

Optimización y determinación del largo de vida útil de mezcla a base de calabaza (*Cucurbita moschata*)

Por

Norleyn María Navas Guzmán

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
en
CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGUEZ
2011

Aprobado por:

Lynette E. Orellana, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Fernando Pérez, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Edna Negrón, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Canny Bellido, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Edna Negrón, Ph.D.
Directora
Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Fecha

ABSTRACT

The shelf life of a mixture of pumpkin (*Cucurbita moschata* Soler) was evaluated using potassium sorbate as preservative agent, ascorbic acid as acidulant agent and other ingredients. The mixture was packaged in polypropylene-polyethylene trays. Three batches of 52 trays were processed, of which half of each of them was stored at 4°C for 13 weeks and the other half at 7°C for 5 weeks. Two samples were taken of each batch at different temperatures for physicochemical analysis (pH, water activity, redox potential, color and carotenoids) and the microbial population (aerobic, coliforms, yeast and mold). The maximum charge of microorganisms reached was 4.07 Log UFC/g for total aerobics and 2.92 Log UFC/g for yeasts at the day 28th, and 1.48 Log UFC/g for molds in the day 49th. Coliforms were not found. There was a decrease of pH, redox potential and water activity. The concentrations of carotenoids decreased from 64.72, 62.87 and 62.32 µg/g to 45.52, 42.87 and 41.44 µg/g in the lots 1, 2 and 3 respectively. This degradation was related to the loss of luminosity and loss of orange color. All the results obtained at temperature of 7°C showed the same pattern as those found at 4°C, however the results at 7°C showed a faster degradation of the mixture which reached values of aerobes and yeast higher than 7 Log UFC/g in the day 28th. The results demonstrated that the shelf life of the product can be guaranteed till the day 35th when storage at 4°C.

RESUMEN

La vida útil de una mezcla a base de calabaza *Cucurbita moschata* Soler, con sorbato de potasio como agente preservativo, ácido ascórbico como agente acidulante y otros ingredientes fue evaluada. La mezcla fue empacada en bandejas de polipropileno con polietileno. Tres lotes con 52 bandejas fueron procesados, de las cuales la mitad de cada uno de ellos se almacenó a 4°C por 13 semanas y la otra mitad a 7°C por 5 semanas. Se tomaron dos muestras de cada lote a las distintas temperaturas para análisis fisicoquímico (pH, actividad de agua, potencial redox, color, carotenoides) y población microbiana (aerobios totales, coliformes, hongos y levaduras). La carga máxima de microorganismos alcanzó, 4.07 Log UFC/g para aerobios totales y 2.92 Log UFC/g para levaduras al día 28, y 1.48 Log UFC/g para hongos al día 49. No se detectaron coliformes. Hubo disminución del pH, actividad de agua y potencial redox. La concentración de carotenoides disminuyó de 64.72, 62.87 y 62.32 µg/g a 45.52, 42.87 y 41.44 µg/g en lotes 1, 2 y 3 respectivamente. Esta degradación fue relacionada con la pérdida de luminosidad y del color anaranjado de las mezclas. A temperatura de 7°C se observó la misma tendencia en todos los resultados con un deterioro más rápido de la calidad alcanzando al día 28 conteos mayores de 7 Log UFC/g para aerobios y levaduras. Los resultados obtenidos demuestran que la vida útil del producto puede ser asegurada hasta el día 35 a 4°C.

**Derechos de Autor Reservados ©
Norleyn M. Navas Guzmán
2011**

“Mas a Dios gracias, el cual me lleva siempre en triunfo en Cristo Jesús”

2 Corintios 2:14

A mi esposo Luis Guillermo Obregón, has sido mi apoyo incondicional, gracias por motivarme a emprender este camino, gracias por amarme y por ser tan especial;

A mis dos grandes tesoros, mis hijos, Valerie Michelle y Sergio Andrés, ustedes son mi orgullo, mi inspiración y mi mayor motivo de superación;

A mis padres, Luis Eduardo y Nohora, han hecho tanto por mí y por mis hermanos que no alcanza la vida para pagarles, son los mejores padres del mundo. Gracias por todos sus esfuerzos y sacrificios;

A mis hermanos Niltzen y Meybis, son los mejores hermanos del mundo;

A mi tía Daysi, has sido como una madre para mí, tu ayuda y apoyo fueron esenciales en mi estadía aquí en Puerto Rico;

A toda mi familia por sus bendiciones,

Los llevo en lo más profundo de mi corazón, los amo con toda mi alma.

AGRADECIMIENTOS

A Ti, Dios Todopoderoso, no soy nadie sin ti. Gracias por todas las bendiciones que me has dado, por ser la luz que alumbró mi camino y la mano que guía mis pasos. Gracias por estar siempre presente, por ser mi gozo, mi fortaleza, mi auxilio y mi refugio. Sin ti no hubiera sido posible este logro.

A mi directora de tesis, Dra. Lynette Orellana, gracias por la confianza que depositó en mí al haberme permitido trabajar con usted. Gracias por su guía y por estar siempre dispuesta a ayudarme.

Al Dr. Fernando Pérez, gracias por su ayuda, siempre estuvo presente cuando lo necesité.

A la Dra. Edna Negrón, gracias por sus consejos y guía en esta investigación.

A mis queridos e incondicionales amigos: Nydia Muñoz, Aimeé Montero y Luis Enrique Ruiz. En palabras no puedo expresar lo inmensamente agradecida que estoy con ustedes. He contado con ustedes en los momentos en que más los he necesitado, gracias por brindarme su ayuda, y lo más importante, su amistad. Quiero que sepan que siempre los llevaré en mi corazón, y aún en la distancia, seguiremos cultivando nuestra amistad.

Durante mi tiempo de estudio en el departamento de CITA y en la realización de mi tesis, tuve el apoyo y la ayuda de muchas personas incluyendo el cuerpo de profesores, personal técnico, administrativo, compañeros y amigos, especialmente durante la época de mi embarazo, donde no solo me cuidaron sino que también me consintieron. Quiero decirles que les agradezco muchísimo su ayuda y colaboración, fueron parte importante en esta formación. A todos ustedes: Ivett Vissepo, Miguel

Ruperto, Don José Ramírez, Liliam Cardona, Miguel Rivera, Gloria Aguilar, Jaime Reyes, Dra. Leyda Ponce de León, Dra. Rosa Chávez, Dra. María Plaza, profesora Aixa Rivera, Minerva Rivera, Luisenrique Molina, Ariana Méndez, María José Pérez.

A Jesús Montero Arce, gracias por toda tu ayuda y disposición.

A Angélica Peluffo, gracias por tu ayuda amiguita, eres muy especial.

A toda mi familia y amigos de Colombia y Puerto Rico, especialmente a Carola Barrera y Gerardo Ruiz, gracias por ser tan buenos amigos. A la Sra. Idelilia Cuadro, gracias por su apoyo, sus consejos y oraciones.

A la Dra. Linda Beaver por suplirme calabazas para esta investigación.

Al departamento de Biología por darme ayudantía y brindarme la oportunidad de ser ayudante de cátedra. A María Méndez, gracias por la confianza que depositó en mí. A Mary Jiménez, gracias por tu disposición y amabilidad. A Magaly Zapata, gracias por tus consejos y tu colaboración, me sacaste de muchos apuros con mi proyecto de tesis.

A todos los que de alguna manera hicieron su aporte en esta investigación.

Gracias, Dios los bendiga.

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
AGRADECIMIENTOS	vi
TABLA DE CONTENIDO	viii
LISTA DE TABLAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE APÉNDICES	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN LITERARIA	3
2.1. Calabaza	3
2.1.1. Generalidades	3
2.1.2. Beneficios y aspectos nutritivos	4
2.1.3. Usos	6
2.2. Formulación del producto	7
2.2.1. Descripción del producto	7
2.2.2. Aditivos	7
2.2.2.1. Ácido ascórbico	7
2.2.2.2. Sorbato de potasio	8
2.2.2.3. Estabilizante	9
2.2.3. Retos	10
2.2.3.1. Alimento acidificado	10

2.2.4. Regulaciones	11
2.3. Vida útil	11
2.3.1. Parámetros intrínsecos	12
2.3.1.1. pH	12
2.3.1.2. Contenido de humedad – Actividad de agua	13
2.3.1.3. Potencial oxidación-reducción (Eh)	13
2.3.1.4. Contenido de nutrientes	14
2.3.1.5. Constituyentes antimicrobiales	14
2.3.2. Parámetros extrínsecos	15
2.3.2.1. Temperatura de almacenamiento	15
2.3.2.1.1. Abuso de temperatura	16
2.3.3. Microorganismos indicadores	17
2.3.4. Empaque	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Obtención de las muestras	19
3.2. Elaboración de la mezcla	19
3.3. Empaque	21
3.4. Almacenamiento	22
3.5. Muestreo	23
3.6. Análisis fisicoquímico de las muestras	25
3.6.1. pH	25
3.6.2. Actividad de agua	25
3.6.3. Potencial óxido reducción	25

3.6.4. Color	25
3.6.5. Carotenoides	26
3.6.6. Análisis proximal	26
3.7. Análisis microbiológico	27
3.7.1. Recuento de aerobios totales	27
3.7.2. Recuento de coliformes	27
3.7.3. Recuento de hongos y levaduras	28
3.8. Análisis sensorial	28
3.9. Análisis estadístico	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1. Análisis fisicoquímico	29
4.1.1. Análisis de pH	29
4.1.2. Análisis de la actividad de agua	32
4.1.3. Análisis del potencial óxido reducción (Eh)	35
4.1.4. Análisis del color	38
4.1.4.1. Análisis para el parámetro <i>L</i>	39
4.1.4.2. Análisis para el parámetro <i>a</i>	41
4.1.4.3. Análisis para el parámetro <i>b</i>	44
4.1.4.4. Análisis para el parámetro <i>Hue</i>	46
4.1.4.5. Análisis para el parámetro <i>Chroma</i>	49
4.1.5. Análisis de carotenoides	51
4.1.6. Análisis proximal	58
4.2. Análisis microbiológico	60

4.2.1. Análisis del recuento de aerobios totales	60
4.2.2. Análisis del recuento de coliformes	64
4.2.3. Análisis del recuento de hongos	65
4.2.4. Análisis del recuento de levaduras	68
4.3. Análisis sensorial	71
5. CONCLUSIONES	72
6. RECOMENDACIONES	75
7. BIBLIOGRAFÍA	76
APÉNDICES	85

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de nutrientes en <i>Cucurbita moschata</i> por 100 g de porción comestible	6
Tabla 2. Contenido de carotenoides totales ($\mu\text{g/g}$) en calabaza cruda, puré de calabaza y mezclas del día 0	52
Tabla 3. Composición proximal de la mezcla en base seca	59
Tabla 4. Recuento promedio de hongos (Log UFC/g) durante almacenamiento a 4°C	66
Tabla 5. Recuento promedio de hongos (Log UFC/g) durante almacenamiento a 7°C	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Calabazas utilizadas para la elaboración de la mezcla	19
Figura 2. Proceso de corte de la calabaza	20
Figura 3. Proceso de cocción de la calabaza	20
Figura 4. Puré de calabaza	21
Figura 5. Proceso de mezclado de ingredientes	21
Figura 6. Pesado de la mezcla en bandejas	22
Figura 7. Sellado de bandejas	22
Figura 8. Almacenamiento de muestras a 4°C	23
Figura 9. Diagrama de flujo para el proceso de elaboración y análisis de mezcla a base de calabaza	24
Figura 10. pH de la mezcla durante almacenamiento a 4°C	30
Figura 11. pH de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C	32
Figura 12. Actividad de agua (a_w) de la mezcla durante almacenamiento a 4°C	33
Figura 13. Actividad de agua (a_w) de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C	35
Figura 14. Potencial óxido reducción de la mezcla durante almacenamiento a 4°C	36
Figura 15. Potencial óxido reducción de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C	37
Figura 16. Parámetro de color L de la mezcla durante almacenamiento a 4°C	40
Figura 17. Parámetro de color L de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C	41
Figura 18. Parámetro de color a de la mezcla durante almacenamiento a 4°C	43
Figura 19. Parámetro de color a de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C	44
Figura 20. Parámetro de color b de la mezcla durante almacenamiento a 4°C	45

Figura 21. Parámetro de color <i>b</i> de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C	46
Figura 22. Valores de <i>Hue</i> de la mezcla durante almacenamiento a 4°C	47
Figura 23. Valores de <i>Hue</i> de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C	49
Figura 24. Valores de <i>Chroma</i> de la mezcla durante almacenamiento a 4°C	50
Figura 25. Valores de <i>Chroma</i> de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C	51
Figura 26. Concentración de carotenoides en la mezcla durante almacenamiento a 4°C	55
Figura 27. Concentración de carotenoides de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C	58
Figura 28. Recuento de aerobios totales en mezcla durante almacenamiento a 4°C	61
Figura 29. Recuento de aerobios totales en la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C	63
Figura 30. Recuento de levaduras en la mezcla durante almacenamiento a 4°C	69
Figura 31. Recuento de levaduras en la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C	71

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice A: Calendario de la abundancia del Departamento de Agricultura de Puerto Rico	85
Apéndice B: Análisis de varianza (ANOVA) para pH	86
Apéndice C: Análisis de varianza para pH con efecto de la temperatura	88
Apéndice D: Análisis de varianza para actividad de agua	89
Apéndice E: Análisis de varianza para actividad de agua con efecto de la temperatura	91
Apéndice F: Análisis de varianza para potencial óxido reducción (Eh)	92
Apéndice G: Análisis de varianza para potencial óxido reducción (Eh) con efecto de la temperatura	94
Apéndice H: Análisis de varianza para parámetro de color <i>L</i>	95
Apéndice I: Análisis de varianza para parámetro de color <i>L</i> con efecto de la temperatura	97
Apéndice J: Análisis de varianza para <i>Hue</i>	98
Apéndice K: Análisis de varianza para <i>Hue</i> con efecto de la temperatura	100
Apéndice L: Análisis de varianza para <i>Chroma</i>	101
Apéndice M: Análisis de varianza para <i>Chroma</i> con efecto de la temperatura	103
Apéndice N: Análisis de varianza para carotenoides	104
Apéndice O: Análisis de varianza para carotenoides con efecto de la temperatura	105
Apéndice P: Curva de calibración de carotenoides	106
Apéndice Q: Análisis de varianza para el recuento de aerobios totales	107

Apéndice R: Análisis de varianza para el recuento de aerobios totales con efecto de la temperatura	108
Apéndice S: Análisis de varianza para el recuento de hongos	109
Apéndice T: Análisis de varianza para el recuento de hongos con efecto de la temperatura	110
Apéndice U: Análisis de varianza para el recuento de levaduras	111
Apéndice V: Análisis de varianza para recuento de levaduras con efecto de la temperatura	112
Apéndice W: Autorización del Comité Institucional para la protección de los seres humanos en la investigación	113
Apéndice X: Hoja del panelista utilizada en el análisis sensorial	114

1. INTRODUCCIÓN

El avance de la industria de alimentos en el desarrollo de nuevos productos ha incrementado en los últimos tiempos debido a la necesidad del consumidor de encontrar en el mercado productos de fácil y rápido manejo y de alta calidad. Es por ello que se ha ideado el desarrollo de una mezcla a base de calabaza y otros ingredientes, el cual es un producto, que, aunque se conoce en los hogares puertorriqueños por ser la base de las famosas barriguitas de vieja o tortitas de calabaza, no es uno que se encuentre en el mercado a disposición del consumidor.

Este alimento tiene como ventajas las diferentes alternativas de preparación culinaria, ya que se puede consumir horneado o frito, al igual que la diversidad de almacenamiento del producto, tanto en refrigeración como en congelación. Además, se introduce en el mercado otra manera de consumo de la calabaza, la cual, tradicionalmente se consume como vegetal cocido o como ingrediente de diversos platos.

La calabaza es una buena fuente de nutrientes. Su tejido mesocarpio es rico en fibra y proporciona una base para el desarrollo futuro de alimentos funcionales [1]. El desarrollo de este producto también favorece la agricultura del país, esto es, porque la calabaza es una de las hortalizas que más aporta a la economía agrícola según el Departamento de Agricultura de Puerto Rico. El valor de la producción agrícola en el año 2009/10 para la calabaza fue de 672,863 mil dólares [2]. Asimismo, según el Calendario de Abundancia preparado por el Programa de Mercadeo de A.S.D.A. (Administración de Servicios y Desarrollo Agropecuario) del Departamento de

Agricultura de Puerto Rico [3], la calabaza se encuentra en abundancia durante todo el año, ya que no tiene mes de inicio ni de final de cosecha (**Apéndice A**). El clima de Puerto Rico es adecuado para su producción, tanto en las costas como en las montañas, y las diferencias de temperatura que existen durante el año no limitan la siembra [4]. Esto constituye una herramienta ventajosa para aprovechar tanto en la agricultura del país, como en el desarrollo de esta investigación, al contar con una hortaliza que se puede encontrar tanto en cualquier parte del país como en cualquier época del año.

La determinación de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del producto es de vital importancia para obtener información del alimento y establecer las condiciones de vida útil del producto, de esta manera se garantiza que este sea seguro para el consumidor y que además conserve sus propiedades de sabor y frescura.

El propósito principal de esta investigación es optimizar la formulación de la mezcla y determinar su largo de vida útil. Para ello se establecen como objetivos secundarios:

- Determinar las propiedades fisicoquímicas del producto.
- Determinar las características microbiológicas del producto.
- Efectuar análisis proximal al producto.
- Determinar el efecto del abuso de temperatura sobre la calidad del producto.

2. REVISIÓN LITERARIA

2.1. Calabaza

2.1.1. Generalidades

La calabaza, *Cucurbita moschata*, es la hortaliza de mayor importancia económica en Puerto Rico y se siembra prácticamente en toda la isla. Es la *Cucurbita* predominante en zonas tropicales del Caribe y Latinoamérica [5]. En Puerto Rico existen las variedades Soler, Taina dorada, Verde Luz y Borinquen [6, 7].

La variedad Soler se caracteriza por tener frutos grandes, circulares, achatados y con lóbulos. La piel es verde oscura, aunque las áreas expuestas al sol serán anaranjadas al alcanzar la madurez [8]. Las frutas pesan aproximadamente de 10 a 25 libras, y algunas pueden pasar las 40 libras. El grosor de la pulpa es de 2.5-4.5 pulgadas y su color entre anaranjado y amarillo [7].

El estado físico es muy importante en la calidad de la calabaza, por tanto es necesario observar que éstas no presenten daño físico. Soler tiene un defecto que es de cuidado cuando hay condiciones de mucha lluvia, debido a que algunas frutas presentan en su parte inferior una cicatriz que tiende a abrirse en la maduración y en consecuencia permitir la entrada del agua [7, 8]. Esto puede conllevar a la penetración de microorganismos que causen deterioro de la calidad y acortar la vida útil del producto, además, de representar un riesgo de salud pública por infección con microorganismos patógenos. Generalmente las frutas pueden ser infectadas por algunos hongos como *Phytophthora capsici*, *Fusarium spp*; bacterias como *Xanthomonas campestris* y *Pseudomonas syringae*; y algunos virus. Esta infección

puede tener lugar desde la siembra hasta la cosecha, y la enfermedad puede manifestarse durante el transporte y el almacenamiento de los frutos [9].

2.1.2. Beneficios y aspectos nutritivos

Cucurbita moschata es usada en muchos países no solo como vegetal sino también como medicina. Muchos científicos han evaluado los beneficios que tiene la calabaza a la salud y se ha reportado que *C. moschata* tiene propiedades antiinflamatorias, antibacterial, antiparasitaria, antitumoral y analgésicas; como también, reduce enfermedades de riesgo como diabetes, cáncer, hipercolesterolemia, hipertensión, aterosclerosis, artritis, cataratas, enfermedades cardiovasculares e intestinales [10].

La calabaza es una buena fuente de ácido ascórbico y carotenoides, los cuales, como vitamina C y precursor de vitamina A, respectivamente, cumplen funciones antioxidantes durante la maduración y el almacenamiento [11]. La vitamina C interviene en la formación de huesos, dientes, colágeno, y ayuda a la absorción de hierro [12]. Además, ejerce funciones preventivas en enfermedades cardiovasculares y en cáncer. La vitamina A es importante para la visión, el crecimiento y el desarrollo embrionario [13].

Los carotenoides representan uno de los grupos de sustancias naturales encontradas en frutas y vegetales responsables de proporcionarles su color amarillo, rojo o anaranjado. Están divididos generalmente en dos grupos de acuerdo a su composición química molecular: los carotenos, que tienen átomos de carbono e hidrógeno, entre ellos el α -caroteno y el β -caroteno; y las xantófilas, que poseen en su

estructura átomos de oxígeno, como por ejemplo la luteína [14]. Los principales carotenoides aislados de la calabaza variedad soler son β -caroteno, α -caroteno y luteína, siendo el más abundante β -caroteno [15, 16]. Éstos son los responsables del color amarillo de la calabaza [17]. La luteína es el caroteno más abundante en la etapa inmadura de la calabaza *C. moschata*, mientras que α -caroteno y β -caroteno predominan en la etapa madura [15]. La composición de los carotenoides varía de acuerdo a ciertos factores como el cultivar, la variedad, el estado de maduración, la composición del suelo, el clima, la parte de la planta utilizada para la determinación, el manejo de cosecha y poscosecha, la duración de la poscosecha, el procesamiento y almacenamiento y la composición del alimento [18, 19].

La estabilidad de los carotenoides es importante en el alimento ya que su degradación conlleva a pérdidas de color y del valor nutricional. Diferentes factores están asociados a su inestabilidad como son la exposición a la luz, el calor, los ácidos y la presencia de oxígeno o antioxidantes, y pueden oxidarse de igual manera cuando hay actividad de las lipoxidasas [20-22]. La degradación de estos compuestos generalmente se debe a reacciones de oxidación. Los β -carotenos también son inestables a los procesos térmicos, mostrando un cambio de color en las calabazas que son sometidas al calor. Esto es debido a que el calor induce las reacciones de isomerización cis-trans, de oxidación y de hidroxilación de los carotenoides [23].

La calabaza, además, contiene otros nutrientes como el calcio, hierro, fósforo y otras vitaminas [24]. Su contenido de grasa es muy bajo al igual que su aporte energético, como lo muestra la **Tabla 1** [25].

Tabla 1. Contenido de nutrientes en *Cucurbita moschata* por 100 g de porción comestible

<i>Cucurbita moschata (Pulpa)</i>	
Agua (g)	88.3
Proteína (g)	1.2
Grasas (g)	0.3
Carbohidratos totales (g)	9.8
Fibra cruda (g)	0.6
Ceniza (g)	0.4
Calcio (mg)	12
Fósforo (mg)	27
Hierro (mg)	0.7
Pro-vitamina A (µg)	1055
Tiamina (mt)	0.05
Riboflavina (IPA)	0.04
Niacina (mg)	0.6
Ácido Ascórbico (mg)	42
Valor energético (kcal)	40

Fuente: Cultivos Andinos. FAO. 1993.

2.1.3. Usos

La calabaza puede ser consumida de diversas maneras, sea como vegetal íntegro, o como ingrediente de guisos, salsas, postres, jaleas, mermeladas, purés y otros productos [8, 23]. No es necesario eliminar la piel para cocinarla. La calabaza ha sido identificada como un vegetal superior y preferida por su única textura carnosa y no arenosa, sabor suave y buena nutrición. Es un vegetal utilizado como base en alimentos como cremas proporcionando suavidad al alimento y cremosa sensación al paladar [26].

2.2. Formulación del producto

2.2.1. Descripción del producto

El producto hecho a base de calabaza es una mezcla de pulpa de calabaza como ingrediente principal y otros ingredientes como harina de trigo, azúcar, huevo, mantequilla, canela y sal, con adición de ácido ascórbico y sorbato de potasio que ayuden a la estabilidad del producto. Esta mezcla puede consumirse en diferentes formas, de acuerdo a como lo desee el consumidor, ya sea frita, en la forma conocida como barriguitas de vieja, o de una manera más saludable, en su forma horneada.

Las características propias de la calabaza como su alto contenido de agua y de nutrientes, hacen que sea un alimento altamente perecedero, haciendo también al producto perecedero, por tanto, es necesario implementar las medidas adecuadas para desarrollar un producto estable durante su almacenamiento.

2.2.2. Aditivos

2.2.2.1. Ácido ascórbico

El ácido ascórbico es usualmente adicionado en algunos alimentos como un acidulante y fortificante, como por ejemplo en los purés de vegetales [17]. Los humanos no pueden sintetizar este ácido, por tanto es necesario consumirlo en la alimentación [12]. El ácido ascórbico también tiene actividad antioxidante [12], probablemente es el agente reductor más utilizado por sus características “*antibrowning*”, es decir, evita el oscurecimiento previniendo la descoloración [27]. Un antioxidante se define, según el Código de Regulaciones Federales (21-CFR -*Code of Federal Regulations Title 21*)

sección 170.3, como una sustancia usada para preservar un alimento retardando el deterioro por rancidez o decoloración debido a oxidación [28].

El ácido ascórbico se clasifica como un antioxidante sinérgico, el cual actúa como secuestrador de oxígeno y regenera antioxidantes primarios por donar átomos de hidrógeno a radicales libres o proporcionar un ambiente ácido más estable a estos antioxidantes [1, 29].

2.2.2.2. Sorbato de potasio

Una de las alternativas para prevenir deterioro de los alimentos refrigerados por acción de los microorganismos es la utilización de químicos preservativos. Diversos estudios han mostrado que la vida útil de almacenamiento de un número de purés de frutas y jugos fue extendido por preservativos químicos, particularmente aquellos que tienen propiedades antifúngicas como el sorbato de potasio, el cual es preferido porque no contribuye al sabor del producto [30]. El sorbato de potasio es usado en un gran número de alimentos, incluyendo productos procesados de vegetales [17].

El sorbato de potasio es una de las sales del ácido sórbico fácilmente soluble en agua. Es muy efectivo a pH entre 4.0 y 6.0. La eficiencia de la mayoría de los preservativos químicos es más alta a medida que el pH es más ácido [31]. Es uno de los antimicrobiales más utilizados por su amplio espectro de acción inhibiendo especies de levaduras, hongos y bacterias [32, 33]. Entre las levaduras inhibe especies de los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, entre otros; hongos de los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, entre otros. También inhibe el crecimiento de hongos micotoxigénicos y la producción de toxinas de

especies como *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum* y *Penicillium patulum*. Inhibe igualmente especies de bacterias asociadas al deterioro de alimentos como *Pseudomona*, *Proteus*, *Klebsiella* y *Listeria*, y algunas patógenas como *Salmonella*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli* 0157:H7, *L. monocytogenes*, *Yersinia*, *Campylobacter*, y hasta formación de esporas por los géneros *Bacillus* y *Clostridium* [32, 34]. Investigaciones recientes han establecido que este preservativo retarda la toxigénesis de *C. botulinum* en carnes curadas y pescado refrigerado bajo atmósfera modificada [33, 34].

La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos, FDA (*Food and Drug Administration*, por sus siglas en inglés) determina los límites de uso para los aditivos y cuales son permisibles. Generalmente el ácido sórbico y sus sales son permitidos en niveles que no exceden los 0.2% en peso del producto terminado [31, 33]. El sorbato de potasio, según la FDA, es una sustancia reconocida como segura, GRAS (*Generally Recognized As Safe*, por sus siglas en inglés) [35]. Estudios experimentales en animales y estudios conducidos en humanos, muestran que no hay pruebas en la información disponible sobre el ácido sórbico, y sus sales, entre ellas, el sorbato de potasio, que demuestren o sugieran un motivo razonable para sospechar de un peligro de estas sustancias al público cuando se utilizan en los niveles establecidos [36].

2.2.2.3. Estabilizante

El término estabilizante se refiere a todo material que se adiciona a un alimento para aumentar su tiempo de almacenamiento reduciendo la tasa en la cual suceden cambios durante el almacenamiento, transporte y manejo [37]. Muchos de los

estabilizantes utilizados durante el procesamiento de los alimentos son polisacáridos como las gomas, entre las cuales se encuentran los carragenanos. Estos son extraídos de algunas especies de algas rojas [34]. Es muy usado en alimentos con pH bajos, generalmente estables a pH cercanos a 5.0 [34]. Sus usos se deben primariamente a sus funciones de espesar, proveer textura, formar geles y estabilizar el producto previniendo la sinéresis [26, 34, 37]. La sinéresis es la pérdida de líquido sobre la superficie del gel cuando éste se contrae. Existen tres formas de carragenanos, Kappa, Iota y Lambda. De éstos, el Iota es el que mejor previene la sinéresis, usados especialmente en productos lácteos como helados [34, 37].

Ticagel PPS-2 es un carragenano diseñado por *TIC GUMS* para incrementar la viscosidad y proveer textura a los productos de calabaza, especialmente los pasteles de calabaza (*pumpkin pie*). Ticagel PPS-2 contiene goma Xanthan dentro de sus ingredientes.

2.2.3. Retos

2.2.3.1. Alimento acidificado

El 21-CFR parte 114.3, define alimentos acidificados como aquellos alimentos de baja acidez a los cuales se les añade un ácido o un alimento ácido [38]. Estos alimentos se caracterizan por tener una actividad de agua (a_w) mayor a 0.85 y un pH final en equilibrio de 4.6 o menor.

El objetivo de acidificar el alimento es evitar el crecimiento de bacterias patógenas como *Clostridium botulinum*, el cual es productor de la toxina botulínica. A un pH menor de 4.6 se inhibe su crecimiento y no se produce la toxina [33].

2.2.4. Regulaciones

Las regulaciones para la mezcla a base de calabaza están dadas bajo el Título 21-CFR y son las siguientes:

- 21CFR 182.3013. *Substances Generally Recognized As Safe (Ascorbic acid)*.
- 21CFR 182.3640. *Substances Generally Recognized As Safe (Potassium sorbate)*.
- 21CFR 172.620. *Food additives permitted for direct addition to food for human consumption (Carrageenan)*.

2.3. Vida útil

La vida útil de un alimento se define como el período de tiempo seguido de la cosecha, producción y manufactura, sobre el cual el alimento mantiene la calidad requerida [29]. Durante el almacenamiento, distribución y transporte de un alimento, se producen reacciones debido a la exposición de éste a factores que pueden llevar a una degradación del alimento por cambios físicos y químicos, y/o proliferación de microorganismos [39]. El crecimiento de microorganismos puede manifestarse en daño del producto por cambios en las características organolépticas causado por microorganismos de deterioro, o en la transmisión de enfermedades causadas por patógenos. Este crecimiento microbiano se ve influenciado por parámetros intrínsecos y extrínsecos.

Los parámetros intrínsecos son propios del alimento, como pH, actividad de agua (a_w), potencial óxido reducción (Eh), contenido de nutrientes y constituyentes antimicrobianos. Los parámetros extrínsecos son los relacionados al ambiente como la

temperatura de almacenamiento, humedad relativa del ambiente, presencia y concentración de gases y presencia y actividad de otros microorganismos [33]. Factores de procesamiento también pueden influir en el crecimiento de microorganismos como la contaminación cruzada y las buenas prácticas de manufactura.

Es importante determinar el largo de vida útil de un alimento, porque a través de éste se garantiza su calidad e inocuidad durante su consumo.

2.3.1. Parámetros intrínsecos

2.3.1.1. pH

El grado de acidez en un producto alimenticio juega un papel importante en su conservación. El determinar el pH de un alimento tiene como propósito establecer su grado de acidez o alcalinidad. Se ha establecido que muchos microorganismos crecen mejor a valores de pH cercanos a 7.0 (6.6-7.5) [33]. Las bacterias que causan deterioro suelen crecer a pH menos ácido en comparación con los hongos y las levaduras, al igual que las bacterias patógenas, las cuales crecen en un rango de pH más ácido. Alimentos con valores de pH >4.6 se consideran poco ácidos, y en ellos se presenta el peligro de la producción de la toxina de *Clostridium botulinum* si éste se encuentra presente [33]. Por lo tanto, algunos alimentos que presentan un pH >4.6 son acidificados con la finalidad de disminuir el pH y evitar el crecimiento de cualquier patógeno que pueda representar un peligro para la salud pública.

2.3.1.2. Contenido de humedad – Actividad de agua

El agua es el componente más importante en muchos alimentos y ésta influye en la palatabilidad y estabilidad del alimento [29]. La actividad de agua se puede definir como la relación existente entre la presión de vapor de agua en el alimento y la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. Desde el punto de vista microbiológico, es la cantidad de agua disponible que pueden utilizar los microorganismos para llevar a cabo sus funciones metabólicas.

Las reacciones químicas, enzimáticas y el crecimiento de microorganismos se presentan mayormente en alimentos con alto contenido de agua. Generalmente, las bacterias requieren mayor contenido de a_w que los hongos y las levaduras. Aproximadamente, el mínimo de a_w que se requiere para el crecimiento de bacterias que causan deterioro es de 0.90, para levaduras es de 0.88 y para mohos de 0.80. En el caso de las bacterias patógenas, se ha encontrado que *Staphylococcus aureus* puede crecer a valores de a_w de 0.86 y *Clostridium botulinum* no puede crecer por debajo de 0.94 [33].

2.3.1.3. Potencial oxidación-reducción (Eh)

El potencial óxido reducción mide la capacidad que tiene un sustrato de perder o ganar electrones. Si pierde electrones el sustrato se oxida y si gana electrones el sustrato se reduce. A medida que una sustancia se oxida más alto o más positivo será su Eh, y al contrario, entre más reducida se encuentre, más bajo o más negativo será su Eh [33]. Algunos sustratos también pueden oxidarse por la presencia de oxígeno.

Los cambios químicos que se presentan en un alimento durante su almacenamiento y distribución son generalmente producidos por reacciones oxidativas, debido a la presencia de oxígeno, que están asociadas con todos los componentes del alimento, entre ellas la oxidación de lípidos y reacciones de pardeamiento no enzimático [39]. Como consecuencia, se presenta en el alimento rancidez y degradación del color y de la vitamina C.

La presencia del oxígeno en el procesamiento y almacenamiento de un alimento puede conllevar al crecimiento de microorganismos aerobios que pueden provocar deterioro del producto, como también, provee un medio donde pueden ocurrir reacciones químicas catalizadas por enzimas. Todas estas reacciones debidas a la presencia de oxígeno son influenciadas por las condiciones de pH, humedad, temperatura y condiciones de empaque.

2.3.1.4. Contenido de nutrientes

Los microorganismos utilizan nutrientes en el alimento que son esenciales para su crecimiento como agua, proteínas, vitaminas, minerales y fuentes de energía como los carbohidratos y las grasas.

2.3.1.5. Constituyentes antimicrobiales

Existen sustancias naturales en los alimentos que les brindan cierta estabilidad frente al ataque de microorganismos. Un grupo de estas sustancias son las especies y su actividad antimicrobiana se debe a su contenido de algunos químicos y aceites esenciales. La canela es una de las especies que ha mostrado un amplio espectro de

inhibición, ésta contiene taninos y aceites esenciales como el aldehído cinámico y el eugenol, los cuales inhiben el crecimiento bacteriano [33, 40], al igual que se ha reportado su inhibición en algunas especies de hongos y levaduras y contra la producción de micotoxinas [41].

El espectro de inhibición antimicrobiana depende de la forma en que se encuentre la canela, ya sea como hoja fresca, extracto en polvo o como aceite esencial. Jeng-Leun, *et al*, [40] reportó que el extracto de canela mostró un extensivo efecto inhibitorio en varios microorganismos estudiados. Gupta, *et al*, [42] mostró que tanto el extracto de canela como su aceite esencial tienen un efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, teniendo el aceite esencial un más amplio rango de actividad antimicrobiana. Ceylan, *et al*, [43] reportó que la adición de canela a niveles de 0.1%, 0.2% y 0.3% al jugo de manzana conteniendo *E. coli* O157: H7 exhibió una significativa actividad antimicrobiana, y este efecto aumenta a medida que aumenta su concentración. La canela en combinación con el sorbato de potasio y el benzoato de sodio redujo hasta más de 5 Log UFC/ml durante el almacenamiento a 8°C durante 14 días y a 25°C durante 3 días. Mencionó además que la canela junto con procesos de acidificación podría brindar un efecto de barrera para el control de *E. coli* O157: H7 en productos alimenticios.

2.3.2. Parámetros extrínsecos

2.3.2.1. Temperatura de almacenamiento

La temperatura de almacenamiento es uno de los factores más importantes que puede afectar un producto en su vida útil. De acuerdo a las características del producto

se selecciona la temperatura a la cual se puede mantener una estabilidad y calidad del alimento. La mezcla de calabaza es un producto que necesita de temperaturas de refrigeración o congelación para retener su calidad durante un tiempo determinado. Temperaturas que sobrepasan las óptimas de almacenamiento durante el manejo, distribución y transporte, pueden acelerar las reacciones de deterioro y causar crecimiento de microorganismos acortando la vida útil del producto [44].

La refrigeración es una de las técnicas más usadas para la preservación de los alimentos. Esto es, porque, a bajas temperaturas, la actividad de los microorganismos es retardada o detenida debido a que las reacciones del metabolismo de los microorganismos son catalizadas por enzimas y éstas van a depender de la temperatura [33]. Por tanto, la refrigeración reduce la tasa de crecimiento de microorganismos alargando la vida de almacenamiento de un producto desde el punto de vista microbiológico. Sin embargo, microorganismos patógenos emergentes pueden desarrollarse si son sicutríficos, como es el caso de *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, por lo que es necesario utilizar otro método de conservación acompañado de la refrigeración [20].

2.3.2.1.1. Abuso de temperatura

Las bacterias crecen muy rápidamente en un rango de temperatura entre 5-57.2°C (41-135°F), la llamada zona de peligro, donde el número de bacterias puede doblarse en tan solo 20 minutos para la mayoría de bacterias [45, 46]. A temperaturas usuales de refrigeración comercial (0-7.2°C), los microorganismos patógenos no se inhiben, debido a que éstos pueden desarrollarse sobre los 4.4°C [20]. Si el producto es

expuesto al abuso de temperatura, existe peligro potencial de crecimiento de patógenos, especialmente aquellos mesofílicos. Tal caso es importante en aquellos alimentos con pH superiores a 4.6, por lo que se aplica la acidificación como tecnología de barrera.

Los alimentos son frecuentemente expuestos a fluctuaciones de temperatura durante su almacenamiento, distribución, transporte, exhibición y manipulación de los consumidores, influenciando esto a la inestabilidad microbiana [47, 48]. Un estudio informó que de las temperaturas de los refrigeradores en casas, el 21% de los hogares encuestados fueron 10°C. Otro estudio informó que más de 1 de 4 refrigeradores en los hogares estuvieron por encima de 7.2°C y casi uno de cada 10 fue superior a 10°C. En los establecimientos de distribución y mercados minoristas se encontraron temperaturas de 7.2°C en el 50% de las veces, y en varios casos se observaron temperaturas tan altas como 10°C [49].

De igual manera, el abuso de temperatura también influye en las características físicas de los productos alimenticios. Estudios reflejan que hay pérdida de color en productos refrigerados cuando son expuestos a altas temperaturas [30].

2.3.3. Microorganismos Indicadores

Los microorganismos indicadores son aquellos que se utilizan para evaluar un alimento en relación a su seguridad y a las buenas prácticas sanitarias con la cuales el mismo es procesado. Además, son índice de la calidad y de la vida útil del alimento. Los indicadores de calidad microbiológica son microorganismos de deterioro que se

multiplican causando pérdida de la calidad del alimento [33], en estos casos, se determina en el producto el número de aerobios o anaerobios totales.

Los coliformes son bacterias gram negativas aerobios o anaerobios facultativos, fermentadores de lactosa con producción de ácido y gas a las 48 horas de ser incubados a una temperatura de 35°C. Específicamente son de los géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Éstos hacen parte de la flora gastrointestinal en el hombre y cuando son encontrados en los alimentos, se multiplican rápidamente, por lo que se utilizan como microorganismos indicadores de malas prácticas sanitarias [33].

2.3.4. Empaque

El empaque juega un papel importante en el mantenimiento de la calidad y el largo de vida de los alimentos al ser parte integral del sistema de preservación del mismo actuando como una barrera para la contaminación externa [17]. Mediante un buen sistema de empaque se pueden minimizar los cambios ocurridos en el alimento por la influencia de condiciones extrínsecas como son la humedad, el oxígeno, la luz, la temperatura y la transferencia de aromas [29]. El sistema de empacado de los alimentos debe hacerse asépticamente y con buenas prácticas de manufactura para evitar contaminación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de las muestras

Las calabazas de la variedad Soler se obtuvieron de la finca Martínez del barrio Corozo en Cabo rojo, Puerto Rico, todas de la misma cosecha (**Figura 1**). Los demás ingredientes: harina de trigo, azúcar, huevo pasteurizado, canela, sal y mantequilla se compraron en un supermercado de la ciudad de Mayagüez.



Figura 1. Calabazas utilizadas para la elaboración de la mezcla

3.2. Elaboración de la mezcla

Las calabazas frescas fueron lavadas y desinfectadas con agua clorada (50 ppm NaOCl) [17, 50] a pH de 6.0 por 2 minutos. Se cortaron en trozos de 7 pulgadas de largo por 15 pulgadas de ancho aproximadamente sin removerles la cáscara ni las semillas (**Figura 2**). Se colocaron a hervir por un período de 15 minutos (**Figura 3**), luego se dejaron enfriar y se secaron con papel absorbente para remover el exceso de agua por aproximadamente 15 minutos. Se pasaron por el despulpador *Robot Coupe* C-80 para obtener el puré (**Figura 4**). Se pesaron los ingredientes y se llevaron al

mezclador M-20 de Barco donde se adicionaron en el siguiente orden: pulpa de calabaza, harina de trigo, azúcar, huevo, mantequilla, canela y sal. Se mezcló hasta obtener uniformidad por aproximadamente 10 minutos (**Figura 5**). Se adicionó el sorbato de potasio y el estabilizante Ticagel PPS-2, y por último el ácido ascórbico. Se midió el pH a la mezcla para asegurar un valor <4.6 . Se procesaron tres lotes con 52 bandejas cada uno, éstos fueron elaborados bajo las mismas condiciones.



Figura 2. Proceso de corte de la calabaza



Figura 3. Proceso de cocción de la calabaza



Figura 4. Puré de calabaza



Figura 5. Proceso de mezclado de ingredientes

3.3. Empaque

Doscientos gramos de mezcla fueron pesados con una balanza Sartorius ELT601 (**Figura 6**) en bandejas de polipropileno con polietileno las cuales se sellaron

con un *film* hecho de poliéster con polietileno usando el equipo *Koch Ultra Source* de ILPRA (**Figura 7**).



Figura 6. Pesado de la mezcla en bandejas



Figura 7. Sellado de bandejas

3.4. Almacenamiento

De cada uno de los lotes, la mitad de las muestras fueron almacenadas bajo temperatura de refrigeración a 4°C en un cuarto frío durante 3 meses (**Figura 8**), y a 7°C por un período de 28 días para el abuso de temperatura.



Figura 8. Almacenamiento de muestras a 4°C

3.5. Muestreo

El muestreo se realizó semanalmente durante un período de 13 semanas para la temperatura de 4°C y de 5 semanas para la temperatura de 7°C. Dos muestras fueron analizadas en cada lote a las diferentes temperaturas para cada uno de los parámetros. Las muestras se escogieron al azar. En la **Figura 9** se muestra el diagrama de flujo de proceso.

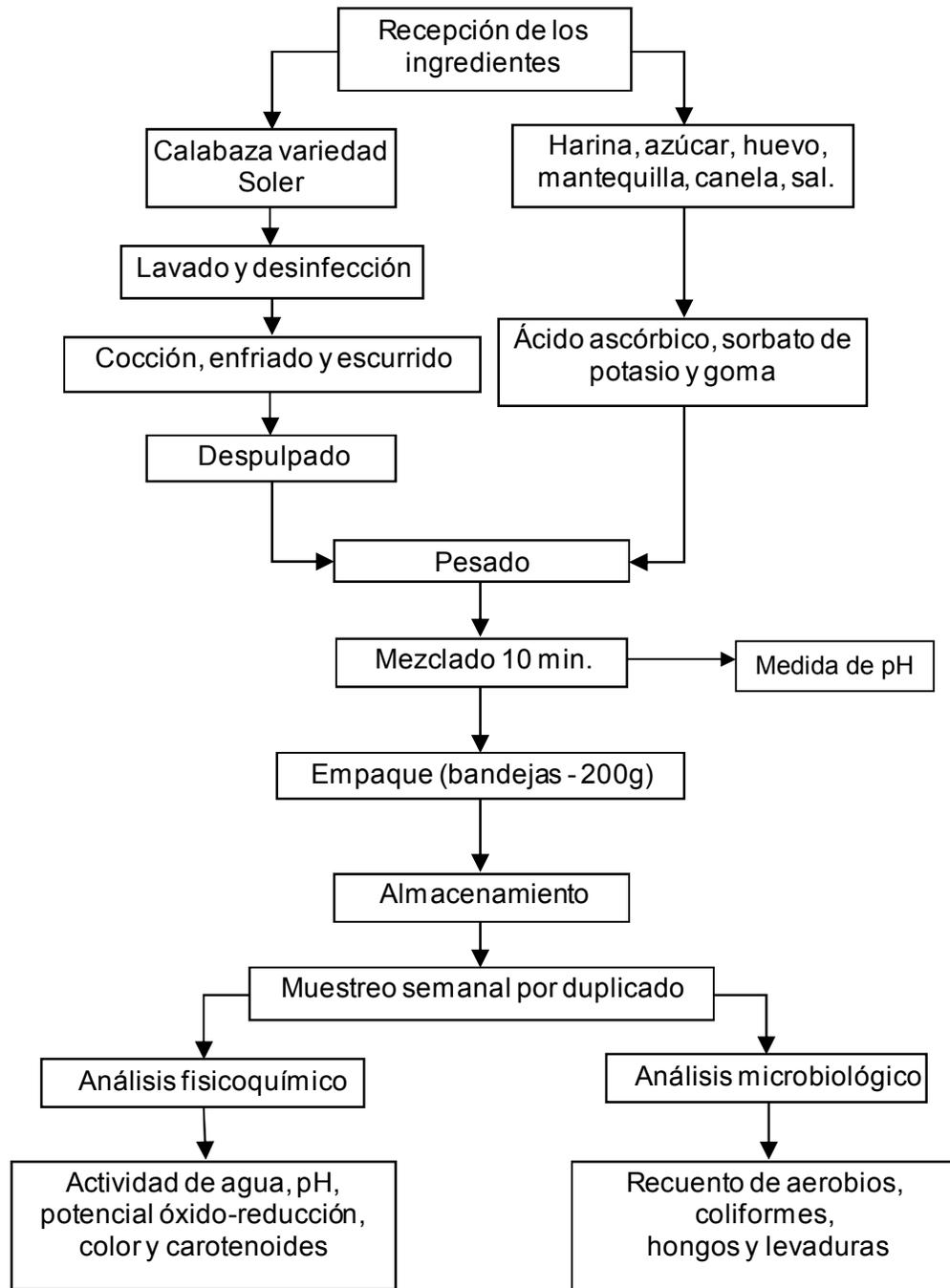


Figura 9. Diagrama de flujo para el proceso de elaboración y análisis de mezcla a base de calabaza

3.6. Análisis fisicoquímico de las muestras

3.6.1. pH

El pH se determinó con el *Docu-pH Meter* de Sartorius, previamente calibrado con soluciones amortiguadoras de pH 4.0, 7.0 y 10.0 de *Fisher Scientific*. Se hicieron lecturas por triplicado.

3.6.2. Actividad de agua

La actividad de agua se determinó a través del equipo *Aqua Lab 4TE* de *Decagon Devices*, previamente calibrado con una solución con a_w de 0.984. Se hicieron lecturas por triplicado.

3.6.3. Potencial Óxido reducción

El potencial óxido reducción se determinó con el *Docu-pH Meter* de Sartorius en modo mV. Las lecturas se hicieron por triplicado.

3.6.4. Color

El color fue medido usando el *MiniScan XE* en la escala del Sistema Hunter L , a y b (observador o ángulo visual de 10° , iluminante D65). El parámetro L representa luminosidad, con valores de 100 para blanco a 0 para negro. El parámetro a representa cambios en color de más rojo a más verde, con valores de 100 para rojo a -80 para verde. El parámetro b representa cambios en color de más amarillo a más azul, con valores de 70 para amarillo a -80 para azul [23, 51]. El equipo se calibró con platos estándares de porcelana negro y blanco. Tres medidas en cada muestra fueron

tomadas. Los valores de L , a y b fueron usados para calcular *Hue* (h°) [$h^\circ = \text{arc tangente}(b/a)$] y *Chroma* [$C = (a^2 + b^2)^{1/2}$]. *Hue* toma valores de 0 a 360° y es un atributo de la tonalidad del color. En un plano de coordenadas cartesianas de color: 0° (+ a) es rojo, 90° (+ b) es amarillo, 180° (- a) es verde y 270° (- b) es azul. *Chroma* toma valores con un rango de 0 a 60 y es la medida de la intensidad o saturación del color [22, 44].

3.6.5. Carotenoides

La determinación de los carotenoides se llevó a cabo mediante el método AOAC 941.15 de extracción con acetona y hexano. Se midió la absorbancia de las soluciones con el espectrofotómetro *Thermo Spectronic GenesysTM 8* a 436 nm. Mediante curva de calibración con estándar de β -caroteno de Sigma, 95% de pureza, se determinó la concentración de carotenoides totales expresados en $\mu\text{g/g}$ de muestra.

3.6.6. Análisis proximal

El análisis proximal se realizó mediante los métodos oficiales de la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*, por sus siglas en inglés). La determinación de humedad se hizo mediante el método gravimétrico AOAC 966.02. Las cenizas por ignición a 550°C hasta peso constante, según el método AOAC 923.03. El extracto etéreo, según el método de *Soxhlet*, AOAC 920.39. La proteína bruta mediante el método de *Kjeldahl* AOAC 991.20. La fibra total mediante el método AOAC 993.21.

3.7. Análisis microbiológico

El análisis de microorganismos se llevó a cabo mediante el uso de los procedimientos establecidos por el *Bacteriological Analytical Manual* (BAM por su siglas en inglés) [52]. Se tomaron 25 g de muestra y se homogenizaron con 225 ml de agua de peptona 0.1% en el *Laboratory Blender Stomacher 400* de Seward, durante 2 minutos. Se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-5} . Las siembras se hicieron por duplicado para aerobios y coliformes y por triplicado para hongos y levaduras. Se reportó como UFC/g (Unidades Formadoras de Colonias/gramo) de muestra.

3.7.1. Recuento de aerobios totales

En la determinación de aerobios totales se utilizó el medio de cultivo *Plate Count Agar* de Difco™. Los platos se incubaron a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $48 \text{ h} \pm 2\text{h}$.

3.7.2. Recuento de coliformes

Para el recuento de coliformes se utilizó el medio de cultivo *Violet Red Bile Agar* de Difco™. Los platos se incubaron a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24 \text{ h} \pm 2\text{h}$. Las colonias características de coliformes fueron confirmadas transfiriéndolas al caldo BGLB 2% (*Brilliant Green Lactose Bile*) e incubadas a 35°C por 24 y 48 horas para la producción de gas.

3.7.3. Recuento de hongos y levaduras

Para el recuento de hongos se utilizó el medio de cultivo *Potato Dextrose Agar* de Oxoid y para las levaduras se utilizó *Malt Agar* de BBL™. Se incubaron a 25° C por 5 días.

3.8. Análisis sensorial

Se realizó una prueba triángulo para evaluar el sabor de la mezcla hecha con dos variedades de calabaza *Cucurbita moschata*: Soler y Taína dorada. A cada panelista se le entregaron tres muestras de la mezcla horneada en forma de bizcocho, de las cuales, dos muestras eran idénticas y una era diferente. El panelista debía identificar cuál de las tres muestras era la diferente, qué grado de diferencia encontraba (leve, moderada o gran diferencia), cuál era la característica más importante en la que encontró diferencia y cuál producto le parecía más aceptable (**Apéndice X**).

3.9. Análisis estadístico

Análisis de varianza (ANOVA) y regresión lineal simple fueron usados para determinar diferencias significativas entre muestras, lotes y días, con un nivel de significancia de 5% utilizando *Minitab* 15.1.20.0, 2007.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis fisicoquímico

4.1.1. Análisis de pH

El pH de la mezcla sin la adición de ácido ascórbico presentó un pH promedio de 5.93. Este valor hace que el producto sea considerado uno poco ácido, por lo cual, se hace necesario convertirlo en un alimento acidificado. Al adicionar el ácido ascórbico se acidificó el producto logrando un pH inferior a 4.6. El objetivo de esta acidificación es asegurar que en el alimento no ocurra crecimiento de bacterias patógenas o producción de sus toxinas, especialmente *Clostridium botulinum* [20, 33].

Para el día 0 el pH promedio de la mezcla fue de 4.57 para los lotes 1 y 2, y de 4.56 para el lote 3. Se tomaron lecturas de cada lote a las 24 horas manteniéndose los valores en promedio iguales, esto mismo ocurrió durante el día 7 de muestreo lo que indica que los ingredientes en el producto alcanzaron un pH final en equilibrio <4.6 . Durante los siguientes días de almacenamiento se observa una tendencia a la disminución de los valores de pH, como se aprecia en **Figura 10**. El pH de la mezcla al último día de almacenamiento osciló entre 4.11 y 4.14. Esta disminución del pH se debe en parte a la acumulación de desechos metabólicos que se producen cuando los microorganismos utilizan los nutrientes presentes en el alimento como carbohidratos, lípidos y proteínas. Además, la flora nativa de la calabaza incluye bacterias acidolácticas, las cuales por las condiciones ácidas del producto pueden proliferar y disminuir significativamente el pH [1, 53]. La misma tendencia en los valores fue encontrada por Gliemmo *et al* [54] en purés de calabaza con pH no ajustado y ajustado

a 5.0, donde el pH disminuyó a 4.32 después de algunos días de almacenamiento como una consecuencia del crecimiento de bacterias acidolácticas.

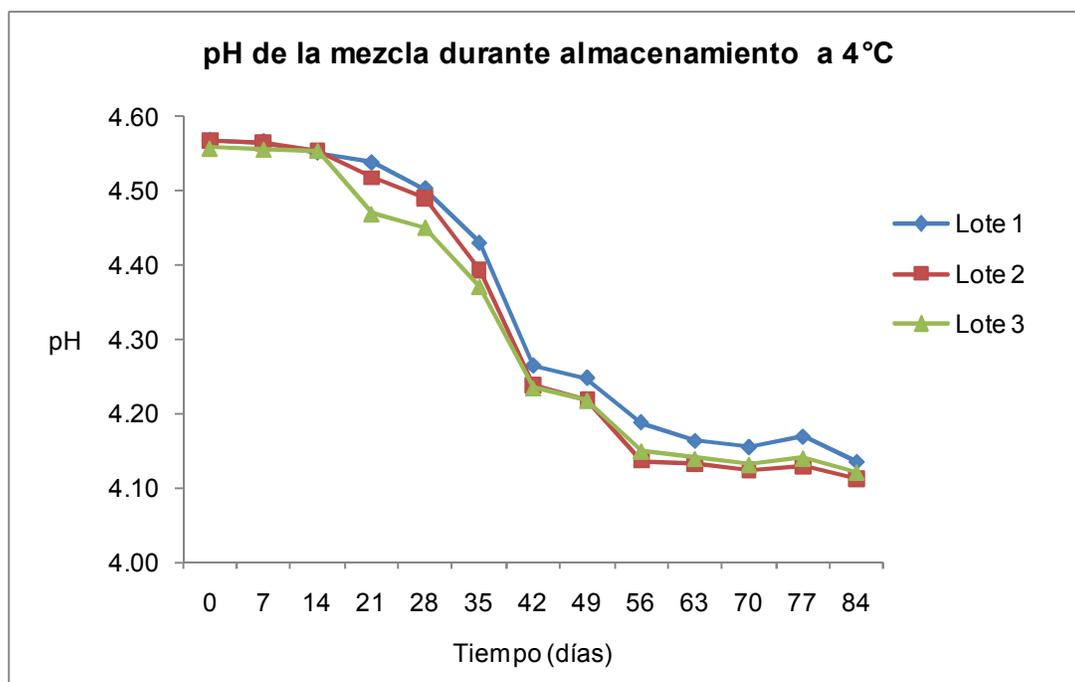


Figura 10. pH de la mezcla durante almacenamiento a 4°C

Al realizar el análisis estadístico no se observan diferencias significativas entre las muestras de un mismo lote ($p= 0.20$), pero si existen diferencias significativas entre lotes y días ($p< 0.05$). Es de esperar que esto ocurra entre los días de almacenamiento por la razón que se explicó anteriormente. En cuanto a los lotes, estas diferencias pueden deberse a los valores de pH que pueda tener la calabaza, el cual oscila entre 4.80 a 5.20 según la literatura [33]. Estudios preliminares mostraron un pH de 5.0 a 5.2. Aunque las calabazas utilizadas en el procesamiento de las mezclas son de una misma cosecha, pueden existir diferencias en el valor de pH y el contenido de sólidos solubles. Además, los procesos de calor afectan el pH de la calabaza. Sistrunk y Cash [55], en

un estudio con calabazas escaldadas, reportaron que las calabazas que no fueron escaldadas y las escaldadas por 3 minutos tuvieron un pH más bajo que aquellas escaldadas por más tiempo. Escalada, de *et al* [1] reportó un pH de 5.77 después de escaldar la calabaza por 8 minutos. La calabaza luego de escaldado presentó un pH entre 6.0 a 6.2. Gliemmo *et al*, reportó que el puré de calabaza presentó un pH de 6.10 y un contenido de sólidos solubles de 10.5 [17]. Estas diferencias pueden afectar el pH de la mezcla, aunque éste haya sido ajustado, ya que limita el crecimiento de algunas bacterias que durante el almacenamiento pueden cambiar el pH de la mezcla.

Considerando el hecho de que los factores que afectan son días y lotes junto con sus interacciones, se creó una regresión matemática para esas variables con un análisis de varianza, el cual reflejó que los lotes y la interacción día y lote no son significativos en comparación con los días y el valor de p es >0.05 (**Apéndice B**). Por lo tanto, las diferencias que existen en los valores de pH entre los lotes no afectan el producto, es solo a través del tiempo de almacenamiento que la mezcla se ve afectada.

En el almacenamiento a temperatura de 7°C se observa la misma tendencia a la disminución de los valores de pH que a 4°C , como se muestra en la **Figura 11**. Según el análisis estadístico no existen diferencias significativas en cuanto a la temperatura de almacenamiento ($p= 0.078$), por tanto, ésta no influye en los valores de pH de la mezcla (**Apéndice C**).

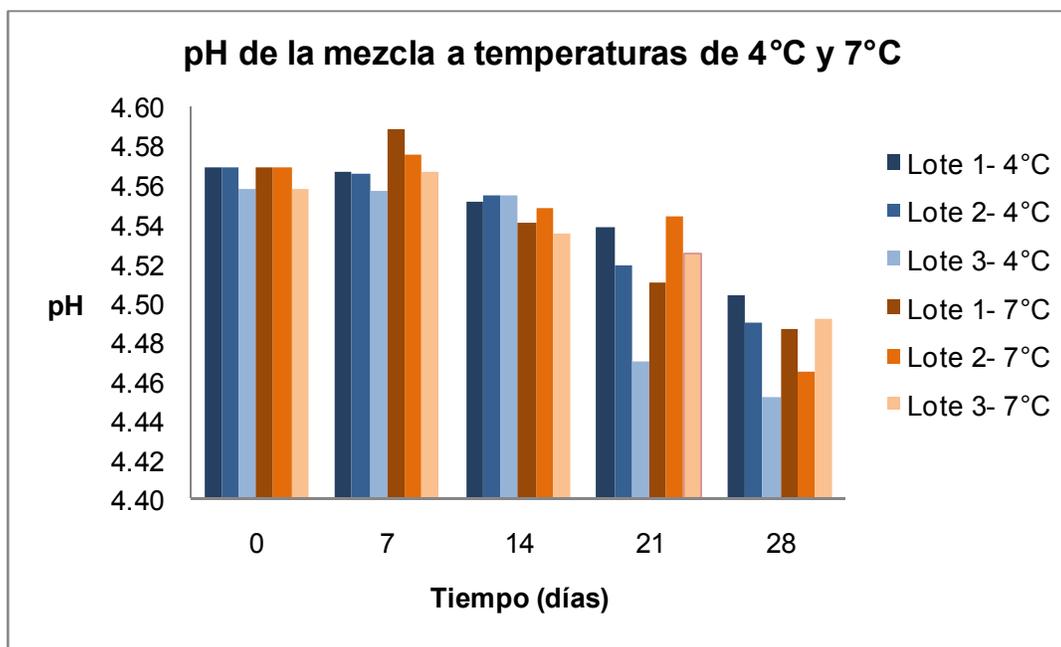


Figura 11. pH de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C

4.1.2. Análisis de la actividad de agua

Los alimentos de alta humedad tienen un rango de a_w de 0.90 a 0.999 y generalmente contienen un 50% (p/p) de agua [33]. A estos valores, los alimentos son muy sensibles al crecimiento microbiano, esto es porque la actividad de agua mide el agua libre, disponible para ser utilizada por los microorganismos y para que se puedan llevar a cabo las reacciones bioquímicas relacionadas al deterioro.

La mezcla presentó una actividad de agua (a_w) el día 0 de 0.9780, 0.9789 y 0.9732 en lotes 1, 2 y 3 respectivamente. Debido a este valor, el producto se considera de alta humedad. En la **Figura 12** se observa que los valores de a_w disminuyeron si se compara el primer y el último día de muestreo, sin embargo, la reducción de estos valores no es tan marcada por lo que el alimento sigue conservando un valor alto de a_w . Para el día 84, los valores aún caen en el rango de alimentos de alta humedad,

como también, por encima del mínimo requerido para el crecimiento de bacterias que causan deterioro ($a_w = 0.90$) [33]. Las variaciones que se presentan a través del tiempo de almacenamiento pueden relacionarse con la humedad relativa del ambiente, la cual estuvo en un rango de 60% a 90% durante el tiempo de muestreo, y esto puede reflejar que el alimento gane o pierda humedad hasta encontrar el equilibrio con el ambiente en donde se encuentra [33].

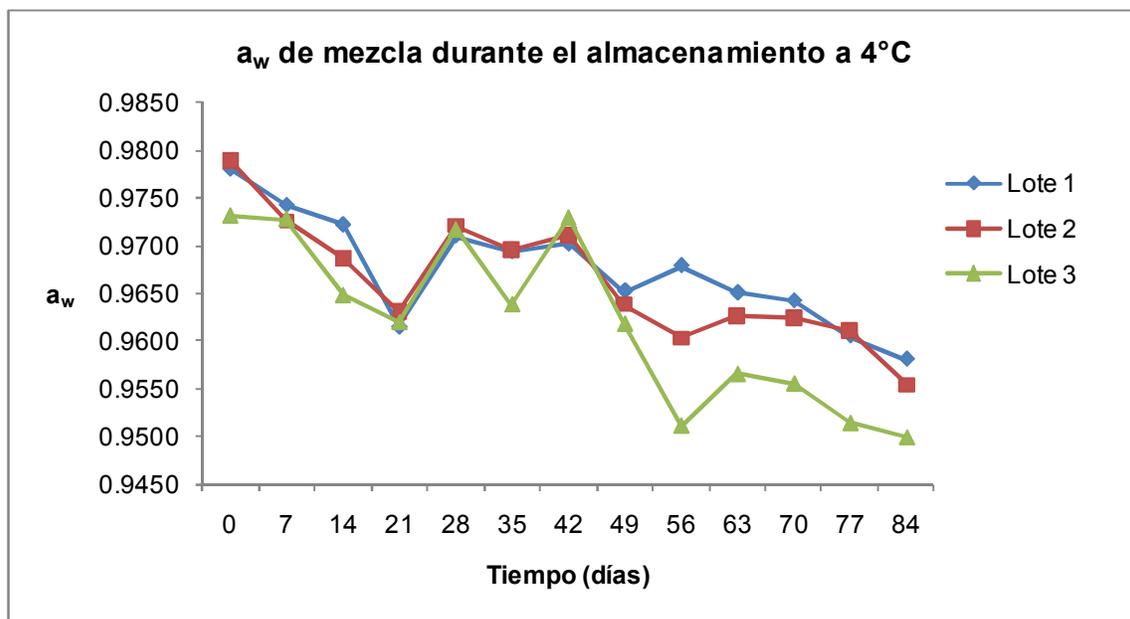


Figura 12. Actividad de agua (a_w) de la mezcla durante almacenamiento a 4°C

Existen muchas razones para explicar esta tendencia de disminución. El agua interactúa con ingredientes del producto como el almidón en la harina de trigo y el azúcar, y estos tienen la capacidad de absorber agua disminuyendo la presión de vapor y reduciéndose el a_w ; generalmente estas interacciones son por enlaces polares [56]. Igualmente, la actividad de agua del alimento también se ve influenciada por las distintas reacciones químicas que ocurren y la utilización del agua libre por los

microorganismos. Por otro lado es importante recalcar que a partir del día 42 se presentó separación de fases observándose agua en la superficie de la mezcla, indicando un efecto de sinéresis; esto también influye en la disminución del a_w y en el deterioro de la calidad del producto. La goma usada como estabilizante ejerce una buena función en cuanto a la prevención de la sinéresis, sin embargo, en algunos casos se usa la combinación de gomas para mejorar la estabilidad del producto.

El análisis estadístico reflejó diferencias significativas entre muestras, lotes y días y sus interacciones ($p < 0.05$), pero al realizar un análisis de regresión y su respectivo ANOVA (**Apéndice D**) para estos parámetros no se observan diferencias significativas ($p > 0.05$), por lo tanto, se puede decir que aunque la actividad de agua disminuye a través del tiempo de almacenamiento, la variación es mínima y no afecta el producto.

La temperatura de almacenamiento tampoco influyó en la actividad de agua del producto ya que no se reflejaron diferencias significativas según el análisis estadístico ($p = 0.654$) (**Apéndice E**). Al comparar las temperaturas de almacenamiento, como se aprecia en la **Figura 13**, se observa que los valores de a_w a 7°C son muy similares a los de 4°C para los días 0, 7 y 14, mientras que para el día 21 son más altos y para el día 28 son más bajos. Esta divergencia también puede ser debida a diferencias en la humedad relativa del ambiente. En general, las variaciones de los valores de a_w en ambas temperaturas a través del tiempo son mínimas y tienden a disminuir.

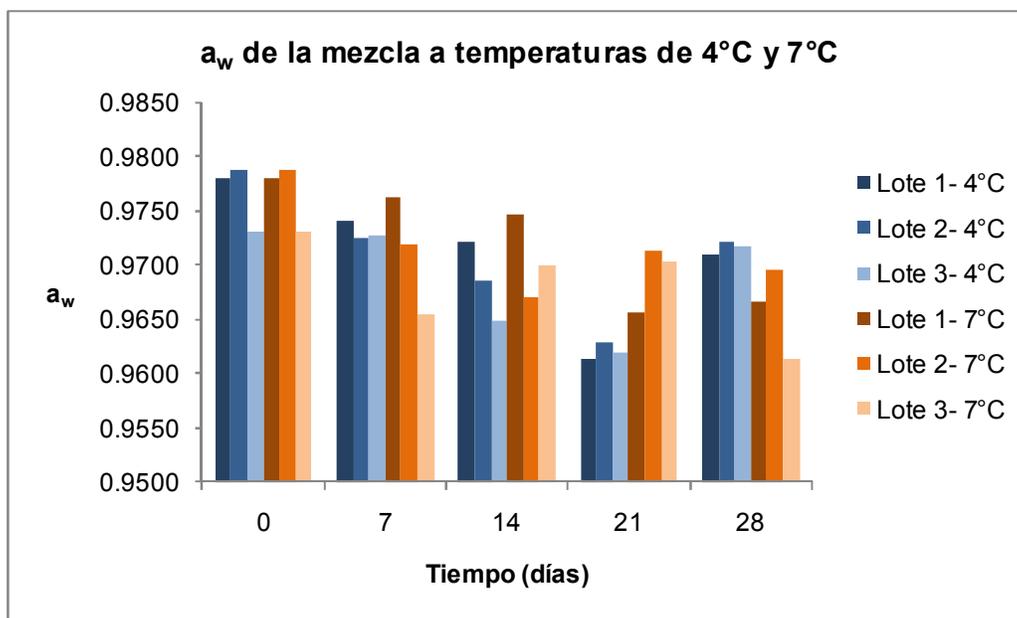


Figura 13. Actividad de agua (a_w) de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C

4.1.3. Análisis del potencial óxido reducción (Eh)

El potencial óxido reducción es un factor determinante en la presencia de microorganismos aerobios o anaerobios. Valores positivos favorecen el crecimiento de microorganismos aerobios, mientras que los valores negativos favorecen a los anaerobios [33].

Los valores de Eh en el día 0 fueron en promedio de 146.2 mV. Este valor positivo refleja que el producto brinda un ambiente oxidado permitiendo el crecimiento de aerobios. Al pasar el tiempo de almacenamiento se observa una tendencia a la disminución de los valores de Eh, como lo muestra la **Figura 14**. A partir del día 42 los valores de Eh tienden a estabilizarse y están cercanos a los 100 mV. Durante el crecimiento microbiano, el potencial redox del ambiente decrece debido al consumo del oxígeno por la flora microbiana y la formación de compuestos reductores en el

ambiente [57]. Aunque los valores de Eh disminuyen, siguen siendo positivos favoreciendo el crecimiento de aerobios o anaerobios facultativos.

La disminución del potencial redox en la mezcla también puede deberse a la presencia del ácido ascórbico en el producto el cual reduce el oxígeno presente en la cámara de aire del empaque, como también a la oxidación del sorbato de potasio y de los carotenoides. Esto fue observado por Gliemmo *et al* [17] en puré de calabaza empacado en polietileno .

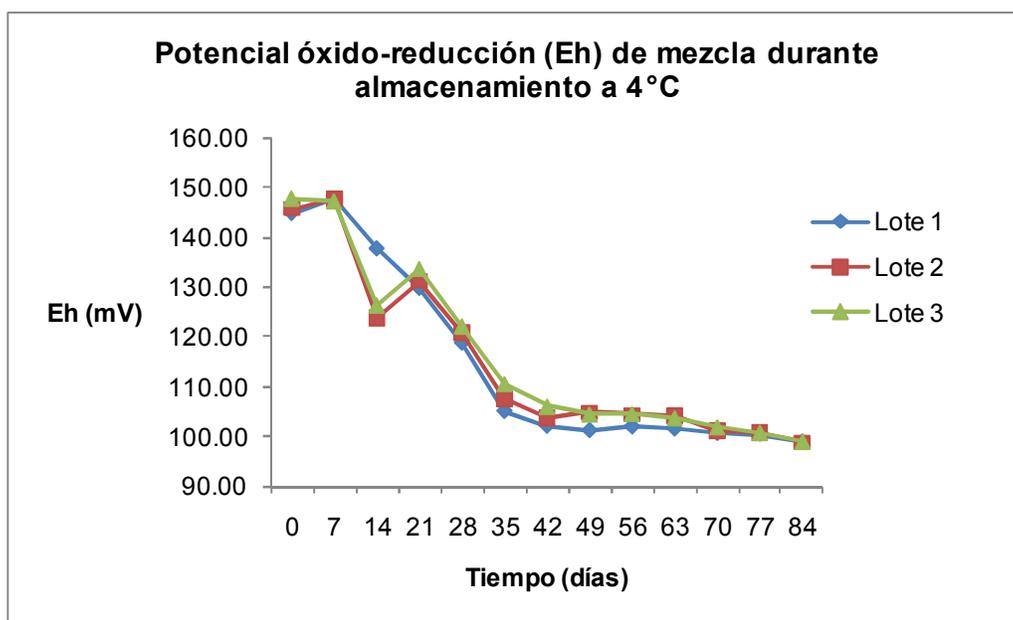


Figura 14. Potencial óxido reducción de la mezcla durante almacenamiento a 4°C

El análisis estadístico refleja que no existen diferencias significativas en las muestras de un mismo lote ($p= 0.055$), en cambio para los días y lotes el valor de p es <0.05 , por lo que hay diferencias significativas. En adición también se observó que hay un efecto en los lotes con un leve incremento en los valores de Eh cuando pasamos del lote 1 al 3, sin embargo la diferencia es mínima. Esto se apreció numéricamente al

realizar una ecuación de regresión lineal general de los días y lotes con su interacción, donde no hubo diferencias significativas en los lotes ($p= 0.872$) y en sus interacciones (**Apéndice F**), por tanto podemos decir que el Eh solo se ve afectado al transcurrir los días de almacenamiento.

En cuanto a la temperatura de almacenamiento, si existen diferencias significativas entre las diferentes temperaturas ($p < 0.05$) (**Apéndice G**) por lo que ésta tiene un efecto en la mezcla. Esto puede ser como consecuencia de la mayor rapidez con que se presentan las reacciones de deterioro del producto (mencionadas anteriormente) y el crecimiento microbiano a 7°C , consumiéndose el oxígeno más pronto que a temperatura de 4°C , como se observa en la **Figura 15**. Si se comparan los valores se observa que son más bajos a temperatura de 7°C que a 4°C , pero el comportamiento es el mismo en ambas temperaturas.

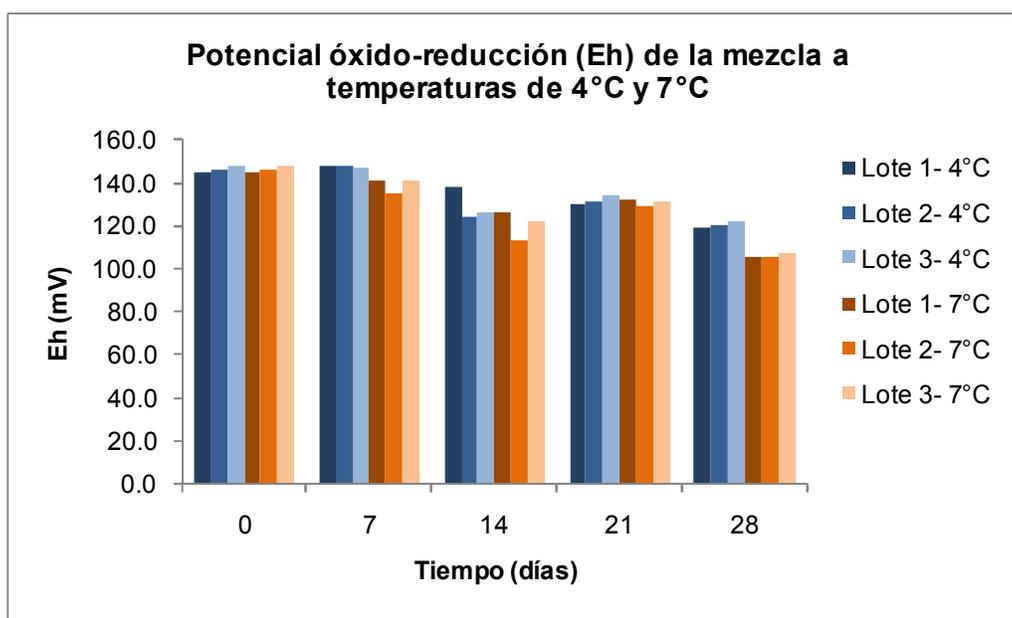


Figura 15. Potencial óxido reducción de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C

4.1.4. Análisis del color

El color es uno de los principales atributos relacionados a la calidad y uno de los que más tiene en cuenta el consumidor al momento de seleccionar un alimento. Se utiliza como un indicador del deterioro biológico y/o fisicoquímico del alimento y como una medida de la calidad [44].

El color en los alimentos está relacionado por factores externos como el empaque, el procesamiento, la luz y por factores internos como la presencia de pigmentos naturales en el alimento. De todos los ingredientes de la mezcla, el color está dado por el puré de calabaza. En la calabaza, el color es dado por la presencia de los pigmentos carotenoides proporcionándoles colores entre amarillos y anaranjados. La estabilidad del color es influenciada en el producto por la degradación de estos pigmentos y la acción del ácido ascórbico como antioxidante.

Durante el almacenamiento los parámetros de color *L*, *a*, *b*, *Hue* y *Chroma* en la mezcla disminuyeron significativamente ($p < 0.05$). La mezcla llegó a ser más oscura, perdiendo color amarillo y rojo. Estos mismos resultados fueron observados por Gliemmo *et al*, [17] en purés de calabaza a medida que incrementaba el tiempo de almacenamiento. Según Gliemmo *et al*, durante la elaboración y procesamiento del puré de calabaza se mejora la biodisponibilidad del β -caroteno ya que se rompe la estructura celular de la planta, lo que hace que el pigmento esté más expuesto a las reacciones de degradación, lo que conlleva a una disminución del color del alimento durante el almacenamiento.

4.1.4.1. Análisis para el parámetro L

El oscurecimiento de la mezcla está representado con los valores del parámetro L . Los valores promedios encontrados para el día 0 corresponden a 67.71, 68.57 y 68.67 para los lotes 1, 2 y 3 respectivamente, y a través del tiempo se observó una disminución de los valores (**Figura 16**). Según Dutta *et al* [23] esto es debido a la degradación de pigmentos que originan compuestos que reducen la luminosidad. Por otro lado, el oscurecimiento de la mezcla puede estar relacionado a reacciones enzimáticas que originan compuestos marrones, como también a pardeamiento no enzimático debido a las reacciones de oxidación del ácido ascórbico [58]. También se observa que entre lotes, los valores de L son más altos en el siguiente orden: lote 3, lote 2 y lote 1. Esto se debe al propio color de la calabaza. Aunque las calabazas son de la misma cosecha y tienen el mismo tiempo de maduración, se observaron diferencias en color, unas más anaranjadas y más oscuras que otras.

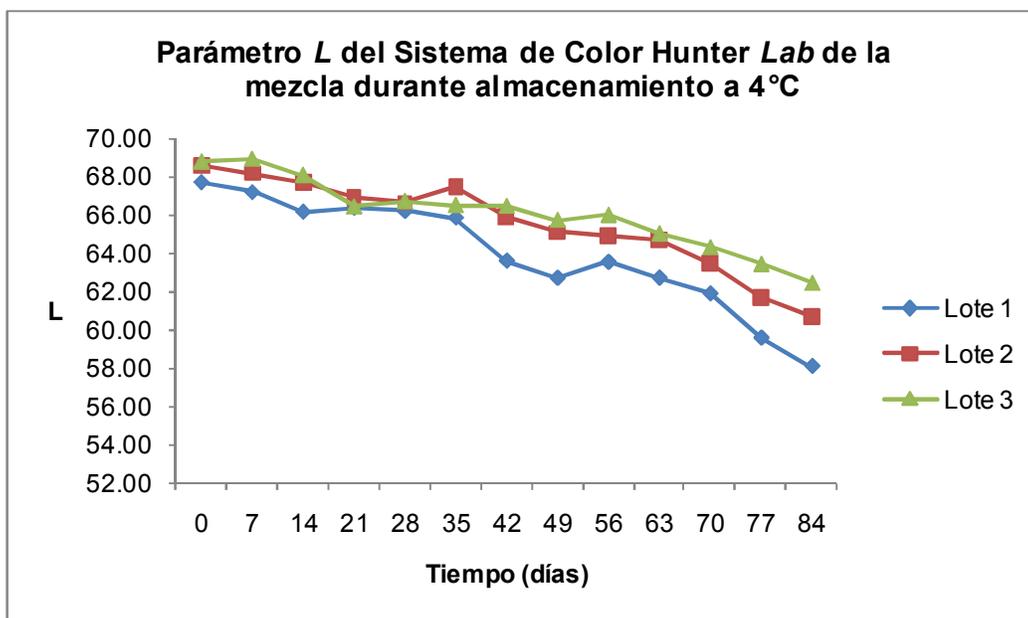


Figura 16. Parámetro de color L de la mezcla durante almacenamiento a 4°C

Las medidas de L^* para los factores día, muestra y lote fueron significantes según el análisis estadístico ($p < 0.05$), pero al realizar el análisis de regresión y su respectivo ANOVA no se muestran diferencias significativas entre lotes ($p = 0.093$) y muestras ($p = 0.346$), por lo tanto, la diferencia que pueda existir entre los lotes no afecta significativamente el producto (**Apéndice H**), es a través de los días que el parámetro L se ve afectado.

Igualmente, la temperatura de almacenamiento también influye en los valores de luminosidad de la muestra. El análisis estadístico para temperatura refleja diferencias significativas ($p < 0.05$) para parámetro L (**Apéndice I**). Las mezclas almacenadas a 7°C presentaron un oscurecimiento más rápido que aquellas almacenadas a 4°C, esto puede observarse en la **Figura 17**, donde los valores son semejantes entre las dos temperaturas hasta el día 14, pero luego disminuyen mucho más a 7°C y esto es debido a que a una temperatura más alta se van a presentar más rápido los cambios

que puedan ocurrir en el alimento por las reacciones químicas y de oxidación. La refrigeración a 4°C o a una temperatura menor retardan la actividad enzimática y las reacciones de deterioro que ocasionan cambios en el color, textura y sabor de los alimentos; a medida que aumenta la temperatura de abuso, mas rápido se presentan estos cambios [59, 60]. Estas diferencias en el oscurecimiento de la mezcla también se pudieron apreciar de manera visual.

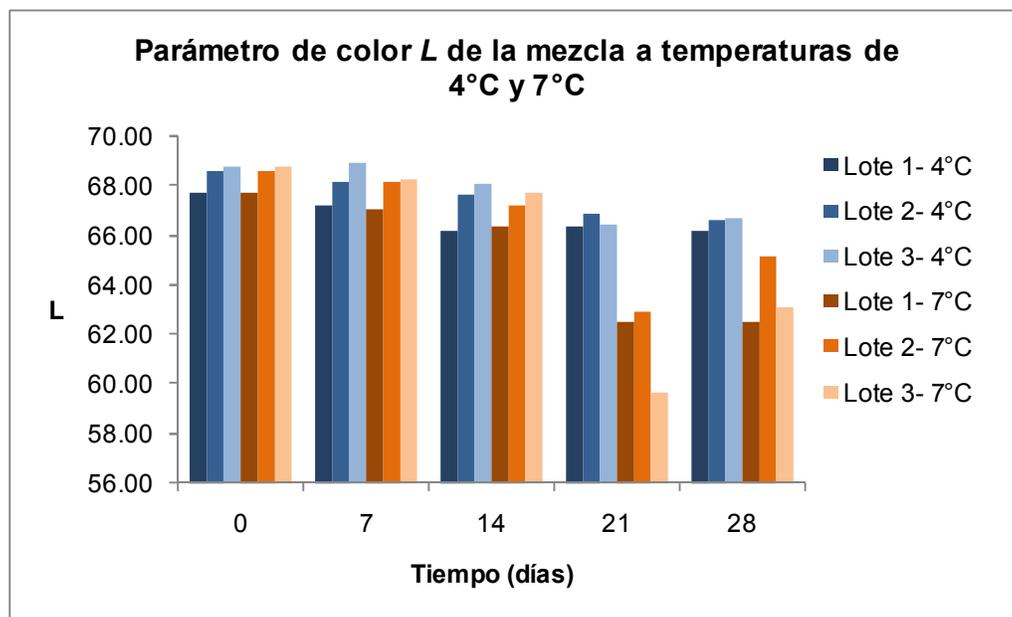


Figura 17. Parámetro de color *L* de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C

4.1.4.2. Análisis para el parámetro *a*

Con respecto al parámetro *a*, en la **Figura 18** se puede observar que la tendencia de los valores no presenta una variación tan marcada como en el caso de *L*. El lote 1 presenta valores más altos que los lotes 2 y 3, con valores iniciales de 13.86, 10.16 y 10.51 respectivamente y fueron correlacionados con color rojo por ser valores positivos. Estos valores generalmente se mantuvieron estables durante el tiempo de

almacenamiento reportándose valores para el último día de muestreo de 12.90 para el lote 1, 10.86 para el lote 2 y 10.06 para el lote 3. En la misma gráfica se puede apreciar esta diferencia, y como se mencionó anteriormente, la variación en los colores de las calabazas utilizadas en cada lote explica este comportamiento. Gliemmo *et al* [17] reportó que la adición de ácido ascórbico a purés de calabaza empaquetados con polietileno a un pH de 4.0 protegió al color rojo e incrementó la pérdida de color amarillo, como observado en la mezcla de calabaza. Meléndez-Martínez *et al* [61] también reportó que en jugos de naranja almacenados bajo congelación la isomerización de un grupo 5,6-epoxi en violaxantina para dar luteoxantina produjo un ligero aumento en el valor de *a* y un descenso en el valor de *b*; estos carotenoides están presentes en calabazas *Cucurbita moschata* según reportado por otros autores [16, 62]. Es posible que en la mezcla ocurra esta isomerización y su subsecuente efecto en los valores de *a* y *b*.

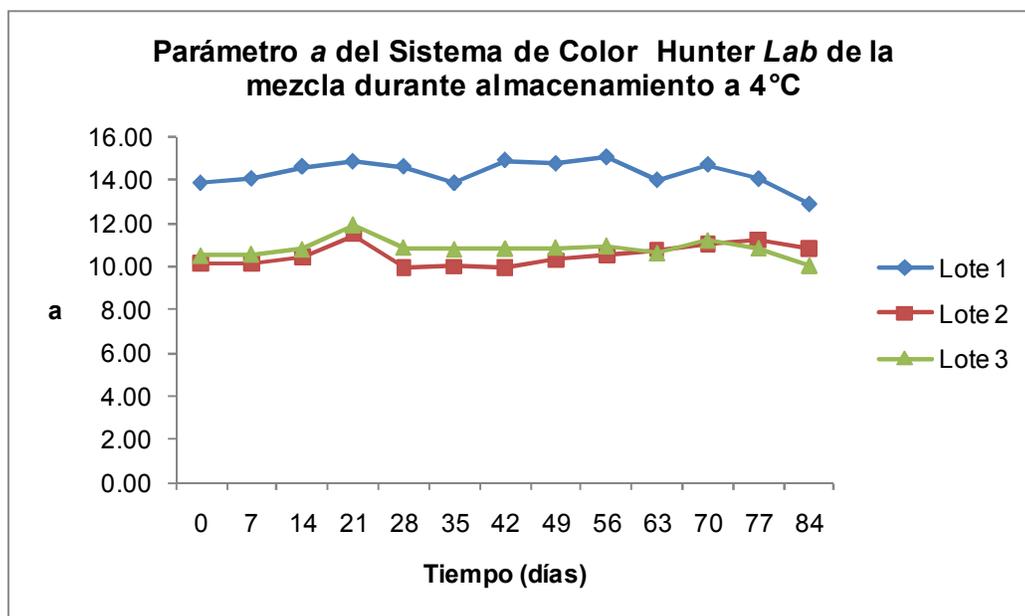


Figura 18. Parámetro de color a de la mezcla durante almacenamiento a 4°C

Los valores del parámetro *a* guardan la misma tendencia durante el tiempo de almacenamiento en ambas temperaturas (**Figura 19**), aunque los valores de los lotes 2 y 3 a 7°C son más altos que a 4°C y solamente para el día 21 el lote 1 es más alto a 7°C. Esto indica que a 7°C la mezcla retiene más el color rojo, lo que pudiera estar relacionado a la isomerización de algunos carotenoides.

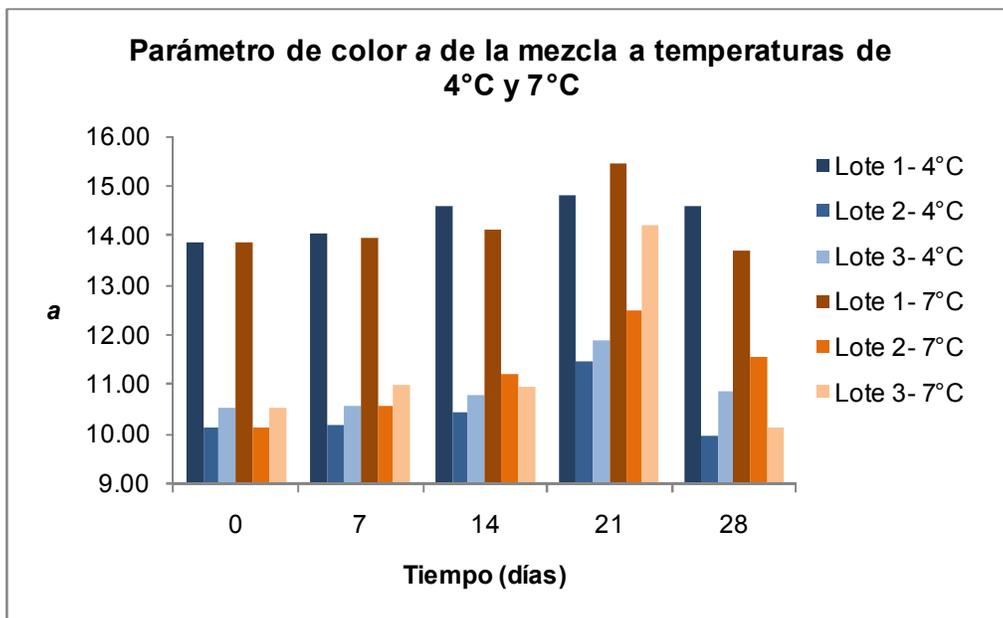


Figura 19. Parámetro de color a de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C

4.1.4.3. Análisis para el parámetro b

Como el color de la mezcla va de acuerdo a color amarillo, el parámetro b se considera importante para describir la degradación del color de la mezcla. Los valores se mantuvieron durante todo el tiempo de almacenamiento entre 30.0 y 50.0, siendo valores positivos, por lo cual están asociados al color amarillo. La disminución en los valores es moderada, como se observa en la **Figura 20**. Las mezclas tienden a ser menos amarillas a través del tiempo. Se observó que el lote 1 presentó los valores más altos, lo que indica que las calabazas usadas para su procesamiento fueron más amarillas que las utilizadas en los otros lotes.

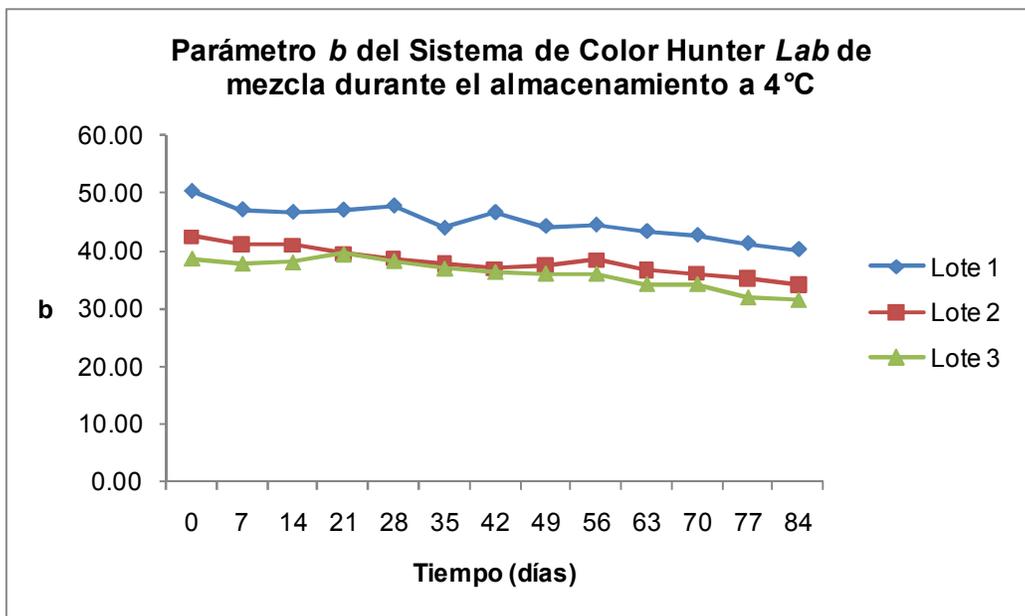


Figura 20. Parámetro de color *b* de la mezcla durante almacenamiento a 4°C

El parámetro de color *b* a diferentes temperaturas se observa en la **Figura 21** donde se aprecia que prácticamente se mantienen los valores muy cerrados en las dos temperaturas hasta el día 14. Para el día 21 a temperatura de 7°C estos son más bajos que los encontrados a 4°C, lo que significa que la mezcla tiende a ser menos amarilla; es posible que la isomerización de algunos carotenoides que pudiera ocurrir en la mezcla a esta temperatura influya en la pérdida de color amarillo y favorezca la retención de color rojo.

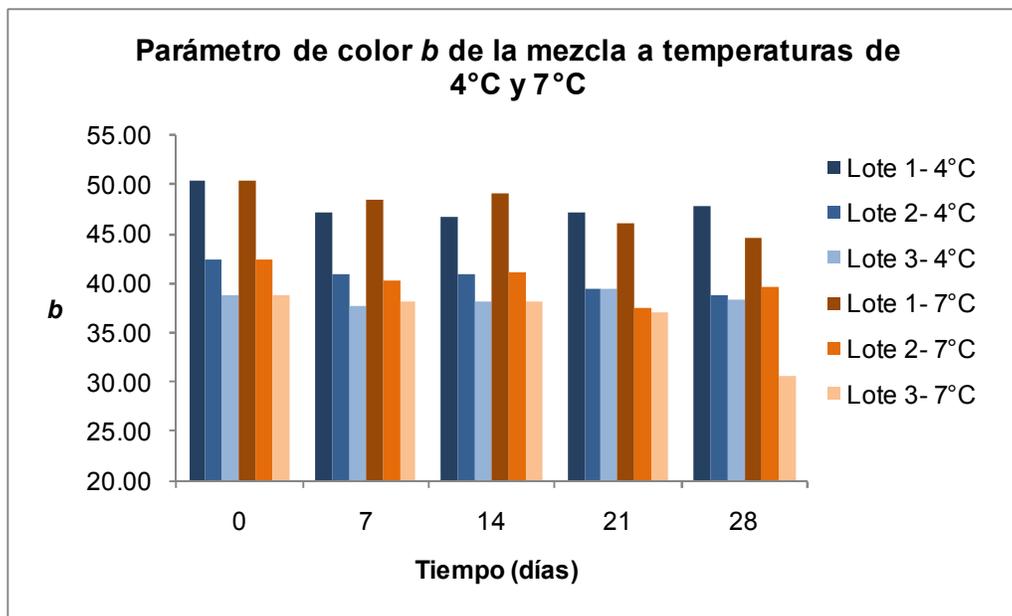


Figura 21. Parámetro de color b de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C

Para los parámetros de color a y b no se realizó análisis de varianza debido a que éste asume que los componentes son variables independientes. Estos parámetros no son independientes, ya que dependen de L , por lo tanto es recomendado calcular *Hue* y *Chroma*, que junto con L es posible realizar un ANOVA. [51].

4.1.4.4. Análisis para el parámetro *Hue*

El valor de *Hue* (h°) corresponde a si el objeto en estudio es rojo, anaranjado, amarillo, verde, azul o violeta. La mezcla de calabaza fue asociada con valores promedio de h° para el día 0 de 74.62° para el lote 1, 76.53° para el lote 2 y 74.81° para el lote 3, los cuales se sitúan en el primer cuadrante (valores positivos de a y b) y corresponden a color anaranjado según el plano de coordenadas cartesianas de color L , a y b [44, 51]. Los valores de h° disminuyeron a medida que transcurrían los días (

Figura 22), pero siempre fueron más altos en el siguiente orden: lote 2, lote 3, lote 1, lo que refleja que la mezcla pierde color siguiendo el mismo orden en los lotes. Existen diferencias significativas entre muestras, días y lotes ($p < 0.05$), aunque al realizar el análisis de regresión lineal general para los factores y sus interacciones se observó que el efecto de las muestras es despreciable ($p = 0.308$) y que h° solo se ve afectado con los días y los lotes, y esto puede deberse a las mismas diferencias encontradas en el color de las mezclas por lotes (**Apéndice J**). Los valores de h° para el último día de muestreo fueron 72.19° , 72.32° y 72.23° para los lotes 1, 2 y 3 respectivamente. Aún con estos valores la mezcla sigue siendo anaranjada, sin embargo, según las coordenadas de color, ésta pierde color amarillo y retiene color rojo.

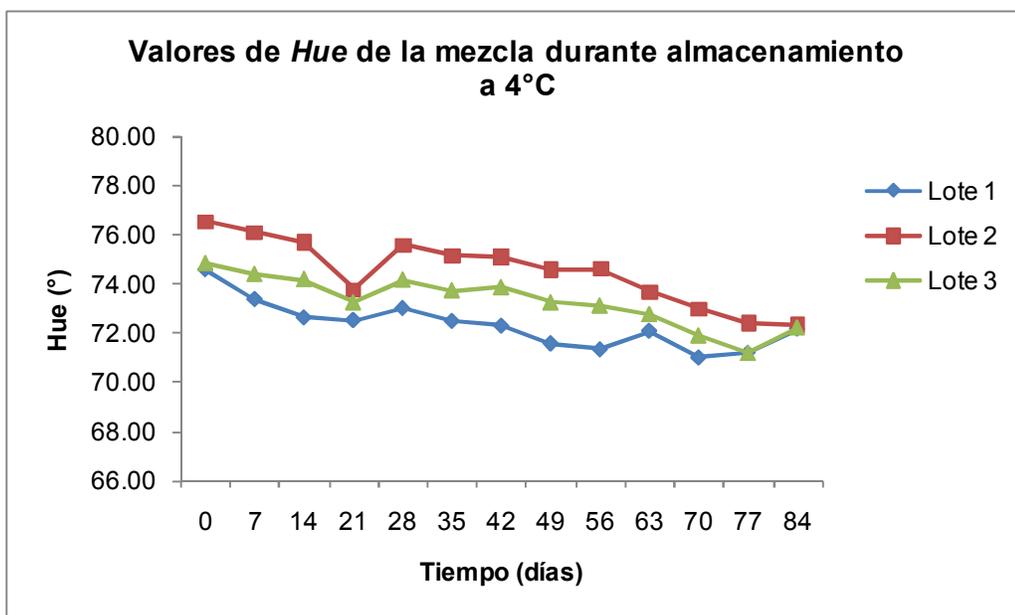


Figura 22. Valores de *Hue* de la mezcla durante almacenamiento a 4°C

Itle y Kabelka [63] observaron de manera subjetiva que el color de las calabazas fue consistente con los valores de *Hue*. Bajos valores de *Hue* corresponden a color naranja y altos valores de *Hue* a color amarillo, con un promedio en las calabazas estudiadas de 77.5° correspondientes a color anaranjado. Subjetivamente, las calabazas utilizadas en esta investigación correspondían más a color amarillo-anaranjado, por tanto, la mezcla va a poseer similares características; objetivamente los valores de *Hue* encontrados para la mezcla concuerdan ya que están más cercanos a un ángulo de 90° (amarillo) que a 0° (rojo).

El comportamiento de *Hue* a temperaturas de 4°C y 7°C mostró diferencias significativas según el análisis estadístico ($p < 0.05$) (**Apéndice K**), por tanto la temperatura de almacenamiento si tiene un efecto en el color de la mezcla. En la Figura 23 se puede observar que los valores de *hue* guardan similitud hasta el día 14, pero para el día 21 ya se observa una marcada diferencia donde los valores a una temperatura de 7°C son más bajos que a 4°C por lo que el deterioro de la calidad del producto a temperatura de abuso se hace más evidente de una manera más temprana.

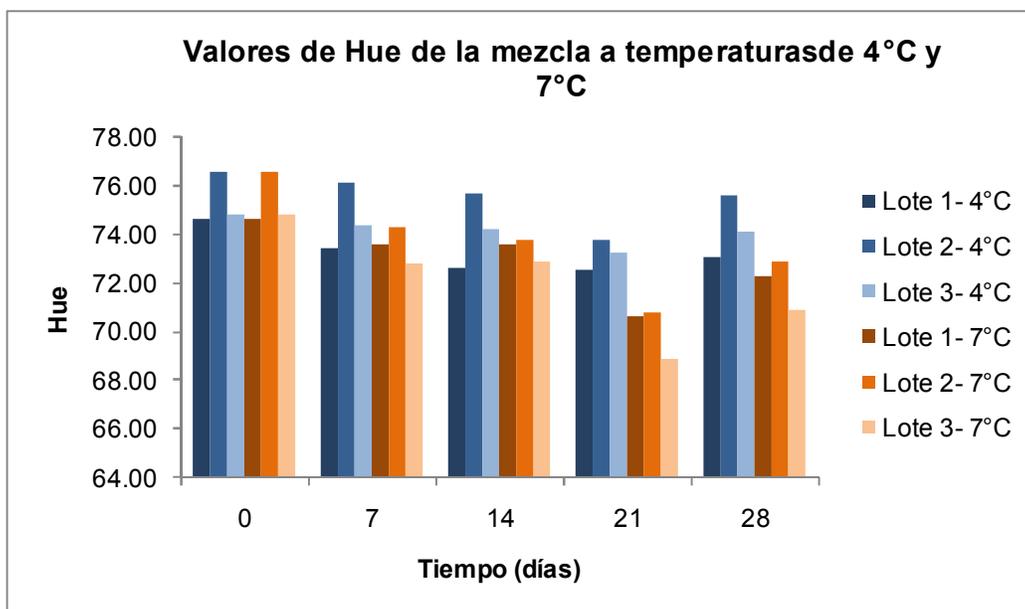


Figura 23. Valores de *Hue* de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C

4.1.4.5. Análisis para el parámetro *Chroma*

En el caso del parámetro *Chroma*, los valores fueron disminuyendo a través del tiempo de almacenamiento, como lo muestra la **Figura 24**. Se observaron diferencias significativas tanto en muestras como en días y lotes (**Apéndice L**). Con el análisis de regresión lineal, no hay diferencias significativas en los días ($p= 0.402$) lo que indica que *Chroma* varía altamente con las muestras y los lotes.

Los valores en el día 0 para lotes 1, 2 y 3 fueron 52.35, 43.61 y 40.11 respectivamente, indicando que existe una alta intensidad en el color de la mezcla la cual se fue perdiendo al pasar el tiempo terminando las mezclas con valores promedios de 42.18, 35.77 y 32.96 para lotes 1, 2 y 3 respectivamente. Esto puede estar asociado a la degradación de los carotenoides por oxidación lo cual ayuda a atenuar el color naranja intenso. Esto mismo fue observado en purés de zanahorias por Talcott y Howard [64] , quienes reportaron que la disminución en los valores de *Chroma* del puré

están asociados al descenso del pH, de los compuestos fenólicos y de los carotenoides totales.

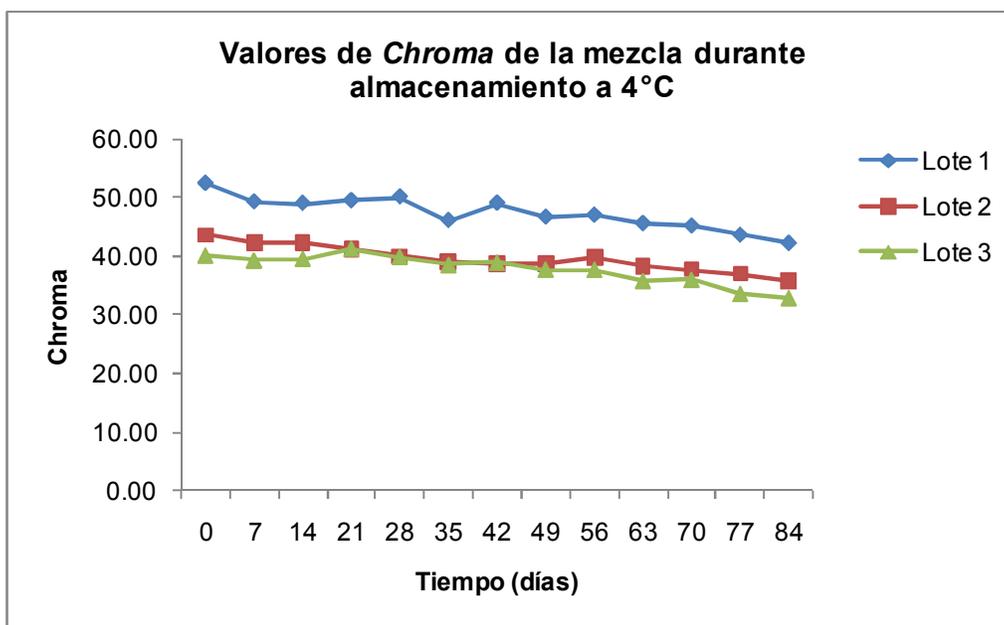


Figura 24. Valores de *Chroma* de la mezcla durante almacenamiento a 4°C

La **Figura 25** muestra los valores de *Chroma* de la mezcla a las diferentes temperaturas. A 7°C los valores de *Chroma* aumentaron para el día 7 en los lotes 2 y 3, excepto el lote 1. Para el día 14 se mantienen constantes y luego disminuyen. Si se comparan con los valores de 4°C se observa que son más altos a 7°C excepto por el lote 1. Esto indica que la mezcla tiene una mayor intensidad en su color a temperatura de 7°C y puede deberse a las reacciones de pardeamiento enzimático que llevan a producir pigmentos que oscurecen y hacen más intenso el color del producto. Se observaron diferencias significativas en la temperatura para el parámetro *Chroma* ($p < 0.05$), por tanto ésta sí tiene un efecto en la mezcla durante el almacenamiento (**Apéndice M**).

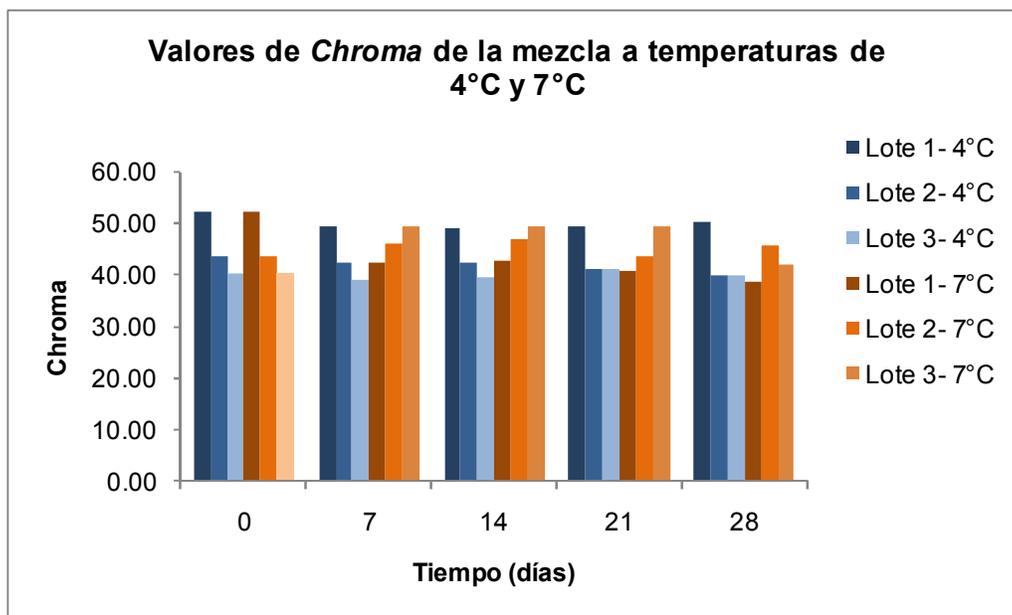


Figura 25. Valores de *Chroma* de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C

4.1.5. Análisis de carotenoides

El contenido de carotenoides totales de las calabazas crudas utilizadas para el procesamiento de la mezcla fue en promedio 62.40 µg/g. Estos valores se encuentran en término medio dentro de los valores reportados por otros autores. Itle y Kabelka[63] reportaron valores en diferentes variedades de *C. moschata* de 1.1 µg/g a 42.3 µg/g en calabazas cultivadas en Florida, USA. Hidaka *et al*, reportaron valores de 23.40 µg/g en *C. moschata* de Japón [16]. Pandey *et al*, reportaron valores de 23.4 µg/g a 148.5 µg/g en *C. moschata* de la India [11]. Shi *et al*, reportaron 148.8 µg/g de carotenoides totales extraídos con etanol [65]. Según de Carvalho *et al*, [66] (en prensa), dos cultivares de *C. moschata* de Brasil presentan valores de 234.21 µg/g y 404.98 µg/g, y son similares a los encontrados por otros autores quienes reportan, según citado por de Carvalho,

valores de 100.50 a 365.40 $\mu\text{g/g}$, y corresponden a variedades de *C. moschata* del noreste y sur de Brasil [67]. Estos valores de carotenoides son más altos que los reportados por otros autores. Pueden existir diferencias cualitativas y cuantitativas de carotenoides aún dentro de la misma especie y variedad debido a la influencia de los factores en el ambiente en el que crecen las calabazas como los nutrientes, el suelo, el clima, la cantidad de luz solar, la temperatura, la etapa de maduración y la poscosecha [18, 19, 62, 68, 69]. Por otro lado, durante el almacenamiento poscosecha la biosíntesis de los carotenoides continua produciéndose un incremento del β -caroteno, por lo cual a medida que la calabaza es más madura, mayor será su contenido de β -caroteno [70]. Todo lo anterior explica el hecho que los valores encontrados de carotenoides totales en calabazas difieran según regiones.

Tabla 2. Contenido de carotenoides totales ($\mu\text{g/g}$) en calabaza cruda, puré de calabaza y mezclas del día 0

Lote	Calabaza cruda	Puré	Mezcla Día 0
1	63.38	72.26	64.72
2	61.71	73.25	62.87
3	62.12	72.84	62.32

Al comparar el contenido de carotenoides en la calabaza cruda con los del puré (**Tabla 2**) en los diferentes lotes se puede observar un aumento en los valores, lo que indica que el procesamiento de la calabaza mediante cocción produjo un incremento en el contenido de carotenoides. Estos mismos resultados fueron reportados por Azizah *et*

al, [71] donde el contenido de β -caroteno y licopeno de la calabaza aumentaron después de cocción a 100°C por un tiempo de 2, 4 y 6 minutos; observándose un mayor incremento a 4 minutos (4.2 veces más). Según MacDougall [72], el escaldado y los tratamientos de calor moderados cerca de los 100°C por un corto tiempo pueden incrementar el contenido de carotenoides, esto es como consecuencia de una mejor extracción debido a disrupción celular, pérdida de humedad e inactivación de las enzimas que oxidan el caroteno. Mientras que tratamientos de calor muy severos, a temperaturas más altas, conlleva a la degradación de carotenoides por procesos de isomerización. La calabaza fue sometida en este estudio a proceso de cocción a 100°C por 15 minutos. Según Chandler y Schwartz [73], citado de MacDougall [72] el contenido de β -caroteno en tiras de batata aumentó un 4% después de escaldado en agua a 100°C, y según Thompson *et al*, [74] citado de MacDougall [72] el contenido de licopeno en tomate no cambió después de cocinado a 100°C por 16 minutos. Según Rodríguez-Amaya [75] los carotenoides en la naturaleza pueden encontrarse en forma cristalina o disueltos en gotas de aceites o en complejos con proteínas, y protegidos por la estructura celular. Una vez que éstos son sometidos al calor, se produce la desnaturalización de las proteínas y el rompimiento de la célula, liberándose al alimento y favoreciendo su biodisponibilidad. Además, se debe tener en cuenta que la naturaleza hidrofóbica de los pigmentos carotenoides no permite que éstos se filtren tan fácilmente en el agua durante la cocción.

Los valores en la mezcla para el día 0 fueron 64.72 $\mu\text{g/g}$ en el lote 1, 62.87 $\mu\text{g/g}$ en el lote 2 y 62.32 $\mu\text{g/g}$ en el lote 3. Estos valores son más bajos comparados con los

del puré (**Tabla 2**), sin embargo hay que tener en cuenta que la mezcla posee otros ingredientes, lo que hace que la concentración de carotenoides sea más baja.

Durante el período de almacenamiento se observó una disminución del contenido de carotenoides en la mezcla, como lo muestra la **Figura 26**. Esta disminución fue gradual hasta el día 63, donde se observan valores de 52.76 µg/g, 51.21 µg/g y 49.80 µg/g en lotes 1, 2 y 3 respectivamente. Para el día 70 se observa un descenso bien marcado a 42.69 µg/g en el lote 1, 41.09 µg/g en el lote 2 y 42.44 µg/g en el lote 3, y estos se mantuvieron hasta el último día de muestreo. No se presentaron diferencias significativas entre muestras ($p= 0.364$) pero si entre lotes y días ($p < 0.05$) según el análisis de varianza (**Apéndice N**). Estas diferencias que existen entre lotes radican en la utilización de diferentes calabazas, que, aunque son de la misma cosecha, su contenido de carotenoides varía de un fruto a otro. En cuanto a los días, las variaciones en los resultados demuestran que los carotenoides sufren procesos de degradación en la mezcla a través del tiempo de almacenamiento. La acidificación de la mezcla juega un papel crucial en ello. Los carotenoides sufren reacciones de isomerización debido a la presencia de ácidos en el alimento, especialmente los epoxicarotenoides [21]. Generalmente el pH neutral hace que los carotenos sean más estables [55].

Teniendo en cuenta los valores encontrados en el día 0 podemos decir que la mezcla presenta un buen contenido de carotenoides y que a pesar de la disminución en la concentración, para el día 84 los valores siguen siendo buenos.

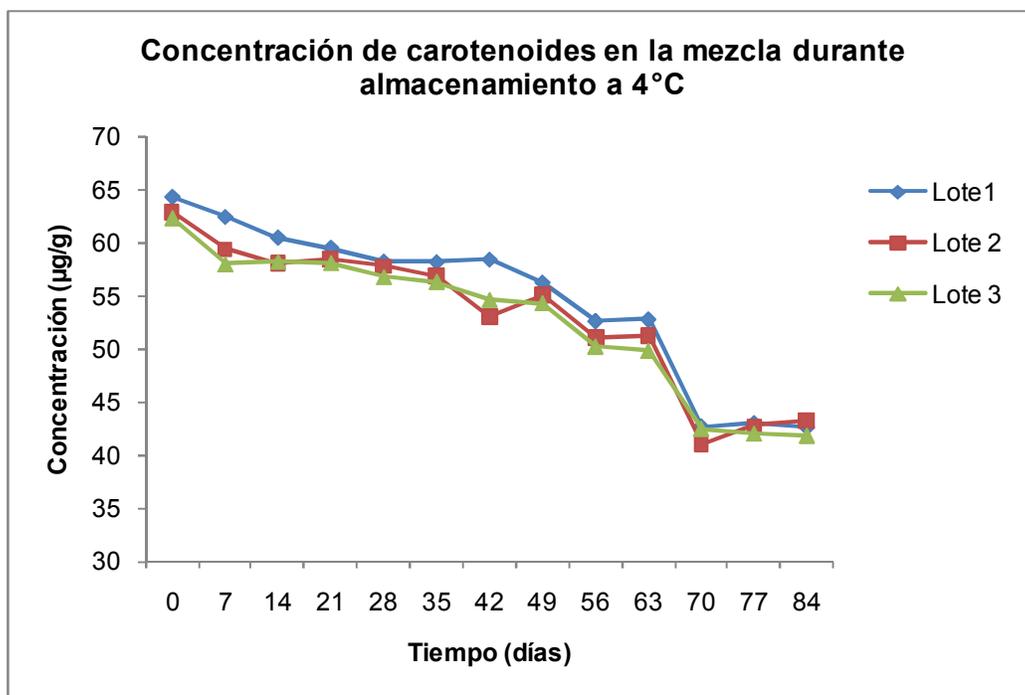


Figura 26. Concentración de carotenoides en la mezcla durante almacenamiento a 4°C

Como se ha mencionado, los procesos de isomerización y oxidación de los carotenoides durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos conllevan a pérdidas del color y de su actividad como provitamina A; además, hay producción de compuestos volátiles que cambian el sabor en algunos alimentos. Los carotenoides *trans* son más estables y más comunes en los alimentos, mientras que los carotenoides *cis* son formados durante el procesamiento de estos. Las reacciones de oxidación dependen de la presencia de oxígeno, luz, enzimas, metales, co-oxidación con lípidos, antioxidantes y los pro-oxidantes [68, 69]. De estos procesos de isomerización y oxidación se forman epoxicarotenoides, apocarotenoides e hidroxicarotenoides, los cuales son compuestos con cadena de carbono corta, y éstos a su vez se transforman en compuestos de bajo peso molecular sin ningún tipo de actividad biológica [68, 75].

En relación al color, el efecto de la oxidación e isomerización de los carotenoides causa en la mezcla una decoloración, por lo que también se observó la disminución de los valores de *L*, *Hue* y *Chroma*. Es importante tener en cuenta que las bandejas estaban almacenadas de forma tal que una quedaba encima de otra, esto se aprecia en la **Figura 8**. Las bandejas que se encontraban en la parte de abajo tienden a sufrir menos degradación de carotenoides por efecto de la luz, como también pueden conservar una temperatura un poco más fría que aquellas que tienen su parte superior expuesta al aire.

Diversos autores han estudiado la relación que existe entre la concentración y el contenido de carotenoides con el color de la calabaza. Murkovic *et al* [76] estudió el contenido de carotenoides en diferentes variedades de calabazas y reportó que la visualización del color correlaciona muy bien con el contenido de carotenoides. Las variedades con alto contenido de carotenos mostraron un color anaranjado y aquellas con alto contenido de luteína y bajo en caroteno mostraron un color amarillo brillante. Itle y Kabelka [63], en las observaciones subjetivas de colores que hicieron a las calabazas *C. moschata* encontraron que aquellas con color rojo-anaranjado tenían concentraciones de carotenoides de 42.3 µg/g y aquellas con color amarillo-anaranjado opaco tenían 26.8 µg/g, por lo que sus observaciones de color concuerdan con la concentración.

El ácido ascórbico, como antioxidante, ejerce un efecto estabilizante en los carotenoides, pero esto es dependiente del pH y del tipo de material de empaque. Según Gliemmo *et al* [17] a pH 4.0 en polietileno, la degradación del ácido ascórbico en

puré de calabaza es más alta que a pH 5.0 alcanzando niveles residuales, lo que conlleva a que actúe como un pro-oxidante en vez de un antioxidante. En este caso, la degradación de los carotenoides toma lugar. Además, es probable que exista una competencia por el oxígeno entre las reacciones de oxidación del ácido ascórbico y de los carotenoides produciéndose una disminución en el color.

Los carotenoides son influenciados por la temperatura de almacenamiento. A bajas temperaturas se disminuye la descomposición de los carotenoides, mientras que al aumentar la temperatura de almacenamiento, las formas *trans* de los carotenoides, especialmente α -caroteno, β -caroteno y luteína, disminuyen [21, 68]. Según Shi *et al*, [65] un incremento en la temperatura resulta en un incremento en la isomerización de compuestos biológicamente activos especialmente el β -caroteno. El análisis de varianza para efecto de la temperatura de almacenamiento mostró que existen diferencias significativas entre ambas temperaturas ($p < 0.05$) (**Apéndice O**). En la **Figura 27** se puede observar que el comportamiento de la concentración de carotenoides a través del tiempo es el mismo en ambas temperaturas, con una tendencia a la disminución, pero con la diferencia que a 7°C la concentración cae más rápido que a 4°C en el mismo tiempo.

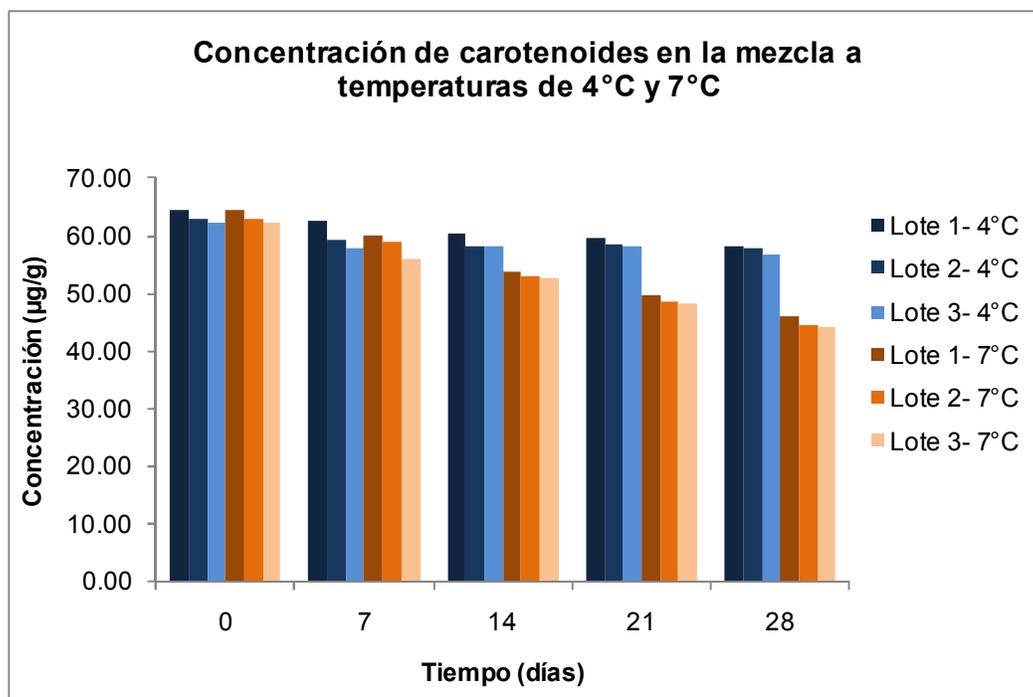


Figura 27. Concentración de carotenoides de la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C

Aunque en este estudio no se identificaron los carotenoides presentes en la mezcla, se citan aquí los carotenoides encontrados en variedades de *Cucurbita moschata* reportados por algunos autores: α -caroteno, β -caroteno, ζ -caroteno, violaxantina, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, taraxantina, luteoxantina, auroxantina, neoxantina, licopeno [13, 15, 16, 62, 76]. No todos los carotenoides tienen actividad provitamina A; entre los que la tienen están: α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno y β -criptoxantina [68].

4.1.6. Análisis proximal

La

Tabla 3 muestra la composición proximal de la mezcla en base seca, con excepción de la humedad.

Tabla 3. Composición proximal de la mezcla

Componentes	Porcentaje (%)
Humedad	58.57 ± 0.49
Proteínas	2.68 ± 0.20
Grasas	6.47 ± 1.35
Cenizas	0.76 ± 0.06
Carbohidratos	29.88 ± 1.36
Fibra	1.64 ± 0.21

Como se había mencionado anteriormente, el 58.57% de la mezcla es agua, por tanto es considerado un producto de alta humedad (>50%). La calabaza cocida tiene un 93.69% de agua [77], para lo cual hay que considerar que la mezcla tiene otros ingredientes que van a cambiar el porcentaje del contenido de agua y del resto de macronutrientes evaluados en análisis proximal.

Las grasas contenidas en la mezcla corresponden al 6.47%. El aporte de lípidos a la mezcla está dado por la margarina y el huevo. En la calabaza cocida, las grasas encontradas son de 0.07% [77], el cual se considera un valor bajo.

La mezcla tiene un 2.68% de proteínas, y la calabaza cocida, 0.72% [77]. Este valor es más alto por el aporte de proteínas de los demás ingredientes, en especial, el huevo.

Las cenizas se refieren a los residuos inorgánicos que quedan luego de la ignición de la materia orgánica [51]. Son importantes porque representan el contenido total de minerales presentes en el alimento. La mezcla tiene un 0.76% de cenizas. La

pulpa de calabaza cruda (*C. moschata*) tiene un 0.4% de cenizas [25] y la calabaza cocida (*Cucurbita spp*) 0.62% [77].

El contenido de carbohidratos para la mezcla es de 29.88% y para la calabaza cocida es de 4.9% [77]. Ingredientes como la harina de trigo y el azúcar hacen un gran aporte de carbohidratos a la mezcla.

La fibra total encontrada en la mezcla corresponde a un 1.64%. La calabaza cocida presenta un 1.1% de fibra total [77]. El aporte de fibra en su mayor parte lo brinda la harina de trigo.

4.2. Análisis microbiológico

4.2.1. Análisis del recuento de aerobios totales

La carga bacteriana inicial promedio para la mezcla en todos los lotes fue de 2.50 Log UFC/g, lo que indica que las mezclas tienen una calidad higiénica adecuada. El incremento en el número de microorganismos fue observado hasta el día 28 alcanzando los 4.06 Log UFC/g en el lote 1, 4.02 Log UFC/g en el lote 2 y 4.10 Log UFC/g en el lote 3.

El análisis de varianza reflejó que existen diferencias significativas entre muestras, días y lotes ($p < 0.05$) (**Apéndice Q**). Es de esperar que esto ocurra en los días debido a que el número de bacterias aumenta con el tiempo de almacenamiento. En cuanto a los lotes y muestras, la diferencia puede radicar en la carga microbiana que pueden llevar al producto los distintos ingredientes y su disposición en la mezcla. No se pudo realizar análisis de regresión debido al comportamiento fluctuante de los valores.

La **Figura 28** muestra la curva de crecimiento de las bacterias aeróbicas en la mezcla para los tres lotes. La fase *Lag* o exponencial concuerda con una leve disminución de los valores de pH, y a medida que las bacterias entraban a la fase estacionaria, el decline del pH fue mayor. Las condiciones de pH del medio no favorecen el crecimiento de la mayoría de bacterias, pero sí de aquellas que toleren condiciones acídicas, como el caso de las bacterias acidolácticas (BAL), las cuales son flora endógena de la calabaza [53]. Según Jay [33], cuando las bacterias se encuentran en su pH óptimo hay un incremento en la fase *Lag*. La flora propia de la calabaza también es parte de la mezcla al adicionar el puré, aunque, el número de microorganismos incorporados son menores por el tratamiento de cocción de ésta antes de procesar la mezcla. Sin embargo, si las bacterias acidolácticas están presentes en el producto pueden generar antagonismo para otras bacterias por varios factores como, producción de ácido láctico, producción de antibióticos y bacteriocinas, producción de peróxido de hidrógeno, disminución del pH y de los nutrientes [33].

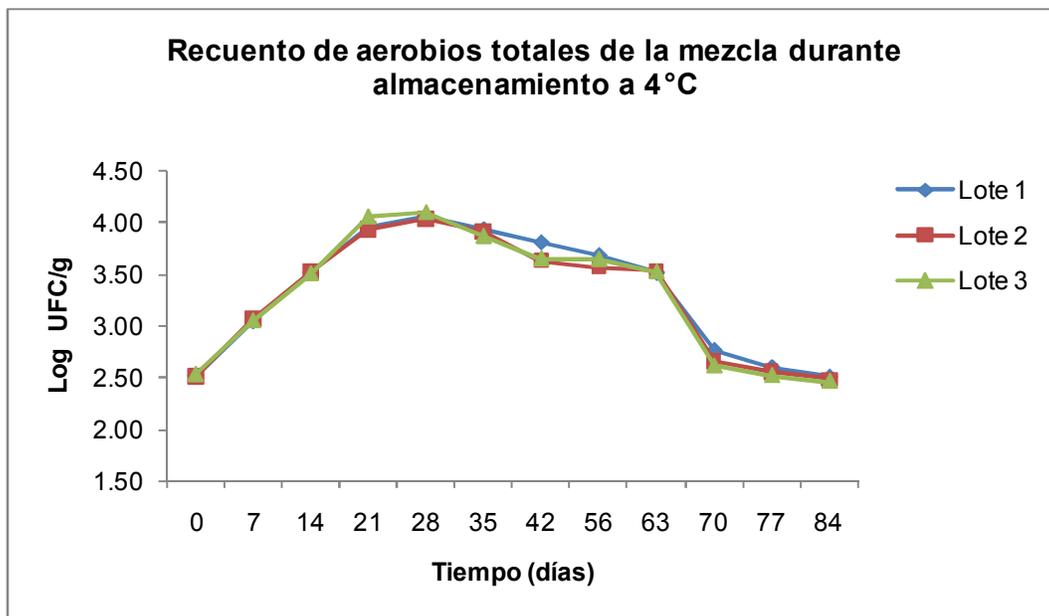


Figura 28. Recuento de aerobios totales en mezcla durante almacenamiento a 4°C

El efecto del sorbato de potasio también juega un papel crucial en inhibir el crecimiento de bacterias. Según Gliemmo *et al* [54], la adición de sorbato de potasio al puré de calabaza inhibió la población de aerobios, hongos y levaduras en aproximadamente 4 ciclos Log después de 12 días de almacenamiento a 25°C comparado con el puré sin sorbato de potasio. Esto no se observó en las bacterias acidolácticas, las cuales son más resistentes a la acción del preservativo, especialmente a pH de 4.5 [33].

Gutiérrez-López *et al* [53] en su estudio realizado con calabaza mínimamente procesada y envuelta en una película de almidón de yuca que contenía sorbato de potasio y con pH acidificado, reportaron que la flora aerobia mesofílica decreció 2 ciclos Log, mientras que los hongos y levaduras y las bacterias acidolácticas aumentaron significativamente después del almacenamiento. Esto confirma la resistencia que tienen las BAL frente al preservativo.

Aunque los recuentos fueron más altos en el día 29, el número alcanzado no representa condiciones de mala calidad sanitaria en el producto, además no se hallaron condiciones de deterioro a esa fecha. Según Gram *et al* [78], el deterioro de alimentos por microorganismos está relacionado a crecimientos con recuentos entre 10^7 a 10^9 UFC/g. A partir del día 42 se presentó deterioro físico visible manifestado por agua en la superficie de la mezcla. No hubo presencia de malos olores en la mezcla durante todo el tiempo de almacenamiento (84 días).

La temperatura de almacenamiento es uno de los parámetros más importantes que afecta el deterioro de alimentos perecederos. Es bien conocido que el abuso de temperatura favorece el crecimiento microbiano en los alimentos. Algunos microorganismos no crecen bien en alimentos refrigerados debido a sus características mesofílicas, pero pueden mantenerse viables en el alimento y si la temperatura aumenta pueden llegar a proliferarse [20]. Otros son de naturaleza psicrófila los cuales crecen bien a temperaturas de refrigeración y pueden causar deterioro a 5°C-7°C, donde los más comúnmente encontrados en la mayoría de alimentos son de los géneros *Pseudomonas* y *Enterococcus* [33].

La **Figura 29** muestra el crecimiento de microorganismos aerobios a temperaturas de almacenamiento de 4°C y 7°C. En ella se puede observar que hay un gran incremento en la carga microbiana a 7°C, alcanzando los 7 Log UFC/g. El análisis de varianza reflejó diferencias significativas ($p < 0.05$) (**Apéndice R**) entre ambas temperaturas, por tanto el almacenamiento del producto en condiciones de refrigeración a 4°C o por debajo es crucial para evitar el desarrollo de microorganismos.

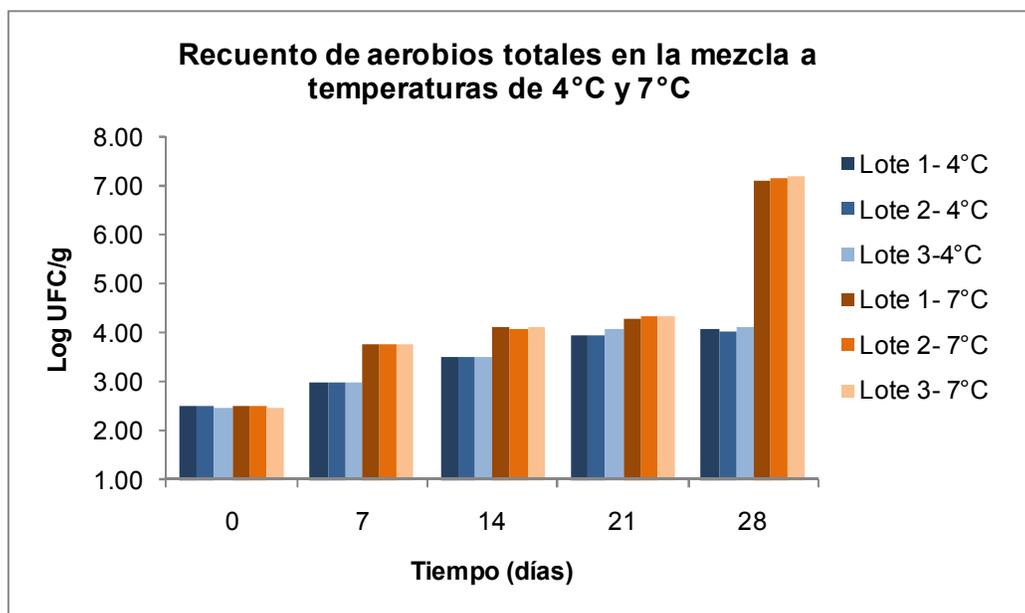


Figura 29. Recuento de aerobios totales en la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C

Sampedro *et al* [79] estudió el largo de vida de una bebida hecha de jugo de naranja y leche almacenada a temperaturas de 8-10°C y observaron un incremento de 4 a 6 Log UFC/mL en el conteo de bacterias, hongos y levaduras en muestras no tratadas y de 6 Log UFC/mL en muestras tratadas con pulso eléctrico y con tratamiento térmico a las 4 semanas de almacenamiento. Carlín *et al* [80] estudió la formación de esporas en purés de vegetales cocidos, pasteurizados y refrigerados y reportaron que la estabilidad de los purés de vegetales era fuertemente afectada cuando se incrementaba la temperatura de almacenamiento. El crecimiento de bacterias fue más rápido en purés almacenados a 10°C que a 4°C y los conteos de aerobios totales >5 Log UFC/g se alcanzaron en pocos días cuando se almacenaron los purés a temperaturas superiores a 4°C. Aunque estos estudios tienen procesos diferentes comparados con los realizados en esta investigación, se obtienen iguales resultados en

el crecimiento de microorganismos incrementando su número cuando el producto se almacena a temperaturas mayores a 4°C.

4.2.2. Análisis del recuento de coliformes

El recuento de coliformes en el día 0 y durante los demás días de almacenamiento en todos los lotes fue <10 UFC/g, es decir, no se detectaron coliformes en ninguno de los lotes. Es posible que el número de coliformes presentes en el producto sea muy bajo y no puede ser detectado. Esto es un buen índice de la calidad microbiológica del producto en cuanto a las prácticas sanitarias se refiere.

4.2.3. Análisis del recuento de hongos

Los hongos son microorganismos que pueden crecer en alimentos con muy bajo pH, hasta por debajo de 3.5 y con un mínimo de a_w de 0.80. Aunque los hongos son microorganismos asociados a deterioro produciendo en los alimentos malos olores, malos sabores y decoloración, su presencia en alimentos es de cuidado debido a la producción de toxinas por algunas especies [33, 81, 82]. Las condiciones que tiene el producto en sus características fisicoquímicas lo hacen muy susceptible al deterioro por hongos, no obstante, el sorbato de potasio tiene la finalidad de limitar este crecimiento.

El recuento de hongos para los días 0 y 7 en todos los lotes fue <1 Log UFC/g, como lo muestra la **Tabla 4**. A partir del día 14 los valores aumentaron levemente, y para el día 49 se alcanzaron los máximos valores: 1.48, 1.45 y 1.39 Log UFC/g en lotes 1, 2 y 3 respectivamente, aún así los recuentos no alcanzan 2 Log UFC/g. Para el último día de almacenamiento el recuento en todos los lotes fue 0 Log UFC/g. Similares

resultados fueron encontrados por de Escalada *et al*, [1] donde el crecimiento de hongos y levaduras en cilindros de calabaza *C. moschata* fueron <10 UFC/g después del día 7 de almacenamiento y el máximo encontrado fue de 100 UFC/g (2 Log UFC/g) y se observó después del día 45 de almacenamiento. Brekke y Tonaki [30] estudiaron puré de guayaba almacenado a 7°C por 2 meses, con un pH de 3.2 y conteniendo sorbato de potasio, y reportaron que el crecimiento de hongos fue visto ocasionalmente y con una baja frecuencia ($<1\%$).

Del análisis estadístico (**Apéndice S**) se observa que existen diferencias significativas entre las muestras y los días ($p < 0.05$), pero no en los lotes ($p = 0.077$). Sin embargo, el efecto que existe entre las muestras es muy pequeño comparado con el efecto existente entre los días. Por otra parte, no es posible hacer una regresión lineal debido a que el comportamiento del recuento de hongos varía mucho a través del tiempo de almacenamiento.

Tabla 4. Recuento promedio de hongos (Log UFC/g) durante almacenamiento a 4°C

Días	Log UFC/g		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
0	0.50	0.00	0.50
7	0.00	0.50	0.00
14	1.15	0.65	1.00
21	1.15	1.30	1.15
28	1.39	1.48	1.45
35	1.39	1.39	1.24
42	1.39	1.15	0.50
49	1.48	1.45	1.39
56	1.24	1.15	1.24
63	0.00	0.50	0.00
70	0.00	0.00	0.00
77	0.50	0.00	0.00
84	0.00	0.00	0.00

El bajo número de hongos en el producto puede deberse a un antagonismo causado por las bacterias acidolácticas las cuales pueden inhibir el crecimiento de hongos [83]. Este bajo recuento, así como la estabilidad de los valores ayudan a alargar la vida útil del producto, y a su vez, son un indicio de la función del agente preservativo y de la buena calidad sanitaria del producto. Durante el tiempo de almacenamiento no se observaron en el producto hongos que pudieran ser visibles y que fueran causa de deterioro.

A temperatura de almacenamiento de 7°C se observó un leve incremento en el recuento de hongos comparándolos con los de 4°C, como se muestra en la **Tabla 5**. Aún cuando existen diferencias significativas entre las dos temperaturas ($p < 0.05$) (**Apéndice T**) indicando que ésta influye en el crecimiento de hongos, los recuentos

no alcanzan los 2 Log UFC/g, por lo que siguen siendo bajos en el producto. No obstante, es importante tener en cuenta que la carga inicial de hongos en el producto no es significativa para producir deterioros en el mismo, pero si ésta fuera mayor, se pudieran alcanzar recuentos causantes de deterioro, por lo que es importante mantener el producto bajo temperaturas de refrigeración durante el almacenamiento que pudieran inhibir cualquier crecimiento de microorganismos.

Tabla 5. Recuento promedio de hongos (Log UFC/g) durante almacenamiento a 7°C

Días	Log UFC/g		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
0	0.33	0.00	0.33
7	0.33	0.33	0.50
14	0.83	1.00	0.83
21	1.33	1.20	1.23
28	1.54	1.52	1.54

4.2.4. Análisis del recuento de levaduras

Las levaduras son microorganismos un poco más exigentes que los hongos, ya que crecen a un rango de pH menos amplio que ellos y con un mínimo de a_w de 0.88. Para el día 0 los lotes tuvieron en promedio recuentos de levaduras de 1.52 Log UFC/g. Es probable que esta carga se deba a la presencia de levaduras en ingredientes como la harina de trigo la cual puede contener una amplia variedad de levaduras y de esta manera ser un vehículo para que entren al producto [81]. Al transcurrir los días estos valores aumentan, siendo los conteos más representativos aquellos entre los días 14 y 49, donde son >2 Log UFC/g (**Figura 30**). Se observan diferencias significativas según

el análisis estadístico para los días y lotes ($p < 0.05$), no siendo así entre las muestras ($p = 0.162$). Aunque exista una significancia entre los lotes, esa variación no es tan marcada comparada con los días, (**Apéndice U**) por tanto es a través de los días que el producto se ve más afectado en el crecimiento de las levaduras.

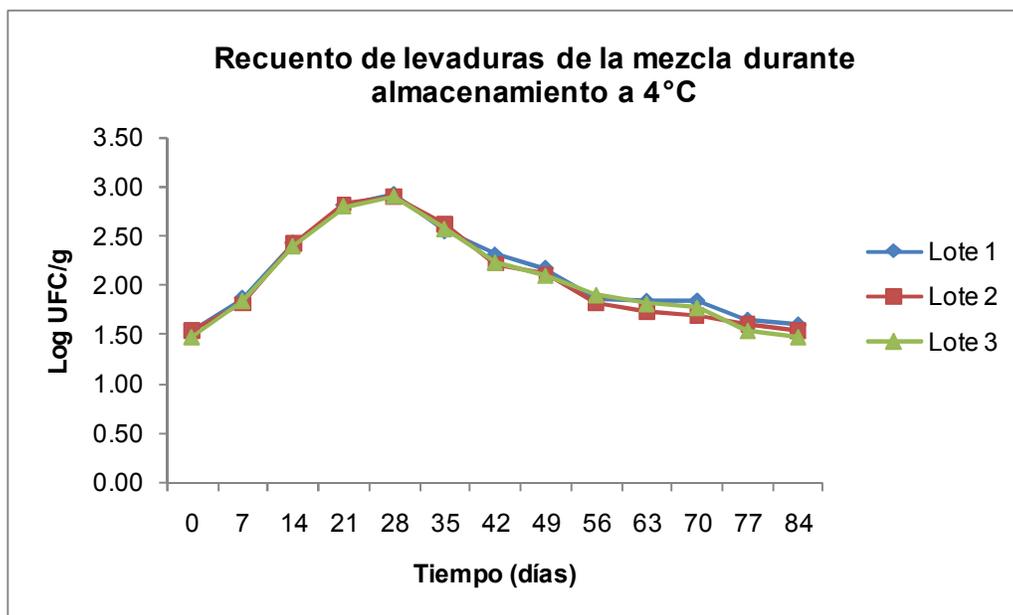


Figura 30. Recuento de levaduras en la mezcla durante almacenamiento a 4°C

La tendencia al aumento en el número de levaduras también fue observada por Gliemmo *et al* en puré de calabaza preservado por tecnologías de barrera donde la población de hongos y levaduras alcanzaron los 10^6 a 10^7 UFC/g [54]. Brekke y Tonaki observaron en el puré de guayaba que durante el almacenamiento los microorganismos mayormente encontrados fueron levaduras, y que las señales de deterioro fueron aparentes en el puré cuando éstas alcanzaron concentraciones de 10^5 a 10^6 UFC/ml, lo que corresponde aproximadamente a 5 Log UFC/g [30]. Aunque en la mezcla los valores no fueron tan altos, existe una carga apreciable de levaduras en el alimento

especialmente para el día 28, por tanto no se descarta el hecho que las levaduras tengan un efecto en su deterioro.

También se debe tener en cuenta que la carga bacteriana alcanzada es mayor con respecto a la carga de levaduras encontradas al mismo tiempo de almacenamiento, esto puede deberse a que a temperaturas bajas de almacenamiento, las levaduras también compiten con las bacterias mesofílicas y sicrotróficas, pero el tiempo de generación de las levaduras es más lento, aproximadamente 1 hora, comparado con la rápida multiplicación de las bacterias [84].

Las condiciones de pH y a_w del producto son favorables para el desarrollo de levaduras, sin embargo, el que los recuentos no hayan alcanzado valores tan altos como 5 Log UFC/g confirma que el sorbato de potasio ejerció un buen efecto sobre las levaduras. Guynot *et al* [85], estudió el efecto de tres preservativos en productos de panadería, y los resultados mostraron que el sorbato de potasio fue el más efectivo en inhibir el crecimiento de hongos y levaduras a un pH de 4.5 y un a_w de 0.90. También observó que en algunos casos la menor actividad del sorbato de potasio frente a algunos hongos y levaduras puede deberse a su interacción con ingredientes del alimento como proteínas y lípidos resultando en la disminución de sus valores y por consiguiente, de su acción preservativa. Igualmente Gliemmo *et al* [54] reportó que los bajos niveles restantes del preservativo productos de su degradación por oxidación permiten el crecimiento de levaduras resistentes.

La temperatura de almacenamiento también influye en el sobre crecimiento de levaduras como puede observarse en la **Figura 31**. Los recuentos a 7°C son mayores que a 4°C en todos los muestreos alcanzando para el día 28 los 6.02, 5.95 y 6.00 Log

UFC/g para lotes 1, 2 y 3 respectivamente. Estas son cifras que producen deterioro del producto como se mencionó anteriormente.

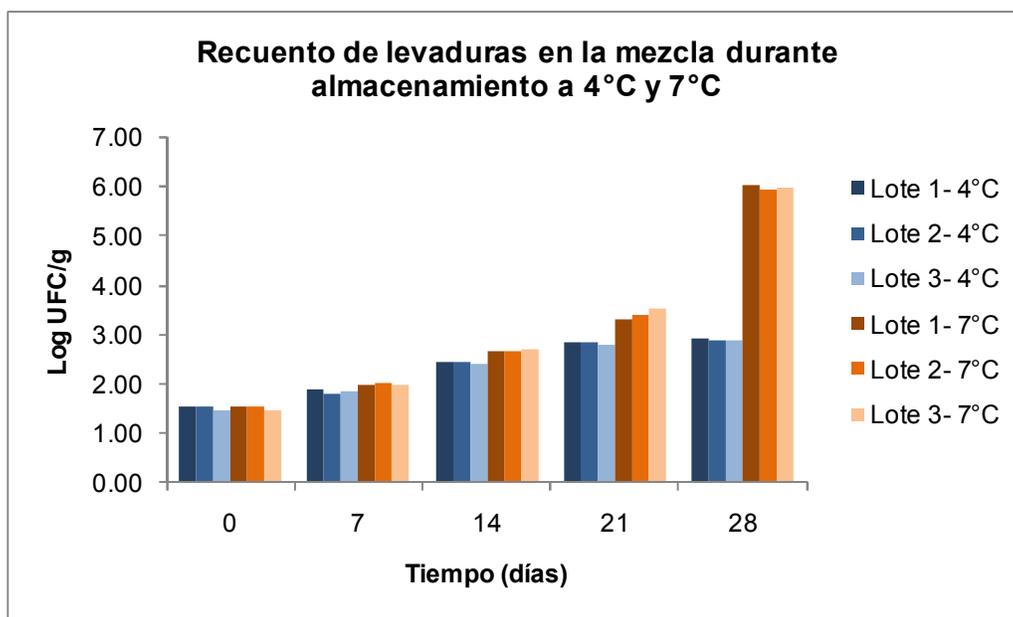


Figura 31. Recuento de levaduras en la mezcla a temperaturas de 4°C y 7°C

Existen diferencias significativas entre las temperaturas de almacenamiento ($p < 0.05$) (**Apéndice V**), por tanto se debe tener en cuenta que si el producto es sometido bajo abuso de temperatura, las condiciones del mismo como pH, y a_w , favorecen el crecimiento en abundancia de levaduras causando pérdida de la calidad por deterioro microbiológico.

4.3. Análisis sensorial

El análisis estadístico para el análisis sensorial realizado a la mezcla horneada de la dos variedades de *C. moschata* mostró que existen diferencias significativas entre ellas en cuanto a sabor. De los 36 panelistas que participaron en el sensorial, 24 (73%)

podieron identificar la muestra diferente, y de ellos, 14 (58%) encontraron una diferencia leve y 10 (42%) una diferencia moderada. La característica más importante en la que se observó diferencia fue el carácter dulce. Con respecto a la aceptabilidad del producto, de los 24 panelistas que acertaron, 12 (50%) prefirieron la variedad soler y 12 (50%) la variedad taina dorada. Esta aceptación es buena para el producto porque puede usarse cualquiera de las dos variedades en el desarrollo del mismo.

5. CONCLUSIONES

Las propiedades fisicoquímicas de la mezcla variaron significativamente a través de los días de almacenamiento, generalmente con una tendencia a la disminución de los valores.

El pH de la mezcla disminuyó debido al producto del metabolismo de los nutrientes del alimento al ser utilizados por los microorganismos. Es muy probable que existan bacterias acidolácticas en el producto y como consecuencia de su crecimiento, se acidifique más el medio bajando el pH.

La actividad de agua disminuyó como consecuencia de la interacción del agua libre con los otros ingredientes de la mezcla como el almidón y el azúcar que tienen la capacidad de absorber agua, además, de su utilización por microorganismos y del efecto de sinéresis en el producto; aún con esta disminución, el producto es considerado uno de alta humedad por tener un a_w superior a 0.95.

El potencial oxido reducción (Eh) disminuyó debido a la utilización del oxígeno por los microorganismos y a su consumo en las reacciones de oxidación de sustancias como el ácido ascórbico, sorbato de potasio y carotenoides. El Eh aún cuando disminuye sigue con valores positivos permitiendo el crecimiento de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos.

Los parámetros de color L , a , b , Hue y $Chroma$ disminuyeron significativamente, por lo que la mezcla llegó a ser más oscura, perdiendo color rojo y amarillo. Los valores de Hue , tanto para el primer y último día de almacenamiento, corresponden a color anaranjado, siendo menos anaranjado a medida que transcurren los días.

Igualmente los valores de Chroma reflejan pérdida de la intensidad del color. La pérdida de color del producto está asociada a la degradación de los pigmentos carotenoides.

El procesamiento de la calabaza mediante cocción produjo un incremento en el contenido de carotenoides. Los valores fueron más bajos en la calabaza cruda que en la cocida. El contenido de carotenoides de la mezcla al día 0 disminuyó con respecto al puré de calabaza (calabaza cocida), por tanto el proceso de acidificación de la mezcla influye en la isomerización de los carotenoides. El contenido de carotenoides de la mezcla durante el tiempo de almacenamiento disminuyó considerablemente como consecuencia de diversos factores que influyen en su degradación como la luz, el oxígeno, la acidez y la temperatura.

Microbiológicamente el producto no alcanzó recuentos mayores a 5 Log UFC/g, los cuales están relacionados a deterioros. La carga máxima de microorganismos fue de 4.07 Log UFC/g para aerobios totales y 2.92 Log UFC/g para levaduras al día 28 de almacenamiento, y de 1.48 Log UFC/g para hongos al día 49. No se detectaron coliformes en ninguna muestra. Es probable que existan bacterias acidolácticas en la mezcla por formar ésta parte de la flora endógena de la calabaza. La mezcla no presentó crecimiento visible de hongos durante todo el tiempo de almacenamiento (84 días).

El producto presentó deterioro físico visible al día 42 manifestado por efecto de sinéresis, observándose agua en la superficie de la mezcla. No se detectó mal olor en ninguna muestra analizada durante todo el tiempo de almacenamiento y muestreo.

La vida útil del producto puede ser asegurada a 4°C hasta el día 35.

El abuso de temperatura mostró la misma tendencia en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en el producto, sin embargo, las condiciones de deterioro y crecimiento microbiológico se presentan con mayor rapidez, por tanto, éste tiene un gran efecto en el producto acortando su vida útil.

El análisis sensorial refleja que existen diferencias significativas en cuanto al sabor entre las variedades de *Cucurbita moschata* Soler y Taína dorada, sin embargo, la preferencia de los panelistas participantes hacia cada variedad es del 50% por lo que puede utilizarse cualquier variedad.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas de sabor al producto durante el almacenamiento para detectar si hay cambio de sabor debido a la acidez.
- Determinar la presencia de bacterias acidolácticas en el producto para establecer si éstas son las causantes del deterioro.
- Experimentar otro empaque que pudiera reducir la degradación de los pigmentos carotenoides y la pérdida de color en el producto, ya sea, por protección de la luz, por reducción del oxígeno de la cámara de aire del empaque o utilizando un material que tenga baja permeabilidad al oxígeno.
- Determinar Vitamina A en el producto.
- Experimentar posibles combinaciones de gomas que pudieran mejorar la estabilidad de la mezcla en cuanto al proceso de sinéresis.
- Considerar la congelación como método alternativo para alargar la vida útil del producto, ya que las reacciones químicas y metabólicas ocurren a una velocidad más lenta y en consecuencia, el producto retendrá su calidad por más tiempo.
- Analizar la materia prima utilizada para identificar posibles fuentes de contaminación microbiana; en especial el caso de la harina de trigo, con el fin de controlar y/o reducir la contaminación con levaduras en el producto.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. de Escalada Pla, M. F., C. A. Campos, L. N. Gerschenson y A. M. Rojas. *Pumpkin (Cucurbita moschata Duchesne ex Poiret) mesocarp tissue as a food matrix for supplying iron in a food product*. Journal of Food Engineering, 2009. **92**(4): p. 361-369.
2. Departamento de Agricultura del Estado Libre Asociado de Puerto Rico - *Producción Agrícola 2009/10*. 2010.
3. Departamento de Agricultura del Estado Libre Asociado de Puerto Rico - *Calendario de Abundancia*. 1998.
4. Fornaris, G. *Conjunto Tecnológico para la Producción de Calabaza. Características de la Planta*. Estación Experimental Agrícola Universidad de Puerto Rico, 1998. **155**: p. 6-7.
5. Martínez, S. *Conjunto Tecnológico para la producción de Calabaza*. Estación Experimental Agrícola Universidad de Puerto Rico. 1998. **155**: p. 5.
6. Wessel-Beaver, L. *Tropical Pumpkin (Squash) Breeding*. 2011 [tomado de sitio web: <http://academic.uprm.edu/lbeaver/id16.htm>].
7. Wessel-Beaver, L. *Conjunto Tecnológico para la producción de Calabaza. Selección de variedades*. Estación Experimental Agrícola Universidad de Puerto Rico. 1998. **155**: p. 7-8.
8. Wessel-Beaver, L. *Cultivar and Germplasm Release. Release of "Soler" Tropical Pumpkin*. The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico. 2005. **89**(3-4): p. 263-266.
9. Babadoost M. y T. A. Zitter. *Fruit Rots of Pumpkins: A Serious Threat to the Pumpkin Industry*. Plant Disease. 2009. **93**(8): p. 772-782.
10. Jacobo-Valenzuela, N., M. R. Maróstica-Junior, J. Zazueta-Morales y J. A. Gallegos-Infante. *Physicochemical, Technological Properties, and Health-Benefits of Cucurbita moschata Duchense vs. Cehualca: A Review*. En: *Food Research International*. 2011.
11. Pandey, S., J. Singh, A. Upadhyay, D. Ram y M. Rai. *Ascorbate and Carotenoid Content in an Indian Collection of Pumpkin (Cucurbita moschata Duch. ex Poir.)*. Cucurbit Genetics Cooperative Report. 2003. **26**: p. 51-53.

12. Davey, M. W., M. Montagu, D. Inze, M. Sanmartin, A. Kanellis, N. Smirnoff, I. Benzie, J. Strain, D. Favell y J. Fletcher. *Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000. **80**: p. 825-860.
13. Seo, J.S., B. J. Burri, Z. Quan y T. R. Neidlinger. *Extraction and Chromatography of Carotenoids from Pumpkin*. Journal of Chromatography A. 2005. **1073**: p. 371-375.
14. Meléndez-Martínez, A. J., I. M. Vicario y F. J. Heredia. *Pigmentos Carotenoides: Consideraciones Estructurales y Físicoquímicas*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2007. **57**(2): p. 109-117.
15. Azevedo-Meleiro, C. y D. Rodríguez-Amaya. *Qualitative and Quantitative Differences in Carotenoid Composition among Cucurbita moschata, Cucurbita maxima and Cucurbita pepo*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2007. **55**: p. 4027-4033.
16. Hidaka, T., T. Anno y S. Nakatsu. *The Composition and Vitamin A Value of the Carotenoids of Pumpkins of Different colors*. Journal of Food Biochemistry. 1987. **11**: p. 59-68.
17. Gliemmo, M. F., M. E. Latorre, L. N. Gerschenson y C. A. Campos. *Color Stability of Pumpkin (Cucurbita moschata, Duchesne ex Poirer) Puree During Storage at Room Temperature: Effect of pH, Potassium Sorbate, Ascorbic Acid and Packaging Material*. Food Science and Technology. 2009. **42** p. 196-201.
18. Rodríguez-Amaya, D. *Análisis de Carotenoides*, en *Producción y Manejo de Datos de Composición Química de Alimentos en Nutrición*, FAO, Editor. Santiago, Chile. 1997. p. 231-241.
19. Kimura, M. y D. B. Rodríguez-Amaya. *Sources of Errors in the Quantitative Analysis of Food Carotenoids by HPLC*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 1999. **49**(1-S): p. 58-S-66-S.
20. Barreiro, J. A. y A. J. Sandoval. *Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas*. 1 ed, ed. Equinoccio. Caracas. 2006. p.365.
21. Meléndez-Martínez, A. J., I. M. Vicario y F. J. Heredia. *Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2004. **54**(2): p. 209-215.
22. Goncalves, E. M., J. Pinheiro, M. Abreu, T. Brandao y C. Silva. *Modelling the kinetics of peroxidase inactivation, colour and texture changes of pumpkin (Cucurbita maxima L.) during blanching*. Journal of Food Engineering. 2007. **81**: p. 693-701.

23. Dutta, D., A. Dutta, U. Raychaudhuri y R. Chakraborty. *Rheological characteristics and thermal degradation kinetics of beta-carotene in pumpkin puree*. Journal of Food Engineering. 2006. **76**: p. 538-546.
24. USDA. *National Nutrient Database for Standard Reference: Pumpkin raw (Cucurbita spp)*. 2010. [tomado de sitio web: http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl].
25. FAO. *Valor Nutritivo y Usos en Alimentación Humana de algunos Cultivos Autóctonos Subexplotados de Mesoamérica. Contenido nutricional de la calabaza*. 1993. [tomado de sitio web: <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro11/cuadro1.htm>].
26. Rowe, E. H., F. Liedl y K Tancibok. *Vegetable based Creamy Food and Process Therefor*. Bestfoods: United States. 2001. p. 8.
27. García, E. y D. M. Barret. *Preservative treatments for fresh-cut fruits and vegetables*. Fresh Cut Fruits and Vegetables: Science, Technology and Market, ed. Lamikamira. New York: CRC Press. 2002. p. 32.
28. FDA. *Code of Federal Regulations Title 21. Part 170. Section 3. Food Additives. Antioxidants*. 2010. [tomado de sitio web: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=170.3>].
29. Eskin, M. y D. S. Robinson. *Food Shelf Life Stability, Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes*. Ed. C. Press. Massachusetts. 2001. p. 370.
30. Brekke, J. E. y K. I. Tonaki. *Stability of Guava Puree Concentrate During Refrigerated Storage*. Journal of Food Science. 1970. **35**: p. 469-471.
31. Dauthy, M. E. *Fruit and Vegetable Processing. Chemical Preservation*. FAO Agricultural Services. Bulletin No.119. 1995. [tomado de sitio web: http://www.vouranis.net/uploads/6/2/8/5/6285823/fao_fruit_veg_processing.pdf].
32. Doyle, M. P., L. R. Beuchat, and T. J. Montville. *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. 2 ed, Ed. A.S. Food Microbiology, Washington. 2001. p 872.
33. Jay, J., M. J. Loessner y D. A. Golden. *Modern Food Microbiology*. 7 ed, Ed. Board, California. 2005. p 790.
34. Damodaran, S., K.L. Parkin y O.R. Fennema, *Fennema's Food Chemistry*. 4 ed, ed. A. Board, Wisconsin. 2008. p 1144.

35. FDA, *Code of Federal Regulations Title 21. Part 182. Section 3640. Chemical Preservatives, Potassium Sorbate*. 2010.
36. FDA. *Database of Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Reviews. Potassium Sorbate*. 2006. [tomado de sitio web: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=scogsListng&id=255>].
37. Pasquel, A. *Gomas: una aproximación a la Industria de Alimentos*. Revista Amazónica de Investigación Alimentaria. 2001. **1**(1): p. 1-8.
38. FDA. *Code of Federal Regulations Title 21. Part 114. Section 3. Acidified Food*. . 2010. [tomado se sitio web: <http://www.accessdata.fda.gov/SCRIPTS/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=114&showFR=1>].
39. Man, D. y A. Jones. *Shelf-life evaluation of foods*. 2 ed, Ed. A. Publishers, Maryland. 2000. p 264.
40. Jeng-Leun, M., C. Chiu-Ping y H. Pao-Chuan. *Antimicrobial Effect of Extracts from Chinese Chive, Cinnamon, and Corni Fructus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001. **49**: p. 183-188.
41. García, E., M. Quezada, J. Moreno, G. Sanchez, E. Moreno y M. Pérez, *Actividad Antifúngica de Aceites Esenciales de Canela (Cinnamomum zeylanicum Blume) y oregano (Origanum vulgare L.) y su Efecto en la Producción de Aflatoxinas en Nuez Pecanera [Carya illinoensis (F.A. Wangerh) K. Koch]*. Revista Mexicana de Fitopatología. 2006. **24**(1): p. 7-12.
42. Gupta, C., A. P. Garg, R.C. Uniyal y A. Kumari. *Comparative Analysis of the Antimicrobial Activity of Cinnamon Oil and Cinnamon Extract on Somefood-borne Microbes*. African Journal of Microbiology Research. 2008. **2**(9): p. 247-251.
43. Ceylan, E., D. Y. C. Fung y J. R. Sabah. *Antimicrobial Activity and Synergistic Effect of Cinnamon with Sodium Benzoate or Potassium Sorbate in Controlling Escherichia coli O157:H7 in Apple Juice*. Journal of Food Science. 2004. **69**(4): p. 102-106.
44. Taub, I. y R. Singh. *Food Storage Stability*. 1ed, Boca Raton: CRC Press. 1997. p 539.
45. FSIS. *Safe Food Handling. Refrigeration and Food Safety*. 2010. [tomado de sitio web: http://www.fsis.usda.gov/factsheets/refrigeration_%26_food_safety/].
46. FDA. *The Process Approach for Managing Food Safety: A Manual for the Voluntary Use of HACCP. Principles for Operators of Food Service and Retail*

- Establishments*. 2009. [tomado de sitio web: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/ManagingFoodSafety/HACCPPrinciples/Operators/ucm077998.htm>].
47. Simpson, R., S. Almonacid, C. Acevedo y C. Cortés. *Mathematical Model To Predict Effect Of Temperature Abuse in MAP Systems Applied To Pacific Hake (Merluccius australis)*. Journal of Food Process Engineering. 2003 **26**: p. 413-434.
 48. Almonacid, S. y J. Torres. *Uncertainty of Microbial Shelf-life Estimations for Refrigerated Foods Due to the Experimental Variability of the Model Parameters*. Journal of Food Process Engineering. 2009. p. 1-19.
 49. FDA. *Food Code 2009: Annex 6 - Food Processing Criteria*. 2009. [tomado de: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/FoodCode/FoodCode2009/ucm188201.htm>].
 50. FDA. *Guidance for Industry. Questions and Answers Regarding the Interim Final Rule on Registration of Food Facilities. (Part B- 2.6)*. 2004.
 51. Nielsen, S. *Food Analysis*. In *Food Science Texts Series*. Springer: New York. 2003. p. 530-541.
 52. FDA. *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. 2011. [tomado de sitio web: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>].
 53. Gutiérrez-López, G., G. Barbosa-Canóvas, J. Welti-Chanes y E. Parada-Arias. *Use of Tapioca Starch Edible Film Containing Potassium Sorbate to Extend the Shelf Life of Minimally Processed Pumpkin*. In *Food Engineering: Integrated Approaches*. Springer: New York. 2008. p. 226-229.
 54. Gliemmo, M. F., M. E. Latorre, L. N. Gerschenson y C. A. Campos. *Effect of sweet solutes on the quality of a pumpkin puree (Cucurbita moschata Duchesne ex poiret) preserved by the hurdle technology*. Journal of Food Processing and Preservation. 2010. **34**: p. 1024-1040.
 55. Sistrunk, W. A. y J. N. Cash. *Ascorbic Acid and Color Changes in Summer Squash as Influenced by Blanch, pH and other Treatments*. Journal of Food Science. 1970. **35**: p. 645-648.
 56. Maltini, E., D. Torreggiani, E. Venir y G. Bertolo. *Water activity and the preservation of plant foods*. Food Chemistry. 2003. **82**: p. 79-86.
 57. Reichart, O., k. Szakmár, A. Jozwiak, J. Felföldi y L. Baranyai. *Redox potential measurement as a rapid method for microbiological testing and its validation for*

- coliform determination*. International Journal of Food Microbiology. 2007. **114**: p. 143-148.
58. Alzamora, S. M., S. N. Guerrero, A. B. Nieto y S. L. Vidales. *Conservación de Frutas y Hortalizas mediante Tecnologías Combinadas*. FAO. 2004.
59. FDA. *Labeling of Foods That Need Refrigeration by Consumers Guidance*. 1997. [tomado de sitio web: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodLabelingNutrition/ucm120226.htm>].
60. Wiley, R. C. *Preservation Methods for Minimally Processed*, in *Minimally Processed Refrigerated Fruit & Vegetables*. Chapman & Hall: New York. 1994. p. 117-118.
61. Meléndez-Martínez, A. J., I. M. Vicario y F. J. Heredia. *Effect of Ascorbic Acid on Deterioration of Carotenoids and Colour in Ultrafrozen Orange Juice*. Journal of Food Composition and Analysis. 2009. **22**: p. 295-302.
62. Provesi, J. G., C. O. Dias y E. R. Amante, *Changes in Carotenoids During Processing and Storage of Pumpkin Puree*. Food Chemistry. 2011. **128**: p. 195-202.
63. Itle, R. A. y E. A. Kabelka, *Correlation between L* a* b* Color Space Values and Carotenoid Content in Pumpkins and Squash (Cucurbita spp.)*. HortScience. 2009. **44**(3): p. 633-637.
64. Talcott, S. T. y L. R. Howard. *Phenolic Autoxidation Is Responsible for Color Degradation in Processed Carrot puree*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999. **47**: p. 2109-2115.
65. Shi, J., Ch. Yi, X. Ye, S. Xue, Y. Jiang, Y. Maa y D. Liu. *Effects of Supercritical CO₂ Fluid Parameters on Chemical Composition and Yield of Carotenoids Extracted From Pumpkin*. Food Science and Technology 2010. **43**: p. 39-44.
66. de Carvalho, L. M. J., P. B. Gomes, R. L. O. Godoy, S. Pacheco, P. H. F. Monte, J. L. V. de Carvalho, M. R. Nutti, A. C. L. Neves, A. C. Vieira y S. Rocha. *Total Carotenoid Content, α -carotene and β -carotene, of Landrace Pumpkins (Cucurbita moschata Duch): A preliminary study*. In Food Research International. 2011.
67. Ramos, S. R., H. W. L. Carvalho, I. R. Oliveira, J. L. Anjos, M. A. Queiróz, M. A. C. Lima, M. R. Nutti, M. Kimura, R. C. S. Dias y R. M. E. Borges, *Identificação de acessos locais de abóbora com elevados teores de carotenóides totais e características agronômicas e comerciais.*, in *3ª Reunião Anual de Biofortificação no Brasil*. 2009.

68. Rodríguez-Amaya, D., *A Guide to Carotenoid Analysis in Food*. Washington: International Life Sciences Institute (ILSI) Press. 2001. p. 64.
69. Rodríguez-Amaya, D. y M. Kimura, *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*, ed. H.T.M. Series. Washington. 2004. p. 58.
70. Chavasit, V., R. Pisaphab, P. Sungpuag, S. Jittinandana y E. Wasantwisut. *Changes in β -Carotene and Vitamin A Contents of Vitamin A-rich Foods in Thailand During Preservation and Storage*. Journal of Food Science. 2002. **67**(1): p. 375-379.
71. Azizah, A., K. Wee, O. Azizah y M. Azizah. *Effect of Boiling and Stir Frying on Total Phenolics, Carotenoids and Radical Scavenging Activity of Pumpkin (*Cucurbita moschata*)*. International Food Research Journal. 2009. **16**: p. 45-51.
72. MacDougall, D. *Colour in food: improving quality*. Boca Raton FL: CRC Press. 2002. p. 378.
73. Chandler, L. A. y S. J. Schwartz. *Isomerization and losses of trans-B-carotene in sweet potatoes as affected by processing treatments*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1988. **36**: p. 129-133.
74. Thompson, K. A., M. R. Marshall, C. A. Sims, C. I. Wei, S. A. Sargent y J. W. Scott. *Cultivar, Maturity, and Heat Treatment on Lycopene Content in Tomatoes*. Journal of Food Science. 2000. **65**(5): p. 791-795.
75. Rodríguez-Amaya, D. *Changes in carotenoids during processing and storage of foods*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 1999. **49**(1-S): p. 38-47.
76. Murkovic, M., U. Mülleder y H. Neunteufl. *Carotenoid Content in Different Varieties of Pumpkins*. Journal of Food Composition and Analysis, 2002. **15**: p. 633-638.
77. USDA. *Nutrient Data Laboratory. Search the USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 24 (Pumpkin, cooked, boiled, drained, without salt)*. 2011. [tomado de sitio web: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>].
78. Gram, L., L. Ravn, M. Rasch, J. B. Bruhn, A. B. Christensen y M. Givskov. *Food spoilage - Interactions between food spoilage bacteria*. International Journal of Food Microbiology. 2002. **78**: p. 79-97.
79. Sampedro, F., D. J. Geveke, X. Fan, D. Rodrigo y Q. H. Zhang. *Shelf-Life Study of an Orange Juice–Milk Based Beverage after PEF and Thermal Processing*. Journal of Food Science. 2009. **74**(2): p. 107-112.

80. Carlin, F., M. H. Guinebretiere, C. Choma, R. Pasqualini, A. Braconnier y C. Nguyen, *Spore-forming bacteria in commercial cooked, pasteurised and chilled vegetable purees*. Food Microbiology. 2000. **17**: p. 153-165.
81. Legan, J. D. y P. A. Voysey. *Yeast Spoilage of Bakery Products and Ingredients*. Journal of Applied Bacteriology. 1991. **70**: p. 361-371.
82. Filtenborg, O., J. C. Frisvad y U. Thrane. *Moulds in Food Spoilage*. International Journal of Food Microbiology 1996. **33**: p. 85-102.
83. Dalié, D. K., A. M. Deschamps y F. Richard-Forget. *Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review*. Food Control. 2010. **21**: p. 370-380.
84. Viljoena, B., A. Lourens-Hattingha, B. Ikalafenga y P. Gabor. *Temperature abuse initiating yeast growth in yoghurt*. Food Research International. 2003. **36**: p. 193-197.
85. Guynot, M. E., A. J. Ramos, V. Sanchis y S. Marín, *Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5–5.5)*. International Journal of Food Microbiology. 2005. **101**: p. 161- 168.

APÉNDICES

Apéndice A: Calendario de la abundancia del Departamento de Agricultura de Puerto Rico



ESTADO LIBRE ASOCIADO DE PUERTO RICO
 DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA
 ADMINISTRACION DE SERVICIOS Y DESARROLLO AGROPECUARIO
 PROGRAMA DE MERCADEO



CALENDARIO DE ABUNDANCIA

PRODUCTOS	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE
Acarola	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Aguacate	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Ajl dulce	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Apio	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Batata	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Berinjera	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Cababazo	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Carambola	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Cebolla	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Coco	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Conacón	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Chayote	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
China	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Fresa	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Gandul	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Guandana	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Guineo	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Habichuela Tierra	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Habichuela Verde	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Lchuga	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Lima	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Limón	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Mel	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Melanga	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Mamey	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Mamey sapote	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Mandarina	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Mangó	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Melón de agua	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Naña Florida	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Naña Habanero	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Nispero	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pana de pepita	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Panapán	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Papaya	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pancha	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Papriño	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pimentón	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Piña	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Plátano	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Quiñepi	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Quimbombó	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Rapallo	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Tamarindo	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Tomate	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Tortija	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Yautía blanca	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Yautía morada	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Yuca	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

LEYENDA: ■ COMIENZO Y FINAL DE COSECHA
 ■ ABUNDANCIA

PREPARADO POR EL PROGRAMA DE MERCADEO DE A.S.D.A., CON LA COLABORACION DEL SERVICIO DE EXTENSION AGRICOLA.
 EDIFICIO PLAZA 20, AVE. HIPODROMO #603, PDA.20, SANTURCE, P.R.
 PO BOX 9200, SAN JUAN, P.R. 00908-0200, TEL.: (787) 724-8494, FAX:(787) 723-4751



REVISTADO EN MARZO DE 1998

Apéndice B: Análisis de varianza (ANOVA) para pH

pH vs. Muestra, Día, Lote

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Muestra	fijo	2	1, 2
Día	fijo	13	1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85
Lotes	fijo	3	1, 2, 3

Análisis de varianza para pH

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Muestra	1	0.000312	0.000312	0.000312	1.66	0.200
Día	12	7.563054	7.563054	0.630254	3351.81	0.000
Lotes	2	0.032541	0.032541	0.016271	86.53	0.000
Muestra*Día	12	0.003727	0.003727	0.000311	1.65	0.083
Muestra*Lotes	2	0.000956	0.000956	0.000478	2.54	0.082
Día*Lotes	24	0.025526	0.025526	0.001064	5.66	0.000
Muestra*Día*Lotes	24	0.007755	0.007755	0.000323	1.72	0.027
Error	156	0.029333	0.029333	0.000188		
Total	233	7.663204				

Análisis de regresión: pH vs. D, L, DL, MDL

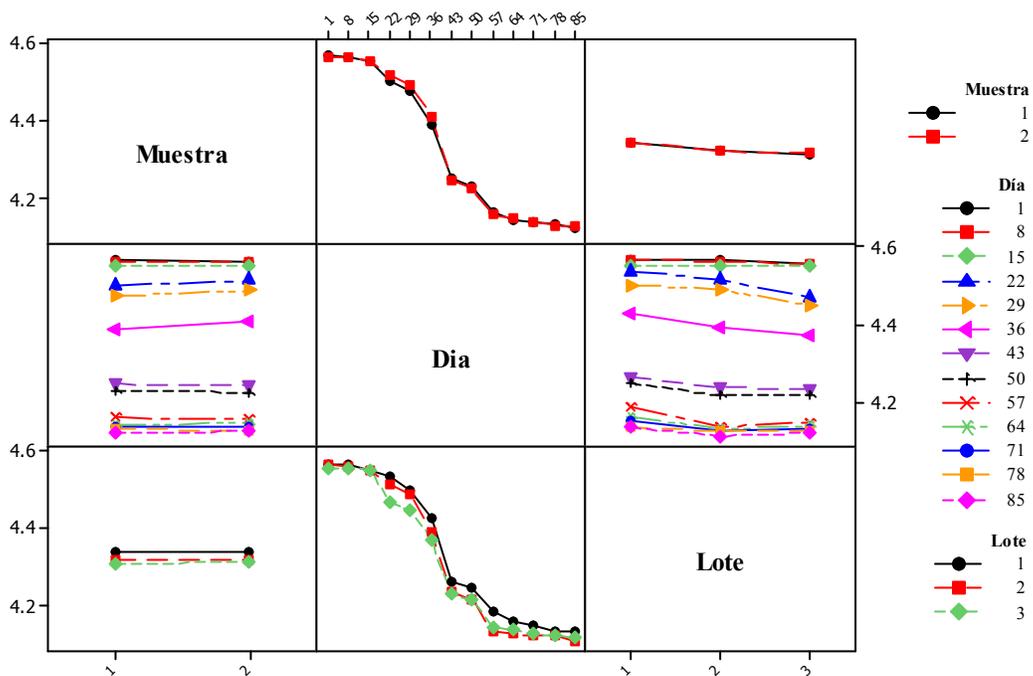
La ecuación de regresión es

$$\text{pH} = 4.64 - 0.00664 D - 0.0151 L - 0.000003 DL + 0.000021 MDL$$

Predictor	Coef	Coef. de EE	T	P	VIF
Constante	4.63950	0.01796	258.36	0.000	
D	-0.0066431	0.0003567	-18.63	0.000	7.000
L	-0.015120	0.008313	-1.82	0.070	3.695
DL	-0.0000032	0.0001917	-0.02	0.987	13.069
MDL	0.00002087	0.00006492	0.32	0.748	4.373

S = 0.0540100 R-cuad. = 91.3% R-cuad. (ajustado) = 91.1%

PRESS = 0.696361 R-cuad. (pred) = 90.91%



Gráfica de Interacción de los factores para pH

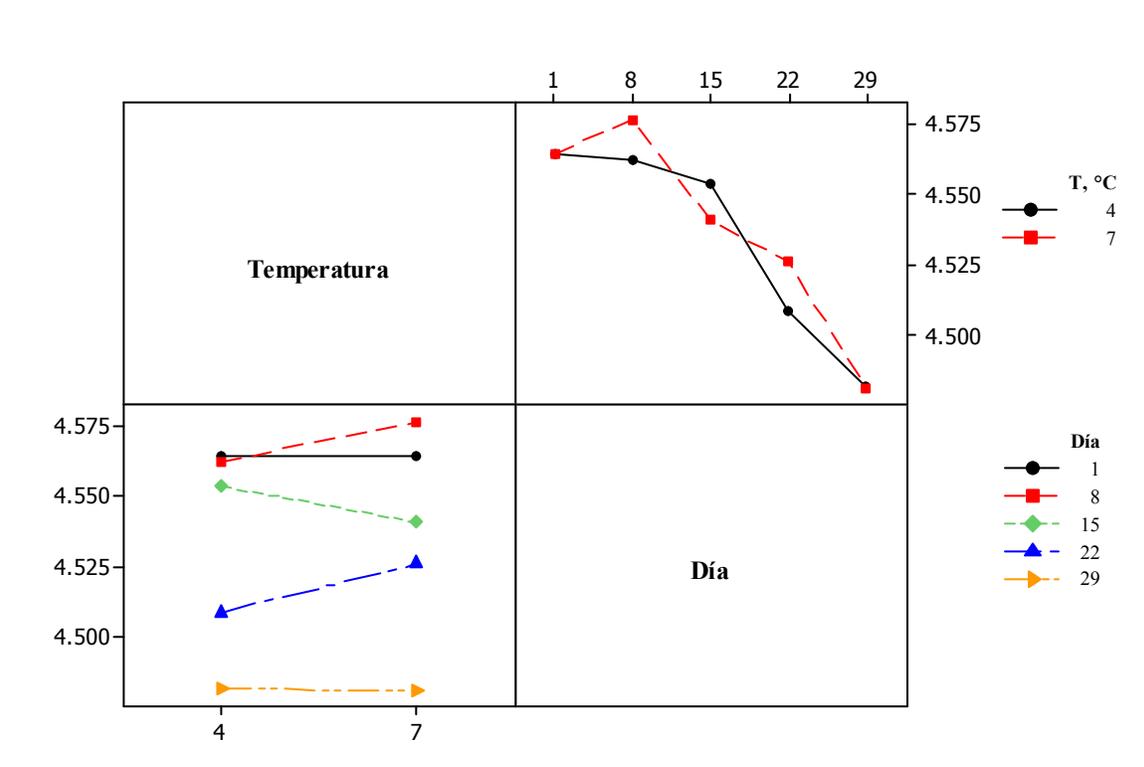
Apéndice C: Análisis de varianza para pH con efecto de la temperatura

pH vs. T, D

Factor	Tipo	Niveles	Valores
T	fijo	2	4, 7
D	fijo	5	1, 8, 15, 22, 29

Análisis de varianza para pH

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
T	1	0.000569	0.000569	0.000569	1.57	0.212
D	4	0.195653	0.195653	0.048913	134.77	0.000
T*D	4	0.005309	0.005309	0.001327	3.66	0.007
Error	170	0.061700	0.061700	0.000363		
Total	179	0.263231				



Gráfica de Interacción de temperatura y día para pH

Apéndice D: Análisis de varianza para actividad de agua

aw vs. Muestra, Día, Lote

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Muestra	fijo	2	1, 2
Día	fijo	13	1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85
Lote	fijo	3	1, 2, 3

Análisis de varianza para aw

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Muestra	1	0.0000698	0.0000698	0.0000698	29.82	0.000
Día	12	0.0097265	0.0097265	0.0008105	346.23	0.000
Lote	2	0.0012334	0.0012334	0.0006167	263.43	0.000
Muestra*Día	12	0.0002467	0.0002467	0.0000206	8.78	0.000
Muestra*Lote	2	0.0001344	0.0001344	0.0000672	28.71	0.000
Día*Lote	24	0.0011285	0.0011285	0.0000470	20.09	0.000
Muestra*Día*Lote	24	0.0003334	0.0003334	0.0000139	5.93	0.000
Error	156	0.0003652	0.0003652	0.0000023		
Total	233	0.0132380				

Análisis de regresión: aw vs. M, D, L, DL, MD, ML, MDL

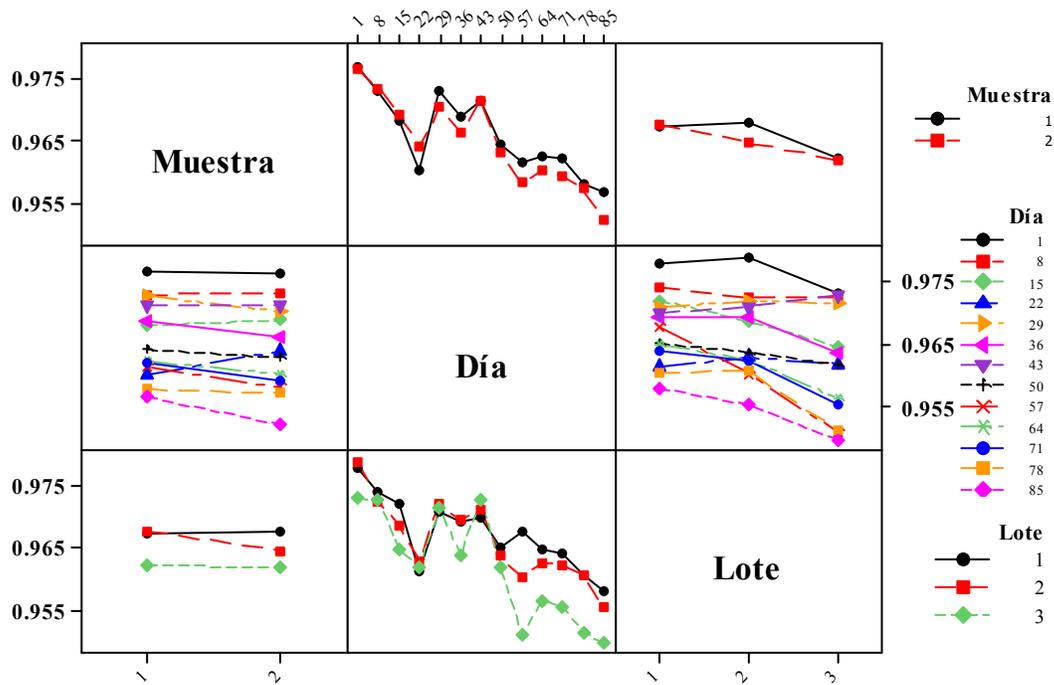
La ecuación de regresión es

$$aw = 0.972 + 0.00275 \text{ Muestra} - 0.000007 \text{ Día} + 0.00078 \text{ Lote} - 0.000068 \text{ Día*Lote} \\ - 0.000073 \text{ Muestra*Día} - 0.00091 \text{ Muestra* Lote} + 0.000013 \text{ Muestra*Día*Lote}$$

Predictor	Coef	Coef. de EE	T	P
Constante	0.971513	0.004617	210.44	0.000
Muestra	0.002748	0.002920	0.94	0.348
Día	-0.00000655	0.00009169	-0.07	0.943
Lote	0.000779	0.002137	0.36	0.716
Día*Lote	-0.00006828	0.00004245	-1.61	0.109
Muestra*Día	-0.00007304	0.00005799	-1.26	0.209
Muestra* Lote	-0.000907	0.001352	-0.67	0.503
Muestra*Día*Lote	0.00001296	0.00002685	0.48	0.630

S = 0.00439095 R-cuad. = 67.1% R-cuad. (ajustado) = 66.1%

PRESS = 0.00460723 R-cuad. (pred) = 65.20%



Gráfica de Interacción de los factores para a_w

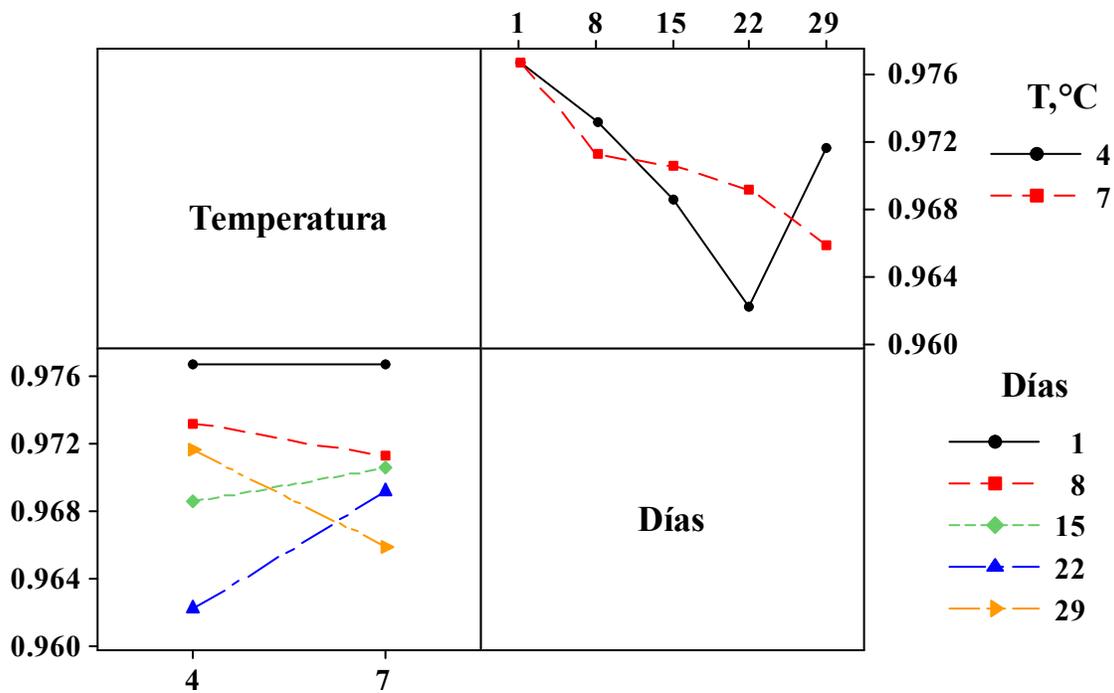
Apéndice E: Análisis de varianza para actividad de agua con efecto de la temperatura

Aw vs. Temperatura, Día

Factor	Tipo	Niveles	Valores
T	fijo	2	4, 7
D	fijo	5	1, 8, 15, 22, 29

Análisis de varianza para aw

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
T	1	0.0000031	0.0000031	0.0000031	0.20	0.654
D	4	0.0024722	0.0024722	0.0006181	39.77	0.000
T*D	4	0.0007975	0.0007975	0.0001994	12.83	0.000
Error	170	0.0026419	0.0026419	0.0000155		
Total	179	0.0059148				



Gráfica de Interacción de temperatura y día para a_w

Apéndice F: Análisis de varianza para potencial oxido reducción (Eh)

Eh vs. Muestra, Día, Lote

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Muestra	fijo	2	1, 2
Día	fijo	13	1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85
Lote	fijo	3	1, 2, 3

Análisis de varianza para Eh

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Muestra	1	2.11	2.11	2.11	3.72	0.055
Día	12	67963.73	67963.73	5663.64	10011.47	0.000
Lote	2	87.95	87.95	43.97	77.73	0.000
Muestra*Día	12	40.62	40.62	3.39	5.98	0.000
Muestra*Lote	2	0.63	0.63	0.31	0.55	0.576
Día*Lote	24	923.07	923.07	38.46	67.99	0.000
Muestra*Día*Lote	24	37.23	37.23	1.55	2.74	0.000
Error	156	88.25	88.25	0.57		
Total	233	69143.58				

Análisis de regresión: Eh vs. Día, Lote, Día*Lote

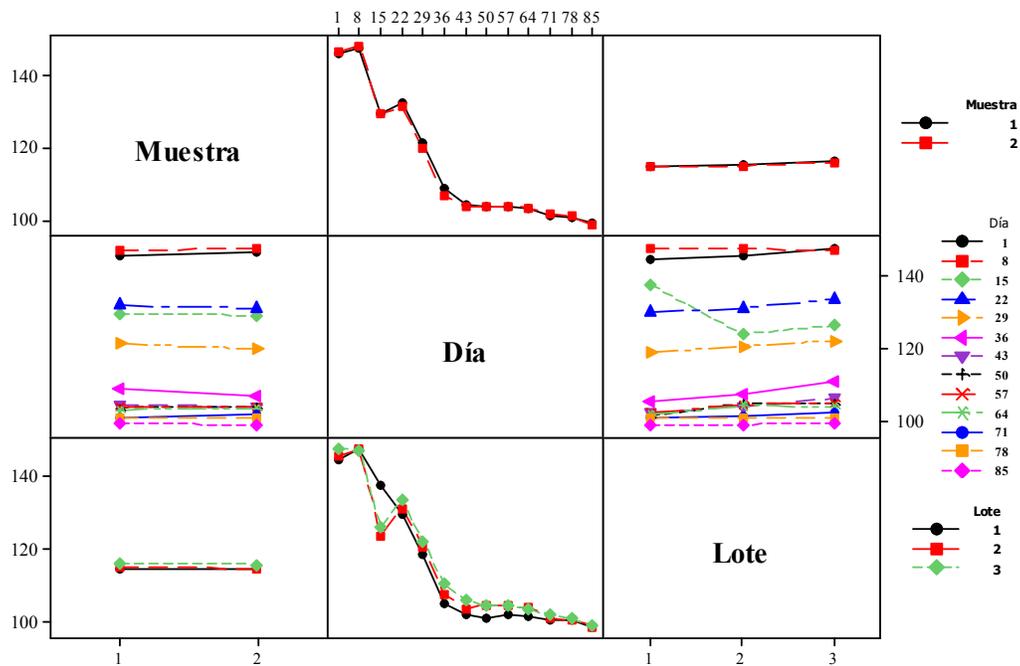
La ecuación de regresión es

$$Eh = 140 - 0.616 \text{ Día} + 0.19 \text{ Lote} + 0.0122 \text{ Día*Lote}$$

Predictor	Coef	Coef. de EE	T	P	VIF
Constante	140.332	2.482	56.54	0.000	
Día	-0.61624	0.04930	-12.50	0.000	7.000
Lote	0.186	1.149	0.16	0.872	3.695
Día*Lote	0.01219	0.02282	0.53	0.594	9.695

S = 7.46552 R-cuad. = 81.5% R-cuad. (ajustado) = 81.2%

PRESS = 13269.4 R-cuad. (pred) = 80.81%



Gráfica de interacción de los factores para Eh (mV)

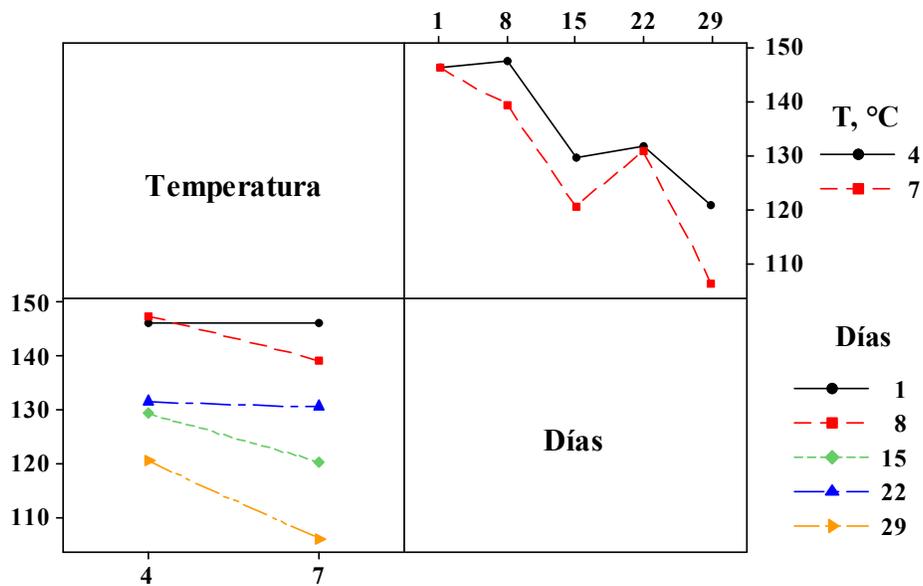
Apéndice G: Análisis de varianza para potencial oxido reducción (Eh) con efecto de la temperatura

Eh vs. Temperatura, Día

Factor	Tipo	Niveles	Valores
T	fijo	2	1, 2
D	fijo	5	1, 8, 15, 22, 29

Análisis de varianza para Eh

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
T	1	1924.7	1924.7	1924.7	194.92	0.000
D	4	26334.4	26334.4	6583.6	666.74	0.000
T*D	4	1306.3	1306.3	326.6	33.07	0.000
Error	170	1678.6	1678.6	9.9		
Total	179	31244.0				



Gráfica de Interacción de temperatura y día para Eh (mV)

Apéndice H: Análisis de varianza para parámetro de color L

Lightness vs. Muestra, Día, Lote

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Muestra	fijo	2	1, 2
Día	fijo	13	1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85
Lote	fijo	3	1, 2, 3

Análisis de varianza para Lightness

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Muestra	1	9.440	9.440	9.440	677.48	0.000
Día	12	1265.185	1265.185	105.432	7566.43	0.000
Lote	2	187.460	187.460	93.730	6726.64	0.000
Muestra*Día	12	20.356	20.356	1.696	121.74	0.000
Muestra*Lote	2	9.537	9.537	4.768	342.20	0.000
Día*Lote	24	67.095	67.095	2.796	200.63	0.000
Muestra*Día*Lote	24	16.646	16.646	0.694	49.77	0.000
Error	156	2.174	2.174	0.014		
Total	233	1577.892				

Análisis de regresión: Lightness vs. M, D, L, M*D, M*L, D*L, M*D*L

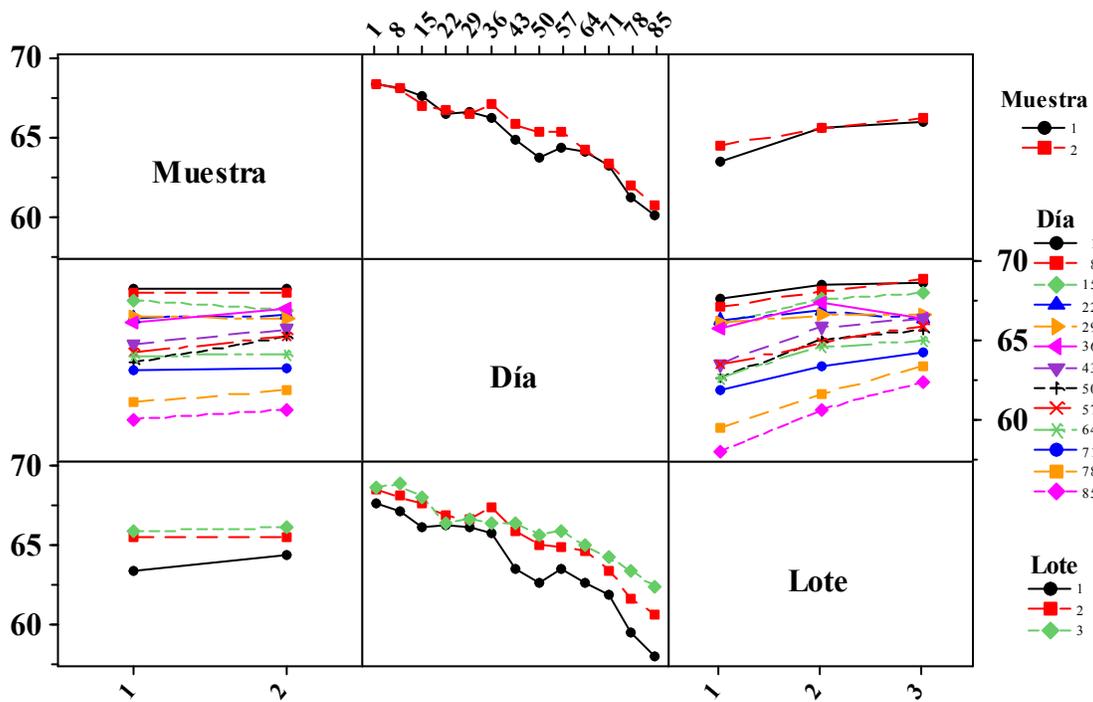
La ecuación de regresión es

$$\text{Lightness} = 67.5 + 0.537 \text{ Muestra} - 0.143 \text{ Día} + 0.702 \text{ Lote} + 0.0136 \text{ Muestra*Día} \\ - 0.284 \text{ Muestra*Lote} + 0.0207 \text{ Día*Lote} - 0.00177 \text{ Muestra*Día*Lote}$$

Predictor	Coef	Coef. de EE	T	P
Constante	67.5166	0.8984	75.15	0.000
Muestra	0.5369	0.5682	0.95	0.346
Día	-0.14255	0.01784	-7.99	0.000
Lote	0.7021	0.4159	1.69	0.093
Muestra*Día	0.01360	0.01128	1.21	0.229
Muestra*Lote	-0.2841	0.2630	-1.08	0.281
Día*Lote	0.020748	0.008260	2.51	0.013
Muestra*Día*Lote	-0.001766	0.005224	-0.34	0.736

S = 0.854451 R-cuad. = 89.5% R-cuad. (ajustado) = 89.2%

PRESS = 176.828 R-cuad. (pred) = 88.79%



Gráfica de interacción de los factores para parámetro de color L

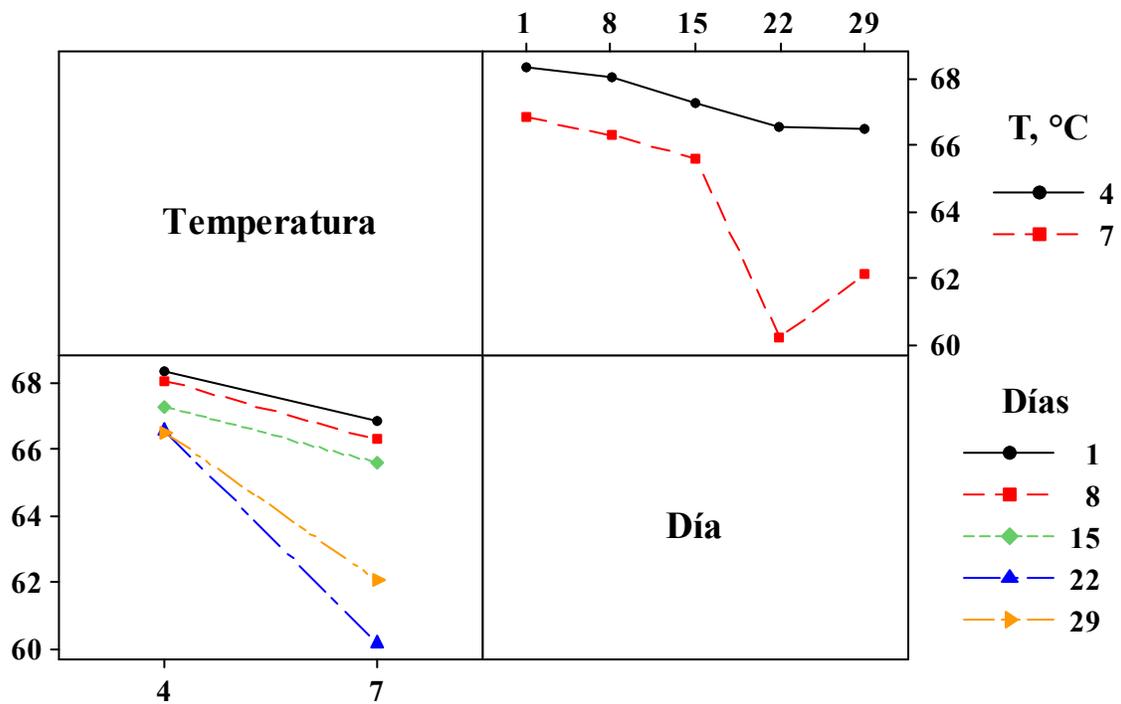
Apéndice I: Análisis de varianza para parámetro de color L con efecto de la temperatura

L vs. Temperatura, Día

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Temp	fijo	2	4, 7
Día	fijo	5	1, 8, 15, 22, 29

Análisis de varianza para Lightness

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Temp	1	448.91	448.91	448.91	467.36	0.000
Día	4	493.83	493.83	123.46	128.53	0.000
Temp*Día	4	169.20	169.20	42.30	44.04	0.000
Error	170	163.29	163.29	0.96		
Total	179	1275.23				



Gráfica de Interacción de temperatura y día para parámetro de color L

Apéndice J: Análisis de varianza para *Hue*

Hue vs. Muestra, Día, Lote

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Muestra	fijo	2	1, 2
Día	fijo	13	1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85
Lote	fijo	3	1, 2, 3

Análisis de varianza para Hue

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Muestra	1	0.3582	0.3582	0.3582	24.88	0.000
Día	12	251.9563	251.9563	20.9964	1458.66	0.000
Lote	2	182.5328	182.5328	91.2664	6340.46	0.000
Muestra*Día	12	6.9745	6.9745	0.5812	40.38	0.000
Muestra*Lote	2	0.5243	0.5243	0.2622	18.21	0.000
Día*Lote	24	34.6093	34.6093	1.4421	100.18	0.000
Muestra*Día*Lote	24	11.1828	11.1828	0.4659	32.37	0.000
Error	156	2.2455	2.2455	0.0144		
Total	233	490.3838				

Análisis de regresión: Hue vs. M, D, L, M*D, M*L, D*L, M*D*L

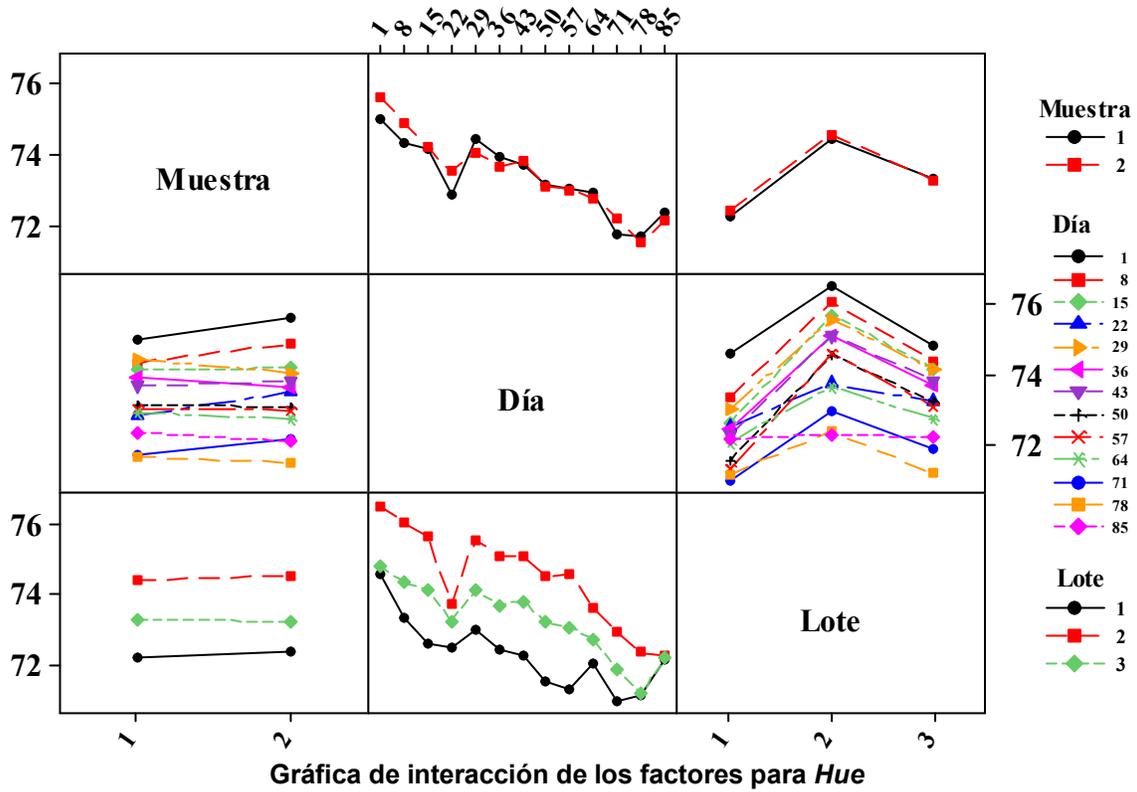
La ecuación de regresión es

$$\text{Hue} = 73.1 + 0.310 \text{ Muestra} - 1.10 \text{ Día} + 0.359 \text{ Lote} + 0.00008 \text{ Muestra*Día} \\ + 0.002 \text{ Muestra*Lote} + 0.0149 \text{ Día*Lote} - 0.00254 \text{ Muestra*Día*Lote}$$

Predictor	Coef	Coef. de EE	T	P
Constante	73.1324	0.4444	164.56	0.000
Muestra	0.3103	0.3038	1.02	0.308
Día	-1.10176	0.06535	-16.86	0.000
Lote	0.3588	0.1756	2.04	0.042
Muestra*Día	0.000084	0.004371	0.02	0.985
Muestra*Lote	0.0018	0.1246	0.01	0.989
Día*Lote	0.0149370	0.0009044	16.52	0.000
Muestra*Día*Lote	-0.002543	0.001339	-1.90	0.059

S = 0.690436 R-cuad. = 78.0% R-cuad. (ajustado) = 77.4%

PRESS = 115.204 R-cuad. (pred) = 76.51%



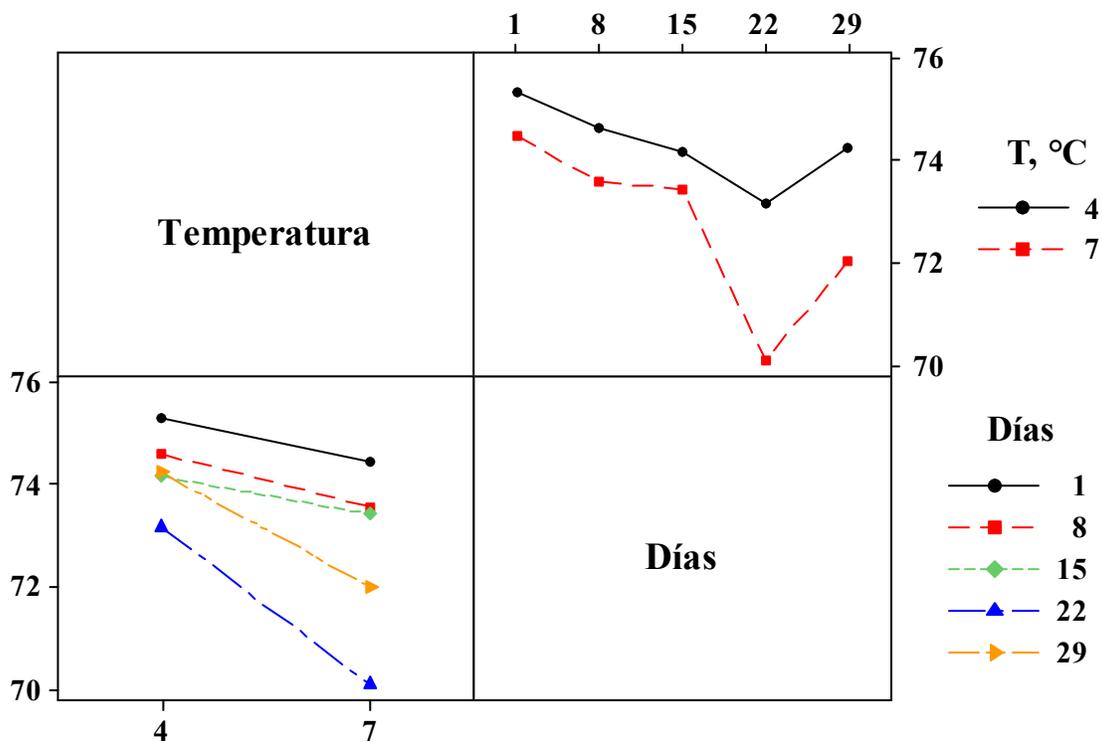
Apéndice K: Análisis de varianza para Hue con efecto de la temperatura

Hue vs. Temp, Día

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Temp	fijo	2	4, 7
Día	fijo	5	1, 8, 15, 22, 29

Análisis de varianza para Hue

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Temp	1	112.955	112.955	112.955	124.92	0.000
Día	4	215.809	215.809	53.952	59.67	0.000
Temp*Día	4	37.804	37.804	9.451	10.45	0.000
Error	170	153.722	153.722	0.904		
Total	179	520.290				



Gráfica de interacción de temperatura y día para Hue

Apéndice L: Análisis de varianza para *Chroma*

Chroma vs. Muestra, Día, Lote

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Muestra	fijo	2	1, 2
Día	fijo	13	1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85
Lote	fijo	3	1, 2, 3

Análisis de varianza para Chroma

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Muestra	1	0.942	0.942	0.942	37.48	0.000
Día	12	1291.810	1291.810	107.651	4284.33	0.000
Lote	2	4000.271	4000.271	2000.136	79602.17	0.000
Muestra*Día	12	49.975	49.975	4.165	165.74	0.000
Muestra*Lote	2	32.393	32.393	16.196	644.59	0.000
Día*Lote	24	112.612	112.612	4.692	186.74	0.000
Muestra*Día*Lote	24	64.190	64.190	2.675	106.44	0.000
Error	156	3.920	3.920	0.025		
Total	233	5556.111				

Análisis de regresión: Chroma vs. Día, Muestra, ...

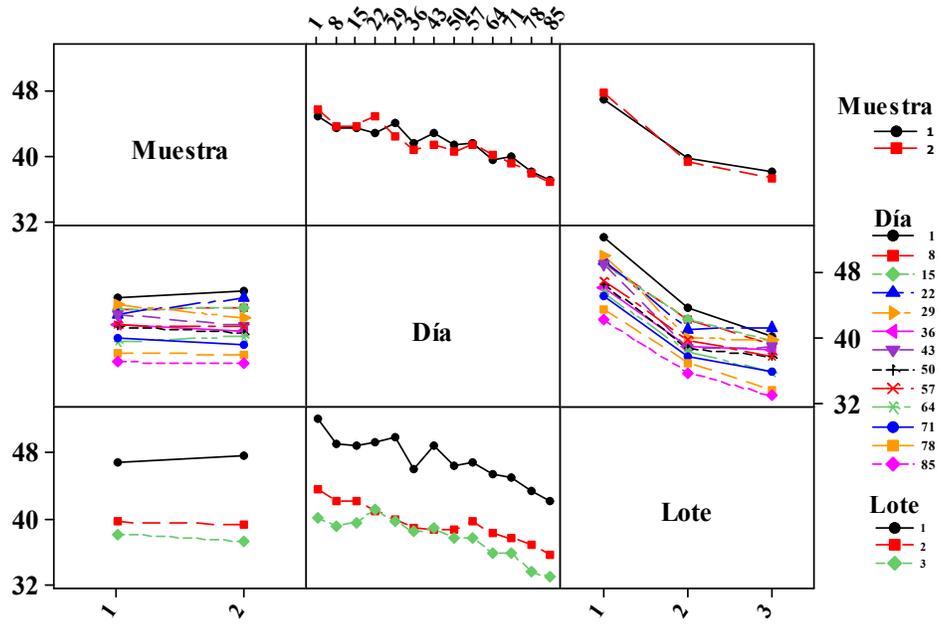
La ecuación de regresión es

$$\text{Chroma} = 50.0 - 0.0326 \text{ Día} + 3.55 \text{ Muestra} - 2.65 \text{ Lote} - 0.0437 \text{ Muestra*Día} \\ - 1.58 \text{ Muestra*Lote} - 0.0178 \text{ Día*Lote} + 0.0159 \text{ Muestra*Día*Lote}$$

Predictor	Coef	Coef. de EE	T	P
Constante	49.965	1.955	25.56	0.000
Día	-0.03260	0.03882	-0.84	0.402
Muestra	3.553	1.236	2.87	0.004
Lote	-2.6454	0.9049	-2.92	0.004
Muestra*Día	-0.04365	0.02455	-1.78	0.077
Muestra*Lote	-1.5832	0.5723	-2.77	0.006
Día*Lote	-0.01777	0.01797	-0.99	0.324
Muestra*Día*Lote	0.01586	0.01137	1.39	0.164

S = 1.85918 R-cuad. = 85.9% R-cuad. (ajustado) = 85.5%

PRESS = 821.801 R-cuad. (pred) = 85.21%



Gráfica de interacción de los factores para *Chroma*

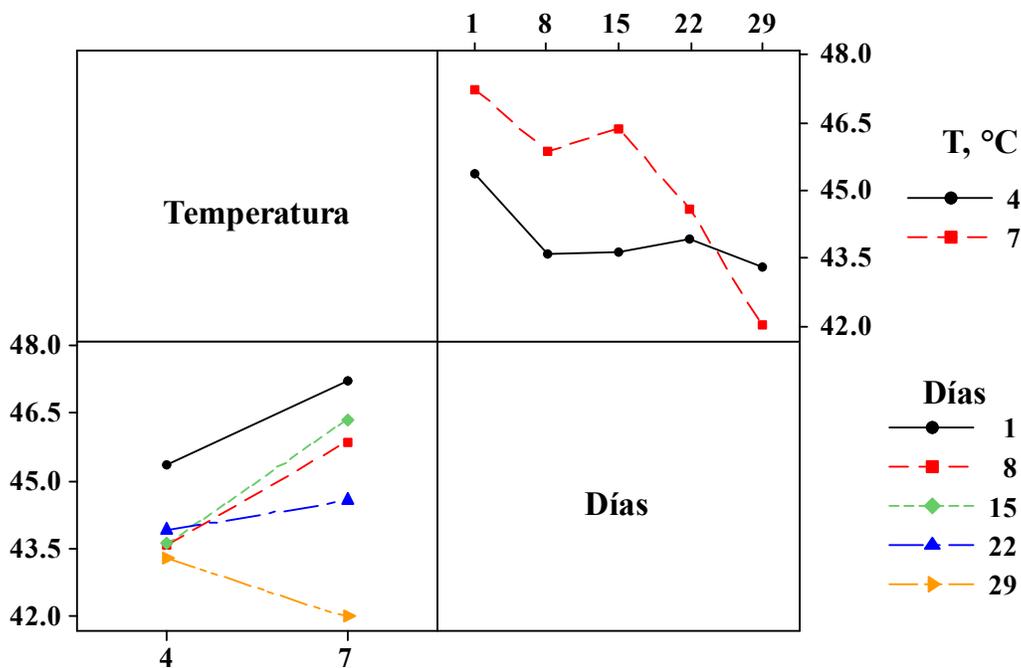
Apéndice M: Análisis de varianza para *Chroma* con efecto de la temperatura

Chroma vs. Temp, Día

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Temp	fijo	2	4, 7
Día	fijo	5	1, 8, 15, 22, 29

Análisis de varianza para Chroma

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Temp	1	71.85	71.85	71.85	4.61	0.033
Día	4	253.87	253.87	63.47	4.07	0.004
Temp*Día	4	95.61	95.61	23.90	1.53	0.195
Error	170	2649.71	2649.71	15.59		
Total	179	3071.03				



Gráfica de interacción de temperatura y día para *Chroma*

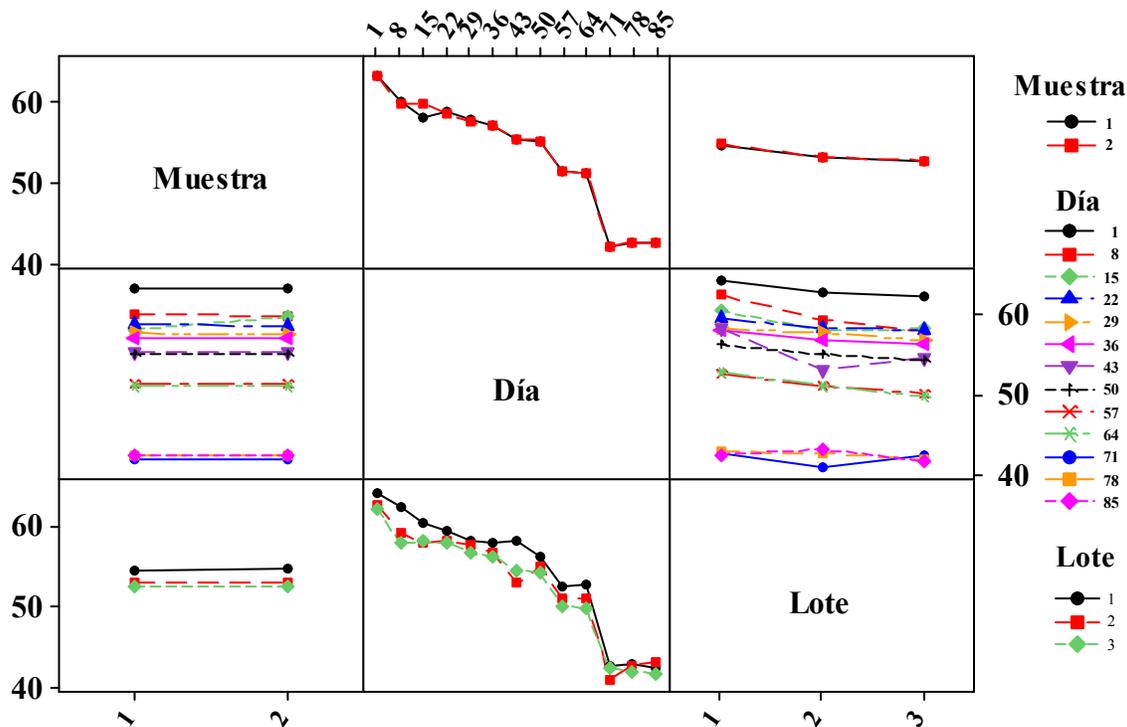
Apéndice N: Análisis de varianza para carotenoides

Carotenoides vs. Muestra, Día, Lote

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Muestra	fijo	2	1, 2
Día	fijo	13	1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85
Lote	fijo	3	1, 2, 3

Análisis de varianza para Carotenoides

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Muestra	1	0.22	0.22	0.22	0.83	0.364
Día	12	10915.22	10915.22	909.60	3397.11	0.000
Lote	2	181.22	181.22	90.61	338.41	0.000
Muestra*Día	12	11.65	11.65	0.97	3.63	0.000
Muestra*Lote	2	0.03	0.03	0.02	0.06	0.940
Día*Lote	24	108.49	108.49	4.52	16.88	0.000
Muestra*Día*Lote	24	0.55	0.55	0.02	0.09	1.000
Error	156	41.77	41.77	0.27		
Total	233	11259.16				



Gráfica de interacción de los factores para Carotenoides (µg/g)

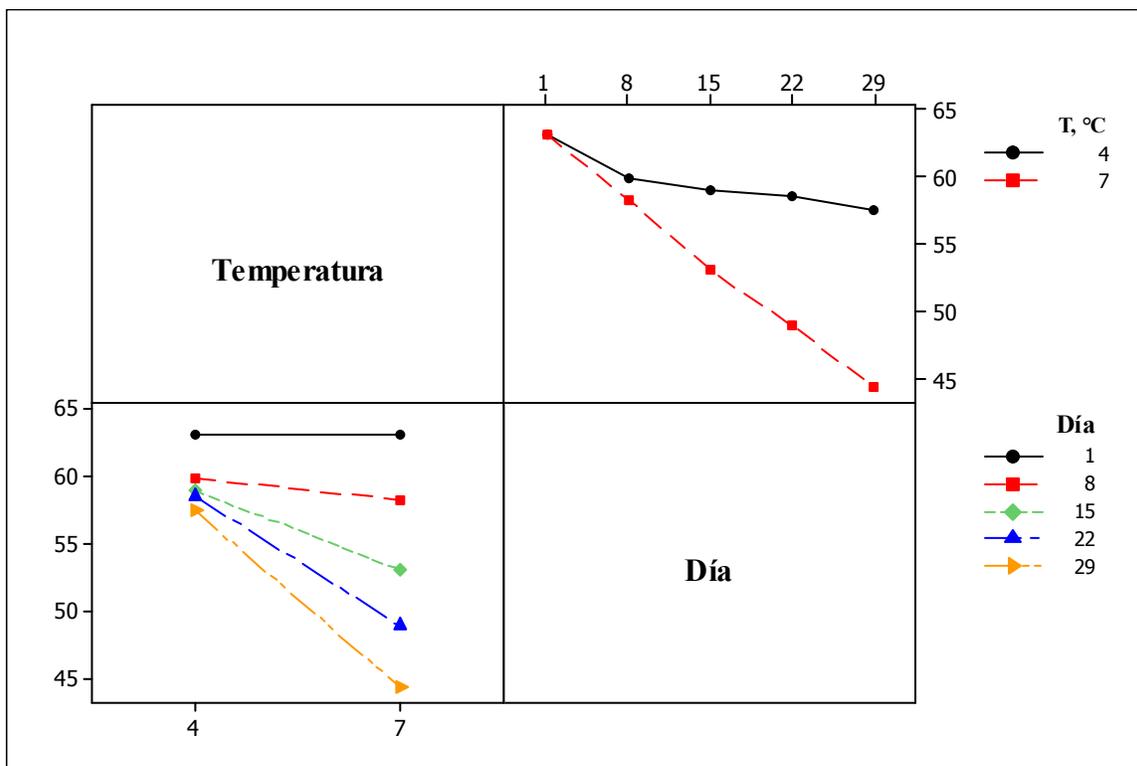
Apéndice O: Análisis de varianza para carotenoides con efecto de la temperatura

Carotenoides vs. Temperatura, Día

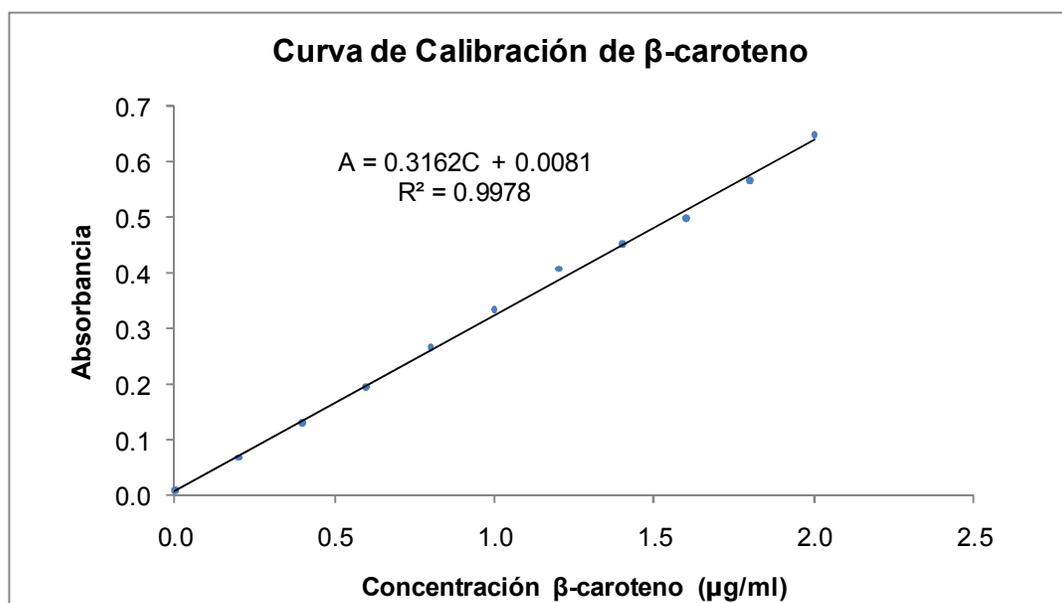
Factor	Tipo	Niveles	Valores
Temperatura	fijo	2	4, 7
Día	fijo	5	1, 8, 15, 22, 29

Análisis de varianza para Carotenoides

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Temperatura	1	1655.31	1655.31	1655.31	1123.76	0.000
Día	4	3236.23	3236.23	809.06	549.26	0.000
Temperatura*Día	4	1073.02	1073.02	268.25	182.11	0.000
Error	170	250.41	250.41	1.47		
Total	179	6214.96				



Gráfica de interacción de temperatura y día para Carotenoides (µg/g)

Apéndice P: Curva de calibración de carotenoides

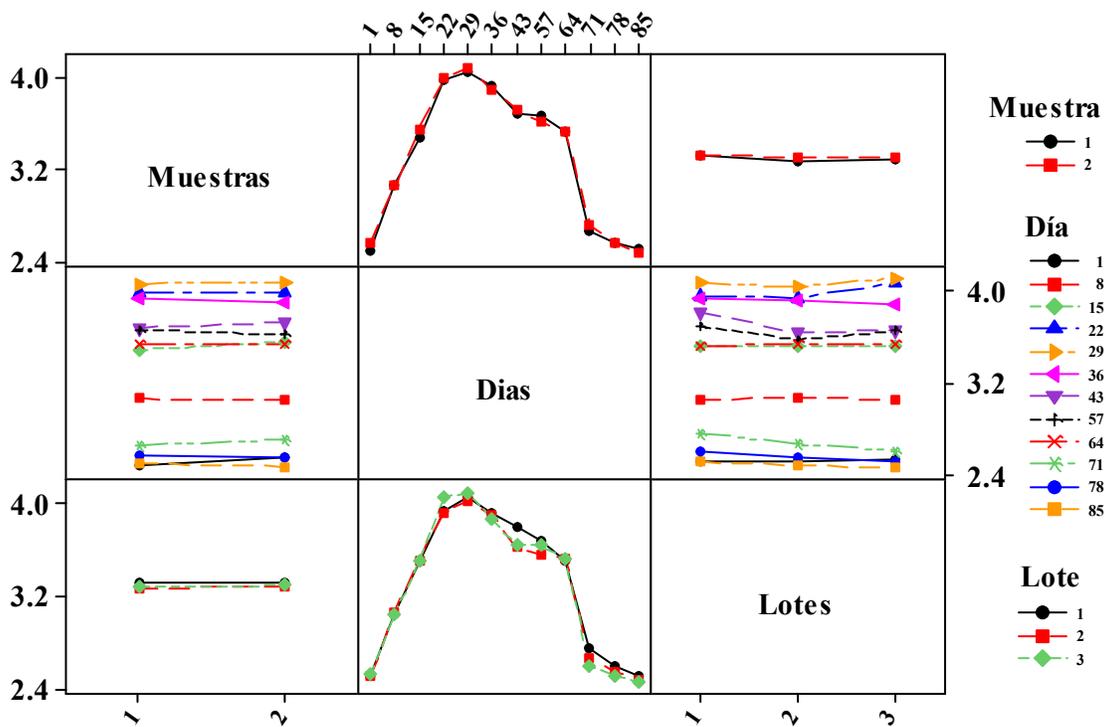
Apéndice Q: Análisis de varianza para el recuento de aerobios totales

AEROBIOS vs. Muestras, Dias, Lotes

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Muestras	fijo	2	1, 2
Dias	fijo	12	1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 57, 64, 71, 78, 85
Lotes	fijo	3	1, 2, 3

Análisis de varianza para AEROBIOS

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Muestras	1	0.00651	0.00651	0.00651	5.38	0.023
Dias	11	48.81828	48.81828	4.43803	3663.18	0.000
Lotes	2	0.04009	0.04009	0.02005	16.55	0.000
Muestras*Dias	11	0.04925	0.04925	0.00448	3.70	0.000
Muestras*Lotes	2	0.00289	0.00289	0.00144	1.19	0.309
Dias*Lotes	22	0.19477	0.19477	0.00885	7.31	0.000
Muestras*Dias*Lotes	22	0.06184	0.06184	0.00281	2.32	0.004
Error	72	0.08723	0.08723	0.00121		
Total	143	49.26086				



Gráfica de interacción de los factores para aerobios totales

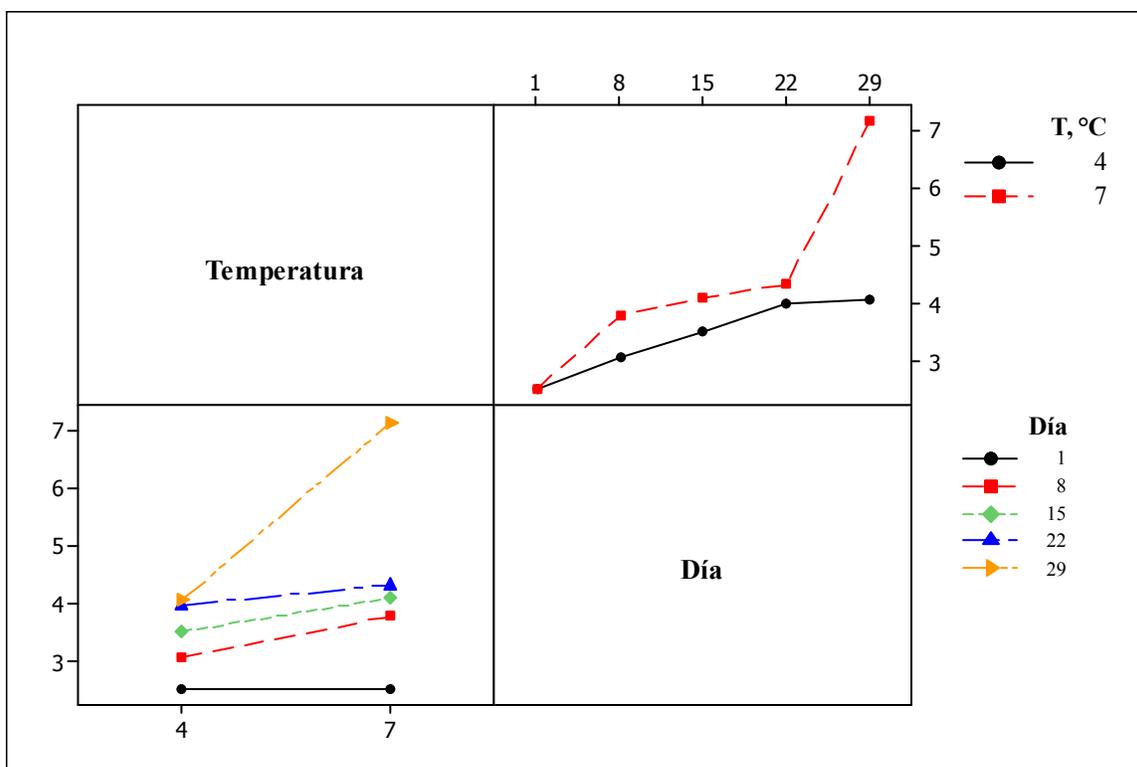
Apéndice R: Análisis de varianza para el recuento de aerobios totales con efecto de la temperatura

Aerobios vs. Temp, Día

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Temp	fijo	2	4, 7
Día	fijo	5	1, 8, 15, 22, 29

Análisis de varianza para Aerobios

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Temp	1	27.126	27.126	27.126	14846.38	0.000
Día	4	123.409	123.409	30.852	16885.67	0.000
Temp*Día	4	36.146	36.146	9.037	4945.77	0.000
Error	110	0.201	0.201	0.002		
Total	119	186.883				



Gráfica de interacción de temperatura y día para Aerobios totales (Log UFC/g)

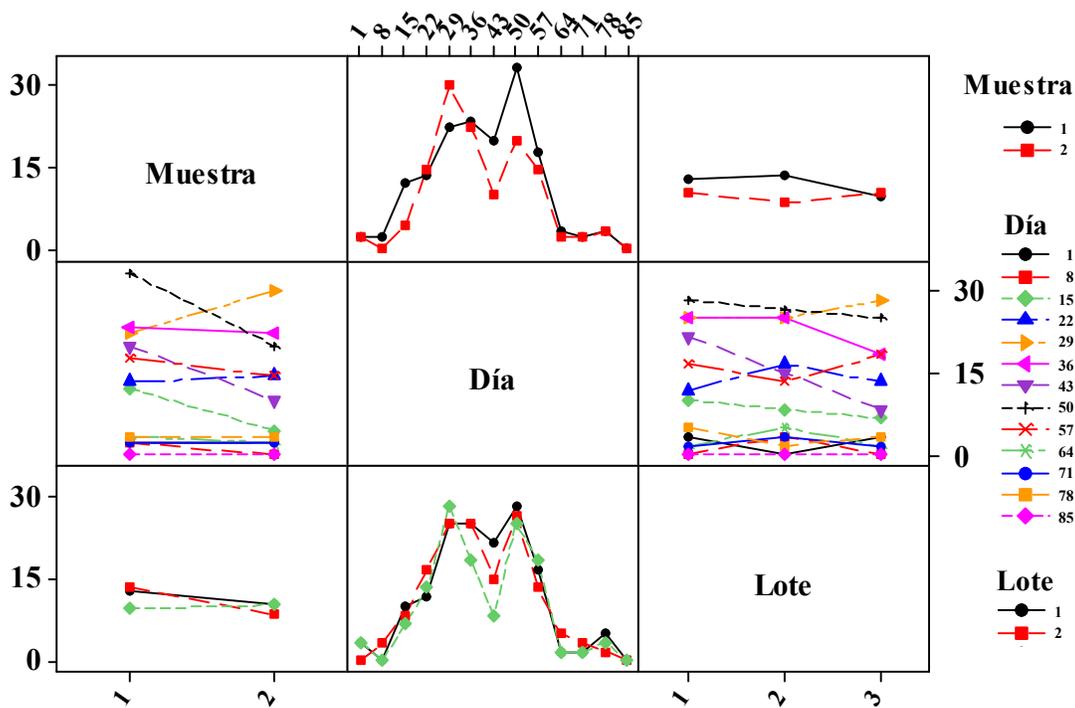
Apéndice S: Análisis de varianza para el recuento de hongos

Hongos vs. Muestra, Día, Lote

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Muestra	fijo	2	1, 2
Día	fijo	13	1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85
Lote	fijo	3	1, 2, 3

Análisis de varianza para Hongos

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Muestra	1	311.54	311.54	311.54	14.29	0.000
Día	12	21040.17	21040.17	1753.35	80.45	0.000
Lote	2	113.68	113.68	56.84	2.61	0.077
Muestra*Día	12	1571.79	1571.79	130.98	6.01	0.000
Muestra*Lote	2	341.03	341.03	170.51	7.82	0.001
Día*Lote	24	1041.88	1041.88	43.41	1.99	0.007
Muestra*Día*Lote	24	2925.64	2925.64	121.90	5.59	0.000
Error	156	3400.00	3400.00	21.79		
Total	233	30745.73				



Gráfica de interacción de los factores para hongos (UFC/g)

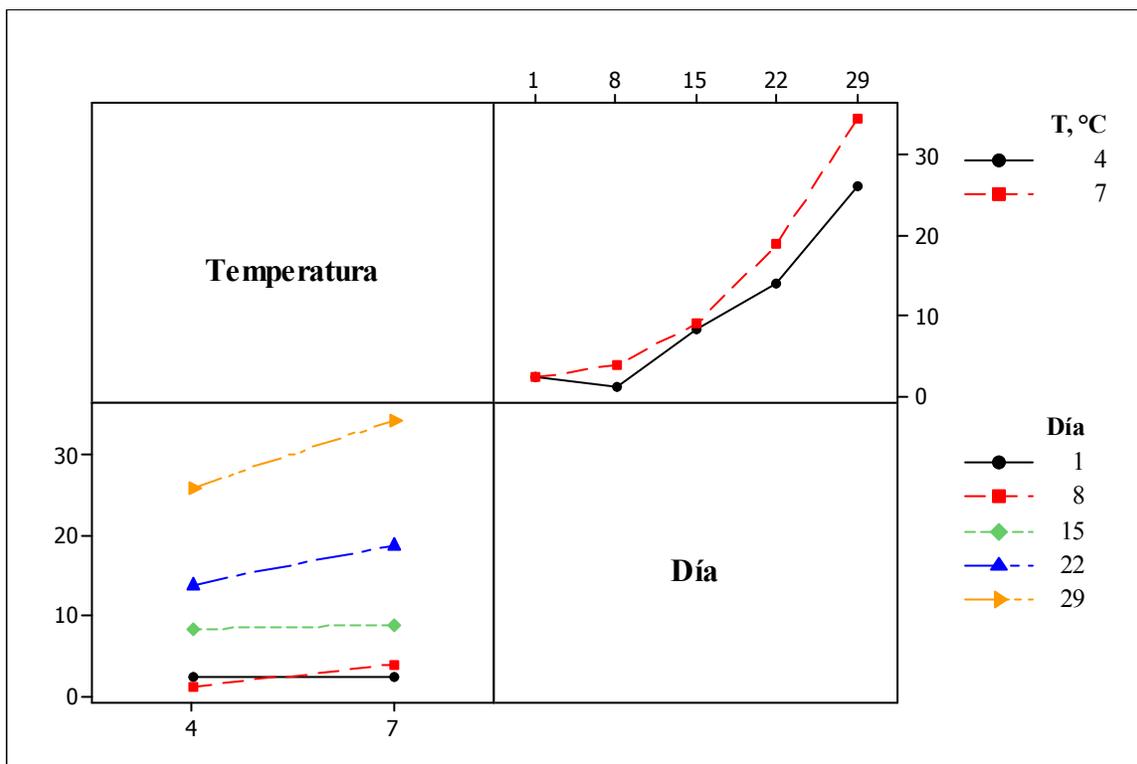
Apéndice T: Análisis de varianza para el recuento de hongos con efecto de la temperatura

Hongos vs. Temperatura, Día

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Temperatura	fijo	2	4, 7
Día	fijo	5	1, 8, 15, 22, 29

Análisis de varianza para Hongos

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Temperatura	1	500.0	500.0	500.0	17.23	0.000
Día	4	19824.4	19824.4	4956.1	170.78	0.000
Temperatura*Día	4	422.2	422.2	105.6	3.64	0.007
Error	170	4933.3	4933.3	29.0		
Total	179	25680.0				



Gráfica de interacción de temperatura y día para hongos (UFC/g)

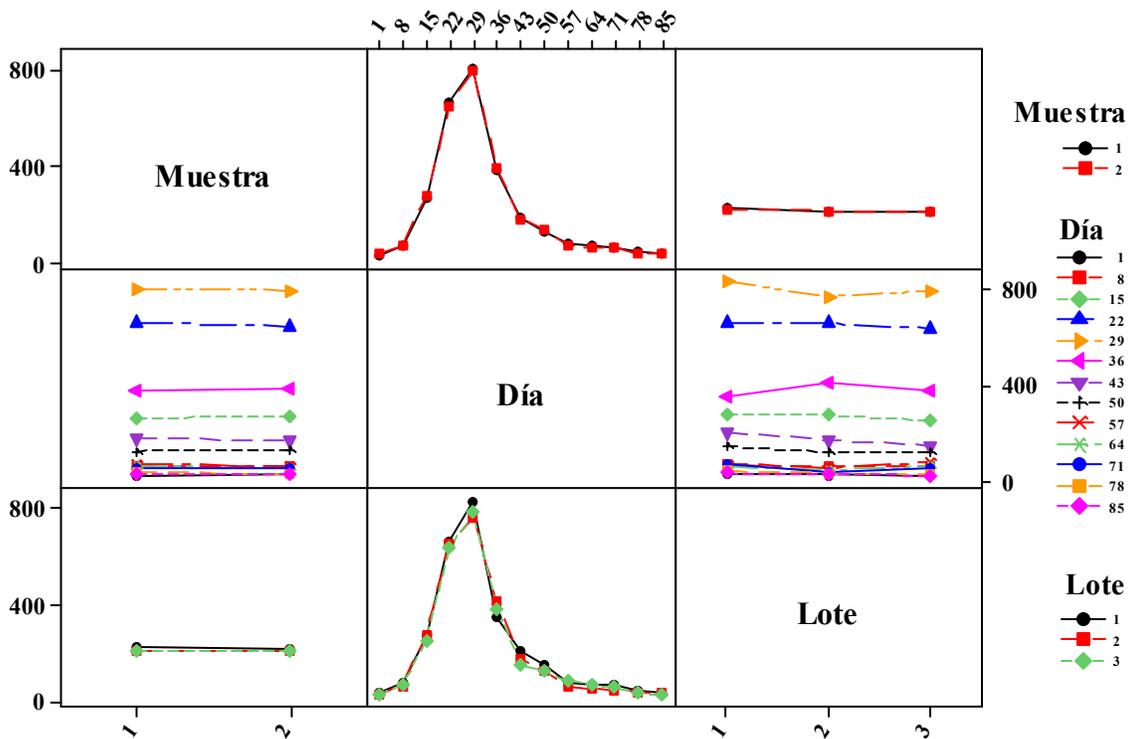
Apéndice U: Análisis de varianza para el recuento de levaduras

Levaduras vs. Muestra, Día, Lote

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Muestra	fijo	2	1, 2
Día	fijo	13	1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85
Lote	fijo	3	1, 2, 3

Análisis de varianza para Levaduras

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Muestra	1	246	246	246	1.97	0.162
Día	12	13675254	13675254	1139604	9132.45	0.000
Lote	2	8926	8926	4463	35.77	0.000
Muestra*Día	12	3632	3632	303	2.43	0.006
Muestra*Lote	2	1426	1426	713	5.71	0.004
Día*Lote	24	37751	37751	1573	12.61	0.000
Muestra*Día*Lote	24	20697	20697	862	6.91	0.000
Error	156	19467	19467	125		
Total	233	13767398				



Gráfica de interacción de los factores para levaduras (UFC/g)

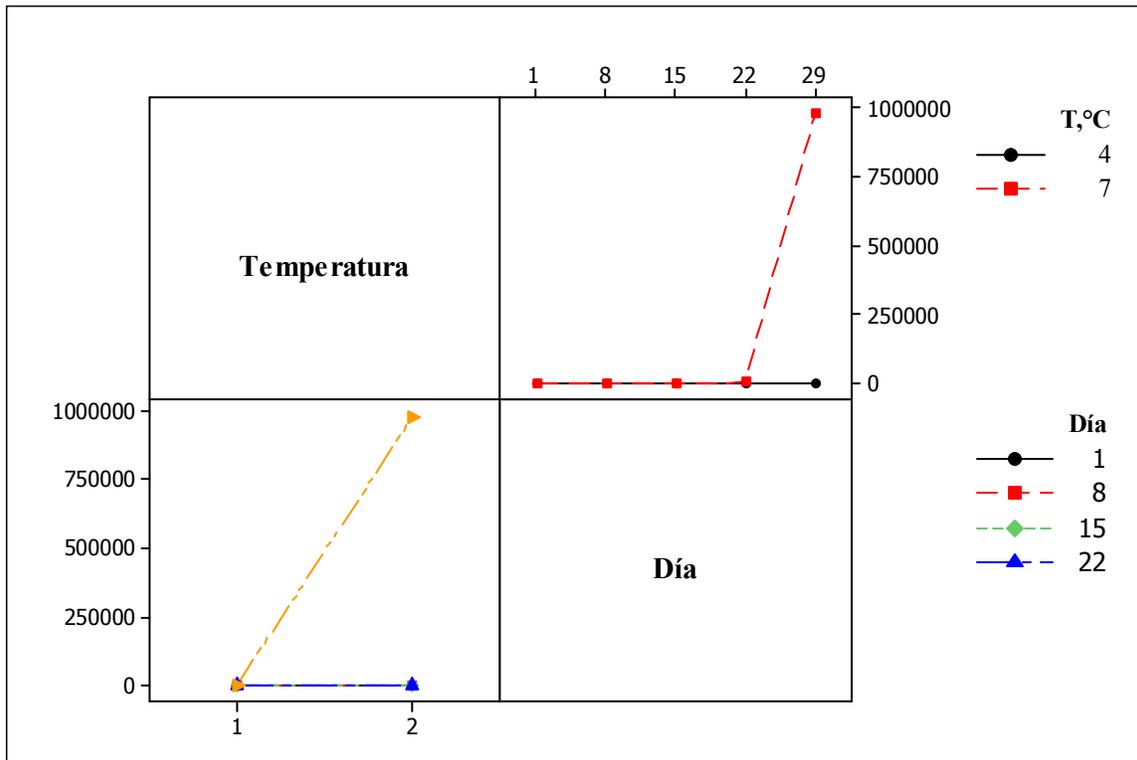
Apéndice V: Análisis de varianza para recuento de levaduras con efecto de la temperatura

Levadura, CFU/g vs. Temp, Día

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Temp	fijo	2	1, 2
Día	fijo	5	1, 8, 15, 22, 29

Análisis de varianza para Levadura, CFU/g

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Temp	1	1.73407E+12	1.73407E+12	1.73407E+12	43.11	0.000
Día	4	6.91081E+12	6.91081E+12	1.72770E+12	42.96	0.000
Error	174	6.99848E+12	6.99848E+12	40221130535		
Total	179	1.56434E+13				



Gráfica de interacción de temperatura y día para levaduras (UFC/g)

Apéndice W: Autorización del Comité Institucional para la protección de los seres humanos en la investigación

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO EN MAYAGÜEZ
DECANATO DE ASUNTOS ACADÉMICOS
COMITÉ PARA LA PROTECCIÓN DE LOS SERES HUMANOS EN LA
INVESTIGACIÓN
(CPSHI/IRB-- 00002053)

10-09-NN-01

23 de febrero de 2010

Norleyn M. Navas Guzmán
Estudiante Graduada
Programa CITA
Colegio de Ciencias Agrícolas
Universidad de Puerto Rico
Recinto Universitario Mayagüez

Estimada estudiante:

El presidente del comité revisó su proyecto de tesis: *OPTIMIZACION Y DETERMINACION DEL LARGO DE VIDA UTIL DE MEZCLA A BASE DE CALABAZA (CURCUBITA MOSCHATA)* y luego de evaluar la documentación sometida, aprueba gustosamente su investigación. La misma reúne las condiciones para ser tratada como expédita.

La aprobación de su propuesta de investigación se extiende desde el 23 de febrero del 2010 hasta el 23 de febrero del 2011. Le recuerdo que cualquier modificación de su proyecto necesitaría pasar por una nueva revisión por parte de este Comité.

Le deseo mucho éxito en su trabajo de investigación y quedo a sus órdenes para cualquier pregunta o clarificación ulterior que estimase necesaria.

Cordialmente,



Dr. Brian Muñoz
Presidente CPSHI
UPRM

Apéndice X: Hoja del panelista utilizada en el análisis sensorial

Universidad de Puerto Rico
Recinto Universitario de Mayagüez
Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Prueba Triángulo y Análisis de diferencias

Fecha: 11 de Marzo 2010
Producto: Horneado de Mezcla a base de Calabaza

Número de panelista _____

Instrucciones:

Usted recibirá 3 muestras para la evaluación de sabor identificadas con números de tres dígitos. Favor mantenerlas en el orden en el que se le entregaron. Dos de las muestras son idénticas, la otra muestra es diferente. Responda los 5 puntos siguientes:

1. * Escriba el número de cada muestra en los encasillados de la izquierda.
- * Pruebe las muestras, tomando agua entre cada prueba.
- * Marque con una X la muestra diferente, en el encasillado de la derecha.

Número de muestra	Diferente

2. Marque con una X el grado de diferencia que encontró.

Diferencia leve () Diferencia moderada () Gran diferencia ()

3. Indique cuál(es) es(son) la(s) característica(s) más importante(s) en la que usted observa diferencia:

Carácter dulce ()
Acidez ()
Salado ()
Amargo ()
Otra:

4. Marque con una X el producto que considera más aceptable

La muestra diferente () Las muestras iguales ()

5. Comentarios
