



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

“CARACTERIZACIÓN PARCIAL Y EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA PULPA DEL FRUTO DE *Cyrtocarpa procera* CONSERVADA POR MÉTODOS COMBINADOS”

**TESIS:
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA:
CLAUDIA VILLANUEVA CAÑONGO**

**DIRECTORES DE TESIS:
M.C. CARLOS GUILLERMO HERNÁNDEZ
DR. MARCO VINICIO RAMÍREZ MARES**

HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA. ABRIL DE 2006.

RESUMEN

La Mixteca Oaxaqueña se caracteriza por tener grandes extensiones áridas, no obstante se encuentran diversas especies vegetales que crecen y que proliferan de manera silvestre. Tal es el caso del árbol frondoso llamado “árbol de chupandía” que ha sido clasificado taxónomicamente como *Cyrtocarpa procera* y cuyos frutos son consumidos en forma fresca por los pobladores. Sin embargo, en la época de abundancia se desperdician cantidades considerables, ya que la producción excede el consumo local. La obtención de pulpas a partir de frutos es un proceso ventajoso por la versatilidad de usos que se pueden dar a las mismas; sin embargo deben considerarse las condiciones que permitan conservar la pulpa por el mayor tiempo posible. La tecnología de métodos combinados ofrece varias ventajas como son: el empleo de tecnología y equipo sencillo y no costoso, conserva las propiedades del producto fresco, aplicable en zonas rurales en donde se pueden conservar los frutos “*in situ*” y por medio de este método de conservación se han obtenido productos estables a temperatura ambiente. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar parcialmente la pulpa de la fruta de *Cyrtocarpa procera* y aplicar la tecnología de métodos combinados para asegurarle la estabilidad microbiológica a temperatura ambiente. Los análisis que se llevaron a cabo para la caracterización fueron: actividad acuosa (Paw-Kit), °Brix (refractómetro de Abbe), humedad (termobalanza), pH, azúcares reductores, acidez total, fibra, proteína y cenizas (Métodos AOAC). En la aplicación de la tecnología de métodos combinados se empleó un factorial 2^3 , teniendo como factores la actividad acuosa (aw), la concentración de sorbato de potasio (SK) y el tratamiento térmico, evaluando el efecto de estos factores sobre el crecimiento de hongos y levaduras (HyL) en la pulpa. Se encontró que el mejor tratamiento para la conservación de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* fue aquél que tuvo como factores el tratamiento térmico (3 minutos) y la adición de sorbato de potasio (400 ppm). Además, no presentó diferencia significativa al comparar los valores iniciales y finales de aw, pH y °Brix y evitando el desarrollo de HyL durante 100 días de almacenamiento a 25° C.

A mi Madre: Eloisa Cañongo Salazar

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación no hubiera sido posible sin el apoyo de mucha gente.

Muchas gracias a mi asesor, Carlos Guillermo Hernández, por darle dirección a mis locuras y hacerlas ideas, a mi co-asesor Dr. Marco Vinicio Ramírez Mares por sus revisiones y consejos. A la Maestra Paula Cecilia Guadarrama Mendoza quien con su enorme cariño y paciencia me ayudó a dar sentido a la confusión. Gracias también a la Doctora Rosa Isela Guzmán Geronimo por su aportación al escrito final. Gracias al Dr. Raúl Salas Coronado quien siendo director del Instituto de Agroindustrias me apoyo con el equipo y reactivos para la elaboración de este trabajo.

Me llevaría todas las hojas de este escrito en agradecer a todas y cada una de las personas involucradas en este trabajo, por lo que me límito a agradecerles con mi pensamiento y mi infinito cariño, ya que sin todas esas personas no hubiera logrado empezar, desarrollar y finalizar este largo proceso. Gracias a todos, juntos hemos terminado y yo sólo lo escribí en estas hojas, gracias también a ti, que en estos momentos lees estas líneas, ya que tu también eres parte de este ciclo que empecé el día en que seleccione este tema de Investigación.

ÍNDICE GENERAL

Página

Resumen.....	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice general.....	v
Lista de cuadros	vii
Lista de figuras.....	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. <i>Cyrtocarpa procera</i> (chupandía)	2
2.2. Alteración de los alimentos.....	3
2.2.1. Cambios de origen no microbiano	3
2.2.2. Cambios producidos por microorganismos	3
2.3. Factores de influencia sobre el crecimiento microbiano.....	5
2.3.1. Nutrimientos para el crecimiento microbiano.....	5
2.3.2. Actividad acuosa (aw).....	5
2.3.3. pH.....	7
2.3.4. Potencial redox (Eh)	7
2.3.5. Temperatura	8
2.4. Conservación de alimentos por métodos combinados	9
2.4.1. Efecto barrera.....	11
2.4.2. Ejemplos de efecto barrera.....	12
2.4.3. Principales factores de conservación empleados en métodos combinados	14
2.5. Mecanismos de acción de la conservación por métodos combinados	16
2.5.1. Homeostasis	16
2.5.2. Agotamiento metabólico.....	17
2.5.3. Reacciones ante el estrés.....	18
2.5.4. Mecanismo <i>multitarget</i>	18
2.6. Importancia	19
2.7. Frutas conservadas por métodos combinados.....	20

3.	HIPÓTESIS.....	23
4.	OBJETIVOS	23
	4.1. Objetivo General.....	23
	4.2. Objetivos específicos	23
5.	METODOLOGÍA.....	24
	5.1. Obtención de la pulpa del fruto de <i>Cyrtocarpa procera</i>	24
	5.2. Caracterización parcial de la pulpa del fruto de <i>Cyrtocarpa procera</i>	26
	5.3. Aplicación de métodos combinados a la pulpa del fruto de <i>Cyrtocarpa procera</i>	27
	5.4. Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	29
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
	6.1. Caracterización parcial de la pulpa del fruto de <i>Cyrtocarpa procera</i>	30
	6.2. Aplicación de métodos combinados a la pulpa del fruto de <i>Cyrtocarpa procera</i>	33
	6.2.1. Análisis microbiológico de la pulpa del fruto de <i>Cyrtocarpa procera</i>	33
	6.2.1.1. Principal grupo microbiano.....	33
	6.2.1.2. Crecimiento de hongos y levaduras en la pulpa del fruto de <i>Cyrtocarpa procera</i> para cada tratamiento	35
	6.2.1.3. Valores de aw, °Brix y pH finales de los tratamientos	41
	6.3. Efecto de la aw, concentración de sorbato de potasio (SK) y tratamiento térmico en el crecimiento de HyL durante el almacenamiento de la pulpa del fruto de <i>Cyrtocarpa procera</i>	44
	6.4. Tiempo de almacenamiento de la pulpa del fruto de <i>Cyrtocarpa procera</i> a 25 °C antes de superar las 10 ⁵ UFC/g.....	49
	6.5. Selección del mejor tratamiento que mantuvo la calidad microbiana (HyL) de la pulpas de <i>Cyrtocarpa procera</i> durante 100 días a 25 °C	50
7.	CONCLUSIONES.....	51
8.	PERSPECTIVAS.....	52
9.	APÉNDICE.....	53
10.	BIBLIOGRAFÍA	61

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
2.1. Barreras empleadas para la conservación de alimentos	15
2.2. Barreras potenciales para la conservación de alimentos.....	15
2.3. Principales factores empleados en frutas de alta humedad conservadas por métodos combinados	16
2.4. Frutas conservadas por métodos combinados.....	21
5.1. Combinaciones del factorial 2^3	27
6.1. Caracterización parcial de la pulpa del fruto de <i>Cyrtocarpa procera</i>	30
6.2. pH de frutas tropicales y subtropicales	31
6.3. pH y aw mínimos para crecimiento de bacterias patógenas	35
6.4. aw y pH mínimos para el crecimiento de bacterias en frutas y productos de frutas.....	35
6.5. Cuantificación de HyL en los tratamientos durante el almacenamiento a 25° C.....	36
6.6. Valores de aw de los tratamientos durante el almacenamiento a 25 ° C	41
6.7. Valores de °Brix de los tratamientos durante el almacenamiento a 25°C	43
6.8. Valores de pH de los tratamientos durante el almacenamiento a 25 ° C	43
6.9. Análisis de varianza para el factorial 2^3	44
6.10. Efecto de los factores sobre el crecimiento de HyL en la pulpa de <i>Cyrtocarpa procera</i>	45
6.11. Efecto de aw, SK y tratamiento térmico sobre el crecimiento de HyL durante el almacenamiento de la pulpa a 25°C.....	45
6.12. Tiempo de almacenamiento de la pulpa antes de superar las 10^5 UFC/g permitidas para su consumo.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
2.1. Árbol de chupandía (<i>Cyrtocarpa procera</i>)	2
2.2. Fruto maduro de <i>Cyrtocarpa procera</i>	2
2.3. El “efecto barrera”	12
2.4. Ejemplos de efecto barrera	14
5.1. Diagrama esquemático de las etapas requeridas en la caracterización parcial y aplicación de métodos combinados de la pulpa del fruto de <i>Cyrtocarpa procera</i>	25
5.2. Diagrama de flujo de los tratamientos aplicados	28
6.1. Crecimiento de la principal levadura presente en la pulpa del fruto de <i>Cyrtocarpa procera</i>	34
6.2. Apariencia inicial y final de la pulpa de <i>Cyrtocarpa procera</i>	37
6.3. Curva de crecimiento de levaduras en el control	38
6.4. Curvas de crecimiento de levaduras para el control y tratamiento 2	39
6.5. Crecimiento de hongo filamentoso en los tratamientos 4 y 5	40
6.6. Interacción entre la concentración de SK y el tratamiento térmico, con una aw de 0.93	47
6.7. Interacción entre la concentración de SK y aw, sin tratamiento térmico	48

1. INTRODUCCIÓN

La Mixteca Oaxaqueña se caracteriza por tener grandes extensiones áridas, no obstante se encuentran diversas especies vegetales que crecen en tierra caliente y que proliferan de manera silvestre. Tal es el caso del árbol frondoso llamado “árbol de chupandía” que ha sido clasificado taxónomicamente como *Cyrtocarpa procera*. Este árbol presenta un tronco robusto de color gris, llegando a medir el árbol de cinco a siete metros de altura. *Cyrtocarpa procera* produce un fruto esférico pequeño de aproximadamente tres centímetros de diámetro, cuya cáscara es de color amarillo cuando está maduro, tiene una pulpa agri dulce, también de color amarillo y un hueso ovalado de color café que en el interior de éste se encuentra la semilla cuyo sabor recuerda al coco (Cabrera, 1998).

En diversas comunidades de la Mixteca crece este fruto de manera silvestre y es consumido en forma fresca por los pobladores, no obstante en la época de abundancia se desperdician cantidades considerables, ya que la producción excede el consumo local (Martínez, comunicación personal). Una opción para evitar el desperdicio y además de otorgar un valor agregado al fruto es procesarlo y comercializarlo. La obtención de pulpas a partir de frutos es un proceso ventajoso por la versatilidad de usos que se puede dar a las mismas; sin embargo, se deben establecer las condiciones que permitan la conservación de la pulpa por el mayor tiempo posible y sin recurrir a la congelación, por cuestiones de economía. En este sentido han surgido tecnologías menos costosas como la de métodos combinados que pretende evitar los cambios fisicoquímicos no deseables, el desarrollo microbiano y/o la inactivación de sistemas enzimáticos en un alimento. La tecnología de métodos combinados ofrece varias ventajas como son: el empleo de tecnología simple (sencilla), menos costosa, energéticamente eficiente, conserva las propiedades del producto fresco, aplicable en zonas rurales en donde se pueden conservar los frutos “*in situ*”, no requiere de equipo sofisticado y la posibilidad de obtener productos estables a temperatura ambiente.

Con base a lo anterior en el presente trabajo se caracterizó parcialmente a la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* y se obtuvo una pulpa conservada por métodos combinados.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Cyrtocarpa procera* (chupandía)

Cabrera (1998) describe a las chupandías o cocos como pequeños frutos esféricos, de aproximadamente tres centímetros de diámetro, cuya cáscara es de color amarillo cuando están maduros. Su pulpa es agri dulce, también de color amarillo y un hueso ovalado de color café, en el interior de éste se encuentra la semilla que tiene un sabor parecido al coco. Estos frutos son producidos por un árbol frondoso llamado chupandío, que puede medir de cinco a siete metros de altura, con un tronco robusto, grueso, de color gris oscuro. Sus flores no tienen pétalos pero pueden distinguirse por el color rojo de los estambres. Los chupandíos crecen en las zonas de tierra caliente, entre los 1200 y 1500 metros de altitud, en la vegetación conocida como bosque tropical caducifolio. Es común encontrarlos en las copaleras, zonas donde abundan las especies de copales (*Bursera* spp.); en las casahuateras, donde abundan los casahuates (*Ipomea arborecens*); en las cubateras donde hay cubatas (*Acacia* spp.); en las huizacheras (*Acacia farnesiana*) y también en las barrancas (vegetación riparia). Las flores comienzan a brotar en abril y mayo, posteriormente se producen los frutos, los cuales maduran entre agosto y septiembre. Los frutos maduros son consumidos como fruta de tiempo.



Figura. 2.1. Árbol de chupandía
(*Cyrtocarpa procera*)



Figura. 2.2. Fruto maduro de *Cyrtocarpa procera*

2.2. ALTERACIÓN DE LOS ALIMENTOS

Los alimentos, ya sean procesados o no, sufren alteraciones en su composición lo cual se traduce en cambios deteriorativos, que finalmente producen la descomposición del alimento. El deterioro de los alimentos es diferente, dependiendo del tipo de cambios que intervengan: cambios de origen no microbiano o cambios producidos por microorganismos.

2.2.1. Cambios de origen no microbiano

En los alimentos se producen cambios de naturaleza bioquímica (enzimática), por reacciones químicas o bien por modificaciones físicas. Tales cambios pueden producirse durante el procesamiento o el almacenamiento y pueden conllevar a una disminución en la calidad sensorial.

Los cambios que pueden ser percibidos sensorialmente por el consumidor incluyen la alteración del color, aroma y consistencia. La alteración del color se pone de manifiesto por oscurecimientos no deseables o decoloraciones. El sabor y aroma pueden alterarse, ya que las temperaturas elevadas favorecen a la desaparición de sustancias volátiles y componentes aromáticos característicos de los alimentos. Las reacciones donde participan las proteínas y la oxidación de los lípidos son la causa de la aparición de olores y sabores extraños (Casp, 1998).

Los cambios de naturaleza bioquímica, pueden afectar el valor nutrimental del alimento, tales cambios incluyen la pérdida de azúcares, variaciones en el contenido y composición de sustancias nitrogenadas, gradual oxidación y pérdida de vitaminas. Estos cambios se producen por ejemplo, en la respiración poscosecha de frutas y hortalizas (Casp, 1998).

2.2.2. Cambios producidos por microorganismos

Los microorganismos (de varios tipos) producen los cambios indeseables más graves en los alimentos perecederos, ya que generan pérdidas substanciales de los nutrimentos y cambios considerables en las características externas de los alimentos. Los

microorganismos representan el agente más temible de la alteración de los alimentos y el más activo, debido a su elevada velocidad de reproducción en condiciones adecuadas. Los microorganismos están dotados de una carga enzimática notablemente desarrollada, de forma que se puede decir, que no existe en los alimentos compuesto que no sea atacado y degradado por al menos por una especie microbiana (Casp, 1998).

Los microorganismos normalmente implicados son las bacterias y hongos, aunque también son importantes los virus y los parásitos. Se puede decir que es posible que casi cualquier microorganismo puede encontrarse en una fruta u hortaliza en circunstancias específicas. Sin embargo, las frutas y hortalizas a veces difieren en las características físicas y bioquímicas. Estas diferencias causan además diversidad en la microflora normalmente relacionada con los tipos específicos de productos. Las hortalizas frescas, tienen como características una elevada cantidad de agua y nutrimentos y un pH neutro. Estas características hacen que en ellas puedan crecer casi cualquier tipo de microorganismo. En general, las hortalizas se encuentran aproximadamente contaminadas de igual forma con bacterias que con hongos (Wiley, 1997).

Las frutas difieren principalmente de las hortalizas en que normalmente contienen mayores cantidades de azúcar y un pH más ácido (4.6 o inferior). Este bajo pH junto con la naturaleza de los ácidos orgánicos que contienen hace que normalmente se inhiba el crecimiento de las bacterias excepto las ácido lácticas. Por consiguiente, los hongos y las levaduras son los microorganismos predominantes en las frutas (Wiley, 1997).

Las superficies expuestas de la fruta se contaminan a través del suelo, agua, aire, animales, insectos, excrementos, entre otros y luego a través del contacto con el equipo de procesamiento. Algunos hongos son capaces de penetrar la cutícula intacta de los frutos. Otros organismos de deterioro entran en la fruta a través de heridas mecánicas producidas durante la cosecha, el manipuleo y el envasado, o a través de aberturas naturales de la cutícula, atacando los tejidos internos. Entre los deterioros pueden citarse: crecimiento superficial de hongos, ennegrecimiento de los tejidos, podredumbre marrón, azul, rosada y gris causada por hongos o podredumbre por levaduras. La ocurrencia de podredumbre se asocia a la producción microbiana de enzimas que degradan las paredes celulares. A medida que la fruta madura, la susceptibilidad a los microorganismos de deterioro aumenta, por una parte, debido a que la producción de componentes

antifúngicos de la fruta disminuye, y por otra parte debido a la degradación de las paredes celulares. El deterioro también se favorece en condiciones de alta temperatura y alta humedad después de la cosecha (FAO, 2006).

2.3. FACTORES DE INFLUENCIA SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO

La habilidad de los microorganismos (excepto los virus) para crecer en un alimento, lo determina el ambiente interno del alimento, así como las condiciones ambientales en las cuales se almacena. Estos dos aspectos son designados parámetros intrínsecos y extrínsecos de un alimento (Ray, 1996).

Los parámetros intrínsecos incluyen tipo y cantidad de nutrimentos, actividad de agua (a_w), pH, potencial redox (Eh) y sustancias inhibitorias presentes de manera natural, mientras que los parámetros extrínsecos son: temperatura, humedad relativa y transferencia de gases (Ray, 1996).

1.3.1. Nutrimentos para el crecimiento microbiano

Los microorganismos normalmente encuentran en un alimento gran variedad de nutrimentos.

El crecimiento microbiano se lleva a cabo por la síntesis de componentes celulares y de energía. Los nutrimentos necesarios para este propósito son obtenidos del alimento por la célula microbiana, estos nutrimentos incluyen carbohidratos, proteínas, lípidos, minerales y vitaminas. Todos los alimentos contienen estos cinco grupos de nutrimentos, de forma natural o adicionados y, la cantidad de cada nutrimento varía según el tipo de alimento (Ray, 1996).

2.3.2. Actividad de agua (a_w)

La actividad de agua (a_w) es una medida de la cantidad de agua disponible (agua libre) de un alimento capaz de propiciar el crecimiento microbiano o las reacciones químicas y enzimáticas (Badui, 1998). El agua libre en un alimento es necesaria para el crecimiento microbiano. Es necesaria para el transporte de nutrimentos y remoción de materiales de

desecho, para realizar reacciones enzimáticas, sintetizar material celular y, tomar parte de otras reacciones bioquímicas (síntesis de proteínas a partir de aminoácidos) (Ray, 1996). Los microorganismos son sensibles al estado del agua del medio y existen valores de a_w límites por debajo de los cuales no pueden permanecer metabólicamente activos, es decir, no pueden multiplicarse, esporular o producir metabolitos, entre otros, metabolitos tóxicos (Alzamora, 1997).

Cada especie o grupo microbiano tiene un óptimo, máximo y mínimo nivel de a_w para su crecimiento. En general los valores mínimos para el crecimiento de los grupos microbianos son: mohos, 0.8, mohos xerófilos 0.6; levaduras, 0.85, levaduras osmófilas entre 0.6 y 0.7; bacterias Gram-positivas 0.90, bacterias Gram-negativas 0.93, *Staphylococcus aureus* 0.85, bacterias halofílicas 0.75. Cuando el valor de a_w es reducido por debajo de los niveles mínimos para el crecimiento microbiano, las células quedan viables por algún tiempo. Pero si el valor de a_w se reduce drásticamente, las células perderán viabilidad rápidamente al inicio y después lo harán lentamente (Ray, 1996).

Ordóñez (1998) hace una clasificación de los alimentos en términos de la actividad de agua:

- a) Alimentos de $a_w > 0.98$. A este grupo pertenece la mayoría de los alimentos frescos: carne, pescado, leche y otras bebidas, frutas y hortalizas.
- b) Alimentos con a_w 0.98 a 0.93. Los alimentos que pertenecen a este grupo son: leche concentrada, carnes curadas, jamón cocido, mortadelas, salchichas, etc, carnes y pescado ligeramente salado (concentración máxima de sal del 10%), quesos frescos, pan y frutas en almíbar (concentración máxima de sacarosa del 50%).
- c) Alimentos con a_w 0.93 a 0.85. Dentro de este grupo se encuentran alimentos más deshidratados o con una gran concentración de solutos, como los embutidos madurados, jamón serrano, cecina, quesos muy madurados, leche condensada entre otros.
- d) Alimentos con a_w 0.85 a 0.60. A este grupo pertenecen los alimentos denominados IMF (alimentos de humedad intermedia), lo cuales son los frutos secos, cereales, harinas, mermeladas, pescado muy salado (bacalao), nueces, almendras entre otros.

- e) Alimentos con $a_w < 0.60$. Los alimentos que presentan a_w inferiores a 0.60 son por ejemplo, dulces diversos, chocolates, leche en polvo, miel, galletas, papas fritas entre otros.

2.3.3. pH

El pH indica la concentración de los iones hidrógeno en un sistema y es expresado como el logaritmo negativo de la concentración del ión hidrógeno $-\log [H^+]$. El pH se relaciona con la acidez presente en un alimento, es decir el valor del pH depende de la cantidad y tipo de ácidos contenidos en un alimento (Ray, 1996).

El crecimiento y la supervivencia de los microorganismos están fuertemente influenciados por el pH y el contenido de ácidos orgánicos del alimento; éstos determinan, de acuerdo a su valor, floras contaminantes diferentes y de distinta resistencia a los factores de conservación (Alzamora, 1997).

El pH de un alimento tiene un importante efecto sobre el crecimiento y la viabilidad de la célula microbiana. Cada especie tiene un óptimo y un intervalo de pH en su crecimiento. En general, mohos y levaduras a diferencia de las bacterias son viables a pH bajos. El intervalo de pH para mohos es de 1.5 a 9.0; para levaduras de 2.0 a 8.5; bacterias Gram-positivas de 4.0 a 8.5 y bacterias Gram-negativas de 4.5 a 9.0 (Pelczar, 1982; Ray, 1996). Cuando el pH se reduce por debajo del límite del crecimiento de una especie microbiana, se detiene su crecimiento y la especie perderá viabilidad, pues el requerimiento energético de la célula microbiana aumenta al tratar de equilibrar el pH interno y cuando el pH mínimo para el crecimiento es alcanzado la energía es demasiado baja para poder sintetizar componentes celulares.

2.3.4. Potencial redox (Eh)

El potencial redox o potencial oxidación-reducción, es la medida de la diferencia de potencial generada en un sistema por una reacción en la cual una sustancia es oxidada y otra sustancia es reducida simultáneamente (Ray, 1996).

En sistemas biológicos, la oxidación y reducción de sustancias es la principal forma de generar energía (Ray, 1996). En alimentos, el potencial redox varía dependiendo del tipo de procesamiento (algunas sustancias se reducen por la temperatura), también el Eh depende de las sustancias presentes en el alimento, como son ácidos orgánicos, azúcares reductores y proteínas; así mismo por las condiciones de envasado y almacenamiento las cuales pueden ser en presencia o ausencia de oxígeno. El crecimiento de los microorganismos y las reacciones metabólicas específicas para generar energía son extremadamente dependientes del potencial redox del alimento (Ray, 1996). Así que el intervalo de Eh para el crecimiento microbiano depende del grupo específico de microorganismos al cual se refiera.

Los microorganismos pueden ser agrupados en aerobios, anaerobios, anaerobios facultativos y microaerófilos (Ray, 1996). Los microorganismos aerobios necesariamente requieren oxígeno libre para producir energía, los anaerobios no lo podrán hacer en presencia de oxígeno y morirían si hay pequeñas cantidades de éste. Los anaerobios facultativos pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno, mientras que los microaerófilos crecen muy bien si tan solo están presentes pequeñas cantidades de oxígeno libre (Ray, 1996).

2.3.5. Temperatura

El crecimiento microbiano se lleva a cabo a través de reacciones enzimáticas y la temperatura tiene influencia sobre estas reacciones. Se sabe que por cada 10 °C de incremento en una reacción, esta se acelera al doble y viceversa, si se disminuye la temperatura a 10 °C la reacción se retarda (Ray, 1996).

En consecuencia, los microorganismos importantes en alimentos se dividen en tres grupos basándose en su temperatura de crecimiento. Cada grupo tiene un óptimo y un intervalo de temperatura. Los microorganismos termófilos son aquellos cuya temperatura óptima de crecimiento es de 55 °C y pudiéndose desarrollar en un intervalo entre 45 y 70 °C; los mesófilos tienen como temperatura óptima de crecimiento los 35 °C con un intervalo entre 10 y 45 °C y los psicrófilos con un óptimo de 15 °C e intervalo de -5 a 20 °C (Ray, 1996).

Los alimentos son expuestos a diferentes temperaturas desde su procesamiento hasta el momento de consumo. Dependiendo de las condiciones de proceso, un alimento puede ser expuesto a altas temperaturas entre 60 a 65 °C y hasta 100 °C (ultrapasteurización), durante el almacenamiento puede estar a 5 °C (refrigeración) o –20 °C (congelamiento). Algunos alimentos son estables a temperaturas ambiente en un intervalo de 10 a 35 °C. Es así que diferentes temperaturas son empleadas para desfavorecer el crecimiento microbiano (Ray, 1996).

El tratamiento térmico a temperaturas mayores a las que el microorganismo puede crecer produce, de acuerdo a su severidad y tiempo de aplicación, la inactivación o la lesión subletal del mismo. El calor provoca múltiples efectos en los componentes celulares de los materiales biológicos; sin embargo, se han identificado cuatro blancos principales relacionados al daño térmico letal o subletal: el DNA, el RNA y los ribosomas, la membrana citoplasmática y enzimas específicas (Gould, 1989).

2.4. CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS POR MÉTODOS COMBINADOS.

La conservación de alimentos se basa, en primer lugar y empleando conceptos ecológicos, en la aplicación de factores de estrés, conducentes a la inhibición de crecimiento y/o la muerte de la comunidad microbiológica, así como a la prevención del establecimiento de otras comunidades (Boddy y Wimpenny, 1992). Por lo tanto, la conservación de alimentos implica poner a los microorganismos en un ambiente hostil para inhibir su crecimiento, reducir su supervivencia o causar su muerte (Leistner, 2000). Es así que, la conservación de alimentos se basa principalmente en el retraso o prevención del crecimiento de microorganismos deteriorativos o patógenos, por el uso de factores de influencia en el crecimiento y sobrevivencia microbiana (Welti-Chanes et al., 1996).

La mayoría de las técnicas de conservación de alimentos se basan en el retraso o prevención del crecimiento microbiano, utilizando los factores que más influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos, tales como temperatura, actividad acuosa (aw), potencial redox (Eh), pH, sustratos disponibles, presencia o ausencia de

oxígeno, concentración de los solutos mayoritarios presentes y sustancias inhibitorias (Barbosa-Cánovas, 1999).

Por definición, la tecnología de métodos combinados consiste en la aplicación conjunta de dos o más factores de inhibición del crecimiento microbiano, aprovechando el efecto sinérgico de los mismos. El objetivo es utilizar simultáneamente diferentes barreras para retrasar o prevenir el crecimiento microbiano, en el producto.

La mayoría de los métodos tradicionales de conservación de alimentos, se basan en la aplicación de un solo factor, para superar un dado mecanismo homeostático de la célula, por ejemplo, la esterilización permite conservar el alimento aplicando suficiente calor, como para inactivar las esporas y células vegetativas bacterianas; la deshidratación disminuye la *aw* hasta un valor suficientemente bajo, como para extender la fase lag de crecimiento hasta un valor infinito; la conservación por acidificación, reduce el pH hasta valores menores de dos unidades, y se impide el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras (Alzamora, 1997). El método de factores combinados, por el contrario, no aplica un solo factor en forma severa, sino que supera los mecanismos homeostáticos de los microorganismos mediante una combinación de factores que actúan aditiva o sinérgicamente, cada uno de ellos utilizado en dosis leves (Leistner y Rödel, 1976; Leistner y Rödel, 1976). Es decir, si se considera la aplicación de ellos en forma individual, no producirían ni la muerte, ni la inhibición del crecimiento microbiano (Alzamora, 1997).

La conservación por métodos combinados ayuda a disminuir la contaminación microbiana inicial, prolonga la fase lag y reduce la velocidad de crecimiento exponencial. Su fundamento está en inhibir el desarrollo bacteriano, de hongos y levaduras, por la interacción combinada de distintos factores de “estrés” (Cerezal y Duarte, 2004).

En realidad, el concepto de “métodos combinados” tiene un significado más amplio, ya que involucra también la utilización de factores que actúan sobre algún microorganismo específico del medio y no sobre los restantes, por ejemplo, puede efectuarse una ligera reducción de la *aw* para evitar el crecimiento de *C. Botulinum*, sensible a la reducción de *aw* y, un ligero tratamiento térmico para inactivar levaduras y células de *Staphylococcus* sensible al calor (Alzamora, 1997).

2.4.1. Efecto barrera

La manipulación de los parámetros intrínsecos o extrínsecos del alimento, afectarán marcadamente la respuesta de los microorganismos presentes en o sobre el alimento. El uso de un solo factor, como la disminución de la actividad acuosa por debajo de 0.85, podrá inhibir el crecimiento, pero tal cambio en el producto alimenticio puede ser inaceptable por el consumidor. Reduciendo la actividad acuosa a 0.90 y utilizando un segundo factor, como el almacenamiento a baja temperatura, puede tener el efecto deseado de conservación (Zottola, 1994).

Este concepto de utilizar varios métodos subletales de conservación ha sido llamado “efecto barrera” por Leistner y Rödel. Teóricamente los microorganismos son estresados por cada uno de los factores y deben superar cada una de las barreras antes de iniciar su crecimiento (Zottola, 1994).

Cada tratamiento subletal puede ser considerado como un peldaño de una escalera, en donde el microorganismo debe superar cada peldaño antes de iniciar su crecimiento (Figura 2.3). Una escalera con cinco peldaños, cada peldaño representa un método de conservación: temperatura, conservador (pres), pH, actividad acuosa (a_w) y potencial redox (E_h). El microorganismo estresado debe subir cada escalón (superar cada barrera), antes de que su crecimiento sea posible. Si el sistema es diseñado adecuadamente, el microorganismo es incapaz de alcanzar la meta (fin de la escalera), antes de que la vida de anaquel del producto llegue a su fin (Zottola, 1994).

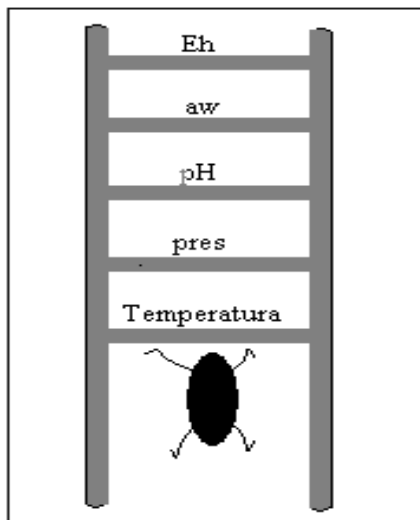


Figura 2.3. El “efecto barrera”. El microorganismo debe escalar cada peldaño o superar cada uno de los procesos subletales: temperatura, conservador, pH, aw y Eh antes de que pueda iniciar su crecimiento.

2.4.2. Ejemplos de efecto barrera

El efecto barrera es ilustrado por la Figura 2.4, representando ocho ejemplos.

Ejemplo 1. Representa al alimento conteniendo seis barreras: alta temperatura durante el procesamiento (F), almacenamiento a baja temperatura (t), actividad acuosa (aw), acidez (pH), potencial redox (Eh) y agente antimicrobiano (pres). Los microorganismos presentes no pueden superar estas barreras y, así este alimento es seguro y estable microbiológicamente. Sin embargo el ejemplo 1 es solo un caso teórico, pues todas las barreras son de igual magnitud, teniendo la misma intensidad y esto raramente ocurre (Leistner, 1995).

Una situación más común es representada por el ejemplo 2, donde la estabilidad microbiana del producto se basa en barreras con diferentes intensidades. En este producto particular las principales barreras son aw y pres, siendo las barreras de menor intensidad t, pH y Eh. Esas cinco barreras son suficientes para inhibir los tipos usuales y el número de microorganismos asociados con tal producto (Leistner, 1995).

Si solo hay algunos microorganismos presentes al inicio como en el ejemplo 3, entonces solo algunas o barreras menos intensas son suficientes para la estabilidad del producto. Las buenas condiciones higiénicas o el proceso aséptico de alimentos perecederos se

basan en este principio. Algo similar pasa si la carga microbiana inicial de frutas de alta humedad se reduce substancialmente por el escaldado con vapor, pues después de este tratamiento solo algunos microorganismos están presentes al inicio, los cuales son fácilmente inhibidos (Leistner, 1995).

El lado opuesto se representa en el ejemplo 4, si debido a malas condiciones higiénicas muchos microorganismos indeseables están presentes inicialmente, las barreras usadas no pueden prevenir su proliferación o la toxicidad del alimento (Leistner, 1995).

El ejemplo 5 es un alimento rico en nutrimentos y vitaminas, los cuales promueven el crecimiento de los microorganismos (“efecto trampolín”), y de esta manera las barreras en tal producto deben aumentarse, de lo contrario los microorganismos las superarán (Leistner, 1995).

El ejemplo 6 ilustra el comportamiento del daño subletal de los organismos en el alimento. Si, por ejemplo, las esporas bacterianas en los productos cárnicos son subletalmente dañadas por el calor, entonces las células vegetativas derivadas de tales esporas son vitalmente débiles y, por lo tanto son inhibidas por algunas o por leves barreras (Leistner, 1995).

En algunos alimentos la estabilidad se logra durante el proceso de maduración, mediante la secuencia de barreras, dirigiéndose así a un producto final estable. Esto se ilustra en el ejemplo 7 donde se ejemplifica la secuencia de barreras en salchichas fermentadas (Leistner, 1995).

Finalmente el ejemplo 8 ilustra el posible efecto sinérgico de las barreras, probablemente relacionado a la alteración de la homeostasis de los microorganismos en el alimento (Leistner, 1995).

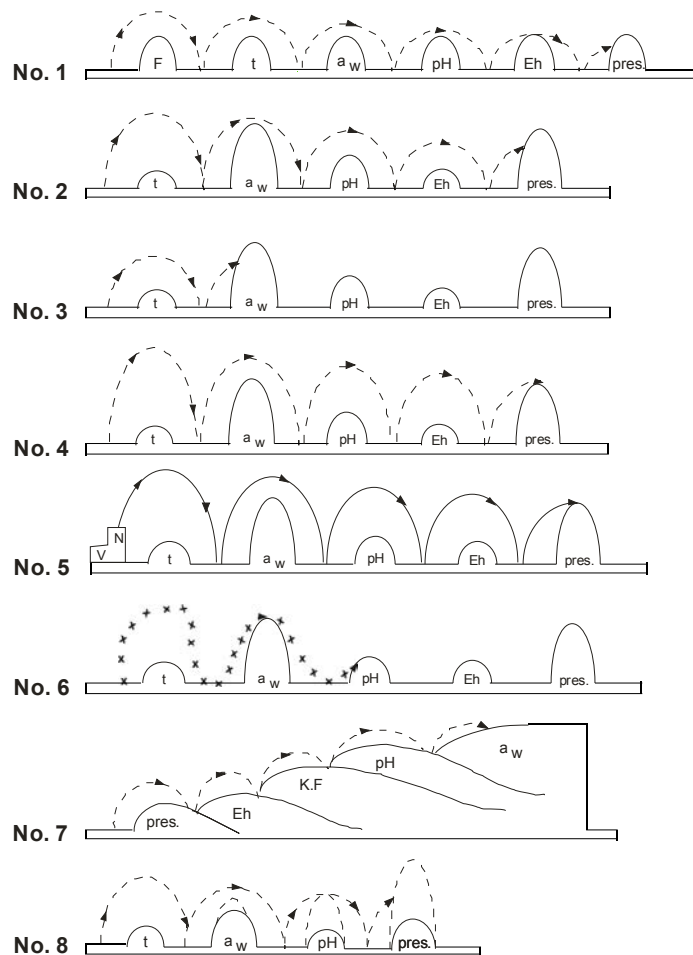


Figura.2.4. Ejemplos de efecto barrera. F: calentamiento, t: refrigeración, a_w : actividad acuosa, pH: acidificación, Eh: potencial redox, pres: conservadores, K-F: competencia microbiana, V: vitaminas, N: nutrientes. Fuente: Leistner, 1995.

2.4.3. Principales factores de conservación empleados en métodos combinados

El concepto barrera ilustra que las interacciones complejas de temperatura, a_w , pH, y otros son significativos en la estabilidad microbiana de los alimentos (Barbosa-Cánovas, 1999), así a los factores usados en la conservación de alimentos se les ha llamado “barreras” y hay numerosas barreras que han sido aplicadas para la conservación de

alimentos (Lee, 2004). Las más importantes barreras usadas en la conservación de alimentos son temperatura (alta o baja), aw, pH, Eh, conservadores (nitrato, sorbato, sulfito) y competencia microbiana (bacterias ácido lácticas) [Cuadro 2.1]. Sin embargo hay más de 60 barreras potenciales para alimentos (Leistner, 2000) [Cuadro 2.2].

Del entendimiento del efecto barrera, derivó la conservación por métodos combinados y, partir de este método de conservación surgió los llamados alimentos mínimamente procesados, dentro de los cuales están los productos de alta humedad (productos derivados de frutas). Tapia de Daza et al., (1997) establecieron los intervalos de los factores involucrados en la conservación por métodos combinados en frutas de alta humedad, Cuadro 2.3.

Cuadro 2.1. Barreras empleadas para la conservación de alimentos. Fuente: Leistner, 1995.

Barrera	Aplicación
Temperatura alta	calentamiento
Temperatura baja	congelación
Reducción de aw	secado, curado, concentración
Incremento de la acidez	adición de ácidos
Reducción de Eh	Remoción de oxígeno o adición de ascorbato
Conservadores	sorbatos, sulfitos, nitritos
Competencia microbiana	fermentaciones microbiológicas

Cuadro 2.2. Barreras potenciales en conservación de alimentos. Fuente: Lee, 2004.

Tipo de barrera	Ejemplos
Barreras físicas	Envasado aséptico, energía electromagnética (microondas, radio frecuencias, pulsos magnéticos campos de alta electricidad), altas temperaturas (escaldado, pasterización, evaporación, extrusión cocción, freído), radiación iónica, baja temperatura (refrigeración, congelación), atmósferas modificadas películas, inactivación fotodinámica, altas presiones ultrasonidos, radiación ultravioleta
Barreras fisicoquímicas	Dióxido de carbono, etanol, ácido láctico, lactoperoxidasa, bajo pH, bajo Eh, baja aw, productos de reacciones de Maillard, ácidos orgánicos, oxígeno, ozono, fenoles, fosfatos, sal, ahumado, nitrito / nitrato de sodio, sulfito de sodio/ potasio, especias y hierbas, agentes surfactantes.
Barreras microbiológicas	Antibióticos, bactericidas, flora competitiva, cultivos protectores.

Cuadro 2.3 Principales factores usados en frutas de alta humedad, conservadas por métodos combinados.
Fuente: Tapia de Daza et al., 1997.

Factor	Intervalo del factor
Actividad acuosa (adicionando o por inmersión en sacarosa, glucosa, maltodextrinas, etc.)	0.94-0.98
pH, (ajustado con ácido cítrico o fósfórico)	3.0-4.1
Tratamiento térmico escaldado llenado en caliente	Vapor saturado 100 °C
Agentes antimicrobianos sorbato de potasio benzoato de sodio	0-1500 ppm 0-1500 ppm
Agentes que evitan el pardeamiento sulfitos	0-150 ppm

2.5. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA CONSERVACIÓN POR MÉTODOS COMBINADOS

Los mecanismos de acción sobre los que se fundamenta la conservación por métodos combinados más conocidos son: homeostasis, agotamiento metabólico, reacciones ante el estrés y mecanismo *multitarget* (Leistner, 2000).

2.5.1. Homeostasis

Homeostasis es la tendencia a la uniformidad o estabilidad en el estado normal (ambiente interno) de los organismos (Barbosa-Cánovas, 1999).

En la conservación de alimentos la homeostasis microbiana es un fenómeno clave que merece mucha atención, pues si la homeostasis de los microorganismos presentes en un alimento es alterada por los factores de conservación (barreras), estos no podrán multiplicarse, se quedarán en fase lag o bien morirán antes de que la homeostasis se haya reestablecido (reparado). Por lo tanto la conservación del alimento se consigue por la alteración temporal o permanente de la homeostasis de los microorganismos presentes en el alimento (Leistner, 2000).

2.5.2. Agotamiento metabólico

Otro fenómeno de importancia práctica es el agotamiento metabólico de los microorganismos, el cual puede conducir a una “autoesterilización” de los alimentos (Leistner, 1995). (Leistner, 2000) observó que en salchichas con un leve tratamiento térmico, ajustadas a diferentes actividades acuosas mediante la adición de sal y grasa, inoculadas con *Clostridium sporogenes* y almacenadas a 37 °C. En donde las esporas sobrevivientes al tratamiento térmico desaparecieron del producto durante el almacenamiento. Comportamiento similar de esporas de *Clostridium* y *Bacillus* fue observado durante el almacenamiento de productos cárnicos, si estos eran almacenados a temperatura ambiente. Productos cárnicos fueron inoculados después del procesamiento con *Staphylococcus*, *Salmonellas* o levaduras, el recuento microbiano decreció rápidamente durante el almacenamiento sin refrigeración, especialmente en actividades acuosas cercanas al umbral del crecimiento microbiano. Fenómeno semejante se presentó en frutas de alta humedad, en donde el recuento de bacterias, levaduras y hongos, decreció rápidamente en los productos que no fueron almacenados en refrigeración (Elguezabal et al., 1994; García y Reátegui, 2002).

Una explicación general de este comportamiento, en donde los microorganismos vegetativos que no pueden crecer morirán y, ellos mueren más rápidamente si la estabilidad esta muy cercana al umbral de su crecimiento, en donde el almacenamiento se lleva a cabo a altas temperaturas, donde hay presencia de agentes antimicrobianos y, donde los microorganismos son subletalmente dañados sugiere que, aparentemente los microorganismos presentes en el alimento, hacen todo lo posible para reparar el mecanismo de su homeostasis, para superar el ambiente hostil, por hacer esto, usan completamente su energía y mueren si empiezan a quedar agotados metabólicamente. Esto conduce a una “autoesterilización” del alimento (Leistner, 2000).

El agotamiento metabólico se acelera, si están presentes varios factores de conservación (barreras) y, esto puede causar un incremento en la demanda energética para mantener la homeostasis bajo condiciones de estrés (Leistner, 2000).

2.5.3. Reacciones ante el estrés

Algunas bacterias se vuelven más resistentes o son más virulentas bajo estrés, ya que generan proteínas protectoras producidas por choque. La síntesis de proteínas protectoras producidas por choque, son inducidas por calor, pH, aw, etanol, compuestos oxidantes, entre otros así como por inanición (Leistner, 2000).

Las diferentes respuestas de los microorganismos ante el estrés obstaculizan la conservación de los alimentos y pueden volverse un problema para la aplicación de métodos combinados. Por otra parte, la activación de genes para la síntesis de proteínas protectoras producidas por choque, las cuales ayudan a los microorganismos a superar las situaciones de estrés, debe ser más difícil, si diferentes tipos de estrés son recibidos al mismo tiempo. La exposición simultánea a diferentes tipos de estrés, requerirá consumir energía para las síntesis de varias o pocas, pero mucho más efectivas proteínas protectoras producidas por choque, lo cual podrá ser la causa de que los microorganismos empiecen a agotarse metabólicamente (Leistner, 2000).

2.5.4. Mecanismo *multitarget*

El mecanismo *multitarget* tiene la meta ambiciosa de una moderada pero efectiva conservación de los alimentos. Se ha sospechado por algún tiempo, que diferentes barreras en un alimento pueden no solamente tener un efecto aditivo en la estabilidad microbiana, sino que pueden actuar sinérgicamente. Un efecto sinérgico se puede llevar a cabo si las barreras en un alimento golpean, al mismo tiempo, diferentes objetivos (membrana celular, ADN, sistemas enzimáticos, pH, aw, Eh) en la célula microbiana y estas (barreras) alteran la homeostasis del microorganismo presente en varios aspectos. Si es así, la reparación de la homeostasis también como la activación de las proteínas protectoras inducidas por choque empieza a ser más difícil (Leistner, 2000).

Por lo tanto, el empleo simultáneo de diferentes barreras en la conservación de un alimento en particular, debe conllevar a una óptima estabilidad microbiológica de dicho alimento. En términos prácticos, esto puede significar que es más efectivo el uso de diferentes factores de conservación (barreras) de intensidades bajas, que un solo factor de

conservación con una alta intensidad, ya que diferentes factores de conservación pueden tener un efecto sinérgico. Se presupone que los objetivos sobre los microorganismos de los diferentes factores de conservación de alimentos serán definidos, y que las barreras puedan agruparse en clases de acuerdo a sus objetivos. Una moderada y efectiva conservación de alimentos, esto es un efecto sinérgico de las barreras, es probable si las medidas de conservación se basaron en una selección y combinación inteligente de barreras provenientes de diferentes clases de objetivos (Leistner, 2000).

2.6. IMPORTANCIA

Las limitantes más importantes para incrementar el consumo fresco y/o el procesamiento de frutas son la estacionalidad de la producción y su perecibilidad. Una forma parcial de remediar esta situación es la de procesar localmente el excedente no consumido en fresco, pero básicamente se ve muy limitado por la tecnología convencional que se requiere y no se dispone con facilidad en lugares de producción de los frutos. Ante esta problemática surge como opción el empleo de tecnologías alternativas más sencillas y de menor costo, es así que una técnica que se puede emplear es la de métodos combinados, por la ventaja de ser un método conveniente de elaboración en zonas rurales en donde se puedan conservar las frutas “*in situ*”.

La conservación por métodos combinados (tecnología de barreras) es provechosamente utilizada tanto en países industrializados como en países en vías de desarrollo, por su suave pero efectiva conservación de los alimentos (Leistner, 2000). La conservación por métodos combinados ha demostrado ser una técnica efectiva y en general se emplea prioritariamente en regiones apartadas de los centros urbanos donde no se cuenta con tecnología de punta ni se dispone de suficiente energía (Cerezal y Duarte, 2004). La carencia de técnicas convenientes para la distribución, el transporte, el almacenamiento y también la alta perecibilidad conduce a las grandes pérdidas que podrían ser reducidas procesando por métodos combinados (Nassu et al., 2001).

Los factores utilizados por esta tecnología se han seleccionado para obtener productos de alta calidad y de características similares a las frutas frescas (Cerezal y Duarte, 2004); ya que evitan la aplicación de un solo factor de conservación en forma severa con la

consiguiente mejora en la calidad organoléptica y nutrimental del alimento (Alzamora, 1997), no requiere de un equipamiento especializado, el empleo de energía es mínimo para su procesamiento y no se necesita energía para su almacenamiento, pues los productos son estables a temperatura ambiente (Cerezal y Duarte, 2004). El proceso aplicado a frutas se basa en la combinación de un tratamiento térmico suave, una ligera reducción de la *aw*, descenso de pH y adición de niveles permitidos de agentes antimicrobianos, en un proceso de estabilización por equilibrio de trozos de fruta en el sistema jarabe-ácido-conservador en el caso de conservación en trozos de fruta y, en sistemas pulpa-conservador-soluto-ácido en el caso de pulpas (García y Reategui, 2002). Las frutas procesadas por métodos combinados pueden ser consumidas como si fueran postres frescos o empleados en la formulación de otros alimentos, tales como jugos, néctares, ates, mermeladas, helados, yogurt etc.

Tal es la importancia de la problemática como de las opciones de solución, los aspectos considerados para desarrollar tecnologías regionales, según Tapia de Daza (1996), deben:

- a. Ser simple y no cara (independiente de la cadena de frío)
- b. Ser energéticamente eficiente
- c. Ser conveniente para el procesamiento “*in situ*”
- d. Evitar las pérdidas de las producciones estacionales
- e. Contribuir a la diversificación de las industrias locales
- f. Ayudar a reducir las pérdidas postcosecha
- g. Conservar las propiedades del producto fresco

2.7. FRUTAS CONSERVADAS POR MÉTODOS COMBINADOS

Existe una amplia información acerca de frutas conservadas por métodos combinados, resultado de un proyecto multinacional que inició en 1991, llamado CYTED (ciencia y tecnología para el desarrollo) con el subprograma “*Bulk Preservation of Fruits by Combined Methods Technology*”. Donde se desarrollaron trabajos tanto con piezas como con pulpas de frutas. Los procesos de conservación se realizan combinando factores de inhibición y consiste en un escaldado de la fruta es decir, la exposición de las piezas de fruta a altas temperaturas durante unos pocos minutos, tiene como función principal

destruir las enzimas que podrían deteriorar las hortalizas y las frutas, pero el escaldado tiene también el importante rol de reducir la carga microbiana inicial mediante la inactivación de microorganismos sensibles al calor (FAO, 2006). Así se ha encontrado que el escaldado reduce la carga microbiana entre un 60 y un 99 por ciento (Alzamora et al., 1995), seguido de una depresión de la aw ya sea por deshidratación osmótica o por adición de solutos en un intervalo de 0.94 a 0.98, pH de 3.0 a 4.1 (ajustado con ácido cítrico o fosfórico), 400 a 1000 ppm de sorbato de potasio o benzoato de sodio y generalmente 150 ppm de bisulfito de sodio. El procesamiento de algunas frutas (como pulpa de plátano) incluye un suave tratamiento térmico, después del empacado o un llenado en caliente (Alzamora et al., 1995). En el Cuadro 2.4. se presentan algunos trabajos que se realizaron conservando frutas por métodos combinados.

Cuadro 2.4. Frutas conservadas por métodos combinados. Aw = actividad de agua, KS = sorbato de potasio, AA = ácido ascórbico, SB = benzoato de sodio, SMB = metabisulfito de sodio. Fuente: Alzamora et al., 1995.

Fruta	Factores de inhibición	Temperatura de almacenamiento °C	Vida comercial (meses)
<i>trozos</i> melocotón, mitades	escaldado (vapor, 2 min.) aw = 0.94 (glucosa) pH= 3.5 NaHSO ₃ = 150 ppm KS =1000 ppm	20 - 30	4
piña troceada	escaldado (vapor) aw = 0.97 (glucosa) pH= 3.8 NaHSO ₃ = 150 ppm KS =1000 ppm	25	8
mango	escaldado (vapor, 4 min.) aw = 0.97 (sacarosa) pH= 3.0 NaHSO ₃ = 150 ppm KS =1000 ppm	35	4.5 continúa

Cuadro 2.4. continuación

Fruta	Factores de inhibición	Temperatura de almacenamiento °C	Vida comercial (meses)
pulpas plátano	escaldado (vapor, 1 min.) aw = 0.97 (glucosa) pH= 3.4 NaHSO ₃ = 400 ppm KS =100 ppm AA = 250 ppm tratamiento suave con calor 100°C, 1 min.	27	3.5
mango	escaldado (80°C,10 min.) aw = 0.985 de la fruta pH= 3.6 SMB =150 ppm SB= 1000 ppm	30-35	3
ciruela	escaldado (vapor, 3 min.) aw = 0.98 (sacarosa) pH= 3.0 KS= 1000 ppm	25	4
maracuyá	aw = 0.94 (sacarosa) pH = 3.4 tratamiento con calor (85°C, 2 min) Na ₂ S ₂ O ₃ =150 ppm KS= 1500 ppm llenado en caliente (60°C)	35	6
tamarindo	aw = 0.96 (sacarosa) pH = 2.5 tratamiento con calor (85°C, 2 min) Na ₂ S ₂ O ₃ =150 ppm KS= 1500 ppm llenado en caliente (60°C)	35	6

3. HIPÓTESIS

La aplicación de métodos combinados permitirá mantener una buena calidad microbiana (hongos y levaduras) al almacenar la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* a temperatura ambiente.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Caracterizar parcialmente la pulpa de la fruta de *Cyrtocarpa procera* y aplicar la tecnología de métodos combinados para su conservación.

4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar parcialmente la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*.
- Determinar el efecto combinado de las variables independientes (actividad acuosa, sorbato de potasio y tratamiento térmico) en el crecimiento de hongos y levaduras (variable dependiente).
- Seleccionar el método combinado que mantenga la calidad microbiana (HyL) de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* durante su almacenamiento.

5. METODOLOGÍA

5.1. Obtención de la pulpa de la fruta de *Cyrtocarpa procera*

El fruto de *Cyrtocarpa procera* proveniente de la comunidad de Acatizapan fue adquirido en un mercado local y trasladado en cubetas (5 kg de fruto/cubeta) a la planta piloto de la Universidad. Posteriormente fue seleccionado separando aquéllos que presentaban daño físico, ruptura o alteración y eligiéndose sólo aquéllos que no tenían daños físicos y con color característico de la fruta madura, es decir, un color amarillo uniforme. Con la finalidad de eliminar materia extraña (tierra, basura y hojas) se lavaron por inmersión, se hizo la separación de los frutos en tres lotes (un lote por cada réplica) y se mantuvieron en refrigeración (4 ° C) hasta su utilización. Luego, los frutos fueron escaldados en agua a 95 °C por un minuto según el manual de elaboración de frutas y hortalizas (Paltrinieri, 1990). Para la obtención de la pulpa de los frutos escaldados se utilizó un despulpador JERSA, modelo DRAIOO20 separando la pulpa de los residuos (cáscara y semilla). De esta pulpa se tomó una cuarta parte para la caracterización parcial y se mantuvo en refrigeración. El resto de la pulpa se utilizó inmediatamente para hacer el estudio de los métodos combinados (Figura 5.1.).

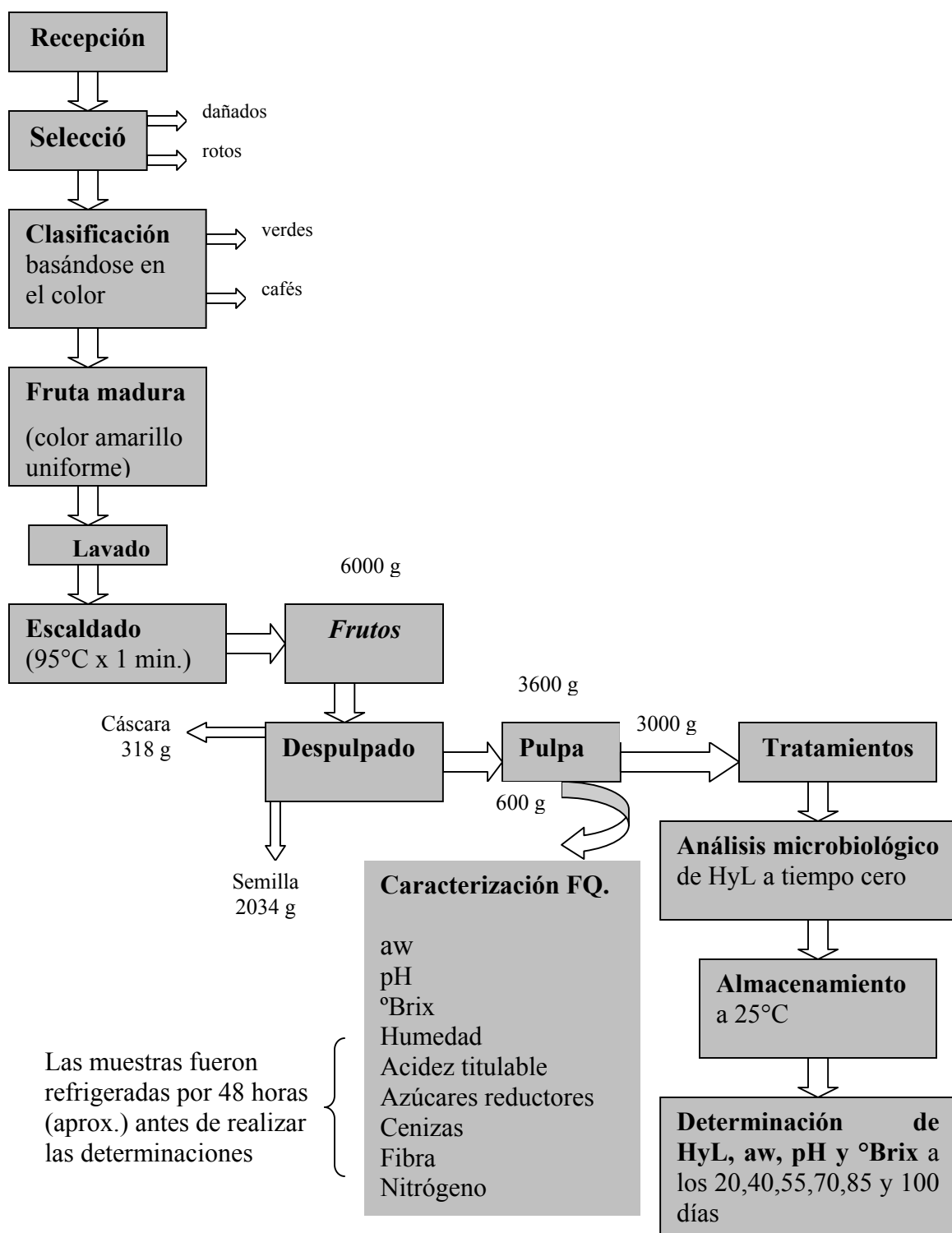


Figura 5.1. Diagrama esquemático de las etapas requeridas en la caracterización físicoquímica y aplicación de métodos combinados de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*.

5.2. Caracterización parcial de la pulpa de la fruta de *Cyrtocarpa procera*

La caracterización consistió en la determinación de pH, porcentaje de sólidos solubles, acidez titulable expresada como ácido cítrico, azúcares reductores directos, actividad acuosa (aw) y el análisis proximal (humedad, cenizas, fibra cruda y proteína). Los métodos que se usaron fueron los siguientes:

- El pH se midió utilizando un potenciómetro calibrado marca Corning (modelo pH meter 240).
- La determinación de sólidos solubles se hizo utilizando un refractómetro Abbe marca VISTA (modelo C10) a 20 °C.
- La acidez titulable se determinó por valoración potenciométrica siguiendo el método de la AOAC (*Official Method 942.15B Acidity titratable of Fruit Products*). Los resultados se han expresado en gramos de ácido cítrico /100g.
- La actividad de agua (aw) se realizó empleando un medidor de actividad de agua Decagon modelo Paw- Kit y siguiendo el manual del equipo.
- Los azúcares reductores directos se determinaron por el método volumétrico de Lane-Eynon, siguiendo el AOAC *Official Method 923.09*.
- La determinación de humedad se realizó empleando una termobalanza Sartorius modelo MA45 a una temperatura de 100°C durante 42 ± 3 minutos.
- El porcentaje de proteína se hizo utilizando el método Kjeldahl, siguiendo el AOAC *Official Method 920.152 Protein in Fruit Products*.
- El contenido de fibra se determinó según la técnica descrita por Kirk (1996), empleando papel filtro Whatman No. 41.
- La determinación de cenizas se realizó siguiendo el método de la AOAC (*Official Method 940.26 Ash of Fruit and Fruit Products*).

5.3. Aplicación de métodos combinados a la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*

Los factores que se probaron fueron los siguientes: actividad acuosa (aw) con dos niveles 0.91 y 0.93, presencia de sorbato de potasio (SK) con dos niveles 0 y 400 ppm y tiempo de tratamiento térmico a la pulpa de 60 a 65 °C con dos niveles 0 y 3 minutos. Al combinar estos factores con sus respectivos niveles se obtuvieron ocho tratamientos (Cuadro 5.1.).

Cuadro 5.1. Combinaciones del factorial 2³

Tratamiento	aw	SK(ppm)	t (min.)
Control	0.93	0	0
1	0.91	0	0
2	0.93	400	0
3	0.91	400	0
4	0.93	0	3
5	0.91	0	3
6	0.93	400	3
7	0.91	400	3

La preparación de cada tratamiento se realizó de la siguiente manera:

- Se aleatorizó el orden de la preparación de las ocho combinaciones.
- Se pesó la cantidad de sacarosa necesaria para reducir la aw a 0.91, para este fin se necesitó 60 g de sacarosa por 100 g de pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*.
- Se pesó la cantidad de SK, la cantidad añadida fue de 400mg/Kg.
- Los tratamientos fueron preparados por una sola persona, el orden en que se incorporó cada uno de los factores fue: pulpa, sacarosa, SK y calentamiento (60 a 65°C.)
- Una vez pesada la cantidad necesaria de pulpa, se le añadió la sacarosa y se mezcló en una batidora Sunbeam Mixmaster a una velocidad de 3 y después de un minuto se le añadió el SK, se puso a la velocidad de 5 y se mezcló durante cuatro minutos para obtener una mezcla homogénea.
- Las muestras que requerían calentamiento, según la combinación obtenida, se calentaron empleando para ello una parrilla eléctrica, un termómetro IR y un vaso de precipitado de 1000 ml y agitación. Una vez que toda la masa tuvo una

temperatura de 60°C se empezó a tomar el tiempo (3 min.), el intervalo de temperatura que se mantuvo en la pulpa durante ese tiempo fue de 60 a 65°C .

- g)** Se adicionaron 50 g de muestra, de las diferentes combinaciones, a frascos de polietileno con tapa twist-off, los cuales fueron previamente expuestos a radiación UV durante 10 minutos en una campana Labconco modelo 6413, para disminuir con ello la presencia de contaminación microbiana que pudieran tener dichos frascos.
- h)** Las muestras contenidas en los frascos fueron etiquetados y almacenadas en una cámara de fermentación Luckie, la cual se mantuvo a 25 °C $\pm$ 0.60.



Figura 5.2. Diagrama de flujo de los tratamientos aplicados.

5.4. Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para la caracterización de la pulpa se realizaron dos repeticiones con tres réplicas para cada una de las determinaciones, reportándose los promedios y desviaciones estándar.

Para la aplicación de métodos combinados se tuvo como unidad experimental 50 g de pulpa envasada y almacenada a 25 ± 0.60 °C. Se utilizó un diseño factorial 2^3 completamente aleatorizado, con tres réplicas independientes, dando como resultado un total de veinte y cuatro muestras para cada tiempo, las cuales fueron bloqueadas por día, es decir, las ocho muestras de combinaciones de tratamientos fueron preparadas y analizadas en un día y las otras dos réplicas en los consecutivos días existiendo un día de diferencia entre ellas. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se hizo con un análisis de varianza para tres factores (ANOVA), empleando la transformación logarítmica de los datos (Kuehl, 2003). El software estadístico que se utilizó fue Design-Expert 6.0.1.0. La variable de respuesta que se seleccionó para conocer el efecto de los factores en los tratamientos probados fue la cuantificación de hongos y levaduras (HyL). Esta cuantificación se hizo siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994 para el recuento de hongos y levaduras en alimentos. El monitoreo para cada uno de los tratamientos se realizó a diferentes tiempos: 0 (inicial), 20, 40, 55, 70, 85 y 100 días, sembrando por duplicado cada tratamiento. Las lecturas de las colonias de hongos y levaduras fueron realizadas a los tres días de incubación a 25 ± 1 °C. Además, se midió el pH (potenciómetro calibrado), el porcentaje de sólidos solubles (refractómetro de Abbe) y la actividad acuosa (Paw-Kit) al final del tiempo de estudio para cada uno de los tratamientos (Elguezabal et al., 1994).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización parcial de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*

Los resultados obtenidos de los distintos análisis realizados para la caracterización de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* se presentan en el Cuadro 6.1.

Cuadro 6.1. Caracterización parcial de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*.

Determinaciones	pulpa del fruta de <i>Cyrtocarpa procera</i>
pH	3.44 ($\pm$ 0.10)
Contenido de sólidos solubles (°Brix)	10.13 ($\pm$ 0.18)
Acidez titulable (g. de ác.cítrico /100g)	0.46 ($\pm$ 0.01)
Actividad de agua (aw)	0.93 ($\pm$ 0.01)
Azúcares reductores directos (% peso)	4.34 ($\pm$ 0.05)
Humedad (% peso)	83.62 ($\pm$ 0.03)
Proteína (% peso)	1.61 ($\pm$ 0.13)
Fibra (% peso)	0.38 ($\pm$ 0.15)
Cenizas (% peso)	0.68 ($\pm$ 0.01)

Nota: Datos evaluados de la pulpa proveniente del fruto escaldado.

Se encontró que la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* fue ácida registrando un valor de 3.44 ± 0.10 . Kirk (1996) menciona un intervalo de 2.5 a 4.5 para los vegetales, siendo para la mayoría de las frutas de 3.0 a 3.5. En el Cuadro 6.2. se presentan los valores de pH de algunas frutas tropicales y subtropicales, que pueden servir de referencia para ubicar a la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*. Como se puede apreciar, la pulpa del fruto de la chupandía tuvo un pH parecido al de la manzana y al del maracuyá entrando en el intervalo de pH del albaricoque, arándano, cereza, guayaba, mango, durazno, piña, fresa y muy cercano al de la ciruela, que son frutos considerados generalmente como ácidos.

Cuadro 6.2. pH de frutas tropicales y subtropicales. Fuente: Alzamora et al.,1995.

Fruta	pH	Fruta	pH
manzana (<i>Pyrus malus</i>)	3.4-3.5	melón (<i>Cucumis, Citrullus</i>)	5.5
albaricoque (<i>Prunus armeniaca</i>)	3.3-4.4	papaya (<i>Carica papaya</i> L.)	4.0-5.6
plátano (<i>Musa cavendish</i>)	5.6	maracuyá (<i>Passiflora edulis</i> Sims.)	3.2
arándano (<i>Vaccinium angustifolium</i>)	3.2-3.6	durazno (<i>Prunus persica</i>)	3.4-4.2
cereza (<i>Prunus arium y cerasus</i>)	3.2-3.6	pera (<i>Pyrus communis</i>)	3.8-3.6
chicozapote (<i>Achras sapota</i> L.)	4.1-5.2	piña (<i>Ananas comosus</i> Merr.)	3.0-3.6
higo (<i>Ficus carica</i> L.)	4.9-5.0	ciruela (<i>Prunus insititia</i>)	2.8-3.0
guayaba (<i>Psidium guajaba</i> L.)	3.0-4.0	fresa (<i>Fragaria ananasa y vesca</i> L.)	3.0-3.9
mango (<i>Mangifera indica</i> L.)	3.2-4.2	tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)	2.2

Los grados Brix obtenidos de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* fue de 10.13 ± 0.18 , que se asemeja a lo reportado por Hayes (1992) para el puré de melocotón 10°Brix . Valores más altos los presentan puré de albaricoque con 13.8°Brix y puré de pera con 14.6°Brix . Medina y Pagano (2003) reportan 13.82°Brix para pulpa de guayaba.

La cantidad de ácidos totales expresados en ácido cítrico de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* fue de 0.46 g de ácido cítrico/100g (0.46%). Valor semejante presenta Belitz y Grosch (1997) para mango con 0.5% de ácido cítrico. Sin embargo, a pesar de que éste fruto tuvo un pH ácido, no presentó un valor alto de acidez si se compara con el de la naranja o el del pomelo que tienen valores de 0.8% y 13% de ácido cítrico, respectivamente (Belitz y Grosch,1997).

Ordóñez (1998) clasifica a los alimentos con base a su actividad acuosa en cinco grupos, en donde, la mayoría de las frutas y hortalizas frescas presentan un valor de a_w que es mayor a 0.98. Con base al valor de a_w que tuvo la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* que fue de 0.93 ± 0.01 , no pertenecería a este grupo, pero quedaría dentro del grupo de alimentos con una a_w de 0.98 a 0.93 como son las frutas en almíbar. Esta baja actividad acuosa se debe posiblemente al escaldado ($95^\circ\text{C} / 1 \text{ min}$) al que fue sometido el fruto.

La pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* presentó una cantidad de azúcares reductores directos expresados en glucosa de $4.34\% \pm 0.05$. Medina y Pagano (2003) encontraron en pulpa de guayaba $5.72\% \pm 0.3$ de azúcares reductores, Belitz y Grosch (1997) reportan valores de 4.8% para la ciruela y 4.9% para la fresa. Valores más altos presentan la manzana y pera con 9.0% y el plátano con 8.0%. También, existen otros frutos con valores bajos como son la piña con 3.0% y el tomate con 2% de azúcares reductores (Wills et al., 1999). Una de las ventajas que podría presentar la chupandía con respecto a los alimentos ricos en azúcares reductores como los mencionados anteriormente, es que posiblemente se presentarían con menor intensidad las reacciones químicas de oscurecimiento no enzimático no deseables en donde participan los azúcares simples (Belitz y Grosch, 1997).

La pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* tuvo un porcentaje de humedad de 83.62 ± 0.03 que se asemeja a los valores de humedad que presentan otros frutos como son la pulpa de guayaba con 84.3% (Medina y Pagano, 2003), manzana con un 83.90%, pera con 83.8%, el kiwi con 83.1% (Charley y Weaver, 1998). Existen otras pulpas con valores más elevados como son la de uva con 88% (Fennema, 1973) o la del tomate con un valor de 92.9% (Rahman, 1995). Como puede apreciarse, al tener la pulpa de la chupandía un bajo valor de humedad (83.62%) y actividad acuosa (0.93) con respecto a otras pulpas posiblemente sea menos propensa al deterioro microbiano o reacciones químicas, ya que se sabe que valores elevados de humedad y actividad acuosa aceleran las reacciones de deterioro de los alimentos (Barbosa-Cánovas y Vega-Mercado, 2000).

El valor proteico presente en la mayoría de los frutos es bajo oscilando desde un 0.2% a un 1.3% (Kirk, 1996). En esta ocasión, la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* presentó un valor que se encuentra dentro de este intervalo ($1.61\% \pm 0.13$), valor similar a lo reportado para otras pulpas como la de plátano y kiwi con 1.0 % y pulpa de albaricoque con 1.4% (Charley y Weaver, 1998), pero superior a la pulpa de manzana que tiene 0.2 % (Charley y Weaver, 1998).

El valor obtenido de fibra bruta de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* fue de $0.38\% \pm 0.15$, valor semejante al del plátano con 0.5% y el de las fresas también con 0.5% (Salunkhe et al., 2000), pero definitivamente menor si lo comparamos con la fibra de la pulpa de manzana que cuenta con 10% de fibra (Robinson, 1991).

La cantidad de cenizas presentes en la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* fue de $0.68\% \pm 0.01$, valor semejante a lo reportado por Belitz y Grosch (1997) en frutos como la cereza o el albaricoque con un valor de 0.6% . Otros frutos, tienen valores más bajos de cenizas como son la pulpa de manzana (0.3%), la pera (0.4%) y la naranja (0.5%) [Belitz y Grosch, 1997]. Dado el porcentaje de cenizas que presentó la chupandía sería interesante el caracterizar y cuantificar el tipo de minerales presentes para conocer si se podría considerar como fuente de algún mineral esencial (como son el zinc, calcio, fierro o magnesio).

6.2. Aplicación de métodos combinados a la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*

6.2.1. Análisis microbiológico de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*

6.2.1.1 Principal grupo microbiano

Al estudiar al tipo de grupo microbiano que se desarrolló predominantemente en la pulpa de la chupandía fueron las levaduras y las bacterias acidófilas. Estos resultados eran de esperarse dadas las características de pH (3.44) y actividad acuosa (0.93) que tuvo esta pulpa, en los cuales es común el crecimiento de estos microorganismos. Tapia de Daza (1995) menciona que un alto contenido ácido y bajo pH proveen las condiciones que limitan el crecimiento de casi todas las bacterias, seleccionando en cambio una flora fúngica, usualmente dominado por levaduras. Alzamora (1995) concuerda que el bajo pH y la naturaleza de los ácidos orgánicos seleccionan el crecimiento de microorganismos acidófilos, como son los hongos (predominantemente mohos) y bacterias ácido lácticas.

Al caracterizar a la levadura predominante presente en la pulpa, se encontró que formaba colonias rosadas de forma circular, con bordes enteros, convexas, de aproximadamente 0.5 a 1.0 cm de diámetro y brillantes (Figura 6.1). Al observar las levaduras en el

microscopio se encontró que su morfología era hexagonal y que se agrupaban en forma de panal (Villanueva-Cañongo et al., 2004).

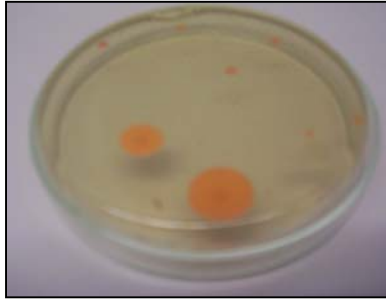


Figura 6.1. Crecimiento de la principal levadura presente en la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*.

Algunas de las levaduras que se encuentran presentes en la superficie de las frutas frescas y que son las encargadas de causar alteraciones pertenecen a los géneros de *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Kloeckera*, *Candida* y *Rhodotorula*, las cuales, han sido identificadas en frutas cítricas, manzanas y uvas (Splittstoesser, 1987). Las bacterias patógenas no son normalmente asociadas con frutas debido a su bajo pH, pero aun así, algunas pueden desarrollarse teniendo el pH y aw mínimos para su crecimiento. En los Cuadros 6.3. y 6.4. se muestran las principales bacterias capaces de crecer en frutas, así como, sus límites de crecimiento en función de aw y pH. Sin embargo, dados los valores de pH que presentan la mayoría de las frutas que oscilan entre valores de 3.0 y 3.5, la contaminación predominante como se mencionó anteriormente está constituida por hongos y levaduras. Por lo tanto, seguramente en la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*, al igual que en otras frutas, tampoco se podrían desarrollar los microorganismos que se encuentran en los Cuadros 6.3. y 6.4., por los valores de pH y actividad acuosa que presentó y por eso la principal flora nativa fueron las levaduras, las cuales, posiblemente sean las principales causantes de su deterioro. Por todas estas razones, se usó como variable de respuesta en el estudio de estabilidad a la cuantificación de hongos y levaduras (HyL).

Cuadro 6.3. aw y pH mínimo para el crecimiento bacterias patógenas. Fuente: Argai et al., 1995.

Bacteria	aw	pH
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	0.970	5.5
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.960	4.6
<i>Clostridium perfringes</i>	0.945	5.6
<i>Clostridium botulinum</i>	0.940-0.965	4.2-4.5
<i>Salmonella spp</i>	0.940	4.0
<i>Escherichia coli</i>	0.935	5.0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.932	4.8
<i>Bacillus cereus</i>	0.930	4.9
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.920	4.6
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.860	4.5

Cuadro 6.4. aw mínima y pH mínimo para el crecimiento de bacterias en frutas y productos de frutas. Fuente: Alzamora et al., 1996.

microorganismo	aw	pH
<i>Clostridium butyricum</i>	>0.945 - <0.965 (glucosa)	>4.8
	>0.935 - < 0.950 (glicerol)	--
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0.985	3.5-4.5
<i>Bacillus coagulans</i>	0.94 (glucosa o sacarosa)	3.8-4.8
<i>Bacillus licheniformis</i>	>0.89 - < 0.91 (NaCl o glucosa)	4.2-4.4
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	>0.97 (NaCl o glucosa)	>5.0-<6.0
<i>Lactobacillus species</i>	>0.94 (glicerol)	3.8-4.4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.94	--
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0.94 (NaCl)	--
<i>Streptococcus faecalis</i>	0.94 (NaCl)	4.4-4.7
<i>Salmonella especies</i>	0.95	3.7-4.5
<i>Salmonella oranienberg</i>	0.95 (NaCl)	--
	0.935 (glicerol)	--

6.2.1.2. Crecimiento de hongos y levaduras en la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* para cada tratamiento

El comportamiento microbiológico de los tratamientos durante 100 días de almacenamiento a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.60$, se presenta en el Cuadro 6.5. Antes de describir el comportamiento de los diferentes tratamientos, es preciso aclarar que se tomó como límite admisible para continuar con el monitoreo de los tratamientos probados un valor máximo de hongos y levaduras de 10^5 UFC/g, debido a que los productos mínimamente procesados como es el caso de la pulpa de aguacate no deben de sobrepasar este límite para ser comercialmente aceptables (Ray, 1996; Medina y Pagano, 2003 y Soliva-Fortuny

et al, 2004). Por ejemplo, se han reportado valores que oscilan desde 10^4 hasta 10^6 UFC/g de hongos y levaduras en alimentos como rodajas de piña (Alzamora et al., 1989), zanahoria, achicoria, col rayada y mezcla de vegetales para ensalada (Nguyen y Carlin, 1994). Por lo tanto, todos aquellos tratamientos donde se rebasó este valor de 10^5 UFC/g se eliminaron. Sin embargo, en el caso particular de los tratamientos 4 y 5 se eliminaron porque al parecer se contaminaron con un hongo filamentoso de crecimiento expansivo que impidió hacer la cuantificación real de la carga microbiana de hongos y levaduras en el transcurso del tiempo.

Cuadro 6.5. Cuantificación de HyL en los tratamientos durante el almacenamiento a $25^{\circ}\text{C} \pm 0.60$.

Tiempo (días)	Tratamientos							
	Control	1	2	3	4	5	6	7
	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g
0	$*2.15 \times 10^{+5}$	$*4.13 \times 10^{+4}$	$*1.02 \times 10^{+5}$	$*1.23 \times 10^{+4}$	*0	*0	*0	*0
20	$*1.97 \times 10^{+7}$	$*9.18 \times 10^{+6}$	$*1.46 \times 10^{+4}$	*0	1 hongo	*0	*0	*0
40	$*1.30 \times 10^{+8}$	E.	0	*0	E.	1 hongo	*0	*0
55	N.D.	E.	N.D.	*0	E.	E.	*0	*0
70	$*3.49 \times 10^{+7}$	E.	0	*0	E.	E.	*0	*0
85	N.D.	E.	0	*0	E.	E.	*0	*0
100	$*5.65 \times 10^{+7}$	E.	0	*0	E.	E.	*0	*0

N.D.: no determinado. E. : eliminado. * media geométrica

La cuantificación inicial de HyL en la pulpa de *Cyrtocarpa procera* para el control, es decir, aquél que no se le modificó la aw propia del fruto (0.93), no se le adicionó sorbato de potasio y tampoco se le dio un tratamiento térmico, fue desde 2.3×10^3 hasta 6.3×10^5 UFC/g que son valores que se encuentran dentro de lo reportado para otras frutas como papaya y fresa (Alzamora et al., 1995). Sin embargo, a los veinte días la pulpa presentó signos de fermentación (olor a fermentado y presencia de burbujas en la superficie de la pulpa) y cambió a un color café claro (Figura 6.2.). Probablemente, los cambios presentados se debieron a la acción metabólica de la levadura descrita anteriormente. De hecho, como puede apreciarse en el Cuadro 6.5, a los veinte días de almacenamiento se sobrepasó el límite establecido por Ray, 1996; Medina y Pagano, 2003 y Soliva-Fortuny et al., 2004 para productos mínimamente procesados, alcanzando cifras que oscilaron desde 3.73×10^6 hasta 3.14×10^7 UFC/g. Este valor elevado era de esperarse ya que la

muestra no tenía ningún factor de inhibición para el crecimiento microbiano. Este comportamiento es similar a lo reportado por Guerrero et al., 1994 para la muestra control de pulpa de plátano conservada por métodos combinados, la cual tuvo cuentas cercanas a las 10^7 UFC/g a los 15 días de almacenamiento. Aunque no se realizó el análisis de HyL antes de los veinte días de almacenamiento, probablemente esta muestra fermentó antes de este periodo, ya que otros autores reportan para frutas y pulpas tiempos de vida de anaquel que oscilan entre uno y siete días. Por ejemplo, Casp (1998) menciona que el tiempo de vida útil de frutas frescas es de uno a siete días si son almacenados a 21 °C, García y Reátegui (2002) reportaron que la pulpa de *Mauritia flexeusal* L (drupa sudamericana) se conservó durante 24 horas a temperatura ambiente y cuatro días en refrigeración (5 a 6 °C) y para la pulpa de jiotilla se encontró una vida de anaquel de tres días a 25 °C, periodo en el cual se sobrepasaron las 10^5 UFC/g (resultados no publicados).



Figura 6.2. a) Apariencia inicial de la pulpa de *Cyrtocarpa procera*. b) Apariencia final de la pulpa fermentada.

Con base a los resultados obtenidos se encontró que para la muestra control la fase logarítmica de crecimiento se mantuvo hasta los cuarenta días y después de los cincuenta y cinco días inició la fase estacionaria, decreciendo a los cien días (fase de muerte), Figura 6.3.

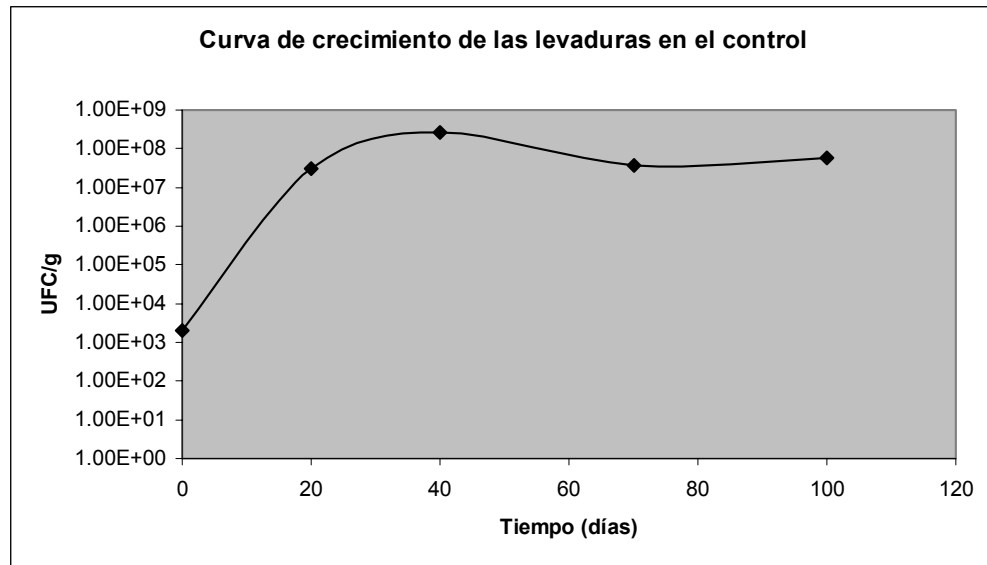


Figura 6.3. Curva de crecimiento de levaduras en el control.

El tratamiento 1 cuya a_w fue modificada a 0.91, sin incorporación de sorbato de potasio y sin calentamiento, presentó concentraciones iniciales desde 3.80×10^2 hasta 1.23×10^5 UFC/g de HyL. Sin embargo, a pesar de haber disminuido la actividad acuosa a 0.91 no se logró inhibir el crecimiento de levaduras, ya que a los veinte días se alcanzaron concentraciones de 8.30×10^6 hasta 1.04×10^7 UFC/g, las cuales, rebasan el límite propuesto por Ray (1998) de 1×10^5 UFC/g. Con esto se demostró que las levaduras nativas de la pulpa fueron capaces de superar la barrera de a_w , logrando proliferar de la misma forma como sucedió en el control y fermentándose a los veinte días. Por lo tanto, no se continuó con el estudio del crecimiento microbiano en este tratamiento.

El tratamiento 2 (a_w 0.93, SK 400 ppm y sin tratamiento térmico) inicialmente presentó concentraciones de HyL desde 4.16×10^4 hasta 2.20×10^5 UFC/g. Sin embargo, se encontró que la adición de SK (en una concentración de 400 ppm) inhibió el crecimiento de las levaduras, ya que si se comparan las curvas de crecimiento de este tratamiento con respecto al control se puede observar que rápidamente se alcanzó la fase de muerte no logrando sobrevivir después de los cuarenta días (Figura 6.4.). Este comportamiento concuerda con lo esperado, ya que el sorbato de potasio es uno de los principales aditivos que se utilizan para la inhibición específica de hongos y levaduras. (Tapia de Daza et al.,

1995). Sin embargo, lo que se observó es que después de los cuarenta días lo que sí llegó a desarrollarse fueron bacterias acidófilas Gram negativas, las cuales, encontraron las condiciones ideales para desarrollarse sin que tuvieran la presencia de otro grupo microbiano con el cual competirían. Pero, se observó que dejaron de crecer después de los ochenta y cinco días.

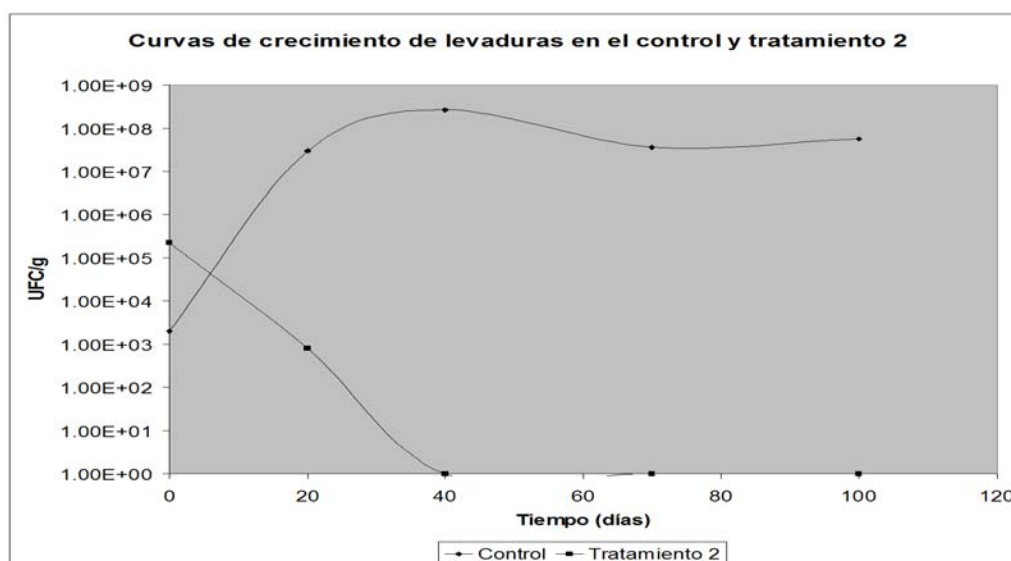


Figura 6.4. Curvas de crecimiento de levaduras para el control y tratamiento 2

El tratamiento 3 cuya a_w fue modificada a 0.91 y que se le incorporó el sorbato de potasio (400 ppm) pero no se le dio el tratamiento térmico, tuvo una cuenta inicial de HyL desde 5.4×10^3 hasta 2.4×10^4 UFC/g. Con respecto al crecimiento de HyL se encontró que sólo bastaron 20 días para que se murieran, lo que demuestra que la acción conjunta de disminución de la a_w y la presencia del sorbato afectó el desarrollo de este grupo microbiano. Este fenómeno era de esperarse, ya que la combinación de barreras generalmente tiene un mayor efecto inhibitorio. Por ejemplo, la a_w mínima para inhibir el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, en ausencia de sorbato de potasio, y a pH óptimo, es de 0.89. Sin embargo, existen combinaciones de estos tres factores (a_w , pH y concentración de un agente antimicrobiano) que inhibe el desarrollo de las levaduras, aún teniendo valores superiores de 0.89 de a_w , como es el caso de mantener un valor de a_w de 0.97 con un pH de 4 y usando 500 ppm de sorbato (Alzamora, 1997 y Tapia de Daza, 1997). Para el caso de la levadura, *Zygosaccharomyces rouxii*, se logra inhibir cuando se

mantiene en valores de 0.95 de aw, pH de 4.0, 500 ppm de SK y 100 ppm de SO₂ (Tapia de Daza, 1997).

La principal diferencia que presentó el tratamiento 4 (aw 0.93, SK 0 ppm y con tratamiento térmico) con respecto a los otros tratamientos fue que desde un inicio (tiempo cero) no se observó crecimiento de HyL. Esto se debió a que el tratamiento térmico que se le aplicó a la pulpa (3 minutos/ 60 a 65 °C) fue lo suficiente para destruir a este grupo microbiano. Esto concuerda con lo reportado por Ray (1996) en donde la mayoría de las células vegetativas de hongos, levaduras, bacterias (excepto las termofílicas o termodúricas) y virus son destruidas cuando se usan temperaturas de 65 °C en un intervalo de 10 minutos. Sin embargo, a los veinte días de almacenamiento se observó crecimiento de un hongo filamentoso expansivo (Figura 6.5.), posiblemente por la contaminación de las muestras, que impidió hacer la cuantificación real de la carga microbiana de hongos y levaduras en el transcurso del tiempo. Además, como estas muestras no tenían el antimicrobiano de sorbato de potasio, el hongo se pudo desarrollar sin problemas.



Figura 6.5. Crecimiento de hongo filamentoso en los tratamientos 4 y 5 (a los veinte y cuarenta respectivamente de almacenamiento).

Al igual que sucedió con el tratamiento 4, en el tratamiento 5 (aw 0.91, SK 0 ppm y con tratamiento térmico), tampoco se observó crecimiento de HyL en el tiempo inicial, manteniéndose así hasta los veinte días. Después de este tiempo (cuarenta días), se observó la presencia del mismo hongo filamentoso desarrollado en el tratamiento 4. Esto se debió a las mismas razones explicadas anteriormente (posible contaminación y ausencia de sorbato de potasio) eliminándose también este tratamiento.

Con respecto a los tratamientos 6 (a_w 0.93, SK 400 ppm y con tratamiento térmico) y 7 (a_w 0.91, SK 400 ppm y con tratamiento térmico), no se observó el crecimiento de HyL desde el inicio hasta los cien días de almacenamiento. La única diferencia entre estos dos tratamientos fue que en el 7 se trabajó con la a_w a 0.91, pero fueron iguales en cuanto a la incorporación de sorbato de potasio y el tratamiento térmico. Por lo tanto, la combinación de calentamiento y sorbato de potasio fue lo suficiente para inhibir el crecimiento microbiano durante este tiempo. Estos datos concuerdan con lo reportado por Beuchat (1983), en donde, 500 ppm de benzoato de sodio o de sorbato de potasio actuaron en forma sinérgica con el tratamiento térmico inactivando cepas de levaduras en jugos de fruta y medios de cultivo, teniendo el efecto más pronunciado a valores de $pH < 5.5$.

6.2.1.3. Valores de a_w , °Brix y pH finales de los tratamientos

Los valores de la a_w , pH y °Brix de los tratamientos, se muestran en los Cuadros 6.6., 6.7. y 6.8.

Cuadro 6.6. Valores de a_w de los tratamientos durante el almacenamiento a 25°C.

(días)	Tratamientos							
	control	1	2	3	4	5	6	7
	a_w	a_w	a_w	a_w	a_w	a_w	a_w	a_w
0	0.93	0.91	0.93	0.91	0.93	0.91	0.93	0.91
20	0.92	0.88	0.92	0.87	-	0.90	0.95	0.90
40	0.92	-	0.92	0.89	-	-	0.92	0.90
55	N.D.	-	N.D.	0.88	-	-	0.91	0.88
70	0.92	-	0.89	0.84	-	-	0.92	0.86
85	N.D.	-	0.91	0.82	-	-	0.92	0.87
100	0.92	-	0.91	0.79	-	-	0.92	0.86

N.D. no determinado

En el control como para los tratamientos 5 y 6 no hay diferencia significativa ($p = 0.01$) en los valores de a_w , no así para los tratamientos 2, 3 y 7 donde si hay diferencia significativa ($p = 0.01$).

En los tratamientos 1, 3 y 7, cuya a_w fue modificada a 0.91, se observó decremento en el valor de a_w con valores de 0.88, 0.79 y 0.86 respectivamente, tal comportamiento de la disminución de la a_w cuando se emplean solutos como la sacarosa es explicado por

Chirife (1980) y Alzamora (1995) debido a la hidrólisis química y/o enzimática que ésta sufre, dicha hidrólisis fragmenta la sacarosa en sus monómeros respectivos fructosa y glucosa. La hidrólisis modifica la aw de las frutas conservadas por métodos combinados, debido a la gran capacidad de la fructosa y glucosa de reducir la aw, incrementando así el efecto de esta barrera en el crecimiento microbiano, la hidrólisis de la sacarosa empleada para disminuir la aw a 0.91 en los tratamientos 1, 3 y 7, probablemente se debió al bajo pH de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*, que provocó la inversión. Montes de Oca et al., (1991) demostraron que en sistemas de jugos de frutas con aw inicial de 0.94, la sacarosa empleada fue hidrolizada, probablemente por el efecto catalítico de los ácidos cítrico, málico, tartárico y otros ácidos orgánicos de las frutas, por ejemplo en el sistema de jugo de ciruela mostró una completa hidrólisis de la sacarosa a los 20 días de almacenamiento a 37 °C. Resultados similares fueron encontrados por Elguezabal et al., (1994) con las pulpas de tamarindo y maracuyá, conservadas por métodos combinados utilizando sacarosa como agente depresor de la aw y almacenadas a temperatura ambiente con 37 °C como máximo, mostraron un aumento de azúcares reductores al final de la prueba (180 días), disminuyendo así el valor de la aw inicial. En el tratamiento 2, donde no hubo empleo de sacarosa, también se observó un decremento del valor de aw. Si se presta atención a los valores de °Brix de este tratamiento (Cuadro 6.7.), al final del experimento se aprecia un aumento del valor inicial, lo que sugiere una pérdida de humedad, probablemente por la permeabilidad del envase utilizado, donde pudo haber transferencia de humedad con el ambiente afectando el valor de aw y disminuyéndolo. De manera general en los tratamientos se observó un aumento en los °Brix (Cuadro 6.7.), probablemente por la pérdida de humedad, por lo que el valor de aw disminuye en mayor o menor grado, es decir, en el caso de los tratamientos 1, 3 y 7 además de las razones expuestas, la disminución del valor de aw, también pudo deberse al aumento de los °Brix.

Cuadro 6.7. °Brix de los tratamientos durante el almacenamiento a 25°C.

Tiempo (días)	Tratamientos							
	control	1	2	3	4	5	6	7
	°Brix	°Brix	°Brix	°Brix	°Brix	°Brix	°Brix	°Brix
0	10.14	44.99	10	44.83	10.17	45.00	10.44	47.05
20	4.61	41.83	10.39	46.50	-	45.83	10.61	47.00
40	3.11	-	10.83	49.94	-	-	10.94	48.83
55	N.D.	-	N.D.	50.99	-	-	11.22	48.61
70	2.83	-	10.66	52.61	-	-	11.05	48.48
85	N.D.	-	10.00	56.27	-	-	11.14	49.49
100	1.11	-	13.89	56.00	-	-	11.16	50.33

Los valores de °Brix son significativamente diferentes para el control y los tratamientos 1, 2, 3, y 5 ($p = 0.01$), y para los tratamientos 6 y 7 no hay diferencia significativa ($p = 0.01$). En los tratamientos, excepto para el control se observó un aumento de los °Brix (Cuadro 6.7.), lo cual como ya se mencionó, pudo ser por la pérdida de humedad. En el caso del control donde se observó una disminución pudo deberse a la presencia de microorganismos, lo cuales fueron consumiendo el sustrato disponible en esta muestra (azúcares reductores y otros).

Cuadro 6.8. Valores de pH de los tratamientos durante el almacenamiento a 25°C.

Tiempo (días)	Tratamientos							
	control	1	2	3	4	5	6	7
	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH
0	3.44	3.42	3.42	3.44	3.43	3.32	3.38	3.43
20	3.52	3.35	2.79	3.26	-	3.30	3.30	3.44
40	3.29	-	2.60	3.28	-	-	3.43	3.28
55	N.D.	-	N.D.	3.05	-	-	3.48	3.26
70	3.94	-	2.53	3.22	-	-	3.45	3.28
85	N.D.	-	2.59	3.23	-	-	3.23	3.23
100	4.70	-	2.44	3.06	-	-	3.42	3.12

Los valores de pH de los tratamientos 1, 5, y 6 no cambian significativamente con respecto al valor inicial ($p = 0.01$), no así los tratamientos 2, 3 y 7 ($p = 0.01$) donde el valor del pH decreció. En el caso del tratamiento 2 en donde el pH final fue de 2.44, puede atribuirse a la presencia de microorganismos, recordando que este tratamiento

presentó crecimiento se HyL y bacterias acidófilas por lo que el descenso del pH pudo haber sido causado por los compuestos metabólicos segregados por los microorganismos durante su crecimiento. El comportamiento del control presenta un aumento del pH, lo cual también pudiera ser por la presencia de sustancias segregadas por los HyL.

6.3. Efecto de la aw, concentración de sorbato de potasio (SK) y tratamiento térmico en el crecimiento de HyL durante el almacenamiento de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* a 25 °C

Después de realizar en análisis estadístico de los resultados obtenidos se encontró que los principales factores que fueron significativos en el crecimiento de hongos y levaduras (para una $p < 0.01$) fueron el tratamiento térmico y la concentración de sorbato de potasio (SK) [Cuadro 6.9.]. Esto se puede corroborar en el Cuadro 6.10, donde se muestra el porcentaje de contribución de cada uno de los factores y sus interacciones, en donde, el tratamiento térmico (C) contribuye en un 49% y el SK en un 24%.

Cuadro 6.9. Análisis de varianza para el factorial 2³

Respuesta: UFC/g de HyL Transformación: log ₁₀ Constante: 0.166667					
Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Valor F	Prob > F
Tratamiento	259.28	7	37.04	316.00	< 0.0001
aw	6.37	1	16.37	139.66	< 0.0001
SK	61.63	1	61.63	525.78	< 0.0001
C	128.54	1	128.54	1096.63	< 0.0001
(aw)(SK)	2.65	1	2.65	22.60	0.0002
(aw)(C)	3.46	1	3.46	29.50	< 0.0001
(SK)(C)	32.08	1	32.08	273.68	< 0.0001
(aw)(SK)(C)	14.55	1	14.55	124.12	< 0.0001
Error	1.88	16	0.12		
Total	261.15	23			
Desviación estándar: 0.34		R ² : 0.9928			

Ecuación:

$$\text{Log}_{10}(\text{crecimiento} + 0.17) = -1.64801 + 9.46017 (\text{aw}) - 0.5247(\text{SK}) - 26.78754 (\text{C}) + 0.55542 (\text{aw})(\text{SK}) + 26.60209 (\text{aw})(\text{C}) + 0.24262(\text{SK})(\text{C}) - 0.25953 (\text{aw})(\text{SK})(\text{C})$$

aw: Actividad acuosa, SK: sorbato de potasio, C: tratamiento térmico.

Cuadro 6.10. Efecto de los factores sobre el crecimiento de HyL en la pulpa de *Cyrtocarpa procera*.

Factor	Efecto	% Contribución
aw	1.6518	6.2685
SK	3.2049	23.5991
C	4.6286	49.2209
(aw)(SK)	0.6645	1.0145
(aw)(C)	0.7591	1.3239
(SK)(C)	2.3123	12.2838
(aw)(SK)(C)	1.5572	5.571

Otra manera de reflejar el efecto de los factores sobre el crecimiento de HyL en los diferentes tratamientos, se muestran en el Cuadro 6.11, en donde, el valor de 1 representa crecimiento microbiano y el valor de 0 el no crecimiento observado durante los días de almacenamiento.

Cuadro 6.11. Efecto de aw, SK y tratamiento térmico sobre el crecimiento de HyL durante el almacenamiento de la pulpa a 25°C.

Tratamientos								
Tiempo (días)	Control	1	2	3	4	5	6	7
inicial	1	1	1	1	0	0	0	0
20	1	1	1	0	1	0	0	0
40	1	1	1	0	1	1	0	0
55	1	1	0	0	1	1	0	0
70	1	1	0	0	1	1	0	0
85	1	1	0	0	1	1	0	0
100	1	1	0	0	1	1	0	0

Como se observar en el Cuadro 6.11, el tratamiento térmico tuvo un efecto determinante sobre la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*. Al hacer el análisis de varianza de los efectos simples, se aprecia que independientemente de la concentración de SK y aw, con el tratamiento térmico se logra inhibir inicialmente el recuento de HyL, observándose un comportamiento independiente del tiempo de calentamiento como factor. Es decir, con el tratamiento térmico (tres minutos), independientemente de la concentración de SK (0 ó 400 ppm) y el valor de aw (0.93 ó 0.91), se reduce a cero la tasa de crecimiento microbiano, lo cual es reafirmado por los tratamientos 4 y 5. Por ejemplo, el valor más alto de UFC/g de HyL lo presentó el control y se redujo a cero en el tratamiento 4 y la

diferencia entre ellos fue el tratamiento térmico. Por lo que el calentamiento de tres minutos fue suficiente para inhibir inicialmente la presencia de HyL. Estudios en células vegetativas y esporas inactivadas por calor, han mostrado rupturas en la cadena de ADN, aparentemente el calor actuaría provocando la depurinación y la depirimidación del ADN de la espora, la cual, al ser dañada por el calor, necesitaría requerimientos nutrimentales adicionales para reparar el ADN, recuperarse y posteriormente crecer. La ruptura del ADN ha sido identificada como la causa principal del efecto letal del calor (Alzamora, 1997). El calentamiento suave provoca la degradación de los ribosomas y la hidrólisis del ARN, habiéndose comprobado que ocurre un reordenamiento de los mismos, durante la recuperación de las células después de un calentamiento subletal (Gould, 1989). La alteración de la semipermeabilidad de la membrana citoplasmática (con la consiguiente pérdida de iones, aminoácidos y componentes del ácido nucleico de bajo peso molecular) y de los mecanismos de transporte a través de la misma, son también efectos subletales del tratamiento térmico (Alzamora, 1997). En algunas especies, se ha inferido que el calor inactiva las esporas destruyendo la actividad de una o más enzimas del camino de germinación (Alzamora, 1997).

Sin embargo, también en el Cuadro 6.11. se observa que en aquellos tratamientos (1, 4 y 5) donde no se adicionó SK, hubo crecimiento de HyL, lo que confirma su influencia como segundo factor de importancia sobre la variable de respuesta, y en aquellos tratamientos en donde estuvo presente junto con el calentamiento o con la aw modificada, no se observó crecimiento microbiano, ya sea desde el inicio (6 y 7) o durante el transcurso del tiempo (2 y 3), es decir en aquellos tratamientos en donde la combinación implicaba la presencia de SK a los cien días no presentaron crecimiento de HyL, independientemente de la presencia de los demás factores, lo que sugiere que el efecto del SK se aprecia con respecto al tiempo (como lo mostró el tratamiento 2), a diferencia del tratamiento térmico que tiene un efecto inmediato sobre el crecimiento de HyL (tratamiento 4 y 5). El efecto inhibitorio del SK sobre levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Zygosaccharomyces roxii* ha sido reportado por Alzamora y López-Malo (2002), en un intervalo de 200 a 500 ppm, así como su utilización en frutas y vegetales (Elguezabal 1994; Alzamora et al., 1995; Cerezal 2004).

La Figura 6.6. muestra la interacción positiva entre la concentración de SK, se observa que con tres minutos de tratamiento térmico y 400 ppm de SK, resultan inhibitorios para el crecimiento de HyL, por lo que, sería interesante el encontrar un valor mínimo de ambos factores y que también fueran inhibitorios para el crecimiento de HyL, con el fin de optimizar para conseguir un tratamiento mínimo de conservación para la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*.

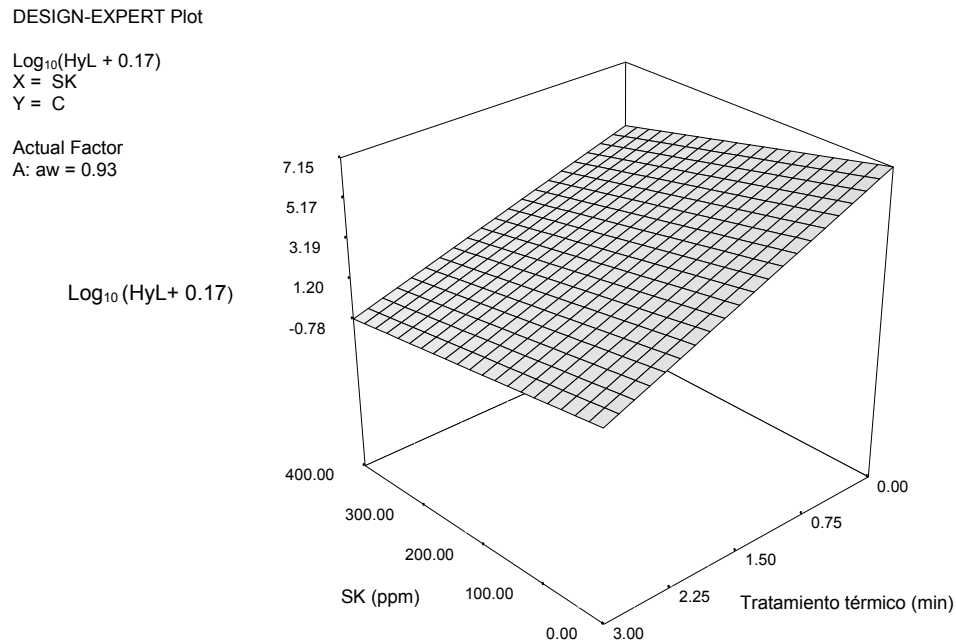


Figura 6.6. Interacción entre la concentración de SK y el tratamiento térmico, con una a_w de 0.93.

Del Cuadro 6.11, se observa que con la presencia de SK y a_w de 0.91, se aceleró la inhibición de HyL como lo demostró el tratamiento 3, pues en este tratamiento a los 20 días ya no se observó crecimiento de HyL, a diferencia del tratamiento 2 que tuvo adición de SK y una a_w de 0.93, y en donde los HyL se observaron hasta los 40 días de almacenamiento. Lo anterior es de esperarse pues el principio de métodos combinados implica que entre más barreras sean empleadas en un alimento, a los microorganismos presentes se les estresa, del tal manera que terminan muriendo por un agotamiento metabólico causado por el querer superar el ambiente hostil en donde se encuentran (Leistner, 2000). Alzamora (1997) explica, que cuando la a_w del medio se reduce, ya sea por la remoción de agua o por adición de solutos, los microorganismos tienden a alcanzar

el equilibrio osmótico con el medio que los rodea, principalmente a través de la pérdida de agua. Inmediatamente se pone en marcha un mecanismo osmoregulador, que inicialmente produce la plasmólisis de la célula con pérdida de la turgencia de membrana, ésta se contrae separándose de la pared y la célula pierde viabilidad, probablemente debido a que la presión de turgencia es necesaria para el crecimiento de la pared y la división celular.

La Figura 6.7. muestra la interacción entre la concentración de SK y a_w , con cero minutos de calentamiento. En la que se observa, entre mas se incrementa la concentración de SK y se disminuye el valor de a_w , el crecimiento de HyL es menor. Alzamora y López-Malo (2002), reportan que 500 ppm de SK, una a_w de 0.93 y pH de 3, inhiben el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

DESIGN-EXPERT Plot

$\text{Log}_{10}(\text{HyL} + 0.17)$

X = a_w

Y = SK

Actual Factor

C: C = 0.00

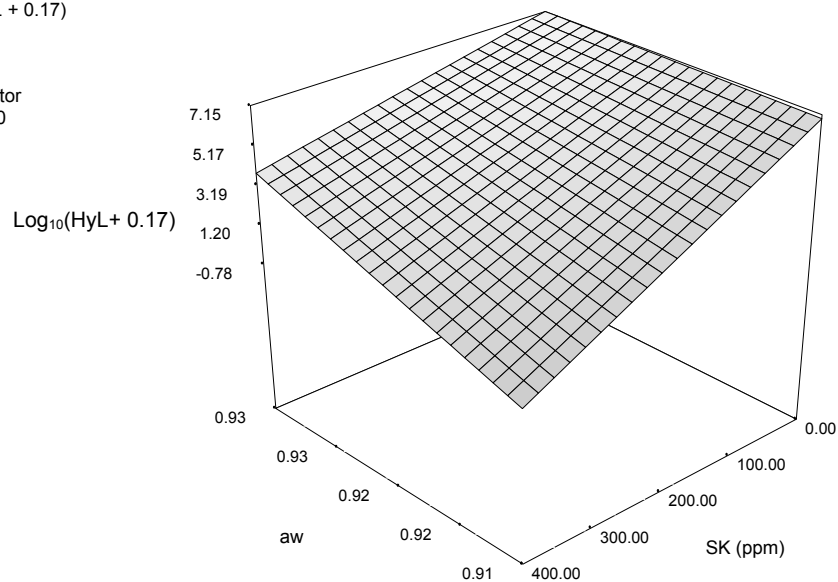


Figura 6.7. Interacción entre la concentración de SK y a_w , sin tratamiento térmico.

6.4. Tiempo de almacenamiento de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* a 25 °C, antes de superar las 10⁵ UFC/g

La estabilidad de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* a 25 °C ± 0.60, basándose en la cuantificación microbiológica de hongos y levaduras se presentan en el Cuadro 6.12.

Cuadro 6.12. Tiempo de almacenamiento de la pulpa antes de superar las 10⁵ UFC/g permitidas para su consumo. (a) aunque no se determinó antes, se asume que es menor que 20 días.

Tratamiento	aw	Sorbato de potasio (ppm)	Tiempo de calentamiento (min.)	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo antes de superar las 10 ⁵ UFC/g (días)
control	0.93	0	0	25 ± 0.60	< 20 ^(a)
1	0.91	0	0	25 ± 0.60	20
2	0.93	400	0	25 ± 0.60	100
3	0.91	400	0	25 ± 0.60	100
4	0.93	0	3	25 ± 0.60	20
5	0.91	0	3	25 ± 0.60	40
6	0.93	400	3	25 ± 0.60	100
7	0.91	400	3	25 ± 0.60	100

Resultados similares son presentados por Tapia de Daza (1996), en una recopilación de pulpas de frutas conservada por métodos combinados, por ejemplo: pulpa de plátano escaldado con vapor por dos minutos, aw de 0.97 (glucosa), pH de 3.4, SK (100 ppm), tratamiento térmico a 100 °C por un minuto, ácido ascórbico (250 ppm) y metabisulfito (400 ppm) almacenada a 27 °C tuvo una vida útil de 105 días; pulpa de tamarindo con aw de 0.95 (sacarosa), pH de 2.5, tratamiento térmico a 85 °C por dos minutos, sulfito de sodio (150 ppm), SK (1500 ppm) y llenado en caliente de 60 °C almacenada a 35 °C presentó una vida de anaquel de 180 días; pulpa de maracuyá con aw de 0.94 (sacarosa), pH de 3.4, tratamiento térmico a 85 °C por dos minutos, sulfito de sodio (150 ppm), SK (1500 ppm) y llenado en caliente a 60 °C tuvo una vida útil de 180 días.

6.5. Selección del mejor tratamiento que mantuvo la calidad microbiana (HyL) de la pulpa de *Cyrtocarpa procera* durante 100 días a 25 ° C

Una vez que se hizo la evaluación de los factores involucrados en la estabilidad de la pulpa desde el punto de vista microbiológico (HyL), se hizo la selección del mejor tratamiento considerando como punto de partida sólo aquellos procedimientos que inicialmente no presentaron crecimiento microbiano (cuentas de 0 UFC/g). Por lo tanto, únicamente fueron los métodos a los que se les aplicó los tres minutos del calentamiento térmico (60 a 65 °C), es decir, los tratamientos 4, 5, 6 y 7. Al utilizar como segundo criterio la conservación de la pulpa durante cien días, sólo quedaron los tratamientos 6 y 7, ya que tanto el 4 como el 5 presentaron crecimiento de un hongo expansivo siendo eliminados del estudio. Como último criterio para la selección se consideró aquel procesamiento que involucraba sólo a los factores que fueron principalmente significativos en el crecimiento de HyL, es decir, la temperatura y la presencia de SK. Por lo tanto, el único que modificaba sólo estos dos factores fue el tratamiento 6. El tratamiento 7 quedó eliminado ya que además de tener los dos factores anteriores se le redujo la a_w a 0.91. Además, considerando que los valores de a_w (0.93), pH (3.44) y °Brix (10.14) son los que dan las características de frescura a la pulpa, el tratamiento 6 fue el único que no presentó diferencias significativas entre el valor inicial y el valor final (después de 100 días de almacenamiento a 25 °C), manteniéndose estable tanto en los parámetros anteriores como en la ausencia de crecimiento de HyL. Mientras que en el tratamiento 7 tanto el pH como la a_w no se mantuvieron constantes siendo significativamente diferentes (el pH pasó de 3.43 a 3.12 y la a_w de 0.91 a 0.86). Además, al no tener que adicionar sacarosa al tratamiento 6 para reducir la a_w , no se altera el sabor característico del fruto y permite tener un menor costo. Por lo tanto, con base a todo lo anterior se seleccionó al tratamiento 6 como el mejor proceso para la conservación de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*.

7. CONCLUSIONES

Se caracterizó la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*, encontrándose que es ácida con pH de 3.44, acidez total de 0.46% expresados en ácido cítrico, con un contenido de azúcares reductores directos de 4.34%, con contenido de agua de 83.62%, actividad acuosa de 0.93, cantidad de proteína de 1.61%, °Brix de 10.13, cantidad de fibra de 0.38% y cenizas de 0.68%.

Se mantuvo la calidad microbiológica (basándose en el crecimiento de hongos y levaduras) a temperatura ambiente de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*, por métodos combinados durante cien días.

Se determinó que en la conservación de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* por métodos combinados, los factores que más efecto tuvieron sobre el crecimiento de HyL fueron el tratamiento térmico y el sorbato de potasio.

El tratamiento térmico de tres minutos en un intervalo de 60 a 65°C tuvo un efecto inhibitorio inicialmente sobre el crecimiento de hongos y levaduras, pero no fue suficiente para impedir la recontaminación de la pulpa.

La actividad acuosa como factor único no tuvo influencia sobre el crecimiento de hongos y levaduras, pero su interacción con el sorbato de potasio y calentamiento sí la tuvieron acelerando la muerte de éstos.

El tratamiento 6 con una actividad acuosa de 0.93, una concentración de 400 ppm de sorbato de potasio y tres minutos de calentamiento (60 a 65°C) fue el mejor tratamiento para mantener la calidad microbiológica de la pulpa de *Cyrtocarpa procera*.

8. PERSPECTIVAS

- Con los datos generados en este estudio, se logró mantener la calidad microbiológica de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera*, sin embargo, para emplear la pulpa en el desarrollo de productos alimenticios se sugiere como etapa siguiente un estudio de evaluación sensorial, para determinar los cambios que sufre la pulpa al tratarla con métodos combinados y conocer el nivel de agrado que tendría la pulpa después de un cierto tiempo, ya que se observó el oscurecimiento de las muestras a partir de los 55 días siendo más notorio a los 70 días.
- Proponer la aplicación de métodos combinados en las comunidades donde se produce la chupandía, para evitar desperdicios del fruto.

APÉNDICE A

Valores de aw de los tratamientos durante los cien días de almacenamiento

Tratamiento	Días	R1*	R2*	R3*	Promedio	Desviación
control	0	0.93	0.93	0.93	0.93	0.0048
1	0	0.91	0.91	0.91	0.91	0.0000
2	0	0.93	0.93	0.93	0.93	0.0000
3	0	0.91	0.91	0.91	0.91	0.0000
4	0	0.93	0.93	0.93	0.93	0.0000
5	0	0.90	0.91	0.91	0.91	0.0050
6	0	0.92	0.93	0.93	0.93	0.0050
7	0	0.90	0.91	0.91	0.91	0.0058
control	20	0.92	0.91	0.92	0.92	0.0050
1	20	0.88	0.88	0.88	0.88	0.0000
2	20	0.92	0.92	0.92	0.92	0.0000
3	20	0.88	0.87	0.87	0.87	0.0029
4	20	E	E	E	--	--
5	20	0.9	0.9	0.9	0.90	0.0000
6	20	0.95	0.95	0.95	0.95	0.0000
7	20	0.89	0.90	0.91	0.90	0.0076
control	40	0.92	0.92	0.92	0.92	0.0029
1	40	E	E	E	--	--
2	40	0.91	0.92	0.92	0.92	0.0058
3	40	0.89	0.88	0.88	0.88	0.0058
4	40	E	E	E	--	--
5	40	E	E	E	--	--
6	40	0.91	0.92	0.92	0.91	0.0029
7	40	0.90	0.90	0.89	0.90	0.0087
control	55	N.D	N.D	N.D.	--	--
1	55	E	E	E	--	--
2	55	N.D.	N.D.	N.D.	--	--
3	55	0.88	0.88	0.88	0.88	0.0000
4	55	E	E	E	--	--
5	55	E	E	E	--	--
6	55	0.91	0.91	0.92	0.91	0.0029
7	55	0.88	0.88	0.88	0.88	0.0000

continúa

* Cada valor de las replicas es el promedio de tres mediciones.

N.D. No determinado. E: Eliminado

continuación

Tratamiento	Días	R1*	R2*	R3*	Promedio	Desviación
control	70	0.92	0.92	0.92	0.92	0.0014
1	70	E	E	E	--	--
2	70	0.89	0.89	0.89	0.89	0.0000
3	70	0.84	0.84	0.84	0.84	0.0000
4	70	E	E	E	--	--
5	70	E	E	E	--	--
6	70	0.92	0.93	0.92	0.92	0.0058
7	70	0.86	0.86	0.87	0.86	0.0058
control	85	N.D.	N.D	N.D	--	0.0000
1	85	E	E	E	--	--
2	85	0.91	0.91	0.91	0.91	0.0000
3	85	0.82	0.82	0.82	0.82	0.0000
4	85	E	E	E	--	--
5	85	E	E	E	--	--
6	85	0.92	0.92	0.92	0.92	0.0000
7	85	0.88	0.86	0.87	0.87	0.0100
control	100	0.92	0.92	0.92	0.92	0.0000
1	100	E	E	E	--	--
2	100	0.91	0.91	0.91	0.91	0.0000
3	100	0.79	0.78	0.79	0.79	0.0058
4	100	E	E	E	--	--
5	100	E	E	E	--	--
6	100	0.92	0.92	0.92	0.92	0.0000
7	100	0.86	0.86	0.86	0.86	0.0000

* Cada valor de las replicas es el promedio de tres mediciones.
N.D. No determinada. E: Eliminado

APÉNDICE B

Valores de pH de los tratamientos durante los cien días de almacenamiento

Tratamiento	Días	R1*	R2*	R3*	Promedio	Desviación
control	0	3.41	3.37	3.55	3.44	0.0939
1	0	3.42	3.42	3.42	3.42	0.0000
2	0	3.42	3.42	3.42	3.42	0.0000
3	0	3.44	3.44	3.44	3.44	0.0000
4	0	3.43	3.43	3.43	3.43	0.0000
5	0	3.51	3.17	3.28	3.32	0.1702
6	0	3.54	3.24	3.37	3.38	0.1504
7	0	3.38	3.36	3.56	3.43	0.1138
control	20	3.62	3.515	3.42	3.52	0.1000
1	20	3.29	3.295	3.46	3.35	0.0000
2	20	2.78	2.77	2.83	2.79	0.0333
3	20	3.26	3.24	3.29	3.26	0.0225
4	20	E	E	E	--	--
5	20	3.36	3.20	3.33	3.30	0.0869
6	20	3.44	3.18	3.29	3.30	0.1263
7	20	3.44	3.31	3.57	3.44	0.1317
control	40	3.23	3.37	3.265	3.29	0.0710
1	40	E	E	E	--	--
2	40	2.63	2.57	2.57	2.59	0.0346
3	40	3.28	3.28	3.28	3.28	0.0000
4	40	E	E	E	--	--
5	40	E	E	E	--	--
6	40	3.47	3.36	3.47	3.43	0.0637
7	40	3.22	3.31	3.32	3.28	0.0535
control	55	N.D.	N.D.	N.D.	--	--
1	55	E	E	E	--	--
2	55	N.D.	N.D.	N.D.		0.0278
3	55	3.07	3.04	3.03	3.05	0.0153
4	55	E	E	E	--	--
5	55	E	E	E	--	--
6	55	3.46	3.52	3.45	3.48	0.0397
7	55	3.18	3.34	3.27	3.26	0.0778

continúa

* Cada valor de las replicas es el promedio de tres mediciones.

N.D. No determinado. E: Eliminado

continuación

Tratamiento	Días	R1*	R2*	R3*	Promedio	Desviación
control	70	3.93	3.95	3.94	3.94	0.0076
1	70	E	E	E	--	--
2	70	2.55	2.52	2.52	2.53	0.0000
3	70	3.23	3.22	3.23	3.22	0.0000
4	70	E	E	E	--	--
5	70	E	E	E	--	--
6	70	3.46	3.45	3.46	3.45	0.0029
7	70	3.29	3.28	3.27	3.28	0.0126
control	85	N.D.	N.D.	N.D.	--	--
1	85	E	E	E	--	--
2	85	2.61	2.58	2.59	2.59	0.0150
3	85	3.24	3.24	3.22	3.23	0.0087
4	85	E	E	E	--	
5	85	E	E	E	--	
6	85	3.24	3.22	3.23	3.23	0.0076
7	85	3.15	3.27	3.29	3.23	0.0729
control	100	4.70	4.70	4.70	4.70	0.0000
1	100	E	E	E	--	
2	100	2.44	2.45	2.44	2.44	0.0058
3	100	3.08	3.05	3.05	3.06	0.0173
4	100	E	E	E	--	
5	100	E	E	E	--	
6	100	3.42	3.42	3.42	3.42	0.0000
7	100	3.07	3.15	3.16	3.12	0.0465

* Cada valor de las replicas es el promedio de tres mediciones.

N.D. No determinado. E: Eliminado

APÉNDICE C

Valores de °Brix de los tratamiento durante los cien días de almacenamiento

Tratamiento	Días	R1*	R2*	R3*	Promedio	Desviación
control	0	10.17	10.11	10.11	10.14	0.0318
1	0	44.99	44.99	44.99	44.99	0.0000
2	0	10	10	10	10.00	0.0000
3	0	44.83	44.83	44.83	44.83	0.0000
4	0	10.17	10.17	10.17	10.17	0.0000
5	0	45	45	45	45.00	0.0000
6	0	10.33	10.66	10.33	10.44	0.1905
7	0	46.66	47.44	47.44	47.05	0.4503
control	20	4.00	5.825	4.00	4.61	1.0551
1	20	41.66	42.33	41.50	41.83	0.0000
2	20	10.66	10.33	10.17	10.39	0.2520
3	20	46.50	46.50	46.50	46.50	0.0000
4	20	E	E	E	--	--
5	20	45.83	45.66	46.00	45.83	0.1675
6	20	10.83	10.66	10.33	10.61	0.2520
7	20	46.50	47.83	46.66	47.00	0.7250
control	40	3.00	3.00	3.33	3.11	0.1905
1	40	E	E	E	--	--
2	40	10.99	10.66	10.83	10.83	0.1650
3	40	48.00	51.66	50.16	49.94	1.8399
4	40	E	E	E	--	--
5	40	E	E	E	--	--
6	40	11.00	10.66	11.17	10.94	0.2575
7	40	47.99	49.50	49.00	48.83	0.7667
control	55	N.D.	N.D.	ND.	--	--
1	55	E	E	E	--	--
2	55	N.D.	N.D.	N.D.	**	0.0967
3	55	50.99	50.99	51.00	50.99	0.0058
4	55	E	E	E	--	--
5	55	E	E	E	--	--
6	55	11.00	11.33	11.33	11.22	0.1905
7	55	48.99	49.83	47.00	48.61	1.4513

continúa

* Cada valor de las replicas es el promedio de tres mediciones.

N.D. No determinado

continuación

Tratamiento	Días	R1*	R2*	R3*	Promedio	Desviación
control	70	2.66	2.995	2.825	2.83	0.1675
1	70	E	E	E		
2	70	10.99	10.50	10.49	10.66	0.2858
3	70	52.50	52.66	52.66	52.61	0.0952
4	70	E	E	E		
5	70	E	E	E		
6	70	11.00	11.165	10.99	11.05	0.0983
7	70	47.99	49.44	48.00	48.72	0.8333
control	85	N.D.	N.D.	N.D.	--	--
1	85	E	E	E	--	--
2	85	10	10	10	10.00	0.0000
3	85	51.99	60.33	56.5	56.27	4.1746
4	85	E	E	E	--	--
5	85	E	E	E	--	--
6	85	11.33	10.88	11.22	11.14	0.2346
7	85	47.99	51.16	49.33	49.49	1.5913
control	100	1.00	1.00	1.33	1.11	0.1905
1	100	E	E	E	--	--
2	100	13.67	13.50	14.50	13.89	0.5351
3	100	52.00	64.00	52.00	56.00	6.9268
4	100	E	E	E	--	--
5	100	E	E	E	--	--
6	100	11.16	11	11.33	11.16	0.1650
7	100	48.00	51.50	51.50	50.33	2.0178

* Cada valor de las replicas es el promedio de tres mediciones.
N.D. No determinando. E: Eliminado.

APÉNDICE D

Valores del recuento de HyL de los tratamiento durante los cien días de almacenamiento

Tratamiento	Días	R1*	R ^{*a}	R3 ^{*a}	Promedio	Desviación
control	0	2276.6667	12450	630000	214909	359515.43
1	0	450	380	123000	41277	70774.49
2	0	41600	45600	220000	102400	101864.22
3	0	5442.5	7222.5	24200.0	12288	10354.13
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
control	20	31450000	24000000	3732500	19727500	14344185.0
1	20	8710000	8385000	10440000	9178333	1104653.04
2	20	19050	24000	800	14617	12218.87
3	20	0	0	0	0	0
4	20	hongo	hongo	hongo	--	--
5	20	0	0	0	0	0
6	20	0	0	0	0	0
7	20	0	0	0	0	0
control	40	265000000	60000000	65000000	130000000	116940156
1	40	E	E	E	--	--
2	40	0	0	0	0	0
3	40	0	0	0	0	0
4	40	E	E	E	--	--
5	40	hongo	hongo	hongo	--	--
6	40	0	0	0	0	0
7	40	0	0	0	0	0
control	55	N.D.	N.D.	N.D.	--	--
1	55	E	E	E	--	--
2	55	N.D.	N.D.	N.D.	--	--
3	55	0	0	0		0
4	55	E	E	E	--	--
5	55	E	E	E	--	--
6	55	0	0	0	0	0
7	55	0	0	0	0	0

continúa

* Cada valor de las replicas es el promedio de dos repeticiones de la dilución correspondiente.

^a Existe un incremento en la UFC/g de HyL en las muestras, lo que se explica quizás debido a los restos de pulpa que inicialmente pudieron quedar en los materiales, lo que pudo haber contaminado a las réplicas siguientes, incrementando así las UFC/g de HyL al tiempo cero de almacenamiento. Lo cual sugiere un punto crítico de control en el despulpado del fruto de *Cyrtocarpa procera*.

continuación

Tratamiento	Días	R1*	R2*	R3*	Promedio	Desviación
control	70	36225000	34325000	34100000	34883333	1167350.99
1	70	E	E	E	--	--
2	70	0	0	0	0	0
3	70	0	0	0	0	0
4	70	E	E	E	--	--
5	70	E	E	E	--	--
6	70	0	0	0	0	0
7	70	0	0	0	0	0
control	85	N.D.	N.D.	N.D.	--	--
1	85	E	E	E		
2	85	0	0	0	0	0
3	85	0	0	0	0	0
4	85	E	E	E		--
5	85	E	E	E		--
6	85	0	0	0	0	0
7	85	0	0	0	0	0
control	100	56500000	N.D.	N.D.	56500000	--
1	100	E	E	E		
2	100	0	0	0	0	0
3	100	0	0	0	0	0
4	100	E	E	E		--
5	100	E	E	E		--
6	100	0	0	0	0	0
7	100	0	0	0	0	0

* Cada valor de las replicas es el promedio de dos repeticiones de la dilución correspondiente
N.D. No determinado. E: Eliminado

BIBLIOGRAFÍA

- Argaiz A., López-Malo A. y Welte-Chanes J. 1995 Considerations for the Development and the Stability of High Moisture Fruit Products during Storage. En Barbosa-Cánovas G. y Welte-Chanes, J. (Eds.) Fundamentals and Applications of Food Preservation by Maustore Control. ISOPOW practicum II. p 729. Lancaster, PA Technomic Publishing.
- AOAC. 1997. Official Methods of Analysis. 16th Edition. Association of Official Analytical Chemist. USA.
- Alzamora S.M. Gerschenson L.N., Cerruti P. Y Rojas A.M. 1989. Shelf stable pineapples for long-term non refrigerated stores. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie. 22: 233-236.
- Alzamora S.M., Cerruti P., Guerreo S. y López-Malo A. 1995 Minimally Processed Fruits by Combined Methods. En Barbosa-Cánovas G. y Welte-Chanes, J. (Eds.) Fundamentals and Applications of Food Preservation by Maustore Control. ISOPOW practicum II. p 463. Lancaster, PA Technomic Publishing.
- Alzamora Stella Maris. 1997. Alimentos conservados por factores combinados. En José Miguel Aguilera (Ed.) Temas en tecnología de alimentos. p 45. CYTED vol. 1 Instituto politécnico Nacional. México.
- Alzamora S.M. y López-Malo A. 2002. Microbial Behavior Modeling as a Tool in the Design and Control of Minimally Processed Foods. En Welte-Chanes J. (Ed.) Food Engineering of 21th Century. p 631. CECOSA Press. USA.
- Badui Dergal Salvador. 1998. Diccionario de Tecnología de los Alimentos. p 36. Addison Wesley Longman. México.
- Barbosa-Cánovas Gustavo V. y Vega-Mercado Humberto. Deshidratación de alimentos. 2000. p.54 ACRIBIA S.A. España.
- Barbosa-Cánovas Gustavo V, Pothakamuy R. Usha, Paulo Enrique y Swanson G. Barry 1999. Conservación no térmica de alimentos. p. 293. ACRIBIA S.A. España.

- Belitz H.B. y Grosch W. 1997. Química de los alimentos. p 861,285, 870,873 segunda edición. ACRIBIA, S.A. España.
- Beuchat L.R. 1983. Combined effects of food preservatives and organic acids on thermal inactivation of yeasts in fruit juices. Lebens. Wiss.Technol.16:51.
- Boddy,l. y Wimpenny, J.W.T. 1992. Ecological concepts in food microbiology. J.Appl.Bacteriol Symp. Supple. 73:23S
- Cabrera Torres José Jorge, Casas Fernández Alejandro, Rojas Canales María del Carmen y Viveros Salinas Juan. 1998. Alimentos de la Naturaleza. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México D.F. [consultada 22 Septiembre 2005] Disponible en la World Wide Web:
http://cecadesu.semarnat.gob.mx/biblioteca_digital/alimentos_naturaleza/alimentos_naturaleza_03.shtml
- Casp Vanaclocha Ana y Requenna Abril José.1998. Procesos de conservación de alimentos. p 36. Mundi- Prensa. España.
- Cerezal P. y Duarte G. 2004. Sensory influence of chemical additives in peeled cactus pears (*Opuntia ficus indica* L. Miller) in syrup conserved by combined methods. J.PACD 102:109.
- Charley Helen y Weaver Connie, 1998. Foods a Scientific Approach. Tercera edición. p 476-477. Prentice-Hall Inc. USA.
- Chifire J., Ferro Fontán C. y Benmergui A. 1980. The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. IV. A prediction in aqueous non-electrolyte solutions. Journal of Food Technology 15: 59-70.
- Elguezabal L., Navarro P. y Daly M. 1994. Preservación de tres frutas (piña, parchita y tamarindo) a granel por métodos combinados. [consultado 29 Marzo 2004], Disponible en la World Wide Web:
<http://www.agroindustrias.org/1-07-01conservatresfrutas.shtml>

- FAO. 2006. Food Agriculture Organization. Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas. Manual de Capacitación. [consultado 13 de marzo de 2006] Disponible en la World Wide: http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/008/y5771s/y5771s02.htm
- Fennema Owen R., Powrie William D. Marth Elmer H. 1973. Low-Temperature Preservation of Foods and Living Matter. p 4. MERCEL DEKKER Inc. USA.
- García Ricardo y Reátegui Manuela. 2002. Conservación de pulpa de *Mauritia flexuosa* L. “aguaje” con aplicación de métodos de factores combinados. Revista Amazónica de Investigación Alimentaria 2 (1): 59-68.
- Guerrero, S., Alzamora, S.M. y Gerschenson, L.N. 1994. Development of a shelf-stable banana purée by combined factors: microbial stability. Journal of food protection 57: 902-907.
- Gould, G.W. 1989. Heat-induced injury and inactivation. En G.W. Gould (Ed.) Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures. p 11. Elsevier Applied Science, London.
- Hayes D. George.1992. Manual de datos para Ingeniería de los alimentos. p. 80. ZARAGOZA. España.
- Kirk S. Ronald, Sawyer Ronald y Eyan Harold. 1996. Composición y análisis de alimentos de Pearson. p. 259. CECOSA. México.
- Kuehl O. Robert. 2003. Diseño de experimentos. Principios estadísticos de Diseño y Análisis de Investigación. p 123 .Segunda edición. Thomson-Learning. México.
- Lee Sun-Young. 2004. Microbial Safety of Pickled Fruits and Vegetables and Hurdle Technology. Internet Journal of Food Safety 4: 21-32.
- Leistner Lothar y Rödel W. 1976. The stability of intermediate moisture foods with respect to microorganisms. En Davies R., Birch K.J. y Parker (Eds.) Intermediate Moisture Foods. p.120. Applied Science Publisher Ltd., London.

Leistner Lothar. 1985. Hurdle technology applied to meat products of shelf stable and intermediate moisture food types. En Simatos D., Multon J.L. (Eds.). Properties of Water in Foods. p.309. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

Leistner Lothar. 1995 Use of hurdle technology in food processing: Recent advances. En Barbosa-Cánovas G. y Welti-Chanes, J. (Eds.) Fundamentals and Applications of Food Preservation by Maustore Control. ISOPOW pranticum II. p. 377. Lancaster, PA Technomic Publishing.

Leistner Lothar. 2000 Basic aspect of food preservation by hurdle technology. Journal Food Microbiology 55:181-186.

Martínez Ramírez Manuel de Jesús. 2004 Técnico Agropecuario. Integrante de la brigada promoción al desarrollo en el Instituto de Agroindustrias en la Universidad Tecnológica de la Mixteca. (Comunicación personal).

Medina B. M.L. y Pagano G. F. 2003. Caracterización de la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) tipo “Criolla Roja”. Rev. Fac. Agron. LUZ. 20:72-86.

Montes de Oca C., Gerschenson N., y Alzamora S.M. 1991. Effect of the addition of fruit juices on water Activity of sucrose-containing model systems during store. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie 24:375-377.

Nassu Tieko Renata, Lima Ribeiro Janice y Souza Filho Moreira de Men de Sá. 2001. Consumers' acceptance of fresh and combined methods processed melon, mango and cashew apple. Rev. Bras. Frutic. [online]23(3): 551-554 [consultado 01 Noviembre 2005], Disponible en la World Wide Web: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010029452001000300020&lng=es&nrm=iso.

Nguyen-the Christopher y Carlin Frédéric. 1994. The Microbiology of Minimally Processed Fresh Fruits and Vegetables. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 34(4):371-401.

Ordóñez Pereda Juan A. 1998. Tecnología de los alimentos. Volumen 1 Componentes de los alimentos y procesos . p 253. SÍNTESIS. España.

- Paltrinieri Gaetano. 1990. Manuales para educación agropecuaria. Elaboración de frutas y hortalizas. Primera edición. p 32. Trillas/SEP México.
- Pelczar, M., Reid, R.D. y Chan, E.C.S.. 1982. Microbiología. Segunda edición. p.255. Mc Graw Hill. México.
- Rahman Shafiur , 1995. Food Properties Handbook. p 109. CRC Press Inc. USA.
- Ray Bidek, 1996. Fundamental Food Microbiology. p 46, 62,66,68-70. CRC Press Inc. USA.
- Robinson David S. 1991. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. p.99 ACRIBIA S.A. España.
- Salunkhe D.K. Bolin H.R. y Reddy N.R. 2000. Store Processing and Nutritional Quality of Fruits and Vegetables. p 118. CRC Press. USA.
- Soliva-Fortuny Robert, Pedro Elez-Matínez, Mercè Sebastián-Calderó y Olga Martín-Belloso. 2004. Effect of combined methods of preservation on the naturally occurring microflora of avocado purée. Journal Food Control 15: 11-17.
- Splitsoesser D.F. 1987. Fruits and fruit products. En Food and Beverage Mycology. Beuchat L.R. (Ed.) p. 83. Wesport Connecticut: AVI Publishing Company.
- Tapia de Daza M.S. Argáiz A. López-Malo A. y Díaz R.V. 1995. Microbial Stability Assessment in High and Intermediate Moisture Foods: Especial Emphasis on Fruit Products. En Barbosa-Cánovas G. y Welte-Chanes, J. (Eds.) Fundamentals and Applications of Food Preservation by Maustore Control. ISOPOW practicum II. p. 575. Lancaster, PA Technomic Publishing.
- Tapia de Daza María S., Alzamora Stella M. y Welte-Chanes Jorge. 1996. Combination of Preservation Factors Applied to Minimal Processing of Foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36(6): 629-65.

- Tapia de Daza María S., Alzamora Stella M. y Welti-Chanes Jorge. 1997 Minimally Processed High-Moisture Fruit Products by Combined Methods: Results of a Multinational Project. En Food Engineering 2000. Fito Pedro, Ortega-Rodriguez Enrique y Barbosa-Cánovas Gustavo V. (Eds.) p 161. Ed. Chapman hall. USA.
- Villanueva-Cañongo C., Hernández C.G. y Guadarrama M.P.C. 2004. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la chupandía (*Cyrtocarpa procera*) especie nativa de la Mixteca Oaxaqueña. XXXV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Septiembre de 2004. Acapulco Guerrero, México.
- Welti-Chanes, J., Alzamora Stella M. y Tapia de Daza María S. 1996 Combination of Preservation Factors Applied to Minimal Processing of Foods. Food Science and Nutrition 36(6):629-659.
- Wiley Robert C. 1997. Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas. p 266,269.ACRIBIA, S.A. España.
- Wills Ron, McGlasson Barry, Graham Doug y Joyce Daryl. 1999. Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales. p 20, segunda edición. ACRIBIA, S.A. España.
- Zottola Edmund A.1994. Microbes, Hurdle, Food Safety and Process Optimization. En Paul Singh, R. and Oliveira Fernanda A.R. (eds.) Food Engineering and Manufacturing Series. p 203. CRC Press. USA.