

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Proyecto presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos para optar por el grado de  
Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

**Evaluación del efecto de las condiciones de proceso sobre la letalidad acumulada y el  
pH de zanahorias acidificadas tratadas térmicamente**

Elaborado por:  
José Adrián Chaves Quesada  
Carné: B41922

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Agosto, 2020

## **Tribunal Examinador**

Trabajo final de graduación presentado a la escuela de Tecnología de Alimentos como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Aprobado por

---

Ph D. Eric Wong González

Presidente del tribunal

---

Ph.D. Óscar Acosta Montoya

Director del Proyecto

---

Ph.D. Jessie Usaga Barrientos

Asesora del Proyecto

---

M.Sc Manuel Montero Barrantes

Asesor del Proyecto

---

Lic. Johan Jiménez Arias

Profesor Designado

## **Dedicatoria**

A Dios por darme la vida

A mi familia por siempre apoyarme

A mi novia y mis amigos por siempre estar ahí cuando los necesito

## **Agradecimientos**

A mi papá y mamá por darme todo su amor, por darme la fe y todas las facilidades para la educación que he tenido hasta hoy y por apoyarme en cada decisión.

A mis hermanos por estar presentes cuando los necesite durante esta carrera; Gabri por las dudas resueltas en cursos de ingeniería, Marco por la ayuda en cursos de economía y el proyecto del IFT y Vero por la ayuda en los cursos de alimentos y por mostrarme esta carrera cuando no sabía que estudiar.

A Lali por ser la mejor novia del mundo y mi mayor apoyo durante estos 6 años de carrera, entendiéndome cuando no tenía tiempo y ayudándome con trabajos cuando no daba más. Por revisar mis documentos de la tesis en redacción y ortografía para que fueran entendibles. Por estudiar conmigo y aguantar mis conversaciones aburridas sobre alimentos y tratamientos térmicos, te amo.

A mis abuelas (Nena y Flor) y abuelo (Carlos), por todo el cariño y apoyo que recibí y recibo de ellos, siempre preocupándose por mis estudios y alegrándose con mis alegrías.

A mis amigos más cercanos; Jorge (curios) por entenderme cuando no tenía tiempo para ir a comer o jugar un partido de Play y apoyarme, a Sánchez por la inmensa ayuda durante este trabajo de investigación, un experto en tratamientos térmicos después de esta tesis y a Jay por motivarme y apoyarme cada vez que hablábamos y en general a los tres por los muchos momentos buenos que hemos vivido juntos.

A mis amigos y amigas de la U, en especial Fabián, Fer, Kim, Rox, Nico, Naty, Leandro y Edward por todas las veces que me explicaron algo, aprendí mucho de cada uno, por cada vez que me recordaron hacer algún trabajo o informe, por tenerme paciencia cuando les tocaba trabajar conmigo, por todos los momentos buenos y malos que vivimos juntos durante este tiempo. Nota especial para el equipo del IFT, fueron de las mejores cosas que viví en este tiempo de U, aprendí muchísimo trabajando al lado de cada una de ustedes y espero haber aportado, aunque sea un poco de humor durante ese sueño que se nos cumplió gracias a Dios y al gran trabajo que hicimos.

A toda la generación de TA, con cada uno tengo al menos un buen recuerdo juntos, son excelentes personas y serán excelentes profesionales.

A mis hermanos de comunidad, sé que han rezado por mi cada vez que lo he pedido, son mi familia.

Al profe Oscar por ser un excelente director de tesis, por ser un excelente profesor y ser humano, por compartir todo su conocimiento conmigo, por enseñarme a trabajar, por estar siempre disponible cuando tenía una duda, por darme consejos cuando se los pedí, por transmitirme ese gusto por los procesos térmicos.

A la profe Jessie por sus aportes a la investigación, por darnos la oportunidad de cumplir nuestro sueño de ir al IFT, por todo lo que aprendí de ella. Una excelente profesora.

Al profe Manuel por los aportes al trabajo de investigación, por resolverme problemas cuando lo buscaba a la oficina, por confiar en mí como estudiante.

A todos los profes de TA y los profes que tuve durante la carrera por brindarme todas las herramientas para ser un buen profesional.

A Camacho, Alonso, José Pablo, Giova, Luis, Randall, por toda la ayuda durante los laboratorios de la carrera y durante el desarrollo del proyecto de graduación.

A todas las personas que formaron parte de mi vida durante este tiempo.

A la escuela de Tecnología de Alimentos, el CITA y la Universidad de Costa Rica por darme la oportunidad de estudiar y desarrollarme profesionalmente.

## Contenido

Resumen.....	xi
1. Justificación.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1 Objetivo General.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3 Marco Teórico.....	4
3.1 Acidificación de alimentos.....	4
3.2 Procesamiento térmico de alimentos.....	9
3.3 Modelización.....	15
4. Materiales y métodos.....	18
4.1 Localización.....	18
4.2 Materias primas, envases, equipos y accesorios.....	18
4.3 Pruebas Preliminares.....	19
4.4 Pruebas Definitivas.....	19
5 Resultados y discusión.....	24
5.1 Desarrollo de modelo para predecir la letalidad acumulada a partir del tiempo de proceso para zanahorias tratadas térmicamente.....	24
5.2 Desarrollo de modelo para predecir el pH a partir del tiempo de acidificación para zanahorias tratadas térmicamente.....	34
6 Conclusiones.....	45
7 Recomendaciones.....	47
8 Bibliografía.....	48

## Índice de cuadros

Cuadro I. Valores de letalidad acumulada con relación al rango de pH del alimento, con un valor $z = 8.9^{\circ}\text{C}$ y $T_{\text{ref}} = 93.3^{\circ}\text{C}$ . .....	14
Cuadro II. Ecuación del ajuste del modelo exponencial de tres parámetros representado en la Figura 1 y el intervalo de predicción inferior (IP) al 95% de confianza, así como la correspondiente ecuación inversa y su IP inferior, para cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 256 mL tratados térmicamente. ....	25
Cuadro III. Valores de letalidad acumulada promedio experimentales y sus respectivos intervalos de confianza al 95% y valores de letalidad acumulada promedio teóricos calculados a partir del modelo exponencial de tres parámetros ajustado, obtenidos para dos tiempos de proceso térmico de cilindro de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 265 mL.....	27
Cuadro IV. Ecuación del ajuste del modelo exponencial de tres parámetros representado en la Figura 2 y el intervalo de predicción inferior (IP) al 95% de confianza, así como la correspondiente ecuación inversa y su IP inferior, para cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 458 mL tratados térmicamente. ....	29
Cuadro V. Valores de letalidad acumulada promedio experimentales y sus respectivos intervalos de confianza al 95% y valores de letalidad acumulada promedio teóricos calculados a partir del modelo exponencial de tres parámetros ajustado, obtenidos para dos tiempo de proceso térmico de cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 458 mL.....	30
Cuadro VI. Valores promedio y desviaciones estándar ( $n=4$ ) de los tres parámetros obtenidos del modelo exponencial ajustado a partir de los datos del proceso térmico de cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 265 y 458 mL. ....	32
Cuadro VII. Ecuación del ajuste del modelo exponencial de tres parámetros representado en la Figura 3 y el intervalo de predicción superior (IP) al 95% de confianza, así como la correspondiente ecuación inversa y su IP superior, para cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones envasados en frascos de 265 mL tratados térmicamente. ....	36
Cuadro VIII. Valores de pH promedio experimentales y sus respectivos intervalos de confianza al 95% y valores de pH promedio calculados a partir del modelo exponencial de tres parámetros ajustado, obtenidos para cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones en frascos de 265 mL tratados térmicamente. ....	38

Cuadro IX. Ecuación del ajuste del modelo exponencial de tres parámetros representado en la Figura 4 y el intervalo de predicción superior (IP) al 95% de confianza, así como la correspondiente ecuación inversa y su IP superior, para cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones envasados en frascos de 458 mL tratados térmicamente. ....	41
Cuadro X. Proporción de vinagre – zanahoria en envases de 265 mL y 458 mL con cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones tratados térmicamente. ....	42
Cuadro XI. Valores de pH promedio experimentales y sus respectivos intervalos de confianza al 95% y valores de pH promedio teóricos calculados a partir del modelo exponencial de tres parámetros ajustado, obtenidos para cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones envasados en frascos de 458 mLo tratados térmicamente. ....	43

## Índice de Figuras

Figura 1. Variación de la letalidad acumulada en función del tiempo de proceso, para cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 265 mL tratados térmicamente.....	24
Figura 2. Variación de la letalidad acumulada en función del tiempo de proceso, para cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 458 mL tratados térmicamente.....	29
Figura 3. Variación del pH en función del tiempo de acidificación, para cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones envasados en frascos de 265 mL tratados térmicamente. ....	35
Figura 4. Variación del pH en función del tiempo de acidificación, para cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones envasados en frascos de 458 mL tratados térmicamente. ....	40

## Índice de abreviaturas

<b>%:</b>	<i>Porcentaje</i>	<b>ADN:</b>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<b><math>\Delta T</math>:</b>	<i>Diferencial de temperatura</i>	<b>FDA:</b>	<i>US Food and Drug Administration</i>
<b>CITA:</b>	<i>Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos</i>	<b>NADH:</b>	<i>Dinucleótido de nicotinamida y adenina</i>
<b>Log</b>	<i>Logaritmo</i>	<b>IP</b>	<i>Intervalo de predicción</i>

## **Resumen**

Chaves Quesada, José Adrián

### **Evaluación de las condiciones de proceso sobre la letalidad acumulada y el pH de zanahorias acidificadas tratadas térmicamente**

Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. – San José, Costa Rica.

Chaves Quesada, J., 2020.

63 h.: 4 il. – 52 refs.

El objetivo de la presente investigación consistió en el efecto de distintas condiciones de proceso sobre la letalidad y el pH en zanahorias acidificadas tratadas térmicamente. Se obtuvieron ecuaciones que describen el comportamiento de estas variables para dos tamaños de envase de vidrio utilizados, 256 mL y 458 mL. Adicionalmente se hicieron pruebas de verificación para cada una de las ecuaciones obtenidas.

Se utilizaron trozos de zanahoria de 2 cm de diámetro y 6,1 cm de altura para el frasco de 256 mL, mientras que para el frasco de 458 mL se utilizó el mismo diámetro (2 cm) y 8 cm de altura.

Para modelar la letalidad acumulada obtenida del tratamiento térmico, se llenaron los frascos con los trozos de zanahoria y se agregó vinagre comercial al 3 % a 80 °C diluido al 50 %, luego se procesaron los frascos de menor tamaño a 5 diferentes tiempos 5, 10, 15, 20,

25 minutos y para los frascos de mayor tamaño se utilizaron 6, 11, 16, 21, 26 minutos. Se midió la letalidad durante el tratamiento térmico y un enfriamiento pasivo hasta alcanzar los 60 °C.

Para modelar el pH obtenido se agregaron los trozos de zanahoria a los frascos y se agregó vinagre comercial al 3 % a 80 °C a tres diferentes concentraciones; 100 %, 50 % y 25 %, luego se procesaron los frascos durante 15 minutos y se les midió el pH a los 0, 30, 60, 90, 150, 210 minutos después de haber sido sacados del agua en ebullición.

De los datos obtenidos se procedió a ajustar un modelo exponencial de tres parámetros de donde se obtuvieron las ecuaciones del modelo ajustado y se analizaron los intervalos de predicción de donde se obtuvieron ecuaciones más conservadoras. Además, se analizaron los tres parámetros de las ecuaciones asociadas al primer modelo según el tamaño de frasco, donde se determinó que para el parámetro de tasa de crecimiento si existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Finalmente se realizaron verificaciones a los modelos obtenidos mediante pruebas a tiempos de proceso que estuvieran dentro del rango evaluado, pero determinados aleatoriamente.

## ZANAHORIA, LETALIDAD, PH, ACIDIFICACIÓN.

PhD. Óscar Acosta Montoya

Escuela Tecnología de Alimentos.

## 1. Justificación

En la mayoría de los casos el aseguramiento de la inocuidad de los alimentos, a nivel industrial, tiene base en los antiguos métodos de conservación desarrollados de manera empírica. La acidificación es uno de los métodos que se utilizan frecuentemente en la actualidad, debido a que al disminuir el pH del alimento se produce un efecto inhibitorio sobre los microorganismos (Sun, 2012). De esta manera, un alimento acidificado se define como aquel que tiene un pH de equilibrio igual o menor a 4,6 y una actividad de agua ( $a_w$ ) mayor a 0,85, según lo establece la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (FDA por sus siglas en inglés) (FDA, 2019).

Este proceso de conservación de alimentos sigue siendo muy utilizado en la industria, debido a que, de todos los parámetros intrínsecos que afectan el crecimiento de microorganismos, el pH es uno de los más sencillos de modificar (Knechtges, 2012). Por lo tanto, permite a los productores controlar de una manera más fácil la inocuidad de los productos que desarrollan, eliminando principalmente el peligro asociado a la enfermedad causada por la bacteria *Clostridium botulinum* (Baker, 2009).

Por otra parte, es primordial señalar que una de las principales preocupaciones de la industria enlatadora o conservería, ha sido determinar los tiempos para los procesos adecuados, con la finalidad de asegurar la esterilidad microbiológica de los productos (Zamora & Teixeira, 2012). De esta forma, el procesamiento o tratamiento térmico se utiliza para describir los procesos de calentamiento, mantenimiento a temperatura constante y enfriamiento posterior, los cuales son aspectos fundamentales para eliminar el riesgo de una posible enfermedad provocada por ingestión de alimentos contaminados (Zamora & Teixeira, 2012).

De esta manera, para productos vegetales acidificados con pH mayores a 3,3 es necesario realizar un tratamiento térmico. El objetivo de este proceso es eliminar células de microorganismos patógenos capaces de sobrevivir en el producto, como lo son

principalmente: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, y *Listeria monocytogenes*. Lo anterior debido a que dichas bacterias tienen una resistencia alta al ácido (Breidt et al, 2010). Además, para controlar la calidad del producto es fundamental dicho tratamiento térmico, ya que permite eliminar el posible desarrollo de microorganismos de deterioro durante el almacenamiento del alimento (Zamora & Teixeira, 2012).

También se debe considerar que, si bien el proceso térmico debe alcanzar la letalidad deseada (que todas las regiones del envase con producto se procesan a una temperatura suficientemente alta durante un tiempo suficientemente largo), la acción del calor también destruye los nutrientes y afecta la textura del producto (Acosta *et al.*, 2015). Por lo tanto, es ideal que estos efectos indeseables se puedan minimizar y a la vez se reduzcan el consumo de energía, el tiempo y otros recursos valiosos (Acosta *et al.*, 2015).

Por consiguiente, el objetivo de este proyecto es desarrollar modelos matemáticos que permitan predecir letalidades a partir de tiempos de proceso térmico para vegetales acidificados, así como predecir tiempos necesarios para que se produzca la acidificación de los productos. Para realizarlo, se utilizaron zanahorias como alimento modelo, debido a que este producto posee alta firmeza y homogeneidad del tejido en comparación con otros vegetales similares, además de la facilidad para lograr las dimensiones requeridas (Acosta *et al.*, 2015). Se procura que la información desarrollada en este proyecto sea de utilidad para los procesadores de vegetales acidificados, de manera que ellos mismos determinen las condiciones óptimas de elaboración de sus productos.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo General**

Evaluar los efectos de las condiciones de proceso sobre la letalidad acumulada y el pH de zanahorias acidificadas tratadas térmicamente.

### **2.2 Objetivos Específicos**

**2.2.1** Desarrollar un modelo matemático que permita predecir la letalidad acumulada a partir del tiempo de proceso para zanahorias tratadas térmicamente en dos tamaños de envase de vidrio.

**2.2.2** Desarrollar un modelo matemático que permita predecir el pH a partir del tiempo de acidificación, para zanahorias tratadas térmicamente, en tres concentraciones de vinagre, en dos tamaños de envase de vidrio.

### 3 Marco Teórico

#### 3.1 Acidificación de alimentos

El término de pH, es utilizado para designar un grado de acidez o alcalinidad de una solución acuosa, o en este caso en específico, de un alimento (Black & Barach, 2018). El pH está directamente relacionado con la concentración de iones hidronio e iones hidroxilo presentes en una solución, donde a mayor cantidad de iones hidronio en la solución, más ácida será (Harris, 2007).

Por lo tanto, el pH es utilizado como indicador de la acidez del medio, debido a que mide los iones hidronio en disolución, resultando en una escala entre 0 y 14; mientras que propiamente la acidez corresponde a una medición que indica el contenido total de ácido en un alimento y usualmente se determina como acidez titulable, expresándose como gramos del ácido en la muestra. De esta forma en la escala de pH los valores entre 0 y 7 se consideran ácidos, 7 corresponde a neutro y entre 7 y 14 son alcalinos o básicos. Así, la medición de pH se realiza generalmente con un pHmetro, el cual cuantifica el cambio en el potencial electroquímico establecido por los iones hidronio a través de una membrana semipermeable en un electrodo indicador (Picado, 2017). Por otra parte, existen algunos métodos de determinación de pH alternativos, que incluyen indicadores químicos, por ejemplo, en las bandas indicadoras por color.

La medición de pH resulta de suma importancia en la industria alimentaria, pues es un parámetro de uso común para el control de calidad e inocuidad en el procesamiento de una gran variedad de alimentos (Nielsen, 2017). No obstante, es relevante tomar en cuenta que, al medir un valor de pH con un pHmetro, se determina el logaritmo de la actividad de iones hidronio (Ecuación 2) y no la concentración de iones hidronio (Ecuación 1) (Harris, 2007).

$$pH = -\log[H^+] \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$pH = -\log A_{H^+} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Un alimento acidificado se define como un alimento de baja acidez, al cual se le añaden ácidos o alimentos ácidos con el fin de presentar dos condiciones en específico. La primera es que debe tener un pH de equilibrio igual o menor a 4,6, y la segunda es que debe poseer una actividad de agua ( $a_w$ ) mayor a 0,85. Lo anterior es establecido por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU (FDA por sus siglas en inglés) (FDA, 2019).

Para comprender de mejor manera el término de “alimento acidificado” es importante tener claro el concepto de “pH de equilibrio”, el cual es la condición que se logra cuando todos los ingredientes en el producto, ya sean sólidos o líquidos, poseen el mismo valor de pH, manteniéndose estable en el envase, de manera que el pH nunca sea mayor a un valor de 4,6 (Black & Barach, 2018).

Es fundamental aclarar que se han excluido de las normativas de alimentos acidificados de la FDA (CFR 114) a las bebidas carbonatadas, jaleas, mermeladas, alimentos propiamente ácidos, alimentos ácidos formulados, alimentos con actividad de agua menor a 0,85, alimentos almacenados, distribuidos y vendidos bajo condiciones de refrigeración y alimentos fermentados.

No todos los ácidos actúan de la misma manera en una disolución, ya que los ácidos fuertes tienen la capacidad de liberar todos los iones hidronio a la disolución, generando una mayor concentración de los mismos que a su vez permite una mayor actividad de los iones, mientras que los ácidos débiles no liberan todos los iones hidronio, lo que genera una menor capacidad de acidificación (Hui, 2015).

Una de las razones por las cuales es fundamental realizar un control microbiológico es debido a *Clostridium botulinum*, la cual es una bacteria patógena, anaerobia, capaz de producir esporas y una toxina llamada BoNT, causante del botulismo (Oliver *et al.*, 2010). Como consecuencia de ello, se produce parálisis de nervios craneales, parálisis simétrica, descendente y flácida de la musculatura somática (Baker, 2009). Es por esta razón que el control de la misma es esencial en cualquier alimento.

El género *Clostridium*, incluye al menos tres grupos genéticamente distinguibles que son capaces de producir toxinas letales para el ser humano (*C. botulinum*, *C. baratii* y *C.*

*butyricum*). Estos organismos comparten la habilidad de producir neurotoxinas. Las toxinas son clasificadas en diferentes tipos como lo son A, B, C, D, E F y G. El botulismo humano se ha descrito con las cepas de *C. botulinum* que producen toxina tipo A, B y E (Tucker & Featherstone, 2010).

Además, las esporas de *C. botulinum* son resistentes al calor, ya que pueden resistir procesos de 5 a 10 horas en agua hirviendo, por lo tanto, es necesario aplicar más de 121°C para destruir las esporas. Por otro lado, la toxina es sensible al ser expuesta a temperaturas cercanas a 100°C, sin embargo, debido a la alta toxicidad de dicha toxina a bajas dosis no es seguro diseñar un tratamiento térmico en base a ella (Black & Barach, 2018).

De esta manera, el pH del alimento permite aplicar tratamientos térmicos menos severos, asegurando a su vez el control de *C. botulinum*, ya que a pH menores a 4,8 las esporas de la bacteria no pueden germinar y pasar a su forma vegetativa, debido a que solamente en su estado vegetativo la bacteria puede producir la toxina causante del botulismo (Sapers *et al.*, 2005). El pH de 4,6 se ha escogido como el límite divisorio entre alimentos ácidos y alimentos de baja acidez, considerando un rango de seguridad de 0,2 en la escala de pH (Hui, 2015).

Por consiguiente, la acidificación de alimentos es un elemento fundamental ya que reduce la tolerancia térmica de los microorganismos como se mencionó anteriormente, por lo que se requiere un tratamiento térmico de menor magnitud para alimentos acidificados (Shafiur, 2007). Además, al estar en control las esporas de *C. botulinum*, el tratamiento térmico tiene como objetivo destruir las células vegetativas de otros patógenos que podrían causar algún daño al consumidor o bacterias de deterioro que podrían estar presentes en el alimento y generar problemas de calidad (Knechtges, 2012).

De acuerdo con la FDA (2009), existen cinco diferentes procedimientos para acidificar alimentos por medio de la adición de ácido: realizar un escaldado en disoluciones ácidas acuosas, efectuar la inmersión de los alimentos escaldados en ácidos, mantener el producto en contacto directo en contenedores con ácido, añadir de modo directo una cantidad predeterminada de ácido en envases individuales durante el proceso de producción y por

último, mezclar alimentos ácidos con alimentos de baja acidez en proporciones controladas para una adecuada formulación. Si bien, todos los procesos se utilizan para acidificar alimentos, para tratar vegetales, solamente se utilizan en la industria los primeros tres (Derossi *et al.*, 2011).

Los procesos de acidificación en alimentos son particularmente complejos debido a la composición química y propiedades físicas de los mismos, de manera que generan complicaciones para realizar predicciones de comportamiento durante la acidificación (Derossi *et al.*, 2011). Así, estos procesos se basan en mecanismos de transferencia de masa en donde iones hidronio presentes en una disolución acuosa migran hacia el alimento que se desea acidificar, de tal forma que existe una tendencia espontánea de los sistemas a igualar concentraciones en el medio como respuesta a un gradiente de concentración de un determinado soluto. A dicha tendencia se le conoce como difusión (Roque-Malherbe, 2007).

Una de las características propias de los alimentos vegetales que influyen sobre el proceso de acidificación es la permeabilidad de la pared celular. Lo anterior ocurre debido a que una baja permeabilidad podría dificultar el proceso de difusión, provocando un impacto negativo en el recorrido de la disolución hasta el centro del alimento y disminuyendo así la eficiencia del proceso (Zhao, 2012). De igual forma, el contenido de humedad del alimento está relacionado con la tasa de acidificación del mismo, ya que la afinidad del alimento con la disolución será mayor, mejorando la tasa de difusión del proceso. En contraparte, con los alimentos de alto contenido lipídico o proteico ocurre lo opuesto, ya que los lípidos generan una diferencia de afinidad del alimento con la disolución acuosa del ácido, mientras que las proteínas actúan como un buffer, de manera que se tiene mayor resistencia a los cambios de pH en el alimento (Badui, 2006; Belitz, 2009).

Por otro lado, es de suma importancia considerar la concentración de soluto en la disolución, ya que este es uno de los factores más relevantes sobre la tasa de difusión. De esta forma, al existir mayor concentración de soluto existe un gradiente mayor que provoca un aumento en la tasa de difusión por el aumento de partículas del soluto en la disolución. Además, también existe una mayor presión de los solutos sobre la membrana externa del alimento, cuya consecuencia es una mayor tasa de difusión (Roque-Malherbe, 2007). Este

efecto se observaría de igual forma si se disminuye la masa del alimento manteniendo la concentración del ácido en la disolución.

Por lo tanto, un elemento a considerar es el tamaño de los trozos de alimento que se quiere acidificar, ya que para que el proceso de acidificación sea efectivo, es necesario que se acidifique todo el alimento, es decir, para un alimento sólido el centro geométrico será el punto más lento de acidificación. De esta manera, si se aumenta el grosor o el tamaño del alimento se disminuirá la eficiencia en la difusión, por lo tanto, para controlar dicha variable las homogeneidades en las dimensiones del producto son esenciales para asegurar buenos resultados (Rao *et al.*, 2014).

Asimismo, de los factores propios del alimento, tanto de su composición química como de sus propiedades físicas, existen factores que afectan la tasa de difusión como lo son la temperatura y la agitación durante el proceso de acidificación. Un aumento en la temperatura produce a su vez un aumento en la energía y por ende en el movimiento de las partículas, provocando así una mayor penetración de las partículas del soluto en el alimento (Roque-Malherbe, 2007). La agitación promueve un efecto similar al crear mayor movimiento de las partículas del soluto y por lo tanto un aumento en la tasa de difusión (Rao *et al.*, 2014). Por esta razón, los factores anteriormente mencionados deben ser controlados si se quiere obtener una tendencia similar entre las diferentes mediciones de pH, de forma que se pueda predecir la tendencia de acidificación de diferentes alimentos (Picado, 2017).

Es necesario resaltar que los ácidos orgánicos, que son utilizados con frecuencia para la acidificación de alimentos, actúan como agentes antimicrobianos mediante diferentes mecanismos. Las moléculas disociadas fluyen a través de las membranas de los microorganismos, donde son ionizadas interiormente. De esta manera, se liberan iones hidrógeno para mantener el pH intracelular. Lo anterior causa deformación y daños en la actividad enzimática, en la estructura del ADN, así como en las diferentes proteínas, situación que provoca daños en la membrana extracelular (Mani-López *et al.*, 2011).

Por otra parte, un mecanismo de acción de los ácidos orgánicos ocurre mediante cambios en la permeabilidad de la membrana celular, ya que dificultan el transporte del sustrato. Es

decir, mientras que los cambios en el pH intracelular suprimen la oxidación del NADH, al afectarse el sistema de transporte de electrones se conduce a la muerte del microorganismo (Kong & Park, 2001).

De esta manera, la capacidad de acidificar e inhibir microorganismos entre los diferentes ácidos no es la misma, sino que depende de su  $pK_a$ , es decir, el logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido. No obstante, este no es el único factor, ya que los grados de afinidad hacia los lípidos, es decir la lipofilidad, influyen en la capacidad del ácido en atravesar la membrana celular hacia el citoplasma de los microorganismos (Lucke, 2003).

Es fundamental señalar que uno de los acidulantes más utilizados en la industria de alimentos es el ácido acético (Lucke, 2003). En esta línea, su afinidad hacia los lípidos es relativamente baja en comparación a otros ácidos, como el benzoico o el propiónico, aunque de igual modo contribuye al intercambio de iones en la matriz alimentaria, y por lo tanto a la acidificación (Knechtges, 2012).

Ligado con lo anterior, en un estudio realizado por Ye-Wong, Jung-Ji, Hyun y Se-Wook (2013), se determinó que el ácido acético, en comparación con el ácido cítrico y el ácido láctico, tiene un mayor efecto inhibitorio sobre especies de *Shigella* sp. Por consiguiente, se evidenció que es necesaria una concentración menor del ácido acético en comparación a los otros dos ácidos para obtener una acidificación igualmente eficaz. En síntesis, los aspectos mencionados anteriormente se asocian a que el ácido acético posee un bajo peso molecular, lo que permite una buena permeabilidad, pese a su baja lipofilidad y su valor de  $pK_a$  (Berg, *et al.*, 2007).

### **3.2 Procesamiento térmico de alimentos**

Otro gran factor que afecta a los microorganismos (además del pH) es la temperatura a la cual son sometidos los alimentos durante su proceso de elaboración. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, aplicar altas temperaturas (mayores a 70°C) permite eliminar la mayoría de los microorganismos patógenos para el ser humano y algunos microorganismos de deterioro. A diferencia de las bajas temperaturas que solo inhiben el crecimiento, cuando

se aplica un tratamiento térmico al alimento se logra la muerte microbiana, según la intensidad del proceso térmico (Holdsworth & Simpson, 2016).

De esta manera, el tratamiento térmico que recibe un alimento para asegurar su inocuidad y estabilidad microbiológica debe ser validado mediante un estudio de penetración de calor, en el cual se deben considerar los mecanismos de transferencia de calor que ocurren según el producto (Breidt *et al.*, 2014). El objetivo de un estudio de penetración de calor es determinar el comportamiento específico del alimento durante su calentamiento y enfriamiento, donde el diseño del estudio debe garantizar que se consideren todos los factores para lograr que el tratamiento térmico llegue hasta el punto más lento de calentamiento del alimento (Tucker & Featherstone, 2010). Tal punto se conoce como punto frío del alimento, es decir, la región donde el calor llega de forma más lenta al alimento (Breidt *et al.*, 2014).

De modo general, existen tres mecanismos de transferencia de calor, los cuales contribuyen en general al proceso de transferencia de calor en diferentes proporciones: conducción, convección y radiación (Holdsworth & Simpson, 2016). Así, la transferencia de calor por conducción ocurre mediante el movimiento de moléculas en cuerpos sólidos, convección es la transferencia de calor a través de fluidos, considerando la densidad del fluido y sus efectos de flotabilidad. La radiación es la transferencia de energía electromagnética entre dos cuerpos a diferentes temperaturas (Holdsworth & Simpson, 2016).

Los mecanismos de transferencia de calor mencionados son de suma importancia para la adecuada localización del punto frío, ya que se debe considerar la naturaleza del alimento que se desea procesar. Así, para alimentos sólidos la penetración de calor es mediante conducción, por lo tanto, se considera el punto frío como el centro geométrico del alimento, mientras que para alimentos donde el mecanismo de transferencia de calor que predomina es la convección, el punto frío se encuentra entre el centro geométrico y aproximadamente una décima parte desde la base, para en un proceso estático (Tucker & Featherstone, 2010).

Lo anterior ocurre debido a que, a medida que la temperatura aumenta, la densidad de los alimentos fluidos disminuye. Por consiguiente, el punto de calentamiento más lento se mueve hacia abajo desde el centro geométrico del recipiente (Tucker & Featherstone, 2010). Sin

embargo, es fundamental realizar estudios de penetración de calor para confirmar con precisión el punto frío de un alimento en un envase seleccionado. De esta forma, dicho procedimiento se realiza por medio de sensores de temperatura llamados termocuplas, de las cuales existen diferentes tipos según el uso específico que se le vaya a asignar (Holdsworth & Simpson, 2016).

Asímismo, al igual que en la tasa de difusión en un proceso de acidificación, existen factores que afectan la penetración de calor durante un tratamiento térmico, entre los que destacan la naturaleza del producto, material y forma del envase, características del líquido de gobierno y la proporción del mismo en relación con el alimento sólido, y el diferencial de temperatura entre el equipo donde se realiza el tratamiento térmico y el alimento (Llosa, 2017).

Los factores anteriormente mencionados influyen en la transferencia y velocidad del calor (Tucker & Featherstone, 2010). En primer lugar, a mayor tamaño de envase mayor va a ser el tiempo que se dure en alcanzar la letalidad deseada en el alimento. En segundo lugar, un recipiente de metal o lata posee una mayor conductividad que un recipiente de vidrio, por lo tanto, mayor va a ser la transferencia de calor. En tercer lugar, una alta cantidad de azúcares, almidones o alta viscosidad en el líquido de gobierno producen una disminución en la transferencia de calor, disminuyendo así la eficiencia del proceso térmico. Por último, un mayor diferencial de temperatura provoca una velocidad mayor de la transferencia de calor (Sancho, 2013; Llosa, 2017).

De esta manera, para determinar cuánto tiempo y calor aplicar a un alimento se debe considerar las cinéticas de muerte bacterianas. Cuando se somete a una población bacteriana a una temperatura constante, el número de supervivientes es una función exponencial del tiempo de proceso; es decir a intervalos iguales de calentamiento la población disminuye de forma proporcional (Huertas, 2008), por lo tanto, la cinética de muerte bacteriana es una reacción de primer orden (Ecuación 3) (Fernández *et al.*, 2007). Además, si se representa el logaritmo de los microorganismos supervivientes frente al tiempo, se obtiene una gráfica lineal, llamada gráfica de supervivencia (Palop, 2007).

$$N_t = N_0 e^{-kt} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde:

$N_t$ : Número de microorganismos tras “t” minutos de proceso.

$N_0$ : Numero de microorganismos al inicio del proceso.

k: Constante de inactivación.

t: tiempo de proceso.

La gráfica de supervivencia permite obtener el tiempo de reducción decimal o “valor D”, que se define como el tiempo que es preciso tratar a una población microbiana a la temperatura “T” para reducir su recuento a la décima parte, o lo que es igual reducir la población en un ciclo logarítmico (Palop, 2007). Representando matemáticamente por la Ecuación 4.

$$D_T = \frac{\Delta t}{\text{Log} \left( \frac{N_0}{N_t} \right)} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde:

$\Delta T$ : Cambio de tiempo durante el proceso

$N_t$ : Número de microorganismos tras “t” minutos de proceso.

$N_0$ : Numero de microorganismos al inicio del proceso.

Por otro lado, si se aumenta la temperatura del tratamiento, el valor D disminuye de forma logarítmica. Por lo tanto, al representar los valores logarítmicos del valor D frente a la temperatura del proceso, se obtiene una línea recta denominada gráfica de termodestrucción (Harris, 2008). Dicha gráfica permite conocer la termoresistencia que presentará el microorganismo a cualquier temperatura de tratamiento. A partir de la gráfica de termodestrucción se define el valor z (Ecuación 5) como el número de grados Centígrados (°C) que se requieren aumentar a la temperatura de tratamiento para reducir el valor D a la décima parte, es decir, una disminución de un ciclo logarítmico (Fernández *et al.*, 2007).

$$Z = \frac{\Delta T}{\text{Log } D1 - \text{Log } D2} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

$\Delta T$ : Cambio de temperatura durante el proceso

D1: Valor D inicial

D2: Valor D final

El valor z permite a su vez poder calcular la letalidad obtenida de un proceso térmico. Dicha letalidad se representa como el valor F y permite comparar el tratamiento térmico realizado a una temperatura y durante un tiempo determinado con un tratamiento de referencia (Hui, 2006). Para calcular el valor F es necesario emplear la siguiente ecuación.

$$F = t * 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde:

t: Tiempo de proceso

T: Temperatura al tiempo respectivo de proceso

T: Temperatura de referencia, para alimentos acidificados es 93,3 °C

z: Valor z, para alimentos acidificados es 8,9 °C

Existen dos métodos principales para calcular la letalidad acumulada de un proceso térmico: el método General Mejorado y el método de Ball. El método General Mejorado está basado en el hecho que cada punto de las curvas de calentamiento y enfriamiento, correspondientes a los registros de temperaturas obtenidos durante el proceso térmico, ejercen un efecto letal sobre el microorganismo, por lo que el cálculo implica la integración gráfica de cada punto registrado durante el proceso (Ciro *et al.*, 2009). Mientras que el método de Ball, a diferencia del método general, permite evaluar la letalidad de un

tratamiento *a priori* y la influencia sobre el proceso al modificar determinadas condiciones como la temperatura inicial del alimento o la temperatura de proceso (Pérez *et al.*, 2004).

Además de asegurar la inocuidad del alimento, el tratamiento térmico se aplica en productos acidificados con el objetivo de producir un alimento estable a temperatura ambiente (comercialmente estéril). Para esto se aplica un tratamiento térmico que considera los valores mostrados en el Cuadro I, recomendados de letalidad acumulada en relación con el pH del alimento.

Cuadro I. Valores de letalidad acumulada con relación al rango de pH del alimento, con un valor  $z = 8.9^{\circ}\text{C}$  y  $T_{ref} = 93.3^{\circ}\text{C}$ .

pH del producto	Letalidad acumulada (min)
4,4 - 4,5	20,0
4,3- 4,4	10,0
4,2 – 4,3	5,0
4,1 – 4,2	2,5
4,0 – 4,1	1,0
3,9 – 4,0	0,5
3,9	0,1

(Pflug, 2007).

Las recomendaciones dadas por Pflug (2007), tienen como objetivo que el alimento sea comercialmente estéril, y aunque se desarrollaron procurando que el alimento pierda la menor cantidad de nutrientes posible, la letalidad recomendada es conservadora, desde el punto de vista de inactivación microbiana. De acuerdo con Arias (2016) una de las mayores

pérdidas de nutrientes en vegetales ocurre debido a la disminución de compuestos como vitamina C, ácido pantoténico, vitamina B6 y vitamina B12.

Por otro lado, se ha reportado que en tratamientos térmicos excesivos, en los cuales el alimento se somete a altas temperaturas por largos periodos de tiempo, es posible que se dé la formación de furfural o hidroximetilfurfural (Lozano, 2006). Ambos son compuestos donde se ha evidenciado potencial nocivo en ensayos *in vitro* y en experimentos realizados con animales de laboratorio. Sin embargo, cuando los estudios se han extrapolado a seres humanos, los resultados no son del todo concluyentes (Jiménez, 2016). El Hidroximetilfurfural (HMF) es biotransformado a 5-sulfoximetilfurfural (SMF) por sulfonación del grupo funcional hidroxilo alílico (Glatt & Sommer, 2006). El SMF induce efectos genotóxicos y mutagénicos en bacterias y líneas celulares de mamíferos (Bakhiya *et al.*, 2009). Por esta razón, un adecuado tratamiento térmico resulta esencial para cualquier alimento termoprocesado.

Las pérdidas nutricionales y los compuestos generados por los tratamientos térmicos excesivos anteriormente mencionados, no son la única razón por la cual se debe realizar correctamente un tratamiento térmico. Se destaca que la pérdida de energía por tratamientos térmicos sobredimensionados representa un costo innecesario para los productores, mientras que un tratamiento térmico subdimensionado sería un potencial peligro para el consumidor (Arias, 2016).

### **3.3 Modelización**

La modelización es utilizada para los procesos térmicos debido a que permite mejorar los estudios de optimización de diseño y mejora en la operación de los equipos, como es el caso del método de Ball y el método General anteriormente mencionados. Mediante la utilización de estos modelos matemáticos en adecuados sistemas informáticos, es posible conocer la evolución de la temperatura en el punto frío de un alimento para evaluar así la eficiencia del tratamiento térmico (Rodríguez, 2011). Esto a su vez permite desde el punto

de vista económico, una posible reducción en el consumo de energía y tiempo de proceso y a su vez la estandarización del proceso involucrado (Pérez *et al*, 2004).

Por otro lado, la modelización ha sido comúnmente utilizada para controlar o predecir cambios de pH en diferentes alimentos (Posada *et al.*, 2012; Kalafatis, *et al.*, 2005), permitiendo de esta manera controlar la calidad de los alimentos producidos industrialmente. Por ejemplo, permite predecir cuanto tiempo tardará un alimento en alcanzar un pH igual o menor a 4,6, lo cual sería de importancia ya que como se mencionó anteriormente es el valor de pH límite entre alimentos acidificados y alimentos de baja acidez, lo que permite a su vez cambiar las condiciones de un proceso térmico si el alimento así lo requiere. De igual forma, permite controlar y predecir el tiempo que necesita un alimento para alcanzar el pH de equilibrio, lo cual es esencial para un adecuado manejo posterior del alimento.

La calidad de los alimentos es uno de los retos más grandes de la industria alimentaria ya que siempre se debe asegurar que el producto cumpla con las expectativas del consumidor, lo que incluye a su vez la inocuidad del alimento. Para cumplir con dicha expectativa del consumidor, es posible controlar los parámetros de calidad del producto por medio de modelos cinéticos que predicen el comportamiento de cada parámetro (Boekel, 2008). Sin embargo, crear modelos matemáticos que puedan simular el comportamiento de los indicadores de calidad de un alimento requiere un conocimiento amplio en ciencias de alimentos y nutrición, así como en modelos matemáticos, de manera que es esencial conocer cuál modelo y para qué se estaría empleando (Boekel, 2008).

Los modelos cinéticos implican que se puedan englobar los cambios que ocurren en un alimento debido al tiempo en un modelo matemático, el cual contiene a su vez parámetros cinéticos como la energía de activación o la tasa de crecimiento. De este modo, los modelos científicos comprenden tres objetivos principales: entendimiento, predicción y control. De esta manera la modelización es una herramienta que permite entender los cambios fisicoquímicos presentes en los estudios con alimentos (Boekel, 2008).

Uno de los primeros modelos desarrollados fue realizado en 1920 para predecir la inactivación de microorganismos en función del tiempo de calentamiento y la temperatura,

fue llamado modelo de Bigelow. Este modelo ha sido de gran utilidad para procesos de esterilización de alimentos, donde son utilizados los valores  $D$  y  $z$  anteriormente explicados (Peleg, 2006). Sin embargo, la industria de alimentos acidificados se ha rezagado en cuanto al desarrollo de nuevo conocimiento que permita tener un mayor control y entendimiento sobre la producción de estos.

## **4. Materiales y métodos**

### **4.1 Localización**

Las pruebas de acidificación y tratamiento térmico de las zanahorias se realizaron en la Planta Piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), ubicada en la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San Pedro de Montes de Oca.

### **4.2 Materias primas, envases, equipos y accesorios**

#### **4.2.1 Matriz alimentaria**

Las zanahorias fueron adquiridas en supermercados locales. Dado que se ha reportado que la zanahoria es una matriz homogénea (Acosta *et al.*, 2015), se empleó un lote de zanahoria por cada repetición de cada uno de los experimentos y se tomaron zanahorias de forma aleatoria de cada lote, para la preparación de las muestras, las cuales corresponden a los frascos. Se cortaron en cilindros de 2 cm de diámetro y 6,1 cm de largo para el frasco de 265 mL y para el frasco de 458 mL se utilizaron zanahorias de 2 cm de diámetro y 8 cm de largo, tanto para realizar el tratamiento térmico como para la acidificación de las zanahorias.

#### **4.2.2 Acidulante**

Se utilizó vinagre comercial de marca “mfs”, elaborado por ELIMAR y NAZLEA S.A., el cual reporta un contenido de ácido acético de 3%.

#### **4.2.3 Envases**

Se utilizaron frascos de vidrio con tapa metálica de rosca del proveedor Grupo VICAL. Se usaron dos tamaños de frasco: uno de 265 mL (frasco pequeño) y otro de 458 mL (frasco grande).

#### **4.2.4 Equipos y accesorios**

Se empleó un termoregistrador CALPlex con el software de procesamiento térmico CALSoft32 (TechniCAL, Inc., Nueva Orleans, LA) y termocuplas tipo aguja T (Ecklund-Harrison Technologies Inc., Fort Myers, FL). Además, se utilizó un pHímetro calibrado marca OAKTON pH 700; con electrodo de vidrio, para realizar las mediciones de pH a través del tiempo.

### **4.3 Pruebas Preliminares**

#### **4.3.1 Determinación de intervalos de tiempo de muestreo en frasco pequeño y grande**

Se evaluaron distintos tiempos de proceso (tratamiento térmico) de las zanahorias en vinagre comercial de marca “mfs” con el fin de obtener letalidades acumuladas acordes a las recomendaciones dadas por Plug (2003) para alimentos acidificados a diferentes valores de pH, en ambos tamaños de envases. Con esa información, se definió el rango de tiempo de proceso que se empleó en las pruebas definitivas, procurando obtener letalidades acumuladas entre los 5 y los 25 min ( $z = 8.9$  °C y  $T_{ref} = 93.3$  °C). Para los frascos de 265 mL, los tiempos de proceso corresponden a 5, 10, 15, 20 y 25 minutos, mientras que para los frascos de 458 mL los tiempos de proceso corresponden a 6, 11, 16, 21 y 26 minutos.

### **4.4 Pruebas Definitivas**

#### **4.4.1 Desarrollo de modelo para predecir la letalidad acumulada a partir del tiempo de proceso para zanahorias tratadas térmicamente**

##### **4.4.1.1 Condiciones del experimento**

Se utilizaron los materiales descritos en la sección 4.2. Los cilindros de zanahoria se colocaron en 5 frascos. Se colocó una termocupla conectada al termoregistrador en el punto frío de la zanahoria, que, en este caso al ser un

alimento sólido, es el centro geométrico del cilindro de zanahoria que ocupe el centro del frasco, para registrar la temperatura cada 10 segundos. Por lo tanto, en el frasco de mayor tamaño la termocupla se colocó a 4,0 cm de altura, mientras que en los frascos de menor tamaño a 3,05cm. Lo anterior se debe a que este es el lugar donde el calor llega de forma más lenta en el alimento (Breidt *et al*, 2014). Posteriormente, se añadió vinagre diluido al 50% en agua, de la marca comercial “mfs” a 80 °C hasta cubrir en su totalidad los cilindros de zanahoria, lo que representa una relación de líquido sólido de 41,56-58,44 % para el frasco de 458 mL y 31,71-68,29 % para el frasco 265 mL. Se taparon los frascos y se introdujeron en agua hirviendo durante 5, 10, 15, 20 y 25 minutos para frasco de 265 mL y 6, 11, 16, 21 y 26 minutos para frasco de 458 mL.

Una vez retirados los frascos del agua hirviendo, se continuó registrando la temperatura hasta que la misma alcanzó 60 °C mediante un enfriamiento pasivo (a temperatura ambiente). Para cada tamaño de frasco (265 y 458 mL), el experimento se realizó por cuadruplicado.

#### **4.4.1.2 Diseño experimental y análisis estadístico**

Con el objetivo de determinar el efecto del tiempo de proceso sobre la letalidad acumulada para las zanahorias tratadas térmicamente en dos tamaños de envases de vidrio, se llevaron a cabo dos experimentos (uno para cada tamaño de envase), según se describe en el punto 4.4.1.1. Una vez obtenidos los datos de temperatura y tiempo, se realizó el cálculo de la letalidad acumulada (Ecuación 7) para cada tiempo de muestreo, donde T es la temperatura medida en cada tiempo (t), T<sub>ref</sub> es la temperatura de referencia (93.3 °C) y z la resistencia térmica (8.9 °C).

$$F = \int_0^{t_f} 10^{\left(\frac{T-T_{ref}}{z}\right)} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Se empleó un modelo exponencial de tres parámetros con el objetivo de determinar si existe diferencia significativa (usando ANDEVA) entre los parámetros del modelo (asíntota, escalar y tasa de crecimiento) que se obtuvieron a partir de la relación entre la variable independiente (tiempo de proceso) y la variable dependiente (letalidad acumulada), según el tamaño de frasco (265 y 458 mL).

Adicionalmente el modelo permite predecir la letalidad acumulada a partir del tiempo de proceso para zanahorias tratadas térmicamente en dos tamaños de envase de vidrio. Para el análisis estadístico, se utilizó el programa JMP 9 y se estableció un nivel de confianza del 95%.

Se realizó adicionalmente una prueba de validación de los modelos obtenidos (según los tamaños de los frascos), la cual consistió en procesar frascos a dos diferentes tiempos de proceso con la finalidad de comparar las letalidades obtenidas (experimentales) con las letalidades calculadas por los modelos matemáticos (teóricas). Las validaciones se realizaron por triplicado. Los tiempos de proceso de la prueba de validación fueron seleccionados aleatoriamente, de manera que se encuentran entre los tiempos utilizados para desarrollar los modelos. Se calculó el porcentaje de error, mediante la diferencia con el valor teórico, de las letalidades obtenidas de la prueba de validación con respecto a las letalidades calculadas por los modelos (teórico).

#### **4.4.2 Desarrollo de modelo para predecir el pH a partir del tiempo de acidificación para zanahorias tratadas térmicamente**

##### **4.4.2.1 Condiciones del experimento**

Se utilizaron los materiales descritos en la sección 3.2. Los cilindros de zanahoria se colocaron en 6 frascos. A cada serie de 6 frascos, se añadió

vinagre de la marca comercial “mfs” a 80 °C a tres diferentes concentraciones, 100, 50 y 25 % (el resto corresponde a agua) hasta cubrir en su totalidad los cilindros de zanahoria, lo que representa una relación de líquido sólido de 41,56-58,44 % para el frasco de 458 mL y 31,71-68,29 % para el frasco 265 mL. Se taparon los frascos y se introdujeron en agua hirviendo durante 15 minutos.

Una vez retirados los frascos del agua hirviendo, se tomó cada frasco y se midió el pH a los cilindros de zanahoria de cada frasco en el tiempo cero (cuando se retira del agua hirviendo), 30, 60, 90, 150 y 210 minutos después del tiempo cero. La determinación de pH se realizó homogeneizando los cilindros de zanahoria con agua destilada en una proporción máxima de 20% correspondiente al peso de los cilindros, según lo establece la FDA (2019). Para cada tamaño de frasco (265 y 458 mL), el experimento se realizó por triplicado.

#### **4.4.2.2 Diseño experimental y análisis estadístico**

Con el objetivo de determinar el efecto del tiempo de acidificación sobre el pH en el alimento, para las zanahorias tratadas térmicamente en dos tamaños de envases de vidrio, empleando tres concentraciones de vinagre (100, 50 y 25 %), se llevaron a cabo dos experimentos (uno para cada tamaño de envase), según se describe en el punto 4.4.2.1.

Una vez obtenidos los datos de variación del pH a través del tiempo, se ajustó un modelo exponencial de tres parámetros para cada concentración de vinagre evaluada en cada tamaño de envase. El modelo permite predecir el pH a partir del tiempo de acidificación para zanahorias tratadas térmicamente, para cada concentración de vinagre en cada tamaño de envase. Para el análisis estadístico se utilizó el programa JMP 9 y se estableció un nivel de confianza del 95%.

Se realizó adicionalmente una prueba de validación de los modelos obtenidos (según los tamaños de los frascos y las concentraciones de vinagre), la cual consistió en procesar frascos térmicamente durante 15 minutos y realizar mediciones de pH a diferentes tiempos de acidificación para cada concentración de vinagre con la finalidad de comparar los valores de pH específicos obtenidos (experimentales) con los valores de pH calculados por los modelos matemáticos (teóricos). Las validaciones se realizaron por triplicado para cada concentración de vinagre en cada tamaño de envase. Los tiempos de acidificación de la prueba de validación fueron seleccionados de manera que se encuentren entre los tiempos utilizados para desarrollar los modelos. Se calculó el porcentaje de error, mediante la diferencia con el valor teórico, de los pH obtenidos de la prueba de validación con respecto a los pH calculados por los modelos (teórico).

## 5 Resultados y discusión

### 5.1 Desarrollo de modelo para predecir la letalidad acumulada a partir del tiempo de proceso para zanahorias tratadas térmicamente

La Figura 1 muestra los valores experimentales de letalidad acumulada obtenidos al variarse el tiempo del proceso térmico, al que fueron expuestos los cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 265 mL. Además de los valores experimentales, se muestra la curva de mejor ajuste, según un modelo exponencial de tres parámetros, acompañada de las curvas que representan el intervalo de predicción (IP) al 95% de confianza. Adicionalmente se muestran los valores experimentales obtenidos para la validación del modelo. El modelo utilizado fue seleccionado a partir de un grupo de modelos no lineales, ajustando los datos experimentales a cada modelo y empleando un análisis de residuales, de la raíz del cuadrado medio del error y del criterio de información de Akaike ajustado (AICc).

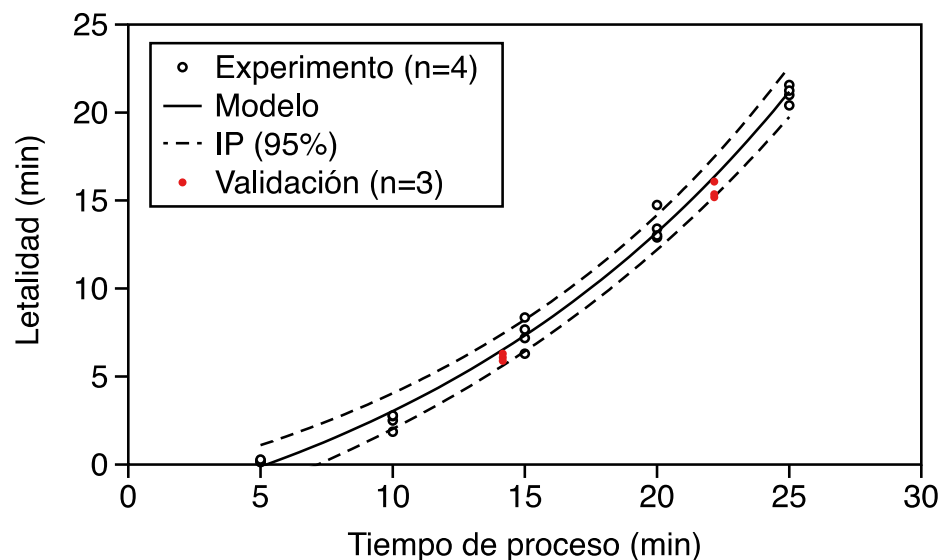


Figura 1. Variación de la letalidad acumulada en función del tiempo de proceso, para cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 265 mL tratados térmicamente.

La ecuación correspondiente al modelo ajustado (letalidad acumulada en función del tiempo de proceso), obtenido a partir de los datos de las 4 réplicas realizadas, se muestra en el Cuadro II. También se muestra la ecuación inversa, la cual se utiliza para el cálculo de tiempos de proceso a partir de letalidades acumuladas deseadas. Adicionalmente se muestra, para ambos casos, la ecuación del intervalo de predicción inferior al 95% de confianza.

Cuadro II. Ecuación del ajuste del modelo exponencial de tres parámetros representado en la Figura 1 y el intervalo de predicción inferior (IP) al 95% de confianza, así como la correspondiente ecuación inversa y su IP inferior, para cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 256 mL tratados térmicamente.

	<b>Ecuación</b>	<b>Ecuación inversa</b>
<b>Modelo ajustado</b>	$F = -8,82 + 6,38 \cdot \exp(0,0619 \cdot t)$	$t = \frac{\ln((F + 8,82) / 6,38)}{0,0619}$
<b>IP inferior (95%)</b>	$F = -12,36 + 8,42 \cdot \exp(0,0535 \cdot t)$	$t = \frac{\ln((F + 12,36) / 8,42)}{0,0535}$

Es de importancia mencionar que los estudios de penetración de calor se realizaron en el punto frío del alimento, en este caso en específico corresponde al centro geométrico del mismo, debido a que el calor penetra por conducción, paulatinamente del exterior al interior del alimento (Tucker & Featherstone, 2010). El estudio de punto frío no se realizó debido a que existe literatura que demuestra que el punto frío de las zanahorias no cambia si se mantiene una adecuada proporción de zanahorias y líquido de gobierno en el envase (Acosta *et al.*, 2015). Es decir, si en el envase hay una cantidad excesiva de líquido de gobierno en comparación con el alimento sólido, el mecanismo de transferencia de calor predominante cambia de conducción a convección. De esta forma la porción fluida del alimento ya caliente se vuelve menos densa y asciende en el interior del envase, provocando la circulación de la masa fluida dentro del recipiente, generando así que el punto frío del alimento se ubique más abajo del centro geométrico (Gómez, 2004; Tucker & Featherstone, 2010).

Los datos obtenidos de temperatura para los intervalos de tiempo muestreados durante los estudios de penetración de calor realizados, fueron analizados aplicando la ecuación descrita en la sección 4.4.1.2. de manera que se obtiene una letalidad acumulada asociada a cada tiempo de proceso evaluado. La ecuación del modelo ajustado obtenida para cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 265 mL tratados térmicamente predice valores de letalidad mayores a los obtenidos experimentalmente durante la validación (ver Figura 1), de tal manera que si se utiliza dicha ecuación para predecir el tiempo de proceso necesario para una letalidad específica, el alimento podría estar subprocesado, es decir la calidad del producto estaría comprometida principalmente por microorganismos de deterioro (Gaviria & Mazuera, 2010). Por otro lado, al utilizar la ecuación obtenida del intervalo de predicción inferior al 95% de confianza, se predicen tiempos de proceso más largos, es decir, asociados a una letalidad mayor, generando así que el alimento, en la mayoría de los casos, esté levemente sobreprocesado, pero se asegura evitar el subproceso.

En el Cuadro III se muestran los valores experimentales de letalidad acumulada promedio obtenidos durante las pruebas de validación, así como los respectivos intervalos de confianza al 95%. Adicionalmente se muestran los valores teóricos de letalidad acumulada promedio calculados a partir del modelo ajustado. Se realizaron dos pruebas, cada una corresponde a tiempos de proceso diferentes. Los datos corresponden a cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 265 mL tratados térmicamente.

Como se mencionó anteriormente y se aprecia en el Cuadro III, en la validación del modelo realizado se obtuvieron valores experimentales menores con respecto al promedio de los valores predichos por el modelo, lo cual podría implicar subproceso. Sin embargo, los valores se encuentran por encima de lo que predice el intervalo de predicción inferior (95% de confianza) mostrado en el cuadro II (ver Figura 1). A modo de ejemplo, es posible observar que, si se desea una letalidad acumulada de 6,09 minutos, utilizando la ecuación del modelo ajustado mostrada en el Cuadro II, se obtiene un tiempo de proceso necesario de 13,71 minutos. Si se utiliza la ecuación del intervalo de predicción inferior el tiempo de proceso necesario es de 14,66 minutos. De esta manera, se obtiene un tiempo de proceso levemente

mayor, resultando así en una letalidad acumulada levemente mayor a la esperada por el procesador al utilizar dicho modelo. Consecuentemente podría presentarse un leve sobreproceso, el cual es preferible al subproceso (aunque podrían darse leves pérdidas de calidad y reducción de eficiencia). Se podría considerar que emplear el intervalo de predicción inferior corresponde a un factor de seguridad, los cuales son ampliamente utilizados por autoridades de proceso o procesadores de alimentos, con la finalidad de evitar que algún proceso se salga de control y se vea afectada la calidad del alimento (Castañeda, 2018).

Cuadro III. Valores de letalidad acumulada promedio experimentales y sus respectivos intervalos de confianza al 95% y valores de letalidad acumulada promedio teóricos calculados a partir del modelo exponencial de tres parámetros ajustado, obtenidos para dos tiempos de proceso térmico de cilindro de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 265 mL.

<b>Tiempo de proceso</b>	<b>Número de repeticiones</b>	<b>Letalidad promedio (min)</b>	<b>IC inferior (95%) (min)</b>	<b>IC superior (95%) (min)</b>
<b>14 min 10 s</b>	Experimental (n=3)	6,09	5,58	6,60
	Calculado (n=4)	6,52		
<b>22 min 10 s</b>	Experimental (n=3)	15,54	14,38	16,70
	Calculado (n=4)	16,34		

Es fundamental recalcar que estos cálculos son realizados con promedios por lo que existe una incertidumbre asociada. Por lo tanto, los valores predichos por los modelos deberían ser utilizados solamente como una guía al diseñarse un tratamiento térmico para un alimento específico y las letalidades deseadas deberán confirmarse experimentalmente con pruebas adicionales de penetración de calor.

Al calcularse los porcentajes de error de los promedios de los valores de letalidad experimentales, comparados con los promedios de los valores calculados por el modelo exponencial, se obtienen valores de  $-6.6\%$  y  $-4.9\%$  para los tiempos de proceso de 14 min 10 s y 22 min 10 s, respectivamente. Las diferencias obtenidas en los valores de letalidad experimentales y los calculados por el modelo exponencial podrían deberse a múltiples factores que inciden en la transferencia de calor en un alimento. Entre ellos destacan la temperatura inicial del producto, masa del producto y del frasco, calor específico y conductividad térmica del producto, geometría del frasco, geometría de las piezas de zanahoria y la influencia de los procesos naturales de convección en la transferencia de calor (Holdsworth & Simpson, 2016). Sin embargo, de dichos factores se procuró mantener constante cada uno de ellos, siendo la geometría de los trozos de zanahoria el factor más difícil de controlar, esto debido a la manipulación manual de las zanahorias al dar la forma adecuada a cada trozo, afectando de forma directa la correcta posición de la termocupla durante cada proceso. La adecuada posición de la termocupla dentro del trozo de zanahoria es vital para obtener datos precisos de penetración de calor, independientemente de la temperatura de proceso. De esta manera, pequeñas variaciones en la posición de la termocupla pueden afectar significativamente la magnitud de la letalidad acumulada de un proceso (Acosta *et al.*, 2015). Lo anterior se refleja en la variabilidad de los datos mostrados en la Figura 1 y el Cuadro III.

Relacionado con los datos mostrados en la Figura 1, la Figura 2 muestra la misma relación descrita (letalidad acumulada en función del tiempo del proceso), para cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 458 mL, procesados térmicamente. Como se aprecia, el comportamiento de los datos es similar al reportado en la Figura 1, en la que se muestran los datos para cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 265 mL.

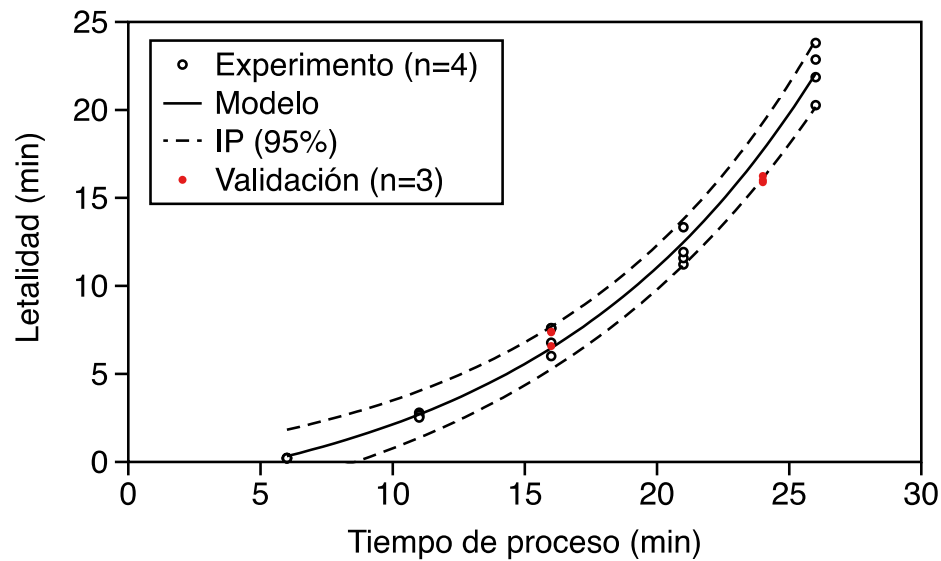


Figura 2. Variación de la letalidad acumulada en función del tiempo de proceso, para cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 458 mL tratados térmicamente.

Las ecuaciones que se muestran en el Cuadro IV corresponden al modelo ajustado que se muestra en la Figura 2 y son comparables con los resultados mostrados en el Cuadro II.

Cuadro IV. Ecuación del ajuste del modelo exponencial de tres parámetros representado en la Figura 2 y el intervalo de predicción inferior (IP) al 95% de confianza, así como la correspondiente ecuación inversa y su IP inferior, para cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 458 mL tratados térmicamente.

	<b>Ecuación</b>	<b>Ecuación inversa</b>
<b>Modelo ajustado</b>	$F = -3,67 + 2,29 \cdot \exp(0,0931 \cdot t)$	$t = \frac{\ln((F + 3,67) / 2,29)}{0,0931}$
<b>IP inferior (95%)</b>	$F = -6,15 + 3,00 \cdot \exp(0,0835 \cdot t)$	$t = \frac{\ln((F + 6,15) / 3,00)}{0,0835}$

La ecuación del modelo ajustado obtenida para cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 458 mL tratados térmicamente predice valores de letalidad en un caso mayores y en otro caso menores a los obtenidos experimentalmente durante la validación (ver Figura 2). Como se ha discutido previamente, al utilizar la ecuación obtenida del intervalo de predicción inferior al 95% de confianza, se predicen tiempos de proceso más largos, es decir, asociados a una letalidad mayor, por lo que su uso es más conservador.

En el Cuadro V se muestran los valores experimentales y calculados (obtenidos a partir del modelo ajustado) correspondientes a la prueba de validación, empleando cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 265 mL tratados térmicamente. Los resultados son comparables con los mostrados en el Cuadro III.

Cuadro V. Valores de letalidad acumulada promedio experimentales y sus respectivos intervalos de confianza al 95% y valores de letalidad acumulada promedio teóricos calculados a partir del modelo exponencial de tres parámetros ajustado, obtenidos para dos tiempo de proceso térmico de cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 458 mL.

<b>Tiempo de proceso</b>	<b>Número de repeticiones</b>	<b>Letalidad promedio (min)</b>	<b>IC inferior (95%) (min)</b>	<b>IC superior (95%) (min)</b>
<b>16 min</b>	Experimental (n=3)	7,12	5,96	8,27
	Calculado (n=4)	6,47		
<b>24 min</b>	Experimental (n=3)	16,05	15,59	16,51
	Calculado (n=4)	17,70		

Como se aprecia en el Cuadro V, en la validación del modelo realizado se obtuvieron valores experimentales menores y mayores con respecto al promedio de los valores predichos por el modelo, lo cual podría implicar subproceso o sobreproceso. Sin embargo, los valores se encuentran –en su mayoría– por encima de lo que predice el intervalo de predicción inferior (95% de confianza) mostrado en el cuadro V (ver Figura 2). Como ha sido discutido, se podría considerar que emplear el intervalo de predicción inferior corresponde a un factor de seguridad, obteniéndose resultados más conservadores. Sin embargo, los valores predichos por los modelos deberían ser utilizados como una guía y deberán realizarse pruebas adicionales de penetración de calor confirmatorias.

Al calcularse los porcentajes de error de los promedios de los valores de letalidad experimentales, comparados con los promedios de los valores calculados por el modelo exponencial, se obtienen valores de  $-9.9\%$  y  $9.3\%$  para los tiempos de proceso de 16 min y 24 min, respectivamente.

El comportamiento exponencial, evidente en ambos experimentos (Figuras 1 y 2), ocurre debido a que, durante un proceso térmico, existe un diferencial de temperatura entre el exterior del alimento y el punto frío del mismo (donde se realizan las mediciones de temperatura). Este comportamiento se refleja en los valores iniciales de letalidad obtenidos, ya que al inicio del proceso no se alcanzan temperaturas suficientemente altas para lograr un cambio apreciable en la letalidad del proceso. A medida que el proceso térmico avanza, la penetración de calor es más efectiva ya que los tejidos del vegetal tienden a ablandarse y absorber cierta parte del líquido de gobierno que facilita la penetración del calor hasta el punto frío del alimento (Castañeda, 2018), generando diferencias entre los resultados obtenidos para ambos tamaños de envase utilizados en el presente proyecto (Cuadro VI).

Dichas diferencias se dan principalmente por el tamaño de los trozos empleados en cada tamaño de envase, lo que genera que la curva que representa el tratamiento térmico realizado a los envases de mayor tamaño tenga valores de letalidad menores en un inicio. Sin embargo, durante el enfriamiento posterior a un proceso térmico, el comportamiento es inverso debido a que los envases de mayor tamaño tienden a ceder el calor de forma más lenta en comparación a los envases pequeños, de tal manera que la letalidad que acumulan

las zanahorias en envase grande es mayor, posterior al proceso térmico (Breidt *et al.*, 2014). En adición, otros factores que podrían afectar la transferencia de calor se mantuvieron constantes en la medida de lo posible, como el líquido de gobierno, la temperatura inicial del líquido de gobierno y la temperatura inicial del agua en la marmita. .

Cuadro VI. Valores promedio y desviaciones estándar (n=4) de los tres parámetros obtenidos del modelo exponencial ajustado a partir de los datos del proceso térmico de cilindros de zanahoria en vinagre diluido envasados en frascos de 265 y 458 mL.

Parámetro	Frasco de 265 mL		Frasco de 458 mL		Probabilidad
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	
<b>Asíntota</b>	-9,9	5,2	-3,7	0,8	0,0587
<b>Escarar</b>	7,4	4,5	2,3	0,5	0,0668
<b>Tasa de crecimiento</b>	0,06	0,02	0,093	0,005	0.0145*

\*Existen diferencias significativas.

En el cuadro VI se observa que no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) al comparar las medias del parámetro de la asíntota obtenidas de datos a partir de experimentos con tamaños de frascos diferentes. Esto quiere decir que, en términos generales la letalidad en los primeros minutos de proceso no se ve afectada por el tamaño del frasco. Lo anterior podría ocurrir debido a que durante los primeros minutos de proceso las temperaturas registradas en el punto frío son bajas (menores a 75 °C en la mayoría de los casos), generando un aporte mínimo a la letalidad del proceso y evitando que factores como el tamaño de los trozos de zanahoria y la cantidad de salmuera influyan en el resultado obtenido.

El escalar está relacionado con la cantidad de letalidad que acumula el alimento durante todo el proceso térmico afectando de forma indirecta la velocidad transferencia de calor. Sin embargo, durante este experimento no se obtuvieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) lo cual quiere decir que la diferencia de tamaño entre los envases 265 mL y 478 mL no es lo suficientemente amplia para obtener diferencias con respecto a ese parámetro. Por

otro lado, el valor reportado en el cuadro VI es muy cercano a 0,05 lo cual indica que con una diferencia levemente mayor entre los tamaños de los trozos utilizados para ambos envases es probable hallar diferencias significativas en este parámetro.

Por otro lado, la tasa de crecimiento sí presenta diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) al compararse los resultados obtenidos de experimentos con tamaños de frascos diferentes. Lo anterior ocurre debido a que el calor recibido por el alimento durante el tratamiento térmico penetra de forma paulatina desde el exterior del alimento hasta el centro geométrico (el punto frío del alimento). Por lo tanto, en este caso en específico, al aumentar el tamaño de los frascos mayor va a ser el tiempo en que se dure en aumentar la temperatura en el centro del alimento y menor va ser la letalidad registrada (Gaviria & Mazuera. 2010). Es por esta razón que la gráfica que representa a los envases de menor tamaño tiene un crecimiento más acelerado provocando la diferencia en el parámetro “C” del ajuste exponencial de tres parámetros.

Finalmente, es fundamental aclarar que el uso de los intervalos de predicción inferiores para cada tamaño de envase no puede ser sustituido por un factor de seguridad constante de tiempo introducido en las ecuaciones experimentales obtenidas. Un ejemplo de lo anterior sería agregar un factor de seguridad de 1 minuto al utilizar la ecuación promedio para el frasco de 265 mL, mostrada en el Cuadro II. Ya que, si se desea una letalidad de 5 minutos, podría no ser suficiente para asegurar la estabilidad microbiológica del alimento, mientras que agregar el mismo minuto a un frasco cuya letalidad objetivo es de 20 minutos, podría generar un sobreproceso en dicho frasco. Esto debido a que agregar 1 minuto más a tiempos cortos de proceso en un tratamiento térmico, tendrá un impacto menor en comparación a agregar 1 minuto de tratamiento térmico a un frasco que ha estado sometido al proceso por un largo periodo. Lo anterior es generado por las diferencias de temperaturas en tiempos cortos de proceso y tiempos largos de proceso y el aporte de las mismas a la letalidad acumulada. De esta forma se explica también el comportamiento exponencial durante un proceso térmico (Morris *et al.*, 2007).

## **5.2 Desarrollo de modelo para predecir el pH a partir del tiempo de acidificación para zanahorias tratadas térmicamente**

La Figura 3 muestra los valores experimentales de pH obtenidos al variar el tiempo de acidificación, según las tres concentraciones de vinagre evaluadas, para los cilindros de zanahoria envasados en frascos de 265 mL. Además de los valores experimentales, se muestra la curva de mejor ajuste, según un modelo exponencial de tres parámetros, acompañada de las curvas que representan el intervalo de predicción (IP) al 95% de confianza. Adicionalmente se muestran los valores experimentales obtenidos para la validación del modelo. El modelo utilizado fue seleccionado a partir de un grupo de modelos no lineales, ajustando los datos experimentales a cada modelo y empleando un análisis de residuales, de la raíz del cuadrado medio del error y del criterio de información de Akaike ajustado (AICc).

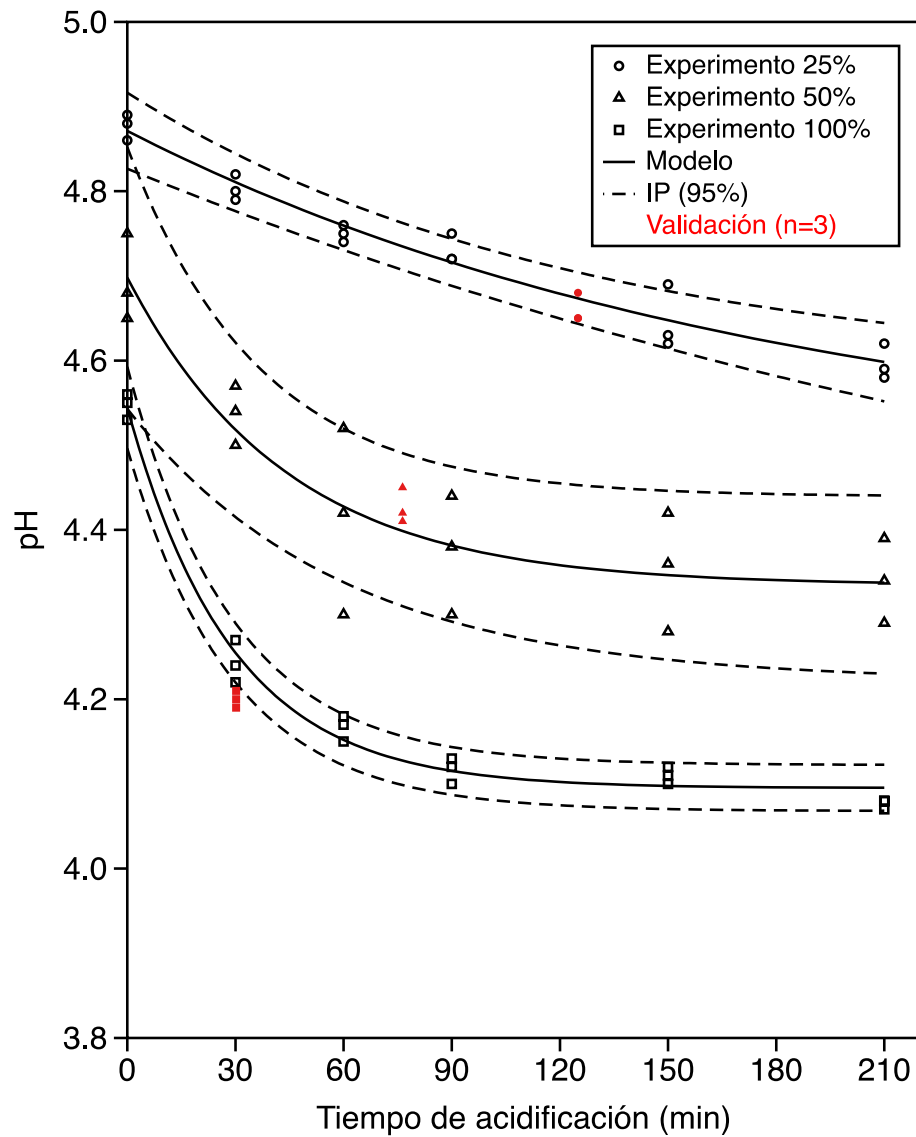


Figura 3. Variación del pH en función del tiempo de acidificación, para cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones envasados en frascos de 265 mL tratados térmicamente.

La ecuación correspondiente al modelo ajustado (pH en función del tiempo de acidificación), obtenido a partir de los datos de las 3 réplicas realizadas, se muestra en el Cuadro VII. También se muestra la ecuación inversa, la cual se utiliza para el cálculo de

tiempos de acidificación a partir de un pH deseado. Adicionalmente se muestra, para ambos casos, la ecuación del intervalo de predicción superior al 95% de confianza.

Cuadro VII. Ecuación del ajuste del modelo exponencial de tres parámetros representado en la Figura 3 y el intervalo de predicción superior (IP) al 95% de confianza, así como la correspondiente ecuación inversa y su IP superior, para cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones envasados en frascos de 265 mL tratados térmicamente.

	<b>Concentración de vinagre</b>	<b>Ecuación</b>	<b>Ecuación inversa</b>
<b>Modelo ajustado</b>	25%	$\text{pH} = 4,47 + 0,4 \cdot \exp(-0,0055 \cdot t)$	$t = \frac{\ln((\text{pH} - 4,47) / 0,4)}{-0,0055}$
<b>IP superior (95%)</b>		$\text{pH} = 4,58 + 0,33 \cdot \exp(-0,0082 \cdot t)$	$t = \frac{\ln((\text{pH} - 4,58) / 0,33)}{-0,0082}$
<b>Modelo ajustado</b>	50%	$\text{pH} = 4,33 + 0,36 \cdot \exp(-0,023 \cdot t)$	$t = \frac{\ln((\text{pH} - 4,33) / 0,36)}{-0,023}$
<b>IP superior (95%)</b>		$\text{pH} = 4,44 + 0,41 \cdot \exp(-0,027 \cdot t)$	$t = \frac{\ln((\text{pH} - 4,44) / 0,41)}{-0,027}$
<b>Modelo ajustado</b>	100%	$\text{pH} = 4,1 + 0,45 \cdot \exp(-0,034 \cdot t)$	$t = \frac{\ln((\text{pH} - 4,41) / 0,45)}{-0,034}$
<b>IP superior (95%)</b>		$\text{pH} = 4,12 + 0,74 \cdot \exp(-0,034 \cdot t)$	$t = \frac{\ln((\text{pH} - 4,12) / 0,74)}{-0,034}$

En la Figura 3 es posible observar que existen diferencias en la tasa de acidificación para cada una de las concentraciones de vinagre utilizadas. La curva de vinagre diluido a un 25 % presenta los valores de pH mayores, esto es debido a que la acidificación ocurre por medio de una transferencia de masa, de la solución ácida al alimento, en este caso específico zanahoria. La transferencia de masa se acelera conforme el diferencial de pH entre la solución ácida y el alimento es mayor (Derrosi *et al.*, 2011), por lo que era esperado que el vinagre diluido a un 25 % tuviera un menor efecto en la acidificación de las zanahorias.

Por otro lado, los vinagres diluidos a un 50 % y 100 % lograron reducir más el pH en un mismo tiempo que el vinagre diluido en un 25 %, siendo la concentración de 100 %

vinagre la que logró valores de pH menores. Lo anterior se explica igualmente por el diferencial de pH que existe entre las zanahorias y el vinagre durante el proceso.

Para las tres curvas se muestra que al llegar a los 210 minutos la acidificación disminuye en forma considerable, por lo tanto, es necesaria una mayor concentración del vinagre o modificar factores como la temperatura de llenado de la solución ácida y la agitación durante el proceso para lograr una mayor acidificación (Rao *et al.*, 2014), esto si no se quiere cambiar las dimensiones del producto, ya que otra forma de mejorar la tasa de acidificación del alimento sería una menor masa de zanahoria en la misma cantidad de solución ácida empleada durante los experimentos.

A diferencia de las ecuaciones obtenidas durante los estudios de penetración de calor, en las curvas de acidificación se utiliza el intervalo de predicción mayor, esto debido a que se utiliza como un factor de seguridad para el procesador ya que el valor de pH obtenido de dicha ecuación será mayor al dado por la ecuación promedio.

En el Cuadro VIII se muestran los valores experimentales de pH promedio obtenidos durante las pruebas de validación, así como los respectivos intervalos de confianza al 95%. Adicionalmente se muestran los valores de pH promedio calculados a partir del modelo ajustado. Los datos corresponden a cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones, envasados en frascos de 265 mL tratados térmicamente.

Se realizó la verificación de cada uno de los modelos obtenidos para cada concentración de vinagre analizada (Cuadro VII). En los tres casos, algunos de los valores experimentales resultantes son mayores o menores al promedio de los valores predichos por el modelo. Utilizando la ecuación del modelo ajustado para 25 % de concentración de vinagre, si se desea un pH de 4,66 es necesario acidificar 135,35 minutos y utilizando la ecuación del intervalo de predicción superior la ecuación indica que se debe acidificar durante 172,81 minutos. Para ambos casos, la verificación (125,0 minutos) resulta en un tiempo menor, por lo tanto, indica que sería seguro utilizar cualquiera de las dos ecuaciones en forma de guía para los procesadores.

Cuadro VIII. Valores de pH promedio experimentales y sus respectivos intervalos de confianza al 95% y valores de pH promedio calculados a partir del modelo exponencial de tres parámetros ajustado, obtenidos para cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones en frascos de 265 mL tratados térmicamente.

<b>Tiempo de proceso</b>	<b>Número de repetición</b>	<b>pH promedio</b>	<b>IC inferior (95%)</b>	<b>IC superior (95%)</b>
<b>Concentración: 25 %</b>	Experimental (n=3)	4,66	4,62	4,70
	Calculado (n=3)	4,67		
<b>125 min</b>				
<b>Concentración: 50 %</b>	Experimental (n=3)	4,43	4,38	4,44
	Calculado (n=3)	4,39		
<b>76 min 33 s</b>				
<b>Concentración: 100 %</b>	Experimental (n=3)	4,20	4,18	4,22
	Calculado (n=3)	4,26		
<b>30 min 17 s</b>				

Para la concentración de 50 % de vinagre, si se desea obtener un valor de pH de 4,43, la ecuación inversa del modelo ajustado predice un valor de 55,7 minutos, el cual es un tiempo menor al valor de la verificación (76,33 minutos). Por otro lado, al emplear la ecuación inversa del intervalo de predicción superior, no es posible realizar el cálculo debido a que la desviación de los datos obtenidos experimentalmente es más grande que en las otras dos concentraciones, generando así una asíntota en la línea del intervalo de predicción que nunca baja a valores de pH menores de 4,44, por lo que no es confiable realizar una predicción con dicha ecuación. Lo anterior podría deberse a algún error durante la realización del experimento por lo cual resultaría recomendable repetir los experimentos para obtener una menor desviación de los datos experimentales que permitan reducir el intervalo de predicción.

Por último, en la concentración de 100 % de vinagre, si se desea un pH de 4,2, mediante la ecuación inversa del modelo ajustado se obtiene un valor de 44,24 minutos y utilizando la ecuación del intervalo de predicción superior es de 65,43 minutos, para ambos casos se obtiene un valor superior a 30,17 minutos, el cual fue el valor obtenido durante la verificación. De esta manera, se podría utilizar ambas ecuaciones para realizar la predicción, sin embargo, al utilizar la ecuación del modelo ajustado se podría disminuir costos por un menor tiempo de acidificación.

Se debe considerar que, como fue mencionado en el apartado sobre los modelos para predecir tiempos de proceso a partir de letalidad acumulada deseada, los tiempos de acidificación predichos por los modelos deberían ser utilizados como una guía y deberán realizarse pruebas adicionales de acidificación confirmatorias.

Se calculó el porcentaje de error de los promedios de los valores de pH experimentales, comparados con los promedios de los valores calculados promedio del modelo exponencial. Esos valores de error son: 0,21 %, -0,91 % y 1,41 % para las concentraciones de vinagre de 25 %, 50 % y 100 % respectivamente. Las diferencias obtenidas en los valores de pH experimentales y calculados podrían deberse a múltiples factores que inciden en la acidificación de un alimento. Entre ellos destacan: el tamaño de los trozos, la temperatura y humedad del alimento y la agitación de los envases durante el proceso.

Al igual que, a los datos mostrados en la Figura 3, la Figura 4 muestra la misma relación descrita (pH en función del tiempo de acidificación), para cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones, envasados en frascos de 458 mL, procesados térmicamente. Se obtiene de esta forma un comportamiento de los datos similar al reportado en la Figura 3, en la que se muestran los datos para cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones de vinagre, envasados en frascos de 265 mL.

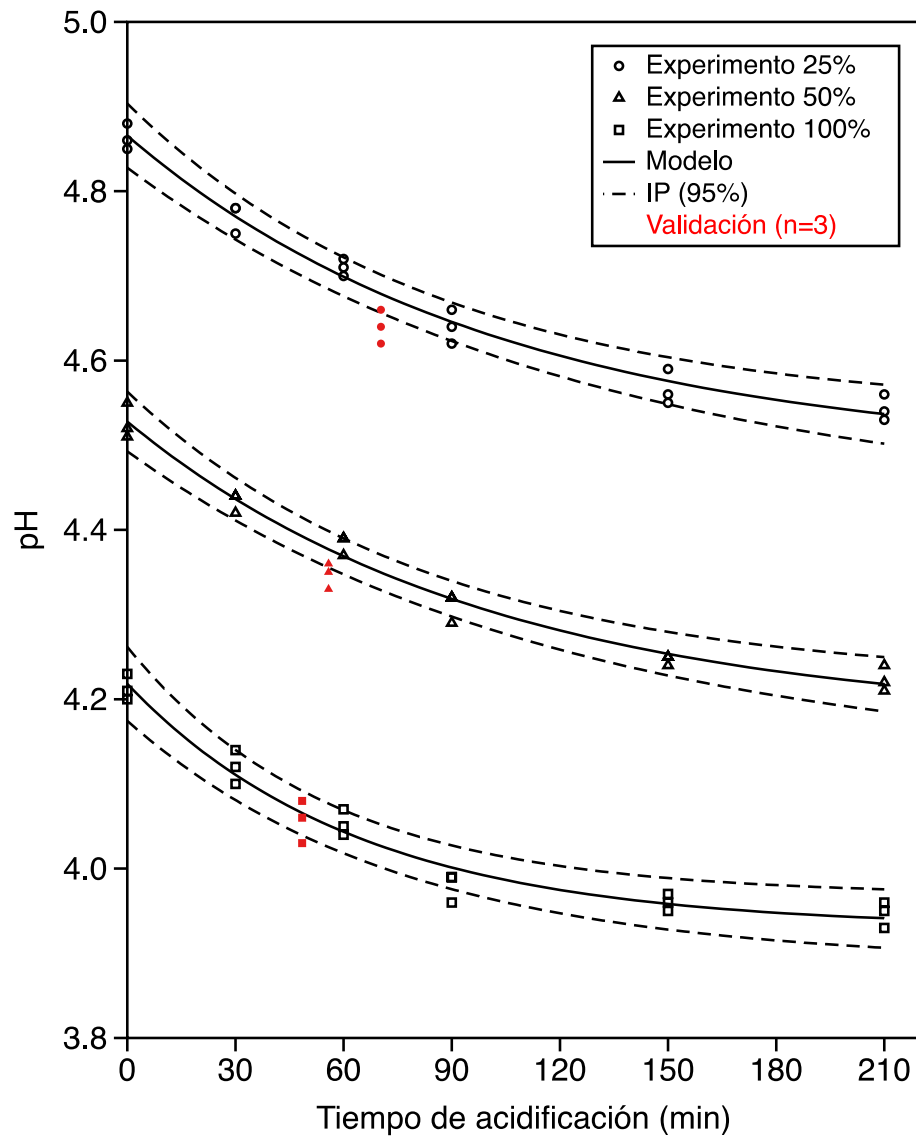


Figura 4. Variación del pH en función del tiempo de acidificación, para cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones envasados en frascos de 458 mL tratados térmicamente.

Las ecuaciones que se muestran en el Cuadro IX corresponden al modelo ajustado que se muestra en la Figura 4 y son comparables con los resultados mostrados en el Cuadro VII.

Cuadro IX. Ecuación del ajuste del modelo exponencial de tres parámetros representado en la Figura 4 y el intervalo de predicción superior (IP) al 95% de confianza, así como la correspondiente ecuación inversa y su IP superior, para cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones envasados en frascos de 458 mL tratados térmicamente.

	<b>Concentración de vinagre</b>	<b>Ecuación</b>	<b>Ecuación inversa</b>
<b>Modelo ajustado</b>	25%	$\text{pH} = 4,49 + 0,38 \cdot \exp(-0,0097 \cdot t)$	$t = \frac{\ln((\text{pH} - 4,49) / 0,38)}{-0,0097}$
<b>IP superior (95%)</b>		$\text{pH} = 4,54 + 0,36 \cdot \exp(-0,011 \cdot t)$	$t = \frac{\ln((\text{pH} - 4,54) / 0,36)}{-0,011}$
<b>Modelo ajustado</b>	50%	$\text{pH} = 4,17 + 0,35 \cdot \exp(-0,01 \cdot t)$	$t = \frac{\ln((\text{pH} - 4,17) / 0,35)}{-0,01}$
<b>IP superior (95%)</b>		$\text{pH} = 4,22 + 0,34 \cdot \exp(-0,012 \cdot t)$	$t = \frac{\ln((\text{pH} - 4,22) / 0,34)}{-0,012}$
<b>Modelo ajustado</b>	100%	$\text{pH} = 3,93 + 0,29 \cdot \exp(-0,016 \cdot t)$	$t = \frac{\ln((\text{pH} - 3,93) / 0,29)}{-0,016}$
<b>IP superior (95%)</b>		$\text{pH} = 3,97 + 0,29 \cdot \exp(-0,018 \cdot t)$	$t = \frac{\ln((\text{pH} - 3,97) / 0,29)}{-0,018}$

En la Figura 4 es posible observar el mismo fenómeno en la tasa de acidificación que el obtenido en los datos de envases de 265 mL. Esto debido a que como se mencionó anteriormente, existe un mayor diferencial de pH entre el vinagre y la zanahoria en la curva de 100% vinagre, por lo que se logran valores de pH menores en un mismo tiempo de proceso comparado con las ecuaciones de vinagre al 50 y 25 %.

Es importante rescatar que, si se compara la velocidad de acidificación entre los envases de 256 mL y los envases 458 mL, estos últimos tienden a acidificar con mayor rapidez, esto ocurre debido a que, aunque la masa de las zanahorias es mayor en el frasco grande, la proporción de vinagre – zanahoria en los frascos era mayor en los grandes que en los pequeños, lo cual genera un aumento en la tasa de acidificación (Knechtges, 2012). Lo anterior se respalda con los datos reportados en el cuadro X.

Cuadro X. Proporción de vinagre – zanahoria en envases de 265 mL y 458 mL con cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones tratados térmicamente.

<b>Frasco grande</b>		<b>Proporción Vinagre- Zanahoria (%)</b>	<b>Frasco pequeño</b>		<b>Proporción Vinagre- Zanahoria (%)</b>
Zanahoria (g)	Vinagre (g)		Zanahoria (g)	Vinagre (g)	
225	160	41,56-58,44	140	65	31,71-68,29

Como se observa en el Cuadro X, en el caso del frasco grande existe cerca de un 10% más de vinagre con respecto a la zanahoria en comparación al frasco pequeño, permitiendo así una mayor tasa de acidificación en el frasco grande, ya que este es un factor fundamental que afecta dicha velocidad.

En el Cuadro XI se muestran los valores experimentales de pH promedio obtenidos durante las pruebas de validación, así como los respectivos intervalos de confianza al 95%. Adicionalmente se muestran los valores calculados de pH promedio calculados a partir del modelo ajustado, donde se obtiene que los porcentajes de error de los promedios de los valores de pH experimentales, comparados con los promedios de los valores calculados son 0,86 %, 0,46 %, 0,24 % para las concentraciones de vinagre de 25 %, 50 % y 100 % respectivamente.

Cuadro XI. Valores de pH promedio experimentales y sus respectivos intervalos de confianza al 95% y valores de pH promedio teóricos calculados a partir del modelo exponencial de tres parámetros ajustado, obtenidos para cilindros de zanahoria en vinagre diluido a tres concentraciones envasados en frascos de 458 mL tratados térmicamente.

<b>Tiempo de proceso</b>	<b>Número de repetición</b>	<b>pH promedio</b>	<b>IC inferior (95%)</b>	<b>IC superior (95%)</b>
<b>Concentración: 25 %</b>	Experimental (n=3)	4,64	4,59	4,69
	Calculado (n=3)	4,68		
<b>70 min 33 s</b>				
<b>Concentración: 50 %</b>	Experimental (n=3)	4,35	4,31	4,39
	Calculado (n=3)	4,37		
<b>55 min 83 s</b>				
<b>Concentración: 100 %</b>	Experimental (n=3)	4,06	4,00	4,12
	Calculado (n=3)	4,07		
<b>48 min 5 s</b>				

Por lo tanto, si se desea en el alimento un pH de 4,64 (concentración de vinagre de 25 %), al realizar las predicciones con el modelo ajustado, se obtiene un valor de 95,83 minutos y a la misma concentración con la ecuación inversa del intervalo de predicción superior es de 116,45 minutos. De igual manera, para la concentración de vinagre de 50% si se desea un pH de 4,35, con la ecuación inversa del modelo ajustado se predice un valor de 66,50 minutos y con la ecuación del intervalo de predicción 80,12 minutos y si se quiere obtener un pH de 4,06 en la concentración de 100 % con la ecuación inversa del modelo ajustado se predice un tiempo de 50,15 minutos y con la ecuación inversa del intervalo de predicción 65,0 minutos. Para las tres concentraciones, ambas ecuaciones predicen tiempos de acidificación mayores a los obtenidos en la verificación. Esto indica que se lograría un pH inferior al deseado lo cual es un factor de seguridad; sin embargo, el alimento podría cambiar de manera importante

sus características sensoriales, por lo que es indispensable utilizar los modelos simplemente como guías para los procesadores y no utilizarlas como valores reales de procesamiento.

## 6 Conclusiones

Producto de los análisis realizados y los comportamientos observados, se determinan las siguientes conclusiones aplicables únicamente bajo las condiciones evaluadas durante la presente investigación.

- El modelo ajustado para obtener la letalidad del proceso térmico realizado a las zanahorias en vinagre para ambos tamaños de envase (265 y 458 mL) predice valores de letalidad mayores a los obtenidos experimentalmente durante la validación del modelo, por lo que dichos valores producirían un subprocesamiento del alimento, no asegurando así la calidad del mismo.
- Las ecuaciones obtenidas del intervalo de predicción inferior predicen para ambos tamaños de envase (265 y 458 mL) valores de letalidad más cercanos a los obtenidos experimentalmente para la prueba de validación.
- No existieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los parámetros asíntota y escalar del modelo ajustado para las curvas de letalidad acumulada, entre los dos tamaños de envase analizados (265 y 458 mL).
- Existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en el parámetro de tasa de crecimiento del modelo ajustado para las curvas de penetración de calor entre los dos tamaños de envase analizados (265 y 458 mL).
- El uso de los intervalos de predicción no puede ser sustituido por un factor de seguridad constante de tiempo introducido en las ecuaciones experimentales obtenidas.

- En la mayoría de las ecuaciones del modelo ajustado y las del intervalo de predicción superior se predicen valores de pH mayores a los obtenidos experimentalmente para la validación de dichos modelos.
- La proporción mayor de vinagre respecto a la zanahoria en los envases de 478 mL produjo una velocidad de acidificación mayor respecto a la acidificación de los envases de 265 mL. Al aumentar la concentración de vinagre, los valores de pH en el alimento disminuyen, y las tasas de acidificación aumentan.
- Los modelos matemáticos son importantes para tener aproximaciones válidas de valores que permitan controlar un proceso, sin embargo, se deben realizar pruebas específicas en cada condición industrial para tener un mejor control de la calidad del alimento

## 7 Recomendaciones

Considerando los hallazgos de la presente investigación se recomienda utilizar los modelos matemáticos como una guía para generar, mediante experimentos propios, los valores límites que permitan controlar la calidad del alimento, ya sea el pH, la letalidad o cualquier otro parámetro ajustable a un modelo que influya en la calidad del alimento procesado.

Para futuros proyectos que puedan generar conocimiento sobre el aseguramiento de la calidad en alimentos acidificados procesados térmicamente, se realizan las siguientes recomendaciones:

- Realizar estudios similares con diferentes vegetales de forma que se tenga información sobre la tasa de acidificación y penetración de calor en dichos alimentos.
- Evaluar el efecto de otro tipo de acidulante como el ácido cítrico con el fin de conocer cual acidulante es más eficiente.
- Modificar otro tipo de factores que afectan la transferencia de calor y la acidificación, como la temperatura de llenado o la masa del producto, de manera que se evalúe cual factor tiene un mayor efecto sobre los fenómenos estudiados.

## 8 Bibliografía

- Acosta, O; Vermeulen, F; Noel, C; Padilla-Zakour, O. 2015. Modeling the effects of process conditions on the accumulated lethality values of thermally processed pickled carrots. *Food Control*. 51: 390-396.
- Arias, L. 2016. Efectos de los Tratamientos Térmicos Sobre las Propiedades Nutricionales de las Frutas y las Verduras. Tesis de Licenciatura Educación. México.
- Baker, C. 2009. Red Book: Atlas de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. Argentina, Médica Panamericana. P. 51-52.
- Bakhiya, N.; Monien, B.; Frank, H.; Seidel, A.; Glatt, G. 2009. Renal Organic Anion Transporters OAT1 and OAT3 Mediate the Cellular Accumulation of 5-sulfooxymethylfurfural, a Reactive, Nephrotoxic Metabolite. Antioquia, Colombia. Universidad de Antioquia. P. 24-26.
- AOAC International (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis. 18 ed. Methods 942.15. Association of Official Analytical Chemist. Maryland.
- Badui, S. 2006. Química de los Alimentos. 4ta ed. Pearson
- of the Maillard product 5-hydroxymethylfurfural. *Biochem. Pharmacol.* 78: 414-419.
- Black, G & Barach, J (*eds.*). 2018. Alimentos Enlatados: Principios de control del proceso térmico, acidificación y evaluación del cierre de los envases. Science and Education Foundation. P. 27-28.
- Belitz, H; Grosch, W & Schieberle, P. 2009. Food Chemistry. Springer-Verlag, Berlin.
- Berg, J; Tymoczko, J & Stryer, L. Bioquímica. 6ta ed, Reverté. Barcelona.
- Boekel, M. 2008. Kinetic Modeling of Food Quality: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 7: 144-158.
- Breidt, F; Sandeep, K & Arritt, F. 2010. Use of Linear Models for Thermal Processing of Acidified Foods. *Food Protection Trends*. 30: 268-272.
- Breidt, F; Kay, K; Osborne, J; Ingham, B & Arritt, F. 2014. Thermal Processing of Acidified Foods with pH 4.1 to pH 4.6. *Food Protection Trends*. 34: 132-138.
- Castañeda, D. 2018. Tratamiento Térmico de Espárragos. Tesis de Licenciatura, Lima, Perú. Universidad Agraria La Molina. P. 2-5.
- Ciro, H; González, C & García, E. 2009. Modelación Numérica de Procesos de Esterilización Térmica de Alimentos Usando Volúmenes de Control: Aproximación Cilíndrica. *Dyna*. Universidad Nacional de Colombia. 76: 115-124

- Derossi, A; Fiore, A; Pilli, T & Severini, C. 2011. A Review on Acidifying Treatments for Vegetable Canned Food. *Food Science and Nutrition*. 51: 955-964.
- FDA 2019. CFR. Code of federal regulations title 21. (en línea, Sitio web). Consultado 25 Jul.2019. Disponible en <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=114&showFR=1>
- Fernández, A; López, M; Bernardo, A; Cordón, S & Raso, J. 2006. Modelling Thermal Inactivation of *Listeria monocytogenes* in Sucrose Solutions of Various Water Activities. *Food Microbiology*. 24: 372-379.
- Gaviria, B & Mazuera, P. 2010. Evaluación del Tratamiento Térmico de las Arvejas Enlatadas en Salmuera. *Revista Especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales*. UNAD. 4: 129-138.
- Glatt, H. R.; Sommer, Y. 2006. Health Risks by 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and Related Compounds. In *Acrylamide and Other Health Hazardous Compounds in Heat-Treated Foods*. Woodhead Publishing: Cambridge. P. 328-357.
- Gómez, O, 2004. Dependencia de la Temperatura de los Cambios en Atributos Sensoriales, Degradación del Ácido Ascórbico e Inactivación Enzimática Durante el Tratamiento de Pasteurización en Puré y Néctar de Tamarindo. Consultado el 22 Feb 2020. Disponible en <https://oatd.org/oatd/record?record=oai%5C%3Aciria.udlap.mx%5C%3Au-dl-a%5C%2Ftesis%5C>.
- Harris, D. 2007. *Análisis Químico Cuantitativo*. 3 ed. Reverté. P. 158-159.
- Holdsworth & Simpson, 2016. *Thermal Processing of Packaged Foods*. 3 ed. Springer. P. 17-18.
- Huertas, J. 2008. Efecto de Tratamientos Térmicos en Combinación con los Aceites Esenciales de Clavo y Tomillo sobre la Supervivencia de *Listeria monocytogenes* Evaluada In Vitro y en Sopa Comercial. Tesis de Licenciatura. Cartagena, España. Pontificia Universidad Javeriana.
- Hui, Y. 2006. *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering*, CRC. Press.
- Hui, Y. 2015. *Plant Sanitation for Food Processing and Food Service*. 2 ed. CRC Press. P. 921-922.
- Jiménez, V. 2016. Evaluación de Hidroximetilfurfural en Diferentes marcas de miel de Abeja, Comercializadas en Guayaquil. Tesis de Licenciatura, Guayaquil, Ecuador, Universidad de Guayaquil. P. 13-14.

- Kalafatis, A; Wang, L & Cluett, W. 2005. Identification of Time- Varying pH Processes Using Sinusoidal Signals. *Automatica*. 41: 685-691.
- Knechtges, P. 2012. *Food Safety: Theory and Practice*. Estados Unidos, Jones & Bartlett Learning. P. 248-249.
- Kong, J & Park, K. 2001. Antimicrobial Activity of *Quercus mongolica* leaf Ethanol Extract and Organic Acids against food-borne microorganisms. *Korean Journalist Food Science Technol.* 33, 178-183.
- Llosa, F. 2017. Estudios de Tratamientos Térmicos en Conservas de Alimentos de Baja Acidez Utilizando Monitoreadores Inalámbricos de Temperatura. Tesis de Licenciatura, Lima, Peru. Universidad Nacional la Agraria. P. 4-10.
- Lozano, J. 2006. *Fruit Manufacturing: Scientific Basis, Engineering Properties, and Deteriorative Reactions of Technological Importance*. New York: Springer. p. 31-33.
- Lucke, F. 2003. The Control of pH. In *Zeuthen, p; Bogh, L. (eds.)*. Boca Raton. CRC Press. p. 109-125.
- Mani-López, J; García, H & López-Malo, A. 2011. Organic Acids as Antimicrobials to Control of *Salmonella* in Meat and Poultry Products. *Food Research International*. 45. 713-721.
- Olivera, D & Salvadori, V. 2012. Kinetic Modeling of Quality Changes of Chilled Ready to Serve Lasagna. *Journal of Food Engineering*. 110: 487-492.
- Palop, A. 2007. Cuaderno de Prácticas de Ingeniería de la Esterilización Asepsia e Higiene. Universidad Politécnica de Cartagena. Cartagena, España.
- Pflug, I. J. 2003. *Microbiology and engineering of sterilization processes*. 11th ed. Minneapolis: Environmental Sterilization Laboratory
- Peleg, M. 2006. Time to Revise Thermal Processing Theories. *Food Technol.* 60: 92-93.
- Pérez, J; Rodríguez, V & Toledano, M. 2004. Evaluación de Tratamientos Térmicos en la Fabricación de Conservas Vegetales. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Córdoba.
- Picado, M. 2017. Evaluación de la Aplicación de Medios Hipobáricos sobre la Eficiencia y Eficacia de la Acidificación de Alimentos Modelo. Tesis de Licenciatura. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. P. 25-36.
- Rao, M; Rizvi, S. Datta, A & Ahmed, J. 2014. *Engineering Properties of Foods*. 4ta ed. CRC Press, Boca Raton.
- Rodríguez, A. 2011. Diseño de Lineamientos de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), Procedimientos Estandarizados de Operación (SOP) y Procedimientos

- Estandarizados de Operación para Limpieza y Desinfección (SSOP) y Validación de la Eficacia del Tratamiento Térmico Aplicado en las Líneas de Cebolla Troceada y Cebolla con Chile Troceados de la Empresa Productos KyC S.A. Tesis de Licenciatura. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. P. 27-29.
- Roque-Malherbe, R. 2007. Adsorption and Diffusion in Nanoporous Materials. CRC Press, Boca Raton.
- Saavedra, J; Córdoba, A; Gálvez, L; Quezada, C & Navarro, R. 2013. Principal Component Analysis as an Exploration Tool for Kinetic Modeling of Food Quality: A Case Study of a Dried Apple Cluster Snack. *Journal of Food Engineering*, 119: 229-235.
- Sancho, M. 2013. Herramientas y Modelos de la Termodinámica de Sistemas Continuos. UNED. Madrid.
- Sapers, G; Gorny, J & Yousef, A. (eds.). 2005. Microbiology of Fruits and Vegetables. CRC Press. P. 321-323.
- Shafiur, M. 2007. Handbook of Food Preservation. 2ed. Boca Raton. CRC Press. P. 307-308.
- Sun, D.W. (ed). 2012. Thermal Food Processing: New Technologies and Quality Issues. 2 ed. CRC Press. Boca Raton.
- Tucker, G & Featherstone, S. 2010. Thermal Processing. Wiley-Blackwell. P. 149-151.
- Ye-Wong, I; Jung-Ji, K; Huyn, K & Se-Wook, O. 2013. Antimicrobial Activities of Acetic Acid, Citric Acid, and Lactic Acid Against *Shigella* Species. *Journal of Food Safety*. 33. 79-85.
- Weingart, O; Schreiber, T; Mascher, C; Pauly, D; Dorner, M; Berger, T; Egger, C; Gessler, F; Loessner, M; Avondet, M & Dorner, B. 2010. The Case of Botulinum Toxin in Milk: Experimental Data. *American Society for Microbiology*. 76: 3293-3300.
- Zamora, W & Teixeira, A. 2012. Principios Matemáticos del Procesos Térmico de Alimentos. AMV ediciones. P. 143-144.
- Zhao, Y. 2012. Specialty Foods: Processing Technology, Quality and Safety. CRC Press. Boca Raton.