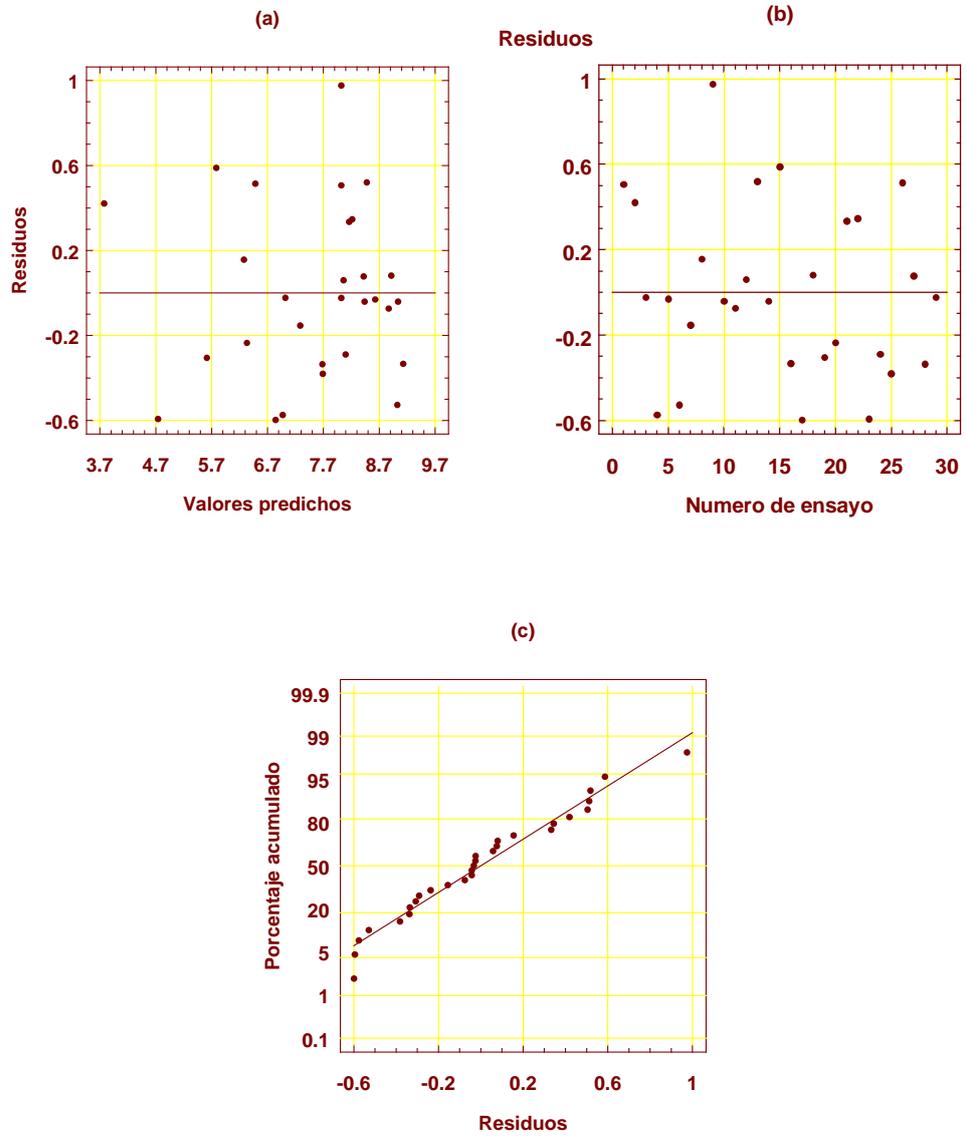


Figura 5.12

Gráficos de diagnóstico para el modelo de Marchitamiento de espinaca mínimamente procesada

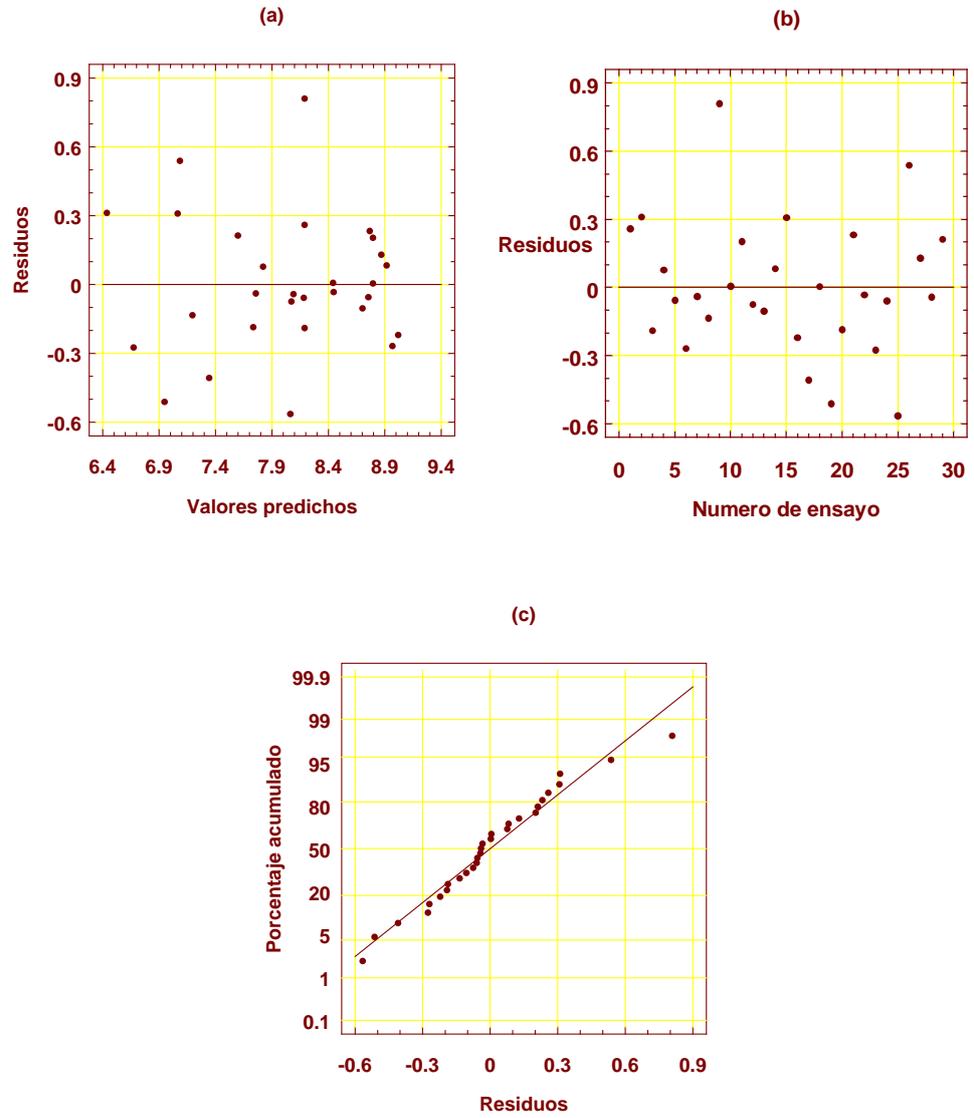


Figura 5.13

Gráficos de diagnóstico para el modelo de Amarramiento de espinaca mínimamente procesada

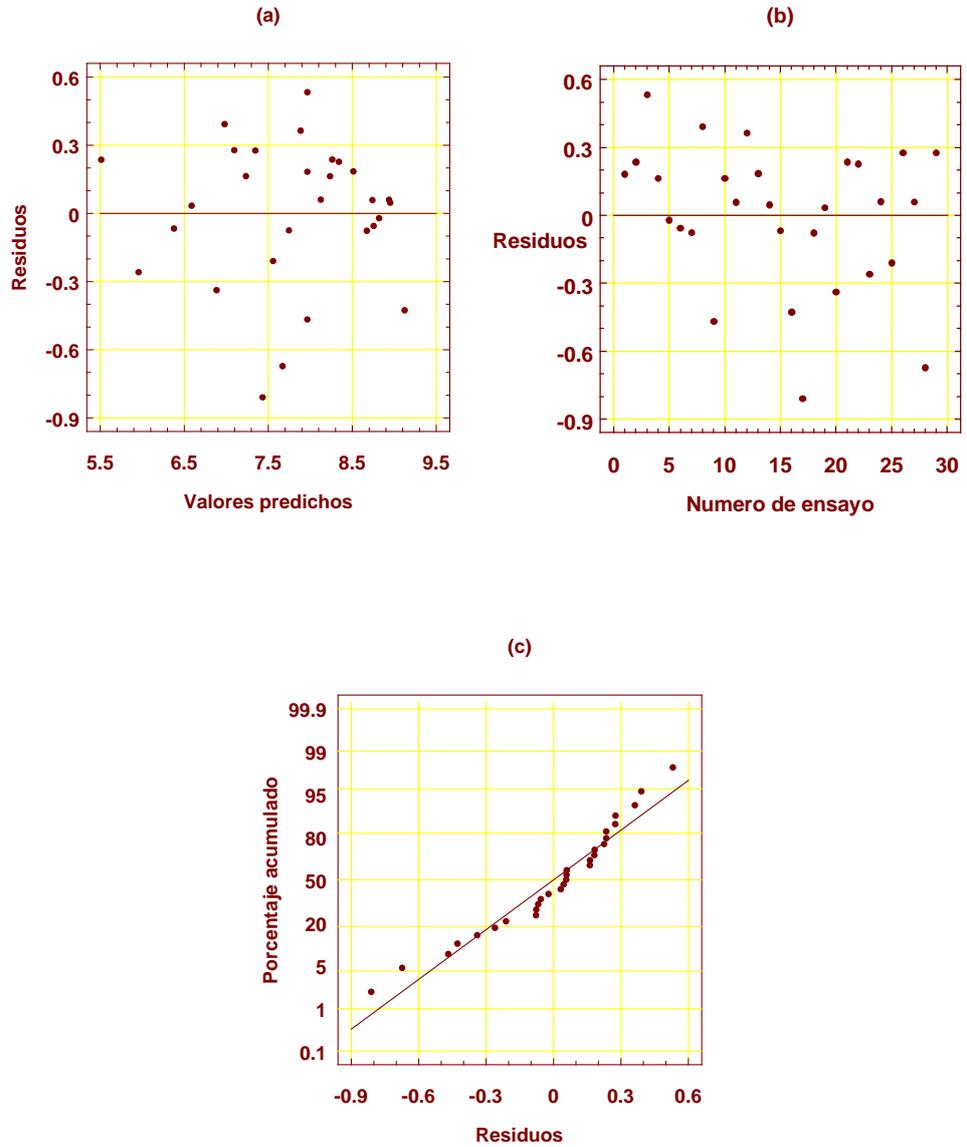
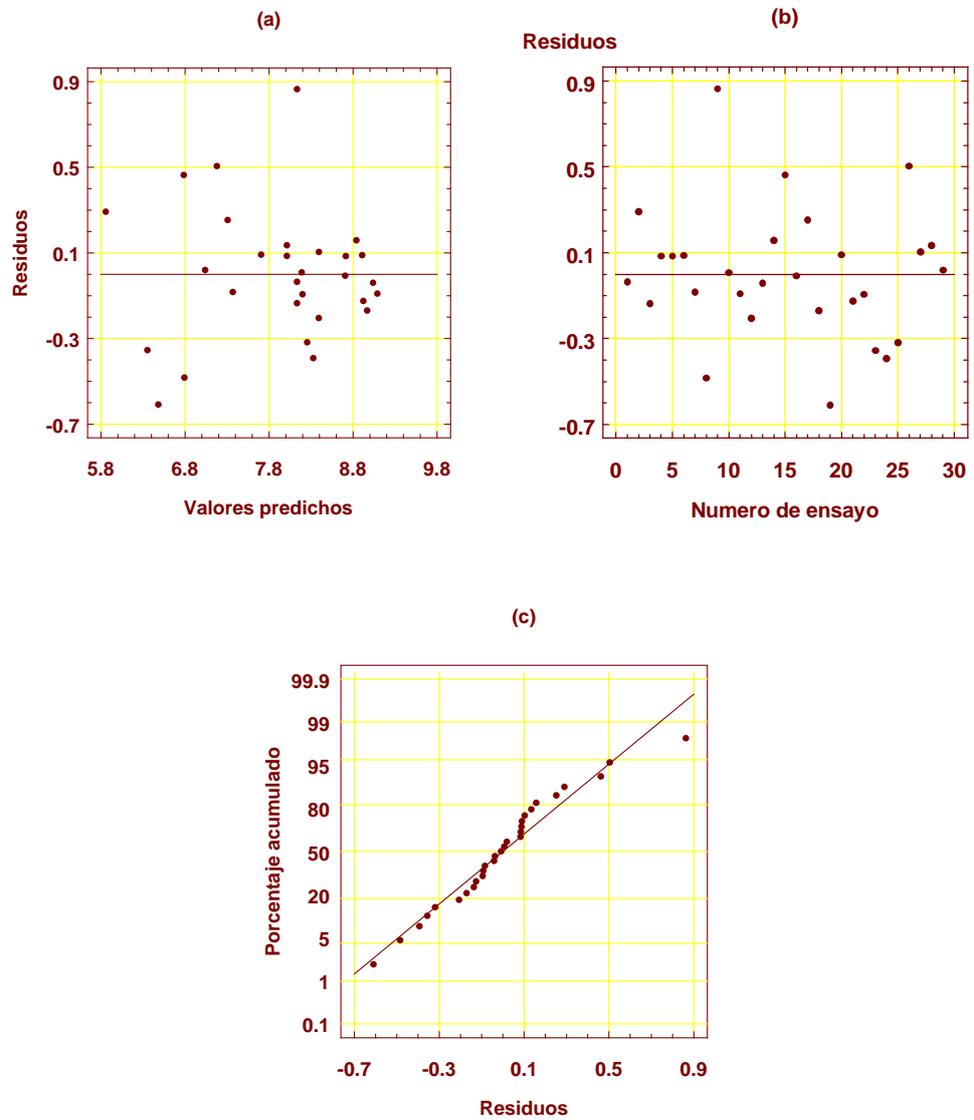


Figura 5.14

Gráficos de diagnóstico para el modelo de Color de espinaca mínimamente procesada



NOMENCLATURA

NOMENCLATURA

A_{666} , A_{655} , A_{536} : Absorbancia a 666, 655 y 536 nm, respectivamente

a_i : Ordenada al origen de la regresión lineal, [mV.s]

A_i : Área bajo el pico cromatográfico, [mV.s]

AM: Atmósfera modificada

b_i : Coeficientes de las ecuaciones de segundo orden

c_A : Concentración de ácido ascórbico, [g/100 ml]

c_C : Concentración de ácido cítrico, [g/100 ml]

Cl_j : Concentración de clorofila a, b ó total realmente presente en la muestra, [mg/L]

CR: Cociente de respiración

d: Diámetro del canasto removible de la centrífuga, [pulgadas]

EAM: Envasado en atmósfera modificada

e_{ij} : Residuo de la observación j del tratamiento i

F calc.: Valor del estadístico F-Snedecor calculado

F j: Concentración de feofitina a, b ó total en el extracto convertido, [mg/L]

f: Tipo de film

FAM: Flora aerobia mesófila, [log(UFC/g)]

F_c : Fuerza centrífuga, [G]

F_{Ri} : Factor de respuesta de CO₂, O₂ ó N₂, [mV.s/ml]

G.L.: Grados de libertad

HDPE: Polietileno de alta densidad

HR: Humedad relativa, [%]

Ie:	Índice de escurrido, [%]
LDPE:	Polietileno de baja densidad
LLDPE:	Polietileno lineal de baja densidad
M ₀ :	Peso de la muestra a los 0 días, [g]
MDPE:	Polietileno de mediana densidad
MP:	Materia prima
MPA:	Materia prima acondicionada
M _x :	Peso de la muestra a los 7 ó 14 días, [g]
N:	Microorganismos aerobios mesófilos, [UFC/g]
n:	Velocidad de centrifugación, [rpm]
OPP:	Polipropileno monoorientado
P justo:	Valor de probabilidad del estadístico calculado
Pa:	Peso de espinaca antes del lavado, [g]
P _{CO2} :	Permeabilidad al CO ₂ , [cm ³ /m ² .24 h. atm]
Pd:	Peso de espinaca después del escurrido centrífugo, [g]
pH _{OPP} :	pH de espinaca envasada en bolsas de OPP
pH _{PE} :	pH de espinaca envasada en bolsas de LDPE
P _{O2} :	Permeabilidad al O ₂ , [cm ³ /m ² .24 h. atm]
PP:	Polipropileno
PS:	Poliestireno
PVC:	Cloruro de polivinilo
R:	Coefficiente de correlación

R^2 :	Coefficiente de determinación
STQ:	Espinaca acondicionada, lavada y centrifugada
t:	Tiempo de conservación a 4 °C, [días]
TCD:	Detector de conductividad térmica
TQ:	Espinaca acondicionada, lavada, tratada químicamente y escurrida
V_i :	Volumen inyectado de CO ₂ , O ₂ ó N ₂ , [ml]
X_k :	Variables codificadas
Y_{ij} :	Valor estimado con el modelo, de la observación j del tratamiento i
y_{ij} :	Valor experimental de la observación j del tratamiento i
Y_k :	Respuesta del sistema
% Cl j:	Concentración de clorofila a, b ó total en el vegetal fresco, [mg/100 g]
% F j:	Concentración de feofitina a, b ó total en el vegetal fresco, [mg/ 100 g]
% i:	Concentración de CO ₂ , O ₂ ó N ₂ , [ml/100 ml]
% R Cl j:	Retención de clorofila a, b ó total a los 14 días de almacenamiento
%Pp _x :	Pérdida de peso de la muestra a lo x días, [g/100 g]
ΔA_{662} , ΔA_{645} :	Diferencia de absorbancia entre la muestra original y convertida a 662 y 645 nm, respectivamente

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abe, K.; Watada, A.E. 1991. Ethylene absorbent to maintain quality of lightly processed fruits and vegetables. *J. Food. Sci.* 56 (6) 1589-1592.
- Alzamora, S.M. 1997. Preservación I. Alimentos conservados por factores combinados. En *Temas en Tecnología de Alimentos*. CYTED e Instituto Politécnico Nacional. México.
- Alzamora, S.M. 1998. Application of combined factors technology in minimally processed foods. En *Sous vide and cook-chill processing for the food industry*. Aspen Publishers, Inc. USA.
- Anónimo. 1989. Dispositions concernant le produit fini. En *Guide de Bonnes pratiques Hygiéniques concernant les produits végétaux dits de la IV^e Gamme*. Extrait du *bulletin officiel de la République Française*. Ctifl, París, Francia.
- Anónimo. 1999. Alimentos de Santa Fe. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Industria y Comercio del Gobierno de la Provincia de Santa Fe. Argentina.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis 16th. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- APHA. 1984. Compendium of methods for microbiological examination of foods. American Public Health Association. 2^{da} Edición. Editor Marvin L. Speck. Washington, D.C., EE.UU.
- Aworh, O.C.; Hicks, J.R.; Lee, C.Y.; Minotti, P.L. 1980. Effects of chemical treatments and controlled atmospheres on postharvest nitrate-nitrite conversion in spinach. *J. Food Sci.* 45, 496-498/501.
- Baardseth, P.; von Elbe, J.H. 1989. Effect of ethylene, free fatty acid, and some enzyme systems on chlorophyll degradation. *J. Food Sci.* 54(5) 1361-1363.

-
- Babic, I.; Roy, S.; Watada, A.E.; Wergin, W.P. (1996) Changes in microbial population on fresh cut spinach. *International Journal of Food Microbiology* 31,107-119.
 - Babic, I.; Watada, A.E. 1996. Microbial populations of fresh-cut spinach leaves affected by controlled atmospheres. *Postharvest Biology and Technology* 9, 187-193.
 - Barrett, D.M. 1996. Special treatments to maintain product quality. En *Fresh-cut products: Maintaining Quality and Safety*. University of California, Davis, EE.UU.
 - Barriga, M.I.; Tracy, G.; Willemot, C.; Simard, R.E. 1991. Microbial changes in shredded iceberg lettuce stored under controlled atmosphere. *J. Food Sci.* 56(6), 1586-1588.
 - Barry-Ryan, C.; O'Beirne, D. 1998. Quality and shelf-life of fresh cut carrot slices as affected by slicing method. *J. Food Sci.* 63(5), 851-856.
 - Berger, H.; Galletti, L.; Escalona, V.; Sáenz, C. 1997. Modified atmosphere and ascorbic acid for minimally processed lettuce. CA'97. Proceedings vol.5: Fresh-cut fruits and vegetables and MAP. Universidad de California.USA.
 - Berrang, M.E.; Brackett, R.E.; Beuchat, L.R. 1989. Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere. *J. Food Protection* 54:702-705.
 - Beuchat, L.; Brackett, R.E. 1990. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. *J.Food Sci.* 55(3), 755-758.
 - Beuchat, L.R.; Golden, D.A. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* 43(1) 134-142.
 - Bolin, H.R.; Stafford, A.E.; King, J.R. and Huxsoll; C.C. 1977. Factors affecting the storage stability of shredded lettuce. *J. Food Sci.* 42 (5), 1319-1321.
 - Borenstein, B. 1987. The role of ascorbic acid in foods. *Food Technol.* 41(11):98.
 - Bowker, A.H.; Lieberman, G.J. 1985. Estadística para ingenieros. Editorial Calypso, S.A. México, D.F.

-
- Brackett, R.E. 1994. Microbiological spoilage and pathogens in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. En *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables*. Ed.R.C. Wiley. Chapman & Hall. EE.UU.
 - Brecht, J.K. 1995. Physiology of lightly processed fruits and vegetables. *Hortscience*, 30(1), 18-22.
 - Browning, D. R. 1971. Cromatografía. Toray - Masson, S. A.. Barcelona. España.
 - Burgheimer, F.; McGill, J.N.; Nlson, A.I.; Steinberg, M.P. 1967. Chemical changes in spinach stored in air and controlled atmosphere. *Food Technol.* 21:1273-1275.
 - Cantwell, M. 1996. Fresh-cut products: Maintaining quality and safety. University of California, Davis, U.S.A.
 - Carbonell, X. 1990. La IV Gama. *Horticultura* , 56, 39-44.
 - Carlin, F.; Nguyen-The, C. ; Varoquaux, P. 1990. La conservation des produits de la 4^{ème} gamme. *Ind. Alim. Agric.* 107(10), 931-943.
 - Castañer, M.; Gil, M.I.; Artes, F.; Tomas-Barberan, F.A. 1996. Inhibition of browning of harvested head lettuce. *J. Food Sci.* 61(2) 314-316.
 - Corlett, D.A. 1989. Refrigerated foods and use of HACCP principles. *Food Technology* 43(2) 91- 94.
 - Chambroy, Y. 1987. Etudes sur la physiologie des produits de 4^{ème} gamme. En *Compte-rendu de la Journee 4 eme du 15 septembre*. Montfavet, Francia.
 - Chen L.M.; Peng, A.C. 1980a. Effect of acid dip on shelf life of coleslaw. *J. Food Sci.* 45 (6), 1556-1558.
 - Chen L.M.; Peng, A.C. 1980b. Biochemical, physiochemical, and microbial changes of chemically treated cabbage slaw during storage. Research circular 256. Ohio Agricultural Research and Development Center.

-
- Day, B.P. 1995. Frutas y Hortalizas. En *Envasado de los alimentos en atmósfera modificada*. Ediciones A. Madrid Vicente. España.
 - Denis, C.; Picoche, B. 1986. Microbiologie des légumes frais prédécoupés. *Ind. Alim. Agric.* 103, 547-553.
 - Di Pentima, J.H.; Güemes, D.R.; Pirovani, M.E.; Piagentini, A.M. 1995. Estudio del comportamiento de vegetales listos para usar, envasados con diferentes láminas plásticas. *La Alimentación Latinoamericana*, 213; 46-50.
 - Dziezak, J.D. 1986. Preservative systems in foods, antioxidants and antimicrobial agents. *Food Technol.* 40(9) 94-136.
 - Farber, J.M. 1991. Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology. A review. *J. Food Protection*, 54(1) 58-70.
 - Fennema, O. 1975. Principles of food science. Part II. Physical principles of food preservation. Marcel Dekker, Inc. U.S.A.
 - Fennema, O. 1996. Food Chemistry. Marcel Dekker, Inc. U.S.A.
 - Forney, C.; Rij, R. 1991. Temperature of broccoli florets at time of packaging influences package atmosphere and quality. *HortScience*, 26(10), 1301-1303.
 - Fox, R. 1995. A new market niche: Fresh cut produce. *Practical Hydroponics & Greenhouses* July/August, issue 23. Casper Publications Pty Ltd.
 - Galetti, L.; Berger, H.; Escalona, V.; Saenz, C.; Araya, E. 1997. Modified atmospheres and ascorbic acid for minimum process of carrot slices. CA'97. Proceedings vol.5: Fresh-cut fruits and vegetables and MAP. Universidad de California. USA.
 - Garg, N.; Churey, J.J.; Splittstoesser, D.F. 1990. Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. *J. of Food Protection*, 53 (8), 701-703.
 - Gorny, J.R. 1996. Fresh-cut product preparation. En *Fresh-cut products: Maintaining Quality and Safety*. University of California, Davis, EE.UU.

- Gorny, J.R. 1997. A summary of CA and MA requirements and recommendations for fresh-cut (minimally processed) fruits and vegetables. CA'97. Proceedings vol.5: Fresh-cut fruits and vegetables and MAP. Universidad de California.USA.
- Gorodisch, M. 1997. Un negocio servido en bandeja. SuperCampo. Noviembre, 56-59.
- Hao, Y.Y.; Brackett, R.E. 1993. Influence of modified atmosphere on growth of vegetable spoilage bacteria in media. Journal of Food Protection, 56(3) 223-228.
- Heaton, J.W.; Marangoni, A.G.1996. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. Trends in Food Sci. & Technol. vol. 7. Enero 8-15.
- Heimdal, H.; Kuhn, B.; Poll, L. Larsen, L. 1995. Biochemical changes and sensory quality of shredded an MA-packaged iceberg lettuce. J. Food Sci. 60(6), 1265-1268/1276.
- Hurst, W.C. 1995. Sanitation of lightly processed fruits and vegetables. Hortscience, 30(1) 22-24.
- Huxsoll, C.C.; Bolin, H.R. 1989. Processing and distribution alternatives for minimally processed fruits and vegetables. Food Technol. 43 (2), 124-128.
- ICMSF. 1980. Ecología microbiana de los alimentos 1. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Editorial ARCRIBA. España.
- Izumi, H.; Nonaka, T.; Muraoka, T. 1997. Physiology and quality of fresh-cut spinach stored in low O₂ controlled atmospheres at various temperatures. CA'97. Proceedings vol.5: Fresh-cut fruits and vegetables and MAP. Universidad de California.USA.
- Kader, A.A. 1986. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. Food Technol.40 (5), 99-104.
- Kader, A.A.; Zagory, D.; Kerbel, E.L. 1989. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. Critical Reviews in Food Science and nutrition, 28(1) 1-30.

-
- Kader, A.A.; Mitcham, B. 1996. Standardization of quality. En *Fresh-cut products: Maintaining Quality and Safety*. University of California, Davis, EE.UU.
 - Kaufman, S. 1996. Salad strategy is in the bag for booming fresh express. The news-times. Business news. August 5.
 - King , A.D.; Bolin, H.R. 1989. Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. *Food Technol.* 43 (2), 132-135/139.
 - King, A.D.; Magnuson, J.A.; Torok, T.; Goodman, N. 1991. Microbial flora and spoilage of partially processed lettuce. *J. Food Sci.* 56(2), 459-461.
 - Ko, N.P.; Watada, A.E.; Schlimme, D.V.; Bowkan, J.C. 1996. Storage of spinach under low oxygen atmosphere above the extinction point. *J. Food Sci.* 61(2), 398-400/406.
 - Langdon, T.T. 1987. Preventing of browning in fresh prepared potatoes without the use of sulfiting agents. *Food Technol.* 41(5) 64-67.
 - Lin, W. 1996. Better in a bag: Studies find that precut vegetables and salads retain more nutrients. The Detroit News. October 1.
 - Lozano, J.E.; Drudis-Biscarri, R.; Ibarz-Ribas, A. 1994. Enzymatic browning in apple pulps. *J. Food Sci.* 59(3) 564-567.
 - Mathewson, P. R. 1998. Enzymes. American Association of Cereal Chemists, Inc. U.S.A.
 - Mazollier, J.; Leteinturier, J. 1991. Fruits et légumes frais prêts a l'emploi: 4e gamme. *Ind. Alim. Agric.* 108(6), 463-468.
 - Mazollier, J. 1988. IVe Gamme. Lavage-desinfection des salades. *Infos-Ctifl.* N°41. Mai. En *Infos-Ctifl Hors serie "4e gamme"*. París, Francia.
 - McGill, J.N.; Nelson, A.I.; Steinberg, M.P. 1966. Effects of modified storage atmosphere on ascorbic acid and other quality characteristics of spinach. *J. Food Sci.* 31, 510-516.

-
- Monsalve-Gonzalez, A.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Cavalieri, R.P.; Mc Evily, A.J.; Iyengar, R. 1993. Control of browning during storage of apple slices preserved by combined methods. 4-hexylresorcinol as anti-browning agent. *J. Food Sci.* 58(4) 797-800.
 - Montgomery, D.C. 1991. *Diseño y análisis de experimentos*. Grupo Editorial Iberoamérica. México.
 - Myers, R.A. 1989. Packaging considerations for minimally processed fruits and vegetables. *Food Technol.* 43 (2), 129-131.
 - Namesny, A.. 1993. *Postrecolección de hortalizas*. Vol 1. Ediciones de Horticultura, S.L. España.
 - Nguyen-The, C; Carlin, F. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 34:371-401.
 - Omary, M.B.; Testin, R.F.; Barefoot, S.F.; Rushing, J.W. 1993. Packaging effects on growth of *Listeria innocua* in shredded cabbage. *J. Food Sci.* 58(3) 623-626.
 - Pantastico, E.B. 1979. *Fisiología de la postrecolección, manejo y utilización de frutas y hortalizas tropicales y subtropicales*. Compañía Editorial Continental, S.A., México.
 - Peiser, G.; López-Gálvez, G.; Cantwell, M. 1997. Changes in off-odor volatiles of salad products during storage. CA'97. Proceedings vol.5: Fresh-cut fruits and vegetables and MAP. Universidad de California.USA.
 - Piagentini, A.M.; Pirovani, M.E.; Güemes, D.R.; Di Pentima, J.H.; Tessi, M.A. 1997. Survival and growth of *Salmonella hadar* on minimally processed cabbage as influenced by storage abuse conditions. *J.Food Sci.* 62, (3) 616-619, 631.
 - Pirovani, M.E.; Piagentini, A.M.; Sabbag, N.; Costa, S. 1997. Entrenamiento de jueces para la evaluación sensorial de vegetales mínimamente procesados. Libro de Resúmenes del VII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires. Argentina.

-
- Pirovani, M.E.; Güemes, D.R.; Piagentini, A.M.; Di Pentima, J.H. 1997. Storage quality of minimally processed cabbage in plastic films. *J. Food Quality*, 20(5), 381-389.
 - Pirovani, M.E.; Piagentini, A.M.; Güemes, D.R.; Di Pentima, J.H. 1998. Quality of minimally processed lettuce as influenced by packaging and chemical treatment. *J. Food Quality* 21(6), 475-484.
 - Pirovani, M.E. 1998. Efecto del lavado y escurrido sobre la calidad de los vegetales listos para usar. Tesis de Magister en Ciencias de los Alimentos. FIQ - UNL
 - Priepke, P. E.; Wei, L. S.; Nelson, A. I. 1976. Refrigerated storage of prepackaged salad vegetables. *J. Food Sci.* 41(2), 379-382.
 - Rij, R.E.; Stanley, R.R. 1987. Quality retention of fresh broccoli packaged in plastic films of defined CO₂ transmission rates. *Packaging Technology*. Mayo/Junio, 22-23.
 - Roberts, T.A. 1989. Combinationas of antimicrobials and processing methods. *Food Technol.* 43(1), 156-163.
 - Rosen, J.C.; Kader, A.A. 1989. Postharvest physiology and quality maintenance of sliced pear and strawberry fruits. *J.Food Sci.* 54(3), 656-659.
 - Ryall, A.L.; Lipton, W.J. 1979. Handling, transportation and storage of fruits and vegetables. Vol. 1. AVI publishing company, Inc. Westport, Connecticut, USA.
 - Salunkhe, D. K.; Desai, B. B. 1984. Postharvest Biotechnology of vegetables. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
 - Salveit, M. E. 1996. Fresh-cut product biology. En *Fresh-cut products: Maintaining Quality and Safety*. University of California, Davis, EE.UU.
 - Sapers, G.M.; Ziolkowski, M.A. 1987. Comparison of erythorbic an ascorbic acid as inhibitors of enzymatic browning in apples. *J. Food Sci.* 52: 1732.
 - Sapers, G. M. 1993. Browning of foods: Control by sulfites, antioxidants, and other means. *Food Technology*, 43(10) 75-84.

-
- Sapers, G.M.; Miller, R.L. 1993. Control of enzymatic browning in pre-peeled potatoes by surface digestion. *J. Food Sci.* 58(5) 1076-1078.
 - Scandella, D.; Leteinturier, J. 1989. La qualité microbiologique. En *La 4^{ème} Gamme*. Centre Technique interprofessionnel des fruits et légumes. p 44-49. Paris, Francia.
 - Schlime, D.V. 1995. Marketing lightly processed fruits and vegetables. *Hortscience* 30(1), 15-17.
 - Schlime, D.V.; Rooney, M.L. 1994. Packaging of minimally processed fruits and vegetables. En *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables*. Ed. R. Wiley, Chapman & Hall.
 - Shewfelt, R, L. 1986. Postharvest treatment for extending the shelf life of fruits and vegetables. *Food Technol.* 40 (5), 70-78/80/89.
 - Shewfelt, R, L. 1987. Quality of minimally processed fruits and vegetables. *J. of Food Quality*, 10, 143-156.
 - Thompson, J.F.; Suslow, T. 1996. Temperature management I: cooling, storage, and distribution. Section 9. En *Fresh-cut products: Maintaining Quality and Safety*. University of California, Davis, EE.UU.
 - Ulrich, R. 1970. Organics acids. En *The biochemistry of fruits and their products*. Editor A.C. Hulme. Academic Press. Londres.
 - Varoquaux, P. 1991. Ready to use fresh fruits and vegetables. *Rev. Gen Froid*, julio, p.33-41.
 - Varoquaux, P.; Wiley, R.C. 1994. Biological and biochemical changes in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. En *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables*. Ed. R. Wiley, Chapman & Hall.
 - Vernon, L. P. 1960. Spectrophotometric Determination of Chlorophylls and Pheophytins in Plant Extracts. *Analytical Chemistry*, 32(9), 1144 - 1150.

-
- von Elbe, J.H.; Schwartz, J. 1996. Colorants. En *Food Chemistry*. Marcel Dekker, Inc. U.S.A.
 - Watada, A.E.; Kim, S.D.; Kim, K.S.; Harris, T.C. 1987. Quality of green beans, bell peppers and spinach stored in polyethylene bags. *J. Food Sci.* 52(6), 1637-1641.
 - Watada, A.E.; Kazuhiro, A.; Yamuchi, N. 1990. Physiological activities of partially processed fruits and vegetables. *Food Technology* 44(5) 116-122.
 - Wiley, R.C. 1994. Preservation methods for minimally processed refrigerated fruits and vegetables. En *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables*. Ed. R. Wiley, Chapman & Hall.
 - Willocx, F.; Hendrickx, M.; Tobback, P. 1994. A preliminary survey into the temperature conditions and residence time distribution of minimally processed MAP vegetables in Belgian retail display cabinets. *Int. J. Refrig.* **17**, 7, 436-444.
 - Wills, R.H.; Lee, T.; Graham, D.; McGlasson, W.; Hall, E. 1981. Postharvest. An introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables. New South Wales University Press Limited. Kensington, Australia.
 - Wolters, M.G.E.; Diepenmaat, H.B.; Hermus, R.J.J.; Voragen, A.G.J. 1993. Relation between *in vitro* availability of minerals and food composition: a mathematical model. *J. Food Sci.* 58(6), 1349-1355.
 - Yang, C.C.; Chinnan, M.S. 1988. Computer modeling of gas composition and color development of tomatoes stored in polymeric film. *J. Food Sci.* 53 (3), 869-872.
 - Zagory, D. 1996. Controlled and modified atmospheres for fresh-cut products: film technology and selection. En *Fresh-cut products: Maintaining Quality and Safety*. University of California, Davis, EE.UU.
 - Zagory, D.; Kader, A. 1988. Modified atmosphere packaging of fresh produce. *Food Technol.* 42 (9), 70-77.

- Zuang, R-Y; Beuchat, L.R.; Angulo, F.J. 1995. Fate of *Salmonella montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (6), 2127-2131.