



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Industrias

PROCESAMIENTO MÍNIMO DE JUGO DE NARANJA MEDIANTE TRATAMIENTO  
TÉRMICO COMBINADO CON OTROS FACTORES DE ESTRÉS

---



---

Tesis presentada para optar por el título de  
Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Químicas

Autora: Bioq. *Cielo Dolores Char*  
Directora de Tesis: *Dra. Sandra N. Guerrero*  
Consejera de Estudios: *Dra. Stella Maris Alzamora*

Buenos Aires, Diciembre 2006

## PROCESAMIENTO MÍNIMO DE JUGO DE NARANJA MEDIANTE TRATAMIENTO TÉRMICO COMBINADO CON OTROS FACTORES DE ESTRÉS

### Resumen

Existen en la actualidad numerosos problemas relacionados a los jugos frutales conservados por tratamiento térmico tradicional debido a sus pobres cualidades organolépticas y nutricionales. Es por ello que deben explorarse tecnologías emergentes de procesamiento. El objetivo principal de este proyecto fue desarrollar una/s tecnología/s de procesamiento de jugo de naranja que incluya/n la aplicación de un tratamiento térmico suave (52°C – 61°C) combinado con la utilización de los antimicrobianos naturales vainillina (500 - 1100 ppm) y/o citral (25 – 75 ppm) con el propósito de asegurar la calidad microbiológica y organoléptica del mismo. El estudio de inactivación microbiana realizado en un equipo ultrapasteurizador UHT/HTST permitió seleccionar múltiples combinaciones de los factores capaces de producir 5 reducciones logarítmicas de *L. innocua*, subrogante de *L. monocytogenes* en el jugo. El estudio preciso de la cinética de inactivación se realizó en un equipo batch, utilizando modelos matemáticos de predicción para interpretar el comportamiento microbiano (Gompertz modificado y Distribución de frecuencias tipo Weibull). A partir de las combinaciones de factores más efectivas se propusieron dos tratamientos de preservación de jugo de naranja. Se realizaron estudios de reto microbiano utilizando *L. monocytogenes*, un microorganismo ubicuo, de incidencia en la salud pública, adaptable a medio ácido y de marcada resistencia al tratamiento térmico. Se evaluó la flora nativa, se realizaron estudios sensoriales con consumidores y se midió la evolución del color del jugo procesado según los tratamientos propuestos, durante doce días de almacenamiento en refrigeración (5°C). Dichos estudios demostraron que las modificaciones introducidas en el jugo de naranja por los tratamientos propuestos fueron leves, obteniéndose un producto innovador, de vida útil extendida respecto del producto fresco, microbiológicamente seguro y de buena calidad organoléptica.

**Palabras clave:** Vainillina; citral; tratamiento térmico; *L. monocytogenes*; modelo de Gompertz; modelo de Weibull.

## MINIMAL PROCESSING OF ORANGE JUICE BY MEANS OF HEAT TREATMENT COMBINED WITH OTHER STRESS FACTORS

### Summary

Nowadays there are many problems related to fruit juices preserved by means of traditional heat treatment due to poor nutritional and organoleptic quality, calling for research on emerging food-processing technologies. The main objective of this project was to develop orange juice processing technology/ies which include a mild heat treatment (52°C – 61°C) combined with natural antimicrobials like vanillin (500 - 1100 ppm) and/or citral (25 – 75 ppm) with the purpose of ensuring its microbiological and organoleptic quality. The inactivation study performed in a UHT/HTST continuous flow system enabled the selection of multiple factor combinations that turned out in 5 logarithmical reductions of *L. innocua*, subrogate of *L. monocytogenes*. The study of death kinetics was carried out in a batch system and analyzed using predictive microbiology (modified Gompertz and Weibull type frequency distribution models). Given the most effective factor combinations, two orange juice preservation treatments were proposed. Challenge studies were performed using *L. monocytogenes*, illness-causing organism ubiquitous in nature, which can become acid adapted and markedly heat resistant. Natural flora was analyzed, sensory studies with consumers were performed and the colour evolution of orange juice processed by the proposed treatments was measured during twelve days of refrigerated storage (5°C). This study demonstrated low changes in juice properties due to the proposed treatments resulting in an innovative product of extended shelf life compared to the fresh one, microbiologically safe, and with good organoleptic quality.

**Key words:** Vanillin; citral; heat treatment; *L. monocytogenes*; Gompertz model; Weibull model.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Buenos Aires por el apoyo financiero recibido, que hizo posible la realización de esta tesis.

A los directivos, docentes y personal del Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por brindarme sus conocimientos e integrarme a su lugar de trabajo.

A la Dra. Sandra Guerrero por su excelente dirección, dedicación y comprensión y a la Dra. Stella Alzamora por su permanente guía y valiosísimas contribuciones en la discusión de los temas.

A los Sres. Carlos Villar y Juan Niechwiadowicz por asistirme con el equipo UHT/HTST y la caldera en todo momento que fuera necesario.

A Litoral Citrus S.A y Eca Agroindustrias por proveerme gentilmente el jugo de naranja para el desarrollo de esta Tesis.

A mis compañeras de laboratorio Marcela, Silvina y Paula por compartir las tareas rutinarias y amenizar largas horas de trabajo.

A Andrés por estar siempre presente, por brindarme su apoyo incondicional y contención.

A mis hermanos y mis sobrinitas Tiziana y Amalia por darme un motivo y mucha alegría de volver a casa.

*A mamá y la memoria de papá*

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN, 1
  - 1.1. Origen del cultivo de frutos cítricos, 2
  - 1.2. Producción de cítricos en la Argentina, 2
  - 1.3. Aspectos socioeconómicos, 3
  - 1.4. Taxonomía, 6
  - 1.5. Cultivo, 7
  - 1.6. Variedades comerciales de naranja (*Citrus cinensis*), 7
  - 1.7. Estructura y composición del fruto, 9
  - 1.8. Factores que influyen en la calidad del jugo de naranja, 14
  - 1.9. Tecnologías alternativas para la preservación de jugo de naranja: factores combinados, 23
  - 1.10. Microbiología predictiva, 31
  - 1.11. Estudio del color en los alimentos, 38
  - 1.12. Análisis sensorial de alimentos, 43
  
2. OBJETIVOS, 58
  - 2.1. Objetivo general, 59
  - 2.2. Objetivos específicos, 59
  
3. MATERIALES Y METODOS, 61
  - 3.1. Jugo de Naranja, 62
  - 3.2. Reactivos e insumos utilizados, 62
  - 3.3. Medios de cultivo utilizados, 63
  - 3.4. Microorganismos, 64
  - 3.5. Determinación de pH y sólidos solubles, 64
  - 3.6. Preparación de las soluciones de antimicrobianos naturales, 64
  - 3.7. Enumeración de microorganismos, 65
  - 3.8. Detección de células injuriadas, 65
  - 3.9. Procesamiento del jugo de naranja en un sistema continuo, 66
  - 3.10. Procesamiento del jugo de naranja en un sistema batch, 82
  - 3.11. Procesamiento propuesto para jugo de naranja, 90

- 3.12. Evaluación de la calidad microbiológica y organoléptica del jugo de naranja procesado según los tratamientos batch propuestos, 91
  
- 4. RESULTADOS, 109
  - 4.1. Detección de células injuriadas, 110
  - 4.2. Procesamiento del jugo de naranja en un sistema continuo, 120
  - 4.3. Procesamiento del jugo de naranja en un sistema batch, 142
  - 4.4. Procesamiento propuesto para jugo de naranja, 189
  - 4.5. Evaluación de la calidad microbiológica y organoléptica del jugo de naranja procesado según los tratamientos propuestos, 193
  
- 5. CONCLUSIONES, 222
  
- 6. APÉNDICE: PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS, 226
  - 6.1. Definiciones, 227
  - 6.2. Grados de libertad, 232
  - 6.3. Significación estadística. Errores Tipo I y II, 232
  - 6.4. Pruebas de significación múltiple, 233
  - 6.5. Pruebas de una cola versus pruebas de dos colas, 234
  - 6.6. La prueba t, 234
  - 6.7. Análisis de varianza, 238
  - 6.8. Test F de significación de la regresión, 242
  - 6.9. Coeficiente de determinación, 244
  - 6.10. Test de Falta de Ajuste del modelo utilizando sistemas replicados, 244
  - 6.11. Análisis de residuales, 247
  - 6.12. Regresión avanzada, 250
  - 6.13. Diseño de una experiencia, 257
  - 6.14. Métodos por comparaciones múltiples, 262
  
- 7. BIBLIOGRAFÍA, 264





## 1.1- Origen del cultivo de frutos cítricos

Los cítricos se originaron hace unos 20 millones de años en las regiones tropicales y subtropicales del sudeste asiático. Desde Asia fueron llevados al norte de África y al sudeste de Europa. Posteriormente fueron traídos a América por los europeos, alrededor del año 1500. La naranja de ombligo *Washington* se originó en Bahía, Brasil, y desde allí fue llevada a Australia, Florida y California en los Estados Unidos (Davis y Albrigo, 1999).

En la actualidad, los cítricos son producidos en las zonas subtropicales y tropicales dentro de la banda delimitada por la línea de 40° de latitud N y S, en más de 80 países. Brasil es el primer productor mundial de naranja ( $\cong$  18 millones de toneladas por año), seguido por Estados Unidos (8 millones de toneladas), México, India, China, Egipto, Sudáfrica, Argentina y Australia, entre otros.

## 1.2- Producción de cítricos en la Argentina

La citricultura en la Argentina es una de las actividades frutícolas más importantes y está compuesta en un 28% por naranja, un 15% por mandarina, un 50% por limón y un 7% por pomelo (Dansa, 2004)

Las plantaciones se hallan localizadas en dos grandes regiones: Noroeste (NOA) y Litoral Nordeste Argentino (NEA). En el NOA, se concentra gran parte de la producción de limones y pomelos del país, mientras que el NEA (Mesopotamia y el Norte de Buenos Aires) se especializa en la producción de naranjas y mandarinas.

De la producción total anual nacional de naranjas ( $\cong$  800.000 toneladas), en la zona Este de la provincia de Entre Ríos, se produce el 35%, mientras que el 25% corresponde a Corrientes (Bella Vista y Monte Caseros). El resto del volumen de producción se concentra en Jujuy (15%), Salta (9%), Tucumán (8%) y Buenos Aires (4%), entre las provincias más relevantes.

La producción de naranja y mandarina en Argentina está dirigida al mercado de fruta fresca. Sólo un 30% de la producción se destina a la industrialización. Los rendimientos promedio son bajos registrándose una gran diferencia entre los rendimientos que corresponden a las plantaciones administradas de forma tradicional

y aquellos correspondientes a plantaciones manejadas con mayor modernización. Los rendimientos de éstas duplican a los de las primeras (Anderson, 2004). En las últimas campañas las principales limitantes de producción fueron de origen agroclimático. Tal como puede apreciarse en la **Figura 1.2.1**, la helada tardía de Septiembre de 2002 y las condiciones de humedad de la primavera/verano 2002/2003 generaron condiciones de estrés en las plantaciones, hecho que provocó una purga excesiva de frutos pequeños condicionando la producción de la campaña 2004 (Dansa, 2004).

### **1.3- Aspectos socioeconómicos**

Tanto por el volumen producido como por el número de los mercados que lo consumen, el jugo de naranja es el jugo cítrico más importante a nivel mundial. Se lo comercializa mayoritariamente concentrado y congelado, aunque también esterilizado y envasado asépticamente, y en una menor proporción fresco refrigerado.

La producción mundial de jugo concentrado congelado de naranja es de aproximadamente 2,2 millones de toneladas. Brasil lidera el mercado con el 50% del volumen elaborado, seguido por Estados Unidos con el 40%. Italia y España producen cada uno el 2% del total mundial. La Argentina con una producción de 8.000 toneladas, tiene una mínima participación en el contexto internacional, inferior al 1%.

Las exportaciones mundiales también están lideradas por Brasil, y en mucha menor medida por España y Estados Unidos, como se aprecia en la **Figura 1.3.1**.

El 60% de la producción local de jugo concentrado congelado de naranja se destina al mercado interno y la mitad de las compras corresponde a la industria elaboradora de gaseosas. La demanda restante está compuesta por elaboradoras de bebidas para diluir a base de jugo, polvos con sabores frutales y jugos frescos (Bruzzone, 2004).

A diferencia de Brasil y Estados Unidos, donde las plantaciones se manejan con el objeto de proveer a la industria, en Argentina la producción está orientada hacia el mercado del fruto fresco. Más del 70% de la fruta utilizada para procesar el jugo corresponde a la variedad Valencia. Otra variedad usada en menor proporción,

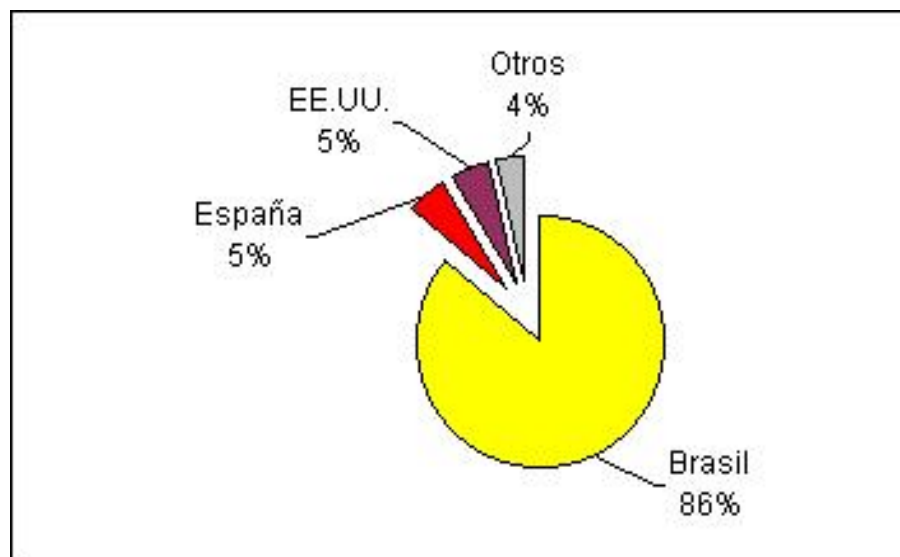
**Figura 1.2.1**

Evolución de la producción argentina de naranja fresca en el período 1999-2004 (Extraído de: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Ministerio de Producción, República Argentina).



**Figura 1.3.1**

Exportaciones mundiales de jugo concentrado de naranja en 2003.  
(Extraído de: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Ministerio de Producción, República Argentina).



en las provincias del norte argentino, es la Criolla. Los jugos argentinos se caracterizan por una equilibrada relación sólidos solubles/acidez (denominada cotidianamente *ratio*) y una mayor coloración, siendo más aptos para la elaboración de bebidas analcohólicas gasificadas. En cambio, los que se producen en Brasil son más dulces y se emplean principalmente para el consumo sin procesar (Bruzzone, 2004).

#### **1.4- Taxonomía**

Dentro de la familia *Rutaceae* y género *Citrus*, se encuentra la especie *Citrus sinensis* popularmente conocida como naranja dulce. La naranja ha sufrido numerosas modificaciones a través del tiempo, debidas a la selección natural y a hibridaciones naturales ó producidas por el hombre (como las originadas por patrones y portainjertos).

El injerto es un método de propagación vegetativa artificial de los vegetales en el que una porción de tejido procedente de una planta (la variedad o injerto propiamente dicho) se une sobre otra ya asentada (el patrón, portainjerto o pie), de tal modo que el conjunto de ambos crezca como un sólo organismo. El injerto se utiliza para permitir el crecimiento de variedades de valor comercial en terrenos o circunstancias que les son desfavorables, aprovechando la mayor resistencia del pie usado, o para asegurarse que las características productivas de un ejemplar se mantienen inalteradas, frente a la dispersión genética que introduce la reproducción sexual.

Debido a la facilidad de hibridación de los cítricos, todos los cultivos para uso comercial se obtienen injertando las especies cultivares deseadas sobre portainjertos seleccionados por su resistencia a las enfermedades y plagas, diferentes tipos de clima y suelos no aptos para el cultivo, entre otros. Los portainjertos influyen notablemente en el crecimiento de la planta, su rendimiento y la calidad interna y externa de la fruta.

## 1.5- Cultivo

Los cítricos desarrollan mejor en regiones de clima templado y húmedo. En general, no son resistentes al frío ya que, temperaturas continuas por debajo de 0° pueden dañar tanto los frutos como los brotes jóvenes. Estos árboles vegetan mejor en condiciones soleadas y húmedas, ya sea por irrigación o pluviosidad natural y suelo fértil. El naranjo dulce es un árbol de porte mediano, (aunque en óptimas condiciones de cultivo llega hasta los 13 m de altura) perenne, de copa grande, redonda o piramidal, con hojas ovales de entre 7 a 10 cm de y ramas en ocasiones con grandes espinas. Sus flores blancas, denominadas azahar, nacen aisladas o en racimos y son sumamente fragantes.

## 1.6- Variedades comerciales de naranja (*Citrus cinensis*)

La mayoría de las variedades han surgido como mutaciones estables. Estas mutaciones son muy frecuentes en cítricos y se estabilizan rápidamente.

La **Figura 1.6.1** presenta la clasificación de los grupos de variedades comerciales de naranja, cuyas características son las siguientes:

- **Navel:** toman su nombre de la protuberancia en forma de ombligo (de la lengua inglesa navel) presente en su parte inferior (opuesta al pedúnculo), la cual contiene una pequeña fruta embriogénica. Los frutos son grandes, sin semillas y con madurez precoz. Tienen cáscaras gruesas, particularmente buenas para la elaboración de conservas como fruta abrigantada. El contenido de limoneno del jugo origina un sabor amargo cuando se lo pasteuriza y por lo tanto este cultivar es indeseable para procesar industrialmente. Las producidas en la zona son de buena calidad, dulces y de buen tamaño, por lo que tienen gran aceptación en los mercados europeos. Se destacan las variedades tempranas Navelina, Newhall, Washington Navel y las de maduración más tardía Navelate y Lane Late.

### **Figura 1.6.1**

Clasificación de los grupos de variedades comerciales de naranja

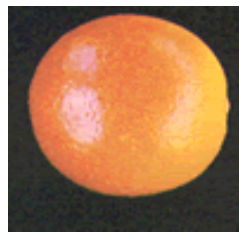
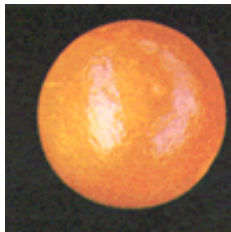
#### **Grupo Navel**

Ej: Washington Navel ó Bahía



#### **Grupo Sanguínea**

Ej: Sanguinelli



#### **Grupo Blanca**

Ej: Valencia Late



- **Sanguínea:** La característica de este grupo es que los frutos poseen, tanto en la pulpa como en la corteza, un pigmento rojo soluble en agua, de distribución no uniforme. Se destaca la variedad Sanguinelli.

- **Blanca:** se la denominó de esta manera para distinguirla de la Navel y Sanguínea. Son frutos de jugo abundante y de buena calidad, con menor acidez y ausencia de sabor amargo. Contienen muy pocas ó ninguna semilla, cáscara fina y color característico. Este grupo incluye las variedades Salustiana (variedad temprana) y Valencia Late (variedad tardía). Existe una selección mejorada llamada Valencia Delta Seedless, redonda, sin semillas con menor porcentaje de azúcares y acidez, originada en Sudáfrica.

### 1.7- Estructura y composición del fruto

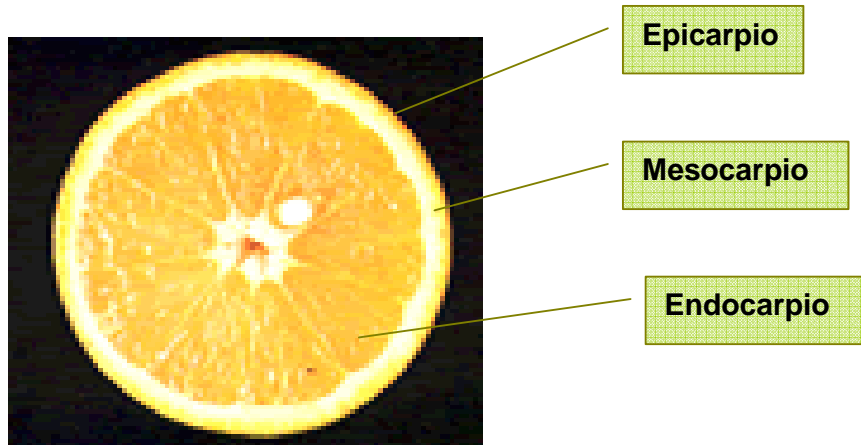
El género *Citrus* se caracteriza por tener un fruto carnoso con características muy particulares y que se denomina hesperidio. En un corte transversal de un hesperidio (**Figura 1.7.1**), se presentan los tres clásicos tejidos de un fruto, que forman en conjunto el pericarpo: epicarpio, mesocarpio y endocarpio (Larrocca, 2004).

- *Epicarpio:* también llamado flavedo, está constituido por un tejido parenquimatoso rico en pigmentos (clorofila, carotenos y xantofila) y células en cuyo interior se encuentran los aceites esenciales. Está cubierto de una cutícula segregada por la epidermis que es una cera natural y tiene por objeto impedir la pérdida de humedad y proteger el fruto contra infecciones causadas por hongos.
- *Mesocarpio:* llamado usualmente albedo, está constituido por celulosa, hidratos de carbono y sustancias pécticas. El tejido parenquimatoso esta formado por células irregulares con grandes espacios intercelulares llenos de aire.



**Figura 1.7.1**

Estructura de la naranja dulce (*Citrus sinensis*)



El epicarpio y mesocarpio constituyen lo que vulgarmente se conoce como cáscara del fruto.

- *Endocarpio*: constituye la parte comestible del fruto. Está constituido por 8 a 12 segmentos, llamados también gajos, cascós ó lóculos, distribuidos alrededor de un eje central que presenta la misma composición del albedo. Los segmentos están envueltos por una sutil membrana, en cuyo interior se desarrollan numerosas células glandulosas, ricas en jugo, y que se denominan también celdas, vesículas ó pelos glandulares. En el ángulo interno del lóculo se ubican las semillas.

A partir del fruto, en la industria de los cítricos se obtienen los siguientes productos intermedios: jugo pulposo (45 – 55 %), cáscara (44 – 55 %) y aceites esenciales (0,2 – 0,5%).

### **1.7.1- Composición**

Los jugos cítricos son sustancias heterogéneas que constan de una fase dispersa llamada “pulpa” y otra fase líquida. Esta última es una solución acuosa de azúcares, ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados, vitaminas, sustancias pécticas, minerales, compuestos aromáticos, pigmentos y flavonoides, que en conjunto constituyen los sólidos solubles. El contenido de sólidos solubles del jugo está comprendido entre 7 y 12° Brix, dependiendo de los siguientes factores: variedad, estado de madurez, nutrición de la planta y condiciones climáticas (Larrocca, 2004).

La contribución más importante al contenido de sólidos solubles corresponde a los azúcares, con hasta el 80% en la fruta madura. Las naranjas maduras contienen azúcares no reductores (sacarosa) y reductores (glucosa y fructuosa), presentes relación 2:1:1.

La acidez de los jugos cítricos se debe principalmente a su contenido de ácido cítrico (80%) y menor proporción los ácidos málico, isocítrico, tartárico, succínico y oxálico. La mayor parte de los mismos se encuentran en estado libre y una pequeña

fracción se encuentra formando sales y ésteres. La relación existente entre la acidez libre y combinada, determina una notable estabilidad en el pH del jugo.

Los compuestos nitrogenados constituyen hasta un 10% de los sólidos solubles del jugo. Están presentes sus numerosas formas orgánicas (aminoácidos, proteínas y vitaminas) e inorgánicas, con una concentración de 1 g/L de nitrógeno total y 0,15 a 0,40 g/L como nitrógeno de aminoácidos, dependiendo de la variedad y de los factores agronómicos y tecnológicos. Los aminoácidos más importantes son, entre otros: prolina, ácido aspártico, aspargina, arginina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico y alanina.

Todos los jugos cítricos contienen notables cantidades de ácido ascórbico (vitamina C), responsable del elevado valor nutricional del jugo, por su actividad vitamínica y antioxidante. En el jugo de naranja su contenido aproximado es de 35 mg/l. Tanto su forma reducida como su forma oxidada (ácido dehidroascórbico) tienen actividad vitamínica, pues la reacción de óxido-reducción es reversible. En el organismo, interviene en múltiples funciones nutricionales tales como:

- Participa en la formación del tejido conectivo (síntesis del colágeno y mucopolisacáridos)
- Por su capacidad de óxido-reducción, actúa en el transporte de electrones en múltiples sistemas en los que participan el NADP, glutatión y citocromos.
- Favorece la absorción de hierro al reducir el ión  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$
- Interviene en reacciones de desintoxicación (Portela, 1993).

La ingesta recomendada en niños es de 35 mg/día y en adultos, 60 mg/día; aumentando en caso de embarazo, lactancia y estrés prolongado. Por lo tanto, las exigencias del adulto se pueden cubrir con un vaso (200 ml) de jugo de naranja por día.

Otras vitaminas presentes en el jugo de naranja son: tiamina, riboflavina, ácido pantoténico,  $\beta$ -caroteno, sin embargo ninguna de ellas se encuentra en cantidades significativas desde el punto de vista nutricional. Los  $\beta$ -carotenos, además de su acción provitamínica, contribuyen al color del jugo, importante atributo de calidad.

En cuanto a los constituyentes inorgánicos, el jugo de naranja se caracteriza por el elevado contenido de potasio (1200 – 2000 mg/l) y por el bajo contenido en sodio (7 a 15 mg/l). Se pueden encontrar combinados con ácidos orgánicos ó con

aniones inorgánicos (fosfatos, nitratos, cloruros y sulfatos). El calcio y el magnesio se encuentran, en su mayoría, combinados con la pectina formando compuestos insolubles en agua. Las cenizas representan el 0,3 – 0,5% del jugo.

Los pigmentos se encuentran localizados en los plastidios ó cromatóforos. Los principales pigmentos de los jugos con pulpa anaranjada son los carotenoides. En las naranjas sanguíneas y pomelos rosados y rojos, el color de los carotenoides queda enmascarado por otros pigmentos, las antocianinas. El color de los frutos verdes se debe a la presencia de las clorofilas (tipos A y B).

Las frutas cítricas son una fuente importante de flavonoides, siendo los más importantes la hesperidina y la naringina. La limonina es el componente amargo más comúnmente encontrado en los frutos cítricos. Se caracteriza por su estructura triterpenoide y está presente en las semillas, albedo y en las paredes de los segmentos. Durante el proceso de extracción se incorporan al jugo, donde se hidrolizan lentamente en el medio ácido formando la lactona amarga. En el espacio de media hora se puede apreciar sabor amargo en el jugo de frutas que no han alcanzado el índice de madurez y en el espacio de algunas horas cuando se utilizan frutas maduras, especialmente de la variedad Navel (Larrocca, 2004).

El jugo cítrico contiene muy pocos lípidos, alrededor de 0,1%. Sin embargo ésta pequeña cantidad es, para algunos autores, la causal de la alteración del sabor de los jugos pasteurizados y del almacenamiento prolongado.

Los constituyentes volátiles junto a los aceites esenciales procedentes de la cáscara, contribuyen a la formación del aroma característico de los jugos recién extraídos. Se encuentran en las celdillas de jugo en forma de glóbulos oleosos de color amarillo, visibles hasta con pequeños aumentos. Los componentes del aroma son muy lábiles y se pierden durante el procesamiento. Se pueden recuperar en parte, con equipos extractores de aromas en los concentradores y volver a incorporarlos al jugo.

La pulpa está constituida por restos de tejidos: pelo glandular, membrana exterior del casco, celdas y restos de albedo y flavedo, que en general cualquiera sea el método de extracción empleado, corresponde a un 17 a 25 % en volumen. Mediante métodos físicos (filtros, tamices helicoidales y vibratorios, hidrociclones y centrifugas) se puede disminuir éste porcentaje hasta los valores deseados, generalmente entre 4 a 6% de pulpa centrifugable.

Las pectinas, polímeros heterogéneos ricos en ácido D-galacturónico con distinto grado de metilación, se encuentran en las paredes celulares principalmente del albedo. Parte de ellas pasan al jugo en el proceso de extracción formando la estructura que permite mantener en suspensión fragmentos muy finos de pulpa, manteniendo la turbidez ó “cloud” y confiriendo “cuerpo” al jugo, es decir, viscosidad. La fracción más importante de la pulpa en el mantenimiento de la turbidez es la pulpa soluble en agua, con elevado índice metoxílico. La principal enzima pectinolítica de los cítricos es la pectinmetilesterasa (PME), que hidroliza los grupos metilésteres del polímero galacturónico, produciendo la pérdida del “cloud” en los jugos.

Según el Código Alimentario Argentino (CAA), los jugos cítricos deberán responder a los siguientes factores de composición y calidad:

Valores mínimos	LIMON	MANDARINA	<b>NARANJA</b>	POMELO	LIMA
°Brix corregido	7	10	<b>11</b>	9	7
Acidez: ác. cítrico anh. g/100 ml	4	-	-	-	-
Relación sólidos solubles/acidez	-	8:1	<b>8:1</b>	6:1	8:1
Nitrógeno amínico mg/100 ml	16	16	<b>16</b>	16	16
Ácido ascórbico mg/100 ml	30	30	<b>30</b>	30	30

### 1.8- Factores que influyen en la calidad del jugo de naranja

Las cualidades del jugo de naranja están influenciadas básicamente por factores microbiológicos, enzimáticos, químicos y físicos que comprometen sus características sensoriales (aroma, sabor, color, viscosidad) y nutricionales.

### **1.8.1- Características inherentes a la fruta**

Las características fundamentales de la naranja que afectan la calidad y productividad del proceso de elaboración del jugo son: la acidez, contenido de sólidos solubles y la homogeneidad en el tamaño.

El pH del jugo juega un rol importante en la severidad de los tratamientos de preservación a aplicar. Valores bajos de pH constituyen un estrés adicional favoreciendo la destrucción de microorganismos, aspecto de particular importancia cuando se quieren obtener derivados mínimamente procesados.

### **1.8.2- Metodología de extracción**

La metodología de extracción del jugo influye en las características fisicoquímicas y sensoriales del jugo, según el aceite esencial se extraiga antes de exprimir el jugo (tecnología Brown) o en el propio extractor (tecnología FMC)(**Figura 1.8.1**). El extractor Brown corta la fruta en dos mitades y las presiona contra una malla, obteniéndose el jugo con altos rendimientos (Cives, 2004). La parte superior del extractor FMC desciende, mientras las copas se entrelazan presionando la fruta. El cortador de la base realiza una incisión circular y mientras las copas ejercen presión, el interior de la fruta es conducido al tubo filtro ó “pre-finisher”, donde el jugo y la pulpa se separan instantáneamente de las semillas y la membrana (Sáenz, 2004).

El contenido de aceites esenciales (provenientes del epicarpio) deberá situarse entre el 0,01 y el 0,03 % para que el jugo presente un sabor equilibrado y sea apto para conservar. En el procedimiento de extracción inevitablemente se ponen en contacto numerosos componentes y sistemas enzimáticos, originariamente alojados en diferentes compartimentos, que pueden determinar reacciones y variaciones negativas en el color, sabor y aroma.

### **1.8.3- Incidencia de microorganismos patógenos y deteriorativos**

La microflora de los frutos frescos está constituida por una población primaria o nativa cuya presencia y cantidad difiere con el área geográfica, condiciones

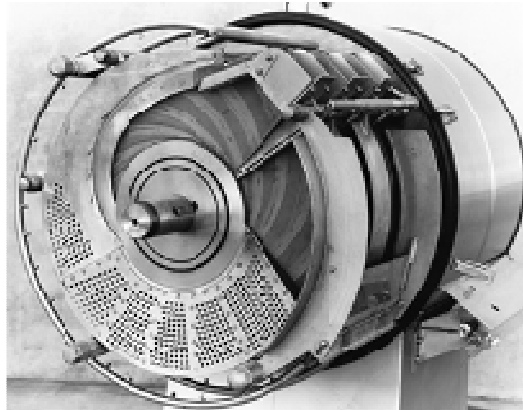
**Figura 1.8.1**

Tecnologías de extracción del jugo de naranja

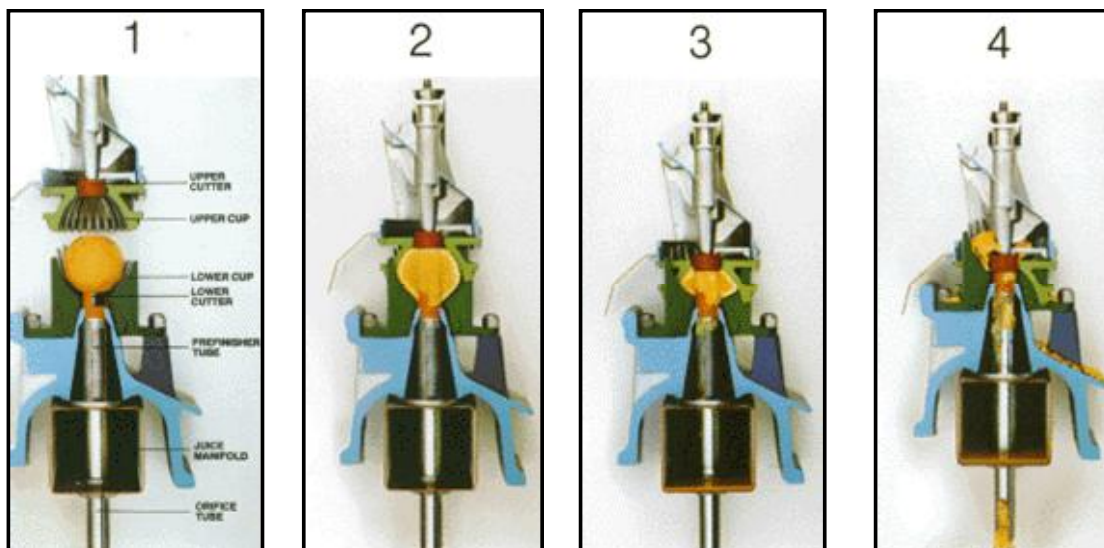
a) Extractor Brown Modelo 1100 (Sáenz, 2004)

b) Tecnología de extracción "in line" ó FMC (Food Machinery Company) (Cives, 2004)

a)



b)



climáticas, tratamientos con agroquímicos, cultivar y aún de las distintas partes del fruto (Bracket, 1999). Las causa del deterioro microbiológico en naranja entera es principalmente fúngica, producida principalmente por *Penicillium digitatum*; *Penicillium italicum*, *Alternaria citri*, *Fusarium spp.*, *Trichoderma viride* (Ferreyra, 2004). Una microflora secundaria (hongos, bacterias, parásitos, virus, etc) proveniente de fuentes externas, puede contaminar los frutos durante las etapas de pre y postcosecha, almacenamiento e industrialización. Las posibles fuentes de contaminación precosecha incluyen: suelo, agua de riego, agua utilizada para la aplicación de insecticidas y fungicidas, abonos a partir de desechos animales, insectos, pájaros, animales domésticos. La contaminación postcosecha puede provenir de la manipulación, equipamiento de cosecha, contenedores, transporte, equipamiento de proceso, insectos, etc. Por ejemplo, Janisiewicz y col., (1999) demostraron que la mosca de la fruta resultó ser un buen vector para la contaminación de manzanas con daños superficiales, con una cepa de *E. coli* O157:H7 marcada con fluorescencia.

La cáscara de los frutos cítricos sanos es una barrera protectora contra la invasión microbiana hacia los tejidos internos. El proceso de lavado de la fruta sana, que tiene lugar previo a la extracción del jugo, elimina mayoritariamente la flora secundaria y en mucha menor medida a la flora primaria. De este modo, restos de la flora microbiana puede introducirse en el jugo.

El jugo de naranja es deteriorado inicialmente por levaduras de rápido desarrollo en el rango de 11°C a 35°C (*Candida* spp, *Rhodotorula* spp.). La fermentación acética o láctica, producida por bacterias heterofermentativas de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, y homofermentativas del género *Pediococcus* ocurre principalmente en el rango de 32°C a 35°C, dando como resultado la producción de ácido láctico, ácido acético, etanol, CO<sub>2</sub>, y eventualmente diacetilo y mucílagos, provocando la opalescencia del jugo, formación de burbujas, aspecto gomoso y/o sabor anormal a manteca (Ferreyra, 2004). Los jugos concentrados y los jarabes de fruta (con a<sub>w</sub> reducida y alta concentración de azúcar) son alterados por hongos y levaduras osmofílicos tales como *Zygosaccharomyces bailii* y *Z. rouxii*, *Aspergillus Níger*, *Eurotim* spp y *Penicillium* spp. (Pitt y Hocking, 1997, Gould y Jones, 1989).



En los últimos años se ha identificado una nueva bacteria deteriorativa en productos derivados de frutas contaminados, como jugo de manzana envasado asépticamente y jugo de naranja: *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Wisotzkey y col., 1992). Este microorganismo no patógeno, es esporoformador, termoacidófilo y está caracterizado por tener ácidos grasos  $\omega$ - alicíclicos como principal constituyente lipídico de la membrana, a diferencia de *Bacillus acidoterrestris*. La detección visual de la contaminación es difícil, debido a que no produce gas durante el desarrollo y por lo tanto, no se hinchan los contenedores. Recuentos de aproximadamente  $10^5$ - $10^6$  UFC/ml en jugo de naranja y manzana, producen suficiente cantidad de guaiacol (ppb) como para ser percibido sensorialmente (Silva y Gibbs, 2004). Este microorganismo ha sido aislado de varios jugos ácidos contaminados, tales como jugo de naranja almacenado a 44°C durante 24 hs (Pettipher, 1997); jugo de manzana (Splittstoesser y col., 1994) y jugo de pomelo almacenado a 30°C (Komitopoulou, 1999).

El número reportado de brotes de infecciones humanas asociadas con el consumo de frutas, vegetales y jugos de fruta no pasteurizados se ha incrementado en los últimos años. Las posibles causas comprenden cambios en los hábitos alimentarios, métodos de producción y procesamiento, fuentes de producción y la emergencia de patógenos que previamente no se reconocía que estuvieran asociados con materias primas frutihortícolas (Beuchat y Ryu, 1997).

La supervivencia y crecimiento de un patógeno en estos productos están determinados por sus capacidades metabólicas, pero sus manifestaciones pueden estar fuertemente influenciadas por factores intrínsecos y extrínsecos. Por ejemplo, el desarrollo de hongos puede producir incremento del pH, aumentando las probabilidades de crecimiento de bacterias patógenas.

Los alimentos ácidos, como los jugos de fruta, no fueron reconocidos como vehículo de enfermedades transmitidas por alimentos, hasta que recientemente (desde 1991) se documentaron varios brotes de *Escherichia coli* O157:H7, diferentes serotipos de *Salmonella enterica* y el parásito protozoario *Cryptosporidium parvum* asociados a jugo de manzana y jugo de naranja no pasteurizados, en los Estados Unidos y Australia (Mazzotta, 2001) y *L. monocytogenes* en tomate, apio y lechuga (Ho y col., 1986). Estos incidentes llevaron a que la U.S. Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA) estableciera normativas a

implementarse a partir de 2002 para asegurar la sanidad de estos productos, según el tamaño de la planta productora. Los requerimientos incluyen la implementación de los principios del Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP) en la producción de jugo fresco, y la aplicación de tratamientos que aseguren la reducción de al menos 5 ciclos logarítmicos del microorganismo de significación pública identificado como el más resistente al tratamiento particular aplicado (FDA, 2001). La norma no especifica el tipo de tratamiento a aplicar, sino que considera la letalidad acumulada por la utilización de más de un tratamiento, posibilitando la aplicación del concepto de barreras y la obtención de productos mínimamente procesados. La guía desarrollada por la FDA incluye una lista de “microorganismos pertinentes”, dentro de los que se encuentra *L. monocytogenes* (FDA, 2002).

*Listeria monocytogenes* es un bacilo gram-positivo no formador de esporos patógeno, ampliamente distribuido en el ambiente y que se encuentra asociado con la suciedad, heces de pájaros y animales, aguas servidas (Beuchat, 2002). Históricamente, los brotes de listeriosis han sido asociados primariamente a carnes listas para consumo, debido a la resistencia de *L. monocytogenes* a las sales y nitritos usadas como preservadores; a productos lácteos por su resistencia a las temperaturas de refrigeración; y al de consumo de productos inadecuadamente calentados ó recontaminación de alimentos pasteurizados (Yuste y col., 2002). También se ha demostrado que *L. monocytogenes* tiene mayor resistencia térmica que otros patógenos como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* (Baumann y col., 2005).

Aunque la listeriosis humana es esporádica, se han reportado casos con consecuencias severas en niños menores de 1 año, mujeres embarazadas, adultos inmunodeprimidos y ancianos. Las manifestaciones de la enfermedad incluyen meningitis, abortos y septicemia perinatal. En los casos diagnosticados, la mortalidad es del 30%, afectando especialmente a ancianos y recién nacidos. La mayoría de los individuos saludables sólo presenta síntomas menores como náuseas, diarrea y/o fiebre no muy alta. En muchos casos estos síntomas, similares a los de una gripe, pueden no ser atribuidos a una enfermedad transmitida por alimentos (ETA), por lo que la mayoría de los casos de listeriosis no son reportados (Hoffmans y col., 1997).

Este patógeno de naturaleza ubicua ha sido recuperado a partir de jugo de manzana sin pasteurizar (pH 3,8) (Sado y col., 1998); jugo mezcla de manzana y

frutos rojos (frambuesa) sin pasteurizar (pH 3,8) y jugo de manzana (pH 3,7) luego de 1 día de almacenamiento a 5°C (Baumann y col., 2005). Otro estudio confirmó que *L. monocytogenes* fue capaz de sobrevivir en jugos concentrados de manzana, naranja, ananá y uva blanca (pH 3,6 a 5,5) (Oyarzábal y col., 2003).

La supervivencia de este patógeno a valores de pH bajos (3,0 a 4,5) ha recibido poca atención, probablemente debido a que se asume su rápida muerte bajo estas condiciones. Sin embargo, resultados obtenidos por Parish y col., (1989) en sistemas modelo ajustados a pH 3,6, indicaron que el tiempo necesario para reducir la población de *L. monocytogenes* desde un inóculo inicial de 10<sup>6</sup> UFC/ml a niveles indetectables fue de 20 días a 4°C y de 5 días a 30°C. Por lo tanto, en productos de alta acidez refrigerados puede encontrarse *Listeria* y puede producirse una masiva contaminación si estos alimentos son consumidos en un período corto de tiempo.

Se ha comprobado que bacterias patógenas como *Listeria* y *Salmonella* no crecen activamente en jugo de fruta con pH < 4,4, pero sí pueden sobrevivir y adaptarse al ambiente ácido (Parrish, 1998). Está bien documentado que la adaptación de estos patógenos al medio ácido, aumenta la tolerancia a condiciones de crecimiento desfavorables y extiende su supervivencia, pudiendo incrementar también su resistencia térmica. Mazzotta, (2001) estudió la inactivación térmica (56 a 62 °C) de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *L. monocytogenes* en jugos de manzana, naranja y uva blanca ajustados a pH 3,9, a partir de cultivos en fase estacionaria y cultivos adaptados al medio ácido. Este autor demostró que la adaptación al medio ácido incrementó la resistencia térmica de los tres patógenos a todas las temperaturas evaluadas, y que dicho aumento de los valores de tiempo de reducción decimal (D) fueron mayores en los casos de *L. monocytogenes* y *E coli* O157:H7, resultando la primera más resistente a temperaturas de tratamiento mayores a 65°C.

#### **1.8.4- Tratamiento térmico**

La aplicación de calor para preservar alimentos es una técnica muy antigua que aún hoy es ampliamente utilizada. La severidad del tratamiento térmico y la vida útil resultante, dependen principalmente del pH del alimento y de las condiciones de

almacenamiento, así como también de la resistencia térmica del microorganismo “blanco”, la carga microbiana inicial, las características de transferencia de calor del alimento y del medio calefactor (Farnworth y col., 2000). El daño en las propiedades sensoriales y nutricionales de los jugos procesados debido a la acción de tratamientos térmicos tradicionales, ha centrado el interés en nuevos métodos de preservación sin el uso de calor o al menos sin la intensidad de los tratamientos convencionales.

Numerosos estudios sobre las características de los jugos cítricos tratados térmicamente, han permitido demostrar que si bien el tratamiento logra aumentar el periodo de vida útil de los jugos, su calidad desde el punto de vista sensorial y nutricional se ve afectada en mayor o menor medida. El aroma original de los jugos frescos se ve particularmente afectado por el tratamiento térmico, el cual afecta el contenido de muchos componentes volátiles del jugo de naranja, disminuyendo las concentraciones de ciertos compuestos tales como etil-butilato, linalool, hexanal y decanal, y aumentando las concentraciones de otros compuestos como  $\alpha$ -terpineol y terpinen-4-ol. El etil-butilato y el linalool son componentes importantes del flavor a naranja fresca, mientras que el  $\alpha$ -terpineol contribuye a la aparición de olores desagradables. El estudio de este efecto ha llevado a que se modifiquen algunas condiciones de proceso y a que se adicione la fracción volátil recuperada, particularmente durante la concentración del jugo, con el propósito de obtener un perfil aromático similar al jugo fresco (Jordán y col., 2003).

El jugo fresco exhibe concentraciones mayores de ácido ascórbico y menor densidad que el jugo pasteurizado (Farnworth y col., 2000), factores que influyen tanto en la calidad nutricional como sensorial del jugo. La oxidación del ácido ascórbico, compuesto responsable de atributos sensoriales y nutricionales del jugo, depende del tratamiento térmico utilizado, además de la presencia de O<sub>2</sub> y de la luz (Graumlich y col., 1986).

Lee y Coates (2003) observaron una disminución en el contenido de carotenos debido a la pasteurización de jugo de naranja de la variedad Valencia, contribuyendo a los cambios de color que se producen después del proceso de pasteurización.

Si bien la pasteurización de los jugos tiene como primer propósito la destrucción de los microorganismos contaminantes (particularmente patógenos) y

deteriorativos, este proceso también inactiva las enzimas. La enzima pectinmetilesterasa hidroliza los enlaces metiléster del polímero de pectina produciendo la liberación de grupos carboxílicos, que reaccionan con los iones  $\text{Ca}^{+2}$  inestabilizando el sistema, con la subsiguiente pérdida de turbidez (clarificación con formación de dos fases) en el jugo natural y gelificación en jugo concentrado (Sentandreu y col, 2005). La inhibición de las enzimas estabiliza la pulpa en suspensión, manteniendo la turbidez de los jugos cítricos, factor de calidad importante para la aceptación por parte del consumidor. Los jugos de naranja con escaso contenido en pulpa se tornan acuosos, de viscosidad reducida y son considerados jugos de baja calidad. Sin embargo, las altas temperaturas necesarias para la inactivación de enzimas, donde la práctica comercial recomendada considera un tratamiento a 90 °C durante 60 segundos, tienen un impacto negativo sobre otras características sensoriales y nutricionales, respecto del jugo fresco (Farnworth y col, 2000).

#### **1.8.5- Factores químicos**

La oxidación del ácido ascórbico, además de la pérdida nutricional, produce compuestos con radicales carbonilos libres que reaccionan con los grupos amino que, por polimerización, producen pigmentos oscuros responsable del pardeamiento de los jugos. La presencia de oxígeno acelera la degradación inicial de vitamina C durante el almacenamiento de los jugos concentrados. El almacenamiento en condiciones anaeróbicas aumenta la retención de esta vitamina, no verificándose alteraciones significativas en el color y otras características sensoriales de los jugos (Kacem y col., 1987).

En cuanto al efecto catalítico de la luz sobre la oxidación del ácido ascórbico en jugo de naranja pasteurizado, algunos autores sostienen que efectivamente se acelera la oxidación en presencia de luz (Martin y col., 1995), mientras que otros han obtenido resultados que lo contradicen (Solomon y col., 1999).

## **1.9- Tecnologías alternativas para la preservación de jugo de naranja: factores combinados**

La estabilidad microbiológica y la calidad sensorial de la mayoría de los alimentos, están basados en la combinación de factores de preservación. Esto es cierto, tanto para alimentos tradicionales con factores empíricos inherentes, como para productos nuevos para los cuales se han seleccionado racionalmente los factores de estrés y se han aplicado intencionalmente (Alzamora y col., 2000).

El objetivo de las tecnologías de obstáculos es seleccionar y combinar factores de preservación o barreras de forma tal que la estabilidad y seguridad microbiológica puedan ser garantizadas, reteniendo las características nutritivas y la aceptación sensorial (Leistner, 1992). Este método usa varias barreras que separadamente pueden no dar una adecuada preservación, pero que cuando se las combina pueden brindar la protección necesaria. Las barreras pueden incluir la disminución de la temperatura, pH o actividad de agua (por adición de por ejemplo NaCl o azúcares); el calentamiento mínimo; ó la adición de antimicrobianos (Leistner, 1995). Para que esta tecnología sea aplicada correctamente, es necesario cuantificar la influencia de los distintos factores sobre el crecimiento microbiano.

La aplicación de este concepto ha sido muy exitosa en los últimos años, dentro del conjunto de tecnologías de preservación de mínimo procesamiento, y ello ha sido posible debido a los grandes avances ocurridos en el conocimiento del modo de acción de los distintos factores de preservación y de su interacción en los microorganismos (Sajur, 1985; Alzamora y col., 1989; Guerrero y col., 1993; Rojas y col., 1994).

Existen numerosos mecanismos homeostáticos que emplean los microorganismos para reaccionar frente al estrés ambiental y también existen muchos caminos para interferir con dicha homeostasis, muchos de los cuales se han venido desarrollando empíricamente. La restricción de la energía disponible para el funcionamiento celular es un camino particularmente interesante para interferir con los mecanismos homeostáticos activos (Gould y Jones, 1989). La aplicación de tecnologías tradicionales (descenso de  $a_w$  y pH) en combinación con aquellas emergentes pueden tener una potencial aplicación como un camino interesante para reducir, mediante un efecto sinérgico y cooperativo, la energía de las células

microbianas. La estabilidad u homeostasis del medio interno (composición y volumen de los fluidos) es vital para la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos. En los alimentos preservados por factores combinados, la homeostasis activa de los microorganismos vegetativos y la homeostasis refractaria pasiva de las esporas se interfieren en “un número de sitios” o de “manera cooperativa”, aplicando cada factor en forma no letal, disminuyendo la severidad de los tratamientos individuales. Por ejemplo, en el caso de células vegetativas, se reduce la disponibilidad de energía (removiendo O<sub>2</sub>, limitando nutrientes, reduciendo la temperatura) y/o se incrementa la demanda de energía (reduciendo a<sub>w</sub> y pH, añadiendo compuestos activos a nivel de membrana). En el caso de las esporas, la idea radica en dañar estructuras claves (por ataque químico, enzimático o físico sobre el cortex) o provocar la germinación de las mismas (con “falsos disparadores”, por aplicación de altas presiones, etc.) (Gould, 1995).

También desde el punto de vista microbiológico, el concepto se ha tornado más extenso y se refiere no sólo a la interferencia de la homeostasis por barreras sinérgicas o aditivas sobre un mismo microorganismo, sino a la aplicación selectiva de factores de conservación que puedan ser efectivos contra un organismo específico o un grupo de microorganismos solamente. Es así, que en los últimos años, un gran número de publicaciones en la literatura internacional se refiere a la utilización de este concepto con distintas finalidades: optimizar tecnologías tradicionales; desarrollar nuevos productos y como medida de seguridad o “back-up” para asegurar la calidad microbiológica de alimentos mínimamente procesados (Alzamora, 1997).

La adopción de altos estándares en el control de calidad, buenas prácticas de manufactura y el sistema HACCP son esenciales para asegurar la calidad microbiológica del producto. Más aún, debido a los reducidos márgenes de seguridad, los distintos organismos de contralor internacionales han recomendado el uso de “obstáculos” adicionales en el diseño de los sistemas de preservación tal que procesos, distribución y almacenamiento no adecuados puedan todavía garantizar productos microbiológicamente seguros. Así, el uso de factores combinados juega un importante rol en la seguridad microbiológica de aquellos productos donde los puntos críticos de control sean imposibles o difíciles de controlar.

Los jugos naturales que no reciben tratamiento alguno tienen una corta vida útil y la probabilidad de contaminación debida a múltiples microorganismos es alta, si el área de producción y los equipamientos no se mantienen debidamente limpios.

La optimización de operaciones unitarias tradicionales, así como su combinación con nuevas técnicas de procesamiento, puede dar origen a alimentos mínimamente procesados, seguros tanto desde el punto de vista microbiológico como organoléptico.

### **1.9.1 Utilización de antimicrobianos naturales**

El uso de antimicrobianos naturales y la creciente problemática de la contaminación por patógenos emergentes en productos alimenticios, han estimulado la investigación del efecto de las especias, condimentos y extractos de plantas en la inactivación de los mismos. Esta técnica emergente de preservación tan promisoría responde a su vez, a la necesidad de reemplazar a los conservadores químicos o sintéticos utilizados en la prevención del crecimiento microbiano, por su cuestionable seguridad para la salud humana. Los sistemas antimicrobianos se encuentran naturalmente presentes en plantas, animales o microorganismos o se generan frente a situaciones de estrés. En los últimos años se ha descubierto que muchos componentes naturales de plantas, utilizados como agentes saborizantes y de flavor poseen actividad antimicrobiana siendo muy adecuada su utilización en productos derivados de frutas (Jay y Rivers, 1984). Estudios recientes de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de especias indicaron que los niveles necesarios para inhibir el crecimiento microbiano son considerablemente mayores en alimentos, respecto de medios de laboratorio, impartiendo al alimento un flavor intolerante. Es posible entonces, aumentar su efectividad en alimentos utilizando estos antimicrobianos naturales en baja proporción, en forma combinada con otros factores de preservación (Board y Gould, 1991).

En general, se ha encontrado que la actividad antimicrobiana de estos compuestos naturales no sólo depende de la estructura química de sus componentes sino también de la proporción y tipo de compuestos presentes. Guerrero y col. (2001) demostraron que aceites esenciales de canela procedentes



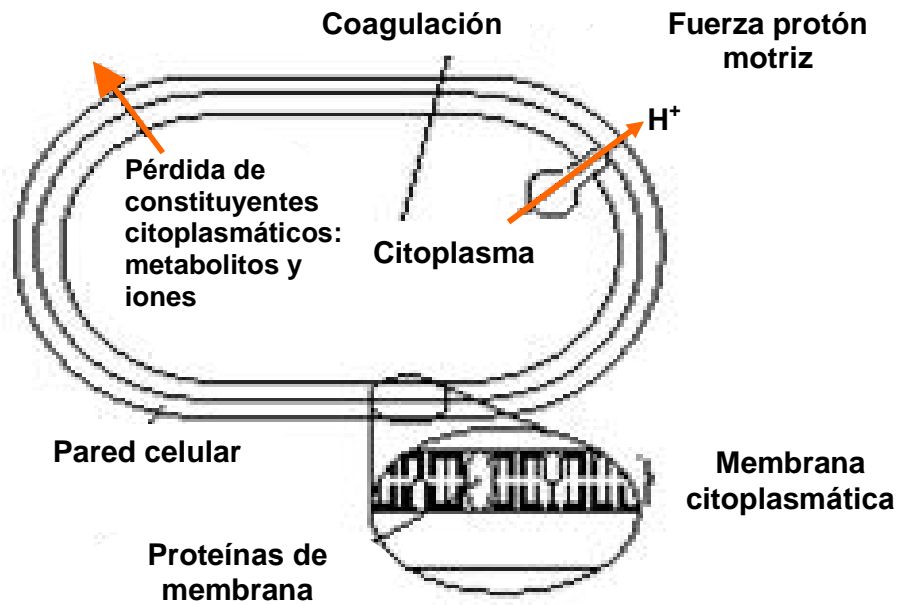
de China o Ceylan mostraron distinta efectividad cooperando con el ultrasonido para inactivar *Saccharomyces cerevisiae* en medios de laboratorio.

Considerando el gran número de grupos diferentes de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es muy probable que la actividad antibacteriana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino que actúen sobre diferentes sitios “blanco” en la célula. Las ubicaciones de los posibles sitios y mecanismos de acción de los aceites esenciales sobre la célula bacteriana se muestran en la **Figura 1.9.1**. No todos los mecanismos son “blancos” independientes, algunos se ven afectados cuando se actúa sobre otro “blanco”. Una característica importante de los aceites esenciales es su hidrofobicidad, lo cual les permite particionarse en los lípidos de las membranas celular y mitocondrial bacteriana, distorsionando las estructuras tornándolas más permeables y ocasionando la pérdida de iones y otros componentes celulares (Burt, 2004). El carácter lipofílico de los monoterpenos cíclicos favorece la partición en la membrana celular, con la consiguiente expansión e incremento de fluidez, llevando a la inhibición de las enzimas embebidas en la membrana. Este mecanismo fue descrito en la inhibición de *L. monocytogenes* con ácido cinámico y benzaldehídos (Ramos-Nino y col, 1996).

Generalmente, los aceites esenciales con fuertes propiedades antimicrobianas contienen altos porcentajes de compuestos fenólicos, tales como la vainillina, carvacrol, eugenol ó timol. Algunos autores consideran razonable que su mecanismo de acción sea similar al de otros fenoles, produciendo alteración de la membrana citoplasmática e interactuando con las enzimas y proteínas de la membrana, afectando de esta manera la actividad celular y el deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluídos aquellos involucrados en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales. Los posibles efectos sobre el funcionamiento celular son: disrupción de la fuerza protón motriz; flujo de electrones; disminución del contenido intracelular de ATP; transporte activo de solutos; control de la presión de turgor y coagulación del contenido celular (Conner y Beuchat, 1984; Dorman y Deans, 2000).

**Figura 1.9.1**

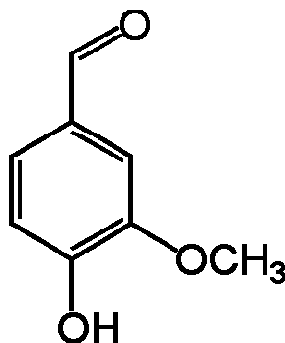
Posibles mecanismos de acción y ubicación de los sitios blanco de los aceites esenciales en la célula bacteriana. Burt, (2004).



Se considera que las bacterias gram-negativas son más resistentes que las gram-positivas, principalmente por poseer una membrana externa, que actúa como efectiva barrera a la permeabilidad de macromoléculas y sustancias hidrofóbicas (Helander y col., 1997) , así como también al alto contenido de ácidos grasos ciclopropánicos de la membrana interna.

### 1.9.1.1- Vainillina

La potencial utilización de conservadores naturales como uno de los factores de metodología combinada, ha demostrado ser efectiva en la estabilización de purés de fruta contra el crecimiento de hongos. Dicho efecto se ha logrado utilizando compuestos fenólicos naturalmente presentes en productos frutales y vegetales, como la vainillina (4-hidroxi-3-metoxilbenzaldeído), componente cristalino extraído de las vainas de vainilla, cuya estructura molecular es la siguiente:



Debido a que la demanda de vainillina (12000 toneladas) ha excedido ampliamente la producción natural (1800 toneladas), se recurrió a la síntesis química, a partir de eugenol (proveniente del aceite esencial de clavo de olor). Posteriormente se sintetizó a partir de lignina, subproducto de la industria papelera y actualmente, se la produce a partir del guaiacol, una materia prima petroquímica y ácido glioxílico. En el año 2000, se comenzó a obtener vainillina biosintética por acción de microorganismos sobre el ácido ferúlico, extraído del salvado de arroz. Si bien este producto es mucho más costoso en comparación con la vainillina obtenida

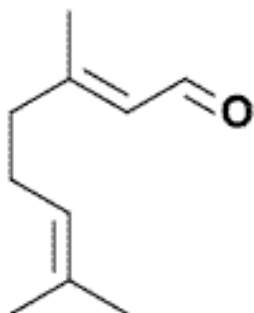
a partir de lignina ó guaiacol, tiene la ventaja de que se puede rotular como producto “natural” (Delaquis y col., 2005).

La vainillina es un agente saborizante GRAS usado en la elaboración de helados, chocolates, galletitas, pastelería y bebidas sin y con alcohol; por lo que sus características sensoriales resultan familiares a los consumidores. También se lo utiliza para enmascarar sabores y aromas desagradables en medicamentos y en la industria de perfumes y limpieza. Este antimicrobiano no sólo imparte notas de sabor, sino que también actúa como antioxidante en alimentos complejos que contienen ácidos grasos poli-insaturados (Burrí y col., 1989). Su aplicación ha resultado muy apropiada en purés de varias frutas (manzana, banana, mango, papaya, ananá) en concentraciones de hasta 3000 ppm. Cerruti y Alzamora (1994) encontraron que la adición de 2000 ppm de vainillina tenía un importante efecto inhibitorio sobre *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* NRRL Y-1448, *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 8383 y *Debaryomyces hansenii* NRRL-7239 en caldo Sabouroud (pH 4) y en puré de manzana (pH 3,5) y  $a_w$  0,99 ó 0,95 durante 40 días a 27°C. Lopez Malo y Alzamora (1994) estudiaron la efectividad de vainillina contra el desarrollo de *Aspergillus flavus* ATCC 16872, *Aspergillus parasiticus* ATCC 26691 y *Aspergillus niger* ATCC 1015 en un medio de laboratorio y en puré de manzana, papaya, mango y ananá (pH 3,5;  $a_w$  0.98). Estos autores reportaron que 100 ppm de vainillina resultaron suficientes para inhibir el desarrollo de *Aspergillus flavus* y *parasiticus* en el medio de laboratorio durante 35 días de almacenamiento a temperatura ambiente. En el caso de *Aspergillus niger* se necesitaron 1500 ppm de vainillina para inhibir su desarrollo. Estos resultados también se corroboraron en el caso de los purés de fruta descriptos.

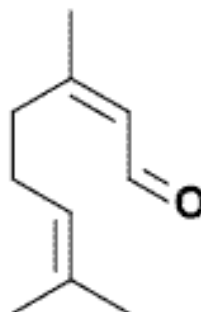
#### **1.9.1.2- Citral**

El citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal), aldehído del geraniol, es otro antimicrobiano natural de amplia utilización en la industria de alimentos, principalmente como agente de flavor. Este terpenoide es el componente principal del aceite de lemongrass y del aceite de *Backhousia citriodora* (British Pharmaceutical Codex, 1911). También se encuentra presente en los aceites de

verbena, limón y naranja. El producto que se comercializa es una mezcla de dos isómeros geométricos,  $\alpha$ -citral (isómero trans, también llamado geranial) y  $\beta$ -citral (isómero cis ó neral) :



**Geranial**



**Neral**

El geranial tiene un fuerte aroma a limón, y el neral tiene un aroma menos intenso, pero más dulce. El citral es un líquido amarillo pálido y por su fuerte aroma a limón se lo utiliza fundamentalmente como saborizante de comidas, bebidas y caramelos (FAO, 1967) y como fragancia en perfumería. Los monoterpenos oxigenados de los cítricos se encuentran dentro de las moléculas con mayor actividad antifúngica, siendo el citral el compuesto más reactivo contra *P. digitatum* y *P. italicum* (Caccioni y col, 1995). El mecanismo de acción de los terpenos puede estar relacionado con la disrupción de la membrana celular, hecho que ha sido observado en bacterias y hongos (Cox, 2000). López-Malo (2000) reportó una concentración mínima inhibitoria de 1800 ppm para *Aspergillus flavus* en agar papa-dextrosa a pH 3,5 y 4,5. Este antimicrobiano natural ha demostrado una marcada acción sinérgica inhibiendo *Zygosaccharomyces bailii* en agar papa dextrosa de pH 4,5 ó 3,5 y  $a_w$  0,99 ó 0,95, cuando se lo combinó con sorbato de potasio, vainillina, timol, carvacrol ó eugenol (Rivera Carriles, 2002).

Lanciotti y col, (2004) reportaron que aceites esenciales de cítricos, mandarina, limón y lima aumentaron la vida útil de ensaladas de frutas mínimamente procesadas sin alterar las propiedades sensoriales. El agregado de dichas sustancias en niveles compatibles en una mezcla de frutas frescas trozadas (manzana, pera, uva, durazno y uva) fue capaz de inhibir la proliferación de la flora normal y reducir la velocidad de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* inoculada

( $10^2$  UFC/g). En las mismas condiciones, la adición de dichas sustancias aumentaron la velocidad de muerte de *E. coli* (inoculada en niveles de  $10^6$  UFC/g), bajo condiciones de abuso de temperatura.

Estos resultados ponen en evidencia que estos antimicrobianos naturales surgen como aditivos promisorios para inhibir microorganismos en muchas frutas y subproductos, dependiendo de su composición y del resto de los factores de conservación considerados

### **1.10- Microbiología predictiva**

Para obtener juicios confiables sobre la calidad del alimento, su vida útil y su seguridad, es necesario disponer de datos cuantitativos sobre los efectos de los factores que afectan el crecimiento, la supervivencia o inactivación de los microorganismos patógenos y/o deteriorativos pertinentes. Para describir las interacciones entre varios factores de preservación cuando actúan en combinación, una buena opción es recurrir a los modelos matemáticos (Mc Meekin y col., 1993; Buchanan y Phillips, 1990; Peleg, 1997).

La microbiología predictiva consiste en el desarrollo de modelos matemáticos para predecir la velocidad de crecimiento o de declinación de los microorganismos bajo un dado conjunto de condiciones ambientales. El conocimiento detallado de las respuestas de crecimiento de los microorganismos frente a las condiciones ambientales, es decir, el conocimiento de la ecología microbiana, permite evaluar objetivamente el efecto del procesamiento, la distribución y el almacenamiento en la seguridad microbiológica y la calidad de los alimentos. Utilizando diseños experimentales adecuados y modelos matemáticos apropiados, la microbiología predictiva permite la selección de los factores de preservación para alcanzar la vida útil deseada de diversos alimentos.

El modelado microbiano comenzó aproximadamente en 1920 con los cálculos del tiempo de muerte térmica y el uso de los valores D (tiempo de reducción decimal) y z (grados de variación en la temperatura, necesarios para reducir el valor de D en un 90%), para describir la resistencia térmica bacteriana. En la década del '70, se

profundizó principalmente en el modelado de la probabilidad de producción de toxinas de *C. botulinum*, principalmente en USA y en el Reino Unido (Roberts e Ingram, 1973). En los años '80 el marcado incremento en la incidencia de brotes de enfermedades producidas por alimentos, llevó a tomar conciencia pública de la necesidad de un abastecimiento seguro de alimentos. En ese momento, los microbiólogos de alimentos comenzaban a aceptar que los métodos microbiológicos tradicionales para determinar la calidad y seguridad alimenticia, estaban limitados por el tiempo requerido para obtener los resultados y que los métodos indirectos basados en cambios químicos, físicos o fisicoquímicos, no proporcionaban una respuesta hasta que un gran número de células se encontraba presente. Lo mismo ocurría con varios métodos rápidos que necesitaban, o bien un alto nivel de contaminación para que la respuesta sea evidente, o dependían del uso de equipamiento muy sofisticado y oneroso.

Antes del advenimiento de la microbiología predictiva, la mayor parte de la bibliografía definía las condiciones ambientales limitantes del crecimiento, cuando los demás factores ambientales se encontraban en los valores óptimos. Además, sólo ocasionalmente los efectos de dos o más factores de conservación se estudiaban de tal forma que permitieran cuantificar la interacción de los mismos. A consecuencia de ello, muchos de estos datos no eran de utilidad o bien no permitían predecir la respuesta microbiana.

Si bien el modelado no revela comportamientos microbianos extraños o poco esperados, los modelos se pueden usar para predecir, por interpolación, el crecimiento bajo una combinación de condiciones que no fueron específicamente testeadas en el protocolo experimental (Whiting, 1995).

#### **1.10.1- Clasificación de los modelos matemáticos**

Se han propuesto varios esquemas para categorizar los modelos, uno de ellos propone dividirlos en modelos de crecimiento y modelos de inactivación/supervivencia. Dentro de cada categoría se subdividen en modelos primarios, secundarios y terciarios (Alzamora y col., 1995).

Los modelos primarios describen cambios en la respuesta microbiana con el tiempo en un ambiente específico. El modelo puede cuantificar unidades formadoras de colonia por mililitro o por gramo, formación de toxinas, niveles de sustrato o productos metabólicos (que son medidas directas del crecimiento); absorbancia e impedancia (medidas indirectas de la respuesta). Una vez generada la curva de crecimiento o muerte microbiana, se utiliza una función o ecuación matemática para describir el cambio de la respuesta en función del tiempo. Ejemplos de modelos primarios son: la función de Gompertz para crecimiento exponencial; el modelo de Gompertz modificado para describir la muerte microbiana; modelos para describir la declinación no lineal de esporas sobrevivientes con el tiempo; el modelo logístico aplicado a destrucción térmica; el modelo de Stannard; el modelo de Schnute; la ecuación de Fermi; etc. (Mc Meekin y col., 1993).

Los modelos secundarios describen las respuestas de los parámetros de los modelos primarios frente a cambios en uno o más factores ambientales como temperatura, pH o  $a_w$ . Ejemplos de modelos secundarios son el modelo de Arrhenius y el modelo de la raíz cuadrada (modelo de Bělehrádek), que describen la dependencia con la temperatura, y el modelo polinómico.

Los modelos terciarios son rutinas de software para computadora que convierten a los modelos primarios y secundarios en programas amigables. Estos programas pueden calcular las respuestas microbianas frente a condiciones que no fueron evaluadas inicialmente, comparar el efecto de diferentes condiciones o contrastar el comportamiento de varios microorganismos, por lo que permiten elegir al microorganismo blanco de ataque en situaciones específicas de formulación-procesamiento de alimentos. Ejemplos de modelos terciarios son el “USDA Pathogen Modeling Program” realizado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, disponible gratuitamente en Internet (<http://www.arserrc.gov>) y el “Food Micromodel” avalado por el Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación del Reino Unido.

Las tendencias en microbiología predictiva hasta la fecha han seguido dos caminos: los modelos cinéticos, en donde se modelan y predicen importantes parámetros cinéticos del crecimiento o inactivación microbiano, tales como la fase lag, la velocidad y el alcance (límite) del crecimiento ó inactivación; y los modelos



probabilísticos, en donde los modelos se construyen para predecir la “probabilidad” de que un evento ocurra, pero no proporciona información sobre la velocidad a la que se produce, como por ejemplo: la germinación de las esporas bacterianas o la producción y concentración de toxina bacteriana después de un período de incubación a tiempo fijo (Gibson y Hocking, 1997; López-Malo, 2000).

Dentro de los modelos cinéticos más utilizados se pueden mencionar al modelo de Gompertz, el de la raíz cuadrada, el modelo cardinal de Rosso, el de Baranyi, el modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull; etc.

### **1.10.2- Validación de los modelos matemáticos**

Los modelos generales para crecimiento o inactivación derivan típicamente de pruebas realizadas en medios de laboratorio con factores controlados. Luego de recolectar un apropiado número de datos experimentales y aplicar los modelos primarios y secundarios, es importante evaluar la exactitud de dichos modelos con nuevos datos y nuevas combinaciones de factores. Existen de manera complementaria una batería de tests y métodos gráficos que permiten validar de manera interna el modelo seleccionado (ver **Apéndice de Procedimientos Estadísticos**). Esto provee una estimación de la bondad de ajuste e indica si es que se necesitan y dónde datos adicionales.

El segundo paso en la validación es comparar las predicciones con el comportamiento real de los microorganismos en los alimentos. Esto muestra las limitaciones del modelo y cuando un alimento en particular no es descrito con exactitud, sugiere qué factores adicionales necesitan ser incluidos en el modelo para incrementar su aplicabilidad.

La mayoría de los modelos desarrollados hasta el momento, se han basado en datos determinados en medios de laboratorio. Por lo tanto no toman en cuenta dos aspectos fundamentales:

- a) el papel de la matriz alimentaria, que puede tanto aportar factores inhibitorios adicionales, como interactuar con los factores de estrés aplicados, disminuyendo su disponibilidad para actuar como antimicrobiano;
- b) el papel de la flora competitiva.

Los modelos no se pueden usar con confianza para hacer predicciones en alimentos hasta concluir con la validación.

### **1.10.3- Limitaciones de los modelos matemáticos**

- *Limitaciones estadísticas:* Con condiciones marginales de crecimiento, la variación entre los replicados aumenta. Se utilizan transformaciones matemáticas para homogeneizar las variaciones en los modelos. La transformación logarítmica de los parámetros en función del tiempo frecuentemente genera valores que se encuentran más cercanos a una distribución normal que si no se aplicara dicha transformación (Whiting, 1995).
- *Limitaciones biológicas:* Es importante especificar claramente los límites del modelo, es decir, para qué microorganismos puede aplicarse, qué factores, los rangos de cada factor y qué combinaciones de factores dan respuestas válidas. La presencia de factores inhibitorios adicionales en el alimento, que no fueron tenidos en cuenta en la construcción del modelo, lo invalidan debiendo ser muy cuidadoso en la interpretación de sus predicciones. La mayoría de los modelos predictivos no incluyen factores como el efecto del anión del acidulante o del antimicrobiano, o el efecto de otros humectantes diferentes al cloruro de sodio en la reducción del  $a_w$ , o la presencia de la flora competitiva cuando se aplica un modelo producido en medios de laboratorio al alimento real.

### **1.10.4- Aplicaciones de los modelos microbianos**

Los modelos microbianos son una herramienta muy valiosa para predecir el crecimiento o supervivencia de los microorganismos y en el planeamiento de la implementación de los programas de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de

Control (HACCP). Estos modelos han evolucionado rápidamente desde ser utilizados en los laboratorios de investigación básica a ser implementados por la industria y las agencias regulatorias. Los modelos son el medio para obtener rápidamente una estimación del comportamiento del microorganismo y son las guías para evaluar problemas potenciales. Sin embargo, los modelos no reemplazan completamente el testeo microbiológico y el juicio del microbiólogo experimentado (Buchanan, 1995).

Los modelos predictivos proveen información muy útil para la toma de decisiones en las siguientes situaciones:

- *Predicción de seguridad y vida útil:* los modelos permiten estimar riesgos potenciales de crecimiento de patógenos en los alimentos luego de un período de almacenamiento normal o en condiciones de abuso. Ayudan a establecer "fechas de vencimiento" a través de la estimación del crecimiento de microorganismos patógenos y deteriorativos.

- *Control de calidad:* los modelos pueden ayudar en el desarrollo de programas HACCP, mostrando qué condiciones permiten el crecimiento y supervivencia y de este modo, identificar los puntos críticos de control. Estimaciones cuantitativas del crecimiento microbiano a diferentes niveles de los factores composicionales o ambientales pueden indicar los rangos permitidos de dichos factores. Contribuyen en hacer más objetivas y consistentes las decisiones de re-procesamiento, utilización rápida o reciclado de un alimento o ingrediente sin esperar los resultados experimentales (Buchanan y Whiting, 1996).

- *Desarrollo de productos:* los cambios en la composición de los alimentos, o una nueva formulación pueden ser rápidamente evaluados. Los modelos muestran qué factores tienen mayor influencia sobre la población microbiana y pueden comparar las nuevas formulaciones con las viejas (Baranyi y Roberts, 1994).

- *Planeamiento de laboratorio y análisis de datos:* permiten lograr mayor eficiencia, ahorrando tiempo, recursos y dinero; además permite que el laboratorio concentre sus esfuerzos en los pasos críticos.

- *Educación*: a través de los modelos se puede mejorar didácticamente la capacitación del personal utilizando gráficos que pueden, por ejemplo, demostrar eficazmente la importancia de mantener las temperaturas adecuadas o los beneficios de utilizar materias primas con bajos recuentos iniciales sobre la seguridad y calidad de los productos.

Los modelos matemáticos sirven como una parte integral del análisis de riesgos microbiológicos por proveer los medios para desarrollar estimaciones realistas de exposición. En el análisis de riesgos, en definitiva, lo que se desea saber es cuáles son las chances de enfermarse luego de consumir un alimento específico. Encontrar la respuesta requiere una evaluación cuantitativa en tres áreas:

- Identificación de las fuentes de contaminación, cálculo de la frecuencia de ocurrencia y cuantificación de microorganismos patógenos en las materias primas.

- Comprensión de la fisiología, bioquímica y comportamiento de los patógenos. Conocer la rapidez con que crecerán o producirán toxinas y otros factores relacionados con la virulencia bajo las condiciones específicas del alimento cuando están presentes.

- Caracterización de la respuesta humana al patógeno, es decir, la dosis infecciosa de distintos grupos de personas.

Se deben integrar estos puntos en un modelo abarcativo, efectivo para fijar las prioridades relacionadas con la seguridad microbiológica de los alimentos objetivamente. Se debe realizar un análisis costo-beneficio para determinar las etapas que minimicen el riesgo.

El progreso en la microbiología de alimentos ha sido notable. El modelado es actualmente una técnica de investigación estándar y una herramienta poderosa en el diseño de alimentos y en el control de procesos. Sin embargo, todavía no se puede contar sólo con los modelos para determinar la seguridad de los alimentos y los sistemas de proceso. Los ensayos de laboratorio siguen siendo necesarios para

determinar inequívocamente la factibilidad del crecimiento o supervivencia de patógenos en el producto.

### **1.11- Estudio del color en los alimentos**

Los caracteres organolépticos de los alimentos pueden analizarse a través de las propiedades sensoriales de textura, apariencia y flavor (conjunción de aroma y sabor). El color es, en los alimentos, un factor determinante de la apariencia. Es un importante atributo sensorial, cuya percepción suele constituir el primer paso en la evaluación de los alimentos por parte del consumidor y es condicionante de su elección. Esto es así, debido a que el consumidor no puede evaluar la calidad microbiológica y nutricional de forma inmediata.

El color es indicativo de la calidad del producto, ya que pone de manifiesto numerosas reacciones de deterioro, las cuales generan pigmentos marrones, dando un aspecto desagradable al producto y alterando su calidad nutricional. La calidad nutricional se ve afectada, debido a que estas reacciones requieren de la participación de azúcares, compuestos nitrogenados y vitaminas. Estos reaccionan generando nuevos compuestos sin valor nutricional. El deterioro debido a cambios de color de los jugos cítricos se debe principalmente a reacciones de degradación del ácido ascórbico y a las reacciones de pardeamiento no enzimático.

El ojo humano es sensible a la radiación electromagnética en el ámbito de 380 a 770 nm de longitud de onda, la cual es comúnmente llamada "luz". Los objetos son coloreados porque interactúan de distinta forma con la luz, usualmente blanca, incidente sobre ellos.

Los diferentes objetos se clasifican respecto a su comportamiento frente a la radiación en:

- Opacos: absorben y/o reflejan toda la luz.
- Transparentes: transmiten la mayor parte de la luz sin reflejarla ni difundirla.
- Translúcidos: parte de la luz es reflejada y parte transmitida, dando lugar a una importante componente difusa tanto transmitida como reflejada.

Cuando la luz encuentra interfases ocurre difusión (scattering, en el habla inglesa). Las partículas dispersas en un medio continuo originan múltiples refracciones y reflexiones que esparcen la luz en todas direcciones. Por eso, cuando el tamaño de partícula es pequeño, se absorbe menos luz durante el pasaje de cada partícula y, al mismo tiempo, la superficie total de interacción luz-material es mayor, dando lugar a mayor sensación de claridad.

Los principios fundamentales de la colorimetría están basados en las tres leyes de Grassman; de las cuales, la más importante establece que cualquier color puede ser igualado por la suma de tres colores primarios en cantidades convenientes. Estos colores primarios deben ser elegidos de forma tal que sean independientes entre sí, es decir, ninguno puede ser obtenido por combinación de los otros dos. En la práctica, los colores primarios a utilizar en forma aditiva son tres: rojo, verde y azul. La suma de todos ellos produce la sensación de luz blanca o acromática (Lozano, 1978).

El color puede ser definido por los siguientes atributos:

- La *claridad* es el atributo que hace corresponder a cada color una equivalencia con respecto a una escala de grises. A la cualidad psicológica claridad le corresponde la magnitud psicofísica *luminosidad*.
- El *tono* o *matiz* es el atributo que adjudica al color una cualidad que se define como rojo, naranja, amarillo, verde, azul, púrpura o cualquier combinación de ellos. A la cualidad psicológica tono le corresponde la magnitud psicofísica *longitud de onda dominante*.
- La *saturación* es el atributo que, fijado el tono, describe al color por su similitud con un color espectral puro, cuanto más parecido a este, tanto más saturado. A la cualidad psicológica saturación le corresponde la magnitud psicofísica *pureza*.

Una descripción cuantitativa de un color puede ser dada en los términos de los tres atributos del color mencionados previamente. El mecanismo psicofísico de visión del color da al observador humano la capacidad de apreciar los tres atributos o características del color. Sin embargo, el observador no puede percibir la composición espectral del estímulo.

La medida objetiva del color de un material puede obtenerse del análisis de su espectro visible, por transmisión o reflexión, obtenido con un espectrofotómetro. De los sistemas propuestos para la especificación del color el más difundido universalmente es el de la CIE (Comission Internationale de l'Eclairage), en el cual el color es indicado por tres variables X, Y, Z, conocidas como los valores triestímulo y que representan a tres colores primarios imaginarios (relacionados con el verde, el rojo y el azul).

El cálculo necesario para obtener los valores triestímulo CIE para un objeto se esquematiza de la siguiente manera (**Figura 1.11.1.a**): El valor del estímulo visual es la resultante de una combinación del espectro de la luz incidente ( $E$  vs  $\lambda$ ) con el espectro de la muestra ( $R$  vs  $\lambda$ ) y con las funciones de distribución de la sensibilidad del ojo para cada uno de los tres primarios imaginarios ( $S$  vs  $\lambda$ ). El área bajo la curva resultante se integra en el espacio visible para obtener los valores numéricos de la contribución de cada uno de los tres primarios ideales (X, Y, Z) al color dado.

El factor de transmitancia o reflectancia espectral se obtiene mediante un espectrofotómetro, en el que se determina la luz transmitida ó reflejada para cada  $\lambda$ . La distribución energética para varios iluminantes es conocida, por ejemplo: el iluminante C tiene una distribución energética similar a la luz blanca solar (difusa, cielo cubierto). Otras de las variables a fijar es el ángulo del observador ó campo visual: cuando se miran objetos la información general proviene de ángulos de 10-20°C, pero cuando se observan detalles, el ángulo es de 2°C; en general, en colorimetría de alimentos se emplea éste último. En los espectrofotómetros actuales este cálculo se realiza automáticamente por un sistema de computación acoplado al instrumento. De esta manera el color queda determinado por un punto en un espacio tridimensional de coordenadas X, Y, Z. Sin embargo, la forma habitual de representación es calcular las llamadas coordenadas cromáticas x, y definidas por:

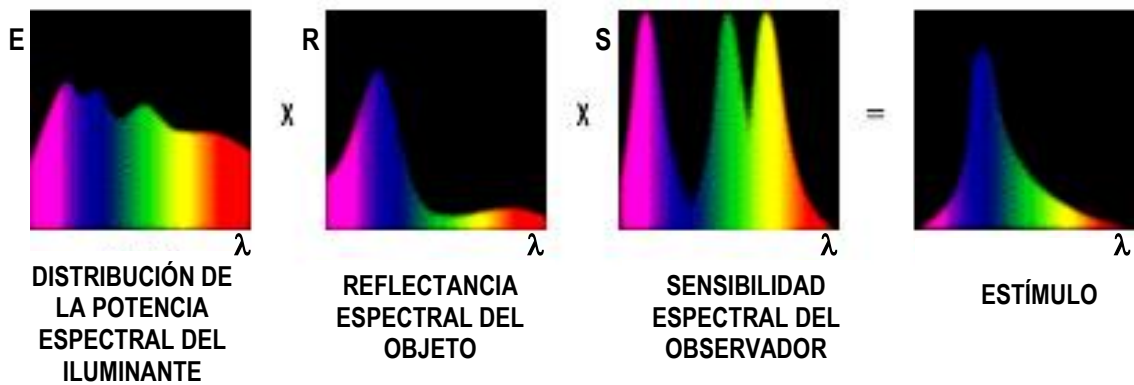
$$x = \frac{X}{X + Y + Z} \quad (1.1)$$

$$y = \frac{Y}{X + Y + Z} \quad (1.2)$$

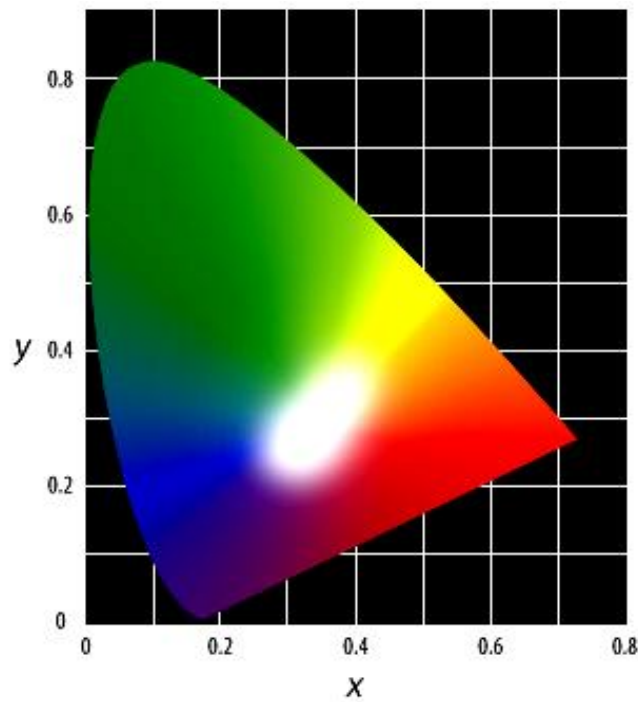
**Figura 1.11.1**

- a) Suma de radiaciones espectrales que conforman en el estímulo o flujo radiante que percibe el observador (Buera, 2005)
- b) Diagrama Cromático CIE

a)



b)





El color definido por  $(x,y)$  se representa en el diagrama cromático CIE (**Figura 1.11.1.b**) donde sólo tiene lugar la cromaticidad del color en cuestión. Para que la especificación del color sea completa, eventualmente se utiliza la luminosidad  $Y$  como tercera coordenada, en un plano perpendicular que representa la propiedad de reflejar más ó menos luz. El plano de las coordenadas cromáticas está delimitado por una línea recta que une los extremos del espectro visible, conocida como línea de púrpuras (Kelly, 1943).

El espacio CIE 1931 es muy sencillo de manejar y es excelente para representar mezclas aditivas, pero no es homogéneo (distancias geométricas iguales no suelen representar diferencias de color iguales en la percepción por el ojo humano). Para subsanar el problema de su no uniformidad, se han desarrollado una serie de transformaciones del espacio CIE que permiten obtener mejores resultados en la evaluación de la diferencia de color. Así surgen las transformaciones CIELab (1974) y CIELuv (1976). El CIELuv es una transformación lineal del espacio cromático CIE, en cambio, líneas rectas en el espacio CIE corresponden a líneas curvas en el espacio CIELab. Es sencillo calcular las coordenadas cromáticas en estos sistemas a través de los valores triestímulo  $X$ ,  $Y$  y  $Z$ , y viceversa.

### **1.11.1- Medición de color con espectrocolorímetro o espectrofotómetros de reflectancia**

Los espectrofotómetros de reflectancia realizan la medición de reflectancia o transmitancia (según donde se coloque la muestra) a medida que barren las distintas  $\lambda$  y luego realizan la integral para todas las  $\lambda$  automáticamente.

Para realizar la medición objetiva del color con estos instrumentos se requiere decidir previamente cómo será la presentación de la muestra (cubeta, posición, tipo de medición; si por reflectancia o por transmitancia):

### **1.11.2- Funciones de color**

Las funciones de color son valores que se obtienen por combinación matemática de los valores triestímulo, y que representan los atributos de color, según los distintos

espacios cromáticos. Para describir un cambio de color se debe primero seleccionar la función más adecuada para ello, que es la que representa más sensiblemente la respuesta al cambio realizado en el producto (por ejemplo, pérdida o formación de pigmento)

En el espacio CIELab algunas funciones de color son las siguientes:

$$L^*_{ab} = 116 \cdot (Y/Y_n)^{1/3} - 16 \quad (1.3)$$

$$a^* = 500 \cdot [ (X/X_n)^{1/3} - (Y/Y_n)^{1/3} ] \quad (1.4)$$

$$b^* = 200 \cdot [ (Y/Y_n)^{1/3} - (Z/Z_n)^{1/3} ] \quad (1.5)$$

Donde  $L^*_{ab}$  es el parámetro *luminosidad* que toma valores entre 0 (negro) y 100 (blanco);  $a^*$  (eje rojo-verde) y  $b^*$  (eje amarillo-azul) toman valores desde -120 a 120.  $X_n, Y_n, Z_n$  son los valores correspondientes al iluminante (para muestras opacas) o a la referencia (para muestras transparentes).

Croma métrica:  $C^*_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (1.6)$

Angulo de tono:  $h_{ab} = \tan^{-1} (b^*/a^*) \quad (1.7)$

## 1.12- Análisis sensorial de alimentos

El análisis sensorial ha sido definido como una disciplina basada en el examen (evocación, medición, análisis e interpretación) de las propiedades organolépticas de un producto, realizado con los órganos de los sentidos.

Si bien los instrumentos son efectivos en muchos casos, no pueden medir ni reemplazar la percepción sensorial. Por ejemplo, hay ingredientes y procesos que tienen un efecto sinérgico que no pueden medirse con un instrumento. En el momento que una porción de alimento se contempla, se huele y se introduce en la

boca se desencadenan una serie de efectos que están relacionados entre sí y que dependen de la intensidad y calidad del estímulo que los provoca, de las características de los receptores sensoriales y de la atención y conocimientos básicos del individuo. El éxito depende de la proximidad lograda entre el estímulo y la respuesta dada por el individuo a la sensación percibida. Cuando una producción está bien definida, tanto en términos instrumentales como sensoriales, la calidad de un producto es más completa, tendiendo a los modernos conceptos de la calidad total (Carter y Risky, 1990).

Cuando se utiliza a las personas como instrumento de medida, es necesario controlar todas las condiciones de las pruebas a realizar para evitar los errores causados por factores fisiológicos, psicológicos y culturales por parte del sujeto; factores ambientales que puedan alterar el juicio por parte del sujeto y factores inherentes al alimento (por ejemplo: intensidad del estímulo inferior a la sensibilidad del individuo). Cuando se habla de error no precisamente se habla de un juicio equivocado sino que se incluye a todos los factores antes mencionados. Para que el análisis sensorial sea considerado como una técnica de análisis se exigen otros requisitos (Cabezudo, 1982):

- Los resultados deben solicitarse y expresarse de manera tal que las conclusiones extraídas de la experiencia sean homologables a las extraídas por otro laboratorio.
- Los resultados deben permitir calcular sus límites de validez y sensibilidad.

Las áreas que se pueden beneficiar con la implementación de un programa de evaluación sensorial se resumen en la **Tabla 1.12.1**.

### **1.12.1- Jueces**

Son los sujetos que llevan a cabo la rutina de evaluación sensorial, es decir, el instrumento de medida. Son seleccionados y entrenados o no, dependiendo del tipo de pruebas y producto a evaluar. El Comité de Evaluación Sensorial perteneciente a la Sociedad Americana para el Análisis de Materiales (ASTM, 1968) los ha clasificado en tres subgrupos:

**Tabla 1.12.1**

Áreas beneficiadas con la implementación de un programa de evaluación sensorial

<b>AREA</b>	<b>FUNCIÓN</b>
<input checked="" type="checkbox"/> <b>Producción</b>	Proveedores alternativos Cambios en los equipos Sustitución de ingredientes
<input checked="" type="checkbox"/> <b>Control de calidad</b>	Aceptación de ingredientes Control durante un proceso Control de un producto final Comparación con otros productos Reducción de costos
<input checked="" type="checkbox"/> <b>Desarrollo de productos</b>	Cambios de escala Evaluación de nuevos productos Pruebas de vida útil
<input checked="" type="checkbox"/> <b>Marketing</b>	Ensayos de preferencia Evaluación de quejas del consumidor

- *Panel entrenado*: son sujetos cuidadosamente seleccionados y entrenados en las propiedades sensoriales (virtudes y defectos) que han de evaluar en el alimento. Deben ser capaces de establecer la intensidad de un carácter sensorial, tanto como la apreciación global de un alimento. El entrenamiento asegura la utilización sistemática de la combinación de las percepciones sensoriales de los evaluadores, como guía analítica para determinar la calidad de los productos alimenticios (Jellinek, 1985). Poseen un lenguaje formal y en muchas ocasiones tienen conocimiento científico de las propiedades que miden. Dado el elevado conocimiento que poseen del producto y su entrenamiento, se utiliza un número escaso de ellos (no más de 10).
- *Panel semientrenado*: constituido por personas familiarizadas con los atributos de del producto que van a evaluar. Este panel es capaz de discriminar diferencias, medir intensidad de atributos en escalas y evaluar globalmente al producto. Tienen un lenguaje menos formal que el panel entrenado. La variabilidad individual puede balancearse considerando un mayor número de panelistas (25 a 40 miembros).
- *Panel de consumidores*: no tienen ningún tipo de entrenamiento, se eligen al azar teniendo en cuenta que sean consumidores del producto que van a evaluar. Son ideales para evaluar la aceptabilidad de un producto pudiendo también evaluar la intensidad de atributos en escalas simples siguiendo determinadas consignas en la elaboración del formulario (ver **apartado 1.12.6.2** )

### **1.12.2- Selección del panel**

No existen reglas fijas en cuanto a las pruebas y criterios de selección. Fundamentalmente dependerá del tipo de trabajo que se espera del panelista. En general, se reclutan tres veces más candidatos de los que se van a precisar. Esto se debe a la necesidad de tener personas suplentes y además porque los participantes que son seleccionados para una prueba no necesariamente serán buenos para otra.

Las pruebas de selección utilizadas son generalmente similares a las que luego se van a utilizar como método de análisis, con el propósito de familiarizar al panelista con dichos ensayos.

Si se requiere un estudio de aceptabilidad de un producto por consumidores, no es necesario tener personas altamente entrenadas. Bastará con seleccionar aquellas con cierta aptitud para detectar los gustos básicos más exaltados en el alimento a analizar y entrenarlas mínimamente en las pruebas que irán a realizar.

Si se busca detectar algún componente extraño en el producto o, por ejemplo, realizar un perfil de sabor del mismo se necesita tener panelistas más entrenados, los cuales seguirán diferentes pruebas de selección secuenciales. Dichas pruebas aumentarán la habilidad para reconocer e identificar atributos sensoriales en sistemas complejos y la sensibilidad y memoria para brindar mediciones sensoriales precisas (ASTM, 1981; Cabezudo, 1982).

### **1.12.3- Selección del sitio de la prueba**

La localización del sitio de prueba tiene numerosos efectos sobre el resultado, no sólo por la localización geográfica, sino por el lugar de prueba define muchos otros aspectos de la forma en que el producto es muestreado y percibido.

- **Pruebas de laboratorio:** permite el control cuidadoso de las condiciones de preparación y presentación de las muestras. En contrapartida, la localización sugiere que el producto fue elaborado en esa dependencia específica, lo cual puede influir sobre las expectativas del sujeto.
- **Pruebas de locación central (puesto de prueba):** las pruebas se realizan en un lugar donde se congregan muchos potenciales compradores, ya sea en un puesto en una feria, supermercado ó paseo de compras. La principal ventaja es que los productos son evaluados por el propio usuario. Sin embargo, el número de preguntas debe ser limitado debido al gran potencial de distracción y al escaso tiempo del que disponen las personas que participan en la prueba.

- **Pruebas domiciliarias:** el producto es evaluado bajo sus condiciones naturales de consumo y se obtienen las opiniones de todo el grupo familiar. Como se dispone de más tiempo, se puede obtener mayor información sobre las actitudes de los usuarios a varias características del producto aunque posee la desventaja que al no estar el analista la persona puede contestar el formulario por aburrimiento o azar.

#### **1.12.4.1- Pruebas de laboratorio: sala de prueba**

Condiciones ambientales no adecuadas pueden ser causa de distorsión de las respuestas, es por eso que la sala ideal es aquella que no llama la atención en ningún sentido a los jueces. La iluminación insuficiente, los ruidos de cualquier tipo, la existencia de olores ambientales, así como una temperatura demasiado alta o baja, son causa indirecta de una mala calificación de las sensaciones. A esta deberán añadirse otras como la incomodidad de las cabinas, que pudiera provocar irritación o claustrofobia, así como también la falta de eficacia de la persona que sirve las muestras. Los requisitos que deben reunir una sala de análisis sensorial están normalizados hasta en los mínimos aspectos (Norma PNE 87-004). Así mismo, se debe evitar que los sujetos interactúen introduciendo errores de apreciación por distracción. Existen, sin embargo pruebas especiales descriptivas donde un grupo reducido de personas entrenadas evalúan y discuten en conjunto, en una mesa redonda los atributos de las muestras.

#### **Requerimientos indispensables de la cabina:**

- Muestras debidamente codificadas y si es necesario camufladas.
- Planilla de análisis correctamente elaborada
- Agua para el enjuague de la boca entre muestra y muestra
- Zona de descarte del agua de lavado (pileta o recipiente). No se recomienda el uso de piletas y canillas pues introducen ruidos y olor.
- Elemento neutralizante (grisines, manzana) para el testeo de muestras con características organolépticas importantes.
- Placa calefactora en caso de evaluar muestras a una temperatura específica.

- Cada cabina puede tener una terminal de computadora, donde el panelista expresa su juicio en la pantalla y el resultado puede ser analizado inmediatamente.

*Iluminación:* La iluminación debe ser uniforme y no debe influir en la apariencia del producto a ser evaluado. En ocasiones se utilizan luces coloreadas para enmascarar diferencias de color, cuando este atributo que no se desea evaluar. El uso de luces coloreadas con personas inexpertas no resulta satisfactorio, en cuyo caso es posible enmascarar ese atributo por ejemplo, utilizando recipientes coloreados.

*Ventilación:* Este punto requiere de especial atención. La sala de prueba debe estar bien ventilada. Las condiciones ideales requieren una temperatura de 20 a 25°C y una humedad relativa aproximada al 62%.

*Presentación de Muestras:* La presentación de las muestras debe estandarizarse de manera de minimizar errores. La cantidad de muestras exigida por la prueba se debe preparar siguiendo estrictamente los criterios que establecen una toma de muestra representativa y suficiente. Todas las muestras se deben entregar codificadas, con la clave marcada en el recipiente de la muestra (vaso o plato). Se recomienda utilizar claves de tres cifras elegidas al azar ó dos cifras y una letra. La clave elegida debe ser distinta para cada sujeto incluso si se trata de la misma muestra (en caso de repetición de la prueba). Las muestras deberán ser idénticas en todos sus aspectos menos en el que se quiere evaluar. El orden de presentación de muestras debe ser al azar, de modo que una misma muestra pueda situarse en todas las ubicaciones posibles en la bandeja. El reparto de los distintos grupos de muestras para cada juez también debe realizarse al azar.

*Uso de diluciones o soportes para la muestra:* La mayoría de los alimentos se sirven de la manera que son consumidos habitualmente. Algunos alimentos tales como salsas ó especias deben ser diluidos. En algunos casos el soporte es necesario (Ej: evaluación de una cobertura para tortas, relleno de tartas), mientras que en otros los soportes no ayudan a una correcta discriminación (Ej: galletitas



para evaluar mermelada). Pueden ser de utilidad en el caso de pruebas de preferencia.

*Temperatura de las muestras:* En los ensayos de aceptabilidad las muestras se sirven a la temperatura de consumo habitual (ej: alimentos calientes: 60 - 66°C; helado: -15°C). En las pruebas discriminativas las muestras se sirven a la temperatura óptima de percepción.

*Cantidad de muestra:*

- Pruebas discriminativas: 15 ml (alimentos líquidos) y 30 g (alimentos sólidos)
- Pruebas de aceptabilidad: 30 ml (alimentos líquidos) y 60 g (alimentos sólidos)

En el caso de productos con características organolépticas importantes puede resultar agradable en pequeñas cantidades, pero desagradable en mayor proporción. En estos casos evaluar el volumen de consumo promedio.

*Formularios de respuesta:* La pregunta pertinente debe estar redactada en un estilo claro y conciso, sin la menor ambigüedad, para impedir toda duda o discrepancia en su comprensión. Existen algunas pruebas normalizadas para las cuales se han desarrollado formularios modelo. Se pueden introducir cambios menores siempre y cuando no se introduzca con ello prejuicios. Por ejemplo, en el cuestionario de una prueba hedónica no podrá preguntarse si el producto es considerado “extra” o “superior”, puesto que implica un grado de calidad que la persona consultada puede no tener el criterio para valorar, además de no ser ese el objetivo de la prueba. Tiene buena aceptación el sistema de solicitar a las personas que marquen la casilla que mejor refleje su opinión. Accesorio desde el punto de vista estadístico pero importante desde el punto de vista psicológico resulta la inclusión del apartado observaciones. Suele derivar información importante.

### **1.12.5- Factores que influyen en un juicio sensorial**

Los factores que influyen en el juicio emitido por un sujeto se pueden agrupar en tres clases (Meilgaard, 1999): fisiológicos, psicológicos y físicos.

### 1.12.5.1- Fisiológicos

- *Adaptación*: es una disminución o cambio en la sensibilidad a un dado estímulo por exposiciones reiteradas al mismo.
- *Potenciación o supresión*: son efectos causados por la interacción de estímulos en una mezcla. Así, por ejemplo, el sabor dulce disminuye el gusto ácido.

### 1.12.5.2- Psicológicos

- *Error de expectativa*: generalmente el juez encuentra lo que esperaba encontrar (por comentarios, etc.).
- *Error de hábito*: consiste en dar la misma respuesta ante pequeños cambios del estímulo (tal como se da en un control de calidad efectuado día a día).
- *Error de estímulo*: ocurre cuando factores irrelevantes, como el estilo o color del envase en que se presenta la muestra, influyen en el juicio emitido por el sujeto.
- *Error lógico*: este tipo de error se produce cuando ciertas características del producto se asocian en la mente del sujeto. Así, por ejemplo, una mayonesa oscura da idea de almacenamiento prolongado, o una cerveza oscura da idea de un sabor más fuerte.
- *Error de superposición de atributos*: cuando se evalúa más de un atributo a la vez es probable que uno de los valores pueda influenciar al otro.
- *Orden de presentación de las muestras*: al menos cinco fuentes de error son causadas por el orden de presentación de muestras:

*Efecto de contraste*

*Efecto de grupo*

*Error de tendencia central*

*Error de tiempo*

*Error de posición*

Todos estos efectos pueden ser compensados utilizando una presentación al azar y balanceada. Una presentación balanceada implica presentar a cada muestra en todas las posiciones posibles un número igual de veces.

- *Sugerencias mutuas*: la respuesta de un juez puede influenciar las respuestas de otros. Para ello se utilizan cabinas separadas.
- *Falta de motivación*: un juez motivado resulta un juez eficiente.
- *Caprichos y timidez*: algunos sujetos tienden a utilizar los extremos de una escala mientras que otros liberan juicios intermedios
- *Físicos*: Los jueces no deben participar de una sesión si se encuentran en las siguientes circunstancias:
  - Resfriados o padecen de alguna enfermedad.
  - Presionados por el trabajo o padecen de algún desequilibrio emocional.
  - Si fumaron o tomaron café antes de la sesión.

### **1.12.6- Clasificación de las pruebas de evaluación sensorial**

Los métodos de medición sensorial comprenden una amplia gama de pruebas de evaluación. La elección de los mismos se basa en los objetivos del proyecto y en la disponibilidad de personas y material a utilizar. Stone y Sidel (1993) han clasificado estos métodos en tres grandes categorías:

- *Pruebas discriminativas*: se desea determinar si dos muestras son perceptiblemente diferentes. Dos muestras pueden tener formulación químicamente diferente y el ser humano puede no ser capaz de percibir esa diferencia, por ejemplo cuando se sustituye un ingrediente. Dentro de este grupo se encuentran las siguientes pruebas: Test del triángulo; Duo ó trío; Test de comparación pareada; diferencia contra control; test "A"- "no A"; etc.
- *Pruebas descriptivas*: describen detallada y objetivamente al producto en términos de sus atributos y/o defectos sensoriales. Permite obtener una descripción completa del producto, ayuda a identificar ingredientes y variables de proceso, y/o determinar que atributos sensoriales son importantes para su aceptación. La intensidad con que se manifiesta cada atributo se expresa por un valor asignado a una escala de medida. La validez de la misma viene dada por dos factores principales:

- a) La selección de una escala adecuada con descriptores adecuados. Esta es una tarea complicada ya que resulta difícil encontrar el rango de valores del atributo evaluado que abarque los valores de las muestras. Muchas veces la intensidad del atributo en la muestra se ve exaltada o bien disminuída por la presencia de otro atributo, dificultando su percepción (Meilgaard, 1999).
- b) La familiarización de los sujetos con las escalas utilizadas y el entrenamiento de los mismos para evaluar un atributo en forma cuali-cuantitativa en una muestra.

Para realizar un test descriptivo se pueden utilizar métodos ya normalizados (análisis descriptivo cuantitativo (QDA); perfil de flavor; perfil de textura, perfil libre, método SPECTRUM<sup>®</sup>, etc.) o bien puede ser diseñado teniendo en cuenta la información que se quiere obtener (Stone y col., 1974). Son ideales para estudios de vida útil, control de calidad, desarrollo de productos, etc. Emplea fundamentalmente panelistas entrenados y semientrenados.

- *Pruebas Afectivas*: el objetivo primario es este tipo de pruebas es evaluar la aceptabilidad global o preferencia de un producto. Las pruebas afectivas más comunes utilizan escalas hedónicas. El término “hedónico” hace referencia al agrado o desagrado que una muestra provoca al probarla o bien observarla. La opinión del participante se vuelca en una escala de categorías (en general, nueve), las cuales determinan los distintos grados de placer en orden progresivo desde, por ejemplo *-me gusta muchísimo-* a *-me desagrada absolutamente-*. Las pruebas afectivas siguen, en general a estudios discriminativos y /o descriptivos y son previas a un estudio de mercado. . Emplean consumidores del producto que se ha de evaluar

A continuación se describirán brevemente los fundamentos de algunas pruebas sensoriales que se han utilizado en este estudio.

### **1.12.6.1- Pruebas discriminativas**

- **Prueba del triángulo**

Es el método discriminativo más utilizado. Como su nombre lo implica es un test de tres muestras (todas codificadas) y la consigna del panelista es averiguar cuales dos son semejantes y cual es la diferente. La chance de acierto es del 33%, hecho que demuestra el peso estadístico de esta prueba y su mayor sensibilidad respecto de otras pruebas discriminativas (por ejemplo: diferencia parada). Sin embargo, resulta una prueba más difícil para el panelista pues debe recordar sensorialmente dos muestras mientras prueba una tercera y tomar la decisión. No debe usarse con productos de mucho dejo (especias) o efecto fisiológico (bebidas destiladas) pues produce fatiga y adaptación sensorial. Se usa para diferencia global y no para un atributo particular. Es ideal para evaluar efecto del cambio de un ingrediente, aunque también se utiliza en la selección y discriminación de jueces ó cuando las muestras no son claramente diferentes. Utilizando una tabla específica, se verifica si el número de respuestas correctas fue igual o superior al tabulado, para el número de pruebas totales realizadas, en cuyo caso se concluye que no existieron diferencias con un nivel de significación especificado.

- **Prueba de diferencia contra control**

Los objetivos de esta prueba consisten en determinar si existe diferencia entre una o más muestras y el control, y estimar el tamaño de dicha diferencia. Se presenta a los participantes una muestra control de referencia, identificada como tal, y una o varias muestras (una de las cuales puede ser un control camuflado), a ser comparadas con la referencia. El juez debe indicar el tamaño de dicha diferencia generalmente, en una escala de categorías desde “ninguna diferencia” a “diferencia muy grande”. A cada categoría se le asignará un número y los resultados totales para cada muestra serán analizados por el método de análisis de varianza (ANOVA).

Suele ser ventajoso agregar un control camuflado (consistente en una muestra igual al control, pero incluida entre las muestras a evaluar) para obtener una medida del efecto placebo.

Esta prueba es útil en situaciones en las cuales puede haber una diferencia detectable, pero el tamaño de esa diferencia es el que afecta la toma de una decisión, como por ejemplo, en estudios de vida útil o control de calidad de un producto (Meilgaard, 1999).

#### **1.12.6.2- Pruebas afectivas**

- **Test de campo con consumidores**

El objetivo principal de esta prueba consiste en evaluar la respuesta personal (aceptabilidad / impresión o bien preferencia frente a competidores) de los consumidores de un determinado producto o servicio siguiendo un protocolo debidamente especificado en el formulario (Meilgaard, 1999).

#### **Usos de los tests campo con consumidores:**

- 1) Determinar aceptabilidad por consumidores, sobre una base sensorial despojado de la definición conceptual del producto que acompaña a su envase y/o promoción.
- 2) Diagnósis de problemas imperceptibles en laboratorio antes de investigaciones de mercado más costosas.
- 3) Son mejor usados como paso final antes de un estudio de mercado o en supermercados.
- 4) Provee la dirección de una reformulación si ello fuera necesario
- 5) Screening de múltiples formulas o selección de las más promisorias sobre la base de un test camuflado.

- 6) Debido a que los tests se realizan con consumidores “blanco”, hacia quienes está dirigido el producto, la información que surge es sustentable y valorable en defensa de sus competidores

### **Presentación de las muestras. Número de productos a comparar.**

Existen tres diseños principales:

- Los *tests paralelos* presentan dos productos simultáneamente. Se realizan más en locaciones centrales que en hogares.. Bajo circunstancias controladas tiene buena sensibilidad pues las personas evalúan ambos productos. El análisis de datos se realiza por ANOVA. Las comparaciones son estadísticamente directas. Este tipo de tests deben ser controlados y monitoreados por el analista.
- Los *tests de un producto (monádicos)*: cada sujeto evalúa un producto. Economiza tiempo pero se requiere de gran cantidad de sujetos. Puede no ser práctico si el producto no es muy usado ó si es difícil reclutar a las personas La comparación estadística entre productos requiere de comparación entre grupos. Existe una desventaja debido a la variabilidad individual. Además deben evitarse dado que el ser humano es mal evaluador de lo absoluto. Si compara con otros productos su potencial aumenta. Es mucho más seguro poner un producto de referencia de base. Ejemplos pueden ser fórmulas alternativas o muestras de la competencia.
- Los *tests monádicos secuenciales*: mejoran esta situación porque al presentar dos productos de forma secuencial, permite tener dos fuentes de variación: sujetos y producto. En algunas situaciones este tipo de tests es inaplicable. Cuando el proceso de evaluación se ve alterado severamente por el uso del primer producto (enjuague para el pelo, cremas, etc).

## Estructura del cuestionario

Cuando se diseña un cuestionario es útil hacer un diagrama de flujo de los tópicos a cubrir. La regla principal cuando se diseña un cuestionario es ir de lo más general a lo específico.

- Al principio se debe preguntar por la impresión global del producto. Para ello se recomienda utilizar una escala hedónica de 9 puntos balanceada.
- Inmediatamente después se formulan preguntas abiertas con un apropiado patrón de omisión de preguntas de acuerdo a lo contestado. El direccionamiento de preguntas orienta para las razones de gusto si la impresión global fue positiva o de disgusto si la impresión global fue negativa y en todo caso si encuentra alguna característica positiva. Aunque las respuestas abiertas presentan desventajas, dan la oportunidad de conocer razones de gusto o disgusto con las propias palabras del encuestado.
- Luego, se investigan atributos más específicos a través de escalas de punto óptimo, de intensidad y de gusto (apariencia, gusto, textura, color, etc).
- Finalmente, puede chequearse nuevamente la satisfacción global o algún otro índice de gusto y se continúa con una escala de preferencia (si es que se evalúa más de un producto secuencialmente). Lo importante es no preguntar primero por los atributos y luego por la impresión global pues los consumidores piensan en el producto como un todo (de forma integrada). Las preguntas sobre atributos individuales los convierte en más analíticos y trae fallas cuando se les pregunta en forma global. Además, es común que en la impresión global utilicen terminología empleada en las escalas de atributos particulares
- Sumada a las preguntas de selección de participantes, se puede incluir en el cuestionario algunas preguntas de información personal (edad, ingresos, composición familiar, residencia, ocupación). Este tipo de preguntas de carácter demográfico nunca debe realizarse al principio del cuestionario pues inhiben a la persona y la hace más insegura. Al final del cuestionario es lo más adecuado. Lo sentirá más natural.





## 2.1- Objetivo general

El objetivo general de este trabajo consiste en investigar nuevas técnicas de conservación de jugo de naranja basadas en la combinación de factores emergentes y/o factores convencionales de estrés antimicrobiano, con mínimo impacto en la calidad sensorial y económicamente beneficiosas. Si el proceso de conservación involucra la interferencia multiobjetivo de la homeostasis microbiana, los requerimientos o niveles de los distintos factores de estrés a utilizar serán menores que los necesarios cuando se usan en forma aislada y por lo tanto se logrará un menor daño en la calidad total del alimento. Se considera evaluar la efectividad individual de un tratamiento térmico suave (52°C – 61°C) en flujo continuo ó en sistema batch combinado con el agregado de antimicrobianos naturales (vainillina y/o citral) con el propósito de inhibir y/o inactivar microorganismos patógenos y deteriorativos de productos frutales con miras a reducir la intensidad de los tratamientos convencionales de conservación (pasteurización, esterilización etc.).

## 2.2- Objetivos específicos

- Seleccionar el medio de cultivo más apropiado para la recuperación del microorganismo clave elegido para la realización de este trabajo (*Listeria innocua*), el cual será sometido a injuria térmica. Estudiar la influencia de los distintos factores de trabajo en el recuento experimental.
- Estudiar las variables involucradas en la preservación de jugo de naranja adicionado con bajas concentraciones de vainillina y/o citral y sometido a un tratamiento térmico suave.
- Optimizar el procesamiento combinado del jugo de naranja utilizando los factores de stress antes mencionados en un sistema de flujo continuo UHT/HTST a escala piloto y en sistema batch.

- Estudiar en particular la resistencia de *L. innocua* como microorganismo subrogante de *L. monocytogenes* frente al tratamiento combinado.
- Modelar y validar interna y externamente la cinética de inactivación del microorganismo clave para los distintos factores emergentes seleccionados y sus combinaciones en el jugo de naranja utilizando como herramienta fundamental a la microbiología predictiva. Evaluar la influencia de los factores de estrés aplicados a través de los parámetros obtenidos para los distintos modelos.
- Proponer el/los tratamiento/s combinado/s de preservación de jugo de naranja en base a la integración de los resultados previos, seleccionando entre las combinaciones equivalentes desde el punto de vista microbiológico aquellas que impliquen menor deterioro en la calidad y que sean factibles de implementar a nivel industrial.
- Evaluar las modificaciones en la flora nativa y los aspectos sensoriales, y de color producidos por los tratamientos propuestos para jugo de naranja mínimamente procesado.



### 3.1- Jugo de naranja

Para los estudios de la cinética de inactivación microbiana se utilizó jugo de naranja preparado a partir de un jugo concentrado (sólidos solubles: 65,2 - 65,8 °Brix; acidez (% p/p): 8,59 - 6,22; relación sólidos solubles / acidez: 7,66 -10,5). Este jugo concentrado congelado (-18°C), sin conservantes ni aditivos, fue elaborado especialmente para este trabajo por Litoral Citrus S.A. y Eca Agroindustrias. Se adicionó al mismo agua estéril en proporción agua - jugo concentrado 6:1, resultando un jugo con concentración final de sólidos solubles de  $\cong 11,2 \pm 0,5$  °Brix y pH  $3,5 \pm 0,1$ . Con el objeto de reducir la posible carga microbiana presente en el jugo, el mismo fue tratado térmicamente a  $\cong 72^\circ\text{C}$  por 14 segundos utilizando un equipo UHT/HTST Microthermics, Lab - 25DH (Raleigh, USA). El jugo pasteurizado se recolectó en una cabina de seguridad biológica tipo II (Nuair Inc., USA) y se mantuvo en refrigeración ( $\cong 5^\circ\text{C}$ ) para su uso dentro de las 24 hs ó se congeló (-18°C) para su posterior utilización.

En las pruebas de vida útil, evolución del color y evaluación sensorial se utilizó jugo obtenido a partir de naranjas (variedad *Valencia*) usando un exprimidor de cítricos eléctrico. Las naranjas fueron previamente lavadas y cepilladas con agua y detergente, remojadas 15 minutos en agua con hipoclorito de sodio al 1% y enjuagadas con agua destilada. El exprimidor y demás materiales utilizados fueron sanitizados con agua con hipoclorito y expuestos a la luz UV por 20 minutos. La extracción del jugo se realizó en cabina estéril. Luego de la extracción, el jugo se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos con el fin de disminuir la cantidad de pulpa y así evitar la precipitación por acción enzimática afectando la calidad del jugo.

### 3.2- Reactivos e insumos utilizados

- Vainillina granulada (Quest International, Argentina).
- Aceite esencial de citral (Firmenich, Argentina).
- Etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Piruvato de sodio (Laboratorios Britania, Argentina)
- D-glucosa anhidra (Merck, Darmstadt, Alemania)

- Azúcar común (calidad comercial)
- Ácido cítrico anhidro (Parafarm, Argentina)
- Extracto de levadura (Laboratorios Britania, Argentina)
- Mezcla vaselina-parafina (vas-par)
- Agar-Agar (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Solución limpiadora ácida, HOROLITH CIP (Ecolab Inc., USA)
- Solución sanitizante alcalina, AC101 (Ecolab Inc., USA)

### **3.3- Medios de cultivo utilizados**

- Agar Tripteína Soja (ATS-E) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), composición (g/l): tripteína 15; peptona de soja 5; cloruro de sodio 5; agar 15; extracto de levadura 6; pH del medio preparado:  $7,3 \pm 0,2$ .
- Caldo Tripteína Soja (CTS-E) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina) composición (g/l): tripteína 17; peptona de soja 3; cloruro de sodio 5; fosfato dipotásico 2,5; glucosa 2,5; extracto de levadura 6; pH del medio preparado:  $7,3 \pm 0,2$ .
- Agua Peptona bufferada (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina) composición (g/l): peptona 10; cloruro de sodio 5; fosfato disódico 3,5; fosfato monopotásico 1,5; pH del medio preparado:  $7,2 \pm 0,2$ .
- Agar de Recuento en Placa (APC) (Merck, Darmstadt, Alemania) composición (g/l): peptona de caseína 5; extracto de levadura 2,5; D(+) glucosa 1; agar-agar 14; pH del medio preparado:  $7,0 \pm 0,2$ .
- Agar Extracto de Levadura-Glucosa-Cloramfenicol (YGC) (Merck, Darmstadt, Alemania) composición (g/l): extracto de levadura 5; D(+) glucosa 20; cloramfenicol 0,1; agar-agar 14,9; pH del medio preparado:  $6,6 \pm 0,2$ .

- Agar Suero de Naranja (OSA) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) composición (g/l): triptona 10; extracto de levadura 3; jugo de naranja (equivalente sólido) 3,5; glucosa 4; fosfato dipotásico 2,5; agar 14; pH del medio preparado:  $5,5 \pm 0,2$ .
- Caldo Cerebro-Corazón (BHI) (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) composición (g/l): infusión cerebro corazón 17,5; hidrolizado pancreático de gelatina 10; cloruro de sodio 5; fosfato disódico 2; glucosa 2; pH del medio preparado:  $7,4 \pm 0,2$ .

### **3.4- Microorganismos**

En este estudio se utilizó *Listeria innocua* ATCC 33090 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 provistas por Medica-Tec SRL, Argentina. Las mismas se sembraron en estrías de ATS-E y se incubaron a 37°C por 24 hs, almacenando luego las estrías a 4 °C para su posterior utilización.

### **3.5- Determinación de pH y sólidos solubles**

El pH del jugo de naranjas se midió utilizando un pHmetro PerpHect pH/ISE modelo 310 (Orion Research Inc., Beverly, USA).

La concentración de sólidos solubles (° Brix) se determinó utilizando un refractómetro digital PR-101 Palette (ATAGO Co. LTD, Japón).

Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

### **3.6- Preparación de las soluciones de antimicrobianos naturales**

Se prepararon soluciones alcohólicas al 26% (p/v) de vainillina y soluciones al 5% (p/v) de citral utilizando etanol absoluto como solvente. Estas soluciones se esterilizaron por filtración con membranas de acetato de celulosa con tamaño de

poro de 0,45 µm (Bellows SRL, Buenos Aires) y se almacenaron en refrigeración (8 °C) al abrigo de la luz hasta su posterior utilización.

### **3.7- Enumeración de microorganismos**

El recuento de los microorganismos viables luego de los distintos tratamientos se determinó por las metodologías del número más probable (NMP) y recuento superficial en placas.

La técnica del NMP es particularmente útil en aquellas condiciones en las que la concentración de microorganismos es baja (< 100 UFC/g). El método empleado se basó en tres diluciones seriadas de la muestra e incubación de grupos de 5 tubos correspondientes a cada dilución. Una vez computados los tubos positivos, se estimó la concentración de microorganismos de la muestra original utilizando las tablas provistas por el Manual Bacteriológico Analítico editado por la FDA (2001) con intervalos de confianza del 95 %.

### **3.8- Detección de células injuriadas**

La experiencia se llevó a cabo utilizando sistemas modelo preparados con agua de peptona al 0,1%, sacarosa (calidad alimentaria) hasta alcanzar una concentración de sólidos solubles de 11°Brix y pH ajustado a 3,5 con ácido cítrico. Los mismos fueron inoculados con *L. innocua* y tratados térmicamente a 57 ó 59 °C por 14 segundos en un equipo de flujo continuo UHT/HTST (MicroThermics, Lab-25DH). La metodología empleada para el tratamiento de muestras en flujo continuo se detalla ampliamente en el **Apartado 3.9**.

Se evaluaron distintos suplementos para lograr una mayor recuperación de células injuriadas térmicamente, evitando los suplementos comerciales que por contener antibióticos podrían afectar la recuperación celular. Se emplearon como medios base ATS-E ó CTS-E suplementados con: 0,1% ó 1 % piruvato de sodio ó 0,5 % D-glucosa anhidra.

Se determinó la aptitud de los diferentes medios aplicando las metodologías del NMP de 5 tubos y de recuento superficial en placas incubando a 30°C durante 7



días. Se seleccionó dicha temperatura de incubación con el objeto de favorecer la recuperación de células injuriadas térmicamente según lo aconsejado por Besse, (2002) quien recomienda utilizar temperaturas de incubación por debajo de la temperatura óptima para el crecimiento, cuando las células fueron expuestas a temperaturas mayores a 60°C.

Se utilizaron los medios base ATS-E y CTS-E como control, siendo cada sistema evaluado por duplicado. Los recuentos microbianos obtenidos en los distintos medios se analizaron estadísticamente mediante la aplicación de un Modelo Lineal Generalizado utilizando como variables categóricas medio de cultivo (MC) y método de recuento (MR), y como variable cuantitativa, temperatura (T) (ver apéndice de **Procedimientos estadísticos, apartado 6.12.1**).

Se realizó un test de comparaciones múltiples Mínima Diferencia Significativa de Fisher (MSD) para determinar si la media de la respuesta obtenida para cada medio de cultivo fue significativamente diferente de las demás (ver apéndice de **Procedimientos estadísticos, apartado 6.14.1**).

### **3.9- Procesamiento del jugo de naranja en un sistema continuo**

#### **3.9.1- Jugo de naranja**

Ver apartado 3.1

#### **3.9.2- Microorganismo**

Se utilizó para este estudio *L. innocua* como microorganismo subrogante de *L. monocytogenes* debido su carencia de patogenicidad, como medida de seguridad por las características de operación del equipo usado para el procesamiento térmico en un espacio abierto. La manipulación de los sistemas inoculados se realizó de acuerdo a los procedimientos de seguridad e higiene reglamentados en el Plan de Protección de este laboratorio.

### 3.9.3- Preparación del inóculo

Para los tratamientos en sistemas de flujo continuo, fue necesaria la obtención de inóculos a gran escala con el propósito de operar grandes volúmenes (5 - 10 litros) de jugo inoculado. Se seleccionó una técnica que incluye como paso principal una centrifugación del cultivo bacteriano requiriendo tres días de preparación como se detalla en el siguiente esquema (ver **Figura 3.9.1**):

Día 1 - Siembra en 20 ml de caldo CTS-E e incubación a 37°C por 24 hs.

Día 2 - Pasaje a 980 ml de caldo CTS-E e incubación a 37°C por 24 hs.

Día 3 - Centrifugación a 2000 x g durante 20 minutos y resuspensión del pellet en un volumen de 50 ml de CTS-E (concentración  $\cong 10^8$ - $10^9$  UFC/mL).

- Inoculación del jugo estéril (en bidones de 5 ó 10 L) de manera de obtener recuentos de  $\cong 10^6$  -  $10^7$  UFC/mL.

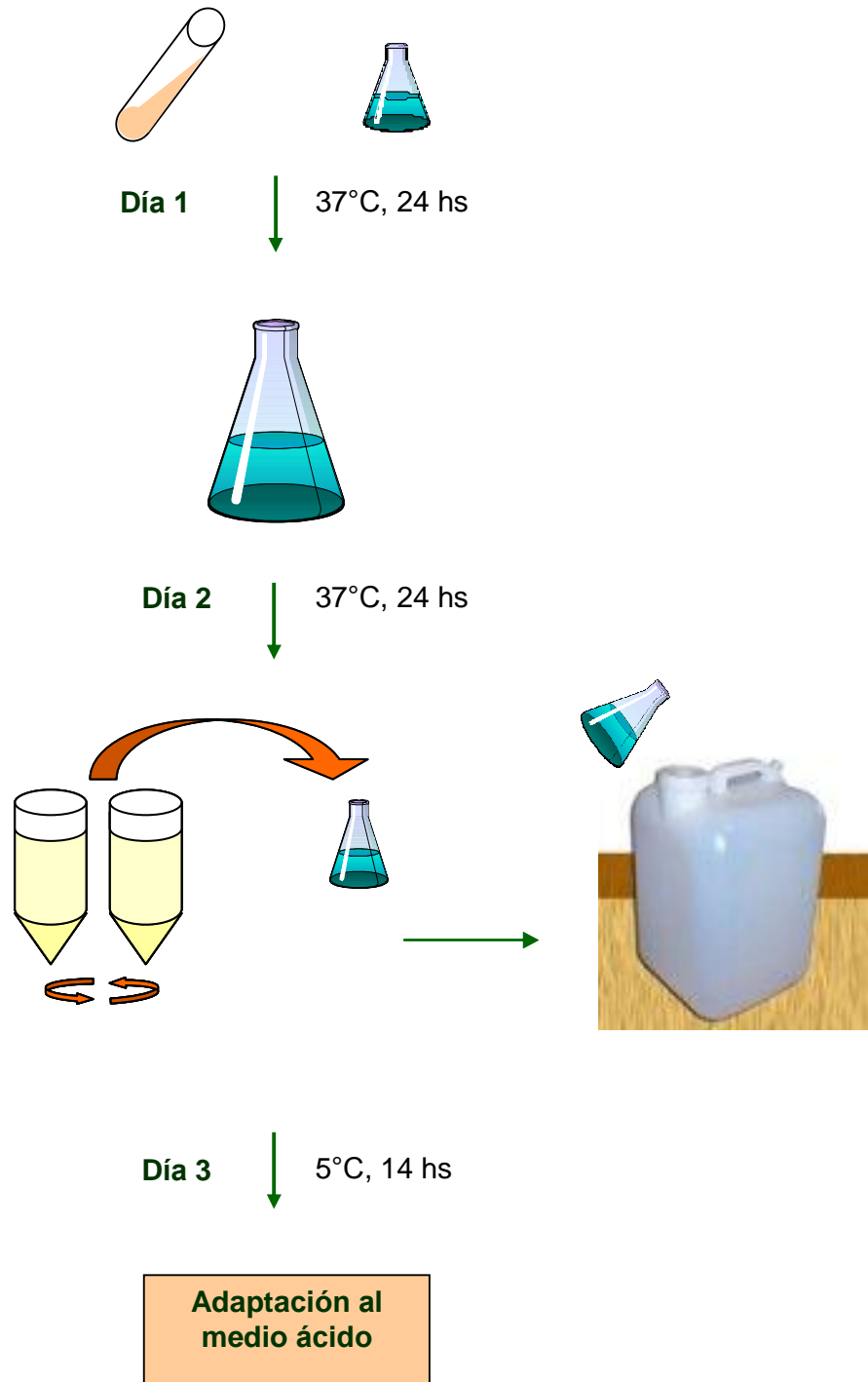
- Almacenamiento durante una noche a 4°C para permitir que las células se adapten al medio ácido antes del tratamiento térmico, según el procedimiento descrito por Farber y col., (1992).

### 3.9.4- Selección de la temperatura de tratamiento térmico

Con el objeto de establecer el rango de temperaturas de trabajo para la obtención de un producto mínimamente procesado, se realizaron pruebas preliminares evaluando el efecto del tratamiento térmico a 55, 57, 59, 61 y 68°C sobre *L. innocua* en sistemas modelo. Dichos sistemas fueron preparados con agua de peptona al 0,1%, azúcar (11°Brix) y pH 3,5 ajustado con ácido cítrico. Estas pruebas permitieron, además de establecer las variables operativas del equipo, seleccionar las temperaturas de trabajo.

**Figura 3.9.1**

Preparación del inóculo concentrado



### 3.9.5-Tratamiento térmico

En esta etapa del estudio se utilizó para el procesamiento del jugo de naranja un equipo de flujo continuo UHT/HTST (ultra altas temperaturas / altas temperaturas cortos tiempos), marca MicroThermics, modelo LAB-25 DH, (Raleigh, USA), esquematizado en la **Figura 3.9.2**. El mismo consiste en un intercambiador de calor de tubos para el procesamiento de fluidos, capaz de trabajar a temperaturas de hasta 145 °C y presiones de hasta 350 psig.

El equipo consta de dos intercambiadores de calor tubulares. El primero (precalentador) **(a)** calienta el producto antes de su entrada al segundo calentador, para lo cual utiliza agua caliente generada a partir de vapor proveniente de una caldera. El segundo calentador **(b)** utiliza vapor para calentar el producto indirectamente, regulando la temperatura del producto por ajuste de la presión de vapor.

Este equipo permite trabajar con diversos tiempos de retención según la combinación de tubos empleada y la velocidad de bombeo del producto. Los distintos tramos de tubos de retención **(c)** están aislados para evitar pérdidas de temperatura, aunque estas pérdidas son inevitables cuando se emplean largos tiempos de retención.

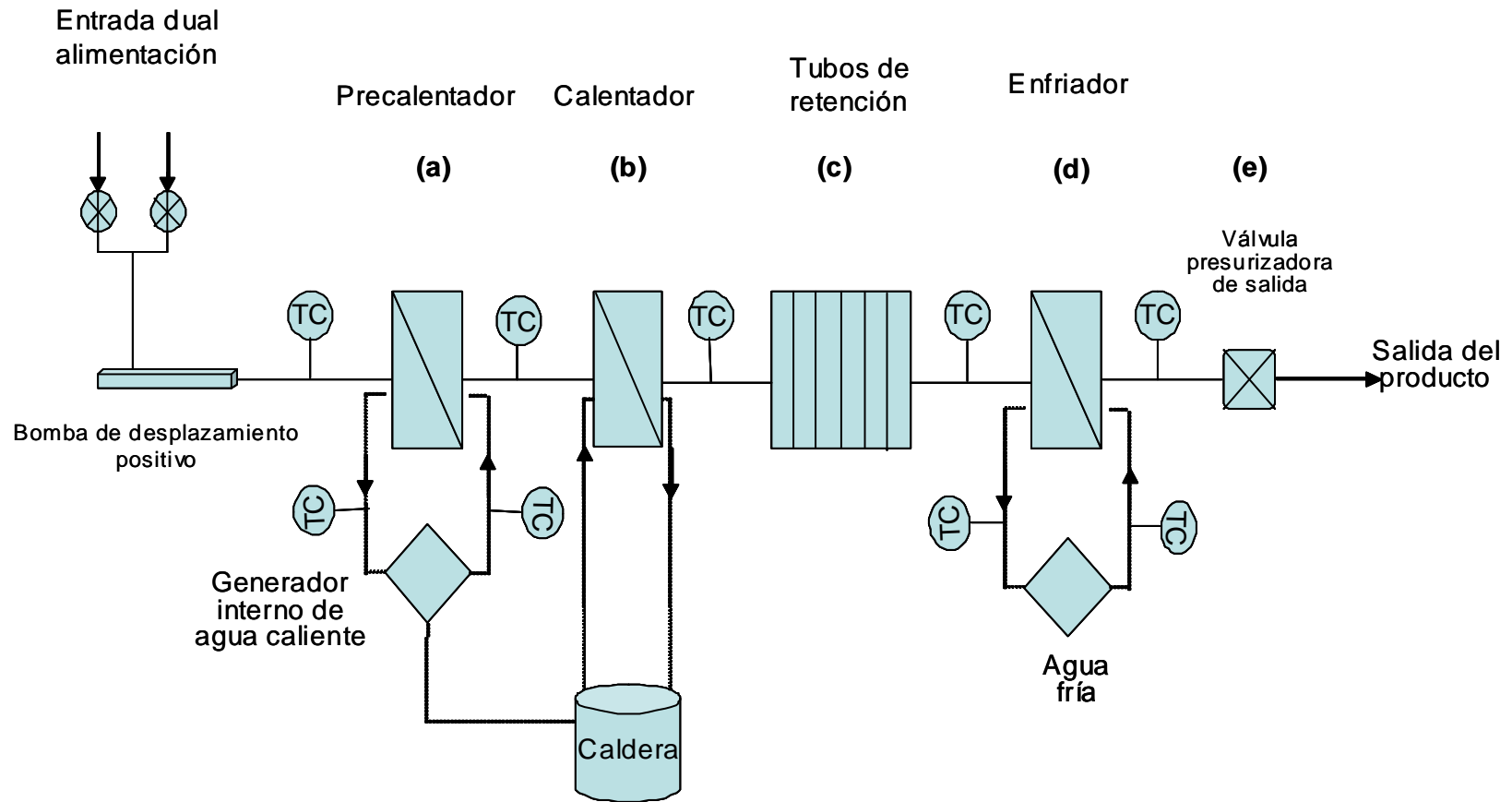
El producto se enfría dentro del equipo **(d)** y la temperatura de enfriamiento se puede controlar restringiendo la entrada de líquido refrigerante (agua). Este sistema de enfriamiento permite la correcta regulación de la temperatura, requisito importante para los sistemas de llenado en caliente.

El sistema también está provisto de una válvula especial **(e)** ubicada en la línea después de los calentadores y refrigerantes. La misma permite controlar la presión de salida del producto y prevenir que éste hierva y salpique durante el proceso. La presión del producto tanto a la salida de la bomba como inmediatamente antes de la válvula reguladora de la presión de salida, se monitorea mediante una pantalla digital. Así mismo el equipo está provisto de termocuplas con las que se pueden monitorear simultáneamente las temperaturas de las distintas unidades.

En este trabajo se emplearon temperaturas de tratamiento térmico subletales para el microorganismo problema utilizando únicamente el precalentador y prescindiendo del uso del calentador.

**Figura 3.9.2**

Diagrama de flujo del intercambiador de calor UHT / HTST MicroThermics, modelo Lab-25 DH utilizado en este estudio.



Se realizaron varias modificaciones y la puesta a punto de las instalaciones de acuerdo al propósito de estudio, las cuales se detallan a continuación (**Figura 3.9.3**):

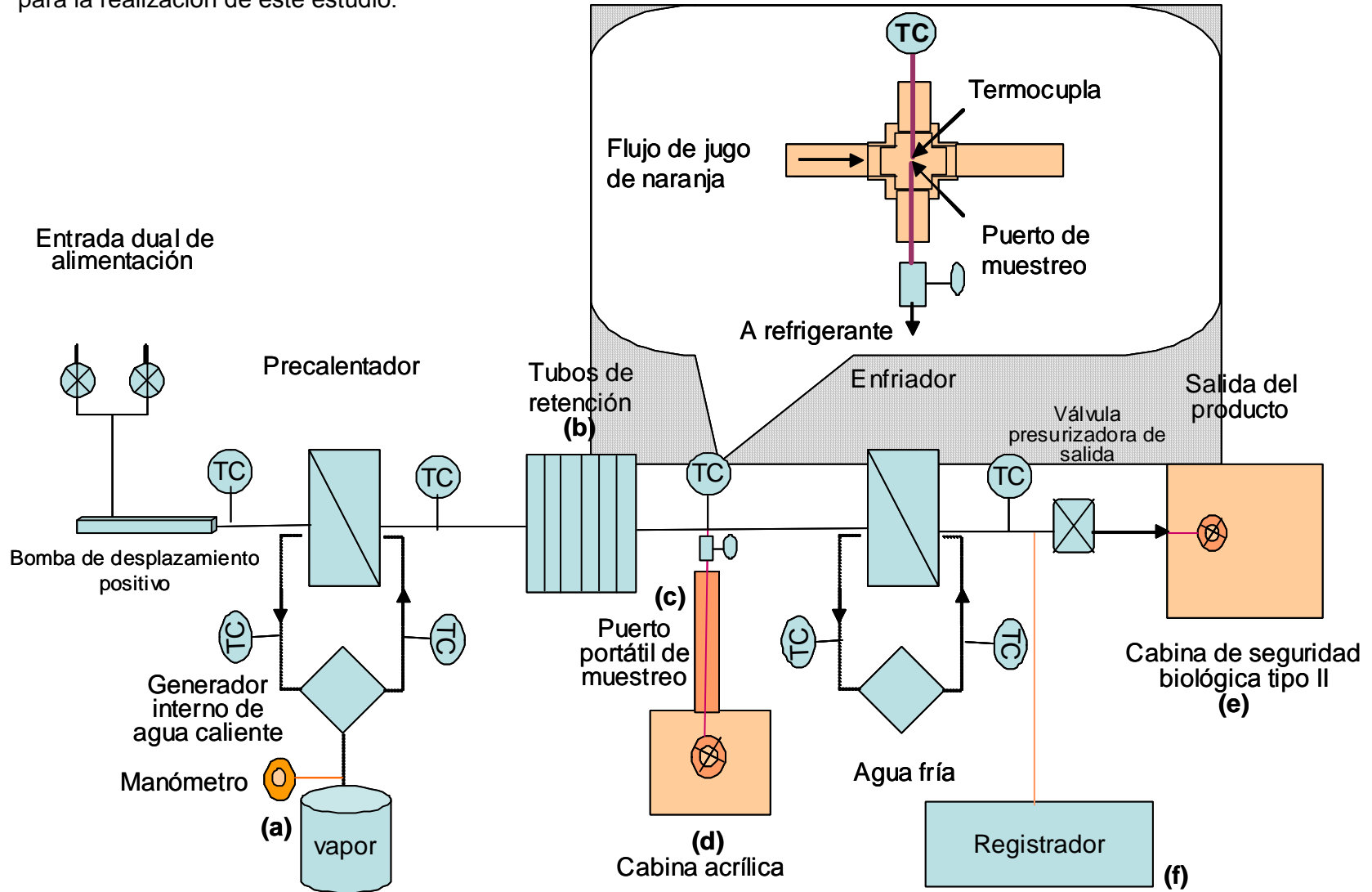
- Colocación de un manómetro **(a)** para el correcto monitoreo de la presión del vapor entrante (presión de alimentación: 3 kg/cm<sup>2</sup>).
- Definición del mejor arreglo operativo de distribución de tubos de retención en el intercambiador **(b)**, de manera de lograr el tratamiento térmico requerido según el estudio de las variables operativas a controlar (temperatura, tiempo de residencia, tamaño del inóculo).
- Instalación de un puerto portátil de toma de muestra **(c)** el cual se puede colocar en distintos lugares de la línea de proceso, según el propósito buscado.
- Instalación de una cabina acrílica **(d)** para la recolección aséptica de la muestra proveniente del puerto portátil.
- Implementación de una vía de recolección aséptica de la muestra tratada mediante el acoplamiento a la cabina de seguridad biológica **(e)**, a la salida del equipo UHT/HTST. Para ello se utilizaron tubos de conexión siliconados (Tygon, USA), resistentes a altas temperaturas, ácidos y álcalis, especialmente recomendados por el fabricante del equipo.
- Así mismo se optimizó y verificó del funcionamiento de los periféricos, tal como el sistema de adquisición de datos **(f)**.

### **3.9.6- Elección del arreglo de tubos de retención**

El arreglo de tubos de retención se basó en la información proporcionada por Mak y col. (2001) quienes proponían tratamientos térmicos para jugo de manzana a temperaturas entre 68,1°C y 80,9 °C por 14 segundos y, en la ventaja de usar tiempos de retención cortos para evitar las posibles pérdidas de temperatura en los tubos de retención. Teniendo en cuenta dichas consideraciones, se propuso aplicar el proceso manteniendo el producto a las distintas temperaturas evaluadas durante un tiempo de retención de 14 segundos.

**Figura 3.9.3**

Detalle de las modificaciones introducidas en el intercambiador de calor UHT / HTST MicroThermics, modelo Lab-25 DH para la realización de este estudio.



Se analizaron las diferentes opciones de arreglo de tubos provistos por el fabricante para cumplir con este requerimiento, aplicando la siguiente ecuación:

$$t = \frac{\sum C_i}{V_f} \quad (3.1)$$

donde:

t = tiempo de retención

$C_i$  = constante de retención de cada tramo de tubo

$V_f$  = velocidad de flujo

A partir de la misma se seleccionó un arreglo de tubos adecuado para el tiempo de retención de 14 segundos, para lo cual se debió fijar la velocidad de flujo en 1,29 L/min.

### 3.9.7- Operación del equipo UHT / HTST

La **Figura 3.9.4** presenta el diagrama de flujo de los procedimientos operativos del equipo UHT/HTST.

#### a- Puesta en marcha

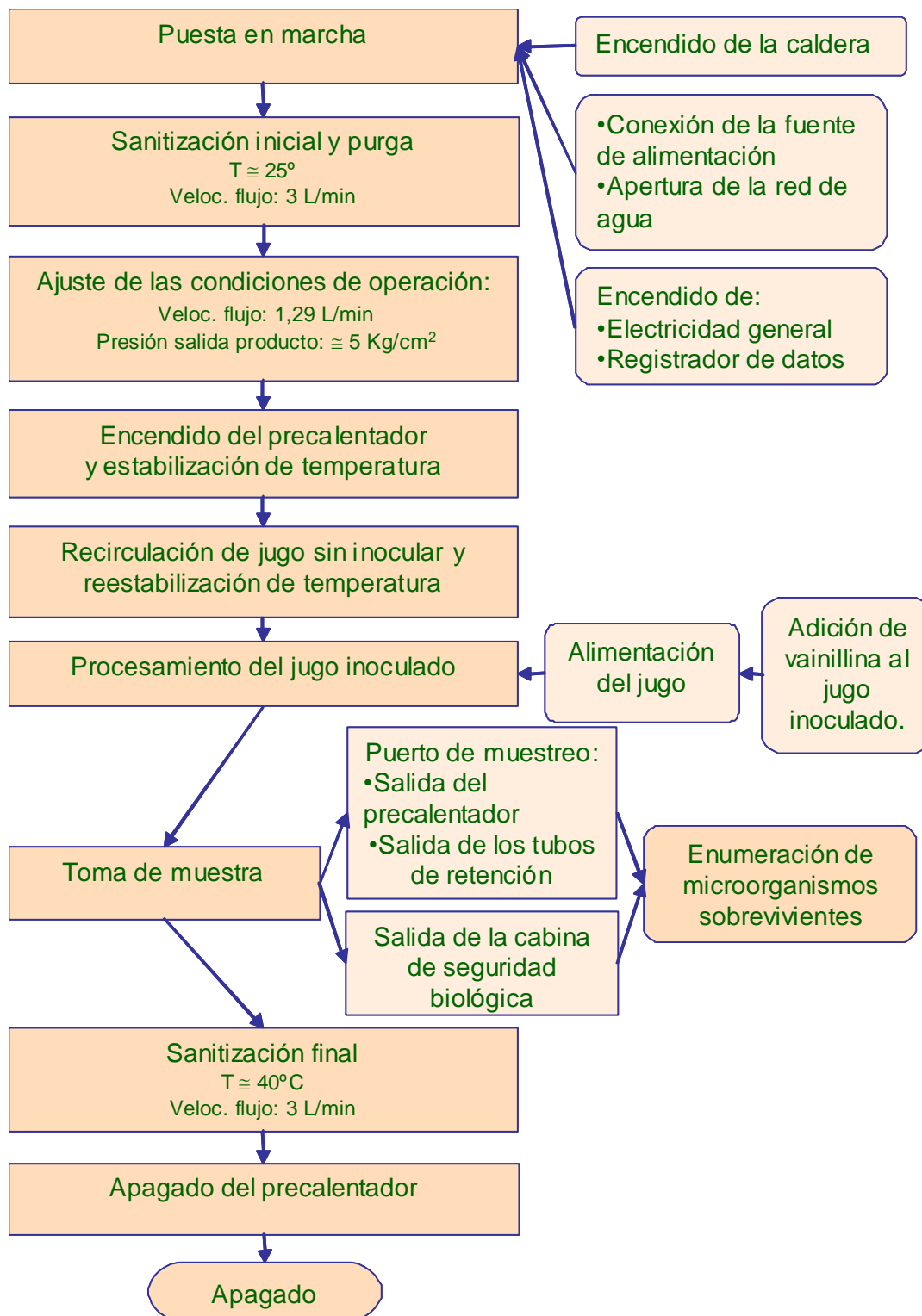
Previamente al encendido del equipo, se requería contar con una alimentación de vapor de 3 kg/cm<sup>2</sup> proveniente de la caldera, la cual era regulada durante todo el proceso por el calderista. Así mismo, por tratarse de un sistema de flujo continuo, era fundamental la alimentación de la línea del producto en forma continua para evitar desgastes innecesarios de la bomba, motivo por el cual se conectaba la fuente de alimentación a la red de agua.

Una vez conectado el registrador de datos que almacenaba toda la información tiempo-temperatura de todos los canales de las termocuplas, se procedía a la puesta en marcha del equipo.



**Figura 3.9.4**

Procedimientos de operación



## **b- Sanitización inicial y purga**

El procedimiento de sanitización constó de los siguientes pasos:

- Alimentación del líquido sanitizante: agua lavandina al 5%, durante 15 minutos.
- Enjuague con agua durante 10 minutos.

Los lavados y enjuagues se realizaron a altas velocidades de flujo (3 L/min) para lograr una mayor eficiencia en la limpieza y simultáneamente facilitar la purga de gases del sistema.

## **c- Ajuste de las condiciones de operación**

Previo al encendido del precalentador, se ajustó la velocidad de flujo de acuerdo con el tiempo de retención requerido (1,29 L/min). Así mismo se ajustó la presión de salida del producto (5 kg/cm<sup>2</sup>).

## **d- Encendido del precalentador y estabilización de la temperatura**

Como se mencionó anteriormente, el rango de temperaturas de trabajo (57-61°C) requirió de la utilización del precalentador para alcanzar las temperaturas de tratamiento deseadas.

Se utilizó agua para estabilizar el sistema a la temperatura requerida. Se reguló una temperatura un par de grados mayor a la requerida por el proceso, considerando el salto térmico producido cuando por la línea del producto dejaba de circular agua y se alimentaba jugo de naranja. Este salto se atribuyó a un mayor contenido de sólidos solubles en el jugo.

La temperatura del producto a la salida del precalentador se ajustó regulando la presión de vapor usada para calentar el agua que calefaccionaba al precalentador ó regulando dicha cantidad de agua caliente.

## **e- Recirculación de jugo sin inocular y reestabilización de la temperatura**

Una vez que el sistema entró en régimen y la temperatura se estabilizó, se alimentó y recirculó un determinado volumen (10 – 20 L) de jugo de naranja sin

inocular, previo al pasaje del jugo inoculado, con el propósito de realizar cualquier ajuste necesario debido a oscilaciones de temperatura.

#### **f- Procesamiento del jugo inoculado**

Una vez establecido el régimen por recirculación de jugo de naranja, se procedió al tratamiento de la muestra inoculada. La misma fue previamente adicionada con el volumen adecuado de vainillina para alcanzar la concentración deseada. Las temperaturas alcanzadas en los diferentes compartimentos del sistema continuo fueron monitoreadas simultáneamente mediante termocuplas y registradas a través del sistema de adquisición de datos.

#### **g- Toma de muestra**

Las muestras tratadas se recolectaron en distintos puntos de la línea de procesamiento de acuerdo a lo requerido para la realización de las diferentes experiencias. La recolección se realizó de dos formas posibles: a través de un puerto de muestreo con camisa de enfriamiento cuya salida se colocó dentro de una cabina aséptica ó al final de la línea en la cabina de seguridad biológica, dónde también se recogió todo el jugo tratado. Se efectuaron tomas de muestra en distintas ubicaciones a lo largo de la línea del producto, según los dispositivos disponibles:

- Salida del precalentador, con el objeto de determinar la existencia de un efecto letal previo a la entrada del jugo en los tubos de retención.
- Salida de los tubos de retención para obtener un monitoreo fehaciente de la efectividad del tratamiento aplicado
- Salida del equipo

El punto de recolección de mayor interés fue el colocado justo a la salida del tubo de retención cuya temperatura podía ser monitoreada constantemente. Este control fue de suma importancia, pues por tratarse de un proceso continuo, la temperatura sufrió pequeñas fluctuaciones por encima y por debajo del valor fijado.

Los tubos conteniendo las muestras se sumergieron en agua con hielo y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento en que se realizaron los recuentos para la enumeración de microorganismos.

## **Enumeración de microorganismos sobrevivientes**

Se realizaron los recuentos de *L. innocua* mediante las técnicas de dilución seriada con plaqueo en superficie (por duplicado) y del NMP. Se utilizaron placas y/o tubos conteniendo ATS-E y CTS-E con el agregado de 1% de piruvato de sodio con el propósito de recuperar las células injuriadas térmicamente. Los mismos se incubaron a 30°C por 5 días. Cada condición se determinó por triplicado.

## **h- Sanitización final**

Una vez concluido el tratamiento del jugo, se procedió a la sanitización final del equipo aplicando el siguiente procedimiento:

- Disminución de la temperatura de proceso a  $\cong 40^{\circ}\text{C}$
- Enjuague con agua caliente 20 min.
- Pasaje de solución ácida (pH = 2,5) a 40-50°C durante 15 min.
- Enjuague con agua caliente 20 min
- Pasaje de solución alcalina (pH = 12,5) a 40-50°C durante 15 min.
- Enjuague con agua caliente 20 min.

## **i- Apagado**

Luego de la sanitización se cerró el vapor apagando el precalentador, y se dejó descender la temperatura en todos los compartimentos hasta llegar a temperatura ambiente. Por último se apagó la bomba de alimentación, red de agua y electricidad.

## **3.9.8- Sistemas evaluados**

La **Tabla 3.9.1** muestra la composición y condiciones de tratamiento de los diferentes sistemas de jugo de naranja evaluados en el equipo de flujo continuo UHT/HTST.

**Tabla 3.9.1**

Sistemas evaluados en el equipo de flujo continuo UHT/HTST

<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>VAINILLINA (ppm)</b>
57	0
	500
	700
	900
	1100
59	0
	500
	700
	900
	1100
61	0
	500
	700
	900
	1100

### 3.9.9- Modelado matemático

Se analizó la relación entre la inactivación de *L. innocua* (representada por las reducciones logarítmicas de la población observadas, *R Log*) y las variables independientes involucradas (temperatura, vainillina) con el fin de optimizar el proceso de preservación del jugo procesado en el sistema continuo. Para ello se aplicó la Metodología de Superficies de Respuesta utilizando un diseño factorial incompleto de dos factores y tres niveles tipo Box-Behnken (Box y Behnken, 1960)(ver **apéndice de Procedimientos estadísticos, apartado 6.13.4**).

Se asumió la existencia de una función matemática  $\varphi$ , que correlaciona la variable de respuesta *Y* (*R Log*), con dos variables independientes del proceso:  $X_1$  (temperatura de tratamiento, *T*) y  $X_2$  (concentración de vainillina, *V*).

$$Y = \varphi(X_1, X_2) \quad (3.2)$$

La función  $\varphi$  se aproximó a una función polinómica de segundo grado en dos variables obteniéndose la ecuación de regresión para un modelo de segundo orden:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (3.3)$$

donde:

$Y$ : variable de respuesta

$X_\mu$ : variables independientes

$\beta_0$ : término constante

$\beta_\mu$ : estimadores de los coeficientes de regresión de primer orden

$\beta_{\mu\mu}, \beta_{\mu j}$ : estimadores de los coeficientes de regresión de segundo orden

Los tres niveles de las variables independientes  $X_1$  y  $X_2$  fueron codificados de la siguiente manera: -1 (nivel inferior); 0 (nivel intermedio) y 1 (nivel superior). Dicha codificación generó las nuevas variables independientes  $x_1$  y  $x_2$ , las cuales mantienen una relación lineal con las variables no codificadas. Debido a que se disponía de datos experimentales para cuatro niveles de vainillina, y a que el diseño

del modelo requería sólo tres niveles, se decidió modelar dos rangos de vainillina como se detalla en la **Tabla 3.9.2**.

Siguiendo el diseño de Box-Behnken, se elaboraron 13 sistemas para cada rango, combinando las dos variables independientes involucradas. Cinco de dichos sistemas correspondieron al centro de coordenadas del diseño experimental, es decir:  $x_1 = x_2 = 0$ . Esta inclusión de puntos centrales permitió lograr un perfil de varianza uniforme sobre la región experimental del diseño y además permitió determinar la significación del error experimental.

### **3.9.9.1- Análisis estadístico**

Se aplicó un análisis de regresión múltiple con el objeto de obtener los estimadores de los coeficientes de regresión que definan la ecuación que constituya la mejor aproximación a  $\varphi$ , para cada rango evaluado. Para seleccionar la mejor ecuación que represente dicha función, se realizó un análisis de varianza y se aplicaron los siguientes tests para validar internamente el modelo:

- Test F para la regresión completa
- Test F parcial para cada término involucrado en la ecuación
- Test de falta de ajuste del modelo elegido
- Método de Eliminación Retrospectiva para la selección de la mejor ecuación de regresión
- Análisis de residuales

También se analizaron los valores de los coeficientes de determinación corregidos por grados de libertad del sistema ( $R^2$  aj).

Todos los parámetros analizados y los tests utilizados se describen en el **apéndice de Procedimientos Estadísticos**.

### **3.9.9.2- Metodología de Superficies de Respuesta**

Una vez seleccionada la mejor ecuación de regresión que representó la relación entre  $R$  Log de *L. innocua* y la concentración de vainillina y temperatura de tratamiento, se graficaron las superficies de respuesta y los correspondientes contornos. Los mismos permitieron predecir la respuesta a múltiples tratamientos

**Tabla 3.9.2**

Codificación de variables y rangos de datos modelados

VARIABLE INDEPENDIENTE		NIVEL	
		NOMINAL	CODIFICADO
Temperatura (°C)		57	-1
		59	0
		61	1
Vainillina (ppm)	Rango 1	500	-1
		700	0
		900	1
	Rango 2	700	-1
		900	0
		1100	1



diferentes a los evaluados, cuyos factores se encontraran en niveles comprendidos dentro del rango experimental.

Todos los cálculos y gráficos fueron realizados utilizando el paquete estadístico Design-Expert 6.0.6 (Stat-Ease Inc, Minneapolis, USA).

### **3.9.9.3- Validación externa**

Para confirmar la bondad de ajuste del modelo, se seleccionó una nueva condición de tratamiento no incluida en los datos usados para generar el modelo, la cual consistió en la adición de 700 ppm de vainillina y tratamiento térmico a 60°C. Se comparó el valor de la respuesta predicho por los modelos para dicha condición, con el valor determinado experimentalmente. Una semejanza en los valores obtenidos verificaría que los modelos fueran apropiados.

## **3.10- Procesamiento del jugo de naranja en un sistema batch**

### **3.10.1- Jugo de naranja**

Ver apartado 3.1

### **3.10.2- Microorganismo**

Para los estudios de procesamiento de jugo de naranja en sistema batch se utilizó *L. innocua* (subrogante de *L. monocytogenes*).

### **3.10.3- Preparación del inóculo**

Los tratamientos realizados en sistemas batch requirieron inóculos de volumen reducido (1 ml) con el propósito de no originar fluctuaciones de temperatura al momento de la siembra en el jugo precalentado a la temperatura de operación. El

inóculo se preparó transfiriendo una ansada de una estría de cultivo fresco a un erlenmeyer conteniendo 20 mL de CTS-E incubando a 37 °C con agitación durante 24 hs de manera de obtener un cultivo en fase estacionaria (concentración  $\cong 10^7$ - $10^8$  UFC/mL).

#### **3.10.4- Tratamiento térmico**

Para el tratamiento térmico del jugo de naranja se utilizó el dispositivo esquematizado en la **Figura 3.10.1**. El mismo constó de un vaso de doble camisa de 150 mL de capacidad, conectado a un baño termostático (HAAKE, modelo Rotovisco RV12, Alemania) cuya temperatura se fijó de manera de obtener 57, 59, 60 ó 61°C.

Noventa y nueve (99) mL de jugo de naranja con y sin agregado de vainillina y/o citral se colocaron en el recipiente. Posteriormente, se incorporó 1 ml de inóculo tomándose muestras de jugo a intervalos de tiempo regulares. Los sistemas estuvieron siempre agitados desde el comienzo de cada experiencia, mediante la utilización de un agitador magnético (Decalab SRL, Argentina).

#### **3.10.5- Sistemas evaluados**

Las **Tablas 3.10.1** y **3.10.2** muestran la conformación de los sistemas evaluados con la adición de vainillina ó citral.

En base a los resultados obtenidos con los sistemas descriptos que contenían vainillina ó citral, se seleccionaron algunas combinaciones de estos antimicrobianos a dos temperaturas subletales (52 y 57°C). Se estudió el efecto de la combinación de dichas variables sobre la cinética de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja, aplicando la misma metodología experimental. La **Tabla 3.10.3** muestra las combinaciones de antimicrobianos naturales y tratamientos térmicos evaluados.

**Figura 3.10.1**

Equipo utilizado para el tratamiento térmico de jugo de naranja en sistema batch.



**Tabla 3.10.1**

Sistemas evaluados con adición de vainillina

<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>VAINILLINA (ppm)</b>
57	0
	500
	700
	900
	1100
59	0
	500
	700
	900
	1100
60	0
	500
	700
	900
	1100
61	0
	500
	700
	900
	1100

**Tabla 3.10.2**

Sistemas evaluados con adición de citral

<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>CITRAL (ppm)</b>
57	0
	25
	50
	75
59	0
	25
	50
	75
61	0
	25
	50
	75

**Tabla 3.10.3**

Sistemas evaluados con adición combinada de vainillina y citral

<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>VAINILLINA (ppm)</b>	<b>CITRAL (ppm)</b>
52	0	0
	900	25
	1100	
57	0	0
	500	75
	900	25
	1100	

### 3.10.6- Enumeración de microorganismos sobrevivientes

Se realizaron los recuentos de *L. innocua* mediante las técnicas de dilución seriada con plaqueo en superficie (por duplicado) y del NMP. Se utilizaron placas y/o tubos conteniendo ATS-E y CTS-E con el agregado de 1% de piruvato de sodio con el propósito de recuperar las células injuriadas térmicamente. Los mismos se incubaron a 30°C por 5 días. Cada condición se determinó por triplicado.

### 3.10.7- Modelado matemático

Se realizó el modelado matemático de las curvas de inactivación de *L. innocua* utilizando los siguientes modelos:

- Gompertz modificado
- Distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull

Los modelados se realizaron utilizando el paquete estadístico Statgraphics Plus for Windows 3.0<sup>®</sup> (Statistical Graphics Corp., USA).

La validación interna de los modelos se realizó mediante análisis de varianza y la aplicación de los siguientes tests:

- Test F para la regresión completa
- Cálculo del coeficiente de determinación corregido por grados de libertad del sistema ( $R^2_{aj}$ ).
- Análisis de residuales

Todos los parámetros y tests analizados se describen en el **apéndice de Procedimientos Estadísticos**.

### 3.10.7.1- Aplicación del modelo de Gompertz modificado

Las curvas de supervivencia se generaron a partir de la información experimental para cada condición de concentración de vainillina y tratamiento térmico, por medio de la representación gráfica del logaritmo de la razón entre el número de microorganismos sobrevivientes y el número inicial de microorganismos ( $\text{Log} (N/N_0)$ ) versus el tiempo de tratamiento ( $t$ ). Estas curvas fueron luego modeladas aplicando la versión modificada de la ecuación general de Gompertz (Linton y col. 1996):

$$\text{Log}\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = Ce^{-e(A+Bt)} - Ce^{-e(A)} \quad (3.4)$$

donde el primer término representa la fracción logarítmica sobreviviente y los tres parámetros estimados ( $A$ ,  $B$  y  $C$ ) representan las diferentes regiones de la curva de supervivencia: el hombro inicial ( $A$ ), la máxima velocidad de muerte ( $B$ ) y el cambio global en el número de sobrevivientes ( $C$ ).

### 3.10.7.2- Aplicación del modelo de distribución de frecuencia de resistencias tipo Weibull

Los datos de las curvas de supervivencia de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con diferentes niveles de vainillina y/o citral y tratado térmicamente se ajustaron a la forma acumulativa de la distribución de frecuencia de resistencias de Weibull (Peleg y Cole, 1998):

$$S_{(t)} = \frac{N_t}{N_0} = \exp(-bt^n) \quad (3.5)$$

donde  $n$  y  $b$  son constantes.

A partir de los valores de los parámetros  $b$  y  $n$ , se graficaron las curvas de frecuencia de resistencias utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{d\phi}{dt_c} = bnt_c^{n-1} \exp(-bt_c^n) \quad (3.6)$$



Utilizando dichos parámetros ( $b$  y  $n$ ) se calcularon también otros parámetros que proporcionaron una mejor explicación de las frecuencias observadas:

- Moda de la distribución ( $t_{cm}$ ): representa el tiempo de tratamiento en el cual la mayoría de la población muere o se inactiva.

$$t_{cm} = [(n-1)/nb]^{1/n} \quad (3.7)$$

- Media ( $\bar{t}_c$ ): corresponde al tiempo de inactivación promedio

$$\bar{t}_c = \{\Gamma[(n+1)/n]\}/b^{1/n} \quad (3.8)$$

- Varianza ( $\sigma_{tc}^2$ ): varianza de la media

$$\sigma_{tc}^2 = \{\Gamma[(n+2)/n] - (\Gamma[(n+1)/n])^2\}/b^{2/n} \quad (3.9)$$

- Coeficiente de sesgo (skewness) ( $v_1$ ): representa el sesgo de la distribución y está relacionado con los miembros más resistentes de la población microbiana.

$$v_1 = \frac{[\Gamma(n+3/n)/b^{3/n}]}{[\Gamma(n+2/n)/b^{2/n}]^{3/2}} \quad (3.10)$$

### **3.11- Procesamiento propuesto para jugo de naranja.**

En base a los resultados obtenidos en las etapas anteriores, desde el punto de vista de la estabilidad microbiológica, se propusieron dos tratamientos para la preservación de jugo de naranja:

**Tratamiento A:** jugo de naranja adicionado con 900 ppm de vainillina y 25 ppm de citral tratado térmicamente a 52°C durante 4'42" y almacenamiento refrigerado.

**Tratamiento B:** jugo de naranja adicionado con 900 ppm de vainillina y 25 ppm de citral tratado térmicamente a 57°C durante 1'18" y almacenamiento refrigerado.

Los tiempos de tratamiento térmico asignados en cada tratamiento fueron calculados a partir las curvas de inactivación correspondientes a los sistemas conteniendo mezcla de los dos antimicrobianos (ver **Resultados, apartado 4.4.1**) para una reducción observada de 5 ciclos Log en la población de *L. innocua*.

Se verificó que la utilización de *L. innocua* como microorganismo subrogante de *L. monocytogenes* fuera apropiada, sometiendo jugo de naranja inoculado con el patógeno a los dos tratamientos propuestos, utilizando la metodología detallada en el **apartado 3.10.4**.

También se tuvo en cuenta la modificación del sabor y aroma que pudieran impartir la mezcla de antimicrobianos al jugo. Para esto último se realizó una prueba preliminar sencilla en la que se degustaron jugos adicionados con las posibles combinaciones de vainillina y citral.

### **3.12- Evaluación de la calidad microbiológica y organoléptica del jugo de naranja procesado según los tratamientos batch propuestos**

Los tratamientos propuestos se caracterizaron microbiológica y organolépticamente según:

- Evolución de flora nativa
- Prueba de reto microbiano
- Evolución del color
- Evaluación sensorial

### **3.12.1- Jugo de naranja**

El jugo de naranja exprimido utilizado en dichas pruebas se preparó manualmente usando la metodología descrita en el **apartado 3.1**.

### **3.12.2-Tratamiento térmico**

El tratamiento térmico se llevó a cabo en el equipo esquematizado en la **Figura 3.12.1**, el cual permitió el procesamiento de mayores volúmenes de muestra. Trescientos (300) mL de jugo se bombearon por el interior de un refrigerante serpentín de doble camisa (diámetro interno: 4mm, longitud: 400 mm) por donde circulaba agua a la temperatura de tratamiento. El jugo adicionado con vainillina y citral se mantuvo recirculando el tiempo de tratamiento requerido mediante una bomba peristáltica (Cole-Parmer, Masterflex modelo 7518-12, USA) a razón de 1,1 L/min. Una vez finalizado el tratamiento térmico, el jugo se recolectó en frascos color caramelo de diferente capacidad, según el volumen requerido por la prueba. Los mismos se almacenaron en refrigeración (5°C).

### **3.12.3- Sistemas analizados**

Los sistemas analizados fueron:

- Jugo de naranja natural sin tratamiento (control)
  
- Jugo de naranja procesado según los tratamientos propuestos: A y B

**Figura 3.12.1**

Equipo utilizado para la aplicación de los tratamientos propuestos.



#### **3.12.4- Evolución de flora nativa**

Se estudió la flora nativa durante el almacenamiento refrigerado del jugo de naranja. Para ello se obtuvo el jugo según la metodología detallada en el **apartado 3.1** con la variante de que el procedimiento no se realizó en ambiente estéril y que las naranjas y los utensilios utilizados no fueron sanitizados previamente con agua clorada.

Los jugos una vez tratados (ver metodología en **apartado 3.12**) se almacenaron en frascos de 15 mL a 5°C. A intervalos de tiempo regulares (24-72 hs) se tomó un frasco de cada condición (control; tratamiento A y tratamiento B) y se realizaron los siguientes recuentos:

- Microorganismos aerobios: plaqueo en Agar APC e incubación a 37°C por 72 hs.
- Bacterias acidúricas mesófilas: plaqueo en Agar OSA e incubación a 37°C durante 72 hs.
- Bacterias acidúricas termófilas: plaqueo en OSA e incubación a 55°C por 7 días.
- Hongos y levaduras: plaqueo en Agar YGC e incubación a 25°C por 5 días.
- Microorganismos anaerobios mesófilos: siembra en tubos con caldo BHI previamente deaireados por precalentamiento a 100 °C durante 20 minutos y con tapón vas-par incubados a 37°C durante 7 días.
- Microorganismos anaerobios termófilos: siembra en tubos con caldo BHI deaireados por precalentamiento a 100 °C durante 20 minutos y con tapón de Agar-Agar incubados a 55°C durante 7 días.

Se graficaron las correspondientes curvas de supervivencia.

#### **3.12.5- Estudio de reto microbiano**

Con el propósito de evaluar la estabilidad del jugo de naranja procesado por la metodología propuesta, se estudió la evolución de *L. monocytogenes* inoculada en jugo almacenado a 5°C durante 14 días.

El jugo de naranja se obtuvo con la metodología detallada en el apartado 3.1. El mismo se inoculó con un cultivo en fase estacionaria de *L. monocytogenes*, resultando una concentración final de  $\cong 5 \times 10^4$  UFC/mL.

Los sistemas analizados fueron:

- jugo de naranja natural inoculado (control)
- jugo de naranja inoculado y posteriormente procesado según los tratamientos propuestos: A y B

Luego de los tratamientos cada lote se fraccionó en frascos de 8 ml de color caramelo y se almacenaron a 5°C.

Se realizó el seguimiento de los recuentos de *L. monocytogenes* a intervalos de tiempo regulares (24-72 hs) durante 14 días. Los mismos se realizaron por las técnicas plaqueo en superficie y NMP de 3 tubos, utilizando CTS-E y ATS-E con el agregado de 1% de piruvato de sodio, incubando a 30°C por 72 hs.

Se graficaron y analizaron las curvas de supervivencia correspondientes.

### **3.12.6- Evolución del color**

Con el objeto de determinar el efecto del tratamiento de preservación propuesto sobre el color del jugo de naranja y los cambios deteriorativos que pudieran ocurrir durante el almacenamiento, se estudió la evolución del color de jugo de naranja preparado y sometido a los dos tratamientos propuestos según la metodología descripta en el **apartado 3.12.2**.

#### **3.12.6.1- Elección del espesor de muestra**

Se evaluaron distintos espesores de muestra (mm) con el objeto de seleccionar aquel que permitiera lograr una mayor diferenciación del color entre dos muestras. Para ello se trabajó con:

- jugo de naranja natural (control)
- jugo de naranja procesado según el tratamiento propuesto **B**

Se colocaron distintos volúmenes de cada muestra (0,5 a 2,5 ml), de manera de obtener espesores de 1, 2, 3, 4 y 5 mm en cubetas diseñadas especialmente con base de vidrio y paredes de PVC opaco de 2,5 cm de diámetro interno y 1 cm de altura.

Las mediciones colorimétricas se practicaron en un fotocolorímetro triestímulo Minolta CM-508-d, (Minolta Corp., USA) con esfera integradora, usando una apertura de 1,4 cm de diámetro. El área de exposición se eligió lo suficientemente grande respecto del área iluminada para evitar cualquier efecto luminoso de borde (Little, 1964). La iluminación se realizó desde la base vidriada de la cubeta y se colocaron como fondo placas blancas y negras. Se obtuvieron los valores triestímulo: X, Y y Z (espacio CIE) y también las correspondientes transformaciones matemáticas:  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (espacio CIE Lab) de forma automática. Las mediciones de color para cada espesor y cada muestra se realizó por triplicado. Los cálculos se realizaron para el iluminante estándar C (luz diurna) y ángulo de observador de  $2^\circ$ .

### **3.12.6.2- Determinación de color en el almacenamiento**

Se determinó la evolución de color de muestras de jugo de naranja procesado según los tratamientos propuestos **A** y **B** durante el almacenamiento. Las muestras A, B y C (control sin tratar) preparadas según la metodología descrita en el **apartado 3.12.2**, fueron fraccionadas y almacenadas en frascos color caramelo sin cámara de aire y almacenadas a  $5 \pm 1$  °C durante 12 días. Periódicamente se tomaron muestras por duplicado de cada lote y se colocaron 1,5 ml de cada muestra en 3 cubetas de base vidriada de 2,5 cm de diámetro interno resultando un espesor de 3 mm. Las mediciones colorimétricas se realizaron en el fotocolorímetro utilizando la misma metodología del inciso anterior. y calculando las funciones de color seleccionadas. A partir de los valores triestímulo X, Y y Z se calcularon diferentes funciones de color y se seleccionaron aquellas que representaron más sensiblemente la respuesta al cambio en procesamiento de las muestras.

### **3.12.7- Análisis sensorial**

Con el objeto de evaluar la aceptabilidad del jugo adicionado con vainillina y citral sometido a tratamiento térmico (ver metodología en **apartado 3.12.2**) sobre una base organoléptica, se realizaron estudios sensoriales los cuales involucraron: diferencias entre los dos procesos propuestos, impresión global y diferencias sensoriales durante el almacenamiento.

#### **Área de prueba y presentación de las muestras**

Se seleccionó una habitación con luz natural, temperatura agradable y libre de posibles distracciones, la cual fue dividida en dos sectores: zona de análisis y zona de preparación de las muestras (**Figura 3.12.2**). Para que los juicios fuesen independientes, el sector de análisis fue dividido en seis cubículos blancos (**Figura 3.12.3**). Cada uno de ellos fue provisto de una jarra con agua inodora, insípida e incolora; una jarra con embudo destinados al enjuague de la boca entre degustaciones de la muestra; una servilleta y un agitador plástico.

Las muestras fueron presentadas de manera idéntica en todas sus propiedades, excepto la sometida a evaluación, con el propósito de evitar que los jueces estuviesen influenciados por características irrelevantes de las mismas. Las mismas se sirvieron a la temperatura de consumo (8 -10 °C). En cada caso, entre 15 y 20 ml de muestra fueron suficientes para que los sujetos emitieran su juicio. Sin embargo, en la prueba de aceptabilidad global, si el participante lo requería, se le entregaba mayor cantidad de la muestra.

Todas las muestras se entregaron bajo clave de tres cifras elegidas al azar, con el objeto de no dar indicios sobre los tratamientos evaluados. Dicha clave fue distinta para cada muestra (aunque se tratase de la misma muestra) y distinta también para cada sujeto. El orden de presentación fue al azar pero balanceado. La distribución de los distintos grupos de muestras entre los sujetos también fue al azar.

#### **Formularios**

Los formularios de respuesta se redactaron en base a modelos ya normalizados, en un estilo claro y conciso, sin la menor ambigüedad, para evitar



**Figura 3.12.2**

Sala utilizada para la evaluación sensorial, zona de análisis



**Figura 3.12.3**

Disposición de las muestras y del material proporcionado a cada cubículo en la realización del Test de Campo



toda duda o discrepancia en su comprensión (Lawless y Heymann, 1999). Los mismos incluyeron instrucciones para la evaluación sensorial y además escalas, preguntas y términos para expresar el juicio emitido por cada sujeto. Se incluyó el apartado “observaciones”, para que los participantes expresaran su opinión proporcionando además cierta información no suministrada por la estadística.

### **Jueces**

Las diferentes pruebas se realizaron con consumidores de jugo de naranja, reclutándose distinto número de personas según los requerimientos de cada prueba.

Fueron invitados a participar de las sesiones estudiantes universitarios, cuyas edades oscilaron entre los 20 y 35 años. Al finalizar la prueba se les proporcionó una pequeña recompensa, consistente en una golosina, en agradecimiento por su colaboración.

#### **3.12.6.1- Test de Triángulo Ampliado**

Esta prueba discriminativa se implementó con el fin de determinar si los dos procesos de preservación propuestos (tratamientos A y B) conferían al jugo diferentes cualidades organolépticas. El **Formulario 1** ejemplifica el test realizado.

Los jueces recibieron tres muestras codificadas de acuerdo a los criterios mencionados. El siguiente esquema muestra un ejemplo de distribución y reparto de las muestras en las cabinas:

<b>ABA</b>	<b>AAB</b>	<b>BBA</b>
<b>BBA</b>	<b>BAB</b>	<b>ABB</b>

**FORMULARIO N° 1**  
**EVALUACIÓN DE UNA BEBIDA DE NARANJA**

N° de bandeja .....  
Fecha:...../...../.....

**INSTRUCCIONES**

Usted ha recibido 3 vasos de una bebida de naranja.  
Pruebe una pequeña cantidad de las muestra de izquierda a derecha, en el orden que se presentan.  
De las tres muestras recibidas, dos son idénticas.  
Determine **cual es la muestra distinta**.  
Puede volver a probar cada muestra (en el mismo orden) si fuera necesario.

Numeración de las muestras recibidas:

.....                      .....

Muestra diferente: .....

Si desea, diga que tipo de diferencia encontró entre las muestras?

.....  
.....  
.....

Comentarios:

.....  
.....  
.....

Dos de las muestras eran idénticas y los jueces debieron discriminar la muestra que percibían diferente. Se les indicó probar las muestras de izquierda a derecha para que la prueba resulte balanceada. Adicionalmente se les pidió que expliquen el tipo de diferencia encontrada.

En esta prueba participaron 42 jueces no entrenados consumidores de jugo de naranja. Se computó el total de respuestas correctas comparando dicho valor con el número mínimo requerido para establecer diferencias significativas a un nivel de significación del 5 % ( $\alpha$ : 0,05) (ver **Tabla 1.12.1**).

### **3.12.6.2- Test de Campo**

Se realizó un test de campo con consumidores con el objeto de evaluar la impresión global respecto de algunas características del jugo de naranja. Para ello se siguió el protocolo para este tipo de pruebas descrito por Lawless y Heymann (1999) (ver **Introducción, apartado 1.12.6.2**).

Dada la complejidad que la prueba representa para los consumidores por la extensión y características de la misma y considerando los resultados obtenidos en el test del triángulo, se seleccionó el **tratamiento A** de procesamiento de jugo de naranja. El **Formulario 2** esquematiza la prueba realizada.

En la prueba de impresión global (ver **Formulario 2, punto 1**) se empleó una escala hedónica de 9 puntos balanceada, con extremos desde “me disgusta extremadamente” a “me gusta extremadamente”. Se realizaron dos preguntas abiertas a cerca del gusto o disgusto por el producto, a contestar en un determinado orden, según lo respondido en la prueba de impresión global.

Se incluyeron en el formulario otras dos preguntas relacionadas con la evaluación de características específicas del jugo (sabor cítrico y sabor a vainilla) a través de escalas de punto adecuado de 9 puntos, con el objetivo de analizar si el atributo se encontró con la adecuada intensidad (ver **Formulario 2, punto 2**).

Se evaluó también la intensidad del sabor a cocido por medio de una escala de nueve puntos con extremos “nada” y “mucho” sabor a cocido (ver **Formulario 2, punto 3**). Para facilitar la evaluación de esta característica se proporcionaron

**Tabla 1.12.1**

Número crítico de respuestas correctas para el Test del Triángulo

n	Nivel de significación (%)				n	Nivel de significación (%)			
	10	5	1	0.1		10	5	1	0.1
3	3	3	—	—	26	13	14	15	17
4	4	4	—	—	27	13	14	16	18
5	4	4	5	—	28	14	15	16	18
					29	14	15	17	19
					30	14	15	17	19
6	5	5	6	—	31	15	16	18	20
7	5	5	6	7	32	15	16	18	20
8	5	6	7	8	33	15	17	18	21
9	6	6	7	8	34	16	17	19	21
10	6	7	8	9	35	16	17	19	22
11	7	7	8	10	36	17	18	20	22
12	7	8	9	10	42	19	20	22	25
13	8	8	9	11	48	21	22	25	27
14	8	9	10	11	54	23	25	27	30
15	8	9	10	12	60	26	27	30	33
16	9	9	11	12	66	28	29	32	35
17	9	10	11	13	72	30	32	34	38
18	10	10	12	13	78	32	34	37	40
19	10	11	12	14	84	35	36	39	43
20	10	11	13	14	90	37	38	42	45
					96	39	41	44	48
21	11	12	13	15					
22	11	12	14	15					
23	12	12	14	16					
24	12	13	15	16					
25	12	13	15	17					

n: número de jueces o evaluaciones

## FORMULARIO Nº 2

### EVALUACIÓN DE UNA BEBIDA DE NARANJA

Fecha:...../...../.....

1. Considerando todos los aspectos, ¿qué afirmación describe mejor su impresión global del producto?

Me gusta extremadamente	-9-
Me gusta mucho	-8-
Me gusta moderadamente	-7-
Me gusta algo	-6-
Ni me gusta ni me disgusta	-5-
Me disgusta algo	-4-
Me disgusta moderadamente	-3-
Me disgusta mucho	-2-
Me disgusta extremadamente	-1-

**Si su respuesta es 5 ó más, vaya a la pregunta A y luego a la pregunta B.**

**Si su respuesta es 4 ó menos, vaya a la pregunta B y luego a la pregunta A.**

A. Diga qué le gusta del producto

.....  
.....  
.....

Pruebe nuevamente e indique: ¿Existe algo más que quiera agregar?

.....  
.....

B. Diga que no le gusta del producto

.....  
.....  
.....

Pruebe nuevamente e indique: ¿Existe algo más que quiera agregar?

.....  
.....

2. Las siguientes preguntas están relacionadas con su opinión respecto de algunas características del producto.

¿Cuál es su opinión acerca del **sabor cítrico** del producto?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
demasiado débil				adecuado				demasiado fuerte	

¿Cuál es su opinión acerca del **sabor a vainilla** del producto?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
demasiado débil				adecuado				demasiado fuerte	

3. La siguiente pregunta está relacionada con la intensidad del sabor a cocido.  
Pruebe primero los patrones que se le entregaron y luego la muestra.  
Ubique la muestra en la escala.

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
nada								mucho



descriptores ó “anclas”. Las mismas estaban identificadas como “nada” y “mucho” sabor a cocido. La primera correspondió a una muestra de jugo de naranja natural, sin procesar y la segunda a jugo calentado en exceso (a 90°C durante 20 minutos) con el objeto de generar sabor a cocido (Calderón y col., 1999).

Para la realización de este test de campo cada juez dispuso de una única muestra (codificada con 3 números al azar) y una bandeja con dos vasitos correspondientes a los descriptores ó “anclas”. Todos los participantes recibieron la misma muestra con diferente codificación y fueron advertidos de que dicha muestra correspondía a una nueva bebida desarrollada en base a jugo de naranja.

Se analizó la información brindada por los consumidores calculando el promedio del puntaje otorgado en la prueba de impresión global y la correspondiente desviación estándar. Las respuestas a las preguntas abiertas se analizaron como información complementaria de la descripción del producto.

Las respuestas brindadas en las escalas de punto adecuado se analizaron asignando puntajes de 1 a 9 puntos correspondientes a las categorías de sabor “demasiado débil” y “demasiado fuerte”, con un puntaje central (5 puntos) correspondiente a la categoría de sabor “adecuado”. Se calculó el porcentaje de sujetos que respondieron en cada categoría de las escalas para cada atributo.

Para el análisis de las respuestas brindadas en el punto 3 del test se asignó una escala numérica a cada escalón de la escala proporcionada originalmente, considerando 1 el escalón “nada” y 9 al escalón “mucho” sabor a cocido. Se calculó el porcentaje de respuestas de cada categoría otorgado a la intensidad del sabor a cocido.

### **3.12.6.3- Test de Diferencia Contra Control durante el almacenamiento**

Se determinó la diferencia global del jugo de naranja procesado por el tratamiento propuesto (control) y el mismo producto almacenado durante 7 y 14 días (muestras D y E respectivamente).

En cada sesión los jueces recibieron 3 vasitos con muestras codificadas al azar (muestras D y E) y el control camuflado presentado también como muestra

incógnita (muestra A), acompañados de un cuarto vaso correspondiente a un control identificado como tal (muestra A). Se les pidió que evaluaran la magnitud de la diferencia global entre cada muestra de jugo presentada y el control reconocido como tal y que lo marcaran en una escala numérica y verbal de categorías desde “ninguna” diferencia a “muy grande”, como lo esquematiza el **Formulario 3**. Además se pidió especificar, en lo posible, la dirección de la diferencia.

Se computaron los puntajes asignados por los participantes, los cuales se analizaron mediante un análisis de varianza de dos factores (muestra-sujeto). Se estudiaron las diferencias entre los sujetos con el objetivo de verificar su funcionamiento como grupo y las diferencias entre las muestras producidas por el almacenamiento.

### FORMULARIO 3

#### EVALUACIÓN DE UNA BEBIDA DE NARANJA

Nº de bandeja .....

Fecha:...../...../.....

#### INSTRUCCIONES

Se le ha entregado una muestra control (C) y otras 3 muestras para que las compare respecto del mismo en cuanto a su diferencia global. Las muestras están ordenadas al azar.

1- Probar primero el control

2- Luego probar una muestra codificada

3- Evaluar la magnitud de la diferencia global de la muestra respecto del control.

4- Marcar la escala con una "x" en la casilla que mejor exprese la diferencia de sensación percibida.

5- Repetir los pasos 1 a 4 con cada muestra. De ser necesario enjuagar la boca con agua antes de la evaluación de un nuevo par control-muestra.

Tenga en cuenta que algunas muestras pueden ser las mismas que el control.

*La diferencia global de cada muestra respecto del control es.....*

Clave de la muestra:

.....

.....

.....

Ninguna	1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ligera	2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Moderada	4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Grande	6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Muy grande	8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Si desea, responda a la siguiente pregunta:

¿Qué tipo de diferencias encontró?

.....  
.....



#### 4.1- Detección de células injuriadas

Con el fin de seleccionar el medio de cultivo más apropiado para la recuperación de *L. innocua* injuriada térmicamente, se evaluaron cuatro medios de recuento, utilizando como medio base ATS-E ó CTS-E, tres de los cuales se suplementaron con 0,1 ó 1% p/p de piruvato de sodio ó 0,5% p/p de D-glucosa anhidra.

En respuesta al tratamiento térmico, en la célula se producen ciertos procesos tales como la síntesis de proteínas de shock térmico, disminución de glucosa y producción de peróxido de hidrógeno (Linton y col., 1990; Knabel y col., 1990). Los aditivos evaluados fueron seleccionados con el objeto de brindar a la célula el ambiente propicio para su recuperación y desarrollo, para de esta manera, asegurar que toda la población que resistió en mayor o menor medida al tratamiento pudiera ser contabilizada. Como se trabajó con sistemas modelo inoculados con cultivos puros, sin flora competitiva, no fueron necesarios los pasos de pre-enriquecimiento (almacenamiento en frío a 4°C de 7 a 28 días ó a 25°C durante 7 días) ni el uso de medios selectivos con antibióticos que podrían afectar la recuperación de células injuriadas (Crawford y col., 1989). La experiencia se realizó utilizando un sistema modelo (agua peptonada, 11° Brix, pH 3,5) inoculado con *L. innocua* y procesado en el sistema de flujo continuo UHT/HTST a 57 ó 59 °C, tal como se detalla en **Materiales y Métodos, apartado 3.8.**

La **Tabla 4.1.1** presenta el número de reducciones logarítmicas (*NRL*) de *L. innocua* para un recuento inicial promedio de  $\cong 1 \times 10^6$  UFC/ml, determinado en cada medio propuesto por el método de plaqueo en superficie y por la técnica del número más probable (NMP), obteniéndose en todos los casos una desviación estándar  $< 0,1$ . Se observó que, en general, los medios base (ATS-E y CTS-E) y los adicionados con 0,5% de D-glucosa presentaron valores de *NRL* ligeramente mayores ó iguales (y por lo tanto menores ó iguales recuentos de unidades formadoras de colonias), que los medios adicionados con piruvato de sodio.

El agregado de piruvato de sodio (0,1 y 1%) tuvo mayor influencia sobre la recuperación microbiana, favoreciendo el crecimiento y acortando el tiempo lag de las células subletalmente injuriadas, especialmente al aumentar la temperatura del

**Tabla 4.1.1**

Evaluación de cuatro medios de cultivo para la detección de *L. innocua* en un sistema modelo (agua peptonada, 11°Brix, pH 3,5) tratado térmicamente a 57 ó 59 °C durante 14 segundos en el equipo de flujo continuo UHT/HTST.

TEMPERATURA (°C)	NRL <sup>a</sup>							
	PLAQUEO EN SUPERFICIE				NMP			
	ATS-E <sup>b</sup>	P 0,1% <sup>c</sup>	P 1% <sup>d</sup>	D 0,5% <sup>e</sup>	CTS-E <sup>f</sup>	P 0,1% <sup>g</sup>	P 1% <sup>h</sup>	D 0,5% <sup>i</sup>
57	0,30	0,22	0,21	0,22	0,22	0,25	0,02	0,44
	0,20	0,26	0,2	0,2	-	0,35	0,07	0,34
59	0,98	1,12	1,12	1,73	0,96	1,07	1,07	1,32

<sup>a</sup> Número de reducciones logarítmicas

<sup>b</sup> Agar Tripteína Soja + 0,6% Extracto de Levadura (ATS-E)

<sup>c</sup> ATS-E adicionado con 0,1% de piruvato de sodio

<sup>d</sup> ATS-E adicionado con 1% de piruvato de sodio

<sup>e</sup> ATS-E adicionado con 0,5% de D-glucosa

<sup>f</sup> Caldo Tripteína Soja + 0,6% Extracto de Levadura (CTS-E)

<sup>g</sup> CTS-E adicionado con 0,1% de piruvato de sodio

<sup>h</sup> CTS-E adicionado con 1% de piruvato de sodio

<sup>i</sup> CTS-E adicionado con 0,5% de D-glucosa

- No determinado

tratamiento a 59°C, es decir, en las condiciones en que las células resultaron más dañadas térmicamente.

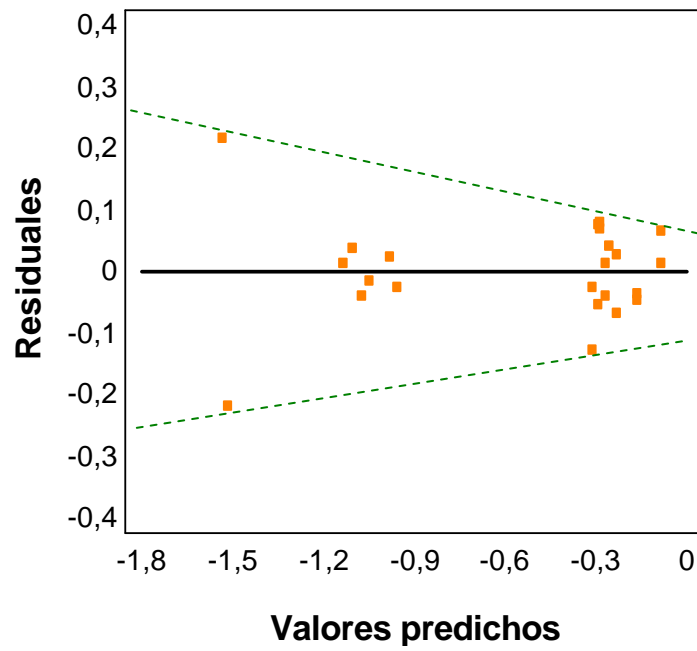
Las dos metodologías de siembra (plaqueo en superficie y NMP) resultaron comparables a las dos temperaturas evaluadas, aunque experimentalmente se observó un mayor crecimiento en el fondo de los tubos de NMP. Este hecho concuerda con la afirmación de Hoffmans y col., (1997) acerca del requerimiento de oxígeno de *L. monocytogenes*, que se comporta como aerobia-microaerofílica en condiciones normales, mientras que en el estado injuriado responde como microaerofílica-anaerobia. Asimismo se observó que el aumento del tiempo de incubación habitual de 2 a 5 días, incrementó considerablemente el número de nuevas colonias, y que una incubación subsiguiente no aportó más beneficios.

Con el propósito de determinar estadísticamente la influencia de las variables medio de cultivo (MC), método de recuento (MR) y temperatura de tratamiento térmico (T) sobre la respuesta (*NRL*), se realizó un análisis de varianza siguiendo el procedimiento del Modelo Lineal Generalizado (Beuchat y col., 2001), utilizándose como variables categóricas MC y MR, y como variable cuantitativa, T (ver **apéndice de Procedimientos Estadísticos, apartado 6.12.1**). La distribución de residuales en función de los valores predichos por el modelo presentó forma de cono (**Figura 4.1.1**), incrementándose la varianza del modelo a medida que disminuyó la respuesta medida, *NRL*. Fue necesario entonces, transformar dicha respuesta hallándose la potencia en base 10 de la misma ( $N/N_0$ ), con el propósito de uniformizar los residuales en el modelo propuesto.

La **Tabla 4.1.2** resume el análisis de varianza del modelo propuesto para describir la relación existente entre la respuesta transformada ( $N/N_0$ ) y las variables independientes: MC, MR y T. El valor de F para la regresión completa (24,96) resultó altamente significativo ( $\alpha < 0,0001$ ), indicando que existe una relación estadísticamente significativa entre la respuesta ( $N/N_0$ ) y las variables independientes tenidas en cuenta por el modelo. El valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) ajustado por grados de libertad, indica que casi el 91,6% de la variación de la respuesta ha sido explicada por el modelo propuesto.

**Figura 4.1.1**

Validación interna del modelo primitivo: análisis de residuales versus valores predichos





**Tabla 4.1.2**

Resumen del Análisis de Varianza del modelo propuesto que relaciona la fracción sobreviviente de *L. innocua* ( $N/N_0$ ) con las variables medio de cultivo (MC), método de recuento (MR) y temperatura de tratamiento térmico (T).

FUENTE	gl <sup>a</sup>	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F <sup>b</sup>	$\alpha$
Modelo	10	1,64	0,16	24,96****	0,0000
MC	3	0,049	0,016	2,49 <sup>&gt;*</sup>	0,1097
T	1	1,38	1,38	209,8****	0,0000
MC·T	3	0,047	0,016	2,38 <sup>&gt;*</sup>	0,1207
MC·MR	3	0,077	0,026	3,87*	0,0378
Residual	12	0,079	0,0066		
R <sup>2</sup>			95,4%		
R <sup>2</sup> ajustado			91,6%		

<sup>a</sup> Grados de libertad

<sup>b</sup> Significativo a un nivel de: <sup>></sup>\* >10%; \* 5%, \*\* 1%; \*\*\*0,1% y \*\*\*\* 0,01%

La **Figura 4.1.2** presenta una validación interna del modelo propuesto utilizando métodos gráficos. El análisis de los valores predichos versus los observados (**Figura 4.1.2.a**) muestra una distribución homogénea en torno de la diagonal y muy próxima a ésta, indicando que los valores de la respuesta predichos por el modelo son muy parecidos a los valores observados experimentalmente. Por lo tanto, el modelo propuesto es adecuado para describir el comportamiento observado. En la **Figura 4.1.2.b**, se observó una distribución uniforme de los residuales en una banda horizontal cercana a los valores predichos, verificando una varianza constante.

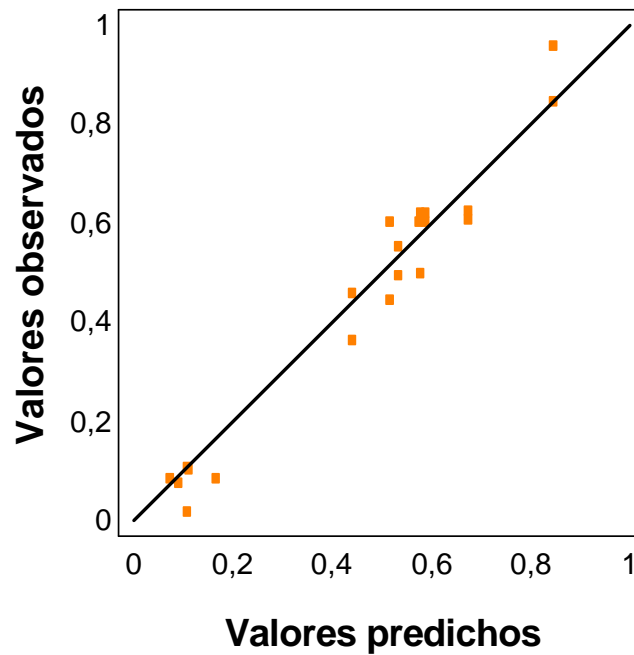
Por todo lo anteriormente expuesto, se concluyó que *no existe razón para dudar que el modelo propuesto sea adecuado para describir la respuesta observada.*

El análisis de los términos que conforman el modelo revela que, el medio de cultivo utilizado, influyó levemente en la recuperación de células injuriadas térmicamente. La temperatura de tratamiento empleada fue factor de mayor significación estadística ( $F$  parcial = 209,8). La elevada significación del término  $T$  resulta predecible, dado que la temperatura de tratamiento térmico tiene una influencia marcada en la disminución de los recuentos. La presencia del término cruzado  $MC \cdot T$  da relevancia a este estudio, ya que permite concluir que la diferencia observada en la respuesta para todos los medios evaluados estuvo influenciada por la temperatura de tratamiento térmico. La presencia de dicho término confirma la interacción observada entre estos factores, por la cual a  $59^{\circ}C$  se obtuvo mayor diferencia en los valores de  $N/N_0$  entre los distintos medios utilizados. Si bien los términos  $MC$  y  $MC \cdot T$  no tuvieron elevada significación ( $\alpha > 10\%$ ), su eliminación produjo un desmejoramiento del ajuste del modelo, hecho que ratificó su inclusión en el modelo propuesto. El factor método de recuento,  $MR$  estuvo presente en el término cruzado  $MC \cdot MR$ , mostrando la dependencia del medio de cultivo en la recuperación de células injuriadas, con el método de detección empleado.

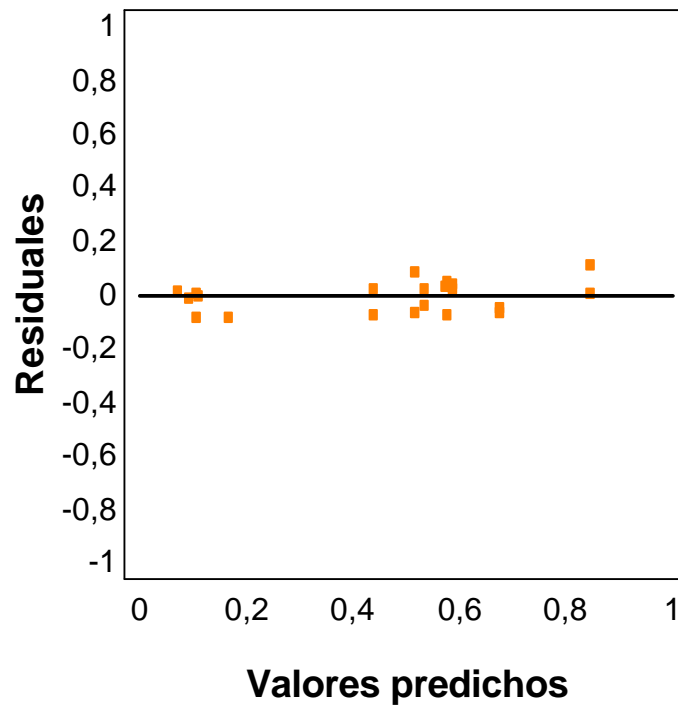
**Figura 4.1.2**

Validación interna del modelo propuesto. a) valores observados vs valores predichos por el modelo propuesto; b) residuales vs valores predichos.

a)



b)



Una vez aplicado el análisis de varianza, se aplicó el test de comparaciones múltiples de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (MDS) con el propósito de establecer entre cuales medios de cultivo se manifestó diferencia significativa de la respuesta medida (**Tabla 4.1.3**). El valor del estadístico MDS calculado de acuerdo a la **ecuación 6.30** del apéndice **Procedimientos Estadísticos, apartado 6.14.1** fue de 0,107.

La **Tabla 4.1.3.a** muestra a los grupos de medios de cultivo cuyas medias de la respuesta ( $N/N_0$ ) resultaron semejantes (grupos homogéneos), los cuales se identificaron con la misma letra. La **Tabla 4.1.3.b** muestra de manera complementaria, la estimación de la diferencia entre cada par de medias. Con un asterisco se marcaron los pares de medias que excedieron dicho valor presentando por lo tanto, medias significativamente diferentes a un nivel del 5%. Del análisis de la **Tabla 4.1.3.a** surge que no existieron diferencias significativas al 5% de la respuesta medida entre los medios: ATS-E; D 0,5% y P0,1%. La **Tabla 4.1.3.b** muestra que existieron diferencias significativas al 5% entre el medio base ATS-E y el medio P 1%; entre éste último y el medio D 0,5% y también existieron diferencias significativas entre el medio que contenía 1% de piruvato de sodio y el medio que contenía 0,1% de este suplemento.

En general, los resultados obtenidos experimentalmente concuerdan con la bibliografía, donde se reporta mayor recuento de células en medios con aditivos, aunque en la mayor parte de los trabajos sólo se presentan los valores absolutos de los recuentos sin especificar si las diferencias observadas entre los distintos medios eran estadísticamente significativas. Busch y Donnelly (1992) encontraron que el medio Caldo Tripteína Soja (CTS) permitió la recuperación de *L. monocytogenes* tratada térmicamente a 56°C durante 50 minutos, pero con un período lag extendido antes de iniciar la reparación, en comparación con el mismo medio conteniendo diversos aditivos. El agregado de 0,5% de extracto de levadura incrementó 1 ciclo log la población en 5 horas de incubación; mientras que el agregado de 0,5% de glucosa aumentó los recuentos en 1,8 ciclos log y la adición de 1% de piruvato incrementó la población en 1,7 ciclos log.

**Tabla 4.1.3**

Test de comparaciones múltiples de medias de Fisher para establecer mínima diferencia significativa entre los medios de cultivo evaluados.

a)

MEDIO DE CULTIVO	MEDIA MÍNIMAMENTE SIGNIFICATIVA	GRUPOS HOMOGENEOS
ATS-E (1)	0,41	a
P 0,1% (2)	0,37	a
D 0,5% (4)	0,34	a
P 1% (3)	0,52	b

(1) Medio base: Agar ó Caldo Tripteína Soja + 0,6% Extracto de Levadura

(2) Medio base adicionado con 0,1% de piruvato de sodio

(3) Medio base adicionado con 1% de piruvato de sodio

(4) Medio base adicionado con 0,5% de D-glucosa

b)

COMPARACIÓN	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS
1 – 2	0,042
1 – 3	-0,112*
1 – 4	0,067
2 – 3	-0,154*
2 – 4	0,024
3 - 4	0,178*

- diferencia significativa al 5%

Según los resultados obtenidos, se decidió utilizar el medio base agarizado ATS-E ó el caldo CTS-E adicionado con 1% de piruvato de sodio como medio de recuento en las sucesivas experiencias, para asegurar la recuperación de la mayor cantidad de las células de *L. innocua* ó *L. monocytogenes* injuriadas térmicamente, luego del procesamiento del jugo de naranja.

Algunos resultados en bibliografía reportan una mayor recuperación de células viables de *L. monocytogenes* injuriada térmicamente usando el método del NMP en el medio CTS, que por plaqueo en superficie en el medio ATS ó plaqueo por vertido (Mackey y col, 1994). Por lo tanto, se decidió trabajar con el método de plaqueo en superficie para recuentos elevados y con la técnica del NMP en los casos donde se esperaban recuentos menores, por estar el microorganismo sometido a una mayor injuria.

## 4.2- Procesamiento del jugo de naranja en un sistema continuo

### 4.2.1 Datos experimentales

La **Figura 4.2.1** muestra la inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con vainillina y tratado térmicamente en el equipo de flujo continuo UHT/HTST, para las distintas condiciones evaluadas. En la superficie obtenida se observa que el número de reducciones logarítmicas (*NRL*) de la población de *L. innocua* aumentó conforme se incrementó la concentración de vainillina a una dada temperatura de tratamiento. Este efecto resultó más notorio a medida que aumentó la temperatura de tratamiento térmico. Así por ejemplo: cuando el jugo se trató a 61°C el agregado de 500 ppm de vainillina duplicó el *NRL* observado respecto del correspondiente jugo sin vainillina, mientras que la adición de 1100 ppm de vainillina cuadruplicó dicho valor.

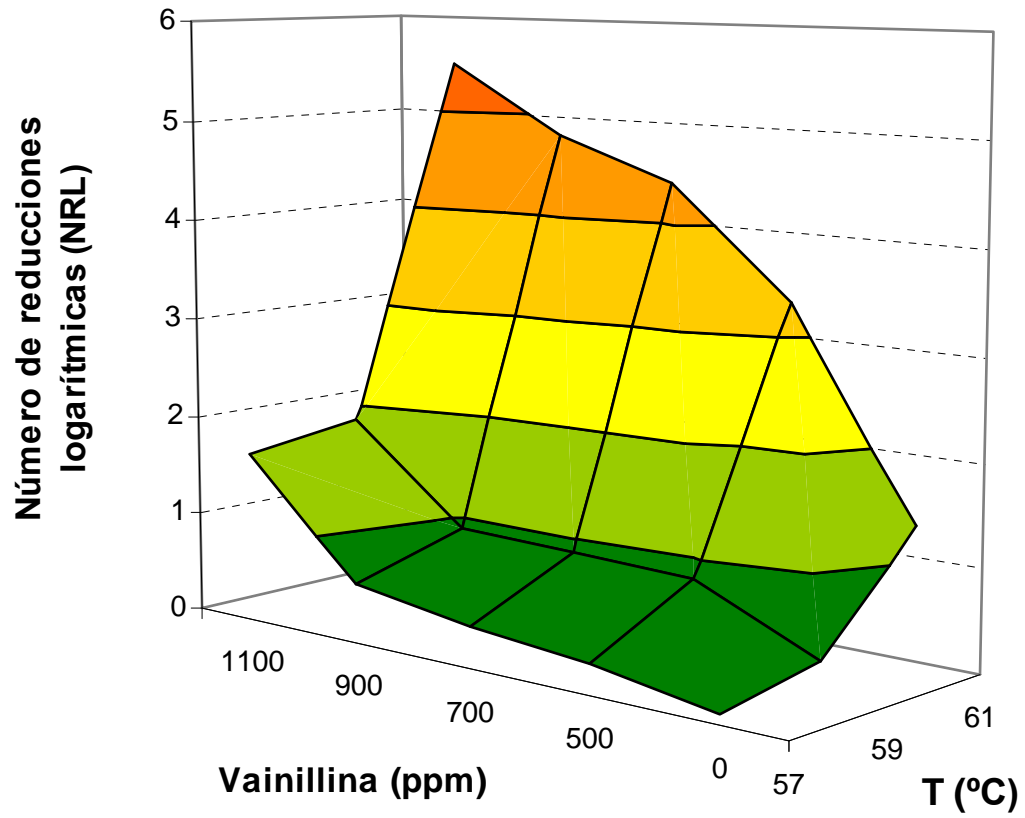
El incremento de la temperatura de tratamiento térmico del jugo de naranja sin agregado de vainillina, produjo escasa inactivación por debajo de 59°C. Sin embargo, por encima de dicha temperatura, se logró una mayor inactivación. Así, por ejemplo, a 61°C se obtuvo un valor de *NRL* de  $\cong 1,4$ . Al agregar vainillina, se observó un efecto semejante: por debajo de 59°C hubo un escaso aumento del valor de *NRL*, mientras que por encima de dicha temperatura hubo un incremento notorio del mismo conforme aumentó la concentración de vainillina.

Este análisis demuestra que la combinación de los factores de estrés adición de vainillina y temperatura de tratamiento térmico, incrementó en gran medida la reducción de la población de *L. innocua* presente en jugo de naranja procesado 14 segundos en el equipo UHT/HTST. Tal es así, que la combinación de 1100 ppm de vainillina y 61°C produjo un valor de *NRL* mayor a 5 ciclos, cumpliendo con los requerimientos de la FDA para este tipo de producto (ver **Introducción, apartado 1.9.3**).

La **Figura 4.2.2** representa un corte de la superficie correspondiente a la **Figura 4.2.1** para jugo de naranja sin y con vainillina (700 ppm). En la misma se aprecia claramente el efecto beneficioso de la combinación de los factores de estrés: tratamiento térmico y agregado de vainillina en baja proporción al jugo de

**Figura 4.2.1**

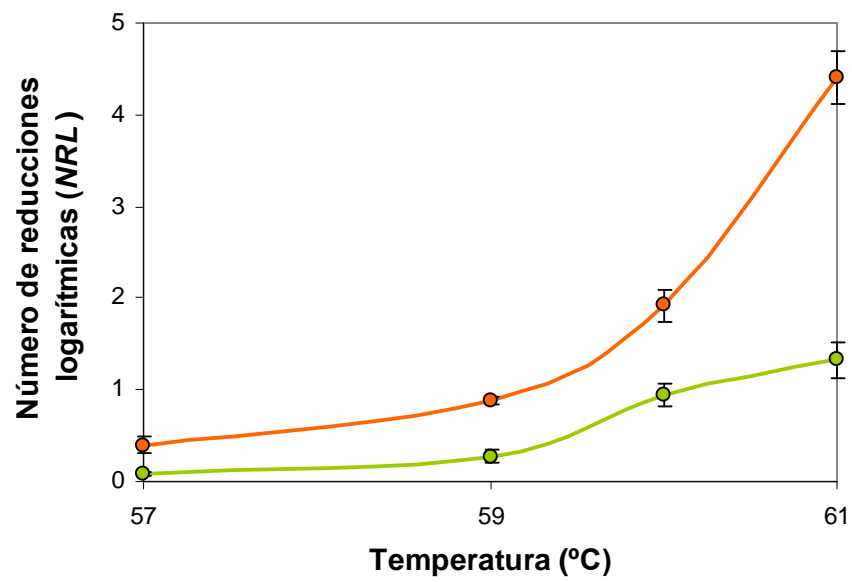
Inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con vainillina y tratado térmicamente por 14 segundos en el equipo de flujo continuo UHT/HTST.





**Figura 4.2.2**

Efecto de la temperatura del tratamiento térmico sobre la inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja suplementado ó no con vainillina (700 ppm): (●) sin vainillina; (●) con vainillina.



naranja. Los recuentos de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con 700 ppm de vainillina presentaron una reducción adicional comprendida entre 0,3 *NRL* (57°C) y 3 *NRL* (61°C) según la temperatura de tratamiento, respecto del jugo de naranja sin agregado de vainillina.

#### 4.2.2- Modelado matemático

Con el fin de optimizar el proceso de preservación del jugo, se relacionó la respuesta observada (*NRL* de *L. innocua*) en función de las variables independientes consideradas (temperatura de tratamiento y concentración de vainillina), aplicando un diseño factorial incompleto tipo Box- Behnken (ver **Materiales y Métodos, apartado 3.9.9**). Debido al requerimiento del diseño de utilizar tres niveles equiespaciados de las variables independientes, se modeló separadamente la respuesta observada para dos rangos de concentración de vainillina en el jugo de naranja:

- 500 a 900 ppm de vainillina
- 700 a 1100 ppm de vainillina

##### 4.2.2.1- Modelado en el rango de concentraciones de vainillina de 500 a 900 ppm

La **Tabla 4.2.1** muestra los datos experimentales y la codificación de las variables independientes en el rango de 500 a 900 ppm de agregado de vainillina.

Mediante un análisis de regresión múltiple se ajustó una ecuación polinómica de segundo orden a los valores de *NRL* obtenidos experimentalmente en dicho rango, con el objeto de vincular dicha respuesta con las variables del proceso.

Al igual que ocurriera en el **apartado 4.1**, fue necesario una transformación de la variable de respuesta (*NRL*), con el propósito de uniformizar varianzas y obtener una distribución de residuales homogénea. Se transformó la respuesta calculando su logaritmo natural:  $\ln [NRL]$ . Se seleccionó la función polinómica que mejor representó la relación entre *NRL* de *L. innocua* con las variables independientes, temperatura de tratamiento térmico ( $x_1$ ) y concentración de vainillina

**Tabla 4.2.1**

Valores experimentales de la respuesta (*NRL*) para diferentes combinaciones de las variables codificadas temperatura de tratamiento térmico ( $x_1$ ) y concentración de vainillina ( $x_2$ ).

$x_1$	$x_2$	<i>NRL</i>
-1	-1	0,30
0	-1	0,83
+1	-1	3,31
-1	0	0,40
0	0	0,88
0	0	4,35
0	0	0,88
0	0	0,85
0	0	0,91
+1	0	1,03
-1	+1	0,60
0	+1	0,90
+1	+1	4,80

( $x_2$ ), siguiendo los pasos descritos en **Procedimientos Estadísticos, apartado 6.12.2.**

La ecuación resultante expresada en función de las variables codificadas fue la siguiente:

$$\text{Ln [NRL]} = -0,11 + 1,14 x_1 + 0,19 x_2 + 0,38 x_1^2$$

ó bien, expresada en función de las variables no codificadas:

$$\text{Ln [NRL]} = 294 - 10,6 T + 9,6 \times 10^{-4} V + 0,095 T^2$$

siendo T = temperatura de tratamiento térmico (°C)

V = concentración de vainillina (ppm)

La **Tabla 4.2.2** exhibe el análisis de varianza aplicado para la regresión completa y para cada término en particular, un análisis de residuales y test de falta de ajuste, y los valores de los coeficientes de determinación resultantes. El análisis de varianza para la regresión completa ( $F = 202$ ) resultó altamente significativo ( $\alpha < 0,0001$ ). El análisis de este parámetro permitió determinar que la variación de las medidas experimentales tenida en cuenta por el modelo (suma de cuadrados debida a la regresión, SSR), es significativamente mayor a la variación no tenida en cuenta por el modelo (suma de cuadrados residual, SSE).

Analizando la contribución de cada variable al modelo en función de las variables codificadas, se observa que los términos lineales y cuadráticos  $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_1^2$  fueron significativos. La temperatura de tratamiento fue el factor más relevante en cuanto a la inactivación de *L. innocua*, presentando el mayor valor de F parcial.

El test F para la regresión completa permite refutar la hipótesis nula, infiriendo que algunos coeficientes del modelo serán distintos de cero. Pero no alcanza para afirmar que el modelo describe adecuadamente el comportamiento de la respuesta en el rango de las variables utilizadas. Por este motivo el diseño aplicado con cinco

**Tabla 4.2.2**

Tabla de ANOVA. Efecto de los términos lineales y cuadráticos en el número de reducciones logarítmicas (*NRL*) de *L. innocua* en jugo de naranja con vainillina (500-900 ppm) y tratado térmicamente (57-61°C) en un equipo de flujo continuo UHT/HTST.

FUENTE	gl <sup>a</sup>	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F <sup>b</sup>	$\alpha$
Modelo	3	8,54	2,85	202,0****	<0,0001
x <sub>1</sub>	1	7,86	7,86	557,6****	<0,0001
x <sub>2</sub>	1	0,22	0,22	15,5**	0,0034
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	0,46	0,46	32,8***	0,0003
Residuales	9	0,13	0,014		
Falta de ajuste (LOF)	5	0,10	0,020	3,77 (NS)	0,1115
Error puro (PE)	4	0,022	5,5x10 <sup>-3</sup>		
R <sup>2</sup>			98,5 %		
R <sup>2</sup> ajustado			98,1 %		

x<sub>1</sub> : temperatura de tratamiento térmico

x<sub>2</sub> : concentración de vainillina

<sup>a</sup> grados de libertad

<sup>b</sup> Significativo a un nivel de: \*\* 1%; \*\*\*0,1% y \*\*\*\* 0,01 %; (NS) no significativo

repeticiones del punto central, permite calcular el test de falta de ajuste (ver **Procedimientos Estadísticos, apartado 6.10**). En este caso, la suma de cuadrados debida a falta de ajuste del modelo ( $SS_{LOF}$ ), resultó no significativa ( $\alpha > 0,1$ ), es decir, que el modelo propuesto ajustó los datos experimentales adecuadamente. Por lo tanto, se puede utilizar la media de cuadrados del error (MSE) como estimador de la varianza del modelo ( $s^2$ ) cuyo valor fue 0,014.

La evaluación del coeficiente de determinación ajustado por grados de libertad ( $R^2$  ajustado) demuestra que más del 98% de la variación observada en los valores de *NRL* de *L. innocua* respecto de la media, pudo ser explicada por la ecuación propuesta.

La **Figura 4.2.3** presenta una validación interna del modelo propuesto mediante métodos gráficos con el propósito de verificar las suposiciones realizadas en el análisis de regresión respecto de los errores experimentales: distribución normal, independencia, y varianza constante.

El gráfico de valores predichos versus observados (**Figura 4.2.3.a**) muestra una distribución uniforme alrededor de la diagonal y muy cercana a ésta, indicando que los valores de *NRL* predichos por el modelo son muy parecidos a los valores observados experimentalmente. Por lo tanto, se confirma que el modelo propuesto es adecuado para describir el comportamiento observado.

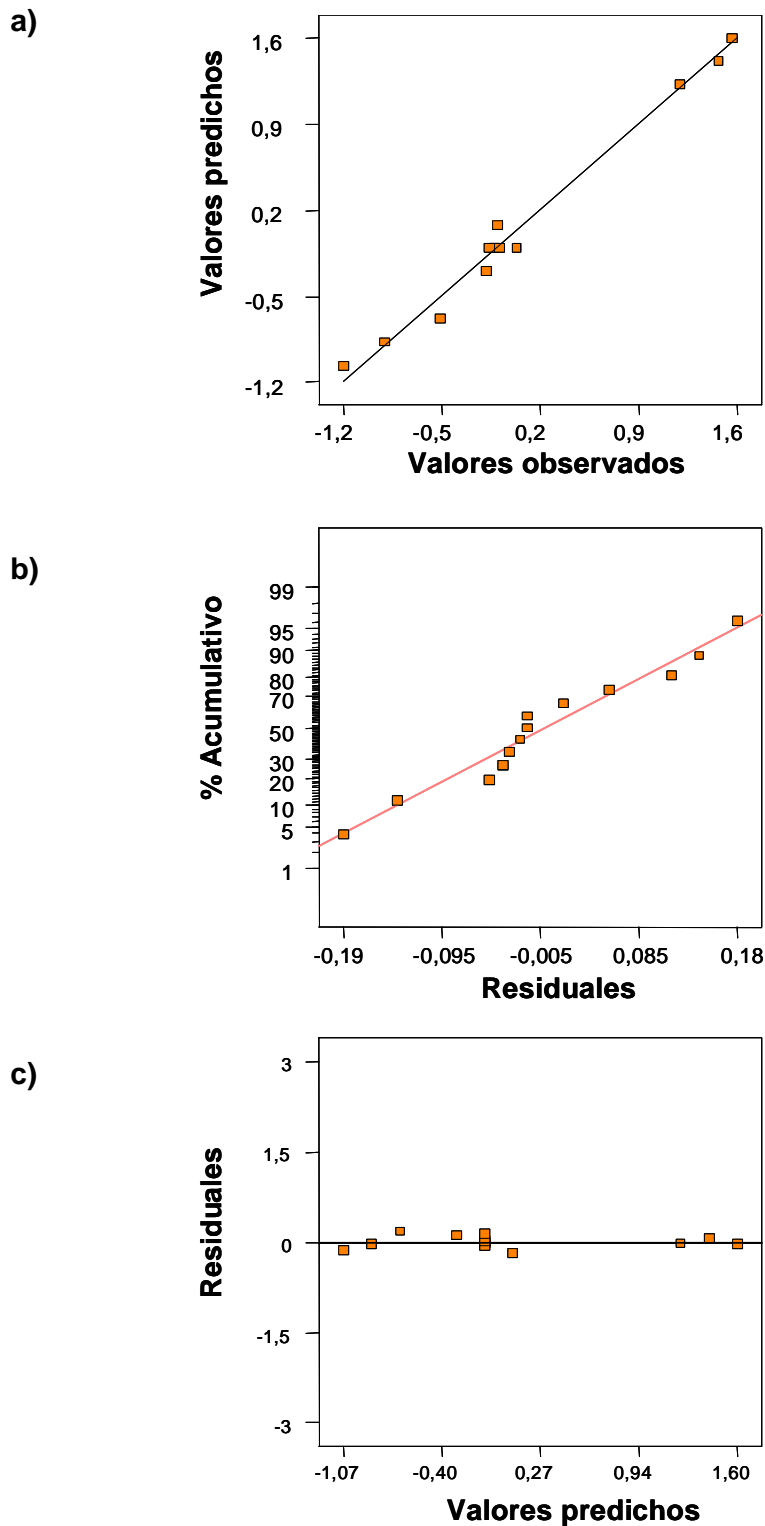
Adicionalmente, se analizó la distribución de los residuales graficados en una escala de probabilidad estándar (**Figura 4.2.3.b**) (ver **Apéndice de Procedimientos Estadísticos, apartado 6.14.2**). Los puntos se distribuyeron de manera uniforme en torno a una línea recta de ajuste ascendente, comprobándose la normalidad de la distribución de residuales.

Graficando los residuales en función de los valores predichos de la respuesta (**Figura 4.2.3.c**) se observó una distribución homogénea de los mismos en una banda horizontal, verificando una varianza constante. Todos los residuales estuvieron comprendidos en un rango de  $\pm 3\sigma$ , con valores muy cercanos a cero. No se observaron distribuciones en forma de herradura ni en forma de cono.

*Por todo lo anteriormente expuesto, se concluyó que no existe razón para dudar de que el modelo propuesto es adecuado.*

**Figura 4.2.3**

Validación interna del modelo propuesto que relaciona el Número de Reducciones logarítmicas (*NRL*) de *L. innocua* en jugo de naranja con la concentración de vainillina (500 a 900 ppm) y la temperatura de tratamiento térmico (57-61°C). a) Valores observados vs valores predichos por el modelo propuesto; b) Variación de los residuales en escala de probabilidad estándar; c) Residuales vs valores predichos por el modelo propuesto.



A partir del modelo polinomial de segundo orden propuesto, se desarrolló la superficie de respuesta y el correspondiente gráfico de contorno (**Figura 4.2.4**).

La superficie de respuesta muestra, en tres dimensiones, un barrido en la zona experimental de la respuesta medida (*NRL*) en función de las variables independientes, concentración de vainillina (*V*) y temperatura de tratamiento térmico (*T*). En la misma se observa un incremento de los valores de *NRL* conforme aumenta la temperatura de tratamiento y la concentración de vainillina.

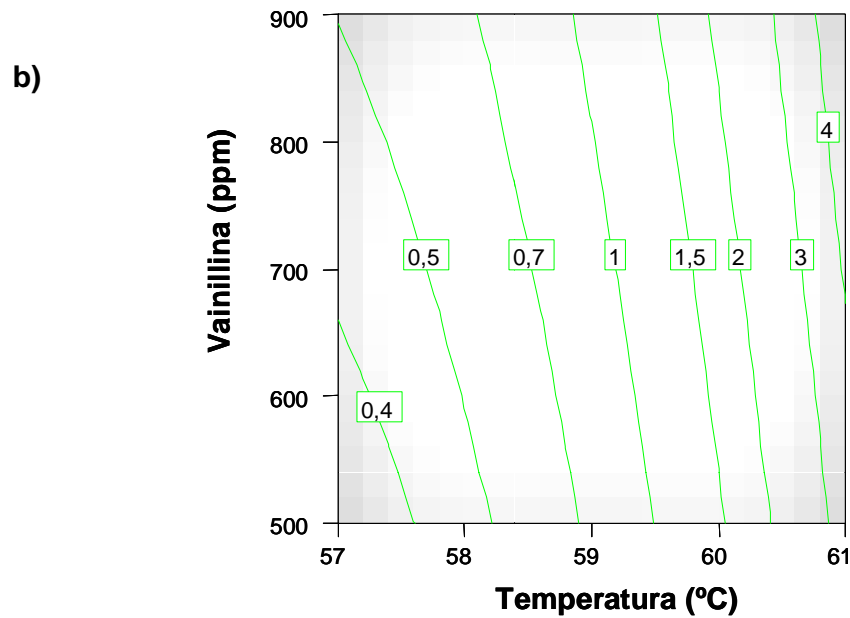
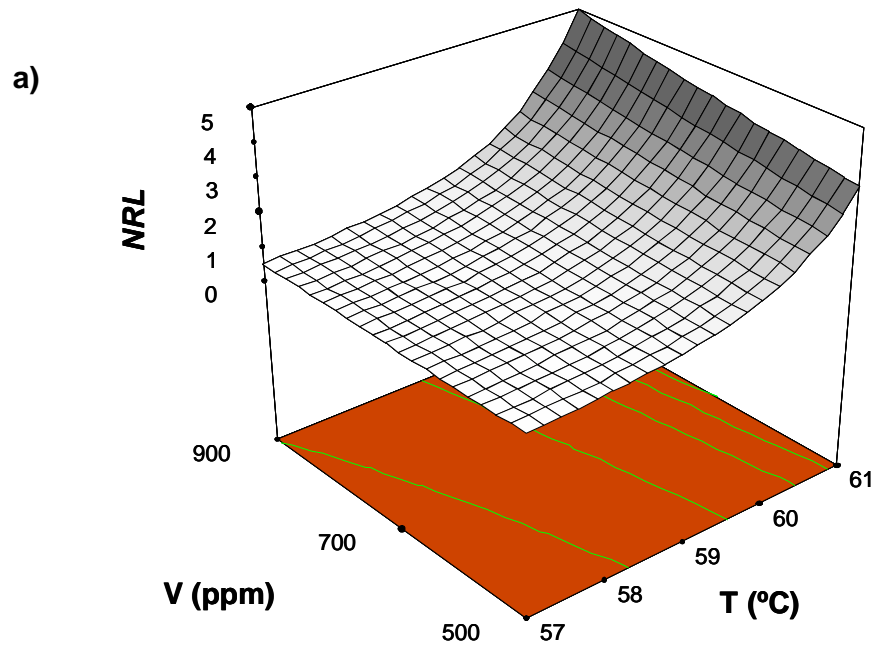
El término cuadrático puro ( $x_1^2$ ) incluido en el modelo con alto grado de significación ( $\alpha = 0,0003$ ) según el análisis de varianza, es responsable de la curvatura que presenta dicha superficie. Esta mayor inclinación sobre el eje de temperatura, respecto del eje concentración de vainillina, confirma también la mayor influencia de la primera variable por producir mayor cambio en la respuesta. Es esperable que la variable  $x_2$  (vainillina) tenga escasa influencia en la representación del modelo, debido a que se está considerando concentraciones de este antimicrobiano relativamente bajas (500-900 ppm), respecto de las concentraciones más comúnmente utilizadas para inactivar microorganismos patógenos y deteriorativos en derivados frutales. Cerrutti y col. (1996) adicionaron 2000 ppm de vainillina a puré de manzana, logrando la inhibición del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, *Zigosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces hanseii* y *Z. bailii*. Ferrante (2004) combinó el agregado de hasta 2000 ppm de vainillina con la aplicación de ultrasonido para inactivar *L. monocytogenes* en jugo de naranja. Corte y col (2005) utilizaron hasta 3000 ppm de vainillina para inactivar *L. innocua* en jugo de manzana.

El análisis del gráfico de contorno permite visualizar con mayor claridad la respuesta (*NRL*) predicha, a partir de múltiples combinaciones de las variables, dentro del rango estudiado. Por ejemplo: un jugo de naranja inoculado con *L. innocua*, conteniendo 700 ppm de vainillina tratado a 57°C durante 14 segundos en un equipo UHT/HTST, produce una reducción en la población de algo más de 0,4 ciclos logarítmicos; sin embargo, tratando el jugo adicionado con la misma concentración de vainillina a 61°C, se logra una reducción de *L. innocua* de 4 ciclos Log. (**Figura 4.2.4.b**).



**Figura 4.2.4**

Superficie de respuesta (a) y gráfico de contorno (b) para la variación del número de reducciones logarítmicas (*NRL*) de *L. innocua* en jugo de naranja en función de la concentración de vainillina (500 - 900 ppm) y la temperatura de tratamiento térmico (57 - 61°C) en el equipo de flujo continuo



Se puede observar que, en la zona de temperaturas de tratamiento térmico menores a 59°C la respuesta observada fue más dependiente de la concentración de vainillina presente que en la zona de temperaturas más elevadas ( $T > 59^\circ\text{C}$ ), donde, para un rango amplio de concentraciones de vainillina, se observó escasa variación de *NRL*.

La inactivación de este microorganismo fue muy dependiente de la temperatura de tratamiento, especialmente por encima de 59°C, lográndose un incremento notorio de los valores de *NRL* con pequeños incrementos de temperatura, para un determinado nivel de vainillina.

#### **4.2.2.2- Modelado en el rango de concentraciones de vainillina de 700 a 1100 ppm**

La **Tabla 4.2.3** muestra los valores de la respuesta (*NRL*) para las distintas combinaciones de las variables independientes  $x_1$  (T) y  $x_2$  (V), en el rango de concentraciones de vainillina de 700 a 1100 ppm.

Procediendo de manera análoga que en **apartado 4.2.2.1**, se obtuvo el mejor modelo polinomial para describir la relación entre el *NRL* de *L. innocua* y las variables independientes, en dicho rango de concentraciones de vainillina. Asimismo, para obtener un modelo apropiado, fue necesario transformar la respuesta calculando su logaritmo natural:  $\text{Ln}[NRL]$ . La ecuación propuesta expresada en función de las variables codificadas fue la siguiente:

$$\text{Ln}[NRL] = 0,035 + 0,94 x_1 + 0,40 x_2 + 0,48 x_1^2 + 0,19 x_2^2 - 0,31 x_1 \cdot x_2$$

ó bien, expresada en función de las variables no codificadas:

$$\text{Ln}[NRL] = 351 - 13 T + 0,04 V + 0,12 T^2 + 4,8 \times 10^{-6} V^2 - 7,6 \times 10^{-4} T_1 \cdot V_2$$

siendo T = temperatura de tratamiento térmico (°C)

V = concentración de vainillina (ppm)

**Tabla 4.2.3**

Valores experimentales de la respuesta (*NRL*) para diferentes combinaciones de las variables codificadas temperatura de tratamiento térmico ( $x_1$ ) y concentración de vainillina ( $x_2$ ).

$x_1$	$x_2$	<i>NRL</i>
-1	-1	0,40
0	-1	0,88
+1	-1	4,40
-1	0	0,60
0	0	0,90
0	0	1,01
0	0	0,96
0	0	1,15
0	0	1,15
+1	0	4,80
-1	+1	1,70
0	+1	1,85
+1	+1	5,50

La **Tabla 4.2.4** presenta el análisis de varianza aplicado para la regresión completa y para cada término en particular, un análisis de residuales y test de falta de ajuste, y los valores de los coeficientes de determinación.

El alto valor de F de la regresión completa (134,7) demuestra que la variación de la respuesta tomada en cuenta por el modelo propuesto es significativamente mayor ( $\alpha < 0,0001$ ) que la variación no considerada por mismo. Al analizar la contribución de cada variable al modelo se observó que, además de los mismos términos lineales y cuadráticos presentes en el modelo propuesto para el rango de concentraciones de vainillina de 500 – 900ppm ( $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_1^2$ ), en el presente modelo resultaron importantes también el término cuadrático  $x_2^2$  y el término cruzado  $x_1 \cdot x_2$ . Al igual que en el modelo anterior, la temperatura de tratamiento fue el factor de mayor peso en la inactivación de *L. innocua* ya que presentó el mayor valor de F parcial (461,9) con alto grado de significación ( $\alpha < 0,0001$ ), tal como lo muestra la **Tabla 4.2.4**.

Asimismo, se puede asegurar que el modelo propuesto ajustó bien a los datos experimentales, por resultar no significativo el test de falta de ajuste ( $F_{LOF} = 0,92$ ). Esto permitió utilizar la media de cuadrados del error como estimador de la varianza ( $s^2$ ), cuyo valor fue 0,012.

El alto valor del  $R^2$  ajustado por grados de libertad indica que 99% de la variación observada en los valores de *NRL* de *L. innocua* respecto de la media, puede ser explicada por el modelo propuesto

Se realizó además, la validación interna del modelo mediante métodos gráficos, los cuales se presentan en la **Figura 4.2.5**. El gráfico de valores observados versus valores predichos por el modelo (**Figura 4.2.5.a**), presenta una distribución homogénea alrededor de la diagonal, con puntos muy cercanos a la misma, indicando alta correlación entre los mismos. Analizando la distribución de residuales en una escala de probabilidad estándar (**Figura 4.2.5.b**), se observa que los puntos están uniformemente distribuidos en torno a una línea diagonal, ordenados de forma ascendente. Por lo tanto, se verificó la normalidad de la distribución de los errores experimentales. Cuando se graficaron los residuales en función de los valores predichos de la respuesta (**Figura 4.2.5.c**), se observó una distribución homogénea de los mismos en una banda horizontal muy estrecha

**Tabla 4.2.4**

Tabla de ANOVA. Efecto de los términos lineales y cuadráticos en el número de reducciones logarítmicas (*NRL*) de *L. innocua* en jugo de naranja con vainillina (700-1100 ppm) y tratado térmicamente (57-61°C) en un equipo de flujo continuo UHT/HTST.

FUENTE	gl <sup>a</sup>	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F <sup>b</sup>	$\alpha$
Modelo	5	7,76	1,55	134,7****	<0,0001
$x_1$	1	5,32	5,32	461,9****	<0,0001
$x_2$	1	0,97	0,97	84,2****	<0,0001
$x_1^2$	1	0,63	0,63	55,0****	0,0001
$x_2^2$	1	0,10	0,10	9,0*	0,0199
$x_1 \cdot x_2$	1	0,37	0,37	32,5***	0,0007
Residuales	7	0,08	0,01		
Falta de ajuste (LOF)	3	0,03	0,01	0,92 (NS)	0,5092
Error puro (PE)	4	0,05	0,01		
$R^2$			99,0 %		
$R^2$ ajustado			98,2 %		

$x_1$  : temperatura de tratamiento térmico

$x_2$  : concentración de vainillina

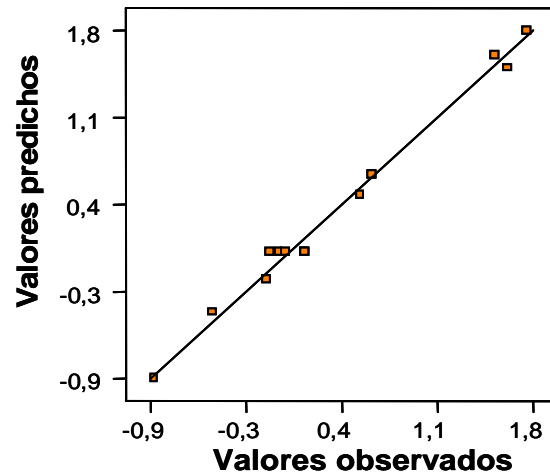
<sup>a</sup> grados de libertad

<sup>b</sup> Significativo a un nivel de \* 5%; \*\*\* 0,1%; \*\*\*\* 0,01 %; (NS) no significativo

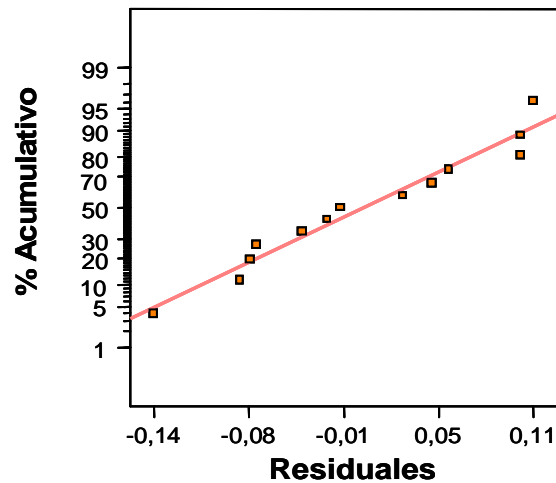
**Figura 4.2.5**

Validación interna del modelo propuesto que relaciona el Número de reducciones logarítmicas (*NRL*) de *L. innocua* en jugo de naranja con la concentración de vainillina (700 a 1100 ppm) y la temperatura de tratamiento térmico (57-61°C). a) Valores observados vs valores predichos por el modelo propuesto; b) Variación de los residuales en escala de probabilidad estándar; c) Residuales vs valores predichos por el modelo propuesto.

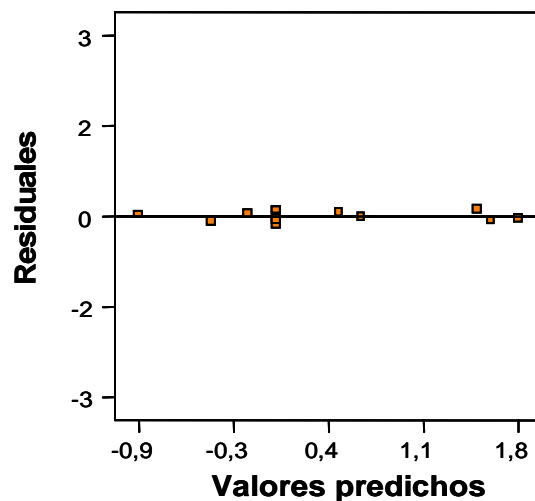
a)



b)



c)



en torno a los valores predichos por el modelo. Esta observación confirma la existencia de una varianza constante, no dependiente de los valores que asuma la respuesta.

*Por todo lo anteriormente expuesto, se concluyó que no existe razón para dudar que el modelo propuesto es apropiado para describir la variación del número de reducciones logarítmicas de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con vainillina en el rango de 700 a 1100 ppm y tratado térmicamente en el rango de 57 a 61°C.*

A partir del polinomio de segundo orden obtenido, se obtuvieron la superficie de respuesta y el correspondiente gráfico de contorno, los cuales se presentan en la Figura 4.2.6.

La superficie de respuesta obtenida permitió evaluar el comportamiento de *L. innocua* extendiéndolo a la zona de 1100 ppm de vainillina. Al igual que en el modelo correspondiente al rango de concentraciones de 500 a 900 ppm de vainillina, se observó un mayor valor de *NRL* conforme aumentó la temperatura de tratamiento y la concentración de vainillina.

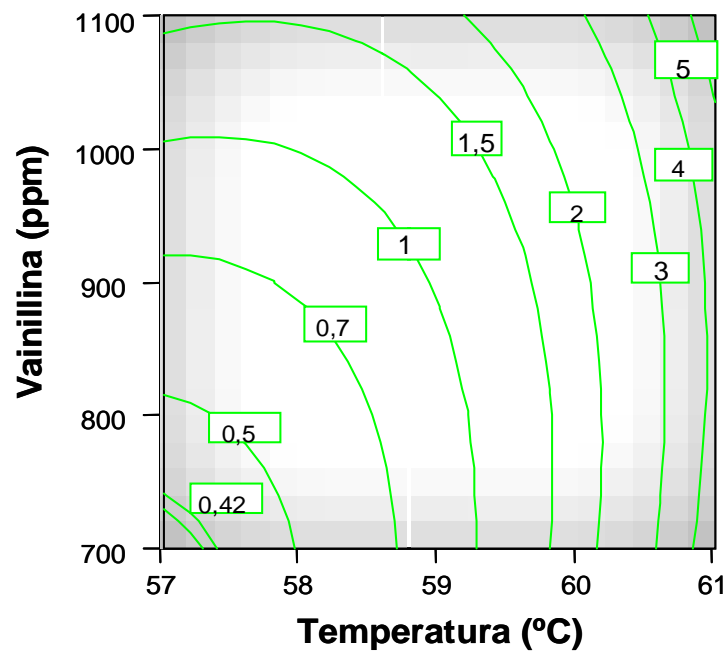
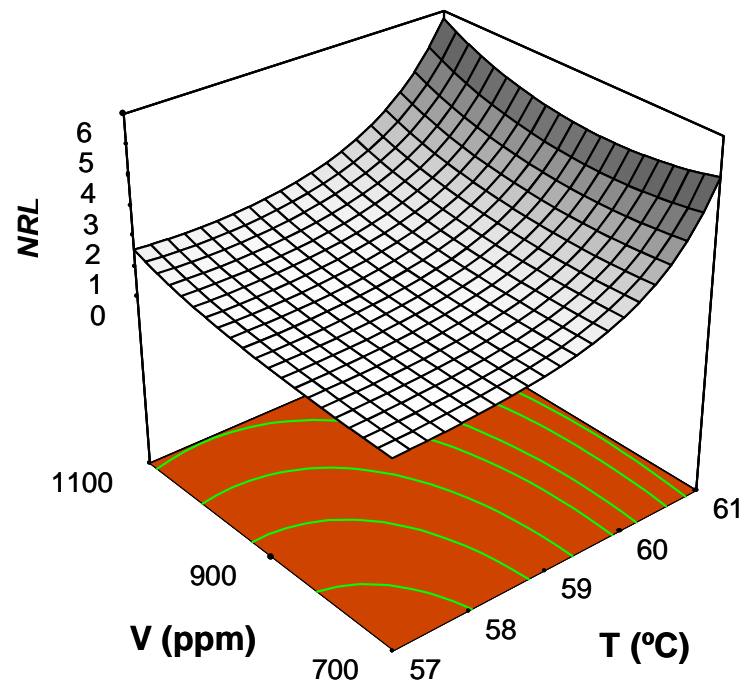
La presencia de una curvatura marcada sobre el eje de la variable temperatura (T), refleja la significación del término cuadrático en la ecuación. De igual forma que en el modelo propuesto para el rango bajo de concentraciones de vainillina, se manifiesta una variación importante en la respuesta con pequeños incrementos de temperatura, indicando una gran dependencia de la respuesta con dicha variable.

En este caso, la inclinación de la superficie sobre el eje de la variable V es más pronunciada que en modelo antes descrito. Es decir, hay mayor cambio de la respuesta (*NRL*) conforme aumenta la concentración de vainillina. Por lo tanto, este factor reviste más importancia, hecho que se verificó por la mayor significación de la variable  $x_2$  ( $\alpha < 0,0001$ ), con un mayor valor del F parcial en el análisis de ANOVA (**Tabla 4.2.4**) y por la presencia de los términos  $x_2^2$  y  $x_1 \cdot x_2$ . Este resultado determina que, al estar en presencia de mayores concentraciones de vainillina en el jugo, su influencia en la reducción de la población de *L. innocua* resulte más notoria. Este efecto puede ser visualizado con mayor claridad en el gráfico de contorno (**Figura**

**Figura 4.2.6**

Superficie de respuesta (a) y gráfico de contorno (b) para la variación del número de reducciones logarítmicas (*NRL*) de *L. innocua* en jugo de naranja en función de la concentración de vainillina (700 – 1100 ppm) y la temperatura de tratamiento térmico (57 – 61 °C) en el equipo de flujo continuo

a)





**4.2.6.b)**, especialmente en la zona de bajas temperaturas, donde el efecto térmico fue menos importante.

Los gráficos de contorno permitieron hacer un estudio más exhaustivo del cambio en la respuesta (*NRL*) que produce la combinación de las variables independientes dentro del rango estudiado. Así, por ejemplo, un jugo de naranja con el agregado de 900 ppm de vainillina y tratado térmicamente a 59°C durante 14 segundos en el equipo UHT/HTST de estudio, predice una reducción de aproximadamente 1 ciclo logarítmico en la población de *L. innocua*; sin embargo, si el mismo jugo fuese tratado a 61°C, el valor de *NRL* predicho aumentaría aproximadamente 5 ciclos logarítmicos.

#### **4.2.3- Validación externa de los modelos propuestos**

Se realizó la validación externa de los modelos propuestos para los rangos de concentraciones de vainillina de 500 a 900 ppm y de 700 a 1100 ppm. Para tal fin se realizó una nueva experiencia que involucró una combinación de variables comprendida dentro de los rangos descriptos por los modelos, pero no evaluada al proponer los mismos. La combinación de variables seleccionada fue la siguiente:  $V = 700$  ppm;  $T = 60^{\circ}\text{C}$ .

La **Tabla 4.2.5** presenta los valores de *NRL* de la población de *L. innocua* predichos por ambos modelos junto a los valores medidos, evaluados en la región que describe las condiciones comunes a ambos modelos ( $V = 700$  y  $900$  ppm;  $T = 57$  y  $59^{\circ}\text{C}$ ). En la misma se observa una buena correlación entre los valores predichos y observados para ambos modelos.

Se verificó también una buena correlación entre los valores predichos por ambos modelos para el sistema de validación externa (700 ppm de vainillina/  $60^{\circ}\text{C}$ ).

Por las razones de bioseguridad comentadas en el **apartado 3.9.2 de Materiales y Métodos**, no se validó el estudio utilizando *L. monocytogenes*. Piyasena y col., (1998) realizaron dicha validación pasteurizando leche bovina inoculada con *L. innocua* y *L. monocytogenes*, utilizando un equipo HTST escala

piloto con tiempos de retención entre 3 y 60 segundos, a temperaturas de tratamiento térmico entre 60,5 y 69,5°C. Estos estudios confirmaron que *L. innocua* puede ser utilizada como microorganismo modelo para estimar la inactivación térmica de *L. monocytogenes* cuando se utilizan equipos de flujo continuo HTST, por tener una termoresistencia igual o mayor que la de la especie patógena, proporcionando un cierto margen de seguridad.

Mak y col. (2001) propusieron un tratamiento térmico de jugo de manzana (pH 3,3-4,1 y 11-14 °Brix) sin aditivos a 68°C por 14 segundos, para lograr una reducción de *L. monocytogenes* de al menos 5 ciclos logarítmicos. En el presente trabajo se comprobó que es posible disminuir la termoresistencia de *L. innocua* con la adición de vainillina, lo que permitió utilizar menores temperaturas de tratamiento térmico para lograr un grado de inactivación similar. En este caso, la adición de 1100 ppm de vainillina al jugo de naranja y el posterior tratamiento térmico a 61°C por 14 segundos fue suficiente para superar dicha reducción ( $NRL = 5,5$ ).

**Tabla 4.2.5**

Valores predichos y observados de la respuesta (*NRL*) de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con vainillina y tratado térmicamente en un equipo de flujo continuo UHT/HTST.

TEMPERATURA (°C)	VAINILLINA (PPM)	VALOR PREDICHO		VALOR OBSERVADO
		M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	
57	700	0,42	0,39	0,40
59		0,90	0,84	0,88
61		4,10	4,73	4,40
57	900	0,50	0,65	0,60
59		1,08	1,04	0,90
61		4,97	4,29	4,80
<b>VALIDACIÓN EXTERNA</b>				
60	700	1,86	1,73	1,92

M<sub>1</sub>: Modelo propuesto para el rango de concentraciones de vainillina de 500-900 ppm

M<sub>2</sub>: Modelo propuesto para el rango de concentraciones de vainillina de 700-1100 ppm

Dado que el equipo de flujo continuo UHT/HTST experimentaba pequeñas fluctuaciones de temperatura durante el procesamiento del jugo de naranja, no era posible realizar un estudio preciso de la cinética de inactivación microbiana y conocer la influencia de los factores de estrés involucrados (temperatura de tratamiento térmico y concentración de antimicrobianos naturales). Por tal motivo, se decidió evaluar dicha cinética en un equipo discontinuo, de menores dimensiones, el cual permitió el control adecuado de las variables de proceso involucradas.

## 4.3- Procesamiento del jugo de naranja en un sistema batch

### 4.3.1 Utilización de vainillina

#### 4.3.1.1 Curvas de inactivación

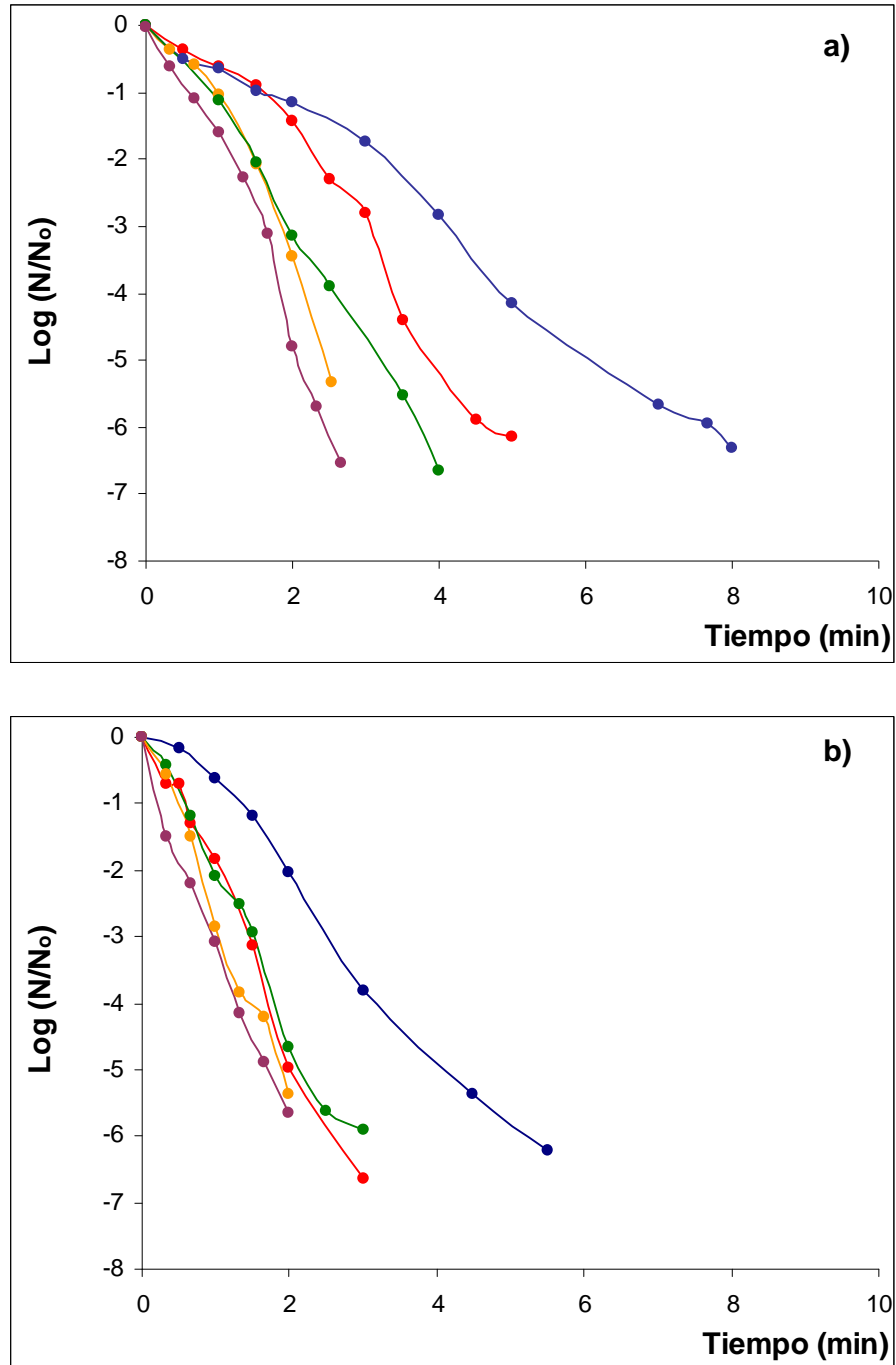
La **Figura 4.3.1** presenta los resultados obtenidos a partir del estudio de la respuesta de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con diferentes concentraciones de vainillina (0, 500, 700, 900 y 1100 ppm) y tratado térmicamente a 57, 59, 60 y 61°C en un sistema discontinuo (batch), tal como se describe en el **apartado 3.10 de Materiales y Métodos**. Las curvas de inactivación presentaron en su mayoría forma sigmoidea, la cual fue perdiendo la región de hombro y suavizando su inflexión, a medida que se alcanzaron las combinaciones más severas de los factores de estrés utilizados: concentración de vainillina y temperatura de tratamiento térmico.

La adición de concentraciones crecientes de vainillina al jugo de naranja produjo, a una dada temperatura de tratamiento térmico, una marcada disminución en los tiempos necesarios para la inactivación de *L. innocua*. Dicho efecto fue especialmente notorio a 57 °C, donde el agregado de 500 ppm de vainillina disminuyó el tiempo necesario para lograr la reducción requerida por la FDA (5 ciclos logarítmicos) (ver **Introducción, apartado 1.9.3**) de 6,2 minutos (en ausencia de vainillina) a 4 minutos; mientras que la incorporación de 1100 ppm de vainillina aceleró aún más el proceso de inactivación, requiriéndose sólo un tratamiento de 2 minutos para alcanzar 5 reducciones logarítmicas (**Figura 4.3.1.a**). Es de destacar que otros integrantes del grupo de trabajo determinaron que 1500 ppm de vainillina en jugo de manzana (pH 3,8) a 30°C produjo escasa inactivación de *L. innocua* (menos de 0,4 reducciones logarítmicas) en 120 minutos de tiempo de contacto (Corte y col., 2005).

El incremento de la temperatura de tratamiento térmico en ausencia de vainillina redujo sustancialmente los tiempos de inactivación de *L. innocua*, siendo las diferencias más marcadas en el rango de menores temperaturas. De esta manera, para alcanzar 5 ciclos Log de reducción microbiana fueron necesarios: 6,2 minutos a 57 °C; 4,1 minutos a 59 °C; y  $\cong$  1,7 minutos para los tratamientos a 60 y

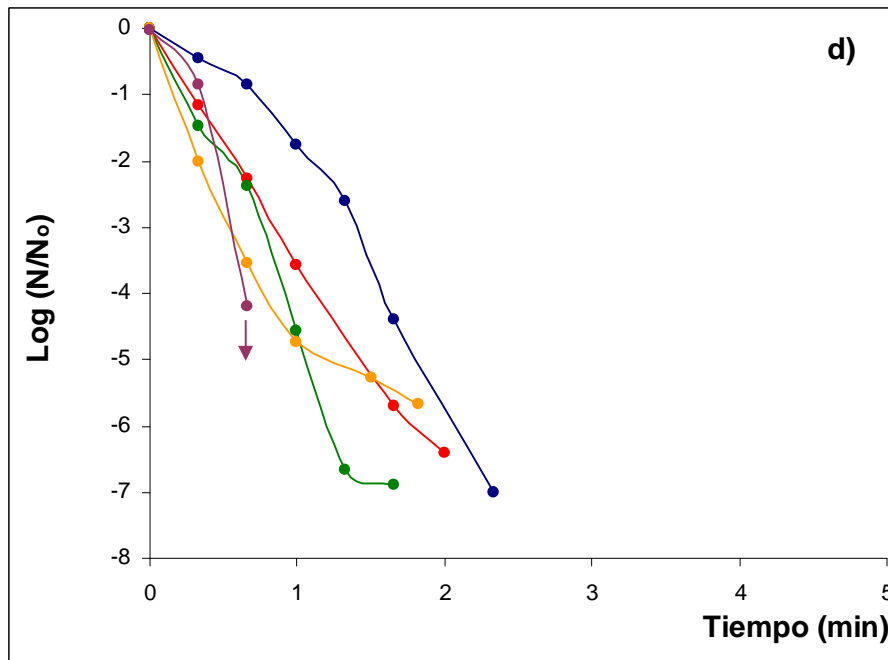
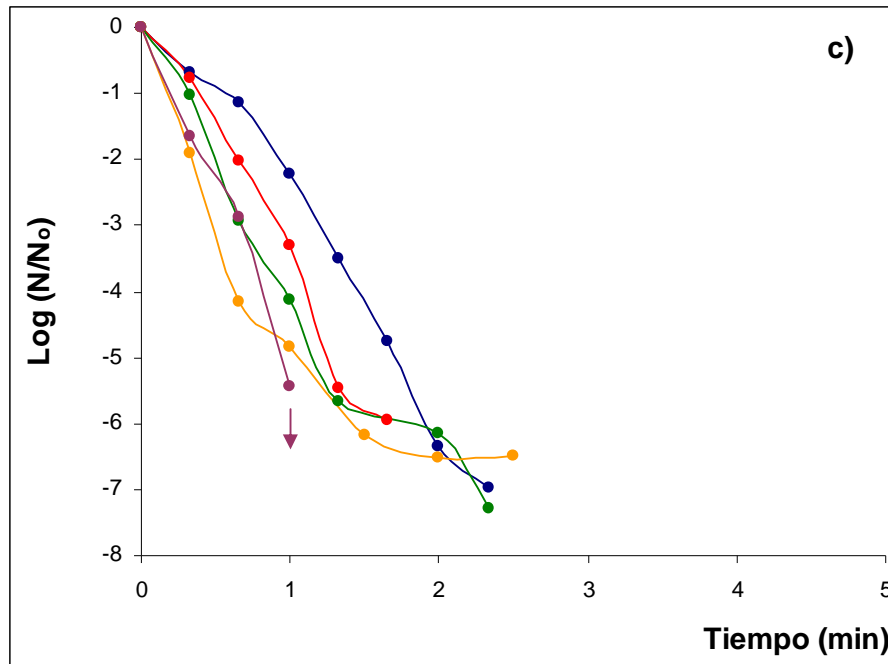
**Figura 4.3.1**

Curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con distintas concentraciones de vainillina (● control; ● 500 ppm; ● 700 ppm; ● 900 ppm y ● 1100 ppm) y sometido a tratamiento térmico. a) 57 °C; b) 59 °C.



**Figura 4.3.1 (continuación)**

Curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con distintas concentraciones de vainillina (● control; ● 500 ppm; ● 700 ppm; ● 900 ppm y ● 1100 ppm) y sometido a tratamiento térmico. c) 60 °C; d) 61 °C; ↓ recuento menor a 3 UFC/ml.



61 °C, evidenciándose a estas últimas temperaturas un marcado aumento de la sensibilidad del microorganismo al tratamiento aplicado (**Figura 4.3.1**).

La combinación de los factores de estrés, adición de vainillina y tratamiento térmico, aceleró la cinética de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja, reduciendo los tiempos requeridos para la destrucción del microorganismo en todas las combinaciones evaluadas. Cuando se trabajó a temperaturas moderadas de tratamiento térmico, este efecto dependió considerablemente de la cantidad de vainillina añadida. Sin embargo, a las mayores temperaturas de tratamiento evaluadas (60 y 61°C), la concentración de vainillina tuvo menor relevancia, evidenciando una influencia marcada del tratamiento térmico en la inactivación observada.

Esta dependencia de la concentración de vainillina a las menores temperaturas de tratamiento evaluadas se verificó también en estudios realizados por Ferrante (2004). Dicho trabajo reportó que el tiempo necesario para lograr reducir 2 ciclos logarítmicos la población de *L. monocytogenes* en jugo de naranja adicionado con 500, 1000, 1500 y 2000 ppm de vainillina a 45°C fue de  $\cong$  50, 25, 18 y 10 minutos respectivamente, demostrando una amplia variación en el tiempo de tratamiento para lograr la misma inactivación, con diferentes concentraciones de vainillina.

#### **4.3.1.2 Modelado matemático**

##### **4.3.1.2.a- Aplicación del modelo de Gompertz modificado**

Dado que la mayoría de las curvas de inactivación presentaron desviaciones significativas de la linealidad, se consideró apropiado aplicar regresión no lineal, teniendo en cuenta todas las partes de la curva de inactivación (Linton y col., 1995a). Para ello, se aplicó el modelo de Gompertz modificado a las curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja, obteniendo los parámetros característicos del mismo, según la metodología descrita en **Materiales y Métodos, apartado 3.10.7.1**.

La **Figura 4.3.2** presenta las curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja predichas por el modelo, junto a los respectivos datos experimentales.



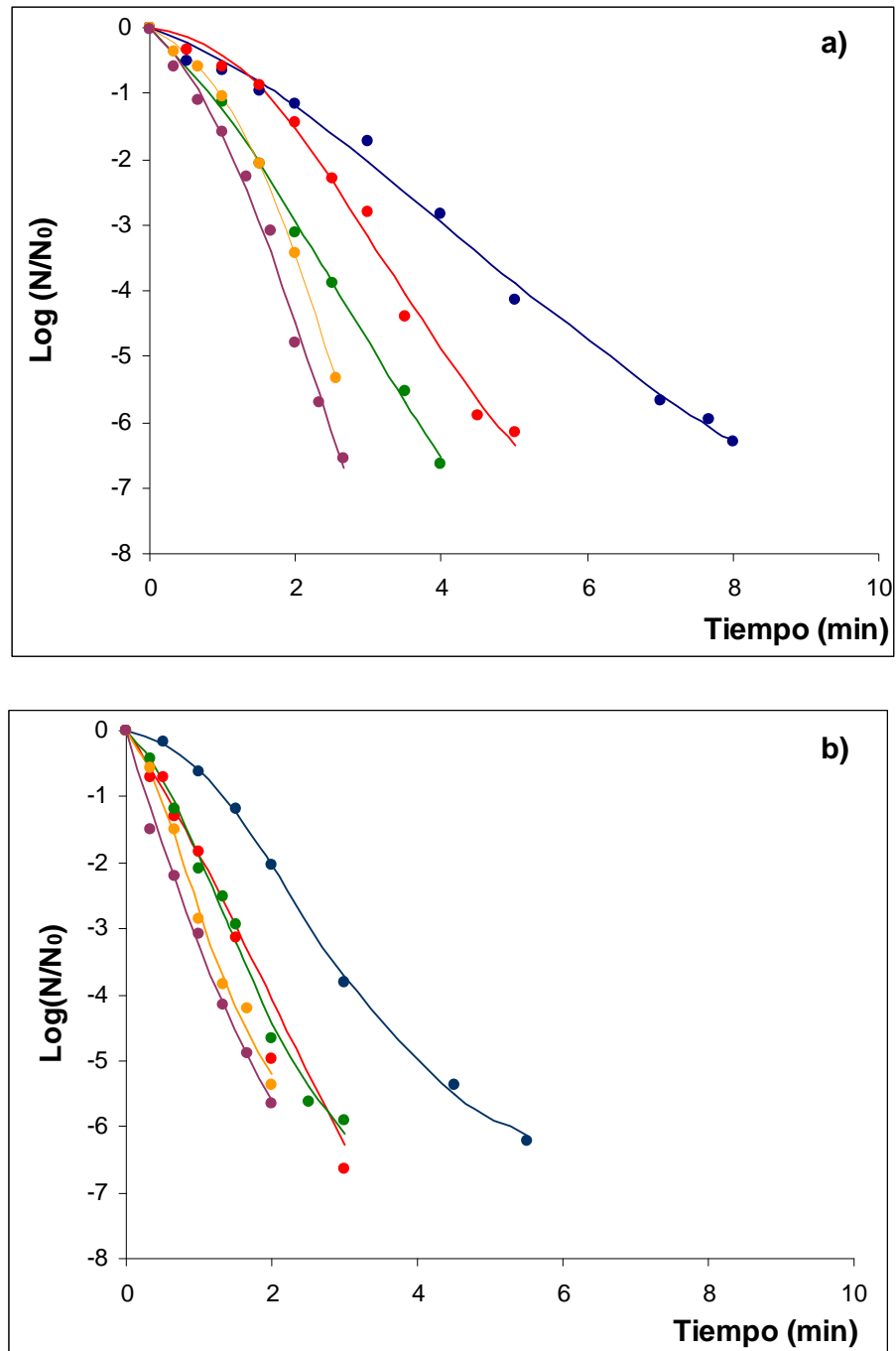
La **Tabla 4.3.1** exhibe los parámetros estimados que representan las diferentes regiones de la curva de supervivencia: el hombro inicial (*A*), la máxima velocidad de muerte (*B*) y el cambio global en el número de sobrevivientes (*C*), junto a los estadísticos de ajuste del modelo.

El ajuste del modelo resultó altamente satisfactorio, obteniéndose valores de  $R^2$  ajustado por grados de libertad entre 98,3 y 99,9%. Los valores de *F* altamente significativos ( $\alpha < 0,0001$ ), demostraron que el modelo fue apropiado para describir el comportamiento observado. Los sistemas preparados con jugo de naranja conteniendo 1100 ppm de vainillina y tratados a 60 y 61°C presentaron una reducción de 5 ciclos logarítmicos en la población de *L. innocua* en menos de 1 minuto de tratamiento (**Figura 4.3.1.c** y **4.3.1.d**), hecho que imposibilitó la correcta aplicación del modelo propuesto, por disponer de escasa cantidad de puntos experimentales.

Las curvas de inactivación predichas por el modelo de Gompertz modificado difirieron marcadamente según la temperatura de tratamiento térmico y el nivel de vainillina presente en el jugo, hecho que pudo ser cuantificado a través de los parámetros característicos del mismo. En ausencia ó bajas concentraciones de vainillina, las curvas presentaron una región del hombro muy marcada, necesitándose mayor tiempo de tratamiento térmico para comenzar la inactivación del microorganismo. Este efecto fue más notorio a bajas temperaturas y, en general, estuvo correlacionado con valores de *A* más elevados. Concentraciones crecientes de vainillina en combinación con mayores temperaturas de tratamiento térmico, en general, produjo curvas más lineales con escasa ó nula zona de hombro (con la consiguiente disminución de *A*) y mayor pendiente, hecho que incrementó la máxima velocidad de muerte caracterizada por el parámetro *B*. En la **Tabla 4.3.1** se verifica dicho comportamiento en todos los sistemas con el incremento del valor negativo de *B*, excepto en el sistema con 1100 ppm de vainillina y tratado térmicamente a 59°C y el sistema preparado con 900 ppm de vainillina y tratado a 60°C, donde por la severidad de los tratamientos se contó con menor cantidad de datos experimentales disminuyendo el poder de predicción del modelo. El parámetro *C* en todos los casos superó las 6 reducciones decimales, indicando que todos los tratamientos fueron efectivos, destruyendo la mayor parte de la población microbiana. Dado que la mayoría de las curvas no presentaron cola este modelo estimó, en algunos casos,

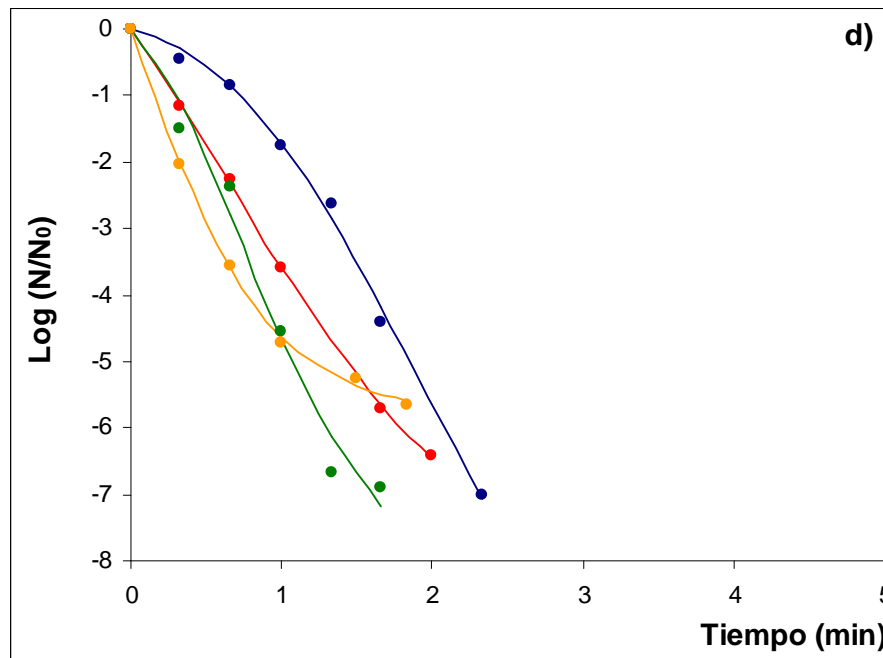
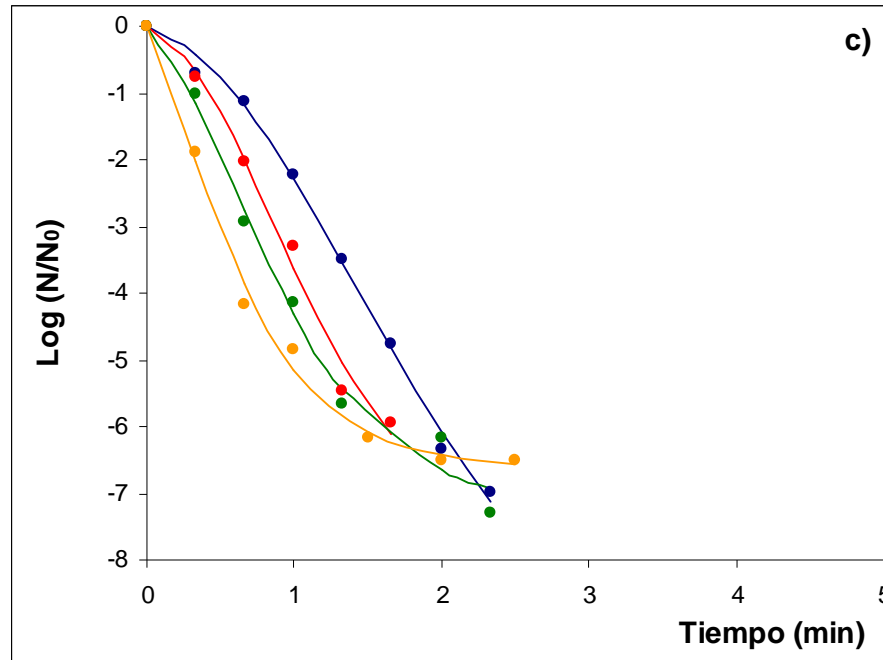
**Figura 4.3.2**

Ajuste del modelo de Gompertz modificado a las curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con vainillina (● 0 ppm; ● 500 ppm; ● 700 ppm; ● 900 ppm y ● 1100 ppm) y sometido a tratamiento térmico. a) 57 °C; b) 59°C. (—) valores predichos; (●) datos experimentales



**Figura 4.3.2 (continuación)**

Ajuste del modelo de Gompertz modificado a las curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con vainillina (● 0 ppm; ● 500 ppm; ● 700 ppm; ● 900 ppm) y sometido a tratamiento térmico. c) 60 °C; d) 61°C. (—) valores predichos; (●) datos experimentales



**Tabla 4.3.1**

Parámetros del modelo de Gompertz modificado y estadísticos relacionados correspondientes al comportamiento de *L. innocua* en jugo de naranja con adición de vainillina y sometido a tratamiento térmico en un sistema batch.

TEMPERATURA (°C)	VAINILLINA (ppm)	PARÁMETROS			R <sup>2</sup> <sub>ajustado</sub>	F <sup>a</sup>
		A	B	C		
57	0	1,06	-0,25	-10,1	99,3	1163****
	500	1,60	-0,51	-9,4	98,8	587****
	700	1,41	-0,77	-7,9	99,8	1573****
	900	1,49	-0,88	-7,0	99,9	2899****
	1100	1,46	-0,88	-8,7	99,1	673****
59	0	1,62	-0,73	-6,8	99,7	2357****
	500	0,94	-0,79	-8,1	98,4	1116****
	700	1,16	-0,93	-7,8	98,8	633****
	900	1,13	-1,33	-6,9	98,8	496****
	1100	0,23	-0,77	-13,8	98,9	773****
60	0	0,98	-0,69	-12,8	99,5	1229****
	500	0,60	-0,85	-11,8	98,9	248****
	700	0,99	-1,72	-7,8	98,3	391****
	900	0,26	-0,79	-13,1	99,2	1072****
	1100 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-
61	0	1,51	-0,79	-14,9	99,5	837****
	500	0,62	-0,98	-10,5	99,9	7490****
	700	-0,28	-0,85	-13,6	99,7	165****
	900	-0,58	-1,39	-15,6	99,1	1267****
	1100 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Significativo a un nivel de: \*\*\*\*0,01%

A: hombro inicial

B: máxima velocidad de muerte

C: cambio global en el número de sobrevivientes

<sup>b</sup> sistema no modelado

valores de cambio global en el número de sobrevivientes muy elevados en comparación con los valores observados.

Para las condiciones de tratamiento menos severas evaluadas en este trabajo, cuyas curvas de inactivación estuvieron más alejadas de la linealidad, la aplicación del modelo de Gompertz modificado sería más apropiada que el modelo lineal tradicionalmente usado para evaluar procesos térmicos. La estimación de la resistencia del microorganismo utilizando el modelo cinético de primer orden subestima dichos valores por no considerar las regiones del hombro y cola de la curva de supervivencia, y sería más adecuado para procesos realizados a altas temperaturas, donde se obtienen curvas de supervivencia más cercanas a la linealidad.

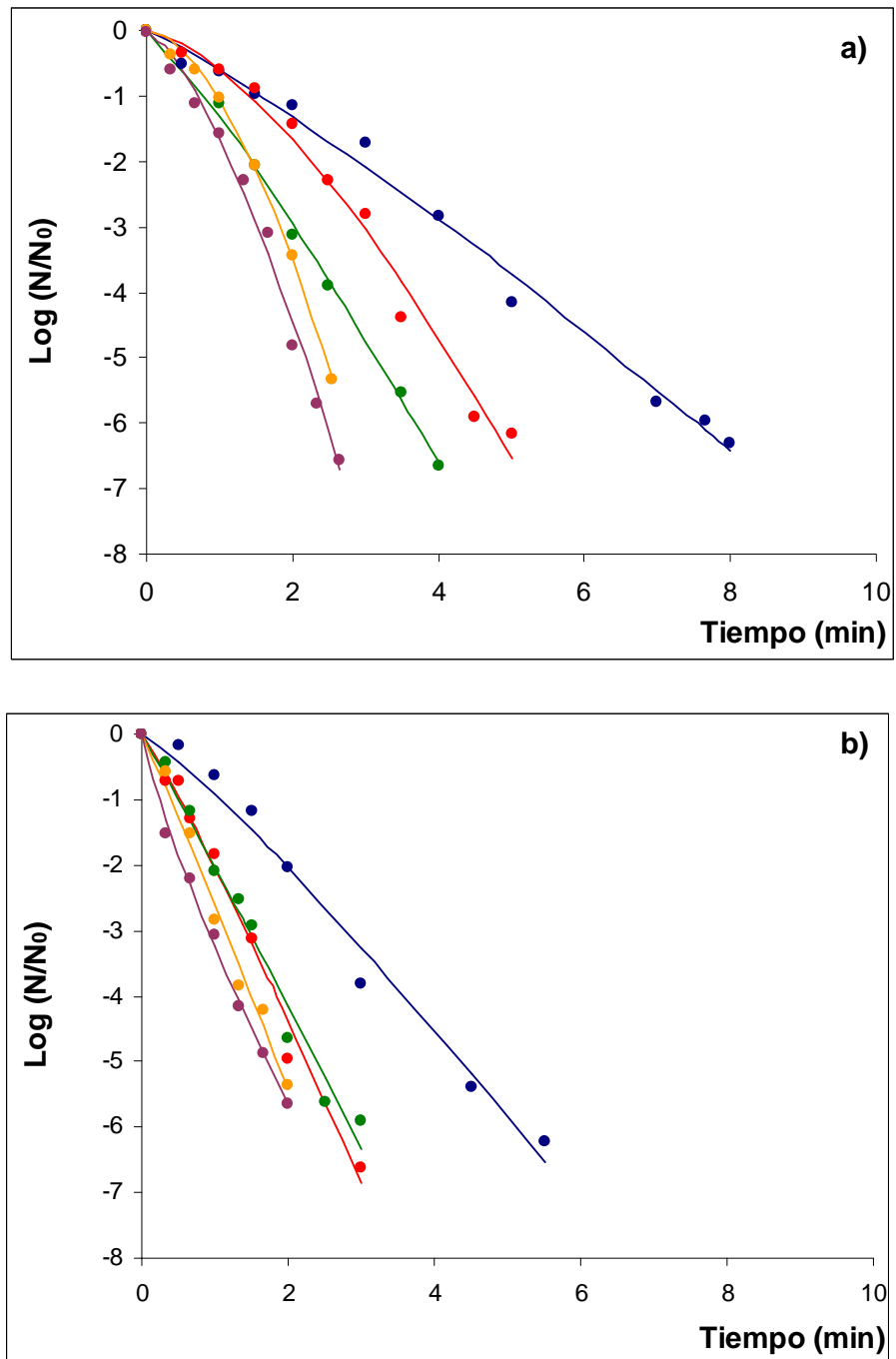
Linton y col. (1995b) evaluaron la resistencia térmica de *L. monocytogenes* en fórmulas infantiles a temperaturas de 50, 55 y 60 °C, valores de pH 5,0; 6,0 y 7,0 y concentraciones de NaCl de 0,2 y 4%. Estos autores reportaron que el modelo de Gompertz modificado resultó muy versátil, describiendo con elevados coeficientes de correlación los diferentes tipos de curvas de inactivación obtenidos (curvas lineales; curvas con marcada región Lag inicial, seguida de otra zona lineal; y curvas sigmoideas).

#### **4.3.1.2.b- Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull**

Con el objeto de explicar con mayor claridad las diferencias observadas entre los distintos tratamientos, se aplicó el modelo de distribución de frecuencias tipo Weibull. La importancia de la aplicación de este modelo radica en el estudio de las distribuciones de frecuencias de resistencias, que se producen debido a que la totalidad de la población microbiana no tiene exactamente el mismo nivel de resistencia al tratamiento aplicado, y por lo tanto, no se destruye al mismo tiempo durante el procesamiento. La **Figura 4.3.3** muestra las curvas predichas por el modelo de Weibull, junto a los datos experimentales de las curvas de inactivación. La **Tabla 4.3.2** muestra los parámetros  $b$  y  $n$  característicos del mismo.

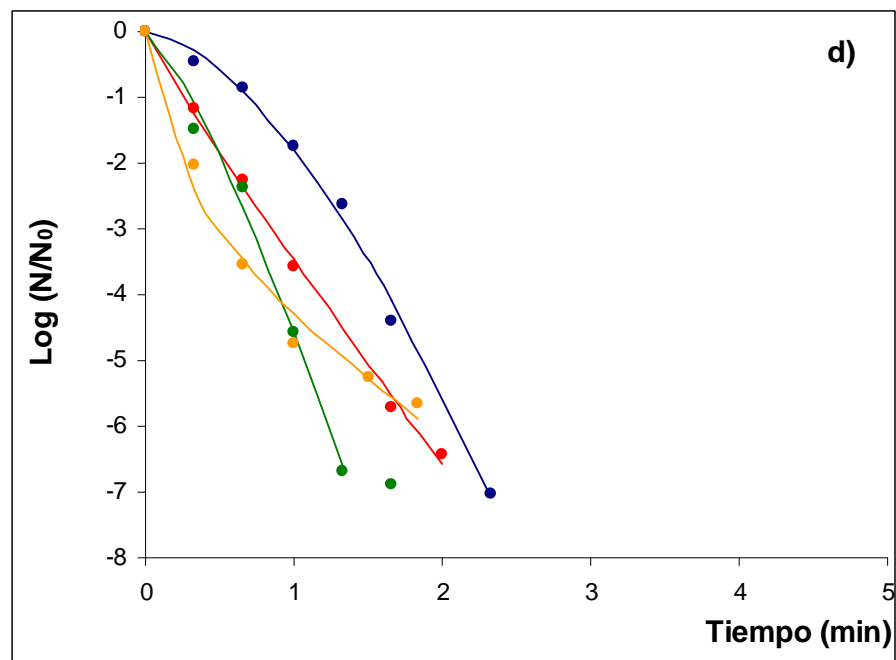
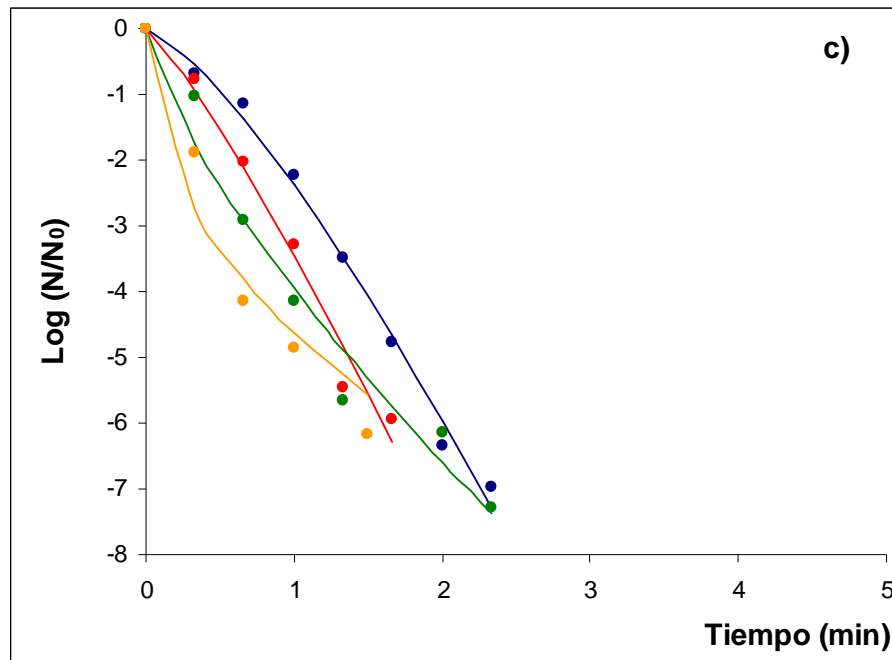
**Figura 4.3.3**

Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull a las curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con vainillina (● 0 ppm; ● 500 ppm; ● 700 ppm; ● 900 ppm y ● 1100 ppm) y sometido a tratamiento térmico. a) 57°C; b) 59°C. (—) valores predichos; (●) datos experimentales.



**Figura 4.3.3 (continuación)**

Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull a las curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con vainillina (● 0 ppm; ● 500 ppm; ● 700 ppm y ● 900 ppm) y sometido a tratamiento térmico. c) 60°C; d) 61°C. (—) valores predichos; (●) datos experimentales.



**Tabla 4.3.2**

Parámetros característicos del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull, correspondientes al comportamiento de *L. innocua* en jugo de naranja con adición de vainillina y sometido a tratamiento térmico

TEMPERATURA (°C)	VAINILLINA (ppm)	<i>b</i>	<i>n</i>	R <sup>2</sup> ajustado	F <sup>a</sup>
57	0	0,59	1,15	99,1	1411****
	500	0,59	1,49	98,3	597****
	700	1,31	1,17	99,7	2755****
	900	1,06	1,72	99,7	1891****
	1100	1,66	1,43	98,9	979****
59	0	0,72	1,46	99,5	1286****
	500	2,06	1,10	98,5	503****
	700	2,02	1,04	97,9	537****
	900	2,61	1,05	98,4	576****
	1100	3,23	0,81	99,6	2777****
60	0	2,38	1,32	99,1	1094****
	500	3,45	1,18	97,6	281****
	700	3,95	0,74	97,6	275****
	900	4,83	0,66	97,6	284***
	1100 <sup>b</sup>	-	-	-	-
61	0	1,80	1,62	99,4	1077****
	500	3,47	0,92	99,7	2284****
	700	4,58	1,29	98,8	445***
	900	4,28	0,52	97,9	496****
	1100 <sup>b</sup>	-	-	-	-

<sup>a</sup> Significativo a un nivel de: \*\*\*\*0,01%; \*\*\*0,1%

<sup>b</sup> Sistema no modelado



Tal como ocurriera con el modelo de Gompertz modificado, los sistemas adicionados con 1100 ppm de vainillina y tratados térmicamente a 60 ó 61°C resultaron muy efectivos, inactivando al microorganismo con tanta rapidez que impidieron la toma de suficiente cantidad de puntos experimentales. Por este motivo no fue posible la aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull a dichos sistemas.

El modelo de Weibull ajustó adecuadamente a los datos experimentales, como lo demuestran los elevados valores de  $R^2$  ajustado por grados de libertad obtenidos, indicando que el modelo explica entre el 97,6 y 99,9 % de la variación observada en la respuesta ( $\text{Log } N/N_0$ ) para las condiciones evaluadas. Asimismo, los valores de F para el modelo resultaron altamente significativos ( $\alpha < 0,001$ ).

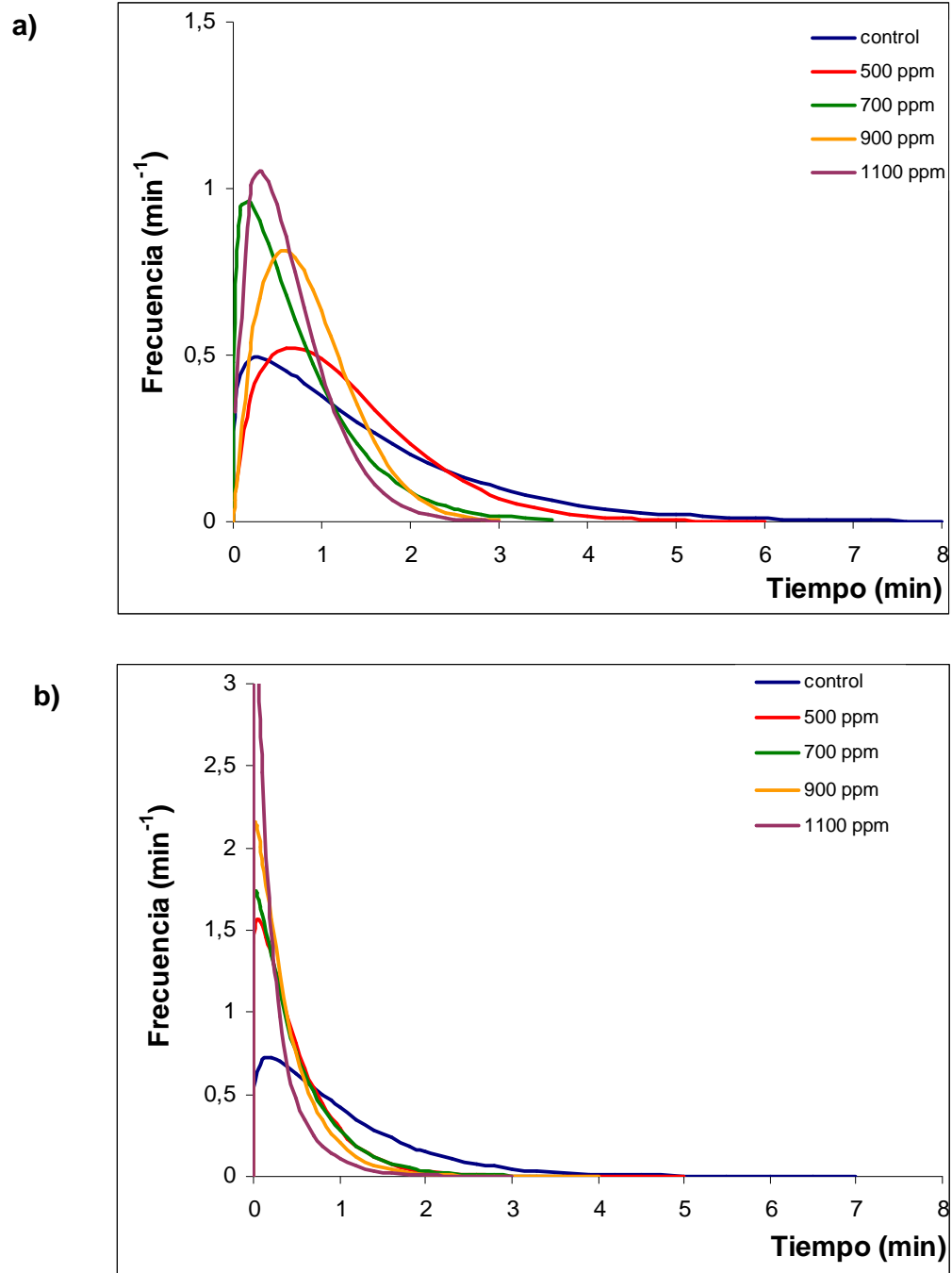
La variación en el perfil de las curvas, se reflejó en el valor asumido por el parámetro  $n$  del modelo (**Tabla 4.3.2, Figura 4.3.3**). Las curvas correspondientes a sistemas sometidos a condiciones de estrés menos estrictas presentaron, en general, valores de  $n$  mayores a 1 con notable concavidad hacia abajo. Los sistemas con valores de  $n$  cercanos a 1 exhibieron comportamiento lineal, mientras que los sistemas con condiciones de estrés más severas presentaron valores de  $n$  menores a 1, concavidad hacia arriba y mayores valores de  $b$  (Peleg y Cole, 1998).

A las mayores temperaturas evaluadas (60 y 61°C), la presencia de 900 ppm de vainillina provocó un cambio en la concavidad de la curva predicha, además de reducir el tiempo de tratamiento necesario para la inactivación de *L. innocua* a todas las temperaturas, Este sistema predijo una disminución abrupta de la población microbiana, alcanzando una reducción de 5 ciclos logarítmicos en aproximadamente 1 minuto de tratamiento (**Figura 4.3.3 c y d**). Guerrero y col., (2004) observaron un comportamiento similar de cambio en el perfil de la curva de supervivencia de *S. cerevisiae* en un medio de laboratorio por la acción de ultrasonido de alta intensidad (93  $\mu\text{m}$ , 20 kHz), cuando se adicionó 1000 ppm de quitosano.

Los valores de los parámetros  $b$  y  $n$  fueron utilizados para obtener las distribuciones de frecuencias de resistencias de *L. innocua* (**Figuras 4.3.4**), calculando los estadísticos asociados a cada distribución (**Tabla 4.3.3**), tal como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.10.7.2**.

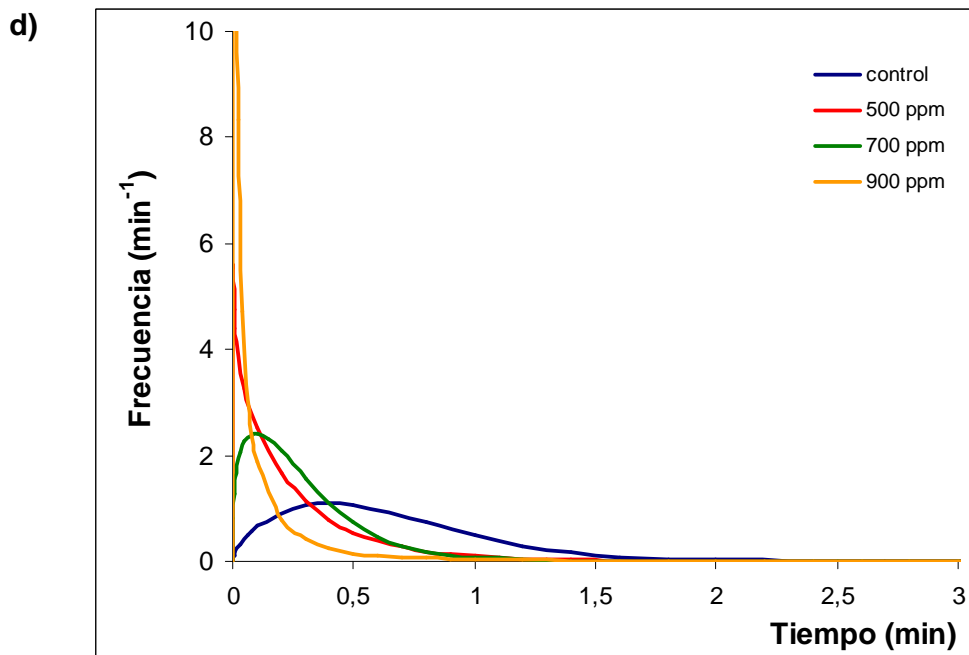
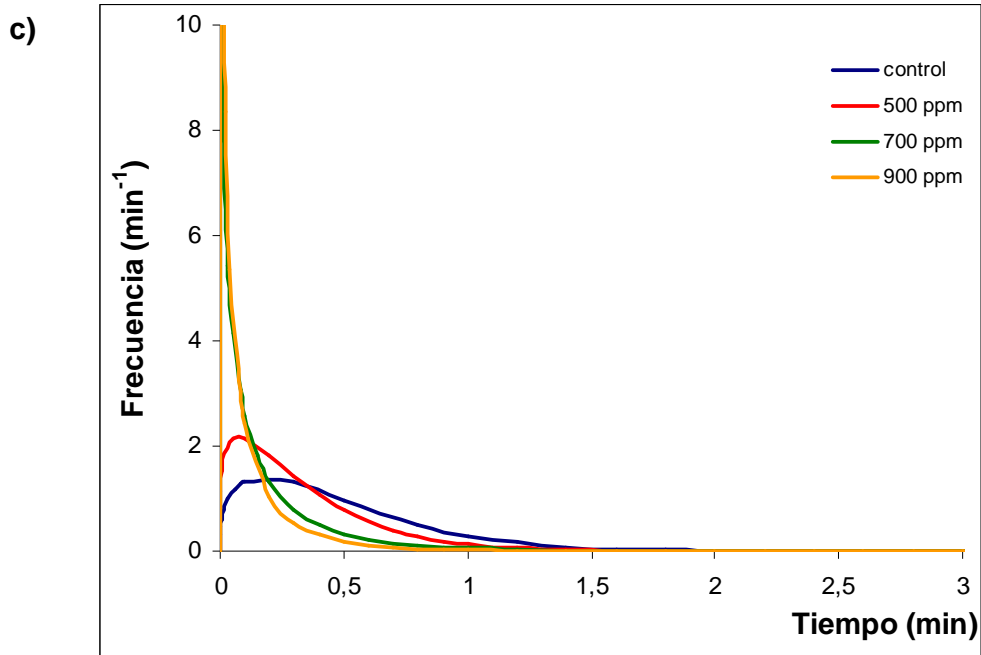
**Figura 4.3.4**

Distribuciones de frecuencias de resistencias calculadas según el modelo de Weibull para la inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con vainillina y sometido a tratamiento térmico. a) 57°C; b) 59°C.



**Figura 4.3.4**

Distribuciones de frecuencias de resistencias calculadas según el modelo de Weibull para la inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con vainillina y sometido a tratamiento térmico. b) 60°C; c) 61°C.



**Tabla 4.3.3**

Análisis estadístico de las curvas de distribución de frecuencias de resistencias para la inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja con adición de vainillina y sometido a tratamiento térmico

TEMPERATURA (°C)	VANILLINA (ppm)	MODA (min)	MEDIA (min)	COEFICIENTE DE SESGO (-)	VARIANZA (min <sup>2</sup> )
57	0	0,26	1,51	1,87	1,74
	500	0,68	1,28	1,54	0,77
	700	0,15	0,75	1,84	0,42
	900	0,58	0,86	1,43	0,27
	1100	0,30	0,64	1,59	0,21
59	0	0,57	1,13	1,56	0,62
	500	0,06	0,50	1,94	0,21
	700	0,02	0,50	2,04	0,23
	900	0,02	0,39	2,02	0,14
	1100	-	0,26	2,70	0,11
60	0	0,18	0,48	1,67	0,13
	500	0,07	0,33	1,82	0,08
	700	0,04	0,19	3,05	0,07
	900	-	0,12	3,62	0,04
	1100 <sup>a</sup>	-	-	-	-
61	0	0,39	0,62	1,47	0,16
	500	0,02	0,27	2,32	0,09
	700	0,10	0,28	1,71	0,05
	900	-	0,11	5,54	0,06
	1100 <sup>a</sup>	-	-	-	-

<sup>a</sup> Sistema no modelado

A la menor temperatura evaluada (57°C) y en ausencia de vainillina (**Figura 4.3.4.a**) el tratamiento resultó poco efectivo, presentándose una amplia distribución de resistencias de *L. innocua*, hecho que correlacionó con elevados valores de media y varianza (**Tabla 4.3.3**). Este comportamiento indicaría que los miembros de la población se inactivaron a diferentes tiempos de tratamiento, dejando una gran fracción de microorganismos más resistentes, hecho evidenciado por una cola en la distribución (Peleg y Cole, 2000).

Niveles crecientes de la concentración de vainillina en el jugo de naranja, así como también el incremento de la temperatura de tratamiento térmico, produjeron una reducción muy marcada de la dispersión de las frecuencias de resistencias (menor media y varianza), así como también un aumento notorio en los valores de dichas frecuencias (**Figura 4.3.4; Tabla 4.3.3**). Este comportamiento reflejaría que la mayor parte de la población microbiana presentó una resistencia similar a un tiempo de tratamiento dado en las condiciones de estrés más severas. Asimismo puede concluirse que, bajo estas últimas condiciones, las distribuciones de frecuencias estuvieron marcadamente sesgadas hacia la derecha, como lo demuestra el elevado valor del coeficiente de sesgo, hecho que pondría de manifiesto que la mayor parte de la población murió al comienzo del tratamiento, dejando un reducido número de sobrevivientes más resistentes (Peleg y Cole, 2000). Las distribuciones correspondientes al sistema adicionado con 1100 ppm de vainillina tratado a 59°C, y los sistemas adicionados con 900 ppm de vainillina y tratados a 60 y 61°C, presentaron además la particularidad de carecer de moda, lo cual está de acuerdo con el hecho de que la mayor parte de la población fue destruida en un tiempo muy corto (**Figuras 4.3.4.b, c y d**).

Un comportamiento similar fue reportado por Guerrero y col., (2004) para la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae* en un sistema modelo, en presencia de quitosano, por acción del ultrasonido. Estos autores observaron que la presencia de dicho antimicrobiano (1000 ppm), así como también un mayor tiempo de contacto con el mismo previo al tratamiento ultrasónico, produjeron distribuciones más estrechas con valores de frecuencias más elevados y menor media y varianza, dejando también un sesgo marcado hacia la derecha, con una pequeña fracción de la población que se mantuvo viable.

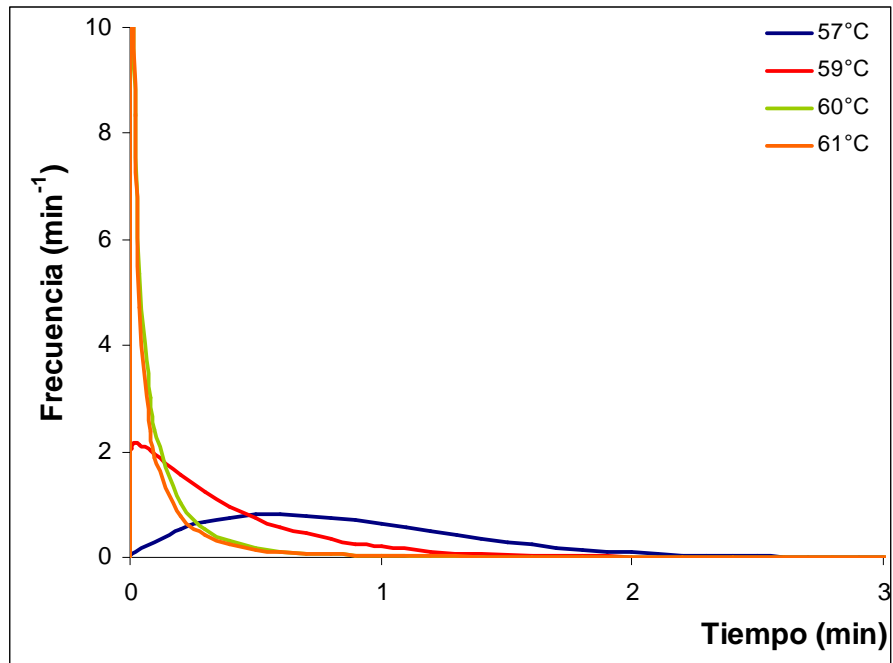
Ferrante (2004), utilizando jugo de naranja observó de manera análoga que, la combinación de la adición de vainillina (500 a 2000 ppm) y tratamiento ultrasónico generó distribuciones de resistencia de *L. monocytogenes* más estrechas, con menor media y varianza, que las correspondientes a los tratamientos individuales.

El efecto de la temperatura de tratamiento térmico se puede observar con mayor claridad graficando las distribuciones de frecuencias de resistencias de *L. innocua* a una determinada concentración de vainillina. A modo de ejemplo, la **Figura 4.3.5** representa las distribuciones de frecuencias obtenidas para los sistemas adicionados con 900 ppm de vainillina tratados a temperaturas entre 57 y 61°C. En la misma se observa que el tratamiento del jugo a 57°C presentó una distribución de resistencias muy amplia, donde la población se inactivó en un amplio rango de tiempos de tratamiento. A medida que la temperatura de tratamiento aumentó, disminuyeron la media en que se inactivó la mayoría de la población y la varianza. Asimismo aumentó el sesgo de la distribución hacia la derecha, lo cual indicaría que gran parte de la población resultó muy sensible a dicha combinación de factores siendo destruida rápidamente, pero dejando un pequeño número de células resistentes.

El modelo de distribución de frecuencias aplicado resultó una alternativa útil al explicar desde otra perspectiva, la influencia de los factores de estrés utilizados sobre la inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja, permitiendo además establecer que algunas condiciones evaluadas son inadecuadas para el tratamiento del jugo, por dejar una población remanente de microorganismos viables.

**Figura 4.3.5**

Distribuciones de frecuencias de resistencias de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con 900 ppm vainillina y sometido a tratamiento térmico.



## 4.3.2 Utilización de citral

### 4.3.2.1 Curvas de Inactivación

La **Figura 4.3.6** muestra los resultados del estudio del comportamiento de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con diferentes concentraciones de citral (0, 25, 50 y 75 ppm) y tratado térmicamente a 57, 59 y 61°C en un sistema batch, tal como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.10**. Las curvas de inactivación presentaron en general, forma sigmoidea, disminuyendo la región de hombro y aumentando la pendiente a medida que se evaluaron combinaciones más severas de los factores de estrés (presencia de citral y mayores temperaturas de tratamiento térmico).

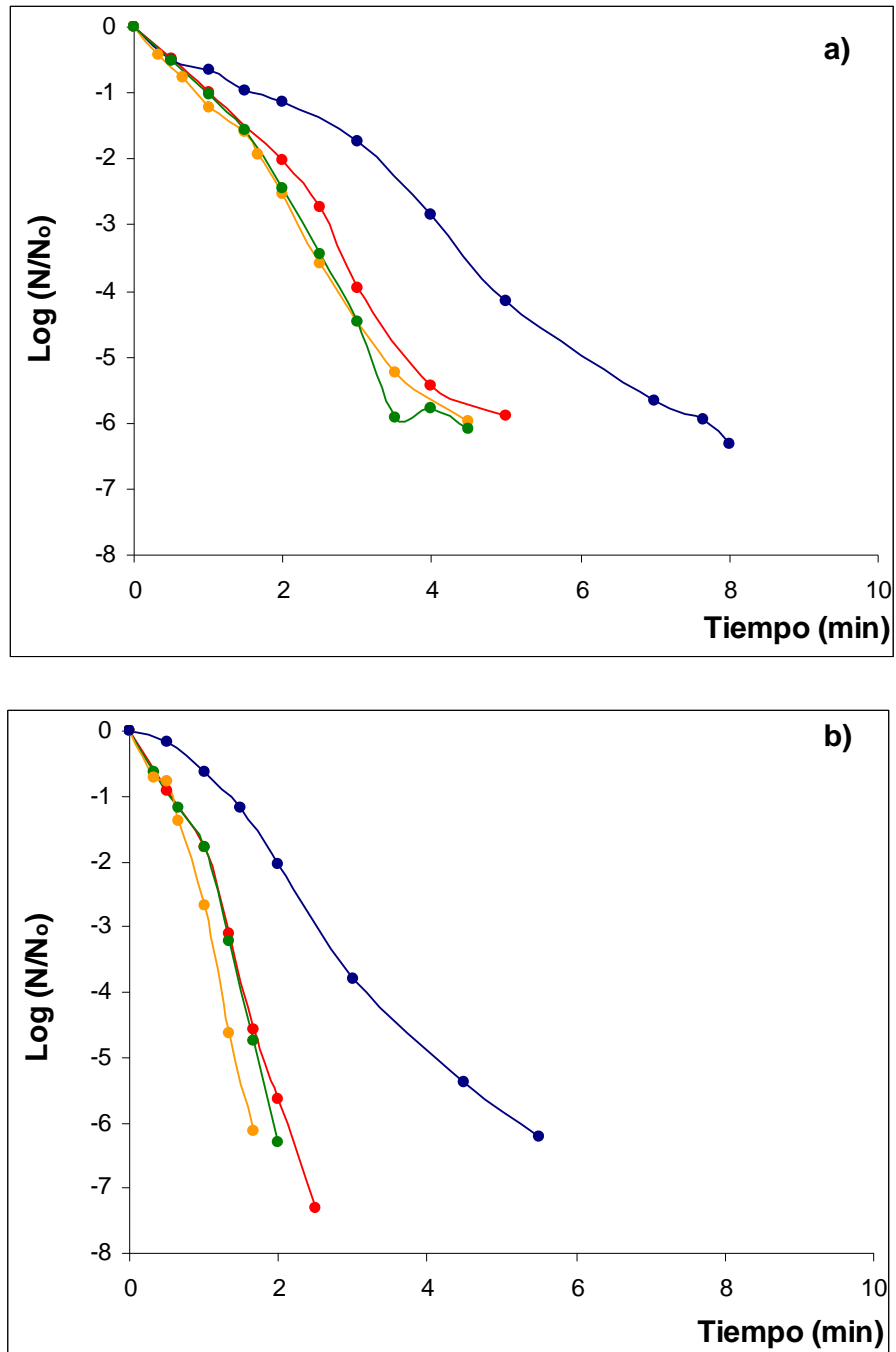
La adición de citral al jugo de naranja produjo, a todas las temperaturas de tratamiento térmico, un marcado incremento en la inactivación de *L. innocua*, tal como lo demuestra la diferencia entre la curva que corresponde al sistema sin adición de citral (control) y las curvas correspondientes a los sistemas adicionados con este antimicrobiano (**Figura 4.3.6**). Cabe destacar que estudios anteriores realizados en este laboratorio por Ferrante (2004) mostraron que el citral agregado en baja proporción (100 ppm) no fue efectivo inactivando *L. innocua* en jugo de naranja a 35°C (menos de 0,3 reducciones logarítmicas en 120 minutos de tiempo de contacto).

La diferencia observada entre la curva de inactivación control y las curvas adicionadas con citral fue menos evidente conforme aumentó la temperatura de tratamiento térmico, posiblemente debido a una mayor influencia de esta última variable en la inactivación microbiana. Tal es así, que la incorporación de 25 ppm de citral al jugo de naranja, a 57°C redujo de 6,2 minutos a 3,8 minutos el tiempo de tratamiento necesario para reducir 5 ciclos logarítmicos la población microbiana, a 59°C acortó dicho tiempo de 3,8 minutos a 2,8 minutos y a 61 °C la reducción del tiempo de tratamiento por adición de citral fue de 2,3 minutos a 1 minuto. Sin embargo, los diferentes niveles de concentraciones de citral provocaron escasa diferencia en la respuesta,  $\text{Log} (N/N_0)$ , a todas las temperaturas de tratamiento térmico evaluadas, especialmente cuando el



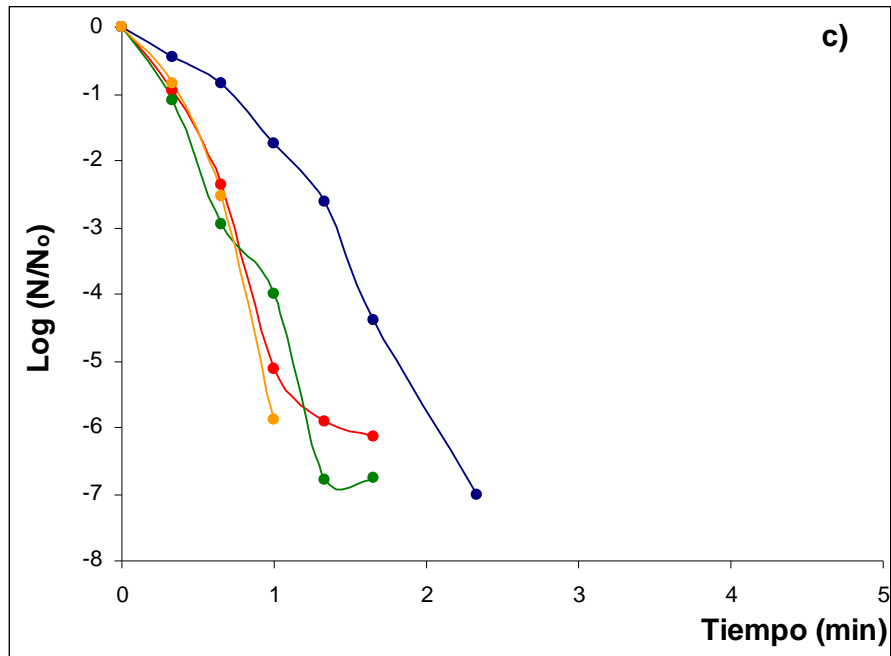
**Figura 4.3.6**

Curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con distintas concentraciones de citral (● control; ● 25 ppm; ● 50 ppm y ● 75 ppm) y sometido a tratamiento térmico: a) 57 °C; b) 59°C.



**Figura 4.3.6 (continuación)**

Curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con distintas concentraciones de citral (● control; ● 25 ppm; ● 50 ppm y ● 75 ppm) y sometido a tratamiento térmico: c) 61°C.



jugo de naranja se trató a 61°C. Cabe destacar que el rango de concentraciones de citral estudiado se seleccionó en base a pruebas sensoriales preliminares, realizadas con jugo de naranja conteniendo 25, 50, 75 y 100 ppm de citral. Las mismas demostraron que el agregado de más de 100 ppm de citral al jugo de naranja son inaceptables sensorialmente.

Ferrante (2004) observó que la adición de pequeñas cantidades de citral (50-100 ppm) a jugo de naranja incrementó notablemente la inactivación de *L. monocytogenes* por acción del ultrasonido, aunque tampoco se manifestaron diferencias significativas en la inactivación entre las distintas concentraciones de citral ensayadas.

#### **4.3.2.2- Modelado matemático**

##### **4.3.2.2.a- Aplicación del modelo de Gompertz modificado**

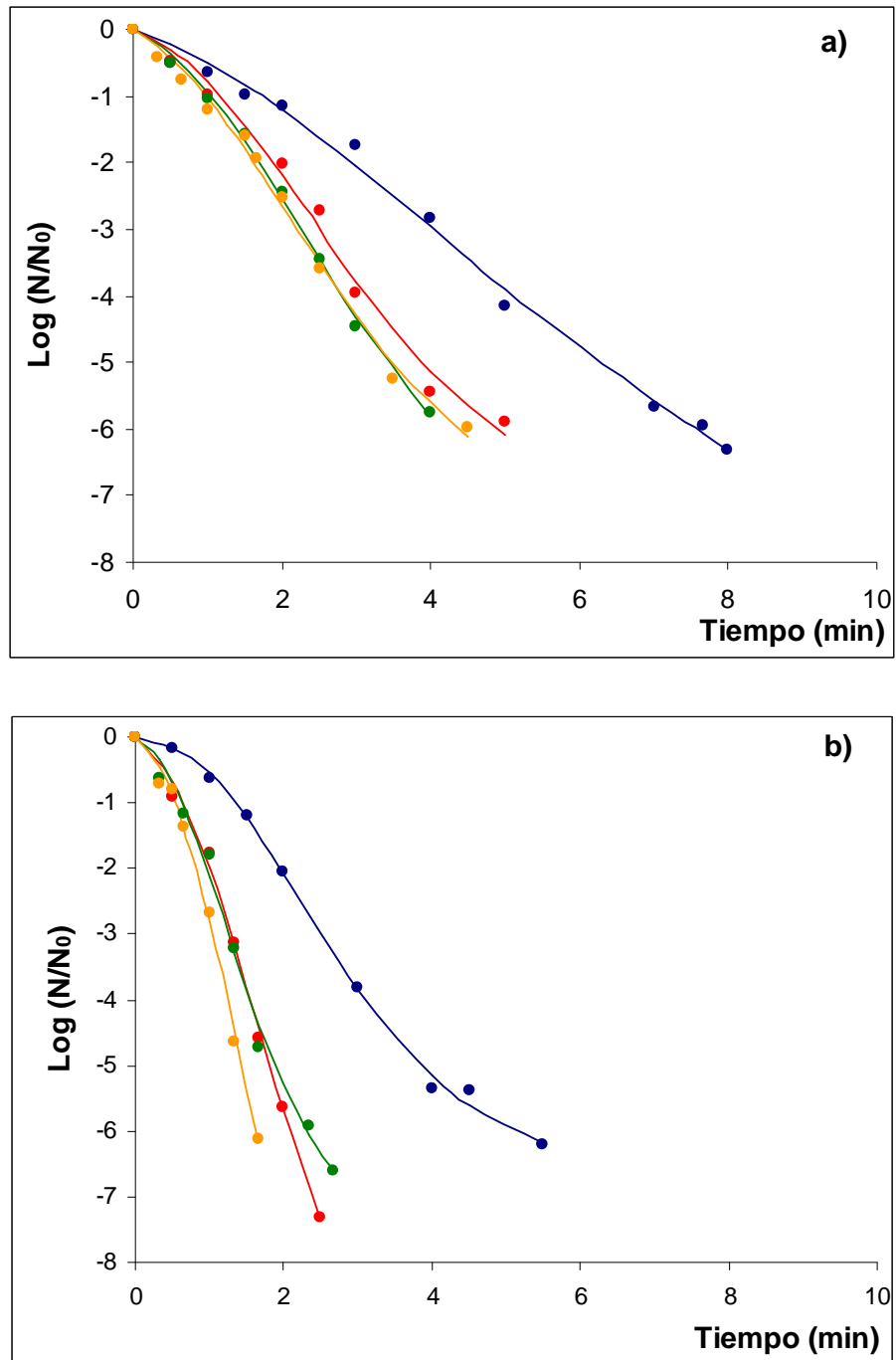
Al igual que cuando se evaluó el agregado de vainillina al jugo de naranja, las curvas de inactivación correspondientes a los sistemas que contenían citral fueron en su mayoría no lineales. Por tal motivo, se aplicó el modelo Gompertz modificado, obteniendo los parámetros característicos del mismo: *A* (hombro inicial), *B* (máxima velocidad de muerte) y *C* (cambio global en el número de sobrevivientes). La **Figura 4.3.7** muestra las curvas de inactivación predichas por el modelo junto a los datos experimentales, demostrando una adecuada correlación entre los mismos. La **Tabla 4.3.4** exhibe los parámetros característicos del modelo, junto a los estadísticos utilizados para evaluar el ajuste del mismo.

Los elevados valores de  $R^2$  ajustado por grados de libertad obtenidos, indican que el modelo ajustó adecuadamente a los datos experimentales, pudiendo explicar entre el 98,1 y 99,7% de las variaciones en la respuesta observada. Asimismo, los valores del estadístico *F* resultaron muy significativos ( $\alpha < 0,001$ ).

El análisis de los valores de los parámetros característicos permitió definir cuantitativamente el comportamiento observado. Los valores de *B* indicaron que, en

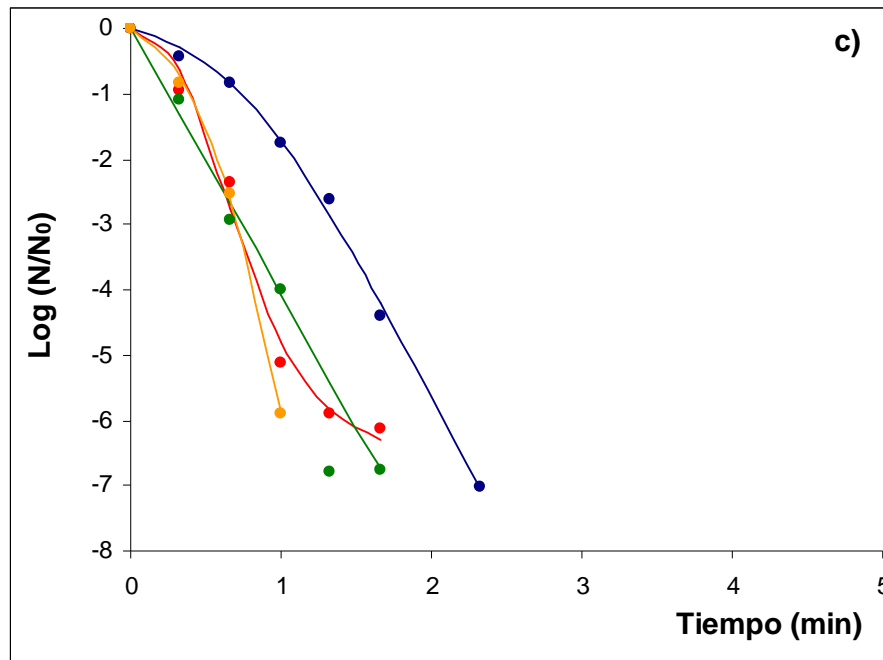
**Figura 4.3.7**

Ajuste del modelo de Gompertz modificado a las curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con citral (● 0 ppm; ● 25 ppm; ● 50 ppm y ● 75 ppm) y tratado térmicamente. a) 57 °C; b) 59°C.  
(—) valores predichos; (●) datos experimentales



**Figura 4.3.7 (continuación)**

Ajuste del modelo de Gompertz modificado a las curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con citral (● 0 ppm; ● 25 ppm; ● 50 ppm y ● 75 ppm) y tratado térmicamente a 61°C. (—) valores predichos; (●) datos experimentales



**Tabla 4.3.4**

Ajuste del modelo de Gompertz modificado y sus respectivos parámetros característicos, correspondientes al comportamiento de *L. innocua* en jugo de naranja con adición de citral y sometido a tratamiento térmico.

TEMPERATURA (°C)	CITRAL (ppm)	PARÁMETROS DE GOMPERTZ			R <sup>2</sup> <sub>ajustado</sub>	F <sup>a</sup>
		A	B	C		
57	0	1,06	-0,25	-10,1	99,3	1163****
	25	1,29	-0,56	-7,8	98,6	453***
	50	1,23	-0,54	-9,1	99,6	1735****
	75	1,15	-0,57	-8,2	99,1	862****
59	0	1,62	-0,73	-6,8	99,7	2357****
	25	1,38	-0,86	-12,0	99,6	1085****
	50	1,46	-1,23	-7,9	98,8	533****
	75	1,45	-1,02	-13,9	99,4	700****
61	0	1,51	-0,79	-14,9	99,5	837****
	25	1,83	-2,99	-6,6	98,1	257***
	50	0,39	-0,54	-21,0	99,1	372***
	75	1,64	-1,26	-25,9	99,7	694***

<sup>a</sup> Significativo a un nivel de: \*\*\* 0,1%; \*\*\*\*0,01%

A: hombro inicial

B: máxima velocidad de muerte

C: cambio global en el número de sobrevivientes

general, la velocidad de muerte de *L. innocua* aumentó para los sistemas que contenían citral, siendo este aumento más evidente al incrementar la temperatura de tratamiento térmico. Una excepción fue el sistema con 50 ppm de citral tratado térmicamente a 61°C, que presentó un valor de *B* incoherente debido a que la severidad del tratamiento aplicado permitió tomar escasos puntos experimentales, afectando el ajuste del modelo. No se manifestaron diferencias significativas en los valores de *B* entre las diferentes concentraciones de citral evaluadas, corroborando el comportamiento observado experimentalmente. Los valores de *A* no mostraron una tendencia definida respecto de las diferentes concentraciones de citral y temperaturas evaluadas. En cuanto a la evolución del parámetro *C*, nuevamente, se encontró que el modelo falla en la predicción debido probablemente, a que las curvas de inactivación obtenidas carecieron de una cola marcada.

Este análisis confirmó que, a una dada temperatura de tratamiento, concentraciones crecientes de citral no provocaron diferencias marcadas en los parámetros que caracterizan a las curvas de inactivación. Por lo tanto, se puede concluir que la adición de 25 ppm de citral es beneficiosa, conduciendo a una mayor inactivación microbiana; sin embargo, aumentos subsecuentes en dicha concentración, dentro del rango evaluado, no produjeron un efecto bactericida adicional.

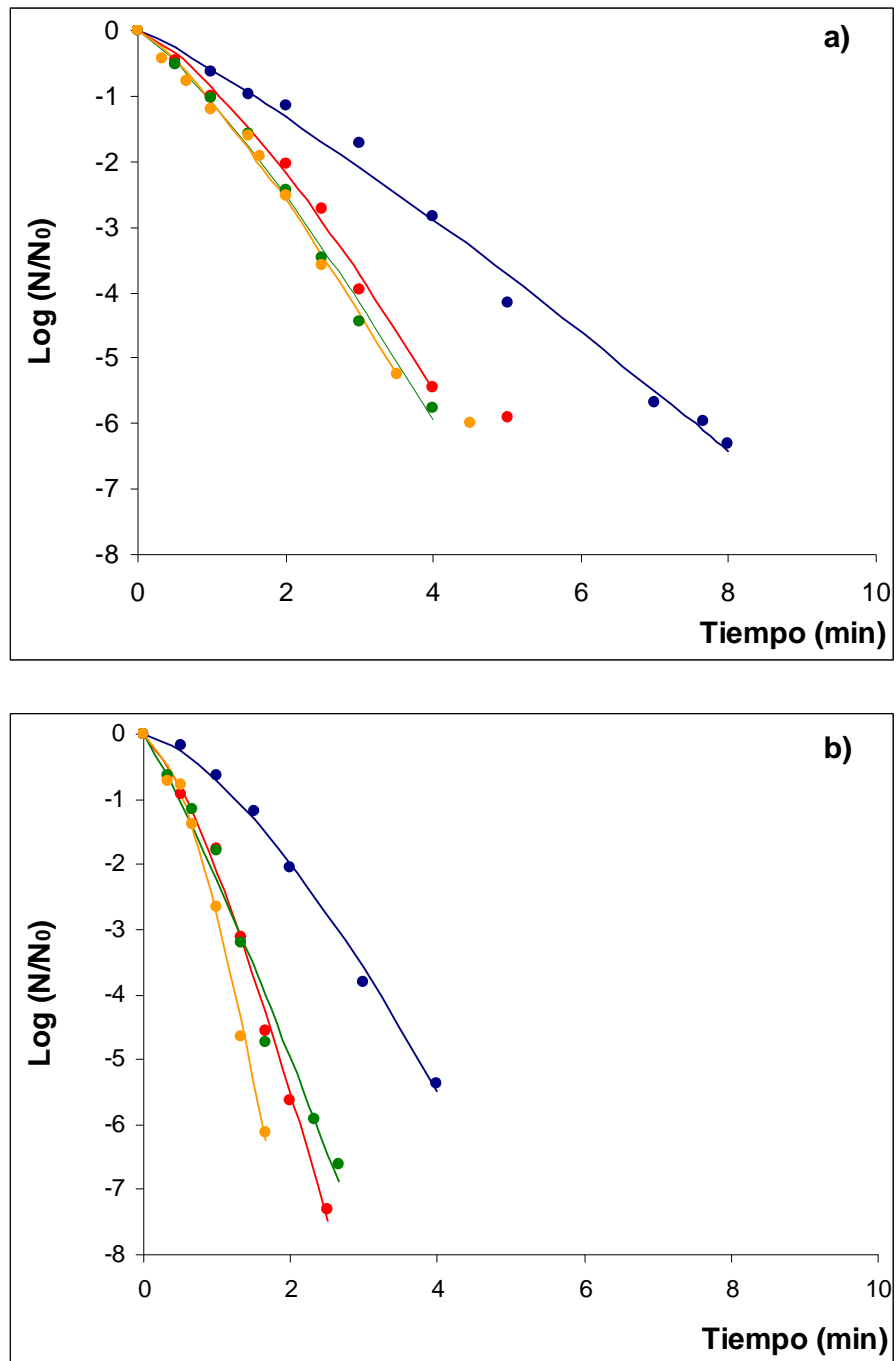
#### **4.3.2.2.b- Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull**

El estudio de las curvas de inactivación se complementó aplicando el modelo distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull. La **Figura 4.3.8** exhibe las curvas predichas por el modelo, junto a los datos experimentales. La **Tabla 4.3.5** presenta los valores de los parámetros *b* y *n* obtenidos a partir de las mismas, así como también los estadísticos de ajuste del modelo.

Los valores de  $R^2$  ajustado obtenidos demostraron que entre el 96,2 y 99,8% de la variación en la inactivación de *L. innocua* pudo ser explicada por el modelo propuesto. Los valores del estadístico F resultaron muy significativos ( $\alpha$ : 0,001).

**Figura 4.3.8**

Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull a las curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con citral (● 0 ppm; ● 25 ppm; ● 50 ppm y ● 75 ppm) y sometido a tratamiento térmico: a) 57°C; b) 59°C. (—) valores predichos; (●) datos experimentales.

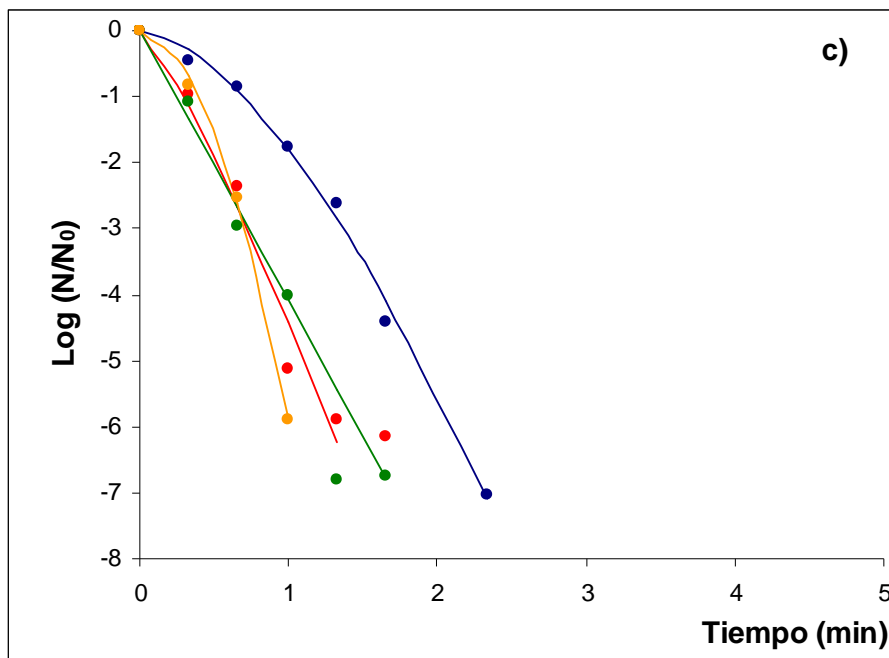




**Figura 4.3.8 (continuación)**

Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull a las curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con citral (● 0 ppm; ● 25 ppm; ● 50 ppm y ● 75 ppm) y sometido a tratamiento térmico:

c) 61°C. (—) valores predichos; (●) datos experimentales.



**Tabla 4.3.5**

Parámetros correspondientes al modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull, para el comportamiento de *L. innocua* en jugo de naranja con adición de citral y tratado térmicamente.

TEMPERATURA (°C)	CITRAL (ppm)	<i>b</i>	<i>n</i>	R <sup>2</sup> ajustado	F <sup>a</sup>
57	0	0,59	1,15	99,1	1412****
	25	0,86	1,33	99,3	1024****
	50	1,08	1,23	99,3	1229****
	75	1,08	1,26	99,3	1381****
59	0	0,72	1,46	99,5	1286****
	25	2,14	1,36	99,2	1084****
	50	2,26	1,13	97,7	396***
	75	2,79	1,58	99,3	959****
61	0	1,80	1,62	99,4	1077****
	25	4,42	1,21	96,2	131***
	50	4,07	1,00	99,4	799****
	75	5,86	1,93	99,8	1324****

<sup>a</sup> Significativo a un nivel de: \*\*\* 0,1%; \*\*\*\*0,01%

A diferencia del comportamiento observado cuando se evaluó la adición de vainillina al jugo de naranja, donde las curvas de modeladas presentaron valores de  $n$  mayores, menores ó iguales a la unidad, mayoría de las curvas con agregado de citral presentaron valores del parámetro  $n$  mayores a la unidad y marcada concavidad hacia abajo (convexo hacia el eje de abscisas), excepto en el caso en que se combinaron 50 ppm de citral con un tratamiento térmico a 61°C, en que se obtuvo una curva cercana a la linealidad con  $n = 1$  (**Figura 4.3.8.c**). Este comportamiento fue predecible, dado que el estrecho rango de concentraciones de citral empleado no provocó niveles de inactivación diferenciados.

A partir de los valores obtenidos de los parámetros  $b$  y  $n$  se graficaron las distribuciones de frecuencias de resistencias de *L. innocua* en jugo de naranja para los distintos tratamientos (**Figura 4.3.9**). La **Tabla 4.3.6** exhibe los estadísticos que las caracterizan calculados mediante las **ecuaciones 3.7 - 3.10** presentadas en el **apartado 3.10.7.2 de Materiales y Métodos**.

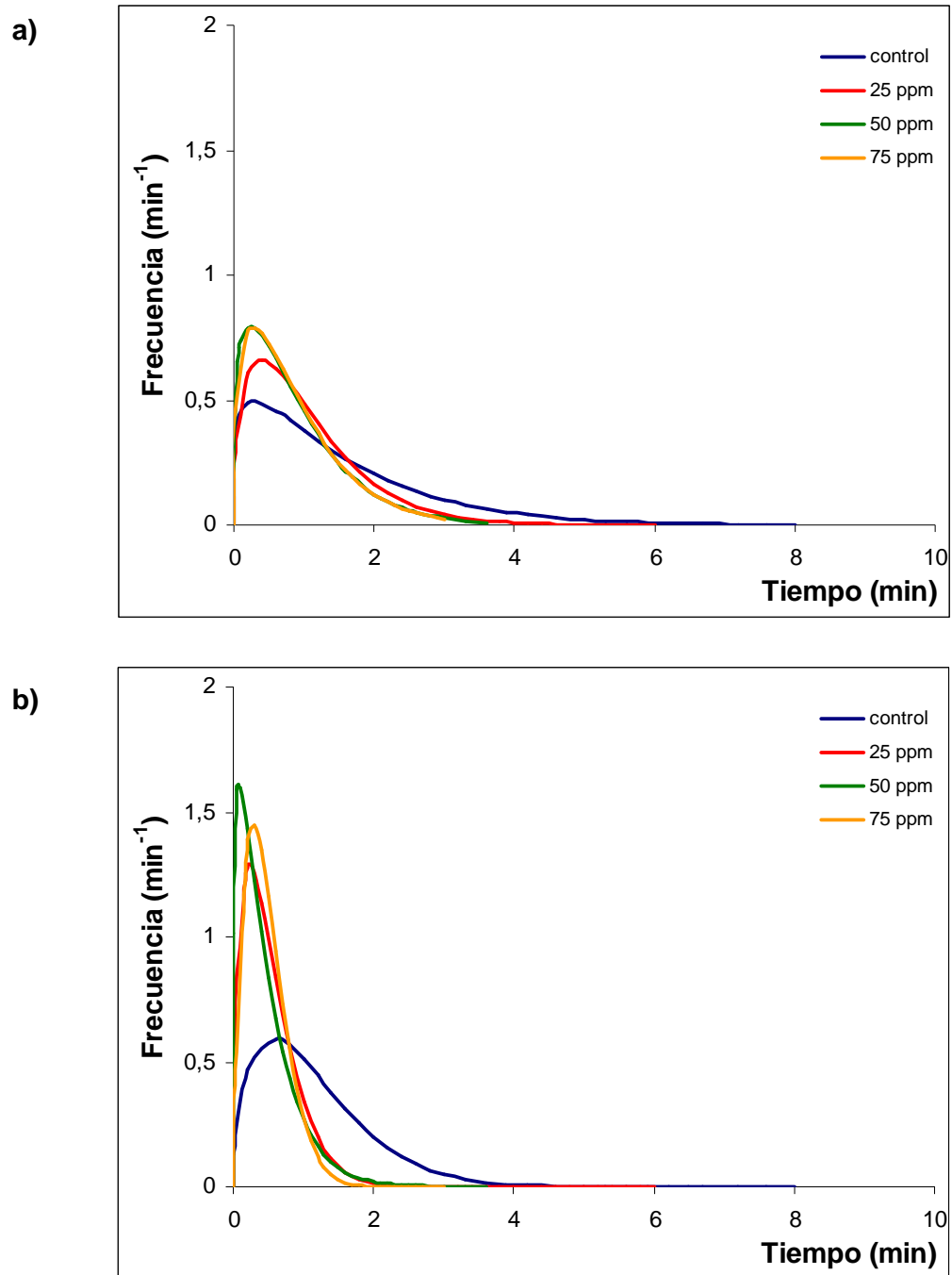
En general, las distribuciones correspondientes a los sistemas sin adición de citral resultaron más aplanadas, con mayores valores de media y varianza, respecto de aquellos sistemas que contenían dicho antimicrobiano. Este comportamiento indicaría que la mayoría los miembros de la población fueron inactivados en un amplio rango de tiempos de tratamiento existiendo una amplia distribución de resistencias al tratamiento aplicado (Peleg y Cole, 1998).

La presencia de citral en bajas proporciones produjo un estrechamiento de las distribuciones, con reducción de los valores de moda, media y varianza, denotando un incremento en la sensibilidad del *L. innocua*. Sin embargo, concentraciones crecientes de citral produjeron una leve reducción adicional en estos parámetros, demostrando que cualquiera de las combinaciones, a una dada temperatura de tratamiento resultó de similar efectividad. Esto quedó demostrado también por la escasa diferencia en los valores de los estadísticos asociados a las distribuciones, correspondientes a los sistemas adicionados con 25 a 75 ppm de citral.

El incremento de la temperatura de tratamiento térmico de 57 a 61°C, permitió verificar la mayor efectividad de los tratamientos con agregado de citral. Los tratamientos realizados a mayor temperatura, resultaron en un mayor estrechamiento de las distribuciones, con menores valores de media y sesgo de la

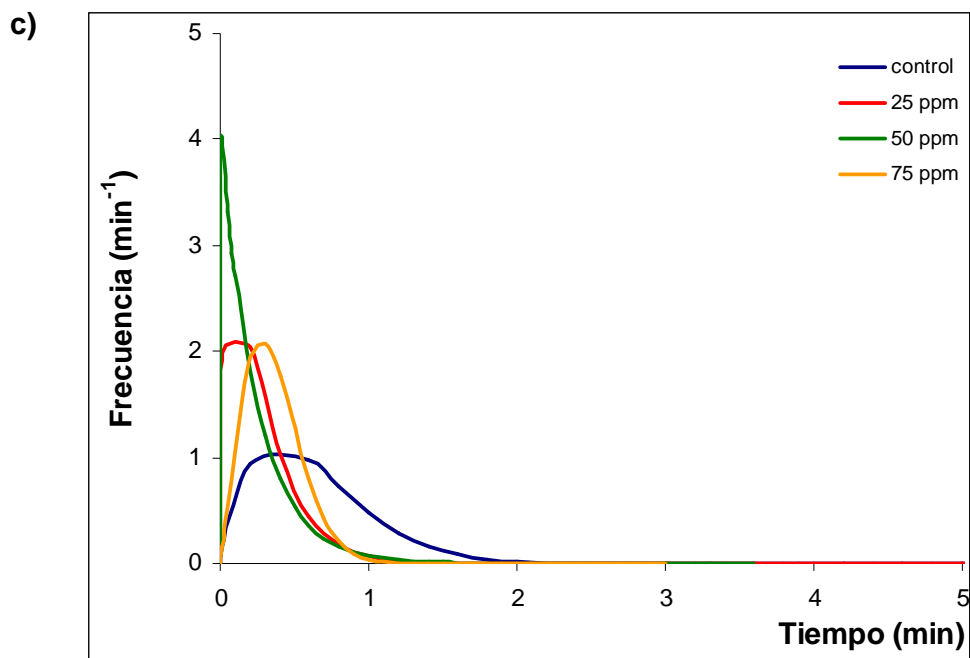
**Figura 4.3.9**

Distribuciones de frecuencias de resistencias de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con citral y sometido a tratamiento térmico: a) 57°C; b) 59°C.



**Figura 4.3.9 (continuación)**

Distribuciones de frecuencias de resistencias de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con citral y sometido a tratamiento térmico: c) 61°C.



**Tabla 4.3.6**

Parámetros de las curvas de distribución de frecuencia de resistencias de *L. innocua* en jugo de naranja con adición de citral y sometido a tratamiento térmico.

TEMPERATURA (°C)	CITRAL (ppm)	MODA (min)	MEDIA (min)	COEFICIENTE DE SESGO (-)	VARIANZA (min <sup>2</sup> )
57	0	0,26	1,51	1,87	1,74
	25	0,39	1,03	1,66	0,61
	50	0,24	0,88	1,77	0,52
	75	0,27	0,87	1,73	0,49
59	0	0,57	1,13	1,56	0,62
	25	0,22	0,52	1,64	0,15
	50	0,07	0,47	1,89	0,17
	75	0,28	0,47	1,49	0,09
61	0	0,39	0,62	1,47	0,16
	25	0,07	0,28	1,79	0,05
	50	-	0,25	2,11	0,06
	75	0,27	0,36	1,35	0,04

distribución hacia la derecha, lo cual indicaría que la mayoría de la población se inactivó en tiempos más cortos, cercanos al inicio del tratamiento.

En general, utilizando citral se observaron distribuciones de frecuencias de resistencias de *L. innocua* más amplias y con mayor varianza y media, y menor sesgo que para algunos niveles de vainillina (> 700 ppm), a iguales temperaturas de tratamiento térmico (ver **Tabla 4.3.3** ). Es decir, que los tratamientos con citral, dentro del rango de niveles evaluados, tuvieron menor efectividad que los niveles de vainillina. Niveles de citral superiores a los utilizados en este estudio generarían gran impacto sobre la percepción sensorial del alimento, aún tratándose de un jugo cítrico, hecho que limitó la selección de las concentraciones a evaluar. Por este motivo, si bien el citral utilizado en bajas concentraciones tuvo un efecto beneficioso aunque limitado, se propuso evaluar su utilización en combinación con otros factores de estrés, además del tratamiento térmico suave.

### 4.3.3- Utilización de vainillina y citral en combinación

#### 4.3.3.1 Curvas de Inactivación

Con el propósito de establecer el/los tratamiento/s más efectivo/s se seleccionaron distintos niveles de los dos antimicrobianos naturales antes evaluados (vainillina y citral) en combinación con la aplicación de un tratamiento térmico suave. La temperatura de tratamiento térmico seleccionada fue la menor temperatura estudiada en las etapas anteriores (57°C), con el objeto de minimizar las modificaciones organolépticas. Asimismo, se decidió evaluar una temperatura inferior (52°C), con el objeto de establecer un tratamiento equivalente que disminuya notablemente los cambios sensoriales producidos por la temperatura de tratamiento térmico. El criterio de selección de los niveles de antimicrobianos naturales se basó en la utilización de las menores concentraciones que mostraron efectividad inactivando *L. innocua* en jugo de naranja, de manera de introducir mínimos cambios en el aroma y sabor del jugo de naranja. Las combinaciones de factores seleccionadas fueron detalladas en la **Tabla 3.10.3** de la sección **Materiales y Métodos**.

La **Figura 4.3.10** presenta las curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja procesado según los diferentes tratamientos. El análisis de las mismas permitió concluir que existieron combinaciones de vainillina y citral que lograron reducir a más de la mitad el tiempo necesario para cumplir con el requerimiento de cinco reducciones logarítmicas (FDA, 2000), respecto de los tratamientos térmicos sin agregado de antimicrobianos. La combinación de 900 ppm de vainillina y 25 ppm de citral redujo el tiempo para alcanzar dicho requerimiento de 10,8 minutos a 5,7 minutos a 52°C y de 6 minutos a 1,5 minutos a 57°C. Se observó también, que manteniendo la concentración de citral (25 ppm) y aumentando la concentración de vainillina a 1100 ppm, se logró reducir dicho tiempo un minuto adicional a 52°C y 0,5 minutos a 57°C. La combinación de antimicrobianos que incluyó 500 ppm de vainillina y 75 ppm de citral a 57°C resultó levemente menos efectiva.

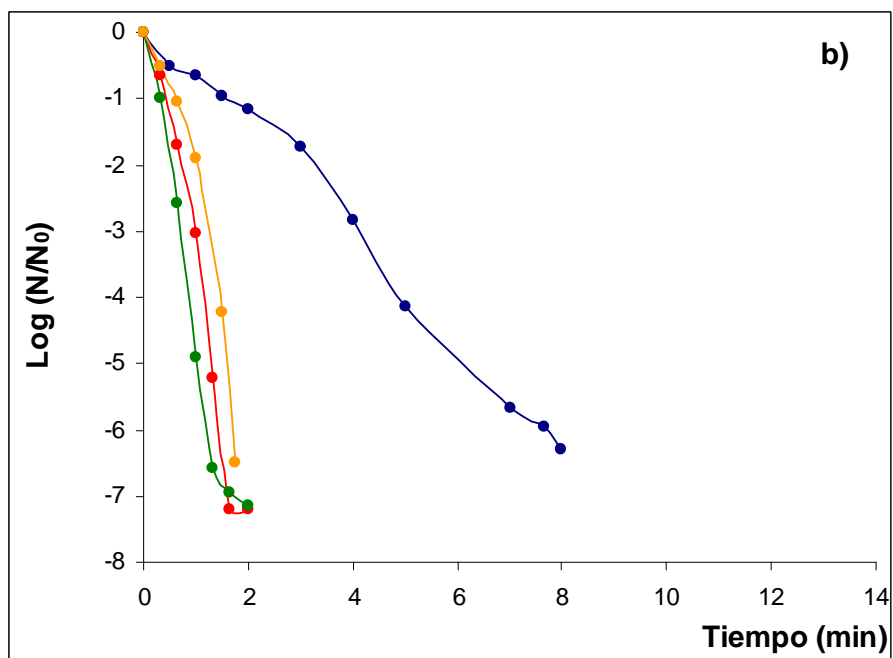
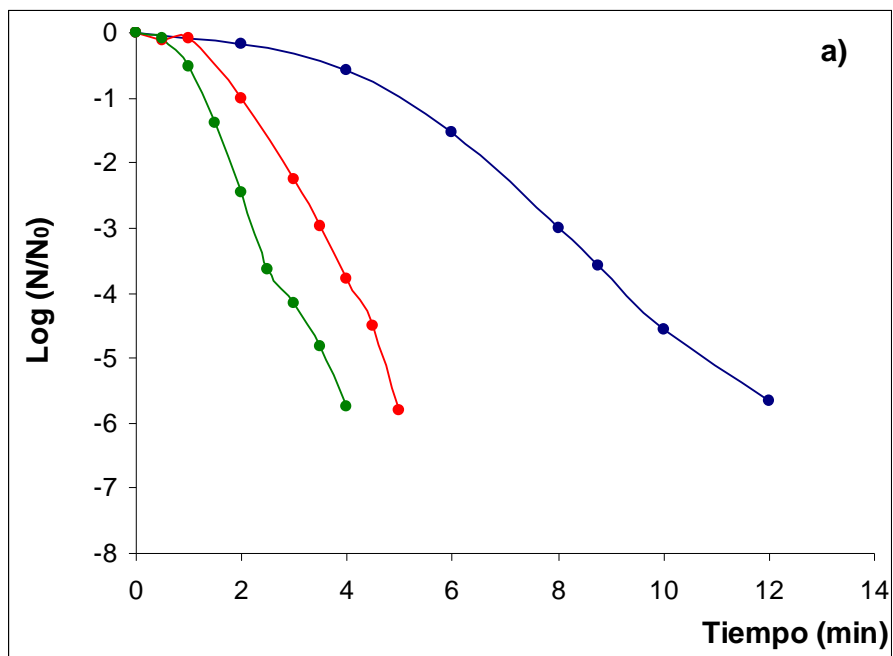
La efectividad adicional alcanzada al combinar vainillina y citral ya fue comentada por otros autores. López-Malo (2000) describió efectos sinérgicos con la utilización combinada de estos antimicrobianos sobre la inhibición de *Aspergillus*



**Figura 4.3.10**

Curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con distintas combinaciones de vainillina (V) y citral (C) y sometido a tratamiento térmico.

- a) 52 °C: ● control; ● 900 ppm V + 25 ppm C; ● 1100 ppm V + 25 ppm C  
b) 57°C. ● control; ● 900 ppm V + 25 ppm C; ● 1100 ppm V + 25 ppm C;  
● 500 ppm V + 75 ppm C.



*flavus* durante al menos 30 días en Agar Papa-dextrosa a  $a_w$  0,99 (ajustada con sacarosa) y pH 3,5. Ferrante, (2004) encontró que la combinación de vainillina (500 a 1500 ppm) y bajas dosis de citral (25-100 ppm) incremento notablemente la inactivación de *Listeria monocytogenes* en jugo de naranja (pH 3,5) respecto de los tratamientos individuales cuando se los combinó con ultrasonido de alta intensidad (45°C, 20kHz, 95  $\mu$ m).

Se ha señalado en diversos reportes que los terpenos provocan disrupción de la membrana celular en hongos y bacterias (Cox y col, 2000). También se conoce que los compuestos fenólicos alteran la funcionalidad de la membrana (Ultee y col., 1999). Esto explicaría el efecto sinergista de la combinación de agentes activos contra la membrana.

Este efecto conjunto de vainillina y citral se vió favorecido aún más por la acción del tratamiento térmico. Lanciotti y col. (2004), propusieron que la actividad biológica de la mayoría de los aceites esenciales depende, en primera instancia, de su partición en la membrana plasmática y atribuyeron el rol principal en la toxicidad a la presión de vapor, que puede ser considerada como una medida indirecta de la hidrofobicidad. Por lo tanto, los factores capaces de incrementar la presión de vapor de estas sustancias pueden favorecer su actividad antimicrobiana, incrementando su solubilidad en las membranas celulares. Tal es el caso del aumento de la temperatura que favorece la tendencia de las moléculas a pasar a su fase gaseosa y en consecuencia, aumenta su efecto antimicrobiano. Una vez que estos antimicrobianos atraviesan la membrana celular pueden interactuar con enzimas de membrana produciendo alteración de su estructura con pérdida de funcionalidad y causar flujo inverso de protones, afectando la actividad celular. Los mismos, por su hidrofobicidad, podrían acumularse en la bicapa lipídica de la célula, alterando la función de la membrana ó provocando su disrupción y conduciendo finalmente, a la pérdida de macromoléculas desde el interior y facilitando el ingreso de más moléculas de antimicrobiano dentro de la célula (Ramos-Nino y col., 1996)

### 4.3.3.2- Modelado matemático

#### 4.3.3.2.a- Aplicación del modelo de Gompertz modificado

La **Figura 4.3.11** muestra el ajuste del modelo de Gompertz a las curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con vainillina y citral y sometido a tratamiento térmico suave (52 ó 57°C). La **Tabla 4.3.7** exhibe los parámetros característicos del modelo (*A*, *B* y *C*) junto a los estadísticos utilizados para evaluar el ajuste del mismo.

El ajuste del modelo resultó muy satisfactorio, como lo muestran los valores de  $R^2$  ajustado (entre 98 y 99,9%) y la elevada significación ( $\alpha < 0,001$ ) de los valores de *F*. Por lo tanto, se puede considerar que el modelo aplicado resultó apropiado para describir los datos experimentales (**Tabla 4.3.7**).

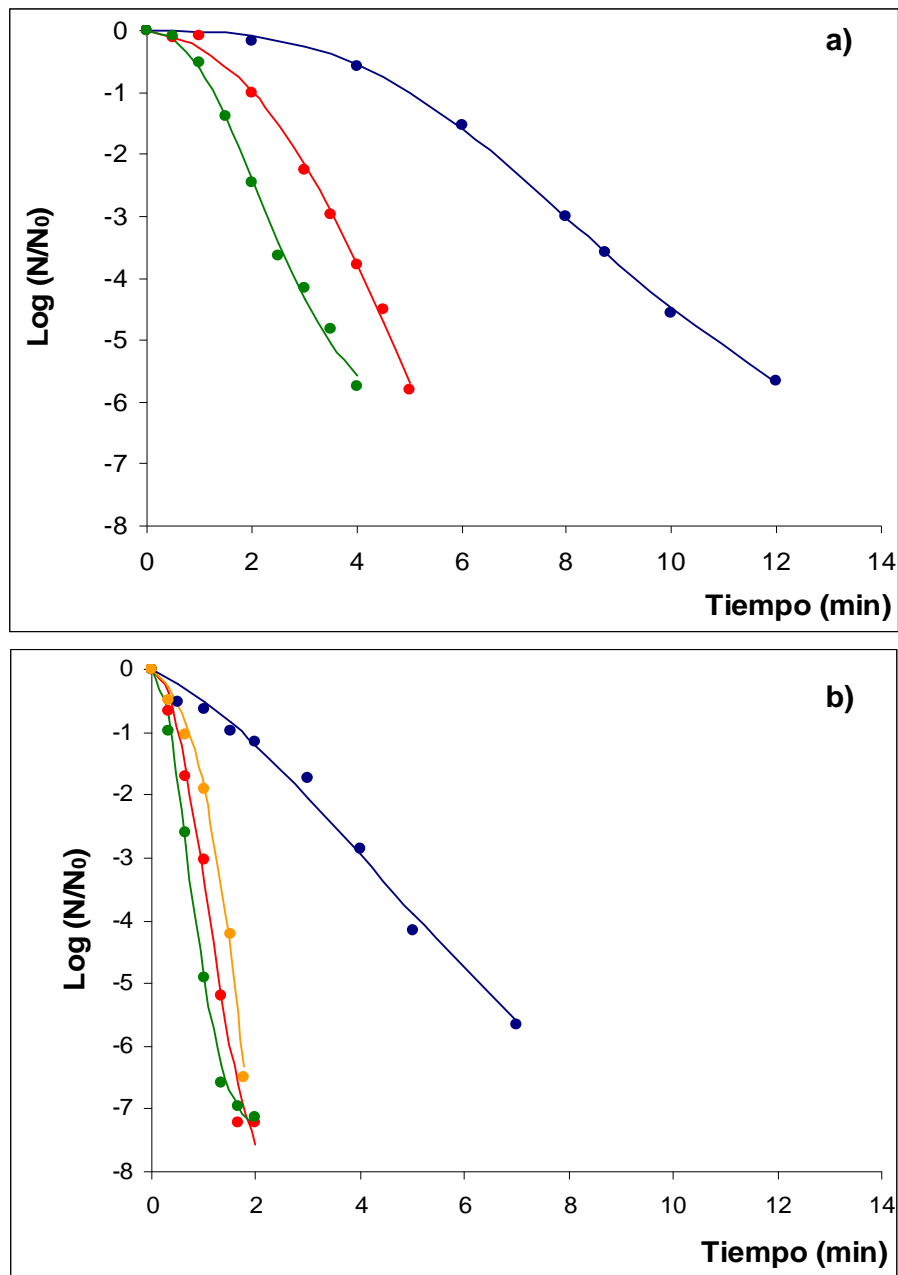
El análisis de los parámetros estimados del modelo permitió establecer que, en general, conforme aumentó la concentración de vainillina para una dada concentración de citral, se incrementó la velocidad de muerte (parámetro *B*). Este efecto fue más notorio con el incremento de la temperatura de tratamiento térmico a 57°C, mientras que no se observó una tendencia marcada para la evolución del parámetro *A* (hombro de la curva de inactivación). En este caso, los valores de *C* resultaron fluctuantes. Este comportamiento resultó predecible, debido a que las curvas presentaron marcadas pendientes sin una cola notable, hecho que como se comentara con anterioridad, condiciona la predicción del parámetro *C*. Este comportamiento resultó más evidente en el sistema adicionado con 500 ppm de vainillina y 75 ppm de citral tratado a 57°C.

Tomando en cuenta las observaciones realizadas en los apartados anteriores (**apartados 4.3.1.2.a** y **4.3.2.2.a**), se puede concluir que el modelo de Gompertz resultó más apropiado para describir el comportamiento en los sistemas donde se utilizaron combinaciones menos severas de los factores de estrés (un único antimicrobiano ó menores temperaturas de tratamiento), los cuales presentaron curvas de inactivación de forma aproximadamente sigmoidea. Cuando dichas condiciones se volvieron más estresantes las curvas resultaron más lineales y con escasa región de cola, disminuyendo la capacidad de ajuste de este modelo.

**Figura 4.3.11**

Ajuste del modelo de Gompertz modificado a las curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con distintas combinaciones de vainillina (V) y citral (C) y sometido a tratamiento térmico.

a) 52 °C: ● control; ● 900 ppm V + 25 ppm C; ● 1100 ppm V + 25 ppm C  
b) 57°C: ● control; ● 900 ppm V + 25 ppm C; ● 1100 ppm V + 25 ppm C; ● 500 ppm V + 75 ppm C. (—) valores predichos; (●) datos experimentales



**Tabla 4.3.7**

Ajuste del modelo de Gompertz modificado y sus respectivos parámetros característicos correspondiente a la inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja con agregado de vainillina y citral y sometido a tratamiento térmico.

TEMP (°C)	VAINILLIN A (ppm)	CITR AL (ppm)	GOMPERTZ			R <sup>2</sup> ajustad	Fa
52	0	0	1,97	-0,24	-8,4	99,9	7044**
	900	25	1,65	-0,32	-16,6	99,6	1553**
	1100	25	1,72	-0,85	-6,8	99,4	1174**
57	0	0	1,06	-0,25	-10,1	99,3	1163**
	500	75	1,76	-0,55	-59,8	99,0	334***
	900	25	1,69	-1,74	-8,9	98,0	262****
	1100	25	1,65	-2,52	-7,6	99,4	1095**

<sup>a</sup> Significativo a un nivel de: \*\*\* 0,1%; \*\*\*\*0,01%

A: hombro inicial

B: máxima velocidad de muerte

C: cambio global en el número de sobrevivientes

#### 4.3.3.2.b- Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull

La **Figura 4.3.12** muestra los datos experimentales correspondientes a la inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja junto a las curvas predichas por el modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull. La **Tabla 4.3.8** exhibe los parámetros característicos  $b$  y  $n$  calculados a partir del mismo, junto a los estadísticos utilizados para la evaluación de la aplicabilidad del modelo. Tal como lo demuestran los valores de  $R^2$  ajustado obtenidos (entre 97,0 y 99,8%), el modelo ajustó adecuadamente a los datos experimentales. Asimismo, los valores de  $F$  para el modelo resultaron altamente significativos ( $\alpha < 0,0001$ ), corroborando que la variación en la respuesta ( $\text{Log}(N/N_0)$ ) tenida en cuenta por el modelo es significativamente mayor que la variación debida a causas no identificables.

Todas las curvas predichas presentaron un valor de  $n > 1$  denotando concavidad hacia abajo (convexo hacia el eje de abscisas) (**Tabla 4.3.8** y **Figura 4.3.12**). Sin embargo la curva correspondiente al sistema sometido a condiciones de estrés más severas (57°C: 1100 ppm vainillina (V) + 25 ppm citral (C)) presentó un valor de  $n$  cercano a 1, exhibiendo un comportamiento cercano a la linealidad.

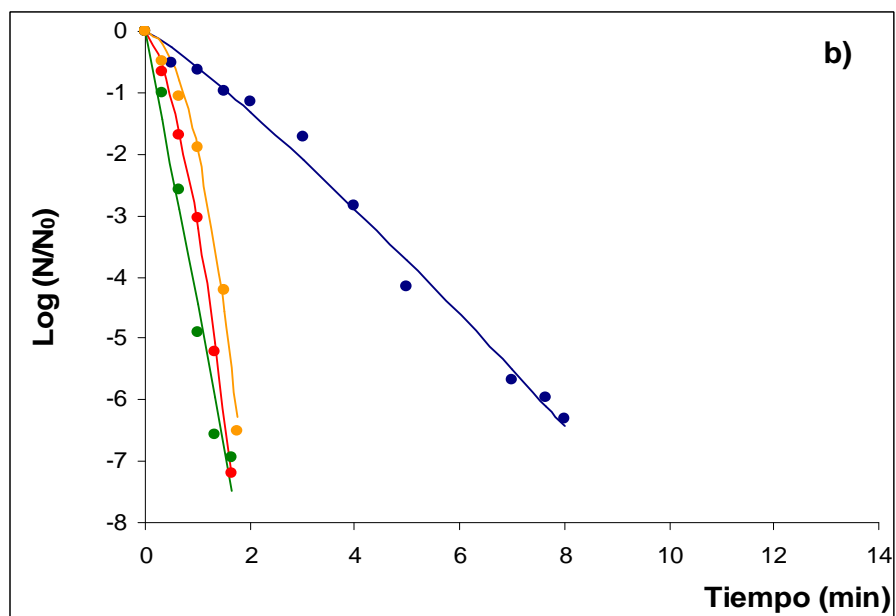
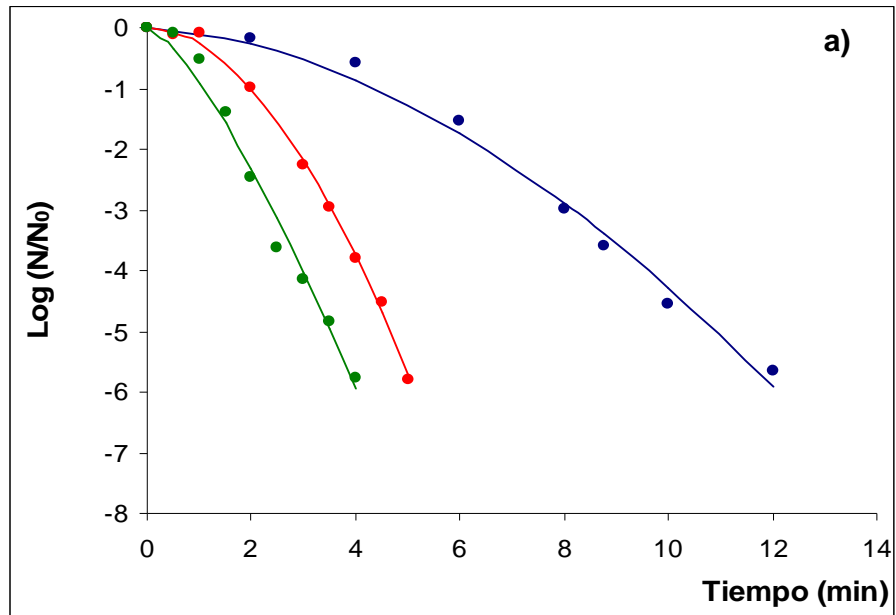
A partir de los valores de los parámetros del modelo  $b$  y  $n$  se graficaron las distribuciones de frecuencias de resistencias de *L. innocua* (**Figura 4.3.13**) y se calcularon los parámetros asociados a la distribución (**Tabla 4.3.9**).

Las distribuciones obtenidas muestran que el jugo de naranja sometido sólo al tratamiento térmico, presentó una gran dispersión de frecuencias de resistencias, con un amplio rango de tiempos de inactivación, con elevados valores de moda y media (curva control, **Figura 4.3.13**). Dicho comportamiento fue más marcado a la menor temperatura evaluada (52°C), tal como lo demuestra el elevado valor de varianza obtenido. Al aumentar la temperatura a 57°C, la distribución redujo su varianza e incrementó el sesgo hacia la derecha, con menores valores de moda y media. Por lo tanto, si bien el incremento de la temperatura resultó beneficioso inactivando una mayor proporción de la población más rápidamente, se demostró que el tratamiento térmico por sí solo resultó insuficiente.

**Figura 4.3.12**

Aplicación del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull a las curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con distintas combinaciones de vainillina (V) y citral (C) y sometido a tratamiento térmico. (—) valores predichos; (●) datos experimentales

- a) 52 °C: ● control; ● 900 ppm V + 25 ppm C; ● 1100 ppm V + 25 ppm C;
- b) 57°C. ● control; ● 900 ppm V + 25 ppm C; ● 1100 ppm V + 25 ppm C;  
● 500 ppm V + 75 ppm C.



**Tabla 4.3.8**

Parámetros estimados del modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull, correspondientes a la inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con vainillina y citral y sometido a tratamiento térmico.

TEMP (°C)	VAINILLIN A (ppm)	CITRAL (ppm)	<i>b</i>	<i>n</i>	R <sup>2</sup> <sub>ajustado</sub>	F <sup>a</sup>
52	0	0	0,08	1,76	98,9	772****
	900	25	0,27	1,89	99,7	3569****
	1100	25	0,91	1,35	98,2	574****
57	0	0	0,59	1,15	99,1	1412****
	500	75	1,95	2,09	99,0	415****
	900	25	3,22	1,59	99,8	2977****
	1100	25	4,45	1,03	97,0	213****

<sup>a</sup> Significativo a un nivel de: \*\*\*\*0,01%

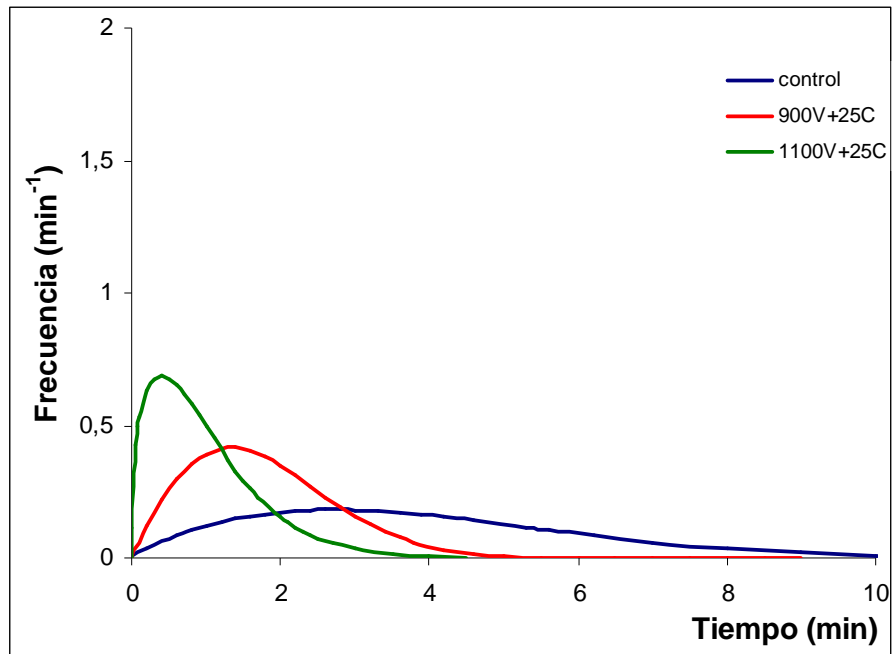


**Figura 4.3.13**

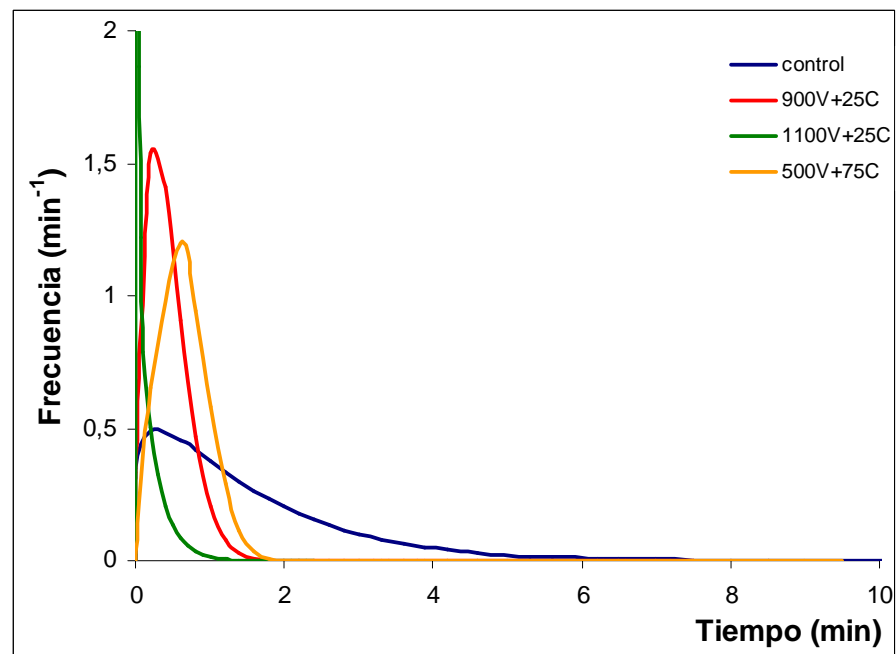
Distribuciones de frecuencias de resistencias de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con citral y tratado térmicamente según la aplicación del modelo de Weibull

a) 52°C; b) 57°C.

a)



b)



**Tabla 4.3.9**

Estadísticos característicos de las curvas de distribución de frecuencias de resistencias según el modelo el modelo de Weibull para la inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja con agregado de vainillina y citral, sometido a tratamiento térmico

TEMPERATURA (°C)	VANILLINA (ppm)	CITRAL (ppm)	MODA (min)	MEDIA (min)	COEFICIENTE DE SESGO (-)	VARIANZA (min <sup>2</sup> )
57	0	0	2,70	3,89	1,41	5,22
	900	25	1,34	1,77	1,36	0,94
	1100	25	0,39	0,98	1,65	0,54
59	0	0	0,26	1,51	1,87	1,74
	500	75	0,53	0,64	1,30	0,10
	900	25	0,26	0,43	1,49	0,08
	1100	25	-	0,23	2,06	0,05

La utilización de combinaciones de vainillina y citral fue muy favorable, ya que se obtuvieron distribuciones más estrechas, con menor varianza, moda y media, siendo este efecto más notorio con el incremento de la concentración de vainillina. El aumento de la temperatura de tratamiento térmico de 52 a 57°C produjo un estrechamiento adicional de las distribuciones. Tal es así, que el sistema adicionado con 1100 ppm de vainillina y 25 ppm de citral tratado a 57°C, no presentó pico, careciendo de moda, lo cual indicaría que la mayor parte de la población fue destruida en un tiempo muy corto de tratamiento, mientras que una proporción muy pequeña de la población, con mayor resistencia a los tratamientos aplicados, se mantuvo viable, hecho que produjo un sesgo muy marcado hacia la derecha.

El modelo de distribución de frecuencias weibulliano permitió explicar desde otro punto de vista, el efecto de la combinación de los factores de estrés evaluados sobre la inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja. Dicho análisis fue una herramienta muy valiosa para seleccionar los tratamientos más adecuados para asegurar la inocuidad del producto.

## 4.4- Procesamiento propuesto para jugo de naranja

### 4.4.1 Selección de tratamientos

En base a los resultados obtenidos en las etapas anteriores, donde se evaluó el comportamiento de *L. innocua* como subrogante de *L. monocytogenes*, en jugo de naranja con agregado de distintas concentraciones de vainillina y/o citral combinado con tratamiento térmico a temperatura moderada (ver **apartado 4.3**), se propusieron dos tratamientos de procesamiento mínimo para jugo de naranja.

Los tiempos de tratamiento térmico fueron calculados a partir las curvas de inactivación de *L. innocua* correspondientes a los sistemas preparados con combinaciones de los dos antimicrobianos y tratamiento térmico a 52°C y 57°C, para una reducción observada en la población microbiana de 5 ciclos logarítmicos (**Figura 4.4.1**).

Los tratamientos propuestos fueron los siguientes:

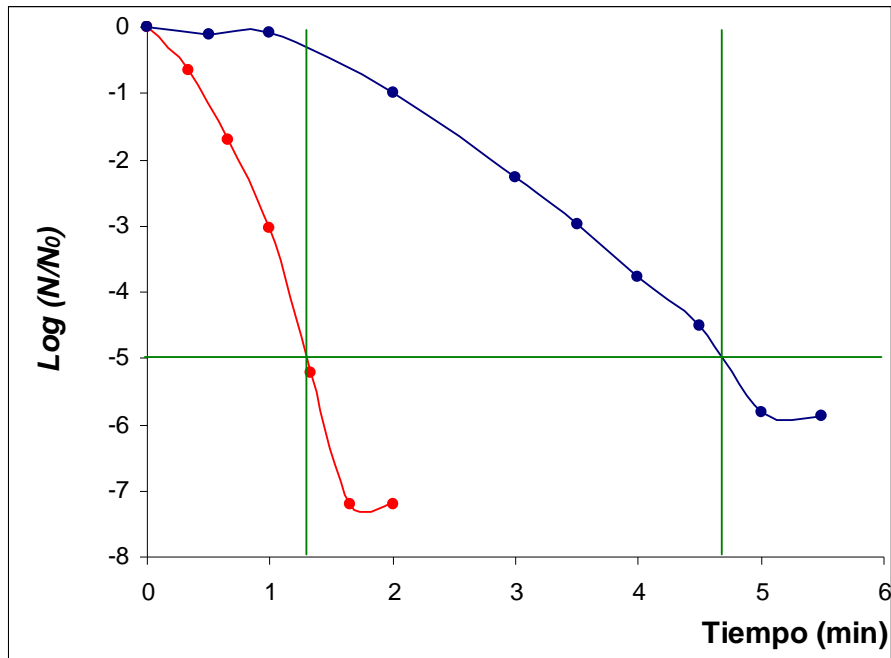
**Tratamiento A:** jugo de naranja adicionado con 900 ppm de vainillina y 25 ppm de citral; tratado térmicamente a 52°C durante 4'42" y almacenado en refrigeración (5 °C).

**Tratamiento B:** jugo de naranja adicionado con 900 ppm de vainillina y 25 ppm de citral; tratado térmicamente a 57°C durante 1'18" y almacenado en refrigeración (5 °C).

En la elección de la combinación mas efectiva de vainillina y citral propuesta se tuvo en cuenta además de la inactivación de *L. innocua* observada, la modificación del flavor que impartía la mezcla de antimicrobianos al jugo. Para ello, durante una prueba piloto con personal del laboratorio se realizó una degustación preliminar de jugos adicionados con distintas

**Figura 4.4.1**

Curvas de inactivación de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con 900 ppm de vainillina y 25 ppm de citral y tratado térmicamente:  
(—) Selección del tiempo de tratamiento térmico para 5 reducciones decimales de la población. ● 52°C y ● 57°C



combinaciones de vainillina y citral, descartando aquellas formulaciones que produjeron modificaciones del flavor muy marcadas.

#### **4.4.2. Inoculación con un patógeno relevante: *L. monocytogenes***

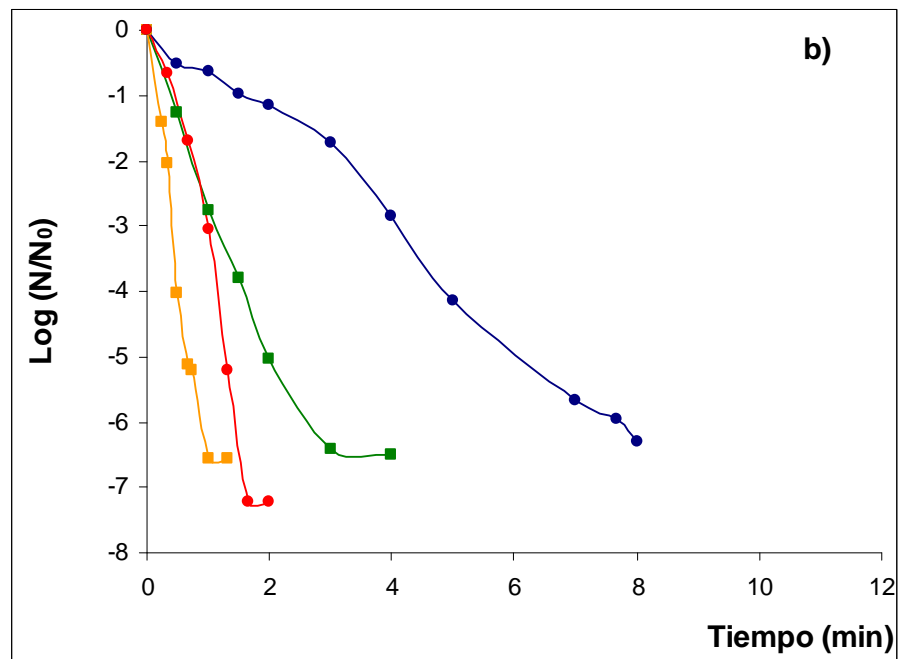
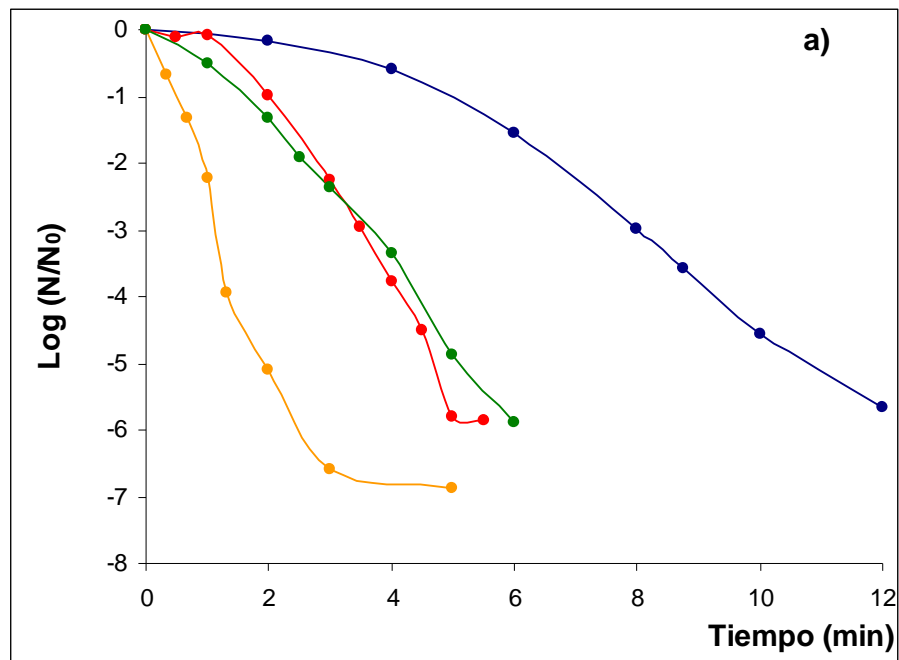
Se verificó que la utilización de *L. innocua* como microorganismo subrogante de *L. monocytogenes* fuera apropiada, sometiendo jugo de naranja inoculado con el patógeno a los dos tratamientos propuestos utilizando la metodología detallada en **Materiales y Métodos, apartado 3.10.4**. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 4.4.2**. En la misma se puede apreciar que los tratamientos propuestos basados en la inactivación de *L. innocua* fueron aún más efectivos en la inhibición de *L. monocytogenes*. El tiempo en el que se alcanzaron 5 ciclos de reducción logarítmica de dicha población, se redujo a 2 minutos a 52°C y a menos de 1 minuto a 57°C. Por lo tanto, se comprobó que la utilización de *L. innocua* como microorganismo subrogante de *L. monocytogenes* fue apropiada, y que la elección de tratamientos más conservadores, basados en datos de resistencia de *L. innocua*, generó un factor de seguridad adicional.

Numerosos estudios han confirmado que *L. innocua* puede ser utilizada como microorganismo modelo para estimar la inactivación térmica de *L. monocytogenes* en diversos alimentos, por tener una termoresistencia al menos igual ó superior que la de la especie patógena. Piyasena y col., (1998) evaluaron la inactivación de ambas especies durante la pasteurización de leche bovina a temperaturas entre 60,5 y 69,5°C. Busch y Donnelly, (1992) arribaron a la misma conclusión estudiando la capacidad de recuperación de diferentes caldos de reparación y enriquecimiento utilizando *L. monocytogenes* y *L. innocua* injuriadas térmicamente.

Figura 4.4.2

Comparación de las curvas de inactivación de *L. innocua* y *L. monocytogenes* en jugo de naranja tratado térmicamente. a) 52 °C; b) 57°C.

*L. innocua*: ● control sin antimicrobianos; ● 900 ppm de vainillina y 25 ppm de citral  
*L. monocytogenes*: ● control sin antimicrobianos; ● 900 ppm de vainillina y 25 ppm de citral



## 4.5- Evaluación de la calidad microbiológica y organoléptica del jugo de naranja procesado según los tratamientos propuestos

### 4.5.1- Evolución de la flora nativa

Con el propósito de evaluar la calidad microbiológica del jugo de naranja procesado por la metodología propuesta, se estudió en primera instancia la evolución de la flora nativa de jugo de naranja procesado según los tratamientos propuestos (**A** y **B**) almacenado en refrigeración (5°C) durante 14 días. Paralelamente, se analizó el jugo de naranja natural, sin procesamiento (**Figura 4.5.1**). En esta etapa del estudio se utilizaron naranjas deterioradas, con el propósito de situarse en el peor escenario de prueba para verificar la eficiencia de los procesos propuestos, motivo por el cual se obtuvieron recuentos iniciales elevados de parte de la flora nativa.

Tal como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.12.4** se siguió el recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales, ácido-tolerantes mesófilos y termófilos, microorganismos anaerobios mesófilos y termófilos, hongos y levaduras.

No se detectó la presencia de microorganismos aerobios, anaerobios termófilos, ni microorganismos ácido-tolerantes termófilos en el jugo de naranja evaluado durante los 14 días de almacenamiento.

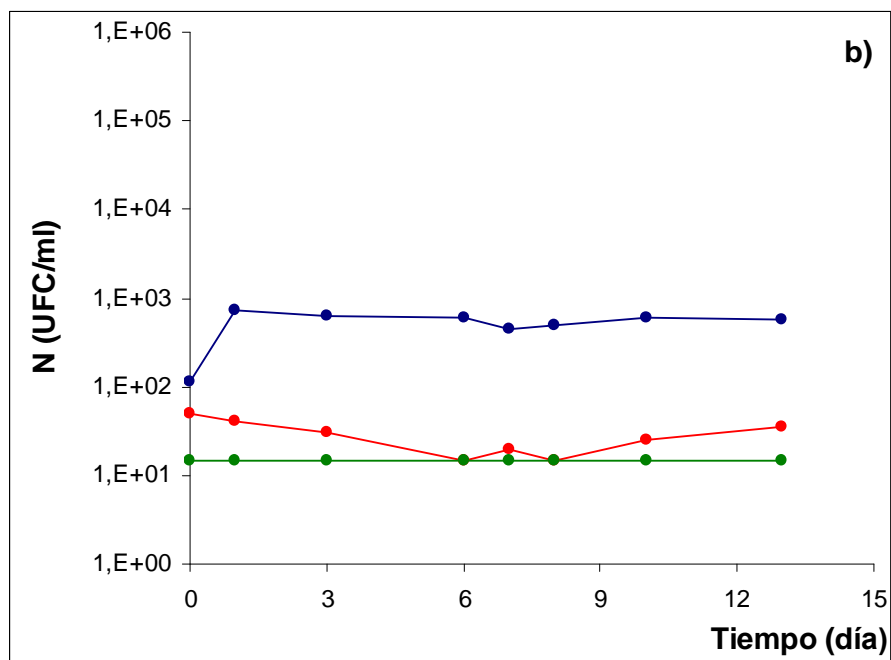
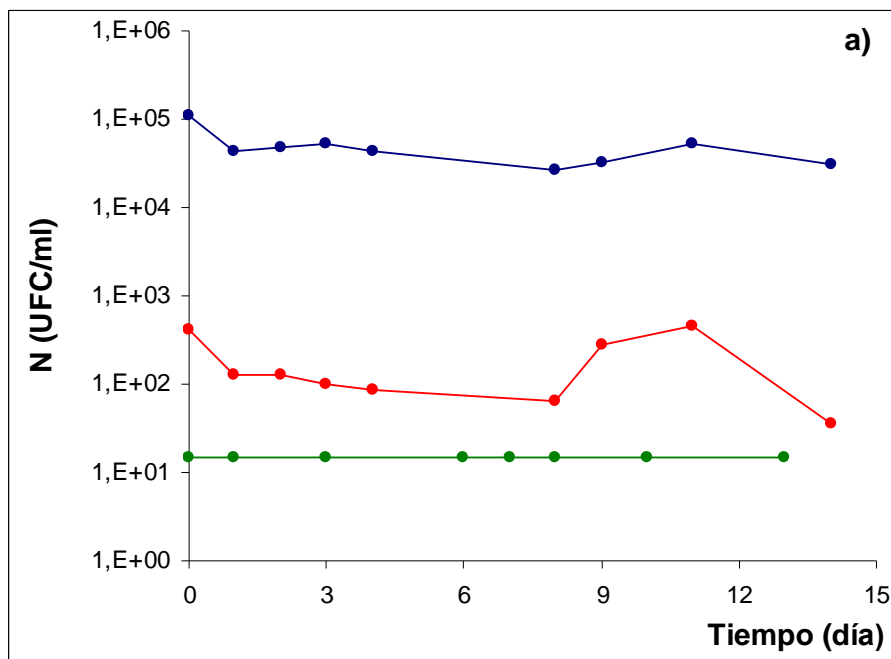
El tratamiento propuesto **B** (jugo de naranja con 900 ppm de vainillina + 25 ppm de citral, tratado a 57°C por 1'18") resultó altamente efectivo, inhibiendo casi por completo todos los microorganismos integrantes de la flora nativa del jugo de naranja durante el tiempo de almacenamiento evaluado, obteniéndose menos de 15 UFC/ml de jugo, en todos los recuentos realizados (**Figura 4.5.1**).

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos en jugo de naranja sin tratamiento (control), fue aproximadamente 2,5 ordenes superior al correspondiente a jugo de naranja procesado según el tratamiento propuesto **A** (jugo de naranja con agregado de 900 ppm de vainillina + 25 ppm de citral, tratado a 52°C por 4'42"). Además, se observó una leve declinación de inicial en ambos sistemas durante las primeras horas de almacenamiento, permaneciendo aproximadamente constantes



**Figura 4.5.1**

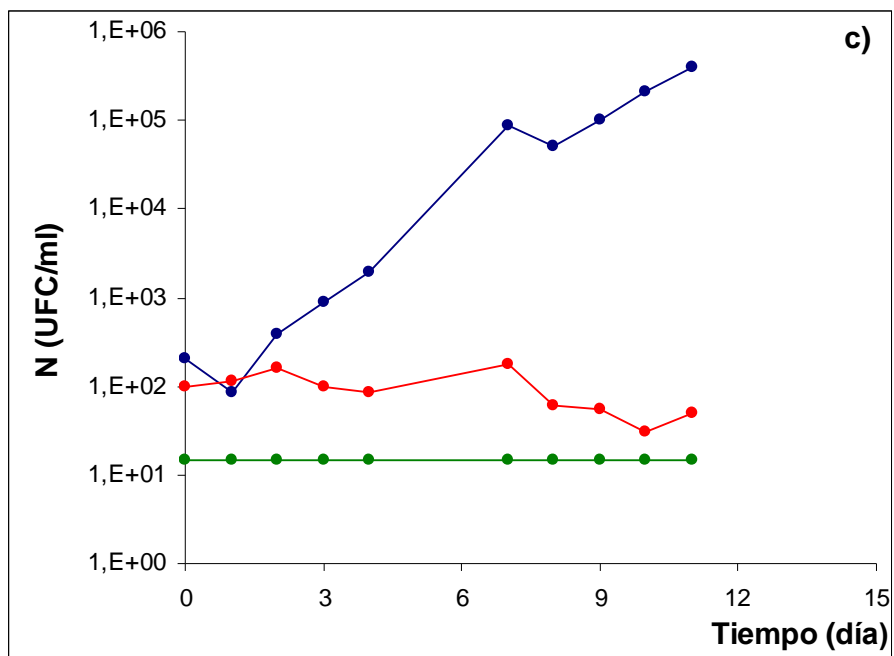
Evolución de la flora nativa durante el almacenamiento en refrigeración (5°C) de jugo de naranja. a) Aerobios mesófilos; b) Aerobios mesófilos ácido-tolerantes  
● jugo sin tratamiento (control); ● jugo procesado según tratamiento propuesto A;  
● jugo procesado según tratamiento propuesto B.



**Figura 4.5.1 (continuación)**

Evolución de la flora nativa durante el almacenamiento en refrigeración (5°C) de jugo de naranja. c) Hongos y levaduras

● jugo sin tratar (control); ● jugo procesado según tratamiento propuesto **A**; ● jugo procesado según tratamiento propuesto **B**.



durante el tiempo restante de la experiencia, aumentando levemente hacia el noveno día de almacenamiento.

Del total de los microorganismos mesófilos ( $\cong 5 \times 10^4$  UFC/ml de jugo sin tratar y  $\cong 1 \times 10^2$  UFC/ml de jugo sometido al tratamiento propuesto A) una parte resultó ácido-tolerante. Los recuentos de los microorganismos ácido-tolerantes mesófilos del jugo sin tratar aumentaron 1 ciclo logarítmico el primer día, permaneciendo constante en  $\cong 1 \times 10^3$  UFC/ml de jugo durante el resto tiempo de almacenamiento. Por el contrario, los recuentos correspondientes al jugo sometido al tratamiento propuesto A se mantuvieron en niveles bajos ( $\leq 5 \times 10^1$  UFC/ml de jugo) durante todo el almacenamiento del jugo de naranja en refrigeración (**Figura 4.5.1 b**).

Si bien se observó el desarrollo de algunos hongos filamentosos durante el almacenamiento, la mayor parte del recuento estuvo integrado por levaduras. Al inicio del almacenamiento, los recuentos de hongos y levaduras correspondientes al jugo de naranja procesado por el tratamiento **A** resultaron similares a los del jugo sin tratamiento ( $\cong 1 \times 10^2$  UFC/ml de jugo). Sin embargo, el recuento en el jugo control aumentó rápidamente con el tiempo de almacenamiento, hasta alcanzar niveles superiores a  $1 \times 10^5$  UFC/ml de jugo, evidenciando un deterioro del producto. Por el contrario, el tratamiento **A** inhibió el desarrollo de estos microorganismos durante el almacenamiento en refrigeración, hecho debido posiblemente a la combinación del tratamiento térmico con vainillina y citral (**Figura 4.5.1 c**).

Es posible concluir que el jugo de naranja procesado según el tratamiento propuesto **B**, mantuvo óptima estabilidad microbiológica durante los 14 días de almacenamiento en refrigeración. Es de destacar que el tratamiento propuesto **A**, si bien mostró menor severidad destruyendo la flora nativa inicial del jugo, mantuvo un control efectivo sobre los microorganismos sobrevivientes inhibiendo su proliferación e incluso inactivándolos, durante las dos semanas de almacenamiento refrigerado del producto. Este efecto estaría relacionado con el daño subletal provocado por el procesamiento térmico suave, reforzado por la presencia de los antimicrobianos vainillina y citral en el jugo de naranja. El tratamiento térmico suave provocaría una disrupción parcial de la membrana, alterando su permeabilidad y favoreciendo al mismo tiempo el ingreso de los antimicrobianos dentro de la célula, los cuales podrían interactuar con enzimas de membrana produciendo alteración de su

estructura con pérdida de funcionalidad, afectando la actividad celular y por lo tanto inhibiendo el crecimiento (Lanciotti y col., 2004).

#### 4.5.2- Estudio de reto microbiano

El estudio de reto microbiano se realizó con el objeto de evaluar la aptitud de los tratamientos propuestos para la eliminación de una eventual contaminación del jugo de naranja con el patógeno objeto de estudio: *L. monocytogenes*. En esta etapa se utilizó jugo de naranja obtenido en condiciones de esterilidad para evitar cualquier interferencia de la flora nativa. El mismo fue inoculado con *L. monocytogenes* y procesado según los tratamientos propuestos **A** ó **B**, fraccionado y almacenado a 5°C. El seguimiento de los recuentos se realizó a intervalos de tiempo regulares, durante 14 días, como se detalla en **Materiales y Métodos, apartado 3.12.5**.

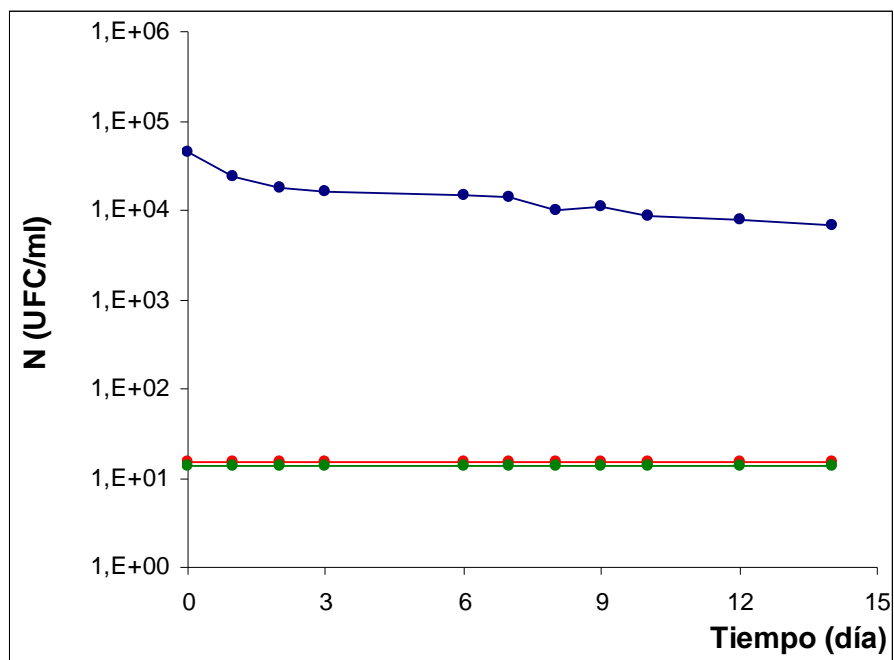
La evolución de los recuentos de *L. monocytogenes* se presenta en la **Figura 4.5.2**. En la misma se aprecia un efecto inhibitorio inicial muy marcado, tanto en el jugo sometido al tratamiento propuesto **B** (900 ppm vainillina + 25 ppm citral a 57°C) como en el jugo sometido al tratamiento propuesto **A** (900 ppm vainillina + 25 ppm citral a 52°C), manteniéndose dicho efecto durante todo el tiempo de almacenamiento. Este comportamiento contrastó con el del jugo sin tratar (control), que presentó una leve disminución de los recuentos iniciales ( $\cong 5 \times 10^4$  UFC/ml de jugo), a lo largo de toda la experiencia.

Considerando que los posibles niveles de contaminación de los alimentos con *L. monocytogenes* se encuentran muy por debajo de las concentraciones iniciales evaluadas en este trabajo ( $\cong 5 \times 10^4$  UFC/ml de jugo), se puede concluir que los dos tratamientos propuestos resultaron adecuados desde el punto de vista microbiológico, para la preservación del jugo de naranja durante al menos 14 días de almacenamiento en refrigeración (5°C).

**Figura 4.5.2**

Evolución de *L. monocytogenes* en jugo de naranja almacenado en refrigeración (5°C).

● jugo sin tratar (control); ● jugo procesado según tratamiento propuesto **A**; ● jugo procesado según tratamiento propuesto **B**.



### 4.5.3- Evolución del color en el almacenamiento

Con el propósito de determinar la evolución de los parámetros de calidad del jugo de naranja procesado según los métodos propuestos **A** y **B** almacenado en refrigeración, se estudió la evolución de los cambios de color durante 12 días de almacenamiento del mismo a 5°C, de acuerdo a lo especificado en **Materiales y Métodos, apartado 3.12.6**.

#### 4.5.3.1- Selección del espesor de muestra y funciones de color

Se seleccionó el espesor de muestra a utilizar en futuras mediciones, que permitiera lograr una mayor diferenciación instrumental del color entre dos muestras: jugo de naranja natural y jugo de naranja procesado según el tratamiento propuesto **B**. Tal como se detallara en **Materiales y Métodos, apartado 3.12.6.1**, mediante la medición instrumental de color se obtuvieron los valores triestímulo: X, Y y Z (espacio CIE) y también las correspondientes transformaciones matemáticas:  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (correspondientes al espacio CIE Lab) de forma automática. A través de los valores triestímulo se calcularon diversas funciones de color y se seleccionaron aquellas que representaron más sensiblemente la respuesta al cambio en el procesamiento de las muestras y/o en el espesor.

La medición instrumental de los parámetros del espacio CIELab ha sido ampliamente utilizada para describir la evolución del color de un sinnúmero de alimentos tales como miel (Pereyra Gonzáles y col., 1999); puré de banana mínimamente procesado (Guerrero y col., 1993); kiwi osmóticamente deshidratado (Talens y col., 2002); jugo de naranja (Meléndez-Martínez y col., 2005), entre otros. Particularmente en el caso de jugo de naranja, muchos autores (Meléndez-Martínez y col., 2005; Knorr y col., 2004; Roig y col., 1999; Petersen y col., 1998) han descrito adecuadamente los cambios de color del mismo durante el almacenamiento a través de las funciones  $L_{ab}^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  ó  $h^*$ .

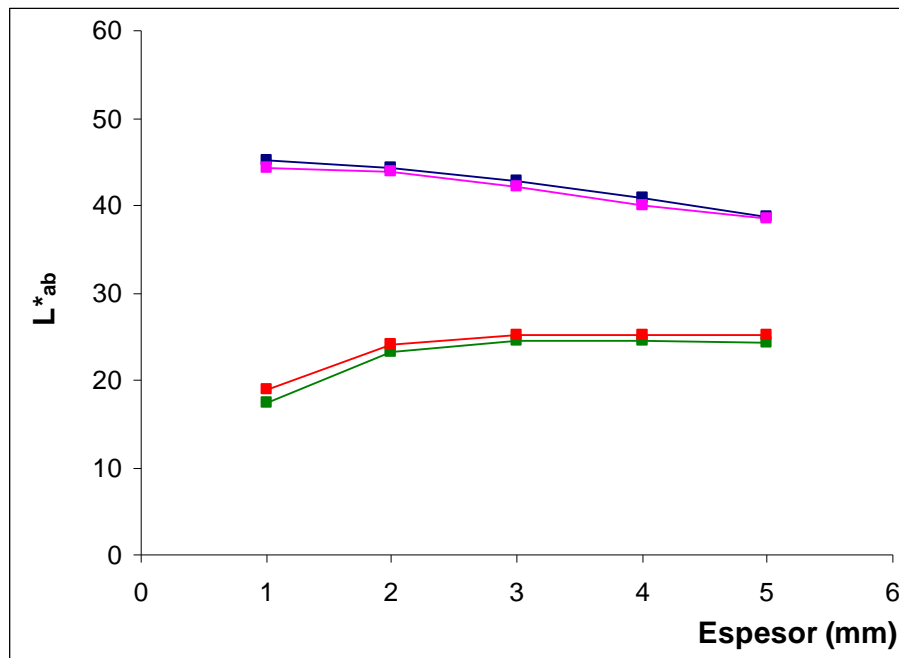
La **Figura 4.5.3** muestra variación de  $L_{ab}^*$  con el espesor de la muestra (1 - 5 mm) obtenida con fondos blanco y negro. En la misma se observa que el menor espesor evaluado presentó el valor más elevado  $L_{ab}^*$  con fondo blanco, que

**Figura 4.5.3**

Función  $L^*_{ab}$  obtenida para diferentes espesores de jugo de naranja utilizando fondos blanco y negro.

Fondo blanco: (■) jugo sin tratamiento (control); (■) jugo procesado según el tratamiento propuesto **B**.

Fondo negro: (■) jugo sin tratamiento (control); (■) jugo procesado según el tratamiento propuesto **B**.



correspondió al menor valor de la función con fondo negro. Es decir, que conforme aumentó el espesor de las muestras, los valores de la función calculados con fondo blanco se acercaron a los valores de la misma con fondo negro, sugiriendo que a mayores espesores (no evaluados) este tipo de muestra turbia tendería al comportamiento de muestra opaca.

Buera y Resnik, (1989) evaluaron la efectividad de las técnicas de medición en capa delgada y en profundidad (deep and thin layer techniques) para permitir la separación de muestras turbias en el espacio de color. Utilizaron distintas concentraciones de un suero de queso hidrolizado concentrado e intensamente pardeado, realizando las mediciones de color con diferentes espesores de muestra (1 mm - 17 mm). Ellos encontraron que esa muestra translúcida podía considerarse opaca con un espesor de 15 mm según los valores de  $X$ ,  $L_{ab}^*$ , y  $s_{uv}$ , ó 6 mm según los valores de  $Z$ , donde las lecturas realizadas con fondo blanco resultaron prácticamente coincidentes con las realizadas con fondo negro. Además estos autores observaron que espesores excesivos, cercanos a los de un sistema opaco, no permitieron una separación efectiva de las muestras evaluadas, excepto con las funciones  $L_{ab}^*$  y  $1/Z$ . Concluyeron que la reducción del espesor de la muestra expandió el espacio de color y que los espesores de 2 a 4 mm fueron los más apropiados para diferenciar muestras separadas por pequeñas diferencias de color, permitiendo el cálculo de la mayoría de las funciones.

Considerando los resultados obtenidos y datos aportados por la bibliografía se seleccionó un espesor de 3 mm para lograr una buena diferenciación del color entre dos muestras de jugo de naranja y poder calcular las funciones de color correspondientes.

#### **4.5.3.2- Evolución del color del jugo de naranja durante el almacenamiento refrigerado**

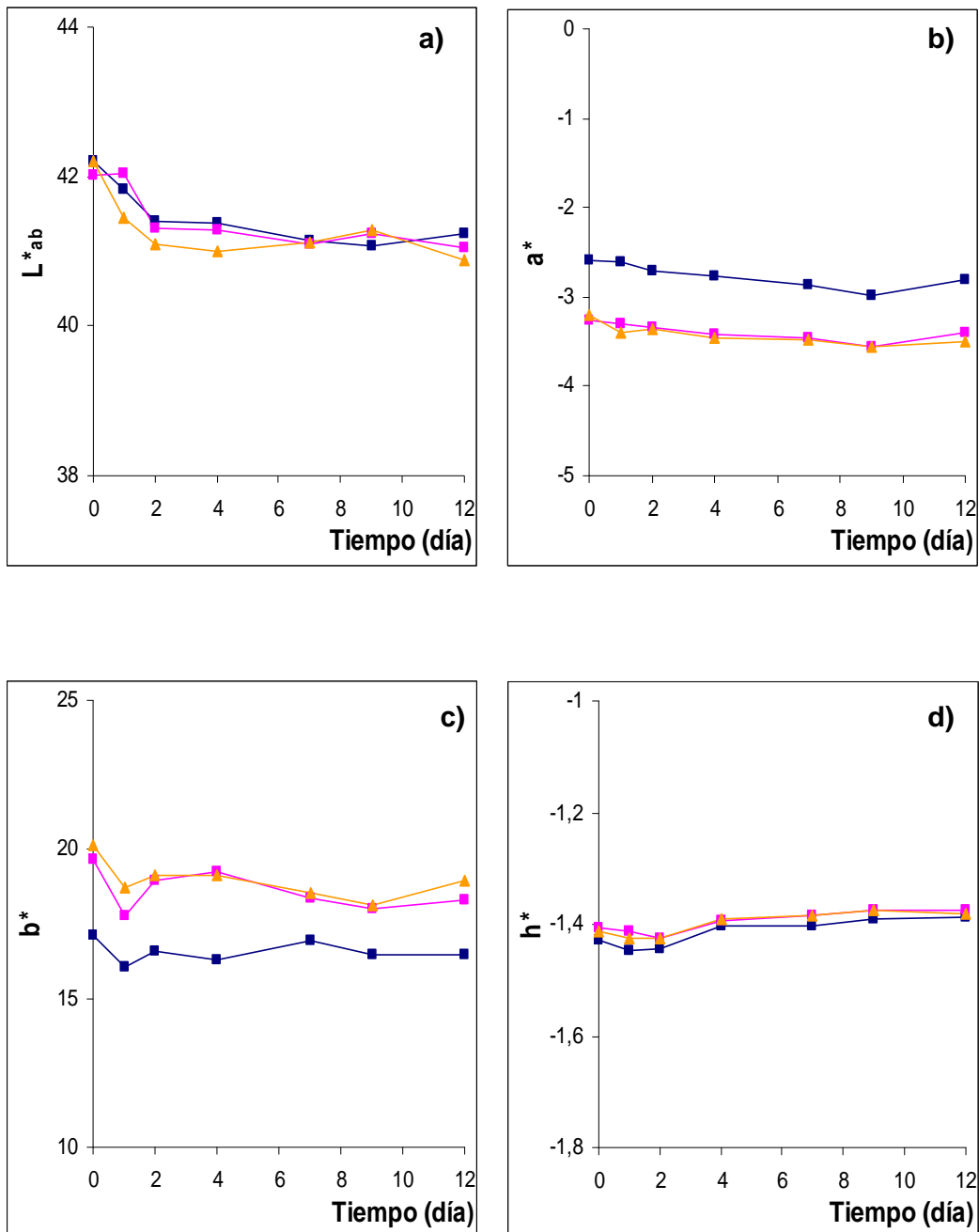
La **Figura 4.5.4** muestra la evolución del color de jugo de naranja procesado según los tratamientos propuestos **A** (900 ppm vainillina + 25 ppm citral tratado a 52°C durante 4'42") y **B** (900 ppm vainillina + 25 ppm citral



**Figura 4.5.4**

Evolución de las funciones de color con el almacenamiento a 5°C durante 12 días. (■) jugo sin tratamiento (control); (■) jugo procesado según el tratamiento propuesto **A**; (■) jugo procesado según el tratamiento propuesto **B**.

a) Luminosidad,  $L^*_{ab}$ ; b) función  $a^*$ ; c) función  $b^*$ ; d) ángulo de tono,  $h^*$



tratado a 57°C durante 1'18"), respecto del jugo natural sin tratamiento, según las funciones de color  $L_{ab}^*$ ;  $a^*$ ,  $b^*$  y  $h^*$ . Las mediciones se realizaron durante 12 días de almacenamiento, utilizando muestras de 3 mm de espesor, tal como se detalla en **Materiales y Métodos, apartado 3.12.6.2**. En la misma se observa una leve disminución de la luminosidad,  $L_{ab}^*$ , especialmente durante los dos primeros días de almacenamiento a 5°C. Por el contrario, los parámetros  $a^*$ ,  $b^*$  y el ángulo de tono  $h^*$  experimentaron leves fluctuaciones, permaneciendo en niveles aproximadamente constantes durante todo el tiempo de almacenamiento evaluado. Los valores negativos de  $a^*$  indicaron la presencia de un componente verde (clorofila remanente). El componente amarillo aportado por los carotenoides, característico del jugo de naranja, se manifestó a través valores positivos de  $b^*$ . Se observó además que el jugo sin tratamiento térmico presentó niveles superiores de  $L_{ab}^*$  y  $a^*$  desde el inicio de la experiencia y menores valores de  $b^*$  y  $h^*$ , que el jugo sometido a los tratamientos térmicos en combinación con vainillina y citral.

La diferencia de temperatura de 52°C a 57°C en el tratamiento térmico aplicado tuvo escasa influencia sobre  $a^*$ ,  $b^*$  y  $h^*$ , tomando mayor relevancia su efecto sobre  $L_{ab}^*$ , en detrimento del tratamiento realizado a 57°C, con el cual el jugo perdió mayor luminosidad a lo largo del almacenamiento. Este comportamiento es predecible, debido a que el tratamiento térmico favorece las reacciones de pardeamiento no enzimático que involucran principalmente grupos carbonilos, provenientes de azúcares ó el ácido ascórbico, los cuales a través de una serie de reacciones complejas se combinan con grupos amino generando melanoidinas insolubles en agua (Manso y col., 2001).

Estos resultados son comparables con los obtenidos por otros autores que evaluaron color de jugos almacenados. Knorr y col. (2004), estudiaron la evolución del color de jugo de naranja sometido a tratamiento térmico (60°C, 36 segundos) almacenado a 20°C durante 50 días. Los autores reportaron valores de  $a^*$  negativos con leves fluctuaciones y valores de  $b^*$  con tendencia decreciente, mientras que los valores de  $L_{ab}^*$ , disminuyeron más marcadamente al inicio del almacenamiento, hasta el séptimo día, a partir del cual el descenso fue más gradual. Esteve y col., (2005), evaluaron cambios en  $L_{ab}^*$ ;  $a^*$  y  $b^*$  durante el almacenamiento de cuatro muestras de jugo de naranja mínimamente pasteurizado (77°C por 20 segundos) y

refrigerado, provenientes de diferentes empresas productoras. Estos autores reportaron que durante el almacenamiento a 4°C hubo una pequeña disminución de  $L_{ab}^*$  y leves variaciones en los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  aunque las mismas resultaron no significativas.

Petersen y col. (1998), compararon los cambios de color producidos en jugo de naranja preparados a partir de la reconstitución de jugos concentrados durante almacenamientos a 4 y 20°C y almacenamientos acelerados a 30, 40 y 50°C por 20 días. Estos autores encontraron un efecto pronunciado de la temperatura de almacenamiento sobre los valores de  $a^*$  que cambiaron hacia valores positivos (tornándose más rojizo) a partir de los 5 días de almacenamiento a 40°C y 50°C, permaneciendo prácticamente inalterado en el jugo almacenado a 4°C y 20°C. Observaron también disminuciones marcadas de  $L_{ab}^*$  y  $b^*$  con el almacenamiento a temperaturas entre 30 y 50°C, resultando el jugo más oscuro y menos amarillo. Concluyeron que el almacenamiento a 4° y 20°C retuvo buena calidad sensorial durante los 20 días.

Roig y col., (1999), sugirieron que la reacción predominante en el pardeamiento de jugo de naranja almacenado a 5°C es la descomposición del ácido ascórbico por oxidación y la consiguiente formación de intermediarios muy reactivos que forman pigmentos marrones. Estos autores demostraron que la estabilidad del ácido L-ascórbico disminuyó en función del tiempo y la temperatura de almacenamiento, reportando una retención de 60,4% después del almacenamiento por 64 días a 4°C, mientras que a 20°C la misma fue de 48,6% y a 37°C del 11,9%, durante el mismo período de tiempo. El aumento del 5-hidroximetilfuraldehído fue dependiente de la pérdida de ácido L-ascórbico aunque ocurrió a bajas velocidades a 4°C. Asimismo reportaron que la absorbancia medida a 420 nm ( $\lambda$  donde se produjo la máxima absorbancia en jugos pardeados), aumentó conforme disminuyó la concentración de ácido ascórbico, y que la adición de más ácido ascórbico fue contraproducente, incrementando el pardeamiento.

De los resultados expuestos de puede concluir que los tratamientos propuestos **A** y **B** introdujeron modificaciones leves en el color del jugo de naranja, respecto del jugo natural y se comprobó que el mismo retuvo sus características,

con una leve pérdida de luminosidad, durante las dos semanas de almacenamiento que se pretende alcanzar en un jugo mínimamente procesado.

#### 4.5.4- Análisis sensorial

Se evaluaron los cambios sensoriales que la temperatura de tratamiento térmico y los aditivos vainillina y/o citral introdujeron en jugo de naranja procesado según los tratamientos propuestos **A** y **B**. Para ello se realizaron distintas pruebas sensoriales tal como se describió en **Materiales y Métodos, apartado 3.12**, en las que se evaluaron algunos aspectos relevantes de los jugos tratados según la metodología propuesta.

##### 4.5.4.1- Prueba de Triángulo Ampliado

Esta prueba discriminativa se realizó con el fin de determinar si los dos procesos de preservación propuestos inferían al jugo características sensoriales (sabor, aroma, color, viscosidad; etc.) que los hicieran perceptiblemente diferentes.

Participaron de la prueba 42 jueces no entrenados, según la metodología detallada en **Materiales y Métodos, apartado 3.12.7.1**. La prueba se realizó por simplificado ya que este tipo de pruebas no requieren repetición.

La **Tabla 4.5.1** exhibe los resultados brindados por cada juez y el total de respuestas correctas e incorrectas. El número de juicios correctos resultantes (14), fue menor que el número mínimo de juicios correctos requerido (20) tabulado para 42 panelistas (ver **Materiales y Métodos, Tabla 1.12.1**), para establecer la significación de la diferencia a un nivel de probabilidad del 95%. Se concluyó que no existieron diferencias significativas ( $\alpha$ : 0,05) entre los jugos tratados por los tratamientos propuestos **A** y **B**, respecto de su percepción sensorial global.

Algunos comentarios explicando el tipo de diferencia encontrada fueron:

La muestra diferente:

- “era más ácida”
- “tenía sabor más suave”
- “tenía diferente color”
- “Las muestras eran muy parecidas”

**Tabla 4.5.1**

Respuestas emitidas por los jueces en el test de triángulo ampliado para la evaluación de jugo de naranja procesado según los tratamientos propuestos **A** (900 ppm vainillina + 25 ppm citral tratado a 52°C durante 4'42'') y **B** (900 ppm vainillina + 25 ppm citral tratado a 57°C durante 1'18'').

Sujeto	Resultado	Sujeto	Resultado
1	I	22	I
2	I	23	I
3	C	24	I
4	I	25	I
5	I	26	C
6	I	27	I
7	I	28	I
8	I	29	C
9	I	30	I
10	C	31	C
11	C	32	I
12	I	33	I
13	I	34	I
14	C	35	C
15	C	36	I
16	I	37	C
17	C	38	I
18	I	39	C
19	I	40	I
20	C	41	I
21	I	42	C

C: respuesta correcta  
I: respuesta incorrecta

**Total de respuestas correctas: 14**

**Total de respuestas incorrectas: 28**

Dado que según la prueba del triángulo realizada, no existieron diferencias significativas respecto de la percepción sensorial global entre los jugos tratados por los tratamientos propuestos **A** y **B**, se seleccionó uno de los tratamientos para evaluar la impresión global del consumidor. La tecnología combinada propuesta por el tratamiento **A** fue la elegida, debido a que la misma involucró una menor temperatura de tratamiento térmico, optimizándose el procesamiento mínimo del jugo de naranja.

#### **4.5.4.2- Test de Campo con Consumidores**

Se realizó un test de campo con consumidores con el objeto de evaluar la aceptación global (ó impresión global) y algunas características del jugo de naranja procesado por el método propuesto **A** (adicionado con 900 ppm de vainillina y 25 ppm de citral, tratado a 52°C durante 4'42") según la metodología descrita en **Materiales y Métodos, apartado 3.12.6.2**. Para ello se diseñaron cuidadosamente todas las preguntas y se ubicó cada una en determinado orden dentro de los formularios según las consideraciones explicadas en **Introducción, apartado 1.12.6.2**.

Cada categoría de la escala hedónica balanceada de 9 puntos utilizada en la evaluación de la impresión global, fue convertida a una puntuación entre 1 y 9, desde 1: "me disgusta extremadamente" a 9: "me gusta extremadamente". Los estadísticos descriptivos de la distribución de resultados obtenidos para impresión global se presentan en la **Tabla 4.5.2**

La impresión global promedio para los 85 jueces del jugo tratado por el tratamiento propuesto **A** fue de 6,02 puntos, correspondiendo a la categoría "me gusta algo", en la escala de nueve puntos.

La **Figura 4.5.5** muestra la distribución de frecuencias de los puntajes asignados por los panelistas. En la misma se puede apreciar que la frecuencia de puntajes obtenida no siguió una distribución normal, echo que se confirmó aplicando un test Chi-cuadrado de bondad de ajuste.

**Tabla 4.5.2**

Análisis estadístico de los resultados obtenidos para la impresión global de jugo de naranja procesado según el tratamiento propuesto **A**

---

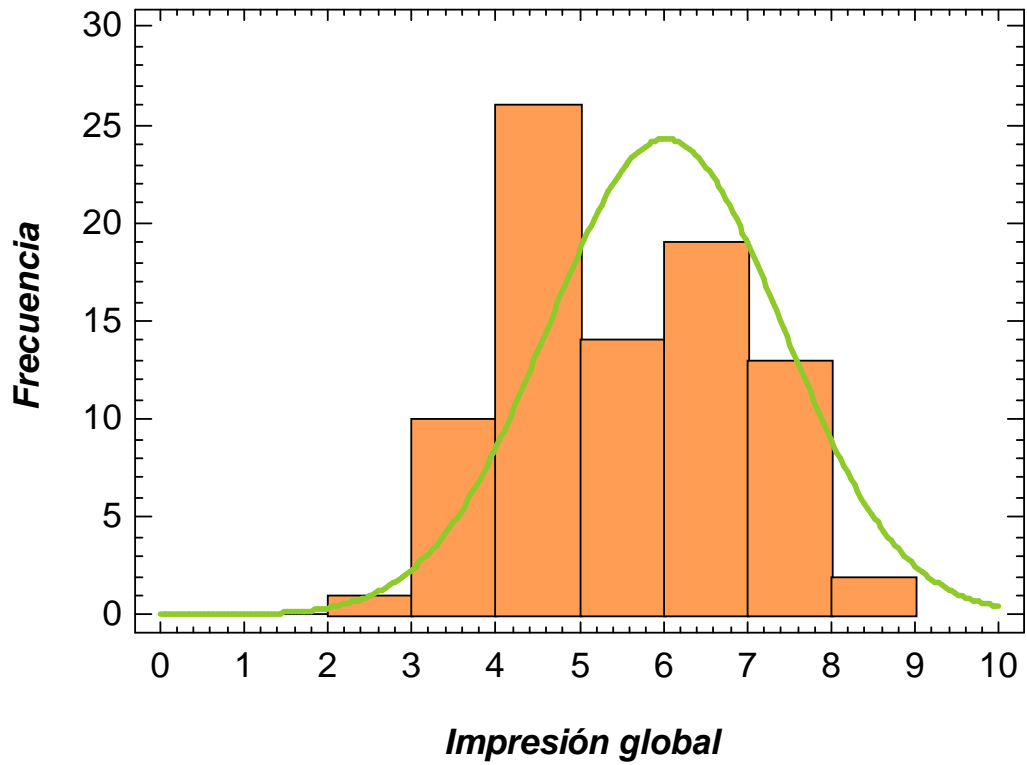
Nº sujetos	85
Promedio	6,02
Desviación estándar	1,40
Rango	6
Valor mínimo	3
Valor máximo	9

---



**Figura 4.5.5**

Distribución de frecuencias de los puntajes asignados por los panelistas para la evaluación de impresión global de jugo de naranja procesado por el tratamiento propuesto **A**



El test de Chi cuadrado se aplicó estableciendo el siguiente test de hipótesis:

- Hipótesis nula,  $H_0$ : los valores asignados por los participantes a la impresión global del jugo de naranja siguen una distribución normal.
- Hipótesis alternativa,  $H_a$ : los valores asignados por los participantes a la impresión global del jugo de naranja no siguen una distribución normal

Todo el rango de datos de impresión global se dividió en intervalos ó clases y se calculó si el número de observaciones de cada clase (frecuencia observada) difirió significativamente del valor esperado para la distribución normal (frecuencia esperada), obteniéndose los siguientes resultados:

$$\chi^2_{(3;0,01)} = 22,2 \quad \langle \rangle \quad \chi^2_{\text{tablas}(3;0,01)} = 11,3$$

Por lo tanto, se concluyó que existen diferencias significativas entre la distribución de los datos de impresión global obtenida y la distribución normal, refutándose la hipótesis nula con un nivel de significación del 1%.

Resulta interesante destacar algunos comentarios realizados en respuesta a las dos preguntas libres que se formularon, acerca de qué fue lo que gustó o no gustó del jugo.

Lo que gustó del producto:

- “buen aspecto a la vista, no presenta turbidez”
- “el gusto es novedoso”
- “el sabor a vainilla”
- “es suave y fresco, es agradable y no tan dulce”
- “es rico y tiene gusto a naranja exprimida”
- “la consistencia, no es tan espeso”
- “me gusta en general”
- “el color”

Lo que no gustó del producto:

- “es un sabor raro que no había experimentado antes”
- “le falta un poco de sabor, me gustaría que fuera más ácido”
- “tiene un gusto a algo que las naranjas no tienen”

Según lo comentado por los panelistas en respuesta a las preguntas libres, la puntuación global obtenida no fue totalmente satisfactoria. Esto pudo deberse a que algunos jueces no comprendieron claramente la consigna, la cual consistía en evaluar un producto novedoso, diferente a los encontrados actualmente en el mercado, incurriendo posiblemente en un error de expectativa. Este es un tipo de error muy habitual en evaluación sensorial, en el que el juez sabe ó presume saber el tipo de estímulo que va a encontrar e infiere el sabor, aroma ó color que debería tener el producto (Lawless y Heymann, 1999). Asimismo, la información obtenida resultó muy relevante para llevar a cabo futuras investigaciones con el propósito de mejorar algunas cualidades organolépticas del producto final.

Adicionalmente se evaluaron características específicas del jugo como el sabor cítrico, sabor a vainilla (utilizando escalas de punto adecuado de 9 puntos) y el sabor a cocido resultante del tratamiento térmico (utilizando escalas de intensidad de 9 puntos), tal como lo muestra la planilla presentada a los participantes (ver **Materiales y Métodos, apartado 3.12.6.2**). A través de estas pruebas se buscó determinar las razones que motivaron los resultados de impresión global y realizar un diagnóstico de los atributos principales.

Convirtiendo las marcas realizadas por los participantes en las escalas correspondientes a sabor cítrico, cocido y vainilla a una puntuación entre 1 y 9 según: 1: “sabor demasiado débil” y 9: “sabor demasiado fuerte”, se calculó el porcentaje de sujetos que respondió en cada puntuación de la escala. Dichos resultados se exhiben en la **Tabla 4.5.3**.

El mayor porcentaje de las respuestas asignadas para el sabor cítrico (23,5%) se ubicó en los 5 puntos, correspondiendo al punto marcado como “adecuado” (**Tabla 4.5.3.a**). En cambio el mayor porcentaje de respuestas asignadas al sabor a vainilla (22,4% de las respuestas), fue de 7 puntos, correspondiendo a una marca intermedia entre “adecuado” y “demasiado fuerte”. Sin embargo otro grupo

**Tabla 4.5.3**

Evaluación del sabor cítrico (a) y el sabor a vainilla (b) y sabor a cocido (c) de jugo de naranja procesado según el tratamiento propuesto **A**

**a) Escala de punto adecuado**

<b>SABOR CÍTRICO</b>									
<b>CATEGORÍA</b>	demasiado débil		adecuado					demasiado fuerte	
<b>PUNTAJE</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>% RESPUESTA</b>	1,7	8,2	7,1	9,4	23,5	18,8	15,3	11,8	3,5

**b) Escala de punto adecuado**

<b>SABOR A VAINILLA</b>									
<b>CATEGORÍA</b>	demasiado débil		adecuado					demasiado fuerte	
<b>PUNTAJE</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>% RESPUESTA</b>	5,9	9,4	10,6	3,5	16,5	5,6	22,4	17,6	8,2

**c) Escala de intensidad**

<b>SABOR A COCIDO</b>									
<b>CATEGORÍA</b>	Nada				Mucho				
<b>PUNTAJE</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>% RESPUESTA</b>	0	4,6	16,5	11,8	16,5	22,3	23,5	2,4	2,4

minoritario de jueces (16,5 %) consideró que el sabor a vainilla fue adecuado (5 puntos), denotando la existencia de dos segmentos de consumidores: un grupo menor que prefirió niveles intensos de sabor a vainilla y otro grupo que prefirió menor intensidad (**Tabla 4.5.3.b**).

Estas escalas de punto adecuado combinan información sobre intensidad de atributos y juicios hedónicos, permitiendo calificar al atributo respecto del criterio que el sujeto tenga en su mente como el nivel adecuado. Dichas escalas resultaron muy útiles en la determinación de los niveles óptimos de los atributos, a considerar en una posterior reformulación u optimización del jugo.

Lawless y Heymann (1999) en desacuerdo con este procedimiento, afirma que los consumidores expresan gusto o disgusto por un producto en base a una percepción sensorial integrada. El autor argumenta que los consumidores deciden rápidamente si un producto les gusta o no, sin evaluar sus atributos por separado, respondiendo sobre el producto como un todo. Los panelistas entrenados, en cambio, son alentados a dejar sus preferencias y gustos de lado, para adoptar un ángulo objetivo, analizando los atributos del producto en gran detalle. Concluye que para los consumidores es complejo responder a los dos tipos de preguntas en un mismo cuestionario, pues se les pide que piensen de dos maneras diferentes.

Meilgaard y col. (1999) coincide en que la utilización de escalas hedónicas por atributos y/o de preferencia por atributo con consumidores es poco efectiva, debido a que tienden a asignar el mismo puntaje de la respuesta global a los atributos individuales, resultando una lista de atributos que tienen un “halo” de la respuesta general. Además, si un atributo recibe un puntaje pobre, no hay manera de determinar la dirección del desagrado. Sin embargo, considera que los consumidores tienen la capacidad de evaluar atributos utilizando escalas apropiadas, como las escalas de intensidad de atributos y las escalas de punto adecuado (utilizadas en este trabajo), que informan el nivel de intensidad del atributo en relación a algún criterio mental de lo que el consumidor considera como adecuado.

Otros autores han utilizado con éxito un panel de consumidores para la evaluación de atributos en diferentes escalas. Castañón y col., (1999) compararon las características sensoriales de purés de banana adicionados con vainillina (3000ppm), ó con un antimicrobiano tradicionalmente utilizado en alimentos, como

es el sorbato de potasio (1000 ppm), usando una escala hedónica de 9 puntos. Según el panel de 50 jueces no entrenados, los purés presentaron aromas significativamente diferentes, prefiriendo el puré con agregado de vainillina (puntaje promedio de 6,1 vs. 4,9); así como también difirieron significativamente respecto del flavor asignando mayor puntaje al puré adicionado con sorbato de potasio (6,8 vs. 5,8).

El agregado de vainillina produce modificaciones en el flavor muy compatibles con productos a base de frutas. Cerruti y Alzamora, (1996) estudiaron la aceptabilidad de purés de manzana, pera, ciruela y banana, adicionados con diferentes concentraciones de vainillina, a través de escalas hedónicas de dos categorías (Aceptable/No aceptable) utilizando un panel no entrenado. Los purés adicionados con concentraciones de hasta 3000 ppm de vainillina resultaron aceptables, presentando un agradable aroma a vainilla y manteniendo el sabor propio de la fruta.

Ferrante (2004), comparó la impresión global de un panel de 60 consumidores de jugo de naranja sin aditivos respecto del mismo jugo adicionado con 1500 ppm de vainillina, y jugo con 1000 ppm de vainillina y 75 ppm de citral. La autora encontró diferencias significativas entre los puntajes otorgados para los jugos adicionados (los cuales obtuvieron una calificación cercana a 6 puntos correspondiente a la categoría “me gusta algo” en una escala hedónica de 9 puntos) y el jugo de naranja sin aditivos, que obtuvo una puntuación promedio cercana a la categoría “me gusta mucho” (8 puntos). Estos resultados son comparables a los obtenidos en el presente trabajo, dónde se utilizaron menores proporciones tanto de vainillina como de citral.

La intensidad del sabor a cocido, consecuencia del procesamiento térmico, se evaluó por medio de una escala lineal de nueve puntos con extremos reconocidos mediante anclas por los evaluadores como “nada” y “mucho” sabor a cocido (ver **Materiales y Métodos, apartado 3.12.6.2**). Los mayores porcentajes de las respuestas (22,3 y 23,5%) se ubicaron entre los 6 y 7 puntos de la escala, correspondiendo a una intensidad moderada de sabor a cocido (**Tabla 4.5.3.c**).

Calderón y col., (1999) en un estudio interlaboratorio coordinado por el programa CYTED (Proyecto XI.4 ; subprograma XI), utilizaron una escala de intensidad para el sabor a cocido, en la evaluación de jugo de naranja

pasteurizado. Durante el entrenamiento de los evaluadores se les presentaron muestras especialmente preparadas con diferente intensidad de sabor a cocido, para luego utilizar una escala verbal en la evaluación definitiva de las muestras. Dado que en el estudio realizado en esta tesis se utilizó un grupo de personas no entrenadas, se consideró adecuada la presentación de anclas que definieran los extremos, al momento de la evaluación de la muestra problema.

Estudios sensoriales realizados con el fin de evaluar el efecto del tratamiento térmico sobre la frescura de jugo de mandarina, demostraron que los jugos sometidos a 50°C ó 60°C durante 10 segundos en un intercambiador de calor de platos, no resultaron significativamente diferentes al jugo fresco (sin tratar). En cambio, los tests de ranking revelaron diferencias significativas en la frescura del jugo tratado a temperaturas entre 70°C y 90°C, encontrándose diferencias adicionales cuando se lo trató a 95°C (Sentandreu y col., 2005).

Calculando las puntuaciones promedio de los atributos evaluados, se elaboró el perfil sensorial del jugo procesado por el tratamiento propuesto **A**, representado a través de un gráfico tipo “araña”, esquematizado en la **Figura 4.5.6** Si bien los mayores porcentajes de respuestas para sabor a vainillina y sabor a cocido, se ubicaron entre los 6 y 7 puntos de las correspondientes escalas, el diagrama permite observar que el perfil resultante del promedio de los puntajes otorgados por todos los participantes, estuvo muy cercano al valor central de las escalas (algo más de 5 puntos).

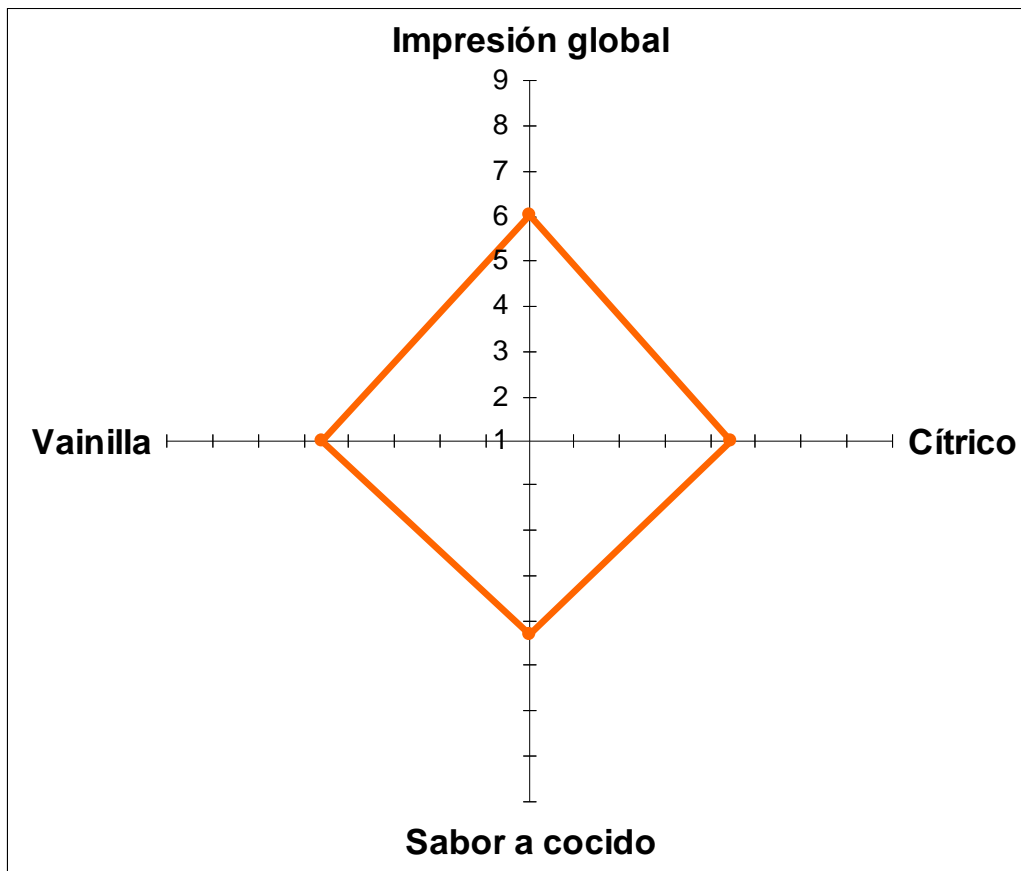
Este estudio orientativo realizado con consumidores permitió confirmar que, si bien se evidenció una modificación lógica del flavor del jugo natural debido a la adición de los antimicrobianos naturales y al tratamiento térmico, la impresión global del jugo de naranja procesado por el método propuesto **A** resultó satisfactoria.

#### **4.5.4.3- Test de Diferencia Contra Control durante el almacenamiento**

En esta prueba, los panelistas analizaron la magnitud de la diferencia global entre tres muestras de jugo de naranja procesado por el tratamiento propuesto **A** y

**Figura 4.5.6**

Perfil sensorial del jugo procesado por el tratamiento propuesto **A**





almacenado durante diferente tiempo, respecto del control sin almacenar, con el propósito de evaluar la influencia del tiempo de almacenamiento en la percepción sensorial del producto, según se detalla en **Materiales y Métodos, apartado 3.12.6.3.**

Las muestras evaluadas frente al control (jugo sin almacenamiento) reconocido como tal fueron:

- Control camuflado (C)
- Jugo almacenado 7 días (D)
- Jugo almacenado 14 días (E)

Se incluyó un control camuflado a comparar con el control reconocido como tal, con el objeto de evaluar el efecto “placebo”. Con los resultados obtenidos a partir de la escala numérica y verbal de categorías (desde 1: “ninguna” diferencia a 9: “muy grande”), se calculó la diferencia media correspondiente a cada muestra y al control camuflado, respecto del control identificado como tal.

Las puntuaciones promedio obtenidas para cada una de las muestras evaluadas fue la siguiente:

- Control camuflado (sin almacenamiento) (C): 3,43
- Jugo almacenado 7 días (D): 3,90
- Jugo almacenado 14 días (E): 5,78

La diferencia contra control promedio obtenida por el jugo almacenado por 14 días resultó próxima a la categoría “grande”, y el jugo almacenado por 7 días resultó próximo a la categoría de “moderada” diferencia. Sin embargo el control camuflado obtuvo un puntaje cercano al jugo almacenado por 7 días.

La **Tabla 4.5.4** resume el test de ANOVA de dos factores realizado. El mismo indicó que los juicios emitidos por los sujetos no fueron significativamente diferentes ( $F_{\text{sujeto}} < F_{\text{crítico sujetos}}$ ) a un nivel del 5%, por lo que

**Tabla 4.5.4**

Análisis de varianza para las posiciones asignadas por los participantes a las diferencias encontradas entre muestras de jugo de naranja procesado según el tratamiento propuesto **A**, y almacenado a 5°C por 7 y 14 días, respecto del control sin almacenamiento.

<b>FUENTE</b>	<b>gl</b>	<b>SUMA DE CUADRADOS</b>	<b>MEDIA DE CUADRADOS</b>	<b>F</b>	<b>F<sub>crítico</sub></b>
MUESTRA	2	123,5	61,7	16,25	3,11
SUJETO	39	191,9	4,91	1,29	1,55
ERROR	78	296,5	3,8		
TOTAL	119	611,9			

si bien se trabajó con un panel no entrenado, existió coherencia entre sus integrantes, los cuales evaluaron las muestras comportándose como un grupo.

El análisis de varianza también permitió determinar que se manifestaron diferencias significativas en cuanto a la diferencia contra control de los diferentes tiempos de almacenamiento evaluados ( $F_{\text{almacenamiento}} > F_{\text{crítico muestras}}$ ). Con el propósito de comparar las medias y determinar cuales de las diferencias contra control fueron significativamente diferentes entre sí, se procedió a realizar un test de comparaciones múltiples, calculando la mínima diferencia significativa de Fisher (MDS), según la **ecuación 6.30** descrita en el **apéndice de Procedimientos Estadísticos, apartado 6.14.1**. La  $MDS_{5\%}$ , se calculó reemplazando en la ecuación el valor de t-Student obtenido de la **Tabla 6.6.1** con  $\alpha/2$  y 78 grados de libertad; la media de la suma de cuadrados del error (MSE); y siendo  $n$ , en este caso, el número de panelistas (40). El valor resultante de  $MSD_{5\%}$  fue de 0,87. Los pares de medias cuyas diferencias excedieron dicho valor se consideraron estadísticamente diferentes. Las diferencias entre las medias de las muestras C - E (jugo control camuflado - jugo almacenado durante 14 días) y las muestras D y E (jugo almacenado durante 7 días - jugo almacenado durante 14 días) exceden el valor hallado. Los participantes no encontraron diferencias significativas entre el jugo almacenado durante 7 días (D) y el jugo fresco (control camuflado).

Este estudio puso de manifiesto la importancia de la inclusión de un control camuflado, particularmente cuando se trabaja con panelistas no entrenados, para detectar el efecto placebo. De esta manera, se pudieron comparar los puntajes relativos asignados, considerando el control camuflado respecto del cual habría “ninguna” diferencia con jugo almacenado durante una semana y una “ligera” diferencia con el jugo almacenado durante 14 días.

Considerando estos resultados, se concluyó que los cambios sensoriales respecto del control, percibidos luego de una semana de almacenamiento en refrigeración fueron de escasa significación, incrementándose dicha diferencia con la extensión del almacenamiento del jugo de naranja.

El perfil sensorial resultante del promedio de los puntajes, demostró que la adición de los antimicrobianos naturales vainillina (900 ppm) y citral (25 ppm) fue aceptable, pudiéndose considerar la modificación de los niveles de vainillina

en futuras reformulaciones, para satisfacer al mayor segmento de la población que prefirió niveles menos intensos. La bebida propuesta representa una nueva alternativa a la demanda de productos naturales con una vida útil extendida



Este estudio permitió aportar información cuantitativa relevante acerca de la influencia de una tecnología de preservación de jugo de naranja, combinada e innovadora, la cual involucra la adición de antimicrobianos naturales y tratamiento térmico suave, sobre el desarrollo de un microorganismo subrogante de un patógeno de relevancia. También proveyó valiosa información acerca de la implementación del tratamiento combinado en flujo continuo en escala piloto ó bien en sistema batch y sus consecuencias en la calidad organoléptica y microbiológica del producto. En particular se puede afirmar que:

- El medio base ATS-E ó CTS-E adicionado con 1% de piruvato de sodio resultó ser el más apropiado para recuperación de microorganismos injuriados térmicamente (*L. innocua* y *L. monocytogenes*) por lo que fue seleccionado para las futuras investigaciones. Las variables estudiadas que influyeron en mayor medida en la recuperación de las células fueron la temperatura de tratamiento térmico y el medio de cultivo empleado. El recuento observado en todos los medios de cultivos evaluados dependió la temperatura de tratamiento térmico utilizada.
- Se comprobó el efecto beneficioso de la combinación de los factores de estrés: tratamiento térmico suave (14 segundos/57°C-61°C en el equipo de flujo continuo UHT/HTST) y agregado de vainillina (500 - 1100 ppm) utilizados en el procesamiento de jugo de naranja en flujo continuo. Una herramienta estadística, la Metodología de Superficies de Respuesta, permitió determinar las variables de mayor peso en la inactivación de *L. innocua* además de predecir múltiples combinaciones de los factores de estrés dentro de los rangos evaluados que resultarían efectivas (900-1100ppm vainillina/61°C) cumpliendo con el requerimiento de la FDA de 5 reducciones logarítmicas para el microorganismo de relevancia.
- La utilización de antimicrobianos de origen natural (vainillina y/o citral) en reemplazo de los conservantes sintéticos, representó una buena alternativa para reducir la resistencia de *L. innocua*, aumentando la efectividad de tratamientos tradicionales como la pasteurización y

permitiendo disminuir la severidad de los mismos, contribuyendo a la formulación de un jugo mínimamente procesado.

- La optimización del tratamiento combinado que incluye adición de vainillina (500 a 1100 ppm) y/o citral (25 y 75 ppm) y tratamiento térmico suave (52°C-61°C) en sistema batch permitió un estudio cinético más preciso, un mejor control de las variables del proceso y una adecuada caracterización de la conducta microbiana.
- La aplicación de modelos matemáticos no lineales conceptualmente diferentes como el modelo de Gompertz modificado y el modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull, resultó muy útil para explicar de forma más completa la inactivación del microorganismo estudiado en los distintos sistemas evaluados, brindando información complementaria para la selección de las combinaciones más efectivas y seguras desde el punto de vista microbiológico.
- Este estudio de modelado predictivo permitió establecer que el agregado de pequeñas dosis de citral incrementó notablemente la efectividad del tratamiento combinado que incluía adición de vainillina y tratamiento térmico suave para todas las condiciones evaluadas
- En base a la información obtenida por dichos modelos matemáticos, así como también teniendo en cuenta el concepto procesamiento mínimo, se propusieron dos tratamientos alternativos en sistema batch que cumplieren con el requerimiento de la FDA antes mencionado. Estos tratamientos incluyeron la adición de vainillina y citral en bajas proporciones, tratamiento térmico a 52°C ó 57°C y almacenamiento refrigerado durante una semana.
- Los resultados satisfactorios obtenidos en los estudios de color y pruebas sensoriales, permitieron afirmar que los cambios organolépticos introducidos en el jugo procesado por los tratamientos propuestos

fueron leves durante el tiempo de vida útil propuesto, y que la bebida a base de jugo de naranja resultante puede considerarse un producto innovador.





**6- APÉNDICE: PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS**

Esta sección presenta algunos métodos que fueron utilizados para realizar el análisis estadístico de la información que surgió de las investigaciones realizadas (modelado matemático, estudio de color, análisis sensorial). Algunos métodos son de aplicación general, mientras que otros son específicos para la metodología aplicada.

## 6.1-Definiciones

Una *población estadística* se define como un conjunto completo de elementos de interés. Las medidas tomadas sobre los elementos de una población están gobernadas por una distribución de probabilidad, usualmente expresada en forma de ecuación matemática, la cual relaciona la ocurrencia de un valor específico con la probabilidad de dicha ocurrencia.

La *distribución normal* es una de las distribuciones que más comúnmente se manifiesta. Existen otras distribuciones, como la de Poisson y la Binomial, las cuales se aproximan a una distribución normal cuando el tamaño de una muestra es grande.

En general, los test estadísticos asumen que la población de una serie de mediciones realizadas en un experimento sigue una distribución normal. De hecho existen procedimientos estadísticos para verificar esta suposición (Zar, 1999). La forma de la función de distribución normal es:

$$f(x) = \left(1/\sqrt{2\pi}\sigma\right) \cdot \exp\left[ -(Y - \bar{Y})^2 / 2\sigma^2 \right] \quad (6.1)$$

Donde:

exp = función exponencial con base e

Y= medición realizada

$\bar{Y}$  = media del total de las mediciones

$\sigma$  = desviación estándar

$\sigma^2$  = varianza

Existen cantidades determinadas asociadas a una distribución, las cuales son llamadas normalmente *parámetros*. Los valores de los parámetros proveen información acerca de la población estadística. Así, por ejemplo, para la distribución normal la media  $\bar{Y}$  representa el promedio de las mediciones y la desviación estándar  $\sigma$  y varianza  $\sigma^2$  miden la dispersión o esparcimiento de las mediciones entorno a la media  $\bar{Y}$ .

El campo de aplicaciones estadísticas puede dividirse en dos áreas generales: *estimación e inferencia*.

En estadística aplicada se asume que la forma de la distribución aplicada es conocida pero no así los parámetros que la representan. Los mismos deben ser estimados mediante la aplicación de funciones matemáticas a las mediciones obtenidas. Los datos estadísticos extraídos de dichas funciones se denominan *estimadores*.

Muchas veces se desea determinar si es razonable pensar que una determinada situación, llamada *hipótesis nula* ( $H_0$ ), se manifieste dentro de la población. El analista, basado en el conocimiento de la forma de la distribución de probabilidad y asumiendo inicialmente que dicha hipótesis nula es cierta, usa la información que surge de las mediciones en forma de datos estadísticos para calcular la probabilidad de que dicha situación exista. La *hipótesis alternativa* ( $H_a$ ) se plantea entorno al interés principal del analista. Si la probabilidad calculada es muy pequeña se concluye que la situación especificada en la hipótesis nula es una descripción poco adecuada del estado de la población. Este procedimiento es llamado *inferencia estadística*. Ambas hipótesis deben establecerse antes de la realización del test.

### **6.1.1- Estimación estadística**

Existen dos tipos de estimaciones estadísticas: las que determinan estimadores puntuales (media, varianza, etc.) y aquellas que determinan un rango de valores que tienen una probabilidad conocida de contener el valor real de un parámetro.

A continuación se exponen las fórmulas estadísticas que generan los estimadores de los parámetros que describen una distribución:

Media ( $\bar{Y}$ ) : representa el promedio de una serie de datos .

$$\bar{Y} = \frac{\sum_{i=1}^N Y_i}{N} \quad (6.2)$$

donde  $Y_i$  : valor individual del sistema i

N: número total de datos

*Varianza de la distribución* ( $\sigma^2$ ): corresponde al promedio del cuadrado de las diferencias entre los valores individuales y la media .

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^2}{N-1} \quad (6.3)$$

La varianza de la distribución ( $\sigma^2$ ) puede o no ser equivalente a  $\sigma^2_{xy}$  (varianza real determinada por regresión). Si el modelo postulado es correcto  $\sigma^2 = \sigma^2_{xy}$  y por lo tanto  $s^2$  constituye un *estimador de la varianza*  $\sigma^2$  de la distribución pero si  $\sigma^2_{xy} > \sigma^2$  se establece que el modelo sufre de falta de ajuste.

Si el modelo es correcto,  $s^2$  representa una medida del error con el cual un valor observado de la variable de respuesta,  $Y_i$ , puede ser predicho para valores dados de  $X_i$  variables usando una ecuación determinada.

*Desviación estándar de la población* ( $\sigma$ ): este estadístico tiene especial importancia en la descripción de una distribución y en la computación del significado estadístico de los resultados. Se calcula como la raíz cuadrada de la varianza:

$$\sigma = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^2}}{\sqrt{(N-1)}} \quad (6.4)$$

Estos conceptos aplicados a una población pueden interpretarse de la misma forma para cada muestra obteniendo así:  $\bar{Y}_m$ ,  $\sigma_m^2$ , y  $\sigma_m$

*Error estándar de la media (SE)*: puede ser considerado como la desviación estándar estimada de la distribución de medias que se esperaría si el experimento se repitiera hasta el infinito. Está directamente relacionado a la desviación estándar de la población y al número de casos. Se define según la siguiente ecuación:

$$SE = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad (6.5)$$

*Error estándar de la diferencia (SE<sub>a-b</sub>)*: esta es una medida del grado en que la diferencia entre dos medias variaría por azar. Se estima a partir de los errores estándar de las distribuciones por la siguiente fórmula, que solamente puede aplicarse a distribuciones independientes:

$$SE_{a-b} = (SE_a^2 + SE_b^2)^{1/2} \quad (6.6)$$

*Intervalos de confianza*: los estadísticos antes descriptos no proveen información acerca de su precisión. Aunque ellos en sí mismos son un buen inicio en el análisis estadístico de una serie de datos, es siempre aconsejable determinar los intervalos de confianza de los valores desconocidos de los parámetros de interés. Un intervalo de confianza permite al analista determinar si los estimadores calculados son suficientemente precisos para la investigación que se realiza.

El intervalo de confianza a dos colas, es decir en el que se da el límite superior e inferior del estimador, es el más utilizado. La fórmula que permite calcularlo para una media  $\bar{Y}$  es:

$$\bar{Y} \pm t_{\alpha/2, n-1} \cdot \sqrt{\frac{\sigma^2}{N}} \quad (6.7)$$

La cantidad  $t_{\alpha/2, n-1}$  corresponde al estadístico  $t$ , el cual será explicado con más detalle. El mismo se obtiene de tablas estadísticas a partir del valor del nivel de confianza  $\alpha/2$  y de  $n-1$  grados de libertad del sistema (Zar, 1999).

### 6.1.2- Inferencia estadística

Muchas veces se desea determinar si es razonable asumir que el valor desconocido de un parámetro es igual a algún valor especificado o bien si dos valores desconocidos de dos parámetros pueden ser iguales. Determinaciones de este tipo entran dentro de la inferencia estadística. El tipo de inferencia estadística que se usa en este trabajo se denomina testeo de hipótesis. El proceso de un test de hipótesis puede resumirse en los siguientes pasos (O'Mahony, 1986):

- a) Se establece el objetivo de la investigación en términos matemáticos bajo la denominación de hipótesis nula ( $H_0$ ) (por ejemplo  $H_0: \bar{Y} = c$ , siendo  $c$  una constante).
- b) El analista, basado en el interés prioritario de la investigación, formula otro requerimiento matemático bajo el nombre de hipótesis alternativa ( $H_a$ ) ( $H_a: \bar{Y} > c; \bar{Y} < c$ ).
- c) Se toma una muestra de elementos de la población y se efectúa sobre cada elemento la medición de interés.
- d) Se calcula el valor del estadístico utilizado para estimar el parámetro de interés.
- e) Basado en el conocimiento de la distribución de probabilidad de las mediciones y asumiendo el valor del parámetro de interés bajo la certeza de la hipótesis nula, el analista calcula la probabilidad que el estadístico elegido tome el valor calculado en d). Si dicha probabilidad es pequeña a un valor predeterminado de nivel de confianza  $\alpha$ , la hipótesis nula se refuta en favor de la hipótesis alternativa.

## 6.2- Grados de libertad (gl)

Este es un concepto clave; el símbolo *gl* (o bien su análogo *df* del habla inglesa) se encuentra con frecuencia en los libros sobre estadística y en tablas. Sin pretender un estudio profundo de su significado se hará una breve descripción del mismo.

Los grados de libertad tienen que ver con la independencia funcional de las medidas. Por ejemplo, en la expresión  $A+B = 0$ ,  $A$  y  $B$  son funciones dependientes, ya que al fijar el valor de uno de ellos se está fijando el valor del otro. Así, cuando "n" medidas se expresan como desviaciones de la media muestral, todas las medidas menos una pueden variar libremente si colocamos la restricción sobre los datos de que la suma de desviaciones debe ser igual a cero. En general el número de grados de libertad es igual al número de medidas menos el número de restricciones algebraicamente independientes que están presentes en el grupo de medidas.

## 6.3 - Significación estadística. Errores Tipo I y II (Lawless y Heyman, 1999)

Una explicación breve de la significación estadística es que muestra la probabilidad, generalmente expresada como porcentaje, de que un determinado resultado puede haber ocurrido por el azar. Está muy relacionada con la hipótesis nula. Por ejemplo, el asegurar significación al nivel de 1 % implica que solamente existe una chance en cien de que la hipótesis nula sea aceptada por azar. En algunos casos la significación está expresada como nivel de confianza, que no es más que su complemento; por ejemplo, un nivel de confianza del 95 % es equivalente a un nivel de significación del 5 %.

Cuando se formula una conclusión se corre el riesgo equivalente a la probabilidad de rechazar un valor "bueno" por considerarlo "malo" y dicho riesgo se denomina error  $\alpha$  o *error del Tipo I*. Es decir significa encontrar una diferencia cuando en realidad no la hay (inventar!). También se corre el riesgo de aceptar un resultado "malo" como "bueno" (error  $\beta$  o *error del Tipo II*).es decir no encontrar

diferencia cuando en realidad existe (no darse cuenta!) El cuadro siguiente refleja de manera muy clara dichos conceptos:

	<b>conclusión establecida</b>	
	<b>• H<sub>0</sub> refutada</b>	<b>• H<sub>0</sub> aceptada</b>
<b>H<sub>0</sub> verdadera</b>	error Tipo I	decisión correcta
<b>H<sub>0</sub> falsa</b>	decisión correcta	error Tipo II

Cuando el nivel de significación es  $\alpha = 0,05$ , cinco valores de cada cien se pueden manifestar por azar y la probabilidad de obtener valores "correctos" es  $P = 1 - \alpha = 1 - 0,05 = 0,95$  en ensayos unilaterales. Si se cuenta las dos partes de la distribución normal (ensayos bilaterales),  $P = 1 - 2\alpha = 0,90$  y en este caso si se desea que  $P$  siga valiendo 0,95 deberá tomarse  $\alpha = 0,025$ .

Las tablas con las que han de compararse los resultados contienen los valores que han de superarse para estar seguro que no se ha llegado a una determinada conclusión por azar. Esta seguridad tiene tres niveles;  $P \geq 0,95$  ( $\alpha \leq 0,05$ );  $P \geq 0,99$  ( $\alpha \leq 0,01$ ) y  $P \geq 0,999$  ( $\alpha \leq 0,001$ ) cuya mención indica la significación de las conclusiones que se formulan. Cuando el valor experimental obtenido es inferior al tabulado se concluye que "no hay significación" y se indica con (-) ó (NS); cuando dicho valor supera al valor tabulado para  $P \geq 0,95$  y no al tabulado para  $P \geq 0,99$  se indica con (\*); si el valor experimental es mayor que el tabulado para  $P \geq 0,99$  la conclusión es (\*\*) y para  $P \geq 0,999$  (\*\*\*). En general, en el estudio de alimentos, los niveles (\*) y (\*\*) son suficientes para la mayoría de los propósitos.

#### 6.4- Pruebas de significación múltiple

Hay veces en que se necesitan muchos tests de significación sobre los



mismos datos o sobre un grupo de datos relacionados. Esto es permisible; sin embargo, se debe tener en cuenta el concepto de la significación estadística. Algunas pruebas de significación múltiple se verán más adelante.

### **6.5- Pruebas de una cola versus pruebas de dos colas**

La terminología de "cola" está relacionada con las distribuciones involucradas en un test de significación. Por ejemplo la hipótesis de que dos medias son distintas usa una prueba de dos colas. Sin embargo, al decir que una medida es mayor o menor que otra se requiere una prueba de una cola. Una prueba de dos colas no presupone nada sobre el sentido de la diferencia, si es que existe; sin embargo, una prueba de una cola va un poco más allá al suponer la dirección de la diferencia. Si existen dudas sobre cual de las dos pruebas usar para una determinada situación se utiliza una prueba de dos colas y entonces se buscan los datos estadísticos de tablas para un nivel de significación de  $\alpha/2$ .

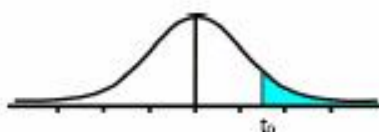
### **6.6- La prueba t (Zar, 1999)**

Con mucha frecuencia se usa el estadístico **t** de Student para determinar la significación de la diferencia entre dos medias, pero no es aplicable cuando hay más de dos medidas (medias, proporciones, etc.) a ser consideradas. Para su aplicación las muestras debieron ser tomadas de una población normalmente distribuida. El estadístico **t** está definido como la diferencia entre medias dividida por el error estándar de la diferencia. Su distribución muestra las probabilidades asociadas con este cociente para un número dado de grados de libertad. Básicamente, el test **t** investiga si las diferencias observadas entre medias de dos muestras de datos indican si esas muestras provienen de poblaciones diferentes ó si las mismas son producto del azar y las muestras provienen de la misma población. Hay muchas aplicaciones diferentes para esta prueba, pero todas siguen el mismo procedimiento general. Una de las más utilizadas es la prueba *t* **generalizada**. (**Tabla 6.6.1**)

**Tabla 6.6.1**

Valores críticos de la distribución t-Student

Tabla t-Student



Grados de libertad	Nivel de					
	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005
1	1.0000	3.0777	6.3137	12.7062	31.8210	63.6559
2	0.8165	1.8856	2.9200	4.3027	6.9645	9.9250
3	0.7649	1.6377	2.3534	3.1824	4.5407	5.8408
4	0.7407	1.5332	2.1318	2.7765	3.7469	4.6041
5	0.7267	1.4759	2.0150	2.5706	3.3649	4.0321
6	0.7176	1.4398	1.9432	2.4469	3.1427	3.7074
7	0.7111	1.4149	1.8946	2.3646	2.9979	3.4995
8	0.7064	1.3968	1.8595	2.3060	2.8965	3.3554
9	0.7027	1.3830	1.8331	2.2622	2.8214	3.2498
10	0.6998	1.3722	1.8125	2.2281	2.7638	3.1693
11	0.6974	1.3634	1.7959	2.2010	2.7181	3.1058
12	0.6955	1.3562	1.7823	2.1788	2.6810	3.0545
13	0.6938	1.3502	1.7709	2.1604	2.6503	3.0123
14	0.6924	1.3450	1.7613	2.1448	2.6245	2.9768
15	0.6912	1.3406	1.7531	2.1315	2.6025	2.9467
16	0.6901	1.3368	1.7459	2.1199	2.5835	2.9208
17	0.6892	1.3334	1.7396	2.1098	2.5669	2.8982
18	0.6884	1.3304	1.7341	2.1009	2.5524	2.8784
19	0.6876	1.3277	1.7291	2.0930	2.5395	2.8609
20	0.6870	1.3253	1.7247	2.0860	2.5280	2.8453
21	0.6864	1.3232	1.7207	2.0796	2.5176	2.8314
22	0.6858	1.3212	1.7171	2.0739	2.5083	2.8188
23	0.6853	1.3195	1.7139	2.0687	2.4999	2.8073
24	0.6848	1.3178	1.7109	2.0639	2.4922	2.7970
25	0.6844	1.3163	1.7081	2.0595	2.4851	2.7874
26	0.6840	1.3150	1.7056	2.0555	2.4786	2.7787
27	0.6837	1.3137	1.7033	2.0518	2.4727	2.7707
28	0.6834	1.3125	1.7011	2.0484	2.4671	2.7633
29	0.6830	1.3114	1.6991	2.0452	2.4620	2.7564
30	0.6828	1.3104	1.6973	2.0423	2.4573	2.7500
31	0.6825	1.3095	1.6955	2.0395	2.4528	2.7440
32	0.6822	1.3086	1.6939	2.0369	2.4487	2.7385
33	0.6820	1.3077	1.6924	2.0345	2.4448	2.7333
34	0.6818	1.3070	1.6909	2.0322	2.4411	2.7284
35	0.6816	1.3062	1.6896	2.0301	2.4377	2.7238
36	0.6814	1.3055	1.6883	2.0281	2.4345	2.7195
37	0.6812	1.3049	1.6871	2.0262	2.4314	2.7154
38	0.6810	1.3042	1.6860	2.0244	2.4286	2.7116
39	0.6808	1.3036	1.6849	2.0227	2.4258	2.7079
40	0.6807	1.3031	1.6839	2.0211	2.4233	2.7045
41	0.6805	1.3025	1.6829	2.0195	2.4208	2.7012
42	0.6804	1.3020	1.6820	2.0181	2.4185	2.6981
43	0.6802	1.3016	1.6811	2.0167	2.4163	2.6951
44	0.6801	1.3011	1.6802	2.0154	2.4141	2.6923
45	0.6800	1.3007	1.6794	2.0141	2.4121	2.6896
46	0.6799	1.3002	1.6787	2.0129	2.4102	2.6870
47	0.6797	1.2998	1.6779	2.0117	2.4083	2.6846
48	0.6796	1.2994	1.6772	2.0106	2.4066	2.6822
49	0.6795	1.2991	1.6766	2.0096	2.4049	2.6800

**Tabla 6.6.1 (continuación)**

Valores críticos de la distribución t-Student

50	0.6794	1.2987	1.6759	2.0086	2.4033	2.6778
51	0.6793	1.2984	1.6753	2.0076	2.4017	2.6757
52	0.6792	1.2980	1.6747	2.0066	2.4002	2.6737
53	0.6791	1.2977	1.6741	2.0057	2.3988	2.6718
54	0.6791	1.2974	1.6736	2.0049	2.3974	2.6700
55	0.6790	1.2971	1.6730	2.0040	2.3961	2.6682
56	0.6789	1.2969	1.6725	2.0032	2.3948	2.6665
57	0.6788	1.2966	1.6720	2.0025	2.3936	2.6649
58	0.6787	1.2963	1.6716	2.0017	2.3924	2.6633
59	0.6787	1.2961	1.6711	2.0010	2.3912	2.6618
60	0.6786	1.2958	1.6706	2.0003	2.3901	2.6603
61	0.6785	1.2956	1.6702	1.9996	2.3890	2.6589
62	0.6785	1.2954	1.6698	1.9990	2.3880	2.6575
63	0.6784	1.2951	1.6694	1.9983	2.3870	2.6561
64	0.6783	1.2949	1.6690	1.9977	2.3860	2.6549
65	0.6783	1.2947	1.6686	1.9971	2.3851	2.6536
66	0.6782	1.2945	1.6683	1.9966	2.3842	2.6524
67	0.6782	1.2943	1.6679	1.9960	2.3833	2.6512
68	0.6781	1.2941	1.6676	1.9955	2.3824	2.6501
69	0.6781	1.2939	1.6672	1.9949	2.3816	2.6490
70	0.6780	1.2938	1.6669	1.9944	2.3808	2.6479
71	0.6780	1.2936	1.6666	1.9939	2.3800	2.6469
72	0.6779	1.2934	1.6663	1.9935	2.3793	2.6458
73	0.6779	1.2933	1.6660	1.9930	2.3785	2.6449
74	0.6778	1.2931	1.6657	1.9925	2.3778	2.6439
75	0.6778	1.2929	1.6654	1.9921	2.3771	2.6430
76	0.6777	1.2928	1.6652	1.9917	2.3764	2.6421
77	0.6777	1.2926	1.6649	1.9913	2.3758	2.6412
78	0.6776	1.2925	1.6646	1.9908	2.3751	2.6403
79	0.6776	1.2924	1.6644	1.9905	2.3745	2.6395
80	0.6776	1.2922	1.6641	1.9901	2.3739	2.6387
81	0.6775	1.2921	1.6639	1.9897	2.3733	2.6379
82	0.6775	1.2920	1.6636	1.9893	2.3727	2.6371
83	0.6775	1.2918	1.6634	1.9890	2.3721	2.6364
84	0.6774	1.2917	1.6632	1.9886	2.3716	2.6356
85	0.6774	1.2916	1.6630	1.9883	2.3710	2.6349
86	0.6774	1.2915	1.6628	1.9879	2.3705	2.6342
87	0.6773	1.2914	1.6626	1.9876	2.3700	2.6335
88	0.6773	1.2912	1.6624	1.9873	2.3695	2.6329
89	0.6773	1.2911	1.6622	1.9870	2.3690	2.6322
90	0.6772	1.2910	1.6620	1.9867	2.3685	2.6316
91	0.6772	1.2909	1.6618	1.9864	2.3680	2.6309
92	0.6772	1.2908	1.6616	1.9861	2.3676	2.6303
93	0.6771	1.2907	1.6614	1.9858	2.3671	2.6297
94	0.6771	1.2906	1.6612	1.9855	2.3667	2.6291
95	0.6771	1.2905	1.6611	1.9852	2.3662	2.6286
96	0.6771	1.2904	1.6609	1.9850	2.3658	2.6280
97	0.6770	1.2903	1.6607	1.9847	2.3654	2.6275
98	0.6770	1.2903	1.6606	1.9845	2.3650	2.6269
99	0.6770	1.2902	1.6604	1.9842	2.3646	2.6264
100	0.6770	1.2901	1.6602	1.9840	2.3642	2.6259
∞	0.6745	1.2816	1.6449	1.9600	2.3263	2.5758

### 6.6.1- Prueba t generalizada

Esta prueba se usa para probar la significación de la diferencia entre las medias de grupos independientes de observaciones, tales como medidas hechas sobre muestras extraídas independientemente de la misma población. Así, la fórmula del estadístico t para comparar dos grupos de medidas independientes es:

$$t = \frac{\bar{Y}_a - \bar{Y}_b}{SE_{a-b}} \quad (6.8)$$

El denominador del estadístico t ya se ha definido como el error estándar de la diferencia entre medias (ecuación 6.6).

En el cálculo de los grados de libertad involucrados, se ha impuesto una restricción algebraica sobre cada grupo de datos, por lo tanto se deben restar al total dos grados de libertad.

Entonces:

$$gl = N_a + N_b - 2 \quad (6.9)$$

donde  $N_a$  = número de medidas en el grupo a

$N_b$  = número de medidas en el grupo b

Se compara dicho valor con el valor de t tabulado para (N-2) grados de libertad y  $\alpha$  nivel de significación. Si el valor calculado es menor que el valor tabulado se concluye que la diferencia no cumple con este criterio para el nivel de significación especificado.

Esta prueba puede aplicarse a una sola muestra de una población con el propósito de verificar si la media de la muestra difiere de la media de la población y así concluir si la muestra pertenece a la población (aceptar  $H_0$ ) o proviene de una población distinta (refutar  $H_0$ ). En este caso la fórmula aplicada es:

$$t = \frac{Y_a - \bar{Y}}{SE_a} \quad (6.10)$$

donde  $Y_a$  = media de la muestra a

$\bar{Y}$  = media de la población

$SE_a$  = estimador del error estándar de la muestra

### 6.6.2- Consideraciones para la utilización del test t

Para la aplicación de dicho test es necesario hacer algunas suposiciones, las cuales generalmente se cumplen:

- Las muestras deben ser tomadas de sus respectivas poblaciones *al azar*.
- Las muestras deben ser independientes, lo mismo que los elementos que las conforman (puntajes, mediciones, etc.).
- Las muestras deben provenir de poblaciones distribuidas normalmente que posean además la misma varianza (homocedasticidad).

El test t de Student (ó el análisis de varianza que se aplica en su reemplazo cuando se analizan varias muestras) señala un camino para analizar la información y dicho camino puede estar distorsionado, pues las consideraciones estadísticas no se cumplieron exactamente. Si, mediante la utilización del test t (o bien, test F, test de la Mínima Diferencia Significativa (MDS), etc.) se hallan diferencias, se deberá analizar la información por otros caminos para verificar la conclusión alcanzada ya que el mismo no resulta concluyente.

### 6.7- Análisis de varianza

El análisis de varianza es un método general con aplicaciones muy variadas y que puede llegar a ser complejo de acuerdo a las derivaciones que tome. Se utiliza en reemplazo del uso de una batería de test t-Student cuando se poseen varias muestras. Las razones del reemplazo radican en que el análisis de varianza provee mayor información y además se reduce la probabilidad de cometer error de Tipo I. Si se diseña un test t para un nivel de significación del 5%, la probabilidad

de rechazar  $H_0$  cuando es cierta (cometiendo error Tipo I) es de 5 %, es decir, 1 en 20. Sobre 20 test t, se espera entonces, que uno de ellos lleve a cometer error de tipo I. Cuanto mayor es el número de sistemas de análisis, realizar una batería de test t no solo resulta dificultoso sino que ofrece pocas ventajas con la posibilidad cierta de cometer error del Tipo I. Esta situación puede ser prevenida utilizando el análisis de varianza (abreviado comúnmente ANOVA). Esta técnica compara las medias de varias muestras y verifica si todas ellas pertenecen a la misma población o si, una o más son significativamente diferentes y provienen de poblaciones diferentes. El ANOVA debe ser considerado en la práctica un test de diferencias de medias a dos colas (ya que las medias en sí mismas pueden aumentar o decrecer) que opera vía un test de cambio de varianza a una cola, el cual se describirá más adelante (test F) (Zar,1999).

Tal como el test t-Student, el análisis de varianza puede aplicarse a varios tipos de diseños experimentales. Existe un tipo de diseño experimental de muestras o sistemas independientes donde los datos de cada sistema provienen de mediciones diferentes o, como en el caso del análisis sensorial, de un grupo diferente de personas. A este diseño se lo denomina "completamente aleatorio". Existe otro diseño en el que las muestras o sistemas están relacionados. Los datos de los diferentes sistemas provienen de la misma medición o de los mismos sujetos. A este diseño se lo denomina "diseño de medidas repetidas" o "diseño de bloques aleatorio". Este último tipo de diseño puede a su vez ser completo (si todas las muestras son evaluadas por cada sujeto o aparato de medida) o incompleto (si los sujetos o el aparato de medida evalúan algunas muestras).

### **6.7.1- Tabla de Análisis de Varianza**

La variación total que existe en una distribución global de valores o medidas puede ser segregada en categorías representando por un lado los efectos identificables y por otro lado la variación debida a causas no identificables. La variación total del conjunto de datos es llamada *Suma de Cuadrados Totales* (SST). La misma se obtiene sumando los cuadrados de las desviaciones del valor

observado en cada sistema  $Y_i$  respecto de la media  $\bar{Y}$ . La fórmula de cálculo correspondiente es:

$$SST = \sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^2 \quad (6.11)$$

donde  $N$  = número total de sistemas evaluados

Toda suma de cuadrados tiene asociados grados de libertad. Este número, como ya se dijo, indica cuantas partes independientes de la información, involucrando "N" números independientes  $Y_1, Y_2, \dots, Y_N$ , son necesarias para compilar esa suma de cuadrados. Los mismos se fijan de acuerdo a las restricciones que tiene el sistema. La Suma de Cuadrados Totales tiene asociada (N-1) grados de libertad ya que existe la restricción:

$$\sum_{i=1}^N Y_i - \bar{Y} = 0$$

Dicha suma puede dividirse en dos contribuciones: una Suma de Cuadrados debida a la Regresión (SSR) y una Suma de Cuadrados Residual (SSE).

La *Suma de Cuadrados debida a la Regresión (SSR)* agrupa la variación en los valores de la variable independiente analizada debida a las variables del experimento involucradas. Es decir, representa una variación de la información tenida en cuenta por el modelo que relaciona a las variables del experimento (independientes) con la variable medida (dependiente). Esta suma de cuadrados tiene asociada (p-1) grados de libertad, donde  $p$  representa al número de parámetros utilizados para describir la relación entre la variable medida y las variables independientes del experimento. La fórmula de cálculo correspondiente es:

$$SSR = \sum (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2 \quad (6.12)$$

Como puede apreciarse, esta suma para N elementos de la población representa la desviación del valor predicho por el modelo postulado,  $\hat{Y}_i$ , en la corrida i, respecto de la media  $\bar{Y}$ .

La *Suma de Cuadrados Residual* (SSE) representa la variación de la información debida a causas no identificables. Generalmente se la identifica como el error en la determinación de una relación que vincula a las variables del diseño involucradas. Se define como la suma de los cuadrados de las diferencias entre los valores medidos de los elementos de la población y los valores de esos elementos que predice el modelo. La fórmula de cálculo que le corresponde es:

$$SSE = \sum_{i=1}^N (Y_i - \hat{Y}_i)^2 = \sum_{i=1}^N r_i^2 \quad (6.13)$$

donde  $r_i$  = se define como el residual en la corrida i

Esta suma de cuadrados tiene asociado (N-p) grados de libertad.

Los *residuales* ( $r_i$ ) son definidos como la diferencia entre el valor de la respuesta observado y aquel valor predicho para la respuesta por un modelo determinado, en la corrida i. Es decir, un residual representa una cantidad que el modelo no puede explicar. Representa al error observado si el modelo es correcto.

Los residuales son de suma importancia pues se usan para chequear el ajuste del modelo a los valores experimentales, así como también la normalidad, independencia y varianza constante de los errores experimentales. La suma de los residuales de cada corrida es nula. En la práctica esta suma puede o ser nula exactamente pero debe rondar en cero. Con esta información básica se puede construir un cuadro de análisis de varianza tal como el que se muestra a continuación:



### Modelo de Análisis de Varianza

FUENTE	gl	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS
DEBIDO A LA REGRESIÓN	p-1	SSR	$MSR = \frac{SSR}{p-1}$
RESIDUAL	N-p	SSE	$MSE = \frac{SSE}{N-p}$
TOTAL	N-1	SST	

#### 6.8- Test F de significación de la regresión

Es un test muy implementado dentro del análisis de varianza, el cual contribuye a verificar la hipótesis propuesta. El mismo plantea una hipótesis nula  $H_0$ : todos los valores de los términos  $\beta_\mu$  (excepto  $\beta_0$ ) son nulos; y una hipótesis alternativa  $H_a$ : al menos un valor de  $\beta_\mu$  es distinto de cero.

Si la hipótesis nula es cierta ( $\beta_\mu = 0$ ), el valor del estadístico F sigue una distribución con (p-1) y (N-p) grados de libertad en el numerador y denominador de la expresión respectivamente:

$$F = \frac{MSR}{MSE} = \frac{SSR/(p-1)}{SSE/(N-p)} \quad (6.14)$$

Luego de calcular F, se compara dicho valor con el valor F de tablas para un nivel de significación ( $\alpha$ ) predeterminado, (p-1) y (N-p) grados de libertad. Este último valor representa el mayor  $100\alpha$  porcentaje de puntos de una distribución F

con  $(p-1)$  y  $(N-p)$  grados de libertad. Esta situación representa un test de una cola para la comparación de varianzas.

Entonces, si  $F > F_{\text{tablas}}$ , se rechaza  $H_0$  a  $\alpha$ -nivel de significación. Esta conclusión nos permite inferir que la variación de la información explicada por el modelo o relación propuestos es significativamente mayor que la variación debida a causas no identificables (residuales) y que el efecto observado no se debió al azar.

Es de destacar que los test t-Student y F son esencialmente los mismos. Para un diseño completamente aleatorio donde se estudian sólo dos tratamientos y dos test t a dos colas para muestras independientes se verifica que:

$$F = t^2 \quad (6.15)$$

### 6.8.1- Test F parcial

Si existen varios parámetros en el modelo de regresión, dicho modelo puede idearse como la incorporación sucesiva de a un término por vez. Se puede conocer la suma de cuadrados que mide la contribución del término  $\beta$  a la suma de cuadrados de la regresión completa considerando que el mismo es el último término incorporado al modelo. Es decir, todos los parámetros excepto  $\beta$  están en el modelo. Por lo tanto, se mide el valor de adicionarlo al modelo, el cual originalmente no lo incluía. En esta situación la suma de cuadrados debida a  $\beta$  coincide con la suma de cuadrados media debida a  $\beta$  ya que se tiene un grado de libertad ( $gl = 1$ ). Esta media puede compararse al estimador de la varianza del modelo ( $s^2$ ) mediante el estadístico F (Khuri y Cornell, 1987).

Este test se realiza para cada término del modelo y es muy adecuado para adicionar o remover términos y así seleccionar la mejor ecuación de regresión. Su hipótesis nula establece:

$$H_0 : \beta = 0$$

versus la hipótesis alternativa:

$$H_a : \beta \neq 0$$

### 6.9- Coeficiente de determinación (Zar, 1999)

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es una medida de la proporción de la variación total de los valores  $Y_i$  acerca de la media  $\bar{Y}$ , explicada por el modelo. Su expresión es generalmente porcentual y se define como:

$$R^2 = \frac{SSR}{SST} \cdot 100 \quad (6.16)$$

El coeficiente de determinación ajustado por los grados de libertad del sistema ( $R^2_{aj}$ ) representa otra forma de expresar la misma información pero más acotada. Su expresión es:

$$R^2_{aj} = 1 - \frac{SSE/(N-p)}{SST/(N-1)} \quad (6.17)$$

A diferencia de  $R^2$ ,  $R^2_{aj}$  puede disminuir si se ha incorporado al modelo algún término innecesario.

Ambos parámetros contribuyen a verificar la adecuación de un modelo propuesto. Sus valores pueden cubrir el rango desde 0 a 99,99 pero nunca valer 100 pues se considera que siempre existe una fuente de error.

Estos parámetros suelen incluirse en la tabla ANOVA como un estadístico más contribuyendo a la interpretación de los resultados.

### **6.10- Test de Falta de Ajuste del modelo utilizando sistemas replicados**

El Test F solo permite refutar la hipótesis nula  $H_0: \beta_\mu, \beta_{\mu\mu}$  y  $\beta_{\mu j} = 0$  infiriendo que alguno de los parámetros es diferente de cero. Ello no significa decir que el modelo describe adecuadamente el comportamiento de la respuesta en el rango de valores de las variables utilizadas.

Un procedimiento para determinar el ajuste del modelo es el llamado Test de Falta de Ajuste (Draper y Smith, 1981; Khuri y Cornell, 1987; Zar, 1999).

Cuando se habla de falta de ajuste de un modelo se está diciendo que el mismo no contiene suficientes parámetros. Esta inadecuación puede deberse a:

- Factores (diferentes a los del modelo propuesto) que fueron omitidos cuando se postuló el modelo pero que afectan a la respuesta.
- Omisión de términos de orden superior necesarios para explicar adecuadamente el comportamiento de la respuesta.

En general se asume que se han elegido, mediante estudios experimentales, los factores adecuados y que la falta de ajuste se debe a la omisión de términos.

Para la aplicación de este test se requieren dos condiciones para la recolección de datos:

- El número de puntos a medir del diseño debe ser mayor que el número de parámetros de la ecuación ( $N > p$ ).
- La varianza no debe depender de la forma del modelo. Para ello se deben tomar medidas replicadas en uno o más puntos del diseño. Se pueden usar estas repeticiones para obtener el estimador de la varianza de los replicados. Se dice que este estimador representa el error puro. Esta denominación surge del concepto que si los valores de una dada variable independiente ( $x_{\mu}$ ) son idénticos para dos observaciones, sólo una variación al azar puede influenciar los resultados y generar diferencias entre ellos.

Además se mantienen las consideraciones ya mencionadas acerca del error experimental ( $\epsilon_i$ ).

Cuando estas condiciones se cumplen la suma de cuadrados de los residuales (SSE) puede dividirse en dos fuentes de variación:

- $SS_{PE}$ : Suma de cuadrados por error puro (debido a replicados).
- $SS_{LOF}$ : Suma de cuadrados debido a falta de ajuste.

Si se realizan " $\delta$ " genuinas repeticiones en la corrida " $i$ " del diseño, se define  $\bar{Y}_i$  como el promedio de la respuesta medida para todas las repeticiones de dicha corrida.

Se define el cálculo de  $SS_{PE}$  y luego el  $SS_{LOF}$  se calcula por diferencia:

$$SS_{PE} = \sum_{i=1}^N \sum_{\delta=1}^n (Y_{\delta i} - \bar{Y}_i)^2 \quad (6.18)$$

donde  $\delta$  = número de repeticiones

$i$  = número de corridas

$$SS_{\text{LOF}} = SSE - SS_{\text{PE}} \quad (6.19)$$

La hipótesis nula correspondiente a este test establece:

$H_0$ : Falta de ajuste nula

La hipótesis alternativa determina:

$H_a$ : Existe falta de ajuste

En este test, el estadístico F se define:

$$F = \frac{SS_{\text{LOF}} / (N - p - n + 1)}{SS_{\text{PE}} / (n - 1)} \quad (6.20)$$

donde  $N$  = número de corridas

$n$  = número de repeticiones

$p$  = parámetros del modelo

Si  $F < F_{\text{tablas}}(\alpha, N-p-n+1, n-1)$  se acepta  $H_0$  y entonces se puede afirmar que:

*No existe razón para dudar de ajuste del modelo.*

y sólo en este caso pueden recombinarse las sumas de cuadrados concernientes al error puro ( $SS_{\text{PE}}$ ) y a la falta de ajuste ( $SS_{\text{LOF}}$ ) para generar la suma de cuadrados residual ( $SSE$ ) y la correspondiente media ( $MSE$ ), estimador de la varianza del modelo ( $s^2$ ). Luego se lleva a cabo el test de significancia de la regresión, se evalúa  $R^2$ , residuales, etc.

El siguiente cuadro muestra un Análisis de Varianza expandido.

### Modelo expandido del Análisis de Varianza

FUENTE	gl	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS
DEBIDO A LA REGRESIÓN	p-1	SSR	$MSR = \frac{SSR}{p-1}$
RESIDUAL	N-p	SSE	$MSE = \frac{SSE}{N-p}$
ERROR PURO	n-1	SS <sub>PE</sub>	$MS_{PE} = \frac{SS_{PE}}{n-1}$
FALTA DE AJUSTE	N-p-n+1	SS <sub>LOF</sub>	$MS_{LOF} = \frac{SS_{LOF}}{N-p-n+1}$

#### 6.11- Análisis de residuales

Un análisis de residuales permite verificar las suposiciones realizadas en los análisis de regresión respecto de los errores experimentales,  $\varepsilon_i$ , acerca de su normalidad, independencia y varianza constante.

Los caminos para analizar los residuales son métodos gráficos sencillos, que hoy en día realizan la mayoría de los programas de estadística aplicada. Los principales métodos involucran representar gráficamente los valores de los residuales:

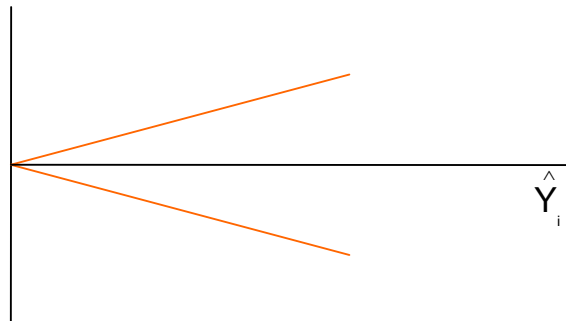
- en escala
- versus valores predichos,  $\hat{Y}_i$
- versus valores de las variables independientes  $x_{ij}$
- en escala de probabilidad estándar

A continuación se describirán los análisis de residuales utilizados en el presente trabajo.

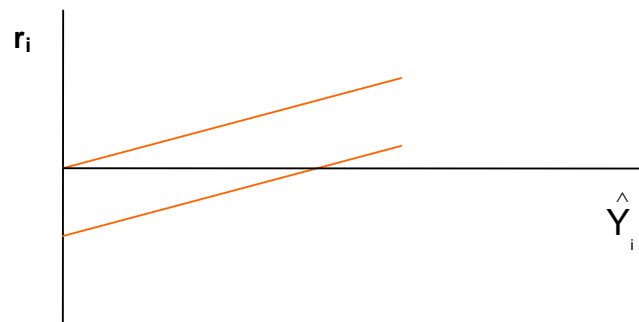
### 6.11.1- Versus valores predichos, $\hat{Y}_i$

Se grafican los valores de los residuales ( $r_i$ ) versus los valores predichos por el modelo aplicando la respuesta en estudio ( $\hat{Y}_i$ ). Dichos residuales no se grafican en función de los valores observados ( $Y_i$ ) debido a que ambos grupos de valores están correlacionados. Debe observarse una distribución uniforme horizontal de los residuales en torno a los valores predichos,  $\hat{Y}_i$  (homocedasticidad). Pueden manifestarse algunos comportamientos anormales tales como los que se describen a continuación.

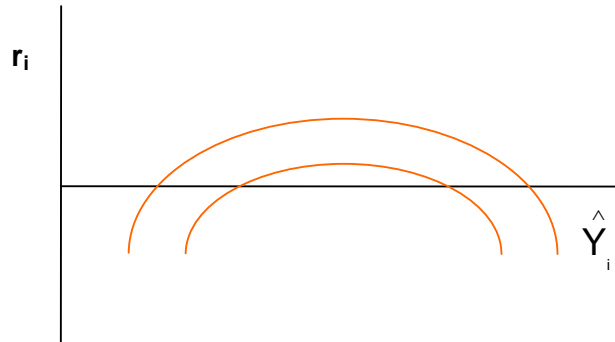
- Si la varianza del modelo no es constante y se incrementa, es necesario realizar un análisis de cuadrados mínimos especial o bien una transformación ( $\ln(Y)$ ;  $\sqrt{Y}$ ;  $1/Y$ ; etc.) en la respuesta de interés :



- Si el término independiente  $\beta_0$  no fue incluido en el análisis, la banda se desplaza:



- Si falta incluir algunos términos lineales y/o cuadráticos en el modelo postulado la banda se curva:



Estas desviaciones, además de detectarse visualmente, pueden medirse mediante parámetros definidos, los cuales no se detallarán en este apéndice (Draper, 1963).

### 6.11.2- En escala de probabilidad estándar

Este método resulta un proceso alternativo para graficar los residuales. Es útil para decidir si los puntos siguen una distribución normal y poder estimar rápidamente  $\sigma$ . Consiste en construir un gráfico “normal” de residuales en una escala de probabilidad estándar. Los puntos caerán aproximadamente en una línea.

Una escala de probabilidad normal es una escala especial que tiene un rango desde 0,01 a 99,99. El espaciado de las divisiones de la escala se ensancha conforme se mueve de 50 a 99,99 y de 50 a 0,01, con simetría alrededor de la línea horizontal 50. Esta escala vertical está determinada por la inversa de la función:

$$y = \int \left( \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \right) \cdot e^{-\frac{1}{2}t^2} \cdot \delta t \quad (6.21)$$

Si los puntos de una función acumulativa N son graficados en una escala de probabilidad normal, una línea pasará a través de esos puntos. Los puntos se ordenan en forma ascendente teniendo en cuenta el signo, graficados versus una ordenada definida como:

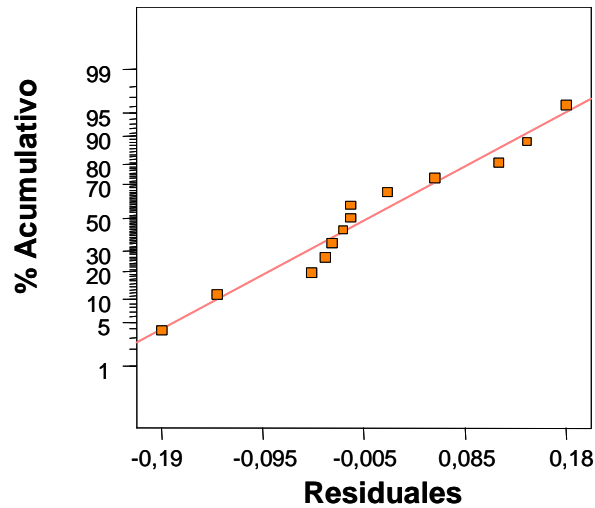


$$\% \text{ acumulativo} = \frac{100 \cdot (Y_i - \frac{1}{2})}{m} \quad (6.22)$$

donde  $Y_i$  = observación realizada  
 $m$  = número total de observaciones

A la observación  $Y_i$  le corresponde el área acumulativa de la mitad de la sección "i". Se multiplica por 100 para adaptar la escala a una escala de probabilidad normal y se divide por la "m" cantidad de mediciones ya que es de esperar que a cada medición le corresponda  $1/m$  porción del área bajo la curva.

Si la muestra presenta una distribución normal, se podrá dibujar una línea recta de ajuste ascendente, aunque ninguno de los puntos caiga exactamente sobre la recta. Dicha recta puede utilizarse para estimar la varianza de los residuales ( $\sigma_{r_{ij}}$ ). La figura siguiente esquematiza este método.



## 6.12 Regresión Avanzada

### 6.12.1 Modelo Lineal Generalizado

Los Modelos Lineales Generalizados (MLG) son una generalización de los Modelos Lineales. En su caso más simple, el modelo lineal especifica una relación

entre la variable respuesta  $Y$  (la cual sigue una distribución normal) y un conjunto de variables predictoras,  $X_k$ :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_k X_k \quad (6.23)$$

Los términos  $\beta_i$  corresponden a los coeficientes de la regresión calculados a partir de los datos. Para gran número de problemas de análisis de datos, las estimaciones a partir de relaciones lineales pueden ser adecuadas para describir los datos y para realizar predicciones razonables.

Pero existen muchas relaciones que no pueden ser resumidas por una simple ecuación lineal principalmente por dos razones:

- La distribución de la variable dependiente: la variable de interés puede no tener una distribución continua, por ejemplo si estudiamos la elección de un comprador entre tres productos (dist. multinomial).
- El efecto de las variables predictoras sobre la variable dependiente puede ser de naturaleza no lineal: por ejemplo, la relación entre el color de un dado sistema y diversos factores de un proceso de preservación de un alimento puede ser no lineal.

Seguramente, alguna clase de función cuadrática o de otro orden sería adecuada para describir esta relación, de manera que un incremento en una variable predictora represente un mayor impacto en la evolución del color del sistema. En otras palabras, el enlace entre las variables independientes y el color se podría describir a partir de una relación no lineal.

Los MLG introducen una función enlace o link:  $G(\bullet)$  donde:

$$Y = G(\beta_i X_k) + \varepsilon \quad (6.24)$$

Por tanto, son una extensión del modelo lineal tradicional siendo más flexibles que este último ya que permiten una dependencia no lineal de  $Y$  con la proyección lineal,  $\beta_i X_k$  de las variables predictoras pero no permite una influencia no lineal individual con las variables  $X_1 \dots X_k$ .

Entre otras ventajas, permiten modelar variables categóricas (si/no; 0/1; nombre; etc) y variables continuas tradicionales (tiempo, temperatura, concentración, etc.).

Asimismo, es posible analizar estadísticamente relaciones no lineales entre variables dependientes e independientes. Por otro lado, no es necesario el supuesto de varianza constante. Los MLG asumen que la varianza de Y es función de su valor esperado, exigiendo sólo que sea conocido el modo en que la varianza depende de aquel.

### **6.12.2- Regresión múltiple/ Método de Superficies de Respuesta**

El análisis de varianza es una herramienta básica y de uso muy extendido para el planteo de modelos matemáticos que vinculan una variable medible (variable de respuesta) con los factores experimentales (variables independientes), los cuales resultan preponderantes en el comportamiento de dicha variable.

De hecho puede existir una relación funcional simple entre las variables, tal como ocurre en algunos sistemas físicos, por ello no constituye la generalidad. La relación entre variables suele ser complicada como para ser explicada en términos sencillos. En este caso se debe aproximar esa relación a alguna función matemática simple, tal como una relación polinomial, que contenga a las variables apropiadas (de las cuales se sospecha que influyen en mayor grado a la respuesta) y se aproxime lo mejor posible a una función real, en un determinado rango de las variables en estudio. Esto sólo es posible mediante un análisis de varianza. Utilizando los datos recogidos de una serie de experimentos, el análisis regresional puede ayudar a establecer empíricamente (por adecuación de un modelo matemático) la relación causa-efecto de un dado sistema (Zar, 1999).

Los factores antes mencionados son las condiciones de proceso o variables independientes cuyos valores o niveles son controlados en la experiencia. Se eligen presumiendo que los mismos afectan en mayor medida a la variable de interés. Los niveles de los factores elegidos se seleccionan para realizar la experiencia, teniendo en consideración el proceso en estudio. Los factores se denotan generalmente como

$X_1, X_2, \dots, X_k$  siendo  $k$ : número de variables independientes, designadas en forma genérica como  $X_\mu$ .

La *respuesta* es una cantidad medible cuyo valor se asume que varía conforme cambian los niveles de los factores en estudio. El valor real de la respuesta corresponde a una combinación de los niveles de los factores involucrados y en consecuencia del error experimental,  $\varepsilon_i$ , se denota como  $\Omega$ .

El error experimental consiste estrictamente en un *error aleatorio* de la medida, causado por el equipo de medición y el personal que realiza la experiencia y un *error no aleatorio*, causado por factores no incluidos en la experiencia. Es importante distinguir entre el error experimental,  $\varepsilon_i$ , en  $Y_i$  con respecto a su valor real ( $\Omega_i$ ) y el residual,  $r_i$  de  $Y_i$  con respecto al valor predicho,  $\hat{Y}_i$ .

El valor medido de la respuesta difiere de  $\Omega$  ya que es imposible no considerar el error experimental:

$$Y = \Omega + \varepsilon \quad (6.25)$$

donde

$Y$  = valor experimental de la respuesta

$\Omega$  = valor real de la respuesta

$\varepsilon$  = error experimental

Cuando se dice que la respuesta depende de los niveles de los factores involucrados, se está diciendo que existe una función  $\varphi$  de  $X_1, X_2, \dots, X_k$  variables que genera  $\Omega$  tal que:

$$\Omega = \varphi (X_1, X_2, \dots, X_k) \quad (6.26)$$

$\varphi$  es una función continua de  $X_\mu$  y puede ser aproximada a una función polinomial (por expresión de series de Taylor).

La forma exacta de  $\varphi$  es generalmente desconocida y se aproxima por una ecuación polinomial o algún tipo de modelo empírico. Los pasos para aproximar el modelo consisten en:

1º) Asumir una forma del modelo a través de una ecuación que involucre a  $X_1, X_2, \dots, X_k$  factores. En ausencia de suficiente conocimiento de la forma en que varía la respuesta, en general se comienza postulando un modelo de primer orden en función de  $k$  variables. Pero si el mismo sufre falta de ajuste debido a una curvatura en la superficie de respuesta se agregan términos de órdenes mayores. El modelo siguiente a ensayar es un modelo de segundo orden:

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{\mu=1}^k \beta_{\mu} X_{\mu} + \sum_{\mu=1}^k \beta_{\mu\mu} X_{\mu}^2 + \sum_{\mu=1}^k \sum_{j=\mu+1}^k \beta_{\mu j} X_{\mu} X_j + \varepsilon_i \quad (6.27)$$

donde:

$Y_i$  = valor de la variable de respuesta

$X_{\mu j}$  = variables independientes ( $\mu, j = 1 \dots k$ ).

$\varepsilon_i$  = error experimental en la corrida  $i$

$\beta_0$  = término constante

$\beta_{\mu}, \beta_{\mu\mu}$  y  $\beta_{\mu j}$  = coeficientes regresionales

Los parámetros  $\beta_{\mu}, \beta_{\mu\mu}$  y  $\beta_{\mu j}$  son llamados coeficientes regresionales. El término  $\beta_0$  corresponde al valor de la respuesta cuando los niveles de los factores son nulos (Ej:  $X_1 = 0; X_2 = 0$ ). Sólo tiene sentido si la coordenada (0,0) está considerada en la región experimental. Los parámetros  $\beta_{\mu}$  ( $\mu \neq 0$ ) se consideran efectos de primer orden y los parámetros  $\beta_{\mu\mu}$  y  $\beta_{\mu j}$  se consideran efectos de segundo orden.

Se asumen algunas consideraciones respecto de los errores experimentales de cada corrida ( $\varepsilon_i$ ):

- Tienen media nula y una varianza común a todos.
- Son mutuamente independientes.
- Están normalmente distribuidos.

Los estimadores  $\beta_{\mu}, \beta_{\mu\mu}$  y  $\beta_{\mu j}$  son determinados por cuadrados mínimos. La suma de cuadrados de las desviaciones respecto de la recta real será:

$$S = \sum_{i=1}^N \varepsilon_i^2 \quad (6.28)$$

donde  $\varepsilon_i$  se despeja a partir de la **ecuación 6.27**. De esta forma, se eligen los estimadores de los coeficientes regresionales de manera de minimizar S.

2º) En asociación con el modelo propuesto seleccionar combinaciones de los niveles de los factores involucrados y para cada combinación medir la respuesta deseada.

3º) Las mediciones de la respuesta son utilizadas en un análisis de regresión para obtener los estimadores de los parámetros del modelo propuesto y también obtener un estimador de la varianza del error experimental.

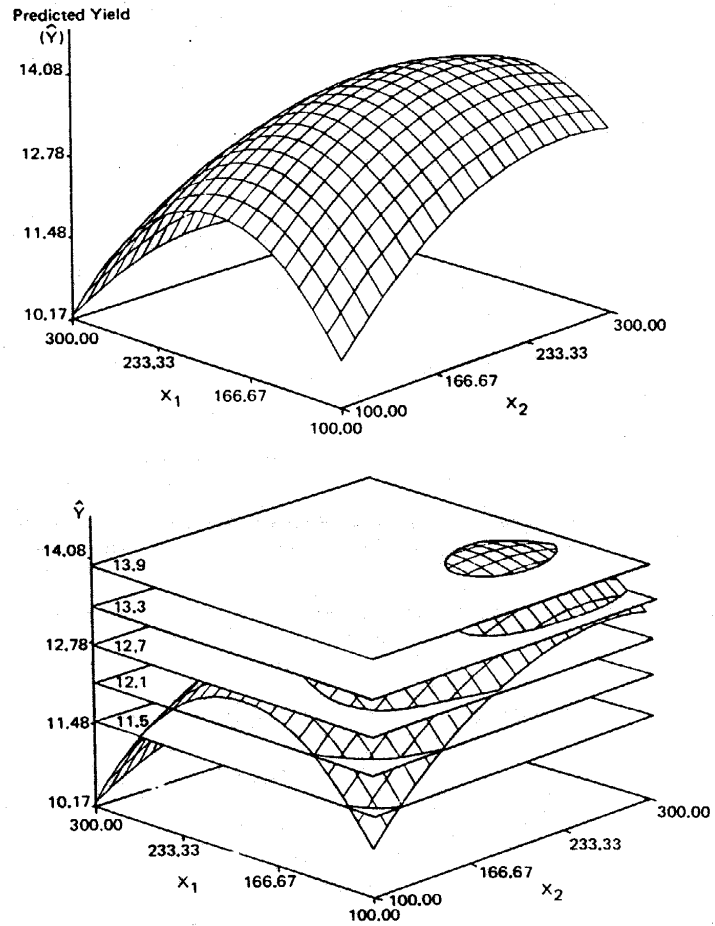
4º) Aplicar tests sobre las magnitudes de los estimadores y sobre el ajuste del modelo mismo.

Con la utilización de “k” factores se genera una superficie de respuesta Y en un espacio k+1 dimensional. Así por ejemplo, si se consideran tres variables independientes es posible generar una superficie en función de dos de ellas (las de mayor significación), mientras la tercera variable permanece constante a distintos niveles preseleccionados. La **Figura 6.12.1** muestra un ejemplo de dicha superficie. Otra forma de visualizar la información es a través de los *gráficos de contorno*, contruidos a partir de la superficie de respuesta correspondiente. En los mismos, se dibujan líneas o curvas de Y constante en un plano cuyas coordenadas representan los niveles  $X_1$  y  $X_2$ . Cada contorno es una proyección en el plano  $X_1 X_2$  de una sección transversal de la superficie de respuesta y representa infinitas combinaciones de  $X_1$  y  $X_2$  que generan el mismo valor de Y. Es posible localizar en estos gráficos zonas de mínima (o máxima) respuesta, es decir, la combinación de  $X_1$  y  $X_2$  que genera un valor mínimo (o máximo) de la variable dependiente de interés.

Todos los resultados obtenidos mediante este análisis se limitan a una región de interés o región experimental ( $\xi$ ) totalmente contenida dentro de una región de operación y la extensión de dichos resultados fuera de la zona de interés puede resultar arriesgado.

**Figura 6.12.1**

Superficie de respuesta y obtención de gráficos de contorno a partir de la misma.



### 6.12.2.1- Selección de la mejor ecuación de regresión

En general existe una situación de compromiso entre seleccionar la mayor cantidad de variables y/o combinaciones de ellas que generen una ecuación lo más útil posible con fines predictivos e involucrar el menor número de variables por la labor requerida para obtener información de las mismas.

Existen varios métodos para seleccionar la mejor ecuación de regresión. Aquí se menciona el *Método de Eliminación Retrospectiva*, el cual tiende a eliminar todas las variables innecesarias sin incrementar sustancialmente el valor del estimador de la varianza,  $s^2$ .

Este método es más sencillo que otros métodos descriptos, pues sólo examina la mejor regresión conteniendo un dado número de variables (algunos métodos analizan todas las regresiones posibles con un dado número de variables). Los pasos básicos de este método son:

- Se computa una ecuación de regresión que contenga todas las variables
- Se realiza un test F-parcial para cada parámetro considerando que el mismo fue incorporado al modelo en último lugar.
- Se selecciona el menor valor de los F-parciales obtenidos y se compara con un  $F_0$  para un nivel de significación especificado.
- Si  $F < F_0$  se remueve el parámetro en cuestión y se realiza una nueva regresión con los parámetros restantes. Si  $F > F_0$  se adopta la ecuación tal como se planteó.

### 6.13- Diseño de una experiencia

#### 6.13.1- Definiciones

Cuando se diseña una experiencia de la cual se piensa obtener información acerca de la influencia de determinados factores sobre un proceso se debe considerar:



- La selección de los factores o variables independientes a ser usados en la experiencia.
- Selección del rango de valores y el número de niveles de cada factor con el propósito de obtener una medida adecuada de la respuesta de interés.

De esta forma queda definida la región experimental (Khuri y Cornell, 1987).

Existen distintos tipos de diseño de acuerdo a las mediciones que el experimentador realiza y al número de niveles seleccionados. Algunos ejemplos de ellos son el diseño factorial simétrico y el diseño factorial incompleto. Desafortunadamente no existe al respecto una nomenclatura única para cada tipo de diseño sino que los autores mencionan los mismos diseños con diferente terminología.

Un *diseño factorial simétrico* es un arreglo experimental en el cual un número pequeño de niveles “p” es elegido para cada factor “k” y todas las combinaciones de esos niveles ( $p^k$ ) son ensayadas para medir la variable de respuesta. En general se han usado dos o tres niveles para cada variable k generando  $2^k$  ó  $3^k$  diseños factoriales (Box y Hunter, 1961a y 1961b).

Si no se ensayan todas las combinaciones de niveles sino sólo un grupo de ellas, se habla de un *diseño factorial incompleto* (Baker y Genigeorgis, 1990; Mudar y col., 1989).

Cuando un diseño involucra “N” sistemas y se determinan “L” constantes o parámetros de un modelo, se define un factor de redundancia  $\mathcal{A}$  (con  $\mathcal{A} = N/L$ ) el cual no debe ser menor que la unidad. Diseños con valores de  $\mathcal{A}$  muy bajos no son utilizados debido a que no proveen grados de libertad residuales y por lo tanto no permiten realizar un análisis de adecuación del modelo propuesto.

### **6.13.2- Condiciones de rotabilidad y ortogonalidad**

Estos conceptos los introdujeron Box y Hunter (1957) para asegurar

una generación simétrica de la información en el espacio de las variables.

Para que un diseño sea exitoso es necesario la propiedad de rotabilidad exacta. Para una ecuación polinomial de segundo orden, un *diseño rotatable de segundo orden* es aquel en el cual la varianza de Y es constante para todos los puntos equidistantes del centro del diseño (Draper, 1963).

Un *diseño ortogonal* es aquel en el cual los términos del modelo ajustado no están correlacionados. En este caso, la varianza de la respuesta predicha en cualquier punto "Y" de la región experimental  $\xi$  es expresable como la suma de las varianzas de los estimadores de los parámetros del modelo. El requerimiento de rotabilidad impone algunas restricciones sobre los momentos del diseño, las cuales no se detallarán en este apéndice (Khuri y Cornell, 1987; Draper y Smith, 1981).

### 6.13.3- Codificación de variables independientes

Las variables se codifican porque este tratamiento simplifica en gran medida los cálculos a realizar y mejora la precisión al ajustar un dado modelo a la realidad.

Este proceso elimina las unidades de medida y estandariza el espacio k-dimensional (Khuri y Cornell, 1987; Zar, 1999). Al codificar las variables, los coeficientes en el modelo propuesto quedan no correlacionados y de esa manera cambia el test t-Student. Es decir la hipótesis nula ( $H_0: \beta=0$ ) correspondiente al modelo con las variables originales y con las variables codificadas es diferente. El valor de la respuesta medida Y para un par  $(X_1, X_2)$  de variables decodificadas es el mismo que para el par correspondiente  $(x_1, x_2)$  codificado, por ello la varianza ( $\sigma^2$ ) y su estimador ( $s^2$ ) son los mismos (Khuri y Cornell, 1987). Una variable codificada definida como  $x_i$  se obtiene según la siguiente fórmula:

$$x_{\mu} = \frac{2X_{\mu} - (X_{\mu L} + X_{\mu H})}{X_{\mu H} - X_{\mu L}} \quad (6.29)$$

donde :

$X_{\mu}$  = nivel de la variable independiente

$x_{\mu}$  = nivel de la variable codificada

$X_{\mu H}$  = nivel superior de la variable independiente

$X_{\mu L}$  = nivel inferior de la variable independiente

La variable codificada toma solo valores entre -1 y +1. Si la variable tiene tres niveles y el nivel medio está equiespaciado de los otros dos, se generan valores de  $x_{\mu} = -1, 0$  y  $+1$  asociados a los valores inferior, medio y superior de la variable  $X_{\mu}$ .

#### 6.13.4- Diseño tipo Box-Behnken

Box y Behnken (1960) postularon un diseño especial a partir de la combinación de un diseño factorial de dos niveles ( $2^k$ ) con un diseño de bloques incompleto. Este diseño satisface los requerimientos impuestos por la condición de rotabilidad. El siguiente ejemplo ilustra un diseño tipo Box-Behnken:

Si se considera un diseño de bloques incompleto balanceado (cada bloque da una combinación de dos variables de manera balanceada) que involucra a tres variables y tres bloques, cada uno conteniendo dos variables, se tiene:

		variables	
			$X_1$
bloques	1	*	*
	2	*	
	3		*

Si ahora este diseño se combina con un diseño  $2^k$  factorial de la siguiente manera:

$x_1$	$x_2$
-1	-1
+1	-1
-1	+1
+1	+1

los asteriscos (\*) en cada bloque son reemplazados por las dos columnas del diseño  $2^k$  factorial. El diseño se completa por la adición de puntos centrales.

Un diseño Box-Behnken de tres niveles y tres variables resultante consiste en los siguientes 13 puntos:

<b>Tratamiento</b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>
<b>1</b>	-1	-1
<b>2</b>	+1	-1
<b>3</b>	-1	+1
<b>4</b>	+1	+1
<b>5</b>	-1	0
<b>6</b>	+1	0
<b>7</b>	0	-1
<b>8</b>	0	+1
<b>9</b>	0	0
<b>10</b>	0	0
<b>11</b>	0	0
<b>12</b>	0	0
<b>13</b>	0	0

El diseño resultante es un diseño de segundo orden rotatable adecuado para el estudio de dos variables en trece tratamientos.

Además de los tratamientos generados por el diseño  $2^k$  factorial, es necesario incluir “ $n_0$ ” puntos centrales (con el propósito de prevenir singularidad en el momento de la matriz generada por el diseño).

El número de puntos centrales afecta el perfil de la varianza. Esto es, la varianza de Y como función de la distancia  $\omega$  (con  $\omega = \sum x_i^2$ ) del centro del diseño. El número exacto de puntos centrales ( $n_0$ ) es crítico y está tabulado (Box y Behnken, 1960) teniendo en cuenta el tipo de diseño considerado de tal manera de lograr un perfil de varianza uniforme sobre la región experimental del diseño. Por ejemplo, para el análisis anterior de tres variables a tres niveles se requiere aparte de ocho tratamientos la inclusión de cinco puntos centrales.

En esta tesis, este diseño se ha aplicado haciendo uso de la herramienta computacional: Design Expert 3.0.

#### **6.14- Métodos por comparaciones múltiples (Zar,1999)**

Un análisis de varianza solo informa si existen diferencias entre medias pero no informa acerca de cuales medias son las que difieren. Una vez que el ANOVA ha demostrado, mediante el test F, que existen diferencias significativas se recurre a los test de comparaciones múltiples.

Cuando se desean hacer comparaciones entre las medias desarrolladas en un experimento que involucra más de dos muestras se origina un problema porque se alteran las probabilidades. A medida que aumenta el número de medias, aumenta la probabilidad que la diferencia entre las medias mayor y menor sea igualada o excedida solamente por el azar.

Hay varias maneras de enfrentar esta situación incluyendo la de despreciar este efecto y simplemente realizar el test t entre cualquiera de dos medias que se comparan. Pero como ya se dijo esto no es muy recomendable si bien es lo más rápido.

Todos los procedimientos de comparaciones múltiples se basan en calcular un rango el cual es comparado con la diferencia entre medias. Si el rango es mayor, no existe diferencia significativa entre las medias.

La diferencia entre los mismos reside en como calcular el rango crítico y de ello resultan procedimientos más o menos conservativos y poderosos, según determinen rangos críticos más o menos estrechos. Algunos de ellos se enumeran aquí, de más a menos conservadores (O'Mahony,1987):

- Test Sheffé
- Test Tukey (HSD)
- Test Newman-Keuls
- Test de rango múltiple de Duncan
- Test Fisher (MDS)
- Test de Dunnett

Se describirá el test que se utilizó en esta tesis.

### 6.14.1- Mínima diferencia significativa de Fisher (MDS).

Es un test muy potente ya que de todos los test de comparaciones múltiples es el que determina el rango más estrecho de valores, hecho que facilita encontrar diferentes a dos medias, resultando ser uno de los test menos conservativo. Debe utilizarse para comparar pocas medias ya que como es realmente un test t-Student modificado existe el riesgo de cometer error tipo I. Antes de ser aplicado debe verificarse que existan diferencias significativas entre medias mediante test F de un ANOVA.

Se calcula:

$$\text{MDS} = t_{\alpha/2, \text{glE}} \cdot \sqrt{\frac{2\text{MSE}}{n}} \quad (6.30)$$

donde:

$t_{\alpha/2, \text{glE}}$  = mayor  $\alpha/2$  por ciento de puntos que siguen la distribución t-Student con  $\text{glE}$  grados de libertad.

$\text{glE}$  = grados de libertad del residual obtenido en ANOVA.

$n$  = número de medidas

Cualquier par de medias cuya diferencia exceda a dicho valor para  $\alpha$ -nivel de significación es considerado estadística mente diferente.



**Alzamora, S.M.** (1997). Preservación I. Alimentos conservados por factores combinados”. En *Temas en Tecnología de Alimentos*. Ed. J.M. Aguilera p. 45-88. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

**Alzamora, S.M.; Tapia, M.S. y López-Malo, A.** (2000). Overview. En *Minimally Processed Fruits and Vegetables: Fundamental Aspects and Applications*. Eds. S.M. Alzamora, M.S. Tapia y A. López-Malo. Aspen Publishers Inc., Maryland, USA.

**Alzamora, S.M.; Gerschenson, L.N.; Cerrutti, P. y Rojas, A.M.** (1989). Shelf-stable pineapples for long-term non refrigerated storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 22: 233-236.

**Alzamora, S.M; Cerrutti, P.; Guerrero, S. y López-Malo, A.** (1995). Minimally processed fruits by combined methods”. En *Food Preservation by Moisture Control. Fundamentals and Applications*. ISOPOW PRACTICUM II. Eds. G.V. Barbosa-Cánovas y J. Welti-Chanes p. 463-492. Technomic Publication, Pennsylvania, USA.

**Anderson, C.** (2004). Introducción a la producción de cítricos. Apuntes del III Curso de Tecnología de Citrus. Biblioteca Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos , Concordia.

**ASTM** (1968). Manual of sensory testing methods. ASTM Special Technical Publication p 434, USA.

**ASTM** (1981). Correlating sensory objective measurements. ASTM, USA.

**Baker, D y Genigeorgis, C.** (1990). Predicting the safe of fresh fish under modified atmospheres with respect to *Clostridium botulinum* toxigenesis by modeling length of lag phase of growth. *Journal of Food Protection* 53:131-135

**Baranyi, J. y Roberts, T.A.** (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23: 277-294.



**Baumann, A.R.; Martin S.E. y Feng H.** (2005). Power ultrasound treatment of *Listeria monocytogenes* in apple cider. *Journal of Food Protection* 68: 2333-2340.

**Besse, N.G.** (2002). Influence of various environmental parameters and of detection procedures on the recovery of stressed *L. monocytogenes*: a review. *Food Microbiology* 19:221-234.

**Beuchat, L.; Frandberg, E.; Deak,T; Alzamora, S.M.; Chen,J.; Guerrero, S.; Lopez Malo, A.; Ohlsson, I; Olsen, M.; Peinado, J; Shnurer, J; Siloniz, M y Tornai-Lehoczki, J.** (2001). Performance of mycological media in enumerating desiccated food spoilage yeast: an interlaboratory study. *International Journal of Food Microbiology* 70:89-96.

**Beuchat, L.R.** (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection* 4:413–423.

**Beuchat, L.R. y Ryu, J.H.** (1997). Produce handling and processing practices. *Emergent Infection Diseases* 3: 459-465.

**Board R.G. y Gould G.W.** (1991). Future prospects. En *Food Preservatives*. Eds. N.J Russel y G.W.Gould. Blackie Academic and Professional, Glasgow y Londres.

**Box G.E.P. y Behnken D.W.** (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2: 455-57.

**Box, G. y Hunter, J.** (1957). Multifactor experimental designs for exploring response surfaces. *Ann. Math. Statist.*28,195-99.

**Box, G. y Hunter, J.** (1961a). The 2k-p fractional factorial designs. Part I. *Technometrics* 3, 311-15.

**Box, G. y Hunter, J.** (1961b). The 2k-p fractional factorial designs. Part II. *Technometrics* 3, 449-52.

**Bracket, R.E.** (1999). Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens on produce. *Postharvest Biology and Technology* 15: 305-311.

**Bruzzone, A.I.** (2004). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Ministerio de Producción, República Argentina

**Buchanan, R.L.** (1995). The roles of microbiological criteria and risk assessment in HACCP. *Food Microbiology* 12:421-424.

**Buchanan, R.L. y Phillips, J.G.** (1990). Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 35: 370-376.

**Buchanan, R.L. y Whiting, R.C.** (1996). Risk assessment and predictive microbiology. *Journal of Food Protection* 59: 31-36.

**Buera, M.P.** (2005). Propiedades organolépticas de los alimentos. Aspectos fisiológicos, químicos y sensoriales relacionados. Universidad de Buenos Aires

**Buera, M.P. y Resnik, S.L.** (1989). Colorimetric Measurements in a turbid medium: hydrolyzed concentrated cheese whey. *Die Farbe* 35/36: 201-214.

**Burrí J.; Graf M.; Lambelet P. y Löliger J.** (1989). Vainillin: more than a flavouring agent. A potent antioxidant. *Journal of Food Agriculture*, 48: 49-56.

**Burt, S.** (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223– 253.

**Busch, S.V. y Donnelly, C.W.** (1992) Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (1): 14-20.

**Cabezudo M.D.** (1982). El análisis sensorial de los vinos. En *Enología: Temas Actuales*. Ed. C. Laguna. Asociación Nacional de Químicos de España, Madrid.

**Caccioni, D.R.L.; Deans, S.G. y Ruberto, G.** (1995). Inhibitory effect of citrus fruits essential oil components on *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Petria* 5: 177-182.

**Calderón, S.; Araya, E.; Haag, M.C. y Silva, A.** (1999) Jugo de naranja. En *Temas en Tecnología de Alimentos*. Volumen 3: Manual de Conceptos Para Análisis Sensorial de los Alimentos. Ed M.H. Damásio. CYTED, Instituto Politécnico Nacional, Dirección de Publicaciones y Materiales Educativos, México, D.F.

**Carter, K. y Risky, D.** (1990). The role of sensory research in bringing a product to a market. *Food Technology* 43(11):160-62.

**Castañón, X.; Argaiz, A. y López Malo, A.** (1999). Effect of storage temperature on the microbial and color stability of banana purées prepared with the addition of vanillin or potassium sorbate. *Food Science and Technology International*, 5:53-60.

**Cerrutti P. y Alzamora S.M.** (1996). Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purées. *International Journal of Food Microbiology*, 29: 379-386.

**Cives, H.R.** (2004). Descripción de los Procesos Industriales. Apuntes del III Curso de Tecnología de Citrus. Biblioteca Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos , Concordia.

**Conner D.E. y Beuchat L.R.** (1984). Effects of essential oils from plants on growth of spoilage yeasts. *Journal of Food Science*, 49: 429-434.

**Corte,F.V.; de Fabricio, S.V.; Salvatori, D.M. y Alzamora, S.M.** (2005). Survival of *L. innocua* in apple juice as affected by vanillin or potassium sorbate. *Journal of Food Safety*, 24,1-15.

**Cox, S.D.; Mann, C.M. y Markham, J.L.** (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88: 170-175

**Crawford, R.G.; Beliveau, C.M.; Peeler, J.T.; Donnelly, C.W. y Bunning, V.K** (1989). Comparative recovery of uninjured and heat-injured *Listeria monocytogenes* cells from bovine milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (6): 1490-1494.

**Dansa, A.** (2004). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Ministerio de Producción, República Argentina

**Davis, F.S. y Albrigo L.G** (1999). *Citricos*. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España.

**Delaquis, P.; Stanich, K. y Toivonen, P.** (2005). Effect of pH on the inhibition of *Listeria* spp. by vanillin and vanillic acid. *Journal of Food Protection* 68:1472-1476.

**Dorman, H.J.D. y Deans, S.G.** (2000). Antimicrobial against from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88: 308-316

**Draper, N.R.** (1963). Ridge Analysis of response surfaces. *Technometrics* 5, 469-72

**Draper, N.R. y Smith, H.** (1981). *Applied Regression Analysis*. 2<sup>nd</sup> edition, Wiley. New York, USA.

**Esteve, M.J.; Frígola, A.; Rodrigo, C. y Rodrigo D.** (2005). Effect of storage period under variable conditions on the chemical and physical composition and colour of Spanish refrigerated orange juices. *Food and Chemical Toxicology*, 43: 1413-1422.

**Famworth, E.R.; Lagacé, M.; Couture, R.; Yaylayan, V. y Stewart, B.** (2000). Thermal processing storage conditions and the composition and physical properties of orange juice. *Food Research International* 34, 25-30.

**Farber, J.M.; Daley, E; Coates, F.; Emmons, D.B. y McKellar, R.** (1992). Factor influencing survival of *Listeria monocytogenes* in milk in a high-temperature short-time pasteurizer. *Journal of Food Protection*. 55, 946-951.

**FDA** (2001). [FDA] Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition Analytical Bacteriological Manual. FDA editions

**FDA** (2002), [FDA] Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Guidance for Industry.

**Ferrante, S.** (2004). Utilización combinada de ultrasonido y antimicrobianos naturales para inhibir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* en jugos frutales. Tesis de Grado. Universidad Católica Argentina.

**Ferreyra, M. (2004). Microbiología de cítricos. Apuntes del III Curso de Tecnología de Citrus.** Biblioteca Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos , Concordia.

**Gibson, A.M. y Hocking A.D.** (1997). Advances in predictive modeling of fungal growth in food. *Trends in Food Science and Technology* 8: 353-358.

**Gould, G.W** (1995). Homeostatic mechanisms during food preservation by combined methods. En *Food Preservation by Moisture Control. Fundamentals and Applications*. ISOPOW PRACTICUM II. G.V. Eds. G. Barbosa-Cánovas y J. Weltri-Chanes p. 397-410. Technomic Publication. Pennsylvania, USA.

**Gould, G.W. y Jones, M.V.** (1989). Combination and synergistic effects. En *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*. Ed. G.W. Gould. p 401-421. Elsevier Science Publishers Ltd., Essex, Inglaterra.

**Graumlich, T.R.; Marcy, J.E. y Adams, J.P.** (1986). Aseptically packaged orange juice and concentrate: a review of the influence of processing and packaging conditions on quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 34(3): 402-405.

**Guerrero S.; Tognon M. y Alzamora S. M.** (2001). Utilización de la Ecuación de Gompertz modificada para predecir el efecto combinado de ultrasonido, pH y algunos aditivos en la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae*. III Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos. I Congreso Español de Ingeniería de Alimentos.

**Guerrero, S.N., Tognon, M. y Alzamora, S.M.** (2004). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan. *Journal of Food Control*, 16: 131-139.

**Guerrero, S.N.; Alzamora, S. M. y Gerschenson, L. N.** (1993). Development of a shelf-stable banana purée by combined factors: microbial stability. *Journal of Food Protection*.

**Helander, I.M.; von Wright, A. y Matilla-Sandholm, T.M.** (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science and Technology* 8: 146-150.

**Ho, J.L.; Shands, K.N.; Friedland, G.; Eckind, P. y Fraser D.W.** (1986) An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals, *Archives of Internal Medicine*. 146: 520-524.

**Hoffmans, C.M; Fung, D.Y.C y Kastner, C.L.** (1997). Methods and resuscitation environments for the recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*: a review. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 5: 249-268.

**Janisiewicz, W.J.; Conway, W.S.; Brown, M.W.; Sapers,G.M.; Fratamico, P. y Buchanan, L.R.** (1999). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut apple tissue and its potential for transmission by fruit flies. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1-5.

**Jay M.J. y Rivers G.M.** (1984). Antimicrobial activity of some food flavouring compounds. *Journal of Food Safety* 6, 129-139.

**Jellinek, G.** (1985). *Sensory Evaluation of Food - Theory and Practice*. Ed G. Jellinek. Ellis Horwood, Ltd., Chichester, England.

**Jordán, M.J.; Gonder, K.L. y Laencina, J.** (2003). Deaeration and pasteurization effects on the orange juice aromatic fraction. *Swiss Society for Food Science Technology* 36, 391-396.

**Kacem, B.; Cornell, J.A., Marshall, M.R.; Shireman, R.B. y Matthews, R.F.** (1987a). Nonenzymatic browning in aseptically packaged orange juice and drinks. Effect of ascorbic acids, amino acids and oxygen. *Journal of Food Science* 52(6): 1668-1672.

**Kelly, K.L.**(1943). Color designations for lights. *Journal of the Optical Society of America* 33:627-31.

**Khuri, A.I. y Cornell, J.A.** (1987). *Response surface. Designs and Analysis*. Interscience, Londres y Nueva York.

**Knabel, S.J.; Walter, H.W.; Hartman, P.A. y Mendonca, A.F.** (1990). Effects of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteurization. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(2): 370-376.

**Knorr, D.; Zenker, M.; Heinz, V. y Lee Dong-Un** (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology* 15: 261-266.

**Komitopoulou, E.; Boziaris, I.S., Davies, E.A., Delves-Broughton, J. y Adams, M.R.** (1999). *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *International Journal of Food Science and Technology*. 34: 81-85

**Lanciotti, R.; Gianotti, A.; Patrignani, F.; Belletti, N.; Guerzoni, M.E. y Gardini, F.** (2004) Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science and Technology* 15: 201/208.

**Larrocca, A.H.** (2004). Anatomía, fisiología y composición de los cítricos. Apuntes del III Curso de Tecnología de Citrus. Universidad Nacional de Entre Ríos.

**Lawless H.T. y Heymann H.** (1999). *Sensory Evaluation of Food. Principles and Practices*. Ed. H.T. Lawless y H. Heymann. Aspen Publishers, Maryland, USA.

**Lee, H.S. and Coates, G.A.** (2003). Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 36:153-156.

**Leistner, L.** (1992). Food preservation by combined methods. *Food Research International* 25: 151-158.

**Leistner, L.** (1995). Principles and applications of hurdle technology. En *New Methods of Food Preservation*. Ed. G.W. Gould, p. 1-21. Blackie Academic and Professional, Glasgow, Escocia.

**Linton, R.H.; Carter, W.H.; Pierson, M.D. y Hackney, C.R.** (1995a). Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection* 58 (9): 946-954.

**Linton R.H.; Carter W.H.; Pierson M. D.; Hackney C.R. y Eifert J.D.** (1995b). Use of modified Gompertz equation to predict the effects of temperature, pH and NaCl on the inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A heated in infant formula. *Journal of Food Protection*, 59:16-23.

**Linton, R.H.; Pierson, M.D. y Bishop, J.R.** (1990). Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sublethal heat shock. *Journal of Food Protection*. 53 (11): 84-87.



**López Malo A.** (2000). La preservación multiobjetivo de alimentos: efecto de factores tradicionales y emergentes en la respuesta de *Aspergillus flavus*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.

**Lopez Malo, A.; Alzamora, S.M. y Argai, A.** (1994) Effect of natural vanillin on germination time and radial growth of moulds in fruit-base agar systems. *Food Microbiology* 12:213-219.

**Lozano, R.D.** (1978). *El color y su medición*. Ed America Lee, Buenos Aires.

**Mackey, B.M.; Boogard, E.; Hayes, C.M. y Baranyi, J.** (1994). Recovery of heat – injured *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 22: 227-237.

**Mak P.P.; Ingham, B.H. y Ingham, S.C.** (2001) Validation of apple cider pasteurization treatments against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 64 (11):1679-1689.

**Manso, M.C.; Oliveira, F.A.R.; Oliveira, J.C. y Frias, J.M.** (2001) Modelling ascorbic acid thermal degradation and browning in orange juice under aerobic conditions. *International Journal of Food Science and Technology* 36/3: 303-312

**Martin, J.J.; Slanes, E.; Bota, E. y Sancho, J.** (1995). Evolucion química y organoléptica del zumo de naranja pasteurizado. *Alimentaria*. p59-63.

**Mazzotta A.S.** (2001). Thermal Inactivation of Stationary-Phase and Acid-Adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in Fruit Juices. *Journal of Food Protection* 64: 315-320

**McMeekin, T.A.; Olley, J.N.; Ross, T. y Ratkowsky, D.** (1993). *Predictive Microbiology: Theory and Application*. Research Studies Press Ltd. y John Wiley and Sons Inc., Gran Bretaña.

**Meilgaard, M.; Civille, G.V y Carr, B.T** (1999). *Sensory Evaluation Techniques*. 3<sup>ra</sup> edición CRC Press, Inc., Florida, USA.

**Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M. y Heredia, F.J.** (2005). Correlation between visual and instrumental colour measurements of orange juice dilutions: effect of the background. *Food Quality and Preference* 16: 471-478.

**Mudahar, G.; Toledo, R.; Floros, J. y Jen, J.** (1989). Optimization of carrot dehydration process using Response Surface Methodology., *Journal of Food Science*. 54: 714-17.

**O'Mahony, M.** (1986). *Sensory Evaluation of Food : Statistical Methods and Procedures*. Ed. O'Mahony. Marcel Decker, Nueva York, USA.

**Oyarzábal, O.A.; Nogueira, M.C.L. y Gombas, D.E.** (2003) Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in juice concentrates. *Journal of Food Protection* 66: 1595-1598

**Parish M.E. y Higgins D.P.** (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *Journal of Food Protection*, 52:144-147.

**Parrish, M.E.** (1998) Food and Drug Administration Docket #97N-0511, Comment #60, Dockets Management Branch (HFA-305), Food and Drug Administration, 12420 Parklawn Drive, Rockville, MD

**Peleg M. y Cole M.B.** (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science*, 38(5):353-380.

**Peleg M. y Cole M.B.** (2000). Estimating the survival of *Clostridium botulinum* spores during heat treatments. *Journal of Food Protection* 63: 190-195.

**Peleg, M.** (1997). Modeling microbial populations with the original and modified version of the continuous and discrete logistic equations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37: 471-490.

**Pereyra Gonzales, A.; Burin, L. y Buera, M.P.** (1999). Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. *Food Research International*, 32: 185-191.

**Petersen, M.A.; Tonder, D. y Poll, L.** (1998). Comparison of normal and accelerated storage of commercial orange juice – changes in flavour and content of volatile compounds. *Food Quality and Preference* 9: 43-51.

**Pettipher, G.L.; Osmundson, M.E. y Murphy, J.M.** (1997) Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters of Applied Microbiology* 24(3): 185-189

**Pitt, J.L. y Hocking, A.D.** (1997). *Fungy and Food Spoilage*. Ed. Blackie Academic and Professional, Londres, Reino Unido.

**Piyasena, P.; Liou, S. y McKellar, R.C.** (1998). Predictive modeling of inactivation of *Listeria* spp. in bovine milk during high-temperature short-time pasteurization. *International Journal of Food Microbiology* 39: 167-173.

**Ramos-Nino, M.E.; Ramírez-Rodríguez, C.A.; Clifford, M.N. y Adams, M.R.** (1996). A comparison of quantitative structure-activity relationships for the effect of benzoic and cinnamic acids on *Listeria monocytogenes* using multiple linear regression, artificial neural network and fuzzy systems. *Journal of Applied Microbiology* 82: 68-76

**Rivera Carriles J.** (2002). Mezclas de antimicrobianos como agentes fungistáticos o fungicidas para la inhibición de *Zygosaccharomyces bailii*. Tesis de Maestría en Tecnología de los Alimentos. Universidad de Puebla, México

**Roberts, T.A. e Ingram, M.** (1973). Inhibition of growth of *C. botulinum* at different pH values by sodium chloride and sodium nitrite. *Journal of Food Technology* 8: 467-70.

**Roig, M.G.; Bello, J.F.; Rivera, Z.S. y Kennedy, J.F.** (1999). Studies on the occurrence of non-enzymatic browning during storage of citrus juice. *Food Research International*, 32: 609-619.

**Rojas, R.; Quintero, J.S.; Rojas, J.C. y Coronado, B.D.** (1994). Conservación de puré de mango mediante factores combinados envasado en grandes recipientes sin adición de sacarosa. *Boletín Internacional de Divulgación CYTED*, N 2, p. 45, Universidad de las Américas, Puebla, México.

**Sado P.N.; Jinneman K.C; Husby G.J.; Sorg S.M. y Omiecinsky C.J.** (1998). Identification of *Listeria monocytogenes* from pasteurized apple juice using rapid test kits. *Journal of Food Protection*, 61:1199-1202.

**Sáenz, C.J.** (2004). Descripción de los Procesos Industriales. Apuntes del III Curso de Tecnología de Citrus. Biblioteca Facultad de Ciencias de la Alimentación Universidad Nacional de Entre Ríos, Concordia.

**Sajur, S.** (1985). Preconservación de duraznos por métodos combinados. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Mar del Plata.

**Saunt, J.** (1992). *Variedades de cítricos del mundo*, Editorial Sinclair, Valencia, España.

**Sentandreu, E.; Carbonell, L.; Carbonell, J.V. y Izquierdo, L.** (2005). Effects of heat treatment conditions on fresh taste and on pectinmethylesterase activity of chilled mandarin and orange juices. *Food Science and Technology International* 11(3): 217-222.

**Silva, F.V.M. y Gibbs, P.** (2004). Target Selection in Designing Pasteurization Processes for Shelf-Stable High-Acid Fruit Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44: 353-360.

**Solomon, O.; Svanberg, U. y Sahlstrom, A.** (1999). Effect of oxygen and fluorescent light on the quality of orange juice during storage at 8 °C. *Food Chemistry*. 53(4) 363-368.

**Splitstoeser, D.F.; McLellan, M.R. y Churey J.J.** (1995). Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H57 in apple juice. *Journal of Food Protection* 59: 226-229.

**Stone, H.; Sibel, J.; Oliver, S. Woolsey, A. y Singleton, R.** (1974). Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. *Food Technology*., 28, 24-28.

**Stone H. y Sidel J.L.** (1993) *Sensory Evaluation Practices*, 2<sup>a</sup> ed., Academic Press Inc.

**Talens, P.; Martínez-Navarrete, N.; Fito, P. y Chiralt, A.** (2002). Changes in optical and mechanical properties during osmodehydrofreezing of kiwi fruit. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3: 191-199.

**Ultee, A.; Kets, E.P.W. y Smid, E.J.** (1999). Mechanism of action of carvacrol on the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4606-4610.

**Whiting, R.C.** (1995). Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35: 467- 494.

**Wisotzkey, J.D.; Jurtshuk, P.; Fox, G.E.; Deinhard, G. y Poralla, K.** (1992). Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 263-269

**Yuste J. y Fung D.Y.C.** (2002). Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A 49594 in apple juice supplemented with cinnamon. *Journal of Food Protection*, 65:1663-1666.

**Zar, J.H.** (1999). *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River, New Jersey, USA.

## 7.1- Páginas web

### **British Pharmaceutical Codex 1911: Citral**

<http://www.ibiblio.org/herbmed/eclectic/bpc1911/citral.html>

**FDA** (2000). [FDA] Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. <<http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/ift-toc.html>>.

**Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación**, Ministerio de Producción, República Argentina. Mercados Frutihortícolas.  
<<http://www.sagpya.mecon.gov.ar/>>

.....  
BIOQ. CIELO DOLORES CHAR  
TESISTA

.....  
DRA. SANDRA GUERRERO  
DIRECTORA