UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

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

Evaluación de la Aplicación de Medios Hipobáricos sobre la Eficiencia y Eficacia de la Acidificación de Alimentos Modelo

Elaborado por:

Marisol Picado Valenzuela

Carné B15027

Cuidad Universitaria Rodrigo Facio

Diciembre, 2017

Tribunal Examinador

Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Aprobado por:

Ileana Morales H.

M.Sc. Ileana Morales Herrera

Presidenta del Tribunal

PhD., MADE, Óscar Acosta Montoya

Director del Proyecto

PhD. Jessie Usaga Barrientos

Asesora del Proyecto

Lic. Eliana Mora Peraza

Asesora del Proyecto

Thompson V.

Lic. Eduardo Thompson Vicente

Profesor Designado

Dedicatoria

A mi familia, por acompañarme y apoyarme, siempre, en altos y bajos, a lo largo de toda mi vida y sobre todo en mi formación profesional.

Agradecimientos

Al cerrar este ciclo de formación profesional quiero agradecer en primer lugar a Dios, por guiarme a la carrera correcta, por mantenerme con salud y llenarme de todas las facilidades que tuve para completar mi educación. Llegar hasta aquí no hubiera sido posible sin las muchas personas que a lo largo del camino me ayudaron de alguna u otra forma a cumplir la meta. Por esto, agradezco también a todo el personal docente de la Escuela de Tecnología de Alimentos, por todo el esfuerzo dedicado a nuestra formación. Gracias a todo el personal de servicio de la Escuela y el CITA, quienes nos facilitan las prácticas de laboratorio y cualquier trámite que necesitemos. Gracias a Nela, Giova, Luis David, Luis Morales y Alonso, quienes nunca dudaron en ayudarme de cualquier forma que lo necesitara durante todo el tiempo de pruebas experimentales. Gracias especiales a Camacho, por todas las veces que me acompañó a abrir la Planta cuando nadie más había llegado para que me diera tiempo de correr las pruebas, y por supuesto por todos los días que me esperó y ayudó cuando ocupé quedarme un poco más tarde de lo planeado.

A mis queridas y queridos B1's, por darme un motivo extra para ir a clases, por todas las sesiones de estudio que llegaban a marcar horas am y por todas las demás reuniones de no sólo estudio. Gracias por compartir altos y bajos, estrés y risas, porque aprendí mucho de cada una de ustedes y por todos los recuerdos de estos 7 años que llevo conmigo. Gracias enormes a Grettel Zúñiga, David Quesada, Maricel Martén y Ana María Quirós, por permitirme abusarme de sus especiales amistades y ayudarme a sacar modelos a tiempo, me salvaron más de una cinética. Vale Brenes, gracias por ser un brazo extra cuando ocupaba estar en dos lugares al mismo tiempo, por ser mi compañera de trabajo nocturno en el laboratorio, por celebrar conmigo cuando las cosas salían bien y por escucharme cuando no salían tan bien. Gracias Naty por toda la compañía en el proceso de redacción, por todas las porras para terminar, por compartir avances y correcciones y sobre todo por ser siempre una fuente de calma en cualquier tormenta.

Por supuesto no hubiera podido finalizar este trabajo sin el apoyo de mi Comité Asesor, formado por tres de los mejores profesores y profesionales con quienes he tenido la dicha de trabajar. Gracias a la profe Eliana, por siempre estar disponible cuando lo necesitara incluso aun después de haberse pensionado. Profe Jessie y profe Óscar, gracias por subir la barra, gracias por exigirnos un poco más, gracias por mostrarnos más. Me quedo corta en palabras para describir lo mucho que aprendí en asesorías gracias a ambos. Profe Jessie, gracias por enseñarnos que no tenemos nada que envidiar de escuelas extranjeras, que nuestra educación es de competencia internacional y que por ende debemos

hacer trabajos como tal, gracias por impulsarnos a explotar al máximo nuestros conocimientos y habilidades. Profe Óscar, gracias por mostrarme este proyecto, gracias por guiarme, por siempre estar presente y disponible (aun estando fuera del país), por las largas sesiones de dudas y explicaciones, gracias por toda la confianza que depositó en mí, gracias por ser un excelente director.

A mi familia, gracias por el apoyo incondicional en todo aspecto. A mi padre, por ser el hombre más perseverante, emprendedor y trabajador que conozco, por estar siempre pendiente, por enseñarme que hay valores que superan intereses, me enorgullece decir que muchos aspectos de mi carácter los copio de vos. A Alfredo, por ser mi inspiración profesional y por siempre sacar tiempo para ayudarme con cualquier duda. Ingrita, gracias por compartir tantas cosas conmigo y chinearme todo el tiempo, por estar pendiente de cómo me podías ayudar y por correr cada vez que lo necesitaba, espero algún día ser al menos la mitad de la increíble líder que sos. A Dimitas, gracias por sus soluciones creativas, especialmente gracias por toda la ayuda diseñando y montando los cortadores de los modelos, este proyecto no hubiera salido igual sin cilindros tan precisos como los que pude moldear con ellos. Pri, gracias por siempre preocuparte por mí, por todas las veces que me recogiste de noche en el laboratorio y las incontables veces que trasnochaste conmigo ayudándome para lograr terminar lo que ocupara, gracias por ser mi compañera del diario vivir. Y por supuesto gracias a mi mamá, por ser tan grande influencia en la persona que soy hoy, gracias Ma porque nunca me dejan de sorprender tus detalles y la increíble persona que fuiste, porque sé que nos cuidas y estás con todos nosotros siempre, gracias por ser una luz en mi corazón, gracias por ser mi fuerza, mi inspiración y aspiración, mi guía, mi ancla, mi mapa, ¡esto también es para vos y por vos!

Contenido

Resumen x

1 Justificación 1

2 Objetivos 3

2.1 Objetivo General 3

2.2 Objetivos Específicos 3

3 Marco Teórico 4

3.1 Alimentos acidificados 4

3.2 Acidificación 6

3.3 Impregnación por vacío 11

4 Materiales y métodos 15

4.1 Localización 15

4.2 Materias Primas 15

4.3 Equipo 15

4.4 Pruebas Preliminares 16

4.5 Metodología 17

5 Resultados y Discusión 33

5.1 Muestreo comercial 33

5.2 Caracterizaciones fisicoquímicas 35

5.3 Determinación del efecto de la aplicación de medios hipobáricos sobre la tasa de acidificación de alimentos modelo de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo 39

5.4 Determinación del efecto de la aplicación de condiciones pulsadas de medios hipobáricos sobre la tasa de acidificación de alimentos modelo de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo……. 44

5.5 Determinación del efecto de dos acidulantes en condiciones pulsadas de medios hipobáricos sobre la tasa de acidificación de alimentos modelo de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo 49

5.6 Determinación del comportamiento de acidificación en el cuarto longitudinal y masa homogeneizada de los modelos 55

6 Conclusiones 59

7 Recomendaciones 60

8 Bibliografía 61

Índice de cuadros

Cuadro I. Formulación del embutido de pollo tipo salchichón utilizado durante el estudio. 18
Cuadro II. Resumen de tratamientos aplicados en el primer objetivo específico del proyecto..... 25
Cuadro III. Resumen de tratamientos aplicados en el segundo objetivo específico del proyecto. 27
Cuadro IV. Resumen de tratamientos aplicados en el tercer objetivo específico del proyecto..... 30
Cuadro V. Proporciones alimento:solución (promedio ± desviación estándar, n = 3 para palmito y n = 2 para huevos) encontradas en productos acidificados comercializados en Costa Rica. 33
Cuadro VI. Resultados de análisis fisicoquímicos (promedio ± desviación estándar, n = 3) realizados a los modelos de alimentos acidificados con disoluciones al 5,0% de ácido acético, de forma convencional e hipobárica (3 pulsos hipobáricos). 35
Cuadro VII. Resultados de análisis fisicoquímicos (promedio ± desviación estándar, n = 3) realizados en las soluciones de ácido acético al 5,0% de modelos acidificados de forma convencional e hipobárica (3 pulsos hipobáricos). 37
Cuadro VIII. Tiempos (promedio ± desviación estándar, n = 3) en que los modelos alcanzaron el pH de 4,6 en cada condición evaluada. 40
Cuadro IX. Tiempos estimados (promedio ± desviación estándar, n = 3) en que los modelos alcanzaron el pH de 4,6 en cada condición pulsada evaluada. 46
Cuadro X. Detalle de concentraciones altas y bajas de ácido cítrico y acético empleadas para el desarrollo de las pruebas relativas al tercer objetivo específico de la investigación. 49
Cuadro XI. Valores (promedio ± desviación estándar, n = 3) de pH a las 24 horas de acidificación en cada condición probada para los distintos modelos. 52
Cuadro XII. Coeficientes de correlación de Pearson (r) obtenidos en los diferentes análisis de la relación entre variables dependientes entre las mediciones de pH en cuartos y centros de los modelos, así como cantidad de observaciones (n) involucradas. 55
Cuadro XIII. Coeficientes de correlación de Pearson (r) obtenidos en los diferentes análisis de la relación entre variables dependientes entre las mediciones de pH modelos homogeneizados y sus centros, así como cantidad de observaciones (n) involucradas. 57

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama del equipo utilizado para la aplicación de condiciones hipobáricas durante la acidificación. 16

Figura 2. Flujo de proceso del embutido de pollo tipo salchichón utilizado durante el estudio. 19

Figura 3. Imágenes de modelos desarrollados de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo (izquierda a derecha). 20

Figura 4. Diagrama de metodología de medición de pH en los modelos a utilizar. 22

Figura 5. Cinéticas de acidificación convencional e hipobárica de los modelos de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo en soluciones de ácido acético al 2,5% y 5,0%, n = 3. 39

Figura 6. Cinéticas de acidificación a 0, 1, 2 y 3 pulsos de vacío de los modelos de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo en soluciones de ácido acético al 2,5% y 5,0%, n = 3. 45

Figura 7. Cinéticas de acidificación (0 y 1 pulsos de vacío) de los modelos de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo en soluciones de ácido acético y ácido cítrico (concentraciones alta y baja), n = 3. 50

Figura 8. Correlación entre pH medido en el centro de los modelos respecto al pH medido en el cuarto, para los tres modelos, bajo condiciones de acidificación convencional e hipobárica, en soluciones al 2,5% y 5,0% de ácido acético, representada como una línea color naranja (r = 0,9691). 56

Figura 9. Correlación entre pH medido en el centro de los modelos respecto al pH medido en el producto homogeneizado, para los tres modelos, bajo condiciones de acidificación convencional e hipobárica, en soluciones al 2,5% y 5,0% de ácido acético, representada como una línea color naranja (r=0,7917). 58

RESUMEN

Los alimentos acidificados deben alcanzar un pH de 4,6 o menos en un periodo no mayor a 24 horas a temperatura ambiente con el fin de evitar la producción de la toxina BoNT, causante de botulismo, por parte del microorganismo patógeno *Clostridium botulinum*. Como un potencial método de aceleración de la operación de acidificación se evaluó el uso de condiciones hipobáricas (33,6 kPa abs) en la acidificación de alimentos modelo de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo, en términos del tiempo requerido para alcanzar un pH de 4,6, utilizando disoluciones con concentraciones de 2,5% y 5,0% de ácido acético. Posteriormente se evaluó el efecto de la condición hipobárica de forma pulsada (0, 1, 2 y 3 pulsos) en la acidificación de los modelos en las mismas disoluciones de ácido acético, así como la aplicación de 0 y 1 pulsos hipobáricos sobre la acidificación de los modelos utilizando dos concentraciones de ácido acético y ácido cítrico, cada uno. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, considerando efectos significativos cuando $p < 0,05$. Tanto en la prueba de acidificación hipobárica de forma simple como en las condiciones pulsadas, para todos los modelos, no se encontró evidencia que demostrara efectos significativos ($p > 0,05$) de las condiciones hipobáricas de acidificación respecto a la acidificación convencional (presión atmosférica), independientemente de la concentración de ácido acético de la solución utilizada. Las pruebas en ácido cítrico revelaron que la aplicación de 1 pulso hipobárico mostró una mejora significativa ($p = 0,0323$) en la acidificación del modelo de embutido de pollo acidificado en una disolución de 1,6% de ácido cítrico, al compararse con la operación ejecutada convencionalmente. No obstante, para los modelos de zanahoria y clara de huevo, en ambas concentraciones de ácido cítrico y ácido acético, así como el modelo de pollo en la disolución de menor concentración de ácido cítrico y ambas concentraciones de ácido acético, no se encontró evidencia suficiente que permita asegurar que existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las acidificaciones con 0 y 1 pulsos hipobáricos. En todos los casos, las pruebas realizadas con 5,0% de ácido acético presentaron tasas de acidificación significativamente más veloces que las llevadas a cabo a 2,5%. En las pruebas con ácido cítrico, los modelos de embutido de pollo y clara de huevo mostraron aceleración significativa ($p = 0,0005$ y $p = 0,005$, respectivamente) en las tasas de acidificación con las disoluciones más concentradas de ácido cítrico, mientras que en el modelo de zanahoria no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la acidificación según la concentración de ácido cítrico. Estos resultados se obtuvieron a partir de condiciones experimentales que se apegan más a la realidad comercial e industrial de productos acidificados en Costa Rica que las investigaciones previamente realizadas en el tema, lo que resalta la aplicación y relevancia de la presente investigación.

1 JUSTIFICACIÓN

La acidificación de alimentos es una técnica ampliamente utilizada a lo largo de la historia como una forma de preservación, gracias al efecto inhibitorio que ejerce la disminución del pH sobre los microorganismos (Sun, 2012). El acidificar reduce la tolerancia térmica microbiológica (Derossi *et al*., 2010), lo que permite obtener productos estables a temperatura ambiente con tratamientos térmicos de menor severidad, ya que, en conjunto con la acidificación, se produce la reducción microbiológica deseada (Tucker & Featherstone, 2011; Sun, 2012).

Para los alimentos acidificados se establece como parámetro de inocuidad un pH igual o menor a 4,6, con lo que se previene el crecimiento y germinación de las esporas de *Clostridium botulinum* y, por ende, la producción de la toxina BoNT, causante de botulismo (FDA, 2017b; Liu, 2009). Esta enfermedad actúa a nivel neuronal impidiendo la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina en el sistema nervioso, provocando así parálisis del sistema motor, lo que podría tener como consecuencia paros respiratorios e incluso la muerte. Si bien el consumo de alimentos contaminados con la toxina no es la única forma de contraer la enfermedad, es una de las causas más comunes (Liu, 2009), lo que recalca la importancia de mantener estrictos parámetros de control en el procesamiento de alimentos.

Por las razones de inocuidad mencionadas anteriormente, en alimentos acidificados alcanzar el pH final de equilibrio menor a 4,6 representa un punto crítico de control en el procesamiento del producto. Las regulaciones estadounidenses indican que en alimentos acidificados todos sus componentes deben alcanzar un pH de 4,6 o menos en un periodo de 24 horas posteriores al tratamiento térmico, a menos de que se cuente con evidencia, por parte de la autoridad de proceso del establecimiento, que demuestre que un lapso mayor es seguro (U.S. GPO, 2011). No obstante, debido a variables como temperatura de almacenamiento, concentración y tipo de solución ácida, matriz alimentaria, tamaño de los trozos de alimento, entre otros, alcanzar el pH deseado puede tomar más de 24 horas, incluso semanas (Valdez-Fragoso *et al*., 2007; Wang, *et al*., 2013). En dado caso, se requiere mantener el sistema en refrigeración para asegurar que en ese tiempo no se darán proliferaciones microbiológicas que comprometan la inocuidad del producto (Acosta *et al*., 2014).

En busca de disminuir el tiempo de acidificación en estos productos y con ello reducir los costos asociados con esta etapa, especialmente si se toma más de 24 horas en alcanzar el pH de equilibrio requerido, se han realizado estudios utilizando variaciones de proceso y distintas tecnologías que

puedan aumentar la eficiencia de acidificación. Estas investigaciones han variado condiciones como por ejemplo temperatura de la solución ácida y concentración de la misma (Acosta *et al*., 2014), aplicación de vacío (medio hipobárico) (Derossi *et al*., 2010; Derossi *et al*., 2013b) o presión (medio hiperbárico) (Tola & Ramaswamy, 2013) por tiempos cortos sobre el producto para luego continuar la acidificación bajo condiciones atmosféricas, además de tratamientos cíclicos (llamados pulsos) de vacío y presión atmosférica (Derossi *et al*., 2011b; Derossi *et al*., 2013a).

La tecnología hipobárica presenta un atractivo para la industria, ya que su implementación es relativamente sencilla y los tratamientos se realizan en lapsos breves. En los estudios previos sobre el tema se reporta su efectividad para reducir el tiempo de acidificación (Derossi *et al*., 2010; Derossi *et al*., 2011b; Derossi *et al*., 2013a; Derossi *et al*., 2013b). Estas investigaciones, demuestran la utilidad y potencial de variar las condiciones de presión en sistemas de acidificación. No obstante, es necesario generar evidencia sobre el efecto del vacío en procesos de acidificación bajo condiciones industrialmente viables, con alimentos que se encuentren dentro de la oferta comercial de productos acidificados (vegetales y productos avícolas y cárnicos).

Finalmente, es importante resaltar que, al realizar investigaciones en tecnologías emergentes como el uso de vacío en acidificación, es de sumo provecho utilizar modelos como objeto de estudio. Esto puesto que, al reducir las causas de variabilidad propias del alimento, se facilita evaluar los efectos realmente asociados con las variables tecnológicas operadas.

De esta forma, el objetivo del presente proyecto de investigación es evaluar el efecto de la aplicación de medios hipobáricos sobre la eficiencia y eficacia de acidificación de modelos de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo, con el fin de generar evidencia científica asociada que sea de interés y utilidad para la industria.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la aplicación de medios hipobáricos sobre la eficiencia y eficacia de acidificación en modelos de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo, para la generación de evidencia científica de valor para la industria.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Determinar el efecto de la aplicación de medios hipobáricos sobre la tasa de acidificación de alimentos modelo de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo.

2.2.2 Determinar el efecto de la aplicación de condiciones pulsadas de medios hipobáricos sobre la tasa de acidificación de alimentos modelo de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo.

2.2.3 Determinar el efecto de dos acidulantes en condiciones pulsadas de medios hipobáricos sobre la tasa de acidificación de alimentos modelo de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 ALIMENTOS ACIDIFICADOS

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) define los alimentos acidificados como aquellos alimentos de baja acidez (pH mayor a 4,6) a los cuales se les ha adicionado ácido(s) o alimentos ácidos con el fin de que presenten un pH menor a 4,6 (FDA, 2017a; FDA, 2017b). Esta definición es la que se tomará como base para la presente investigación, puesto que actualmente Costa Rica no cuenta con legislación que regule esta categoría de productos. Cabe señalar además que las investigaciones previas en este tema, tomadas como referencia para el desarrollo de este proyecto, también utilizan como base las definiciones y regulaciones establecidas por la FDA (Derossi *et al*., 2010; Derossi *et al*., 2011b; Derossi *et al*., 2013a; Derossi *et al*., 2013b).

Como se estableció previamente, en el caso de los alimentos acidificados se utilizan ácidos para lograr la reducción de pH necesaria. Usualmente se utilizan ácidos orgánicos débiles como el ácido acético, cítrico, láctico, málico, entre otros, en diferentes concentraciones que pueden variar entre 200 y 30 000 ppm. La elección del ácido puede estar influenciada por factores sensoriales como el sabor que éste imparte en el producto, así como posibles cambios de color asociados (Nollet & Toldra, 2015); no obstante, relacionado con aspectos de inocuidad, como parte de su función acidulante se deben priorizar variables como la fuerza ácida y capacidad de difusión del ácido.

Los ácidos orgánicos se caracterizan por poseer un grupo carboxílico dentro de su configuración química que les proveen su propiedad ácida (Nollet & Toldra, 2015). La habilidad de un ácido para donar protones de hidrógeno (H^+) se conoce como capacidad de disociación ácida. Este proceso se lleva a cabo en medios acuosos hasta alcanzar el equilibrio entre el ácido disociado y su base conjugada, lo que se puede expresar mediante una constante de equilibrio (K_{eq}). Debido a que la concentración de agua se mantiene relativamente constante durante el proceso de disociación, el equilibrio también se puede expresar como una constante de acidez (K_a), la cual es el producto de la constante de equilibrio multiplicado por la concentración molar del agua en el medio. Estos supuestos generan que los ácidos con mayor capacidad de disociación, es decir ácidos fuertes, presenten constantes de acidez muy elevadas, por lo que, por conveniencia, la fuerza ácida se expresa como un valor de pK_a, correspondiente al logaritmo negativo de la constante de acidez, como se muestra en la ecuación 1 (McMurry, 2008).

$$pK_a = -logK_a \qquad [1]$$

En respuesta a la naturaleza de la ecuación 1, entre menor sea el valor de pK_a mayor es la fuerza del ácido asociado. A su vez, a medida que mayor sea la fuerza ácida es menor la fuerza de su base conjugada, es decir, entre menor sea el valor de pK_a menor es la fuerza de la base, puesto que si el ácido tiende a donar protones con facilidad esto implica una baja capacidad para recibirlos (McMurry, 2008). Algunos ácidos, como el ácido cítrico (ácido triprótico), presentan más de un grupo ácido en su estructura, en cuyos casos a cada grupo se asocia una pK_a particular. Estos valores de pK_a presentan un orden de magnitud que incrementa en cada grupo ácido, puesto que con cada deprotonación aumenta la fuerza de la base (McMurry, 2008; Osiewacz, 2013).

Una vez alcanzado el equilibrio se puede tener una medición del ácido disociado mediante el pH. Este se define como el potencial de hidrógeno o acidez activa, siendo el resultado del logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno en una disolución acuosa (ecuación 2). El pH se utiliza como un indicador de la acidez del medio, puesto que mide los iones hidrógeno en disolución, resultando en una escala entre 0 y 14; mientras que propiamente la acidez corresponde a una medición que indica el contenido total de ácido en un alimento y usualmente se determina como acidez titulable, expresándose como gramos del ácido en la muestra. En la escala de pH los valores entre 0 y 7 se consideran ácidos, 7 corresponde a neutro y entre 7 y 14 son alcalinos o básicos. La medición de pH se realiza usualmente con un pHmetro, el cual cuantifica el cambio en el potencial electroquímico establecido por los iones hidronio a través de una membrana semipermeable en un electrodo indicador. Otros métodos de determinación de pH incluyen indicadores químicos, por ejemplo, en las bandas indicadoras por color. Esta medición resulta de suma importancia en la industria alimentaria, pues es un parámetro de uso común para el control de calidad e inocuidad en el procesamiento de una gran variedad de alimentos (Nielsen, 2017).

$$pH = -log[H^+] \qquad [2]$$

La disposición de la FDA para establecer el pH menor a 4,6 como límite crítico responde a la resistencia del microorganismo patógeno *Clostridium botulinum*, puesto que este crece en medios cuyo pH sea mayor a 4,6. Se ha comprobado que en condiciones de baja acidez se requiere mantener temperaturas superiores a los 100 °C durante un tiempo adecuado para destruir las esporas, puesto que estas presentan alta resistencia térmica. En contraste, a un pH menor a 4,6 se puede obtener una letalidad de las células vegetativas equivalente con un tratamiento térmico de menor intensidad, al mismo tiempo que el pH del medio previene la germinación de las esporas (Derossi *et al*., 2011a; Zhao, 2012).

Algunas variables en proceso como por ejemplo insuficiente líquido de gobierno, presencia de compuestos alcalinos o alto contenido lipídico en el producto, entre otros, pueden generar resistencia a la penetración del ácido en el alimento. De presentarse una acidificación inadecuada, es decir, en donde el producto no alcance un pH menor a 4,6, se incurre en el riesgo de la germinación de las esporas de *C. botulinum* (Zhao, 2012). Este escenario compromete la inocuidad del producto, puesto que en estado vegetativo este patógeno puede producir la neurotoxina BoNT, la cual es considerada la sustancia tóxica de origen natural más potente y cuyos tipos A, B, E y F provocan botulismo en humanos. De 12 a 36 horas después del consumo del producto contaminado, la intoxicación promueve el desarrollo de una neuropatía bilateral aguda en los nervios craneales que como consecuencia provoca resequedad en la boca, dificultad para tragar, dificultades de habla, caída de los párpados y oftalmoplegia. Además, se puede dar el impedimento de liberación de neurotransmisores como la acetilcolina en el sistema nervioso que, en caso de no obtener el tratamiento adecuado a tiempo, puede provocar paros respiratorios, con riesgo de muerte (Liu, 2009; Witczak & Sikorski, 2016).

3.2 ACIDIFICACIÓN

La acidificación es un proceso en el que migran iones hidronio (H^+) desde una disolución acuosa hacia el alimento que se desee acidificar. Al ser un proceso de transferencia de masa, su difusión se rige por los mismos principios que caracterizan este fenómeno (Derossi *et al*., 2011a). No obstante, a diferencia de otros sistemas, en alimentos, debido a su complejidad química, se dificulta la predicción del comportamiento de la transferencia de masa, de modo que sus propiedades deben ser determinadas experimentalmente en cada caso (Rao *et al*., 2014). La difusión corresponde a la tendencia espontánea de los sistemas a igualar concentraciones en el medio como respuesta a un gradiente de concentración de un determinado soluto (Roque-Malherbe, 2007). Al diseñar los procesos operativos que involucran fenómenos de transferencia de masa, se deben tomar en consideración distintos aspectos que pueden tener un efecto directo en el proceso de difusión, como las características de la disolución y el alimento, así como otros factores externos de procesamiento que se pueden manipular durante el proceso (Rao *et al*., 2014).

La disolución corresponde al medio en el cual se encuentra inmerso el sólido de interés. Se compone de una fracción acuosa junto con uno o más solutos que influyen en las características finales del producto. La adición de estos solutos puede generar efectos sensoriales y fisicoquímicos en la solución, por ejemplo sabores específicos y/o aumento de la viscosidad. Particularmente en los procesos

de acidificación, especialmente en sólidos, resulta de suma importancia las características de difusión propias del ácido dentro de una determinada matriz. Previamente se ha encontrado que diferentes ácidos carboxílicos muestran diferente poder o eficiencia de acidificación en alimentos sólidos, siendo el ácido acético uno de los más eficientes. No obstante, el mecanismo involucrado no se ha esclarecido, de modo que los comportamientos reportados se limitan a las condiciones experimentales de los estudios realizados (Marcotte *et al*., 2012; Nollet & Toldra, 2015).

Por otra parte, se puede manipular el gradiente de concentración de la solución, mejorando la eficiencia del proceso de difusión al aumentar la diferencia de concentración entre el medio y el sólido, ya que al hacerlo se aumentan las diferencias entre los componentes del sistema, por lo que en respuesta se obtiene un mayor movimiento de partículas con el fin de alcanzar el equilibrio. La diferencia de concentración de solutos a través de la membrana del sólido supone una diferencia de presión en la misma, lo que también favorece la transferencia a medida que aumenta el gradiente de concentración. De este modo, entre mayor concentración se tenga del soluto en disolución más eficiente será el proceso de migración. Este fenómeno se puede promover alterando directamente la concentración del soluto en la disolución, o bien, aumentando la masa de disolución respecto al sólido. Ambos métodos provocan mayores masas de soluto en el medio, por ende, resultando en una mayor diferencia de concentración entre el alimento y el medio que resultará en mayor eficiencia del proceso de transferencia de masa (Roque-Malherbe, 2007; Rao *et al*., 2014).

Además de las condiciones de la solución, las características del alimento también determinan el comportamiento de la acidificación. En alimentos sólidos, para que la transferencia de masa sea posible se requiere de una membrana porosa que permita la penetración del soluto. Dentro de la matriz, la eficiencia de la difusión se puede ver afectada por el tamaño de los poros, así como por su distribución, ya que ésta tiene un impacto directo en el recorrido de la disolución hasta el centro del alimento (Roque-Malherbe, 2007). La porosidad de un alimento se puede determinar ópticamente o bien mediante ecuaciones que involucran las densidades aparente y real del material (Derossi *et al*., 2011b; Derossi *et al*., 2013a; Derossi *et al*., 2013b; Oliveros *et al*., 2017). No obstante, se debe tomar en cuenta que estas estimaciones presentan ciertas limitaciones, entre ellas el hecho de que algunos poros no son accesibles debido a su reducido tamaño, por lo que la porosidad efectiva es usualmente menor que la porosidad reportada (Pal, 2014).

Por otra parte, las características de composición del alimento resultan de gran importancia, influyendo en diferentes maneras el proceso de acidificación. La permeabilidad de las paredes celulares

puede tener un impacto en la resistencia que presenta el sólido a la penetración de la disolución. Los sólidos por lo general presentan estructuras heterogéneas que pueden interactuar con los solutos durante la difusión (Rao *et al*., 2014; Varzakas & Tzia, 2014). Esto también involucra la afinidad molecular entre el sólido y la disolución, ya que esto afecta la interacción entre la superficie y el soluto, teniendo efectos sobre la adsorción de la disolución (Roque-Malherbe, 2007).

En cuanto a la composición química, se ha encontrado una relación directa entre la humedad del producto y la eficiencia de difusión, de modo que, debido a la afinidad del alimento con la disolución, alimentos de mayor humedad presentarán mayores tasas de difusión (Farid, 2010). Por el contrario, debido a su naturaleza hidrofóbica, el contenido lipídico del alimento genera resistencia a la penetración del ácido, puesto que este se encuentra en disolución acuosa (Zhao, 2012). También se debe tomar en cuenta el contenido proteico del alimento, ya que las proteínas se caracterizan por su natural capacidad buffer, es decir, presentan habilidad para resistir cambios en el pH producto de la adición de ácidos o álcalis (Belitz, 2009; Featherstone, 2014). De este modo se espera que alimentos con alto contenido de agua favorezcan la acidificación, mientras que muestras con alto contenido de lípidos y/o proteínas presentarán mayor resistencia al proceso.

Además de las características mencionadas anteriormente, se debe tomar en cuenta el tamaño de los trozos de alimento en el producto. Los procesos de transferencia de masa en sólidos, incluida la acidificación, se consideran efectivos cuando el soluto alcanza el centro del sólido, considerado el punto de acidificación más lento. Por tanto, el aumentar el grosor o dimensiones del alimento, incrementa el recorrido que debe seguir la disolución para alcanzar el punto central, teniendo así un efecto directo en el tiempo que toma el proceso (Rao *et al*., 2014). Es decir, entre menor sea el tamaño del alimento será más eficiente su acidificación, puesto que el equilibrio de pH se alcanza con mayor facilidad. Tomando en cuenta lo anterior, para facilitar las investigaciones de los procesos de transferencia de masa, se pueden reducir estas variables intrínsecas del alimento al utilizar modelos de alimentos como objeto de estudio. Estos son matrices de tejido homogéneo y forma definida y uniforme (Acosta *et al*., 2015), de modo que al mantener un mejor control sobre las características de las muestras se puede obtener un mejor enfoque de los resultados obtenidos en un estudio.

En adición a las variables propias del producto, se pueden variar condiciones a nivel de procesamiento con el fin de favorecer la difusión. Una de estas condiciones es la agitación, puesto que promueve la turbulencia en el sistema, lo cual mejora la eficiencia de los procesos al estar asociado directamente a mayores tasas de transferencia de masa. Además, se puede variar la temperatura de la

disolución, el alimento o ambos, ya que el aumento de la temperatura mejora la difusión en el medio debido a que el incremento de energía intensifica el movimiento aleatorio de las moléculas, por ende, se promueve la penetración del soluto en el sólido (Calderón-Domínguez *et al*., 2016).

Como se estableció previamente, variables tanto propias del producto como las asociadas a las condiciones de proceso tienen un efecto directo en el comportamiento de la acidificación. Para caracterizar este proceso se pueden llevar a cabo cinéticas de acidificación a partir de mediciones constantes de pH en el tiempo. Estas cinéticas se pueden analizar mediante diferentes modelos matemáticos que se adapten al comportamiento encontrado. Por ejemplo, se han encontrado procesos de acidificación que muestran un comportamiento logarítmico (Acosta *et al*., 2014), resultado de una rápida disminución de pH al inicio del proceso, disminuyendo su pendiente a medida que se alcanza el equilibrio. No obstante, si el alimento presenta cierta resistencia a la acidificación se puede obtener un modelo sigmoidal, el cual se caracterizada por una forma de "S" que indica un incremento o decrecimiento gradual en un inicio, seguido por un cambio de mayor rapidez en el medio, para finalmente estabilizarse en determinado punto (Osborne, 2014).

Una vez establecidas las condiciones del producto, se pueden seguir diferentes métodos para lograr la acidificación deseada. Los siguientes son los principales métodos para obtener el pH en equilibrio aceptable en alimentos acidificados (FDA, 2017b).

- Escaldado de los ingredientes en soluciones acuosas acidificadas.
- Inmersión en soluciones ácidas de alimentos escaldados.
- Acidificación directa (adición de una cantidad conocida de una solución ácida a una cantidad específica de alimento) en el lote.
- Adición directa de una cantidad de ácido predeterminada a envases individuales durante la producción.
- Adición de ingredientes ácidos a alimentos de baja acidez en proporciones contraladas acordes a las formulaciones específicas.

Entre estos, destaca la acidificación directa en lote como una técnica de alta facilidad de operación, además de que, con su aplicación, se reducen variables que puedan afectar la correcta disminución del pH del alimento, en medios de baja-media viscosidad (Derossi *et al*., 2011a). Independientemente del método utilizado se debe asegurar que en el tiempo establecido para el proceso el pH de equilibrio del

producto (pH final en el que todos los componentes del producto han alcanzado la misma acidez) se encuentra por debajo de 4,6 (Hui *et al*., 2003; FDA, 2017b).

Además de la operación de acidificación, los productos acidificados deben someterse a un tratamiento térmico adecuado, ya que ambas operaciones se complementan para garantizar la inocuidad del producto (Zhao, 2012). Al acidificar se restringen las condiciones óptimas de desarrollo microbiológico, lo que tiene un efecto directo en la resistencia de las células microbianas. Ácidos como el acético y cítrico tienen un efecto en los microorganismos mediante dos mecanismos específicos que aumentan el estrés en las células. Por un lado, producto de la disociación del ácido en el medio acuoso se reduce el pH del medio, creando de esta forma condiciones poco favorables para el crecimiento microbiológico, mientras que además, el ácido no disociado penetra en el citoplasma de las células microbianas, alterando su equilibrio interno. En respuesta, los organismos invierten una gran cantidad de energía en mantener el pH intracelular cercano a la neutralidad, por ende, la energía destinada a procesos de resistencia térmica, germinación, reproducción y producción de toxinas se reduce considerablemente. Además, la acidez del medio obliga a los microorganismos a permanecer en estado de espora para su sobrevivencia, lo que evita su paso a célula vegetativa, con lo que a su vez se previene la germinación y producción de toxinas (Derossi *et al.*, 2010; Nollet & Toldra, 2015).

El tratamiento térmico para un determinado producto, es decir, el tiempo y la temperatura a la cual se procesa el alimento para garantizar su inocuidad, depende de variables como el tamaño y densidad de los trozos de alimento, el contenido de sal y nivel de acidez o pH (Zhao, 2012). A pH neutro los microorganismos usualmente presentan su máxima resistencia térmica debido a las condiciones favorables del medio. De este modo, entre mayor sea el grado de acidificación, menor es la sobrevivencia que presentan ante tratamientos térmicos. Es por esto que el acidificar permite obtener alimentos inocuos al aplicar tratamientos térmicos moderados, cuya letalidad para alimentos de baja acidez no es equivalente a la alcanzada con tratamientos más severos (temperaturas superiores a 100 °C). No obstante, se debe tomar en cuenta que el alcance de la acidificación sobre la resistencia térmica depende del microorganismo de referencia, así como del tipo de ácido y su concentración utilizada, por lo que se debe realizar un correcto análisis tomando en cuenta las características del producto para determinar las condiciones de proceso adecuadas (Sun, 2012).

Además de la destrucción de patógenos, el tratamiento térmico también elimina microorganismos de deterioro e inactiva enzimas que pueden provocar cambios de color, sabor o textura en el alimento. Por otra parte, al reducir la temperatura de procesamiento se reduce el daño térmico en el tejido del

alimento y en compuestos termosensibles como vitaminas y antioxidantes, lo que permite desarrollar productos de mejor calidad nutricional y sensorial. Por ejemplo, a temperaturas superiores a 85 °C se puede hidrolizar la pectina, ocasionando suavidad innecesaria en algunos productos (Sun, 2012; Zhao, 2012). También se debe considerar que la aplicación de temperaturas superiores a los 100 °C requiere de equipos especiales con control de presión para alcanzar estas condiciones, los cuales no siempre se encuentran disponibles para productores con bajo volumen de producción. En productos acidificados, al requerir menores temperaturas, se facilita alcanzar los requerimientos de proceso con equipos de menor costo y mayor facilidad de operación.

Como se ha establecido, tanto la acidificación como el tratamiento térmico son necesarios para el aseguramiento de la inocuidad de productos acidificados, pues la primera operación reduce la resistencia térmica de los microorganismos y evita la germinación de esporas en el producto terminado, mientras que el tratamiento térmico elimina las células vegetativas de patógenos (además de las de deterioro) y con esto el riesgo de infecciones e intoxicaciones por consumo del producto. No obstante, también se debe asegurar un correcto sellado y mantenimiento de la integridad del envase durante el almacenamiento para mantener las condiciones de inocuidad hasta el momento de consumo (Sun, 2012; Zhao, 2012).

3.3 IMPREGNACIÓN POR VACÍO

La impregnación mediante vacío o hipobárica se basa en el principio previamente discutido de difusión de masa; aprovechando espacios vacíos en el tejido, como espacios intercelulares, capilares y poros, entre otros, para promover la transferencia de sustancias a través de los tejidos de los alimentos. Esta técnica supone mejoras en la eficiencia de procesos de transferencia de masa, puesto que los métodos convencionales (sin alteración de la presión del medio) solamente se basan en la diferencia de concentraciones, mientras que al usar vacío se impone un gradiente de presión sobre el alimento, lo que acelera la transferencia de solutos (Derossi *et al*., 2012; Hui & Evranuz, 2015).

Específicamente, durante la aplicación de vacío parcial por un determinado tiempo (t_1) se logra extraer líquidos nativos y gases ocluidos en los capilares de la matriz de un alimento, para posteriormente restaurar la presión atmosférica durante un lapso (t_2), impregnando dichos capilares con una solución externa en la cual se encuentra inmerso el alimento (Derossi *et al*., 2012; Hui & Evranuz, 2015). Esta impregnación de solutos es el resultado de la transferencia de sustancias forzada por la diferencia de presión hacia dentro y fuera de los espacios vacíos del alimento, cuyo mecanismo se

conoce como mecanismo hidrodinámico. Este fenómeno es el principal responsable de la cantidad de líquido externo que se impregna en el producto sólido, así como de la profundidad de impregnación. El gradiente de presión necesario se genera en consecuencia al cambio volumétrico en el alimento y/o la fuerza externa sobre los espacios vacíos en respuesta al vacío y presión (condición atmosférica) durante el proceso. Además del mecanismo hidrodinámico, la impregnación lograda también responde a los procesos naturales de difusión, sin embargo, su influencia en el proceso de transferencia es muy reducida en comparación con la aplicación de vacío (Hui & Evranuz, 2015).

En adición al mecanismo hidrodinámico, se ha reportado que durante la impregnación al vacío el alimento sufre el fenómeno de deformación-relajación. Al estar sometido a un medio hipobárico, el alimento sufre de una deformación momentánea debido al cambio de presión del medio y la succión de gases, mientras que al restaurar la presión atmosférica el alimento vuelve a su estado normal de relajación. En conjunto con el mecanismo hidrodinámico, el fenómeno de relajación-deformación provoca la aceleración de la difusión debido a que los poros del alimento se llenan del líquido con el soluto deseado (Zao & Xie, 2014; Hui & Evranuz, 2015).

Los resultados descritos se obtienen producto de las diferentes etapas del proceso de impregnación al vacío. Inicialmente se induce el vacío en el espacio de cabeza del producto, lo que promueve el gradiente de presión en el sistema. La presión en los capilares promueve la compresión interna de espacios vacíos del alimento, provocando que la presión interna del producto (P_i) sea mayor que la presión externa (P_e). Esto genera que los gases internos se expandan, expandiendo con ellos los espacios vacíos, lo que genera el inicio de la deformación inicial del alimento. Una vez la presión interna iguala la externa ($P_i = P_e < P_{atm}$), la deformación o expansión del producto provoca un mayor volumen interno, al mismo tiempo que los líquidos nativos del alimento escapan en consecuencia de la diferencia de presión. Seguidamente, por el mecanismo hidrodinámico, el líquido externo fluye parcialmente hacia el interior de los capilares hasta alcanzar un equilibrio, al mismo tiempo que la deformación continúa producto de la absorción de líquidos externos en los espacios vacíos. Posteriormente, inicia el periodo de relajación, es decir, el vacío en el espacio de cabeza se restaura a presión atmosférica, por tanto, en esta etapa la presión interna del producto es menor a la presión externa. Este gradiente de presión promueve la absorción de líquido por el mecanismo hidrodinámico hasta que el cambio de volumen producto de la impregnación y los espacios comprimidos permitan alcanzar el equilibrio en el sistema, es decir $P_i = P_e = P_{atm}$ (Hui & Evranuz, 2015).

Durante la impregnación al vacío, inicialmente la penetración del líquido en el sólido se lleva a cabo mediante espacios no compactados de la matriz, como espacios intercelulares, paredes celulares y membranas dañadas, en un mecanismo de simple movilidad del líquido por medios no obstruidos. Una vez se inicia la aplicación de vacío, acorde a la dinámica detallada anteriormente, se fuerza el flujo de la disolución mediante el gradiente de presión (Hui & Evranuz, 2015).

Existen algunos factores que pueden afectar la efectividad y eficiencia del proceso de impregnación al vacío. Entre ellos se encuentra la porosidad del alimento, ya que como se explicó, la impregnación se da en los espacios vacíos del producto, por lo que el tamaño, forma y distribución de poros y capilares presentan una alta influencia en la operación. A su vez, la porosidad se ve afectada por las fracciones volumétricas de agua, sólidos y gas en el alimento y por ende su densidad. Los mejores resultados de impregnación se obtienen en los poros de mayor diámetro, sin embargo, la impregnación del líquido se da solamente en la fracción de porosidad efectiva. En cuanto a la distribución de los poros, se conoce que la distribución de los poros en el tejido externo (expuesto a la disolución) del alimento influye en gran medida los efectos de la impregnación al vacío. Por otra parte, se ha determinado que en muestras donde las células se encuentran ordenadas, la alineación de los espacios vacíos favorece la impregnación debido a que se facilita el flujo del líquido a través de las membranas (Hui & Evranuz, 2015).

Además de los aspectos de porosidad, se deben tomar en cuenta las características del tejido del alimento. Hui & Evranuz (2015) exponen que, al menos en vegetales, la efectividad de la impregnación se puede ver afectada por tejidos compactados, así como la resistencia que presenten al flujo de líquidos. La fuerza mecánica o viscoelasticidad de los tejidos también se asocia directamente con el fenómeno de deformación-relajación, siendo los vegetales con alta viscoelasticidad los que presentan mayor grado de impregnación al usar vacío (Hui & Evranuz, 2015).

En cuanto al líquido de gobierno, debido a que se trata de un proceso basado en difusión, la operación se puede ver afectada por variables como el soluto, la concentración, entre otros, así como factores externos como la aplicación de temperatura y/o agitación, tal como se detalló en la sección 3.2 (Derossi *et al*., 2011a; Hui & Evranuz, 2015).

Al procesar con vacío, en conjunto a la impregnación, se pueden dar otros cambios estructurales y fisicoquímicos en el alimento. Estos pueden incluir deformaciones en la estructura de las células,

cambios en textura, color y propiedades térmicas, cuyos efectos específicos dependen del tipo de soluto en la disolución (Hui & Evranuz, 2015).

Como se expuso, al incluir vacío se pueden forzar los procesos de difusión de sustancias y con esto acelerar el procesamiento, lo que además de implicar ventajas operacionales puede presentar ventajas a nivel de calidad de producto. Esta tecnología se ha utilizado para mejorar textura, color, sabor y calidad nutricional de distintos productos, utilizando solutos tales como inhibidores de enzimas, cloruro de sodio, aloe, gluconatos de hierro y calcio, entre otros (Hui & Evranuz, 2015). El aumento de la impregnación se puede potenciar al incluir variables de proceso, como realizar la operación de forma pulsada, lo que promueve los fenómenos de deformación-relajación y mecanismo hidrodinámico en repetidas ocasiones, reportando mejoras en la eficiencia del proceso (Derossi *et al*., 2011b; Derossi *et al*., 2013a). Además, la impregnación al vacío presenta la ventaja de ser compatible con otros procesos y tecnologías que se combinan con el objetivo de aumentar la ganancia de solutos en el alimento. Algunos ejemplos incluyen deshidratación osmótica, tratamientos pre-congelación y descongelación, pulsos eléctricos, ultrasonido, altas presiones hidrostáticas y calentamiento óhmico, entre otros (Derossi *et al*., 2012; Hui & Evranuz, 2015).

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 LOCALIZACIÓN

El desarrollo de los modelos se llevó a cabo en las instalaciones de la Planta Piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). Las operaciones de acidificación se realizaron en el Laboratorio de Termofluidos de la Escuela de Tecnología de Alimentos, mientras que los análisis fisicoquímicos se llevaron a cabo en los Laboratorios de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos y del CITA. Ambas instituciones se encuentran ubicadas en la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San Pedro de Montes de Oca.

4.2 MATERIAS PRIMAS

4.2.1 *Matrices alimentarias*

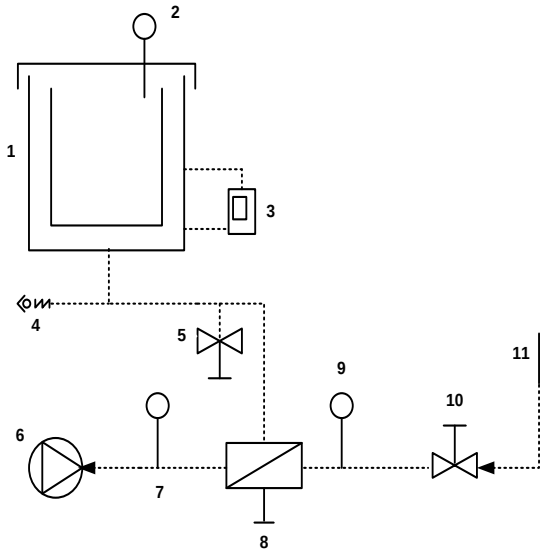
Para la confección de alimentos modelo, se utilizaron zanahorias (diámetro no menor a 3,0 cm), huevos y pollo. Las zanahorias fueron seleccionadas como matriz vegetal debido a su firmeza, homogeneidad del tejido y flexibilidad para obtener la forma deseada de los modelos (Acosta *et al*., 2015). En cuanto a los huevos (matriz avícola), se definió utilizar huevos de gallina por razones de facilidad de acceso en el mercado. Se emplearon solamente las claras, con el objetivo de producir una matriz homogénea en términos de composición y estructura. A modo de matriz cárnica se desarrolló un embutido tipo salchichón, cuyo principal ingrediente es pechuga de pollo, con el fin de que el componente seco mayoritario fuera proteína cárnica. Se seleccionó específicamente el corte de pechuga debido a su característico bajo contenido graso. Otros ingredientes usados en el embutido de pollo se indican en la sección 4.5.1.4.

4.2.2 *Acidulantes*

Se utilizó ácido acético glacial del proveedor Químicas Mundiales S.A. y ácido cítrico en polvo del proveedor Insumos Químicos y Servicios S.A. para la obtención de sus respectivas soluciones ácidas. Las soluciones fueron producidas empleando agua destilada.

4.3 EQUIPO

A continuación, se presenta un diagrama del equipo (de construcción local) utilizado para aplicar condiciones hipobáricas durante el desarrollo de las pruebas de acidificación.



№	Significado
1	Cámara de vacío
2	Manómetro de cámara
3	Control de temperatura
4	Válvula de seguridad
5	Válvula de vacío
6	Bomba de vacío
7	Manómetro de vacío
8	Seleccionador condición
9	Manómetro de presión
10	Válvula de aire comprimido
11	Entrada aire comprimido

Figura 1. Diagrama del equipo utilizado para la aplicación de condiciones hipobáricas durante la acidificación.

4.4 PRUEBAS PRELIMINARES

4.4.1 *Diseño y composición de los modelos*

Para el diseño de los modelos, se realizaron pruebas con geles de agar de forma cilíndrica, empleando puré de zanahoria obtenido mediante las condiciones de cocción descritas por Banerjee *et al*. (2013) y diferentes disoluciones de agar, entre 5 y 13%. Todas las pruebas produjeron modelos que mostraron firmeza considerada inadecuada para ser sometidos a las condiciones de estudio del proyecto, por lo que se descartó el uso de geles y se definió el uso de cilindros de zanahoria cocida como modelo vegetal. Además, para los modelos de zanahoria y clara de huevo, se probaron distintos tiempos de cocción (inmersión en agua a ebullición) con el fin de establecer el tiempo necesario en cada caso para obtener la textura deseada. Por otra parte, se probaron diferentes moldes y formas de obtención de los modelos con el fin de encontrar un método práctico y sencillo de ejecutar durante la investigación.

4.4.2 *Tiempo total de medición de pH para cinéticas*

Se realizaron cinéticas de acidificación preliminares de clara de huevo en ácido acético al 5,0%, para las cuales se llevaron a cabo mediciones del pH del alimento y el pH de la solución ácida hasta que se

alcanzó el equilibrio del sistema. El tiempo requerido para alcanzar este equilibrio fue tomado como base para definir el tiempo total de las cinéticas de acidificación a realizarse a lo largo del estudio (48 h).

4.4.3 ***Determinación de relación alimento:solución***

Se evaluó la cantidad de solución ácida necesaria para cubrir los modelos en los recipientes previamente seleccionados para la investigación, en busca de establecer una relación alimento:solución que permitiera una inmersión completa del alimento en todo momento.

4.4.4 ***Definición de condiciones experimentales***

Se realizaron un total de 15 pruebas preliminares en las que se desarrollaron cinéticas de acidificación de los modelos en condiciones hiperbáricas (202,6 kPa abs). Se probaron condiciones de presión ejecutadas en lapsos de 10 min, condiciones pulsadas restaurando la presión atmosférica y condiciones combinando presión con vacío como medida de intensificación del fenómeno de deformación-relajación. Ninguna de las pruebas mostró indicios de mejorar la eficiencia de la acidificación de los alimentos, por lo que en consecuencia se decidió evaluar solamente el efecto de condiciones hipobáricas de acidificación, resultando en la definición de las condiciones experimentales y tratamientos detallados en esta sección.

4.5 METODOLOGÍA

4.5.1 ***Desarrollo de modelos***

4.5.1.1 Especificaciones

Se desarrollaron cilindros de 2,8 cm de diámetro y 4,0 cm de altura. La forma definida, así como la relación altura/diámetro responde a que se deseaban modelos similares a los alimentos que representan. Las dimensiones se establecieron dentro de los rangos de dimensiones normales de zanahorias, huevos y salchichón. Estas especificaciones se lograron utilizando cortadores que permitieron obtener las medidas mencionadas.

4.5.1.2 Zanahoria

Se tomaron trozos de zanahoria de diámetro y largo no menores a 2,8 y 4,0 cm, respectivamente, y se cocinaron en agua a ebullición (relación de masa 1:2, alimento:agua) durante 25 minutos. Seguidamente, se colocaron en un baño de agua fría para detener la cocción y fueron moldeados con los cortadores definidos.

4.5.1.3 Clara de huevo

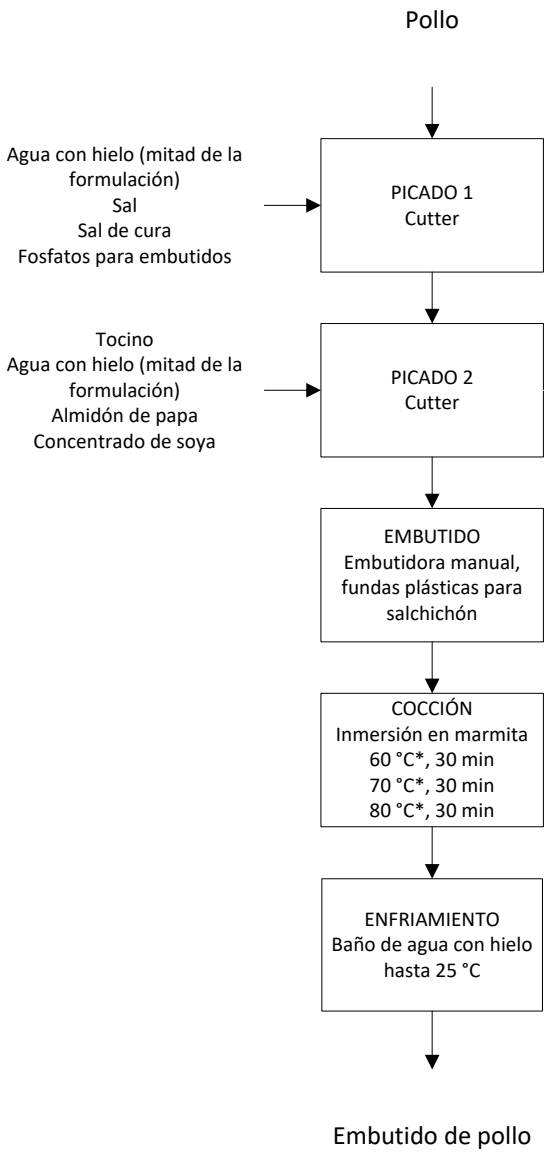
Se separaron las claras mediante un separador de yemas manual. Una vez mezcladas todas las claras, se vertieron en fundas de salchichón (4 cm de diámetro) y se realizó la cocción empleando agua en ebullición durante 15 minutos, para luego ser enfriadas por inmersión en agua fría. Una vez frías, se removieron las fundas y se obtuvieron los modelos mediante el uso de los cortadores definidos.

4.5.1.4 Embutido de pollo

Para el desarrollo del embutido de pollo se siguió la formulación y proceso mostrados a continuación.

Cuadro I. Formulación del embutido de pollo tipo salchichón utilizado durante el estudio.

Ingrediente	Formulación (%)
Pechuga de pollo	50
Agua con hielo	20
Tocino	15
Concentrado de soya	10
Almidón de papa	5
Sal	1,7
Fosfatos para embutidos	0,4
Sal de cura	0,3



*Temperatura del agua de cocción.

Figura 2. Flujo de proceso del embutido de pollo tipo salchichón utilizado durante el estudio.

A continuación, se muestra una imagen de los tres modelos desarrollados.

Figura 3. Imágenes de modelos desarrollados de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo (izquierda a derecha).

4.5.1.5 Almacenamiento

Posterior a su producción, todos los modelos de alimentos fueron almacenados en refrigeración (3-5 °C) durante un periodo de 1 a 2 días previo a su uso en los experimentos. Antes de aplicar los tratamientos, todos los modelos se colocaron en un baño de agua tibia (aproximadamente 30 °C) hasta que se encontraran dentro del rango de 20 a 23 °C.

4.5.2 ***Disoluciones ácidas***

Las disoluciones de ácido acético se prepararon tomando en cuenta la concentración determinada del ácido acético glacial utilizado como materia prima mientras que para el desarrollo de las disoluciones de ácido cítrico se contempló la pureza reportada del mismo (99,5%). Todas las disoluciones preparadas se titularon con NaOH (0,1 mol/L) a modo de confirmación de sus respectivas concentraciones. En estas pruebas confirmatorias, las disoluciones debían presentar una desviación no mayor a 0,2% respecto a la concentración establecida. De no ser así, la disolución se ajustó con ácido o agua destilada según el caso, hasta obtener la concentración necesaria.

4.5.3 ***Relación alimento:solución***

A lo largo del estudio se trabajó con una relación de masa alimento:líquido de 35:65 (determinado en pruebas preliminares). Esta relación de masas responde a la mínima cantidad de líquido con la que los modelos se encontraron completamente cubiertos por el líquido en recipientes de aproximadamente 13,0 cm de diámetro y 15,0 cm de altura. Dentro de cada recipiente se colocó la cantidad de modelos

necesaria para hacer las mediciones respectivas, para cada repetición de los tratamientos, según los objetivos establecidos. Todos los tratamientos contaron con tres repeticiones, las cuales fueron aleatorizadas a lo largo de los días programados para la ejecución de los mismos.

En el caso de los modelos cárnicos, debido a su menor densidad respecto a la solución ácida, en cada recipiente se incluyó una malla sobre los modelos para garantizar la inmersión completa de los mismos. En todos los casos, a lo largo de las mediciones se procuró mantener la relación alimento:líquido establecida, manteniendo los modelos cubiertos por líquido, por lo que al remover modelos para su análisis se removió una cantidad equivalente en masa de solución ácida.

4.5.4 ***Condiciones de temperatura y agitación***

Todos los tratamientos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente (20-23 °C) y sin sistemas de agitación asociados. Posterior a la aplicación de las condiciones hipobáricas definidas en cada caso, los modelos en solución ácida se mantuvieron en reposo en sus respectivos recipientes tapados, a temperatura ambiente y presión atmosférica, hasta sus respectivos momentos de análisis. Las muestras no sometidas a condiciones de acidificación hipobárica, fueron mantenidas en las mismas condiciones descritas.

4.5.5 ***Aplicación de vacío y concentraciones de ácido utilizadas***

A lo largo de todas las pruebas del estudio se emplearon condiciones hipobáricas de 33,6 kPa abs, con un lapso de aplicación de 10 minutos. Este tiempo responde al mayor tiempo de aplicación de vacío utilizado en los estudios publicados sobre acidificación hipobárica, mientras que el nivel de vacío se definió dentro de los niveles de esta variable utilizados en dichas investigaciones (Derossi *et al*., 2010; Derossi *et al*., 2011b; Derossi *et al*., 2013a; Derossi *et al*., 2013b), así como la capacidad de la bomba de vacío del equipo descrito en la sección 4.3. Para alcanzar las condiciones hipobáricas, así como para regresar a condiciones atmosféricas, se manipuló la válvula de vacío de forma tal que el proceso se llevara a cabo de manera gradual a lo largo de 60 segundos.

4.5.6 ***Medición de pH***

4.5.6.1 Determinación de pH en los modelos de alimentos

Las determinaciones de pH se realizaron utilizando un electrodo de vidrio HI1083 (diámetro de 3 mm) calibrado, acoplado a un pH-metro HI2211, Hanna Instruments. Para esto, cada modelo fue removido del líquido de inmersión en el tiempo definido, posteriormente se secó superficialmente con toallas de papel para remover el exceso de solución ácida, y luego se realizó la medición de pH en un

lapso no mayor a 20 minutos desde que se retiró el modelo del recipiente con solución ácida. Se realizaron determinaciones en el centro geométrico del modelo, pues es esta zona la que presenta la acidificación más lenta (Acosta *et al*., 2014), siendo así la zona crítica de acidificación. Como medidas complementarias, se determinó el pH en la mitad de la distancia entre el punto central y el extremo del modelo (un cuarto del eje longitudinal), así como en su masa homogeneizada. En cada caso, a partir de las determinaciones realizadas, se construyeron cinéticas de acidificación para el análisis de datos.

Para las mediciones en el centro y cuarto se realizó un corte longitudinal del modelo a aproximadamente 3 mm del centro, con el fin de que al insertar el electrodo este coincida con la mitad del ancho del cilindro. En el caso de las determinaciones al cuarto de los modelos, se insertó el electrodo a aproximadamente 1 cm del extremo del cilindro mientras que para las determinaciones en el centro geométrico la medición se realizó a aproximadamente 2 cm (figura 4).

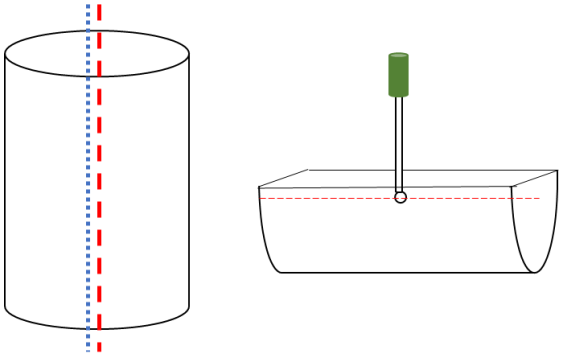


Figura 4. Diagrama de metodología de medición de pH en los modelos a utilizar.

Nota: La línea roja representa el centro y la azul el punto de corte longitudinal.

Por otra parte, para la determinación de pH del modelo en su totalidad, este se homogeneizó utilizando un procesador de alimentos hasta lograr una pasta de consistencia apta para la medición de su pH, adicionando una masa de agua de 10% la masa del modelo, lo cual cumple con las regulaciones de medición de pH establecidos por FDA para productos acidificados semisólidos (2017b).

4.5.6.2 Determinación de pH en las soluciones ácidas

Además de las mediciones detalladas previamente, para todos los tratamientos del estudio se realizaron cinéticas de variación de pH de las soluciones ácidas. Se realizaron mediciones de pH a las 0, 12, 24, 36 y 48 h, para un total de 5 puntos. Estas cinéticas se realizaron con fines confirmatorios de la

eficacia de acidificación (el pH de la solución debería incrementar a medida que se acidifican los modelos), para finalmente corroborar el equilibrio de pH en las etapas finales del proceso.

4.5.7 ***Diseño experimental***

4.5.7.1 Muestreo comercial

Se realizó un muestreo comercial con el fin de registrar las relaciones reales de alimento:líquido que presentan los alimentos acidificados (sólidos en solución) estables a temperatura ambiente encontrados en el país. Como matriz vegetal se eligió corazones de palmito, mientras que se recolectaron muestras de huevos de codorniz como matriz avícola. No se encontró ningún producto cárnico acidificado, por lo que el muestreo se limitó a las dos primeras matrices mencionadas.

Para ambos alimentos se recolectaron muestras de tres diferentes lotes, en el caso del palmito, provenientes de tres diferentes marcas comerciales y para huevo de codorniz de dos marcas, todos dentro de la fecha de caducidad establecida, para un total de nueve muestras de palmito y seis muestras de huevo de codorniz. De la información reportada en las etiquetas de cada una de las muestras se registró la marca, lote, fecha de vencimiento y acidulante reportado. Para cada producto recolectado se midió la masa de sólidos y líquido, para posteriormente obtener la relación correspondiente.

4.5.7.2 Caracterización fisicoquímica de los modelos

Se realizaron diversos análisis tanto a los modelos como a las disoluciones ácidas, con el fin de establecer un perfil fisicoquímico de los mismos y determinar si el proceso de acidificación hipobárica genera cambios significativos. Los análisis detallados a continuación se llevaron a cabo en los tres modelos y sus disoluciones de inmersión al inicio del proceso de acidificación (tiempo inicial) y al cabo de las 48 h de acidificación (tiempo final), tanto en la condición de acidificación convencional (presión atmosférica), como en la condición de acidificación hipobárica más severa (3 pulsos) con la mayor concentración de ácido (5,0% de ácido acético) con la que se trabajó en el estudio.

4.5.7.2.1 Análisis en modelos

Se registró el cambio de masa (Δm) de los alimentos a partir de los valores de masa de los modelos al tiempo inicial y final de cada condición de acidificación. El cambio volumen (ΔV) se determinó mediante mediciones de diámetro y altura de los modelos en los mismos tiempos, utilizando un vernier. Se evaluó la humedad por el método 925.30 AOAC, P-SA-MQ-002 y acidez titulable por el método 942.15 AOAC, P-SA-MQ-011 (AOAC, 2005). Todos los análisis anteriores se realizaron por triplicado.

Además, se determinó la porosidad de los modelos (n=9) mediante la ecuación 3 (Lewis, 1993):

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad [3]$$

Donde:

ε= Porosidad

ρ_a= Densidad aparente

ρ_r= Densidad real

Para estas determinaciones, la densidad aparente se estimó mediante mediciones de masa y volumen según las dimensiones (diámetro y altura) de los cilindros. Debido a las dificultades para eliminar por completo el aire ocluido en los alimentos, la densidad real (ρ_r) se estimó mediante la siguiente ecuación (Lewis, 1993):

$$\rho_r = \frac{1}{{x_C}/{\rho_C} + {x_P}/{\rho_P} + {x_G}/{\rho_G} + {x_F}/{\rho_F} + {x_A}/{\rho_A} + {x_H}/{\rho_H}} \quad [4]$$

Donde:

ρ= Densidad

χ= Fracción de masa

C= Carbohidratos

P= Proteína

G= Grasa

F= Fibra

A= Cenizas

H= Humedad

Las ecuaciones para estimar la densidad de cada uno de los componentes (calculadas a 22 °C), así como sus fracciones de masa correspondientes a cada modelo se tomaron de ASHRAE (2010). Específicamente para el modelo de embutido de pollo, el aporte de sodio de la sal de cura y fosfatos

para embutidos se calcularon mediante la composición de los mismos según el proveedor y los pesos moleculares asociados, para ser reportados como parte de las cenizas del alimento.

4.5.7.2.2 Análisis en soluciones ácidas

Se realizaron determinaciones de acidez titulable según el método 942.15 AOAC (AOAC, 2005) y turbidez utilizando un turbidímetro marca Hach calibrado previo a cada uso con 6 patrones de turbidez entre ≤20 y 7000 NTU.

4.5.7.2.3 Análisis estadístico

Se analizaron los datos empleando la prueba de t-Student (nivel de significancia de 0,01), tomando como factor nominal la condición de acidificación (atmosférica e hipobárica) y como respuesta las mediciones de la característica que corresponda.

4.5.7.3 Determinación del efecto de la aplicación de medios hipobáricos sobre la tasa de acidificación de alimentos modelo de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo

4.5.7.3.1 Condiciones

Se comparó el efecto de la aplicación de condiciones hipobáricas respecto a la forma convencional (presión atmosférica) de acidificación. Todas las pruebas se realizaron sobre los tres modelos alimentarios detallados previamente, utilizando disoluciones de 2,5 y 5,0% de ácido acético como soluciones ácidas de inmersión. A continuación, se presenta el detalle de dichos tratamientos.

Cuadro II. Resumen de tratamientos aplicados en el primer objetivo específico del proyecto.

Condición de acidificación	Presión (kPa abs)	Concentración de solución ácida (%)
Convencional	88,06*	2,5 5,0
Hipobárica	33,6	2,5 5,0

*IMN, 2017.

4.5.7.3.2 Mediciones

Se realizaron un total de 10 mediciones de pH en el tiempo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 32, 48 h), una vez concluidos los respectivos tratamientos. Durante las primeras 12 horas las mediciones se realizaron

en lapsos menores dado que existe evidencia previamente reportada que muestra que la velocidad de acidificación es mayor durante las primeras 24 horas (Acosta *et al*., 2014).

4.5.7.3.3 Análisis estadístico

Las curvas de acidificación presentaron un comportamiento sigmoidal. Tomando en cuenta el coeficiente de determinación ajustado (r^2_{ajs}), la probabilidad de ajuste del modelo, y la raíz del cuadrado medio del error, se seleccionó el modelo no lineal logístico de 4 parámetros Hill. La ecuación correspondiente se muestra a continuación.

$$y = c + \frac{d-c}{1+10^{a*(b-x)}} \quad [5]$$

Donde:

a= Tasa de crecimiento

b= Punto de inflexión

c= Asíntota inferior

d= Asíntota superior

x= Variable predictora (tiempo)

y= Variable respuesta (pH)

Este modelo se utilizó para, mediante predicción inversa, determinar el tiempo en el que cada modelo alcanzó el pH de 4,6; considerado como criterio para evaluar la eficiencia de acidificación. Obtenidos estos tiempos, para cada modelo, se empleó un diseño factorial 2^2, siendo los factores la condición de acidificación (convencional e hipobárica) y la concentración de la disolución ácida (2,5% y 5,0%). Para el análisis estadístico, se llevó a cabo un ANDEVA de dos vías (nivel de significancia de 0.05), mediante el paquete estadístico JMP® Pro versión 13 (SAS Institute Inc.).

4.5.7.4 Determinación del efecto de la aplicación de condiciones pulsadas de medios hipobáricos sobre la tasa de acidificación de alimentos modelo de zanahorita, embutido de pollo y clara de huevo

4.5.7.4.1 Condiciones

Se comparó el efecto de la aplicación de condiciones hipobáricas pulsadas de acidificación en los modelos. Un pulso correspondió a 10 min de la condición hipobárica y 10 min de exposición a presión atmosférica, para 20 min de tiempo total por pulso. Se probó el efecto de la aplicación de 0, 1, 2 y 3

pulsos, para un tiempo máximo de ejecución de 60 minutos, definido por consideración de la factibilidad y practicidad de aplicación a nivel industrial. A continuación, se presenta el resumen de dichos tratamientos.

Cuadro III. Resumen de tratamientos aplicados en el segundo objetivo específico del proyecto.

Condición (cantidad de pulsos hipobáricos)	Concentración de solución ácida (%)
0 1 2 3	2,5
0 1 2 3	5,0

4.5.7.4.2 Mediciones

Se realizaron 10 mediciones de pH para cada cinética, al igual que lo detallado en la sección 0

4.5.7.4.3 Análisis estadístico

Se siguió el procedimiento descrito en la sección 4.5.7.3.3 para determinar para cada tratamiento el tiempo en el que se logra obtener un pH establecido de 4,6. A partir de los tiempos obtenidos para cada modelo, se realizó un ANOVA de dos vías (significancia de 0.05), dado que se establece un diseño factorial de dos factores (cantidad de pulsos y concentración de la disolución ácida). El primer factor presenta cuatro niveles (0, 1, 2 y 3), mientras que el segundo se mantiene con dos (2,5% y 5,0%), para un diseño $4^1 \times 2^1$. Se empleó el paquete estadístico JMP® Pro versión 13 (SAS Institute Inc.).

4.5.7.5 Determinación del efecto de dos acidulantes en condiciones pulsadas de medios hipobáricos sobre la tasa de acidificación de alimentos modelo de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo

4.5.7.5.1 Condiciones

A partir de los resultados del segundo objetivo específico, se seleccionaron 0 y 1 pulsos en condiciones hipobáricas para evaluar el efecto del tipo de ácido (acético y cítrico) en dos concentraciones en la solución de acidificación, sobre la tasa de acidificación de los modelos. Se seleccionó ácido cítrico, ya que es el acidulante reportado en todos los productos analizados en el muestreo comercial realizado.

Al igual que en los casos anteriores, se trabajó con disoluciones de ácido acético al 2,5% y 5,0%. En el caso del ácido cítrico se determinaron dos concentraciones con las cuales cada modelo alcanza el mismo pH de equilibrio que se obtiene con cada una de las disoluciones de ácido acético. Para determinar estas concentraciones de ácido cítrico se siguió el procedimiento que se detalla a continuación. Este consta de dos etapas principales, siendo la primera la determinación de pH con la disolución de referencia de ácido acético (en el procedimiento se muestra el caso de 5,0% de ácido acético), mientras que la segunda fase corresponde a las estimaciones con ácido cítrico.

a. Determinación del pH en equilibrio de alimentos modelo acidificados con ácido acético.

1. Homogeneizar el alimento hasta obtener una pasta fina.
2. Adicionar la disolución de ácido acético (5,0%) en relación 35:65, alimento:solución.
3. Determinar el pH del sistema en equilibrio.

b. Determinación de la concentración de ácido cítrico equivalente a la concentración de ácido acético de referencia.

1. Homogeneizar el alimento hasta obtener una pasta fina.
2. Para una masa de alimento conocida, adicionar un volumen conocido de una disolución de ácido cítrico (concentración conocida) hasta alcanzar el pH en equilibrio determinado en el punto a.3.
3. Estimar la masa de ácido consumida según la ecuación 6.

$$m_{ác} = V_{consumido} * Cn_{dsl} \quad [5]$$

4. Tomando en cuenta la masa de alimento utilizada en el punto b.2, calcular la concentración de una nueva disolución de ácido cítrico que logre adicionar la masa de ácido previamente estimada, utilizando una relación 35:65 alimento:solución ácida (ecuaciones 7 y 8).

$$m_{dsl\,ác.} = \frac{m_{alimento}}{35} * 65 \quad [6]$$

$$Cn_{dsl\,ác.} = \frac{m_{ác} * Pureza}{m_{dsl\,ác}} \quad [7]$$

5. Adicionar la nueva disolución en una relación 35:65 alimento:disolución respecto a una masa homogeneizada y conocida de alimento y confirmar que se alcanzó el pH esperado una vez que se haya alcanzado el equilibrio.
6. Según los resultados de la confirmación, realizar ajustes en la concentración de la disolución de ácido cítrico de ser necesario.

Debido a las diferentes capacidades buffer de cada matriz ante las diferentes concentraciones de ácido, el procedimiento anterior se llevó a cabo específicamente para cada uno de los tres modelos, para cada una de las dos concentraciones de referencia de ácido acético. En respuesta, se obtuvo una concentración baja y una alta de ácido cítrico para cada matriz, cada una equivalente a las disoluciones de baja y alta concentración de ácido acético (2,5% y 5,0% respectivamente). Estas equivalencias se establecieron de manera tal que los pH obtenidos en el punto b.5, en todos los casos, presentaran una desviación menor a 0,1 unidades de pH respecto a los valores de referencia medidos en la sección a.3 del procedimiento. El resumen de tratamientos evaluados en este objetivo se detalla seguidamente.

Cuadro IV. Resumen de tratamientos aplicados en el tercer objetivo específico del proyecto.

Condición (cantidad de pulsos hipobáricos)	Modelo	Concentración de solución ácida	
		Ácido acético	Ácido cítrico
0	Zanahoria	Baja	Baja
		Alta	Alta
	Embutido de pollo	Baja	Baja
		Alta	Alta
	Clara de huevo	Baja	Baja
		Alta	Alta
1	Zanahoria	Baja	Baja
		Alta	Alta
	Embutido de pollo	Baja	Baja
		Alta	Alta
	Clara de huevo	Baja	Baja
		Alta	Alta

4.5.7.5.2 Mediciones

Se siguió el mismo orden de mediciones mencionado en los casos anteriores, sin embargo, las cinéticas se realizaron hasta las 24 h en la acidificación (8 mediciones en total), debido a que los modelos inmersos en ácido cítrico mostraron signos evidentes de deterioro microbiológico, posterior a este periodo.

4.5.7.5.3 Análisis estadístico

Por las limitaciones de muestreo mencionadas anteriormente, para este análisis se tomó como variable respuesta el pH de los modelos a 24 h, en cada tratamiento. Con estos datos, se aplicó un ANOVA (significancia de 0.05) de tres vías, siendo los factores la cantidad de pulsos (0 y 1), el tipo de acidulante (ácido acético y ácido cítrico) y la concentración de la disolución ácida (baja y alta), para un diseño factorial 2^3. Se empleó el paquete estadístico JMP® Pro versión 13 (SAS Institute Inc.).

4.5.7.6 Determinación del comportamiento de acidificación en el cuarto longitudinal y masa homogeneizada de los modelos

Con el fin de evaluar el comportamiento de la acidificación en el cuarto longitudinal de los modelos cilíndricos y en la masa homogeneizada de los mismos, ambos respecto al comportamiento observado en el centro geométrico, se realizó un análisis de correlación lineal en cada caso, cuyas especificaciones se detallan a continuación.

4.5.7.6.1 Correlación en la acidificación en cuarto longitudinal respecto a centro geométrico de los modelos

Con el fin de estudiar la correlación entre la acidificación evaluada en el cuarto longitudinal de los modelos respecto a la acidificación en el centro geométrico de los mismos se analizó la relación entre dichas variables dependientes. Para esto, se utilizaron los valores de pH medidos en ambas zonas en modelos acidificados con ácido acético entre 0 y 24 h (8 intervalos de muestreo en total), tanto en los ensayos llevados a cabo de forma convencional como hipobárica a lo largo de los tres objetivos del estudio. Este análisis se realizó para cada uno de los tres modelos según la concentración de la disolución de ácido acético en la que fueron acidificados, empleando el coeficiente de correlación de Pearson (*r*) como indicador de la relación entre las dos zonas. Posteriormente, con el fin de aumentar el número de observaciones empleadas en cada análisis (n), se repitió el estudio de relación entre las zonas para cada modelo utilizando los valores de pH obtenidos de las acidificaciones a ambas concentraciones de ácido acético. Como otro método que permitiera aumentar el número de observaciones involucradas, se realizó el mismo procedimiento de análisis utilizando los valores de las cinéticas de pH de los tres modelos en un mismo estudio, tanto según la concentración de la disolución ácida como utilizando los datos obtenidos a partir de ambas concentraciones de ácido acético. Lo anterior implica un total de 12 escenarios evaluados, cuyos *r* y n se utilizaron para definir el caso que mejor representara la relación entre las variables dependientes.

4.5.7.6.2 Correlación en la acidificación de masa homogeneizada respecto a centro geométrico de los modelos

Para el estudio de la correlación entre la acidificación registrada en la masa homogeneizada de los modelos respecto a su centro geométrico se realizó el mismo análisis detallado anteriormente en la sección 4.5.7.6.1, exceptuando que solamente se tomaron los datos de las cinéticas entre 2 y 24 h, (7 puntos de muestreo en total). Lo anterior debido a que el rápido descenso de pH entre las 0 y 2 h difiere

del comportamiento observado en el resto de la cinética, de forma que se excluyeron los datos en el tiempo 0, con el fin de evitar dichas desviaciones en el análisis.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 MUESTREO COMERCIAL

El muestreo comercial permitió reflejar la realidad industrial al obtener información acerca de las características de productos acidificados comercializados en el país. El cuadro V muestra las relaciones sólido:líquido encontradas en los análisis.

Cuadro V. Proporciones alimento:solución (promedio ± desviación estándar, n = 3 para palmito y n = 2 para huevos) encontradas en productos acidificados comercializados en Costa Rica.

Producto	Marca	Proporción	
		Alimento	**Solución**
Palmito	La Cima	61,3 ± 0,1	38,7 ± 0,1
	Magna	52 ± 1	48 ± 1
	Sabemás	63 ± 3	37 ± 3
Huevos	Magna	41 ± 2	59 ± 2
	Coturnix	49 ± 2	51 ± 2

Como se detalló en la sección 4.4.3, a lo largo de todo el estudio se utilizó una relación 35:65 alimento:solución en respuesta al volumen mínimo de solución necesario para cubrir los modelos en los recipientes utilizados. En otros estudios de acidificación al vacío se utilizaron relaciones de 11:89 y 17:83 (Derossi *et al*., 2010; Derossi *et al*., 2011b; Derossi *et al*., 2013a; Derossi *et al*., 2013b), por lo que tal como se estableció previamente, al emplear una alta masa de solución ácida respecto al sólido se promueve la acidificación al inducir un amplio gradiente de concentración del ácido (Roque-Malherbe, 2007; Rao *et al*., 2014). Al ser una variable de gran influencia en el proceso de acidificación, la relación alimento:solución empleada en los estudios puede presentar un impacto directo en la aplicación de los resultados obtenidos. Acorde con la información mostrada en el cuadro V, es evidente que las condiciones diseñadas para esta investigación son más cercanas a la realidad comercial de Costa Rica, lo que respalda la relevancia y aplicación de los hallazgos de este estudio.

Cabe mencionar que todos los productos analizados se encontraban empacados de manera tal que el líquido de gobierno cubriera los productos sólidos. No obstante, como se muestra en la información

recopilada (cuadro V), el palmito se comercializa con menor masa de líquido que los huevos. Esto responde a la geometría de los productos y los envases utilizados, los cuales influyen en el espacio disponible para el producto y en el acomodo del mismo en el envase, afectando directamente la cantidad de líquido necesaria para cubrir por completo el alimento.

5.2 CARACTERIZACIONES FISICOQUÍMICAS

Debido a que los modelos son el objeto de estudio de la presente investigación, se realizaron diferentes determinaciones fisicoquímicas con el fin de evaluar su comportamiento (en estos aspectos) como respuesta a la acidificación. A nivel de acidificación (realizada a lo largo de 48 h) esto corresponde a la disolución ácida de mayor concentración probada (5,0% de ácido acético), mientras que en el método de procesamiento se refiere a la mayor cantidad de pulsos de vacío (3 pulsos) como condición de acidificación hipobárica respecto a la convencional. Debido a que se emplearon las condiciones más extremas establecidas, se conoce que, en las variables evaluadas, los efectos observados corresponden al mayor grado de intensidad que se tendrá en el estudio. Los resultados obtenidos de estas determinaciones se muestran en el cuadro VI.

Cuadro VI. Resultados de análisis fisicoquímicos (promedio ± desviación estándar, n = 3) realizados a los modelos de alimentos acidificados con disoluciones al 5,0% de ácido acético, de forma convencional e hipobárica (3 pulsos hipobáricos).

Modelo	Condición de acidificación	ΔMasa (%)	ΔVolumen (%)	Acidez final (g ácido acético/100 g)	Humedad final (g/100 g)
Zanahoria	Convencional	11 ± 2	7,0 ± 0,5	2,7 ± 0,4	92,6 ± 0,3
	Hipobárica	11 ± 2	7,7 ± 0,6	2,5 ± 0,3	93,7 ± 0,6
Embutido de pollo	Convencional	6 ± 1	1 ± 1	2,4 ± 0,3	73,5 ± 0,2
	Hipobárica	8 ± 1	1,3 ± 0,4	2,2 ± 0,3	74 ± 2
Clara de huevo	Convencional	3 ± 2	0,7 ± 0,6	2,4 ± 0,3	85,7 ± 0,9
	Hipobárica	5 ± 1	1 ± 1	2,4 ± 0,5	85 ± 1

Según la información mostrada en el cuadro VI, para los tres modelos, se determinó que no hay evidencia suficiente para asegurar que existen diferencias significativas ($p > 0,01$) en el cambio de masa según la técnica o condición de acidificación. El cambio de masa positivo observado en todos los modelos corresponde a un resultado neto que indica que, si bien durante el proceso de acidificación el gradiente de concentración puede promover pérdida parcial del agua de los alimentos, este efecto es menor que la ganancia de solución ácida (Roque-Malherbe, 2007). No obstante, como se especificó, no se encontró evidencia que sugiera que este proceso se ve influenciado por la aplicación de vacío en la operación.

Por otra parte, estudios previos han reportado deformaciones en las muestras al ser sometidas a condiciones hipobáricas, lo que presenta una desventaja comercial del uso de esta tecnología al afectar la apariencia del alimento (Gras *et al*., 2002; Derossi *et al*., 2013b). Sin embargo, bajo las condiciones experimentales utilizadas, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,01$) en el cambio de volumen de los tres modelos sometidos a acidificación hipobárica respecto a los acidificados convencionalmente. Al igual que como ha sido reportado previamente, esto pudo haber sido influenciado por la rigidez de las matrices estudiadas (Gras *et al*., 2002; Derossi *et al*., 2013b). Este resultado coincide con los hallazgos previamente discutidos respecto al cambio de masa de los modelos, pues el espacio ocupado por la disolución ácida absorbida puede generar aumento en las dimensiones del alimento (Derossi *et al*., 2013b). De esta forma, al no haber encontrado evidencia que sugiera que la condición de acidificación provoca diferencias significativas en el cambio de masa de los modelos, es esperado encontrar el mismo resultado en el estudio de sus respectivos cambios de volumen, como fue el caso.

En el aspecto de la acidez final de los modelos, en ninguno de los tres alimentos se encontró evidencia suficiente que permita asegurar que existen diferencias significativas ($p > 0,01$) según la condición de acidificación, bajo las condiciones experimentales empleadas. Esto indica que no hay evidencia que sugiera que la acidificación hipobárica influencia la absorción de ácido por parte de los alimentos evaluados. Por otro lado, los resultados obtenidos del análisis de humedad, en los tres modelos, tampoco evidencian diferencias significativas ($p > 0,01$) provocadas por la condición de acidificación. Es esperado encontrar el mismo efecto en ambas determinaciones, ya que la impregnación de ácido en los alimentos resulta de la absorción de una disolución acuosa (Derossi *et al*., 2011a), por lo que ambos resultados reflejan la penetración de la solución ácida en los modelos que supone la acidificación.

Además de los análisis aplicados a los modelos, se llevaron a cabo determinaciones de acidez y turbidez en las soluciones ácidas, cuyos resultados se detallan en el cuadro VII.

Cuadro VII. Resultados de análisis fisicoquímicos (promedio ± desviación estándar, n = 3) realizados en las soluciones de ácido acético al 5,0% de modelos acidificados de forma convencional e hipobárica (3 pulsos hipobáricos).

Modelo	Condición de acidificación	Acidez (g ácido acético/ 100 g)	Turbidez (NTU)
Zanahoria	Convencional	4,33 ± 0,02	14 ± 3
	Hipobárica	4,27 ± 0,04	17 ± 4
Embutido de pollo	Convencional	4,36 ± 0,02	65 ± 10
	Hipobárica	4,33 ± 0,02	72 ± 2
Clara de huevo	Convencional	4,07 ±0,02	12,5 ± 0,9
	Hipobárica	3,96 ± 0,05	14 ± 3

En el análisis anterior, las pruebas de acidez de la solución mostraron resultados que no permiten afirmar que existan diferencias significativas ($p > 0,01$) entre las técnicas de acidificación utilizadas, para todos los modelos. Tomando en cuenta que no se encontró evidencia que mostrara diferencias significativas en la acidez de los modelos según la técnica o condición de acidificación, es esperado observar el mismo resultado en la solución, debido al equilibrio que alcanza el sistema (Roque-Malherbe, 2007). Dentro de los resultados, destaca que la solución del modelo de clara de huevo presenta los menores valores de acidez entre las muestras. La clara de huevo presenta el mayor pH inicial (pH cercano a 9), por lo que es normal que este sea el modelo de menor acidez inicial. Por tanto, para alcanzar los valores de acidez final mostrados en el cuadro VI, este modelo requiere mayor absorción de ácido, por ende, en respuesta al equilibrio de concentraciones, la acidez remanente en la solución será menor que en los casos de los otros modelos (Roque-Malherbe, 2007).

Por otra parte, las determinaciones de turbidez no mostraron evidencia suficiente que permita asegurar que existen diferencias significativas ($p > 0,01$) provocadas por la condición de acidificación, para ninguno de los tres modelos. Esto sugiere que, bajo las condiciones utilizadas, la migración de componentes desde el modelo a la solución no se ve afectada significativamente por la aplicación de vacío; contrario a reportes previos que señalan daños en la integridad de los alimentos utilizar esta técnica (Derossi *et al.*, 2011b; Derossi *et al*., 2013b). No obstante, entre los resultados obtenidos (cuadro VII) se puede apreciar que la solución del modelo de pollo muestra valores de turbidez mucho mayores

que los otros dos modelos. Esto es de esperar, considerando que previamente se ha reportado que particularmente los productos embutidos acidificados presentan notable turbidez en su líquido de gobierno (Gaydos *et al*., 2016).

Al no encontrar evidencia que sugiera que existen diferencias significativas en las características fisicoquímicas evaluadas entre la acidificación convencional y la acidificación hipobárica más severa probada, se puede asumir que en las demás condiciones hipobáricas estudiadas, las cuales son de menor severidad, tampoco se darían cambios fisicoquímicos significativos en los modelos y/o las soluciones ácidas. Por ende, a pesar de que algunos autores han expuesto la preocupación de que el proceso hipobárico genere un impacto negativo en la apariencia de los alimentos, afectando la percepción e intención de compra del consumidor sobre estos productos (Gras *et al*., 2002; Derossi *et al*., 2011b; Derossi *et al*., 2013b), los resultados fisicoquímicos obtenidos demuestran que este no es el caso de los ensayos de la presente investigación. De esta manera, se conoce que la potencial aplicación de los hallazgos de este estudio no se verá afectada por la apariencia de los productos procesados hipobáricamente.

5.3 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE MEDIOS HIPOBÁRICOS SOBRE LA TASA DE ACIDIFICACIÓN DE ALIMENTOS MODELO DE ZANAHORIA, EMBUTIDO DE POLLO Y CLARA DE HUEVO

La figura 5 muestra las cinéticas de reducción de pH, para cada uno de los tres modelos, según condiciones de acidificación convencional e hipobárica, y según dos concentraciones de ácido acético (2,5% y 5,0%). Las líneas muestran los ajustes del modelo no lineal logístico de 4 parámetros Hill, para cada caso.

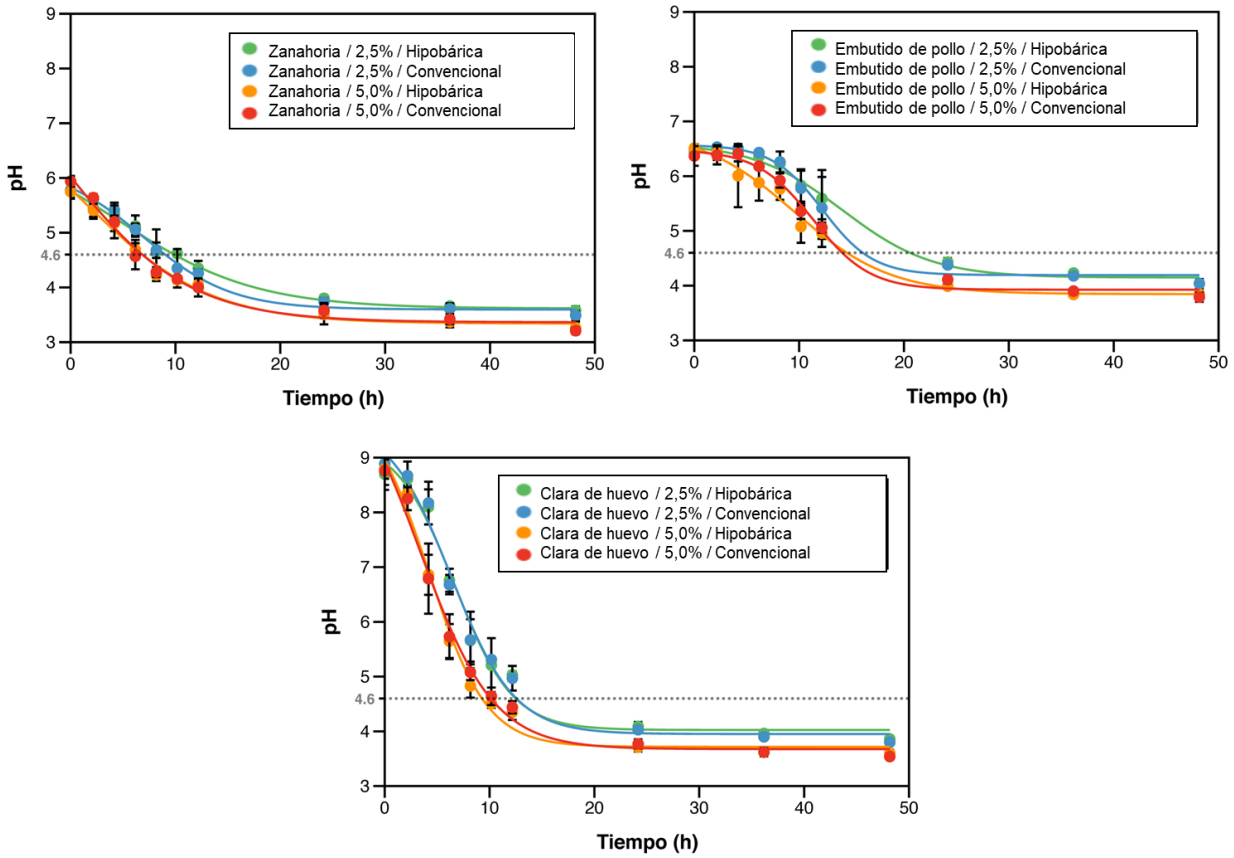


Figura 5. Cinéticas de acidificación convencional e hipobárica de los modelos de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo en soluciones de ácido acético al 2,5% y 5,0%, n = 3.

Nota: En cada gráfica los puntos representan valores promedio y las barras de error desviaciones estándar.

A partir del ajuste del modelo a los datos experimentales y mediante predicción inversa, se estimaron los tiempos a los cuales cada modelo alcanzó el pH de 4,6. Los resultados se muestran en el cuadro VIII.

Cuadro VIII. Tiempos (promedio ± desviación estándar, n = 3) en que los modelos alcanzaron el pH de 4,6 en cada condición evaluada.

Modelo	Concentración de solución ácida (%)	Condición de acidificación	Tiempo estimado para llegar a pH 4,6 (h)
Zanahoria	2,5	Convencional	9,0 ± 0,7
		Hipobárica	9,8 ± 0,8
	5,0	Convencional	7 ± 1
		Hipobárica	6,8 ± 0,3
Embutido de pollo	2,5	Convencional	16 ± 4
		Hipobárica	19 ± 5
	5,0	Convencional	14,3 ± 0,9
		Hipobárica	15 ± 2
Clara de huevo	2,5	Convencional	12,6 ± 0,4
		Hipobárica	12 ± 2
	5,0	Convencional	10,0 ± 0,4
		Hipobárica	9,2 ± 0,7

Para cada uno de los tres modelos, el ANDEVA de dos vías mostró que la interacción entre los dos factores (condición de acidificación y concentración de la solución ácida) resultó no significativa ($p > 0,05$). Una vez eliminada la interacción, se aprecian efectos significativos de la concentración de la solución sobre la tasa de acidificación de los modelos de zanahoria ($p = 0,0003$) y clara de huevo ($p=0,0007$), siendo el tiempo requerido para alcanzar el pH de 4,6 siempre menor para una mayor concentración de ácido en la solución. Este resultado es esperable considerando que en la solución de 5,0% de ácido acético es mayor el gradiente de concentración del ácido, lo que acelera la transferencia de masa (Roque-Malherbe, 2007; Rao *et al*., 2014). Como se puede observar en la figura 5, si bien en estos modelos las cinéticas a ambas concentraciones muestran un comportamiento similar, los alimentos acidificados con ácido acético al 5,0% resultan en un pH en equilibrio menor a los acidificados en las disoluciones al 2,5% (Nielsen, 2017). Los resultados del modelo de embutido de pollo, por su parte, no permiten asegurar que existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las dos concentraciones de ácido utilizadas, lo cual puede estar influenciado por los márgenes de error

obtenidos en las determinaciones en este alimento modelo. Esto a su vez, puede ser el resultado de la compleja composición del embutido, además de su contenido de grasa, lo que puede dificultar la difusión del ácido en la matriz (Zhao, 2012), aumentando la variabilidad de los resultados.

Por su parte, para todos los modelos, bajo las condiciones evaluadas, no se encontró evidencia que permita afirmar que existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las condiciones de acidificación, en términos del tiempo requerido para alcanzar un pH de 4,6 (considerado eficiencia de acidificación). Estos resultados difieren de los reportes encontrados en otros estudios previos sobre acidificación hipobárica, en los cuales se reportan mejoras en la reducción de pH durante la acidificación de diferentes vegetales al utilizar la tecnología hipobárica (Derossi *et al*., 2010; Derossi *et al*., 2013b). Entre los factores que pueden haber influenciado los resultados se encuentra la porosidad de los modelos. Según las determinaciones realizadas, el modelo de zanahoria presenta una porosidad muy cercana a 0%, en el embutido de pollo se encontró un 0,09 ± 0,01% de porosidad, mientras que en la clara de huevo fue de 0,005 ± 0,006%. En todos los casos, estos son valores mucho menores que los reportados para los alimentos utilizados en los otros estudios de acidificación hipobárica, los cuales se encuentran entre 2% y 47% (Derossi *et al*., 2010; Derossi *et al*., 2011b; Derossi *et al*., 2013a; Derossi *et al*., 2013b).

Las bajas porosidades de los alimentos utilizados implican que es menor la superficie que puede ser impregnada con la solución ácida durante la aplicación de vacío respecto a matrices con mayores índices de porosidad, puesto que como se detalló en la sección 3.3, las mejoras en la eficiencia de difusión al promover la impregnación por vacío radican en forzar el líquido en los espacios vacíos de la matriz (Derossi *et al*., 2012; Hui & Evranuz, 2015). De esta forma, al tener menor fracción de espacios vacíos es menor el espacio donde se puede dar el efecto hipobárico, por ende, la penetración de ácido en la matriz producto de este fenómeno es muy reducida, minimizando las diferencias respecto al método convencional. No obstante, cabe destacar que la estimación de porosidad, utilizando una ecuación y a partir de valores de densidad aparente y densidad real, implica ciertas limitaciones de exactitud. En el caso de los estudios previos (Derossi *et al*., 2011b; Derossi *et al*., 2013a; Derossi *et al*., 2013b), todos los cálculos de densidad real se realizaron con una misma ecuación estándar, a pesar de involucrar diferentes alimentos. Para los modelos de este estudio, en busca de reducir el error asociado, se ajustó la ecuación según valores de componentes reportados para cada matriz. Sin embargo, a pesar del ajuste, se mantiene el error inherente a utilizar valores de composición de referencia que pueden presentar desviaciones respecto a los porcentajes reales de la materia prima específica utilizada. También se debe considerar que, en el caso de vegetales, la porosidad se puede ver afectada por el estado de madurez y

las condiciones de cultivo (Derossi *et al*., 2013b), lo que puede sumarse a los factores que pueden estar involucrados en las diferencias encontradas entre lo determinado en este estudio y lo reportado por Derossi *et al*. (2013b).

Por otra parte, se debe tomar en cuenta que el grosor de los cilindros (diámetro) utilizados como modelos en este estudio (2,80 ± 0,02 cm) es aproximadamente entre 460% y 87% mayor que el grosor de las muestras de alimentos utilizados como objeto de estudio en investigaciones previas (0,5-1,5 cm) (Derossi *et al*., 2011b; Derossi *et al*., 2013b). Estas diferencias de dimensiones también pudieron influenciar el no encontrar evidencia que sugiera mejoras significativas en la eficiencia de acidificación hipobárica de los modelos realizada en la presente investigación. Lo anterior puesto que el grosor de la muestra afecta de forma directa la tasa de la transferencia de masa, ya que influye en la distancia que debe recorrer la solución ácida hasta alcanzar el centro del alimento, obteniéndose mayores eficiencias de proceso entre menor sea el grosor de la muestra (Farid, 2010; Rao *et al*., 2014). Adicionalmente, en objetos de menor tamaño se facilita el mecanismo hidromecánico de penetración de la solución inducido por la aplicación de vacío (Hui & Evranuz, 2015). Por otro lado, además de influir en la penetración de la solución, en muestras de dimensiones menores la fracción superficial es mayor, lo que conlleva mayor exposición directa con la disolución y por ende mayor impregnación por contacto directo (Rao *et al*., 2014), tanto en condiciones regulares como en procesamiento hipobárico.

En consideración a otros factores, como se estableció previamente (sección 5.1), las relaciones alimento:solución en los estudios realizados por Derossi *et al*. (2010; 2011b; 2013a; 2013b) son mucho mayores a las empleadas en esta investigación. Además de alejarse de la realidad industrial, al incrementar la cantidad de líquido respecto al sólido, también aumenta la cantidad de iones hidronio en el medio. Por ende, aumenta el gradiente de concentración, resultando en transferencias de masa más eficientes que las que se pueden encontrar al utilizar menor proporción de solución ácida (Roque-Malherbe, 2007; Rao *et al*., 2014). También, se debe considerar que las cinéticas llevadas a cabo en los estudios de acidificación hipobárica realizados previamente (Derossi *et al*., 2010; Derossi *et al*., 2011b; Derossi *et al*., 2013a; Derossi *et al*., 2013b) cuentan con un máximo de ocho puntos de muestreo para un tiempo total máximo de 12 horas de análisis. El realizar las pruebas de esta investigación con diez puntos de muestreo a lo largo de 48 horas de acidificación, permite obtener mayor información del comportamiento de la acidificación a partir de las cinéticas, logrando mejorar así el ajuste matemático de las curvas obtenidas, por ende, obteniendo valores más acertados de la predicción de un tiempo a partir de las cinéticas de pH.

Es importante mencionar que en los estudios realizados por Derossi *et al*. (2010; 2011b; 2013a; 2013b) se utilizaron disoluciones de ácido láctico, cuya información referente a las mismas se limita al pH de las disoluciones. Si bien el tipo de ácido utilizado y su concentración también puede influir en los resultados obtenidos respecto a las referencias, el pH de las disoluciones es información insuficiente para realizar una comparación asertiva en este aspecto. Esto puesto que se desconoce el mecanismo de penetración de ácidos orgánicos en alimentos (Marcotte *et al.* 2012), por lo que no se conoce si la acidificación del tejido responde únicamente al ácido disociado, cuya concentración se refleja en el pH (Nielsen, 2017).

En cuanto a la influencia de la composición de los modelos, la figura 5 ejemplifica la diferencia del comportamiento de la acidificación según el alimento a acidificar. En estas cinéticas se puede observar que, durante las primeras horas de acidificación, la matriz cárnica muestra mayor resistencia a la disminución de pH que los otros dos modelos. Esto concuerda con la capacidad buffer reportada para las proteínas cárnicas debido a su naturaleza mayoritariamente miofribilar (Belitz *et al*., 2009). Además, este modelo también presenta una fracción grasa mayor a los otros modelos, por lo que al contener una mayor proporción lipídica se dificulta la difusión de la solución ácida por su naturaleza acuosa (Zhao, 2012), lo que también influye en que sea la matriz que toma más tiempo en alcanzar el pH de 4,6.

En el caso de la zanahoria, la baja capacidad buffer del tejido vegetal característica (Belitz *et al*., 2009) facilita la reducción de pH de la matriz, resultando, como se puede observar en el cuadro VIII, en el modelo que alcanza el pH de 4,6 en el menor tiempo. En cuanto a la clara de huevo, al presentar el pH inicial más alto entre los modelos (pH cercano a 9) es normal que requiera mayor tiempo que la zanahoria en alcanzar el pH de 4,6 (cuadro VIII). El embutido de pollo toma el mayor tiempo en alcanzar el pH deseado debido a sus características intrínsecas discutidas anteriormente.

5.4 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE CONDICIONES PULSADAS DE MEDIOS HIPOBÁRICOS SOBRE LA TASA DE ACIDIFICACIÓN DE ALIMENTOS MODELO DE ZANAHORIA, EMBUTIDO DE POLLO Y CLARA DE HUEVO

Al igual que en la sección anterior, para el análisis del efecto de la condición hipobárica pulsada se realizaron cinéticas de acidificación en cada modelo, según la cantidad de pulsos correspondientes, en disoluciones de ácido acético al 2,5% y 5,0%, las cuales se presentan seguidamente en la figura 6. Además, a partir de estas cinéticas, mediante predicción inversa se obtuvieron los tiempos en alcanzar el pH de 4,6 que se detallan en el cuadro IX.

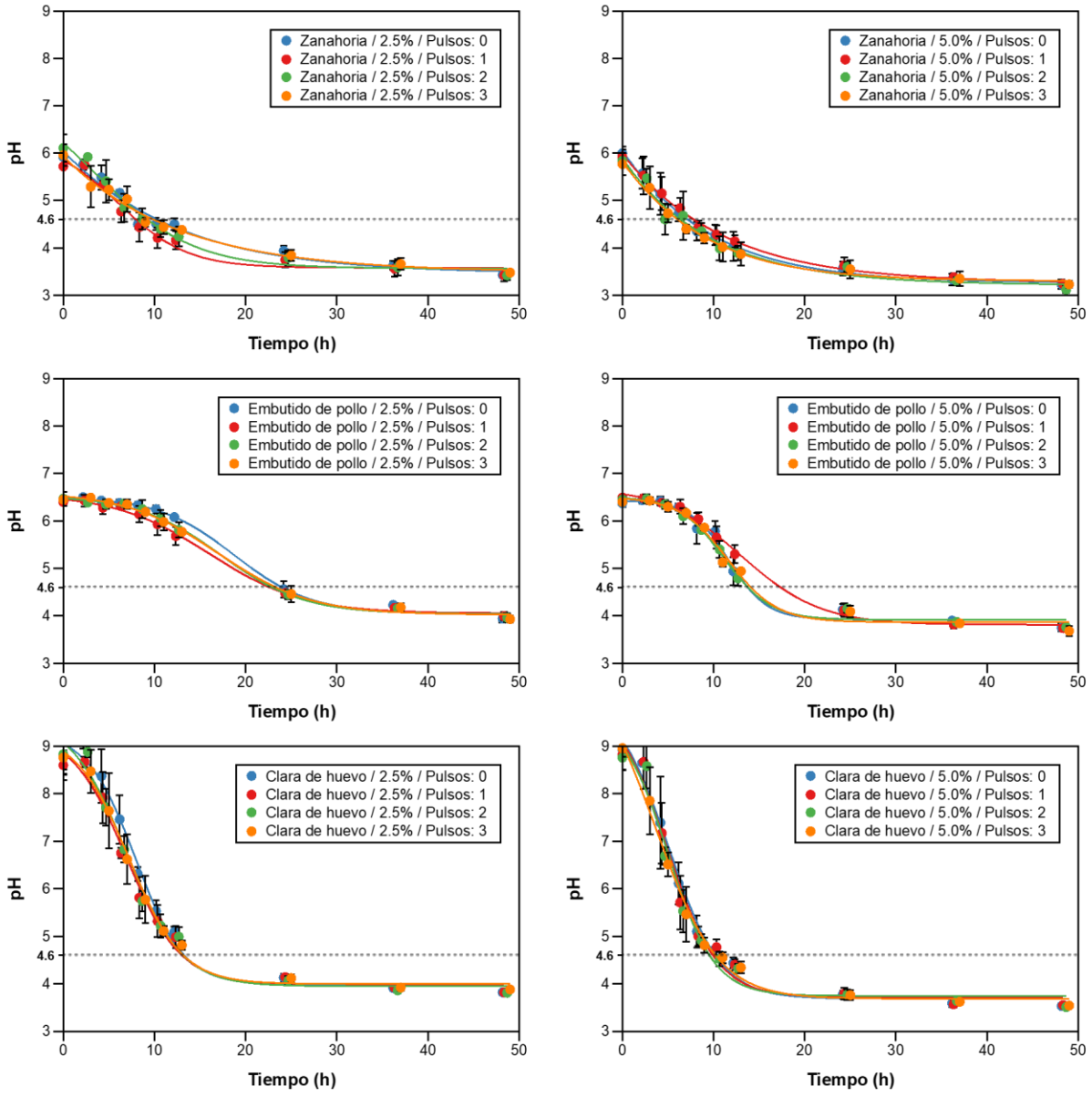


Figura 6. Cinéticas de acidificación a 0, 1, 2 y 3 pulsos de vacío de los modelos de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo en soluciones de ácido acético al 2,5% y 5,0%, n = 3.

Nota: En cada gráfica los puntos representan valores promedio y las barras de error desviaciones estándar.

Cuadro IX. Tiempos estimados (promedio ± desviación estándar, n = 3) en que los modelos alcanzaron el pH de 4,6 en cada condición pulsada evaluada.

Modelo	Concentración de solución ácida (%)	Condición (cantidad de pulsos hipobáricos)	Tiempo estimado para llegar a pH 4,6 (h)
Zanahoria	2,5	0	10,0 ± 0,7
		1	8 ± 2
		2	9 ± 2
		3	10 ± 1
	5,0	0	7 ± 1
		1	8 ± 2
		2	7 ± 2
		3	6 ± 2
Embutido de pollo	2,5	0	24 ± 2
		1	22 ± 2
		2	23 ± 2
		3	23 ± 3
	5,0	0	14 ± 1
		1	17 ± 1
		2	13,8 ± 0,5
		3	14,2 ± 0,5
Clara de huevo	2,5	0	13,2 ± 0,2
		1	13 ± 2
		2	13 ± 1
		3	13,1 ± 0,5
	5,0	0	10,0 ± 0,7
		1	9,7 ± 0,8
		2	9,5 ± 0,7
		3	10,1 ± 0,8

Según la información mostrada en el cuadro IX y la figura 6, de acuerdo al análisis factorial realizado, la interacción entre los factores de condición de procesamiento (cantidad de pulsos hipobáricos y la concentración de la solución ácida) no resultó significativa ($p > 0,05$). Una vez eliminada la interacción del modelo, en el análisis de los efectos simples, bajo las condiciones empleadas, el efecto de la concentración de la solución ácida probó ser significativa en todos los casos, es decir, en los modelos de zanahoria ($p = 0,0018$), embutido de pollo ($p < 0,0001$) y clara de huevo ($p < 0,0001$), manteniendo menores tiempos en alcanzar el pH de 4,6 cuando se utiliza la solución de mayor concentración. Al igual que como se discutió en la sección anterior, este resultado es esperado debido a la promoción de la difusión que provoca incrementar el gradiente de concentración (Roque-Malherbe, 2007; Rao *et al*., 2014). Particularmente en el caso del embutido de pollo, el efecto significativo de la concentración ácida difiere del resultado de la misma evaluación en el capítulo anterior (5.3). En el cuadro IX se observa que si bien el embutido de pollo mantiene mayores márgenes de error que los otros modelos, estas desviaciones son menores que las encontradas en la prueba anterior (cuadro VIII), lo que respalda que la previa falta de evidencia para asegurar diferencias significativas puede ser el resultado de las mayores desviaciones obtenidas en dicha prueba.

En cuanto a la condición de procesamiento y para todos los modelos, la cantidad de pulsos probados no generó un efecto tal que permitiera afirmar que existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los pulsos hipobáricos empleados. En otros estudios de acidificación al vacío con pulsos, se probaron dos pulsos de vacío con un tiempo máximo de aplicación de 4 minutos (Derossi *et al*., 2011b; Derossi *et al*., 2013a), mientras que las pruebas de este estudio se realizaron con hasta tres pulsos (de 20 min cada uno) para un tiempo máximo de tratamiento de 60 minutos. Considerando que previamente se ha establecido que el nivel de impregnación aumenta directamente al aumentar el grado de deformación-relajación al que se someta el alimento (Zao & Xie, 2014), se esperaba obtener mejoras en la eficiencia de acidificación de los modelos producto de la intensidad de las condiciones empleadas. No obstante, el no poder evidenciar diferencias significativas entre los tratamientos indica que la deformación-relajación que presentaron los modelos no fue suficiente para aumentar la impregnación de las soluciones ácidas. Al igual que en el caso anterior, estos resultados pudieron haber sido influenciados por la porosidad de los modelos, las dimensiones de los mismos, el ácido utilizado y sus concentraciones, así como la relación alimento:solución bajo la cuales se trabajó.

Como se puede observar en la figura 6, independientemente de los pulsos empleados, cada modelo muestra el mismo comportamiento durante la acidificación. De esta forma, el modelo de acidificación

más rápida es la zanahoria, seguido por la clara de huevo, cuya pendiente de acidificación es más pronunciada debido a que su pH inicial es más alto. Mientras que finalmente, el embutido de pollo muestra mayor resistencia a la disminución de pH debido a las características propias de su composición previamente discutidas.

5.5 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE DOS ACIDULANTES EN CONDICIONES PULSADAS DE MEDIOS HIPOBÁRICOS SOBRE LA TASA DE ACIDIFICACIÓN DE ALIMENTOS MODELO DE ZANAHORIA, EMBUTIDO DE POLLO Y CLARA DE HUEVO

Como se estableció en la sección 4.5.7.5.1, para el desarrollo de las pruebas relativas a este objetivo se determinaron diferentes concentraciones de ácido cítrico que fueran equivalentes a las concentraciones de ácido acético empleadas a lo largo del estudio. Los detalles de las concentraciones establecidas por matriz se muestran a continuación en el cuadro X.

Cuadro X. Detalle de concentraciones altas y bajas de ácido cítrico y acético empleadas para el desarrollo de las pruebas relativas al tercer objetivo específico de la investigación.

Modelo	**Concentración de solución ácida (denominación)**	**Concentración de solución ácida (%)**	
		Ácido acético	**Ácido cítrico**
Zanahoria	Alta	2,5	0,6
	Baja	5,0	0,8
Embutido de pollo	Alta	2,5	1,0
	Baja	5,0	1,6
Clara de huevo	Alta	2,5	1,1
	Baja	5,0	1,3

Entre la información mostrada en el cuadro anterior cabe destacar las concentraciones mucho menores de ácido cítrico respecto a sus equivalentes en ácido acético. Esto se debe a que el ácido cítrico es un ácido más fuerte que el ácido acético ($pKa_{ác.\ cítrico}$= 3,13; $pKa_{ác.\ acético}$= 4,76), por lo que, como es de esperar, disoluciones de concentraciones menores de ácido cítrico pueden igualar disoluciones de ácido acético de mayor concentración.

Las cinéticas obtenidas a partir de las determinaciones de pH en procesos de acidificación convencionales e hipobáricos (0 y 1 pulsos de vacío, respectivamente), bajo las concentraciones de ácidos cítrico y acético mencionadas se presentan en la figura 7.

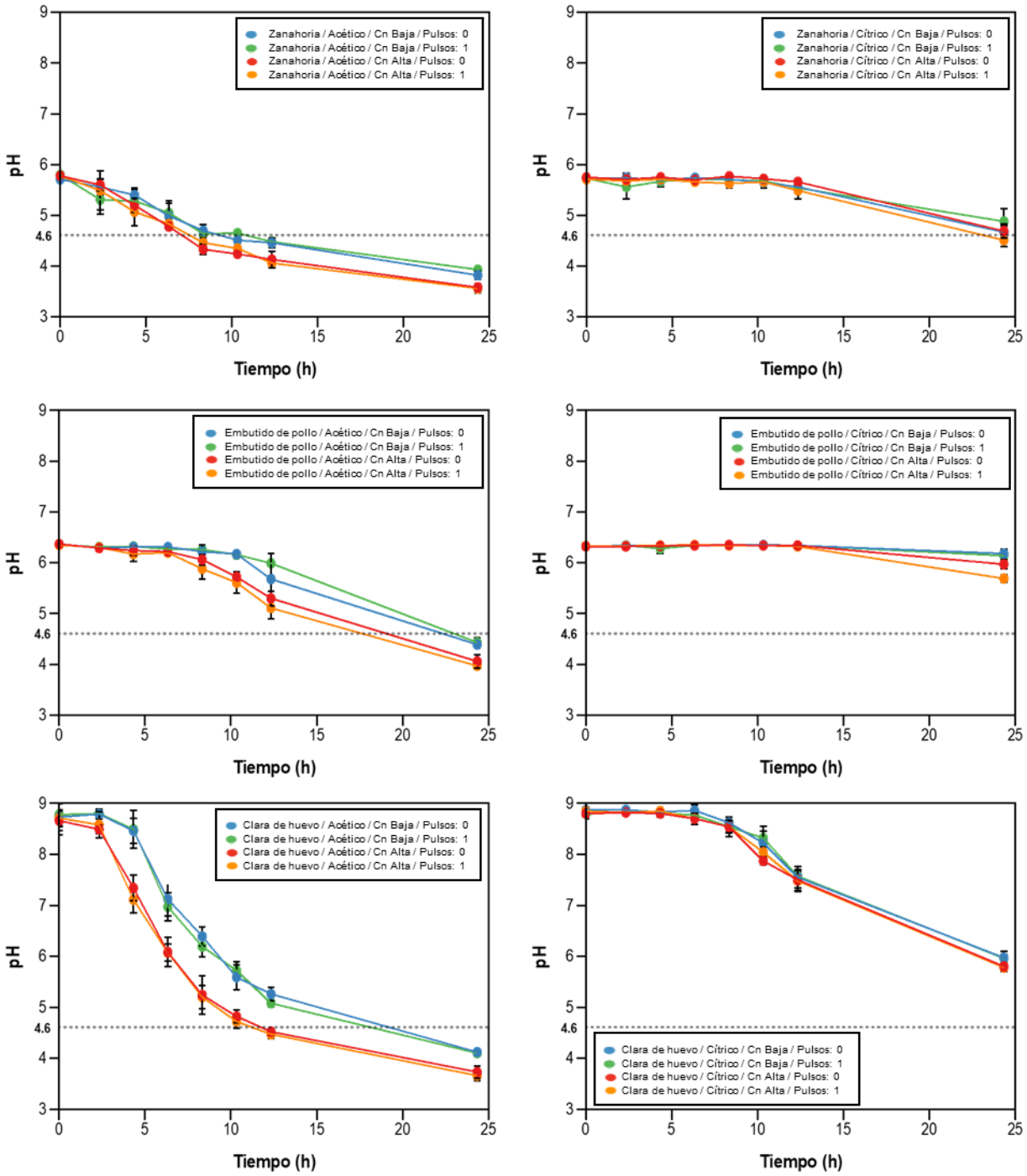


Figura 7. Cinéticas de acidificación (0 y 1 pulsos de vacío) de los modelos de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo en soluciones de ácido acético y ácido cítrico (concentraciones alta y baja), n = 3.

Nota: En cada gráfica los puntos representan valores promedios y las barras de error desviaciones estándar.

Como se refleja en la figura 7, al utilizar ácido cítrico la difusión se dificulta en comparación a cuando se utiliza ácido acético. Si bien con las concentraciones de ácido cítrico establecidas se alcanzaría el mismo pH de equilibrio que sus análogos en ácido acético, la difusión fue tan lenta que los alimentos probados inician su descomposición microbiológica antes de poder llegar al equilibrio. Esta situación no se presenta en las acidificaciones con ácido acético, ya que, al ser un ácido más débil, a los niveles de pH en los que se trabajó, en comparación con el ácido cítrico, el ácido acético presenta mayor proporción de ácido no disociado. En este estado, el ácido puede penetrar las células microbianas alterando las condiciones del citoplasma, mostrando así efectos bacteriostáticos y bactericidas (Ray & Bhunia, 2013; Nollet & Toldra, 2015), lo que permite estudios en un periodo prolongado sin problemas de índole microbiológico.

Debido a que en las pruebas con ácido cítrico no se logró alcanzar el pH crítico de 4,6 se considera que el proceso no fue eficaz. Esto implica que para un análisis uniforme de las cinéticas de pH no se puede seguir el parámetro de eficiencia utilizado previamente para el estudio de los capítulos 5.3 y 5.4. Por ende, para evaluar los tratamientos diseñados se utilizaron los valores de pH determinados en el punto final de estas cinéticas, es decir, a 24 horas. Estos valores se presentan a continuación en el cuadro XI.

Cuadro XI. Valores (promedio ± desviación estándar, n = 3) de pH a las 24 horas de acidificación en cada condición probada para los distintos modelos.

Modelo	Ácido	Concentración de solución ácida	Condición (cantidad de pulsos hipobáricos)	pH a 24 horas
Zanahoria	Acético	Baja	0	3,82 ± 0,08
			1	3,93 ± 0,05
		Alta	0	3,58 ± 0,07
			1	3,56 ± 0,09
	Cítrico	Baja	0	4,7 ± 0,1
			1	4,9 ± 0,2
		Alta	0	4,7 ± 0,1
			1	4,5 ± 0,1
Embutido de pollo	Acético	Baja	0	4,39 ± 0,06
			1	4,43 ± 0,09
		Alta	0	4,1 ± 0,1
			1	3,97 ± 0,05
	Cítrico	Baja	0	6,18 ± 0,06
			1	6,1 ± 0,1
		Alta	0	5,97 ± 0,09
			1	5,69 ± 0,07
Clara de huevo	Acético	Baja	0	4,12 ± 0,05
			1	4,10 ± 0,06
		Alta	0	3,7 ± 0,1
			1	3,7 ± 0,1
	Cítrico	Baja	0	6,0 ± 0,1
			1	5,96 ± 0,08
		Alta	0	5,80 ± 0,04
			1	5,78 ± 0,08

El análisis factorial realizado reveló que la interacción triple correspondiente al tipo de ácido, concentración y condición de acidificación no resultó significativa ($p > 0,05$) en ninguno de los tres modelos. Una vez eliminada la interacción, se procedió a realizar los análisis correspondientes de acuerdo con el tipo de ácido utilizado (por modelo), con el fin de mantener los análisis empleados en los capítulos 5.3 y 5.4 (efectos de la condición de acidificación y concentración de la solución). Esta decisión se respalda con las cinéticas detalladas en la figura 7, donde es evidente que los ácidos presentan diferentes dinámicas de acidificación en los modelos. Como se comentó previamente, en todos los alimentos el ácido acético presenta una penetración más eficiente que el ácido cítrico, es decir posee mejor capacidad de difusión. Este fenómeno también es reportado por Marcotte *et al*. (2012) y Liu *et al*. (2004), quienes indican que este comportamiento puede estar relacionado con la masa molar de los ácidos ($mM_{ác.\ acético}$ = 60,05 g/mol; $mM_{ác.\ cítrico}$ = 192,12 g/mol), siendo mejor la difusión cuando la masa molar es menor. No obstante, no se ha encontrado evidencia suficiente que compruebe esta teoría, puesto que el mecanismo de difusión de los diferentes ácidos en alimentos aún no se ha esclarecido (Liu *et al*., 2004; Marcotte *et al*., 2012).

Para el caso del ácido acético, la interacción entre los factores de la concentración de la solución ácida y la condición de acidificación no se probó significativa ($p > 0,05$) en ninguno de los modelos. Descartada la interacción, se encontraron efectos significativos de la concentración del ácido en zanahoria ($p < 0,0001$), embutido de pollo ($p < 0,0001$) y clara de huevo ($p < 0,0001$). Al igual que en los casos anteriores, la acidificación bajo ácido acético a 5,0% fue más acelerada que la llevada a cabo a 2,5%, lo que es una respuesta normal considerando un mayor gradiente de concentración en la solución más concentrada (Roque-Malherbe, 2007; Rao *et al*., 2014). Continuando el análisis de efectos simples, bajo las condiciones experimentales utilizadas, no se encontró evidencia suficiente que permita afirmar que existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las condiciones de acidificación. Debido a que en esta prueba se trabajó con los mismos modelos y el mismo ácido que en los ensayos anteriores, se puede asumir que los factores que influencian estos resultados corresponden a los discutidos previamente en la sección 5.3.

En lo referente a las pruebas con ácido cítrico, en todos los modelos, la interacción entre la concentración del ácido y la condición de acidificación resultó no significativa ($p > 0,05$). Al analizar los efectos simples, la concentración del ácido generó efectos significativos en la acidificación de los modelos de embutido de pollo ($p = 0,0005$) y clara de huevo ($p = 0,005$). Al igual que en el caso de las pruebas con ácido acético, en estos modelos la acidificación se vio acelerada al utilizar mayor

concentración de ácido, el cual es el resultado esperado debido al comportamiento natural de la difusión al incrementar el gradiente de concentración de los iones de hidrógeno en el medio (Roque-Malherbe, 2007; Rao *et al*., 2014), como se ha detallado previamente. En el caso del modelo de zanahoria, las mismas condiciones probadas no generaron resultados que sugieran que existen diferencias significativas entre las concentraciones de ácido cítrico utilizadas ($p > 0,05$). Tomando en cuenta que Derossi *et al*. (2013b) han reportado que en la zanahoria, al ser una matriz de alta rigidez y porosidad muy reducida (cercana a 0%), se dificulta el proceso de acidificación, es posible que la diferencia de 0,2% entre las concentraciones alta y baja de ácido cítrico no generaran diferencias de gradiente suficientes para observar diferencias significativas en la acidificación. Por el contrario, cabe destacar que en las pruebas con el modelo de clara de huevo las concentraciones de ácido cítrico empleadas también difieren en un 0,2%. Sin embargo, al ser una matriz de mayor porosidad, se puede facilitar la difusión del ácido, permitiendo así observar las diferencias significativas acorde al gradiente de concentración.

Por otra parte, en los modelos de zanahoria y clara de huevo, bajo las condiciones evaluadas, el efecto simple de la condición de acidificación no generó evidencia que permita afirmar que existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la acidificación bajo 0 y 1 pulsos hipobáricos. De la misma forma que en las pruebas con ácido acético, la porosidad de estos alimentos, las dimensiones de los modelos, el ácido y las concentraciones utilizadas, así como la relación alimento:solución pueden haber influenciado en que la aplicación de vacío no provocara mejoras en la eficiencia de impregnación del ácido.

Contrario a los casos anteriores, bajo las condiciones experimentales utilizadas, el modelo de embutido de pollo sí resultó susceptible al vacío, encontrándose diferencias significativas ($p = 0,0323$) entre la acidificación con 0 y con 1 pulsos hipobáricos. Estas diferencias, como se puede apreciar en el cuadro XI, responden a una mayor eficiencia de acidificación al aplicar vacío sobre los modelos inmersos en la concentración más alta de ácido cítrico (1,6%). Debido a que ésta es la matriz más porosa entre las tres estudiadas, los resultados sugieren que el procesamiento hipobárico podría generar mejoras en la eficiencia de acidificación de un producto lo suficientemente poroso en un ácido que regularmente presenta dificultades de difusión. Por otra parte, el encontrar este efecto solamente en la concentración alta de ácido cítrico podría ser un indicador de que se requiere cierta concentración mínima de ácido en disolución para poder observar diferencias significativas en la impregnación del alimento.

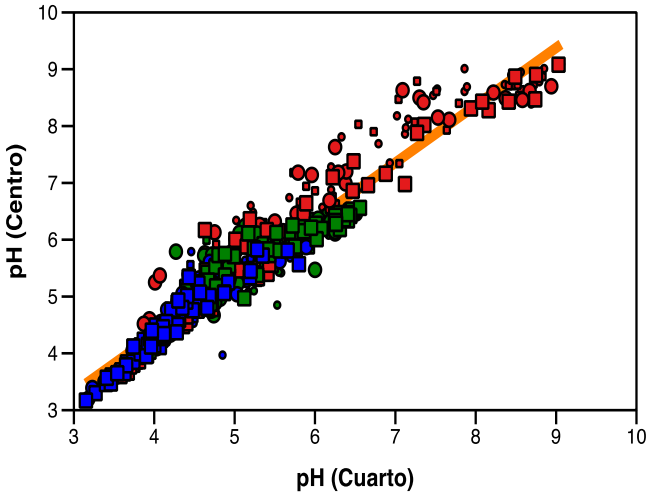
5.6 DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE ACIDIFICACIÓN EN EL CUARTO LONGITUDINAL Y MASA HOMOGENEIZADA DE LOS MODELOS

Las mediciones de pH en el cuarto longitudinal de los modelos permiten ampliar la información experimental respecto al comportamiento de la acidificación de cada uno de estos alimentos. Tal como se detalló en la sección 4.5.7.6, para este análisis se analizó la relación entre las variables dependientes con los valores de pH medidos en el centro de los modelos respecto a los medidos en el cuarto longitudinal durante las cinéticas de acidificación. Se consideraron los datos obtenidos en ambas acidificaciones con ácido acético, tanto convencionales como hipobáricas, puesto que, como se discutió previamente, en ninguno de estos experimentos se encontró evidencia que indique diferencias significativas entre los métodos de acidificación. Los datos de coeficiente de correlación de Pearson (*r*) y cantidad de observaciones (n) utilizadas en cada caso se detallan a continuación en el cuadro XII.

Cuadro XII. Coeficientes de correlación de Pearson (*r*) obtenidos en los diferentes análisis de la relación entre variables dependientes entre las mediciones de pH en cuartos y centros de los modelos, así como cantidad de observaciones (n) involucradas.

Modelo	**Parámetro**	**Concentración ácido acético**		
		2,5%	**5,0%**	**2,5% y 5,0%**
Zanahoria	*r*	0,9253	0,9603	0,9467
	n	144	144	288
Embutido de pollo	*r*	0,9210	0,9288	0,9280
	n	144	144	288
Clara de huevo	*r*	0,9680	0,9777	0,9735
	n	144	144	288
Zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo	*r*	0,9649	0,9721	0,9691
	n	432	432	864

Considerando los datos mostrados en el cuadro XII, se decidió realizar el análisis de resultados utilizando la relación obtenida a partir de la información conjunta de los tres modelos y ambas concentraciones de ácido, puesto que corresponde al análisis con mayor n, que además genera uno de los mayores valores *r* entre las determinaciones. Esta relación se muestra gráficamente a continuación en la figura 8.



Simbología		Significado
Color (Modelo)	Azul	Zanahoria
	Verde	Embutido de pollo
	Rojo	Clara de huevo
Forma (Condición)	Cuadro	Vacío
	Círculo	Presión atmosférica
Tamaño (Concentración)	Pequeño	2,5%
	Grande	5,0%

Figura 8. Correlación entre pH medido en el centro de los modelos respecto al pH medido en el cuarto, para los tres modelos, bajo condiciones de acidificación convencional e hipobárica, en soluciones al 2,5% y 5,0% de ácido acético, representada como una línea color naranja (r = 0,9691).

Los resultados obtenidos (figura 8) indican una alta correlación entre la acidificación que se da al cuarto longitudinal de los modelos y la acidificación en el centro geométrico. Previamente se han reportado procesos de acidificación poco uniformes entre el centro y zona más externas de los productos (Tola & Ramaswamy, 2013), no obstante, la correlación encontrada indica que, al menos entre el cuarto longitudinal y el centro geométrico de los modelos, el comportamiento de la acidificación no se vio altamente distorsionado.

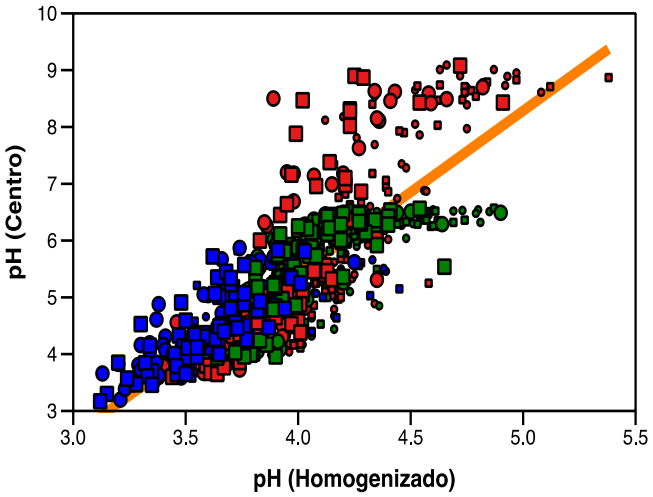
Adicional al estudio del comportamiento del pH en el cuarto de los modelos, también se analizó el pH en los alimentos homogeneizados. Este análisis es relevante debido a la dificultad que puede implicar la determinación del centro geométrico en trozos de alimentos (no modelos), de forma que al homogeneizar el alimento se puede obtener una medición de su pH sin importar la variabilidad que introduce la forma del producto. De esta manera la medición de pH se simplifica, representando una ventaja de eficiencia operativa especialmente en industrias cuyo volumen de producción, y por ende determinaciones analíticas, son altas. Por otra parte, se debe resaltar que para la determinación de pH de esta manera se pueden utilizar electrodos de pH estándar, cuya disponibilidad en el mercado es mayor que los electrodos de menor calibre, como el utilizado en la presente investigación para realizar mediciones precisas de pH en el centro geométrico de los modelos. No obstante, ya que este último corresponde al punto crítico de la acidificación en el alimento, de realizarse las determinaciones de pH en el producto de forma homogeneizada, se debe conocer una relación previamente establecida que

permita estimar el pH en el centro del alimento a partir del valor determinado en su masa homogeneizada.

Así, para esta evaluación también se realizaron análisis de la relación entre variables dependientes utilizando datos de pH (en centro y en producto homogeneizado) tomados de los tres modelos acidificados con ácido acético (2,5% y 5,0%), tanto de forma convencional como hipobárica. La información respectiva a los coeficientes de correlación de Pearson, numero de observaciones, así como el gráfico final obtenido de este análisis se muestran en el cuadro XIII y figura 9.

Cuadro XIII. Coeficientes de correlación de Pearson (*r*) obtenidos en los diferentes análisis de la relación entre variables dependientes entre las mediciones de pH modelos homogeneizados y sus centros, así como cantidad de observaciones (n) involucradas.

Modelo	**Parámetro**	**Concentración ácido acético**		
		2,5%	**5,0%**	**2,5% y 5,0%**
Zanahoria	*r*	0,6903	0,7970	0,7342
	n	126	126	252
Embutido de pollo	*r*	0,6968	0,7298	0,6164
	n	126	126	252
Clara de huevo	*r*	0,8610	0,8305	0,8244
	n	126	126	252
Zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo	r	0,8329	0,8182	0,7917
	n	378	378	756



Simbología		Significado
Color (Modelo)	Azul	Zanahoria
	Verde	Embutido de pollo
	Rojo	Clara de huevo
Forma (Condición)	Cuadro	Vacío
	Círculo	Presión atmosférica
Tamaño (Concentración)	Pequeño	2,5%
	Grande	5,0%

Figura 9. Correlación entre pH medido en el centro de los modelos respecto al pH medido en el producto homogeneizado, para los tres modelos, bajo condiciones de acidificación convencional e hipobárica, en soluciones al 2,5% y 5,0% de ácido acético, representada como una línea color naranja (*r*=0,7917).

Al igual que en el caso anterior, la correlación presentada gráficamente en la figura 9 corresponde a la relación entre variables dependientes obtenida con la mayor cantidad de observaciones (n = 756), es decir, con los datos conjuntos de los tres modelos de alimentos a ambas concentraciones de ácido, que además genera un *r* alto, considerando los valores obtenidos en las demás determinaciones.

En este caso, además de lo evidenciado gráficamente, el coeficiente de correlación de Pearson obtenido revela una baja correlación entre el pH en el centro de los modelos respecto al que se obtiene al homogeneizar el alimento. Esto se debe a que la superficie expuesta del modelo presenta una rápida impregnación al encontrarse en contacto directo con la disolución ácida, mientras que la acidificación de las zonas internas depende de la penetración de la disolución en la matriz (Rao *et al*., 2014). Al no poder establecer una relación confiable entre el pH del alimento homogeneizado y su punto de acidificación más lento, es importante recalcar que, bajo las condiciones estudiadas, no se puede sustituir la medición de pH en el centro del alimento por una determinación en el alimento homogeneizado, a pesar de que este último supone mayor facilidad de ejecución. Cabe destacar que en los estudios previos en acidificación hipobárica, las determinaciones de pH se realizaron sobre los respectivos alimentos de forma homogeneizada (Derossi *et al*., 2010; Derossi *et al*., 2011b; Derossi *et al*., 2013a; Derossi *et al*., 2013b). Sin embargo, como se evidenció, esta forma de medición no necesariamente refleja el estado interno del alimento, lo que resalta la importancia de ampliar los puntos de medición en investigaciones que involucren transferencia de masa.

6 CONCLUSIONES

Producto de los análisis realizados y los comportamientos observados se llegaron a las siguientes conclusiones, las cuales aplican únicamente bajo las condiciones evaluadas en la presente investigación.

- Los resultados obtenidos en el presente estudio son más cercanos a la realidad industrial que los obtenidos en las demás investigaciones publicadas a la fecha, sobre el tema de acidificación en condiciones hipobáricas.
- Las diferentes condiciones hipobáricas empleadas a lo largo del estudio no afectan de forma significativa ($p > 0,01$) las características de ninguno de los tres modelos estudiados, en términos de cambio de masa, cambio de volumen, humedad y acidez de los modelos, así como la acidez y turbidez de la solución ácida.
- No se encontró un efecto significativo ($p > 0,05$) sobre la tasa de acidificación de los alimentos modelo evaluados al aplicar medios hipobáricos (33,6 kPa abs, 10 min), respecto a la acidificación convencional (presión atmosférica), independientemente de la concentración de ácido acético utilizada.
- No se encontraron efectos significativos ($p > 0,05$) sobre la tasa de acidificación de los alimentos modelo evaluados al aplicar hasta 3 pulsos hipobáricos, independientemente de la concentración de ácido acético utilizada.
- Aplicando 0 y 1 pulsos hipobáricos, al utilizar ácido cítrico como acidulante en los alimentos modelo estudiados no se logra alcanzar valores de pH menores a 4,6, contrario a acidificar utilizando ácido acético. La aplicación de 1 pulso hipobárico mejora significativamente ($p=0,0323$) la acidificación del modelo de embutido de pollo en ácido cítrico al 1,6%, respecto a la acidificación convencional bajo las mismas condiciones.

7 RECOMENDACIONES

Considerando los hallazgos de la presente investigación, se recomienda que, para la acidificación de zanahoria, embutido de pollo y clara de huevo bajo las condiciones experimentales evaluadas, utilizando ácido acético como acidulante, se utilice el método convencional de acidificación, puesto que este presenta mayor facilidad de ejecución que la acidificación hipobárica, la cual, ante las condiciones expuestas no mostró mejoras en la eficiencia de acidificación de los modelos evaluados. Tanto con ácido acético como con ácido cítrico, se recomienda, dentro de lo sensorialmente viable, incrementar las concentraciones de acidulante en disolución para aumentar la eficiencia de acidificación. No obstante, tomando en cuenta consideraciones de deterioro microbiológico, se recomienda el uso de ácido acético ante el ácido cítrico.

Futuras investigaciones pueden ampliar los conocimientos que se tienen a la fecha sobre acidificación hipobárica y su potencial para mejorar la eficiencia de la operación de acidificación, para las cuales se recomienda:

- Variar condiciones de relación alimento:solución, ácidos y concentraciones con el fin de establecer un panorama más claro de la influencia de estas variables en la acidificación al vacío.
- Evaluar el efecto del vacío en la acidificación de alimentos no modelo, de forma que se genere información sobre la aplicación de esta tecnología en condiciones aún más apegadas a la realidad industrial.
- Incluir diferentes temperaturas en próximos estudios en el tema, puesto que previamente se han reportado mejoras en la eficiencia de la acidificación convencional al incrementar la temperatura de proceso (Acosta *et al*., 2014), además de que esta representa un factor normalmente viable de variar en la producción industrial.

8 BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, O.G., VERMEYLEN, F.M., NOEL, C. & PADILLA-ZAKOUR, O.I. 2015. Modeling the Effects of Process Conditions on the Accumulated Lethality Values of Thermally Processed Pickled Carrots. Food Control. 51: 390-396.

ACOSTA, O., GAO, X., SULLIVAN, E.K. & PADILLA-ZAKOUR, O.I. 2014. Pickled Egg Production: Effect of Brine Acetic Acid Concentration and Packing Conditions on Acidification Rate. Journal of Food Production. 77 (5): 788-795.

AOAC International (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis. 18 ed. Methods 925.30. Association of Official Analytical Chemists. Maryland.

AOAC International (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis. 18 ed. Methods 942.15. Association of Official Analytical Chemists. Maryland.

American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers (ASHRAE). 2010. Handbook: Refrigeration. ASHRAE.

BELITZ, H., GROSCH, W. & SCHIEBERLE, P. 2009. Food Chemistry. Springer-Verlag. Berlin.

BANERJEE, S., RAVI, R. & BHATTACHARYA, S. 2013. Textural characterization of gellan and agar based fabricated gels with carrot juice. LWT- Food Science and Technology. 53: 255-261.

CALDERÓN-DOMINGUEZ, G., GUTIÉRREZ -LÓPEZ, G. & NIRANJAN, K. 2016. Advances in Heat Transfer Unit Operations. CRC Press. Boca Raton.

DEROSSI, A., DE PILLI, T. & SEVERINI, C. 2013a. Application of Pulsed Vacuum Acidification for the pH Reduction of Mushrooms. Food Science and Technology. 54: 585-591.

DEROSSI, A., DE PILLI, T. & SEVERINI, C. 2013b. Application of Vacuum Impregnation Techniques to Improve the pH Reduction of Vegetables: Study on Carrots and Eggplants. Food Bioprocess Technol. 6: 3217-3226.

DEROSSI, A., DE PILLI, T. & SEVERINI, C. 2012. Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry. Intechopen.

DEROSSI, A., FIORE, A.G., DE PILLI, T. & SEVERINI, C. 2011a. A Review on Acidifying Treatments for Vegetable Canned Food. Food Science and Nutrition. 51: 955-964.

DEROSSI, A., DE PILLI, T., LA PENNA, M.P. & SEVERINI, C. 2011b. pH Reduction and Vegetable Tissue Structure Changes of Zucchini Slices During Pulsed Vacuum Acidification. Food Science and Technology. 44: 1901-1907.

DEROSSI, A., DE PILLI, T. & SEVERINI, C. 2010. Reduction in the pH of vegetables by vacuum impregnation: A study on pepper. Journal of Food Engineering. 99: 9-15.

FARID, M. ed. 2010. Mathematical Modeling of Food Processing. CRC Press. Boca Raton.

FEATHERSTONE, S. 2014. A Complete Course in Canning and Related Processes: Microbiology, Packing, HACCP and Ingredients. Vol. 2. 14ta. ed. Elsevier. Oxford.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2011. Código de prácticas de higiene para alimentos poco ácidos y alimentos poco ácidos acidificados envasados CAC/RCP 23-1979. FAO.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). 2017a. Code of Federal Regulations 21 CFR 113: Thermally processed low-acid foods packaged in hermetically sealed containers. INTERNET. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=113

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). 2017b. Code of Federal Regulations 21 CFR 114: Acidified Foods. INTERNET. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=114&showFR=1

GAYDOS, N., GOURAMA, H., SCHEINBERG, J., CUTTER, C., CAMPBELL, J. 2016. Fate of Spoilage Microorganisms Associated with the Production of Pickled Sausage Using a Cold Fill Process. Food Protection Trends. 36 (5): 348-356.

GRAS, M., VIDAL-BROTÓNS, D, BETORET, N., CHIRALT, A. & FITO, P. 2002. The response of some vegetables to vacuum impregnation. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 3: 263-269.

HUI, Y. & EVRANUZ, E. 2015. Handbook of Vegetable Preservation and Processing. 2da ed. CRC Press. Boca Raton.

HUI, Y., GHAZALA, S., GRAHAM, D. MURRELL, K. & NIP, W.K. 2003. Handbook of Vegetable Preservation and Processing. CRC Press. Boca Raton.

INSTITUTO METEREOLÓGICO NACIONAL (IMN). 2017. Condiciones Actuales del Tiempo. Estación Automática del CIGEFI, Montes de Oca, San José. INTERNET. https://www.imn.ac.cr/especial/estacionCigefi.html

LEWIS, M. J. 1993. Propiedades físicas de los alimentos de los sistemas de procesado. Acribia.

LIU, D. ed. 2017. Laboratory Models for Foodborne Infections. CRC Press. Boca Raton.

LIU, D. ed. 2009. Molecular Detection of Foodborne Pathogens. CRC Press. Boca Raton.

LIU, J.G., LUO, G.S., PAN, S. & WANG, J.D. 2004. Diffusion coefficients of carboxylic acids in mixed solvents of water and 1-butanol. Chemical Engineering and Processing. 43: 43-47.

MARCOTTE, M., GRABOWSKI, S., KARIMI, Y. & NIJLAND, P. 2012. Acid Diffusion in Solid Foods. International Journal of Food Engineering. 8 (4): 1:17.

McMURRY, J. 2008. Organic Chemistry. 7ma ed. Brooks/Cole. Belmont.

MULLER, M. ed. 2016. Clinical Pharmacology: Current Topics and Case Studies. 2da ed. Springer. Cham.

NIELSEN, S. ed. 2017. Food Analysis. 5ta ed. Springer. Cham.

NOLLET, L. & TOLDRA, F. 2015. Handbook of Food Analysis. 3ra ed. CRC Press. Boca Raton.

OLIVEROS, N., HERNANDEZ, J.A., SIERRA-ESPINOSA, F.Z., GUARDIAN-TAPIA, R., PLIEGO-SOLORZANO, R. 2017. Experimental study of dynamic porosity and its effects on simulation of the coffee beans roasting. Journal of Food Engineering. 199: 100-112.

OSBORNE, J. 2014. Best Practices in Logistic Regression. SAGE Publications, Inc. Oaks.

OSIEWACZ, H. ed. 2013. The Mycota: A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. Industrial Applications. Vol X. Springer-Verlag. Berlin.

PAL, R. 2014. Electromagnetic, Mechanical, and Transport Properties of Composite Materials. CRC Press. Boca Raton.

RAO, M., RIZVI, S., DATTA, A. & AHMED, J. 2014. Engineering Properties of Foods. 4ta ed. CRC Press. Boca Raton.

RAY, B. & BHUNIA, A. 2013. Fundamental Food Microbiology. 5ta ed. CRC Press. Boca Raton.

ROQUE-MALHERBE, R. 2007. Adsorption and Diffusion in Nanoporous Materials. CRC Press. Boca Raton.

SUN, D.W. ed. 2012. Thermal Food Processing: New Technologies and Quality Issues. 2 ed. CRC Press. Boca Raton.

TOLA, Y.B. & RAMASWAMY, H.S. 2013. Evaluation of High Pressure (HP) Treatment for Rapid and Uniform pH Reduction in carrots. Journal of Food Engineering. 116: 900-909.

TUCKER, G. & FEATHERSTONE, S. 2011. Essentials of Thermal Processing. John Wiley & Sons.

U.S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE (GPO). 2011. Code of Federal Regulations. Título 9. Cap. II. Subcap. A. Parte 381. Canning and Canned Products. INTERNET. https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2011-title9-vol2/pdf/CFR-2011-title9-vol2-part381.pdf

VALDEZ-FRAGOSO, A., MARTINEZ-MONTEAGUDO, S., SALAIS-FIERRO, F., WELTI-CHANES, J. & MUJICA-PAZ, H. 2007. Vacuum Pulse-Assisted Pickling Whole Jalapeño Pepper Optimization. Journal of Food Engineering. 79: 1261-1268.

VARZAKAS, T. & TZIA, C. 2014. Food Engineering Handbook. CRC Press. Boca Raton.

WANG, X., GAO, Z., XIAO, H., WANG, Y. & BAI, J. 2013. Enhanced mass transfer of osmotic dehydration and changes in microstructure of pickled salted egg under pulsed pressure. Journal of Food Engineering. 117: 141-150.

WITCZAK, A. & SIKORSKI, Z. ed. 2016. Toxins and Other Harmful Compounds in Foods. CRC Press. Boca Raton.

ZHAO, Y. 2012. Specialty Foods: Processing Technology, Quality and Safety. CRC Press. Boca Raton.

ZHAO, Y. & XIE, J. 2004. Practical applications of vacuum impregnation in fruit and vegetable processing. Trends in Food Science & Technology. 15: 434-451.