

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS
SUPERIORES DE MONTERREY**

CAMPUS MONTERREY

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERÍA**



**TECNOLÓGICO
DE MONTERREY®**

***FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE MANGO
(Mangifera indica L.) PROCESADO POR ALTA PRESIÓN
HIDROSTÁTICA***

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

POR

PERLA AZUCENA RAMOS PARRA

MONTERREY, N.L.

DICIEMBRE 2006

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE
MONTERREY**

**CAMPUS MONTERREY
DIVISIÓN DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERÍA**

*Los miembros del comité de tesis recomendamos que el presente proyecto de tesis
presentado por la Ing. Perla Azucena Ramos Parra sea aceptado como requisito
parcial para obtener el grado académico de:*

**MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

Comité de Tesis:

**Dra. Carmen Hernández Brenes
ASESOR**

**Dra. Cecilia Rojas de Gante
SINODAL**

**Dr. Sergio Serna Saldívar
SINODAL**

Aprobado:

**Dr. Francisco Ángel Bello
Director del Programa de Graduados en Ingeniería**

Diciembre 2006

RESUMEN

México es el quinto productor y primer exportador a nivel mundial de mango (*Mangifera indica*). El mango es un producto de corta vida comercial, en estado de madurez puede mantenerse en óptimas condiciones sólo de 2 a 3 días en refrigeración mientras que la pulpa de mango comienza a fermentarse entre una y dos horas dependiendo del grado de madurez y de la temperatura ambiental. El procesado de alimentos mediante alta presión hidrostática (HHP) se ha utilizado en los últimos años como una alternativa efectiva al procesado convencional con temperatura, conservando características organolépticas de un producto fresco. El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar los factores fisicoquímicos, microbiológicos y nutrimentales que afectan la vida útil del mango procesado por HHP (600 MPa, 3 min). Se evaluaron los efectos del procesado y almacenamiento (4 °C por 40 días) sobre la actividad enzimática de lipooxigenasa (LOX), contenido y estabilidad de carotenoides. Paralelamente se evaluaron los cambios en pH, color, microorganismos mesofílicos aerobios totales, hongos y levaduras. Adicionalmente se realizaron dos estudios de vida útil sensorial del producto mediante las metodologías de estadística de supervivencia y punto de corte, esta última permite conocer los cambios sensoriales en el producto responsables del rechazo por parte de los consumidores. El producto procesado no presentó cambios significativos en los niveles de microorganismos evaluados. El panel entrenado determinó que los descriptores que diferenciaban a las muestras almacenadas de las frescas fueron el aumento del dulzor, reducción de acidez, oscurecimiento, sabor a madurado/fermentado. Los descriptores evaluados de dulzor, acidez y oscurecimiento no demostraron ser críticos para los consumidores. El pH de la muestra presurizada fue 3.54, el cual se mantuvo constante durante el almacenamiento. Se estima que la acidez del producto le confiere estabilidad, debido a que bajo estas condiciones y en condiciones de baja concentración de oxígeno la LOX presenta muy baja actividad debido a que su pH óptimo de acción es de 5.5 a 6.5. El contenido de carotenoides también se mantiene estable principalmente la violaxantina y todos-trans- β -caroteno a diferencia de tratamiento térmico. La vida útil del producto fue de 31 ± 5 días, estimada por la metodología de estadística de supervivencia.

La actividad de LOX es baja y los carotenos estables posiblemente debido a un efecto combinado de la acidez del producto, reducción de oxígeno en el envase y baja

temperatura de almacenamiento, factores que contribuyen a la retención de características sensoriales deseables por 30 días aproximadamente.

DEDICATORIA

A mi madre, quien ha sabido ser madre y padre al mismo tiempo, quien con sus consejos, dedicación, perseverancia, innumerables esfuerzos y ejemplos me ha enseñado que no hay cosas inalcanzables y me impulsa día a día a ser mejor. Muchas gracias por tu amor y cariño. Gracias por dejarme tomar mis decisiones y camino y darme la mano cuando ves que estoy haciendo algo equivocado, te debo lo que soy, eres la mejor madre del mundo.

A mi padre, con su recuerdo de ejemplo y amor hacia mi madre, hermanas y a mi me ha conducido por el camino indicado. Te extraño.

A mis hermanas que son todo un ejemplo a seguir. Paulina por su siempre constancia en cualquier actividad que realiza. Judith por su inteligencia, alegría por la vida. Hermanas gracias por apoyarme en todas mis decisiones. Las adoro.

¡Muchas Gracias!

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la Dra. Carmen Hernández Brenes por todos sus conocimientos, consejos y por dedicarme su tiempo en esta etapa tan especial e importante en mi vida. Gracias!!

A mis maestros y sinodales por todo el conocimiento, ejemplo y recomendaciones, gracias por seguir solidificando mis bases profesionales y personales.

A mis dos maravillosas abuelas, primos y familia, que siempre están ahí para cuando yo los he necesitado.

A mi equipo de trabajo, Dariana, Daniel, Armando, Gaby por su ayuda, tiempo, trabajos en equipo y por todas las enseñanzas que recibí de su parte. Espero seguirlos conservando como amigos.

A mis compañeros de laboratorio, Jorge, Janet, Alex, Lore, Leydi, Josefina, José Manuel, Fernando, Bertha..... Muchas gracias a todos, por brindarme siempre una sonrisa y ayuda cuando lo he necesitado. Cuentan conmigo.

A mis amigos, en especial a Liz que ha sabido ser mi amiga y hermana aquí en Monterrey, a Iván por apoyarme en esta etapa y Arturo mi familia regia.

A mis amigas Gladis, Lucía, Janeth, Loren, Gema por darme ánimos, siempre han confiado en mi.

Muchas gracias a todos!!!

INDICE

RESUMEN	I
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
INDICE	V
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)	4
2.2 Química y Estabilidad de Fitoquímicos del Mango	5
2.2.1 Carotenoides.....	5
2.2.2 Ácidos grasos.....	10
2.2.3 Vitamina C.....	11
2.2.4 Compuestos fenólicos.....	14
2.3 Procesado con Alta Presión Hidrostática	15
2.3.1 Efecto del procesado y almacenamiento sobre la estabilidad de nutrientes en alimentos procesados con alta presión hidrostática y tecnologías alternas.....	16
2.4 Enzimas Presentes en el Mango	18
2.4.1 Lipooxigenasas.....	18
2.4.1.1 Mecanismo de acción.....	19
2.4.1.2 Impacto de la lipooxigenasa sobre las características sensoriales y nutrimentales de productos procesados.....	21
2.4.1.3 Estabilidad de la lipooxigenasa al procesado con alta presión hidrostática y durante el almacenamiento.....	21
2.4.2 Polifenoloxidasas.....	22
2.4.2.1 Mecanismo de acción.....	22
2.4.2.2 Impacto de la polifenoloxidasas sobre las características sensoriales y nutrimentales de productos procesados.....	23

2.4.2.3 Estabilidad de la polifenoloxidasas al procesado con alta presión hidrostática y durante el almacenamiento.....	24
2.5 Vida Útil Sensorial de Alimentos.....	25
CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1 Materiales y Procesado con Alta Presión Hidrostática.....	28
3.2 Análisis Microbiológicos.....	30
3.2.1 Determinación de bacterias mesofílicas aeróbicas.....	30
3.2.2 Determinación de hongos y levaduras	30
3.3 Mediciones Físicoquímicas	31
3.3.1 Determinación de humedad.....	31
3.3.2 Determinación de color instrumental.....	31
3.3.3 Determinación de pH.....	32
3.3.4 Medición de actividad enzimática de la lipooxigenasa.....	32
3.3.4.1 Preparación de la muestra.....	32
3.3.4.2 Ensayo enzimático de la lipooxigenasa.....	32
3.4 Determinación y Cuantificación de Carotenoides por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	33
3.4.1 Extracción de carotenoides.....	33
3.4.2 Análisis por cromatografía líquida de alta resolución.....	34
3.4.3 Cuantificación de carotenoides.....	35
3.4.4 Procedimiento de identificación tentativa de los carotenoides.....	36
3.5 Análisis Estadístico de Datos Físicoquímicos y Microbiológicos.....	36
3.6 Estudios de Vida Útil Sensorial	36
3.6.1 Determinación de la vida útil sensorial por la metodología de análisis de supervivencia.....	37
3.6.2 Determinación de la vida útil sensorial por la metodología de puntos de corte....	40
3.6.2.1 Determinación de los descriptores críticos.....	41
3.6.2.2 Determinación de aceptabilidad de los descriptores de dulzura/acidez y color	41
3.7 Análisis Estadísticos de los Estudios de Vida Útil Sensorial.....	43
CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44

4.1 Análisis Microbiológicos.....	44
4.2 Efecto del Procesado y Almacenamiento sobre el pH	48
4.3 Efecto del Procesado y Almacenamiento sobre la Actividad de Lipooxigenasa...	49
4.4 Efecto del Procesado y Almacenamiento sobre la Estabilidad de Carotenoides...	52
4.5 Estudios de Vida Útil Sensorial.....	60
4.5.1 Determinación de vida útil sensorial mediante el uso de estadística de supervivencia.....	60
4.5.2 Determinación de la vida útil sensorial por la metodología de puntos de corte	62
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS.....	77
VITA	81

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Composición nutrimental del mango maduro.....	5
Tabla 2.2 Actividad de provitamina A de algunos carotenoides.....	8
Tabla 2.3 Composición de carotenoides y valor de provitamina A de mango variedad Tommy Atkins con diferente estado de madurez.....	9
Tabla 2.4 Distribución de ácidos grasos (C4:0 a C18:3) presentes en el mesocarpo de mango.....	11
Tabla 3.1 Programa de elución con gradiente para separación cromatográfica de carotenoides	35
Tabla 3.2 Concentración de fructosa adicionada a mango procesado con alta presión hidrostática para la simulación del descriptor dulzura/acidez.....	42
Tabla 4.1 Efecto del procesado con alta presión hidrostática a 600 MPa por 3 min sobre los niveles de microorganismos del mango var. Tommy Atkins.....	45
Tabla 4.2 Efecto del procesado por alta presión hidrostática a 600 MPa por 3 min en actividad enzimática residual de la lipooxigenasa de mango.....	50
Tabla 4.3 Identificación tentativa de picos cromatográficos presentes en mango procesado por alta presión hidrostática y separados por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fotodiodos.....	57
Tabla 4.4 Análisis de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución- detector de fotodiodos de mango procesado por alta presión hidrostática a 600 MPa por 3 min a 4°C durante 40 días de almacenamiento.....	58
Tabla 4.5 Color instrumental de mango procesada en escala CIEL*a*b* y CIEL*C*h* (D ₆₅ /10° iluminador/observador) para mango procesado por alta presión hidrostática a 600 MPa por 3 min durante 40 días de almacenamiento.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Estructuras químicas de algunos carotenos y xantofilas.....	7
Figura 2.2 Oxidación ácido ascórbico a deshidroascórbico.....	13
Figura 2.3 Estructuras de flavonoides presentes en el mango (1) Mangiferina C-glicosíadas y (2) Isomangiferina.....	15
Figura 2.4 Acción de la lipooxigenasa sobre el ácido linoléico.....	20
Figura 2.5 Compuesto fenólico utilizado comúnmente como sustrato por la polifenoloxidasas.....	23
Figura 3.1 Formato de evaluación para consumidores utilizado en la determinación de vida útil sensorial de mango procesado por alta presión hidrostática por análisis de supervivencia.....	37
Figura 4.1 Crecimiento microbiano evaluado en mango procesado por alta presión hidrostática a 600 MPa por 3 min y almacenado a 4°C por 40 días. (A) Cuenta de hongos, (B) Cuenta de bacterias mesofílicas aeróbicas totales y (C) Cuenta de levaduras.....	47
Figura 4.2 Cambios en el pH del mango procesado por alta presión hidrostática a 600 MPa por 3 min y almacenado a 4°C por 40 días.....	49
Figura 4.3 Actividad de lipooxigenasa en mango procesado por alta presión hidrostática a 600 MPa por 3 min y almacenado a 4°C por 40 días.....	52
Figura 4.4 Cromatograma de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución- detector de fotodiodos detectados a 450 nm en extractos de mango procesado por alta presión hidrostática con 8 días de almacenamiento a 4°C.....	55
Figura 4.5 Estabilidad de carotenoides totales de mango procesado por alta presión hidrostática (600 MPa, 3min) durante el procesado y almacenamiento de a 4°C por 40 días	56
Figura 4.6 Modelación logística de la probabilidad de rechazo por los consumidores a diferentes tiempos de almacenamiento de mango procesado por alta presión hidrostática (600 MPa, 3 min).....	61

Figura 4.7 Efecto de diferentes concentraciones de fructosa sobre la aceptabilidad sensorial de mango procesado por alta presión hidrostática a 600 MPa por 3 min.....	63
Figura 4.8 Efecto de cambios en el color durante el almacenamiento de mango procesado por alta presión hidrostática (600 MPa, 3 min) sobre la aceptabilidad de los consumidores.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
λ_{\max}	Longitud de onda máxima
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrometro
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados
BHT	Hidroxitolueno butilado
Da	Dalton
d.i.	diámetro interior
EAU	unidad de actividad enzimática
Ec.	Ecuación
EMEX	grupo de empacadores de mango de exportación
E.U.A	Estados Unidos de América
Etc	Etcétera
EVOH	Etil vinil alcohol
FAME	Éster metílico del ácido graso
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
G	Gramo
HHP	Alta presión hidrostática
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ITESM	Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey
kcal	Kilocaloría
KV/cm	Kilovoltios/centímetro
LOX	Lipooxigenasa
M	Molar
min	Minuto
Mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mmol	Milimol
MPa	Megapascales
MTBE	Metil-ter-butil éter
N	Normal
nm	Nanómetro
P	Producto
PA	Poliamida
PEAD	Polietileno de alta densidad
PET	Poliéster
pH	Potencial hidrógeno
PP	Polipropileno

PPO	Polifenoloxidasas
pulg Hg	pulgada de mercurio
PTFE	Polietileno tereftalato
PVDC	Cloruro de polivinilideno
RE	equivalente retinol
seg	Segundo
T	Temperatura
t	Tiempo
UFC	unidades formadoras de colonias
var.	Variedad
v:v	Relación volumen:volumen
VUS	Vida útil sensorial
UI	Unidades internacionales

1. INTRODUCCIÓN

México es el quinto productor y el primer exportador a nivel mundial de mango, en donde del total de sus exportaciones el 98% se realiza en estado fresco y el 2% de manera procesada (pulpa, jugo, etc) (FAO, 2005). El mango es un producto de corta vida comercial por ser un alimento muy perecedero, en estado de madurez puede mantenerse en óptimas condiciones sólo de 2 a 3 días en refrigeración mientras que a temperatura ambiente la pulpa de mango comienza a fermentarse entre una y dos horas dependiendo del grado de madurez del producto (Mata y Mosqueda, 1998).

El procesado de alimentos mediante alta presión hidrostática (HHP) se ha utilizado en los últimos años como una alternativa efectiva al procesado convencional con temperatura. Esta tecnología surge de la necesidad de los consumidores de obtener productos con características similares a los frescos, preservando sus características sensoriales, nutrimentales y asegurando su inocuidad y estabilidad microbiológica (Cano *et al.*, 2005). Los trabajos de Alpas *et al.* (2000) reportaron que en alimentos ácidos ($\text{pH} < 4$), como es el caso del mango, los tratamientos con HHP son eficientes para la inactivación de hongos, levaduras y células bacterianas. El procesado de mango por HHP es un éxito de esta tecnología, sin embargo se han realizado muy pocos estudios sobre este producto, los cuales en su mayoría se han enfocado en el efecto del procesado y no existe información en la literatura sobre los factores que limitan su estabilidad durante el almacenamiento.

El factor más relevante que limita la vida útil de alimentos procesadas por HHP es el desarrollo de sabores desagradables durante el almacenamiento atribuido a actividades enzimáticas residuales, desarrollo de bacterias ácido lácticas y otras reacciones de auto-oxidación. (Castellanos, 2005). Guerrero Beltrán *et al.* (2005) reportaron el efecto de HHP y la adición de agentes antimicrobianos sobre la actividad de la enzima polifenoloxidasas (PPO) en mango. Estos autores encontraron que a presiones superiores a 448 MPa con la combinación de ácido ascórbico se consigue un efecto sinérgico, provocando una mayor estabilización del color del mango procesado por HHP, como consecuencia de la inactivación de PPO. Sin embargo los autores no reportaron los efectos de la PPO a lo largo del almacenamiento.

Cuando un alimento es microbiológicamente estable se hace uso de la evaluación sensorial para determinar el final de su vida útil y la posible causa de su rechazo por parte

de los consumidores (Hough *et al.*, 2003). Existen diversas metodologías, algunas se basan en paneles entrenados para conocer los cambios sensoriales que están ocurriendo en un alimento a través del almacenamiento por medio un análisis descriptivo. Sin embargo cuando se desea conocer la magnitud del cambio necesario en un atributo que modifica la aceptabilidad del producto se utilizan métodos de modelación mediante el uso de paneles entrenados y consumidores. Otras metodologías como la de análisis de supervivencia permiten determinar el tiempo transcurrido hasta el rechazo del producto pero no proveen información sobre las causas del mismo. Adicionalmente, mediante la correlación de los datos obtenidos de variables fisicoquímicas en el producto con los datos sensoriales, se puede obtener información sobre las posibles causas de los cambios sensoriales observados (Jacobo-Velázquez y Hernández-Brenes, 2006).

El mango es considerado una rica fuente de carotenos, para el caso de mango maduro variedad Tommy Atkins, la cantidad promedio es de 1920 µg de carotenos por 100 g de pulpa de mango, con el β-caroteno representando el 68% del total reportado (Pott *et al.* 2003b). Debido a esto se considera importante evaluar la estabilidad de carotenoides a lo largo de la vida útil del mango, debido a que su transformación, además de provocar la reducción del valor nutritivo de la actividad como provitamina A, provoca cambios en color, producción de sabores indeseables y en otras actividades biológicas como son la protección contra la formación y acción de radicales libres por lo que se les ha conferido propiedades anticancerígenas y se les asocia con la prevención de enfermedades cardiovasculares, degeneración macular relacionada a la edad y disminución del riesgo de formación de cataratas (Scott, 1992).

Los objetivos del presente estudio incluyeron la evaluación del efecto del procesado por HHP (600 MPa, 3 min) sobre la inactivación microbiológica de mango procesado y durante un almacenamiento de 40 días a 4 °C, así mismo evaluar paralelamente factores fisicoquímicos con un efecto potencial en el deterioro de mango procesado por HHP durante el almacenamiento. Adicionalmente, evaluar la estabilidad de carotenoides durante el almacenamiento por cromatografía líquida de alta resolución y por último identificar los factores fisicoquímicos y/o microbiológicos críticos que están relacionados con el final de la vida útil sensorial del puré de mango procesado por HHP. Además la estimación de vida útil sensorial por estadística de supervivencia y llevar a

cabo un análisis descriptivo con un panel entrenado para medir los descriptores que cambian a través del almacenamiento.

A diferencia de otros trabajos de investigación de alimentos procesados por HHP, este trabajo aporta conocimiento científico sobre la estabilidad de la LOX y carotenoides durante el almacenamiento y adicionalmente se muestran dos metodologías para estimación de la vida útil sensorial de alimentos microbiológicamente estables como el mango procesado por HHP.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mango (*Mangifera indica* L.)

El mango *Mangifera indica* L., es el frutal más importante de la familia Anacardiaceas, la cual comprende 64 géneros, citándose entre ellos el *Anacardium occidentale* (marañón), *Pistacia vera* (pistache) y *Spondias purpurea* (ciruela mexicana) considerados como frutales de menor importancia económica que el mango (Mata y Mosqueda, 1998). El centro de origen del mango se ubica en el continente asiático, entre la zona geográfica del noreste de la India y el norte de Burma, muy cerca del Himalaya, y actualmente es uno de los frutos tropicales más populares e importantes con una producción global que excedió los 19 millones de toneladas en el 2005 (Berardini *et al.*, 2005; FAO, 2005). De acuerdo a la FAO (2005), México es el quinto productor y el primer exportador a nivel mundial de mango, en donde del total de sus exportaciones el 98% se realiza en estado fresco y el 2% de manera procesada (pulpa y jugo de mango). Las principales variedades que se siembran en México incluyen mangos genéricos, Haden, Keitt, Ataulfo, Tommy Atkins, Manila, Kent, Manillilla y Criollos (procedentes de semillas) (SAGARPA, 2004). El 65% de la producción nacional de mango en México esta compuesta por los mangos tipo Florida como lo son Keitt, Haden, Kent y Tommy Atkins. Los principales estados productores de mango Tommy Atkins, de relevancia para el presente estudio, son Michoacán, Jalisco, Guerrero, Colima, Nayarit, Sinaloa y Campeche, siendo los meses de febrero a agosto la estacionalidad de producción de esta variedad (PROSERCO, 2003).

La fruta de mango es una de las más ricas en vitamina A ya que contiene alrededor de 600 Unidades Internacionales (UI, 1 UI equivale a 0.344 µg de acetato de *trans*-retinol) por cada 100 g de pulpa, concentración que únicamente es superada por la papaya (*Carica papaya*) que contiene 1000 UI, el fruto oriental Kaki (*Diospiros kaki*) con 2000 UI y el canistel (*Pouteria campechiana*) con 1500 UI. El mango aporta el 15% del requerimiento diario de un adulto en los mismos 100 g de pulpa comestible (Mata y Mosqueda, 1998), además la fruta contiene otros nutrientes como vitamina C y vitaminas del complejo B, los cuales se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Composición nutrimental del mango maduro (Mata y Mosqueda, 1998).

Composición Química (100gr de pulpa¹)	Concentración Mango maduro
Calorías	50-60 kcal
Humedad	83 g
Proteínas	0.5 g
Grasas	0.1 g
Hidratos de Carbono	15 g
Fibra	0.8 g
Calcio	10 mg
Hierro	0.5 mg
Vitamina A	600 UI
Tiamina	0.03 mg
Riboflavina	0.04 mg
Niacina	-
Vitamina C	13 mg
Metionina	-
Triptófano	-
Lisina	-
Desechos	34%

¹Valores expresados en base húmeda; - Significa sin datos.

2.2 Química y Estabilidad de Fitoquímicos del Mango

2.2.1 Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos de plantas con funciones como antioxidantes, precursores de hormonas, vitaminas, colorantes y son componentes esenciales de los aparatos fotosintéticos (Howitt y Pogson, 2006). Así mismo los carotenoides son el segundo pigmento más abundante en la naturaleza, representando una familia con más de 700 miembros. La estructura básica de la mayoría de estos compuestos es poliénica de 40 átomos de carbono, formada por ocho unidades de isopreno, cuyo arreglo se hace inverso en el centro y puede ser de cadena lineal o tener ciclizaciones en los extremos. El nombre genérico de carotenoides deriva de la zanahoria (*Daucus carota*), ya que fue de esta

hortaliza donde se aislaron por primera vez (Chen *et al.*, 1995). Los carotenoides son compuestos hidrofóbicos o lipofílicos, y de acuerdo con su estructura química se han dividido en dos grandes grupos, carotenos y xantófilas. Los carotenos tienen características de hidrocarburos, son solubles en éter de petróleo y poco en etanol; destacan entre éstos los α , β , γ -carotenos y el licopeno. Por su parte, las xantófilas son la forma oxidada de los carotenos, se presentan como ácidos, aldehídos o alcoholes y son solubles en etanol, metanol y éter de petróleo, ejemplos de estos compuestos son la zeaxantina, luteína y violaxantina (Figura 2.1). Ambos grupos deben su color a la conjugación de los dobles enlaces, así como a la presencia de los anillos extremos (si existen); en estado natural, sus insaturaciones tienen una configuración *trans* y en algunos casos presentan isomerizaciones *cis*. Las modificaciones isoméricas de estas estructuras provocan cambios muy notorios en el color (Mingués, 1997).

En términos generales, en la naturaleza, la cantidad de xantófilas sobrepasa la de carotenos; sin embargo, el β -caroteno es, tal vez, el carotenoide de mayor importancia en la tecnología de alimentos. El β -caroteno tiene dos grupos cíclicos de ionona unidos a través de una cadena intermedia isoprenoide con nueve dobles enlaces conjugados que contribuyen a la estabilidad y al color. La abertura de los anillos o el aumento de la conjugación producen un cambio hacia el rojo, mientras que la epoxidación o la pérdida de dicha conjugación cambia a los tonos amarillos. El β -caroteno posee actividad biológica de precursor de vitamina A por presentar anillos de ionona, debido a que la mucosa intestinal de los animales superiores los puede oxidar y transformar en retinal (Badui, 1994). Además del β -caroteno, los carotenoides que presentan actividad de provitamina A son, el β -apo-8'-carotenal, criptoxantina, α -caroteno y γ -caroteno (Tabla 2.2). Estos carotenoides biológicamente activos tienen todas sus insaturaciones con configuración *trans* y su isomerización a *cis* reduce su disponibilidad como precursores de la vitamina A. La isomerización *cis* puede ocurrir durante el procesado de los vegetales; se considera que de 15 a 35% de estos pigmentos se isomerizan durante la industrialización por métodos tradicionales (Sweeney y Marsh, 1971).

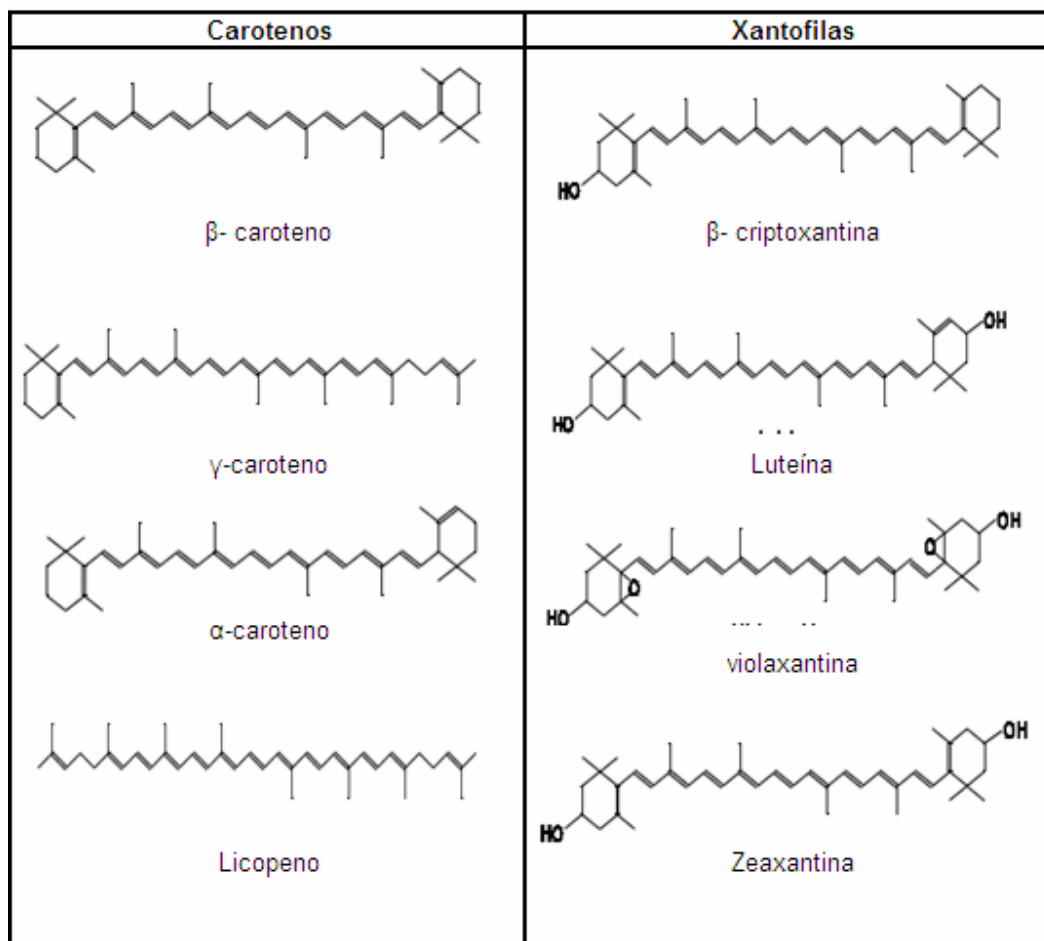


Figura 2.1 Estructuras químicas de algunos carotenos y xantofilas (Rodríguez-Amaya, 1997).

Los carotenos, además de servir como precursores de vitamina A en el organismo humano, también cumplen una función biológica protectora contra la formación y acción de radicales libres por lo cual se les han atribuido propiedades anticancerígenas y se les asocia con la prevención de enfermedades cardiovasculares, degeneración macular relacionada a la edad y disminución del riesgo de formación de cataratas (Scott, 1992).

Tabla 2.2 Actividad de provitamina A de algunos carotenoides (Badui, 1994).

Carotenoide	µg correspondientes a 1 UI de vitamina A
β-caroteno	0.6
β-Apo-8'-carotenal	0.83
Criptoxantina	1.05
α-caroteno	1.13
γ-caroteno	1.43

Como se ha mencionado previamente, debido a su cadena poliénica con dobles enlaces conjugados, los carotenoides están sujetos a muchos cambios químicos que generan su inestabilidad, incluyendo su susceptibilidad a oxidación (combinación con oxígeno) e isomerización geométrica (cambio de geometría alrededor de un doble enlace). Estos cambios son inducidos por las diferentes condiciones de procesamiento industrial (altas temperaturas, radiaciones electromagnéticas y oxígeno) y durante el almacenamiento de los alimentos. Su transformación, además de provocar cambios de color, también reduce su valor nutritivo debido a que se destruye la actividad provitamina A y otras actividades biológicas citadas con anterioridad. La exposición de todos-trans-β-carotenos a la luz lleva predominantemente a la formación de isómeros 9-cis, mientras que el 13-cis-β-caroteno es principalmente formado por tratamientos térmicos (Chen *et al.*, 1996). Su oxidación se acelera con el calor mediante un mecanismo semejante al de la autooxidación de las grasas insaturadas; la reacción se cataliza con la presencia de los metales de transición (hierro y cobre), por la luz y la presencia de oxígeno. De igual manera las enzimas, principalmente la lipooxigenasa (LOX), llevan a cabo esta transformación. Los carotenoides son más estables en los alimentos con un cierto contenido de agua y muy inestables en los que tienen una baja actividad acuosa (deshidratados). La degradación de carotenoides por el proceso de alimentos como deshidratación también ha sido asociada con el desarrollado de olores y sabores indeseables (Rodríguez-Amaya, 1997).

El mango es considerado una rica fuente de carotenos, para el caso de mango maduro variedad Tommy Atkins, la cantidad promedio es de 1920 µg de carotenos por

100 g de pulpa, con el β -caroteno representando el 68% del total reportado (Pott *et al.*, 2003b). Además el color característico de mango maduro ha sido atribuido a la síntesis de carotenos durante la maduración (Mercadante *et al.*, 1997). La Tabla 2.3 muestra la composición de carotenoides y valor de vitamina A de mango variedad Tommy Atkins con diferentes grados de maduración.

Tabla 2.3 Composición de carotenoides y valor de provitamina A de mango variedad Tommy Atkins con diferente estado de madurez (Mercadante y Rodríguez-Amaya, 1998).

Carotenoide	Concentración ($\mu\text{g/g}$) ¹		
	verde-maduro	parcialmente maduro	maduro
todos- <i>trans</i> - β -caroteno	2.0 \pm 0.8	4.0 \pm 0.8	5.8 \pm 2.5
<i>cis</i> - β -criptoxantina	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0
todos- <i>trans</i> - β -criptoxantina	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1
todos- <i>trans</i> -zeaxantina	0.3 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.4 \pm 0.2
Isómeros de luteoxantina	1.3 \pm 0.7	2.7 \pm 1.1	2.0 \pm 0.6
todos- <i>trans</i> -violaxantina	6.9 \pm 3.0	17.5 \pm 6.7	22.4 \pm 9.1
9- <i>cis</i> -violaxantina ²	3.3 \pm 1.3	9.0 \pm 3.2	14.5 \pm 4.7
13- <i>cis</i> -violaxantina ²	0.5 \pm 0.2	0.7 \pm 0.7	tr
<i>cis</i> -neoxantina	ND- tr ³	0.4 \pm 0.5	1.0 \pm 1.0
todos- <i>trans</i> -neoxantina	2.6 \pm 1.8	6.6 \pm 5.1	4.9 \pm 4.5
total	17.0 \pm 7.8	45.1 \pm 20.7	51.2 \pm 16.8
Valor provitamina A (RE ⁴ /100g)	32 \pm 13	68 \pm 14	96 \pm 42

¹Media y desviación estándar de 3 lotes de muestra con diferentes grados de maduración; ²Localización tentativa del doble enlace *cis*; ³ND: No detectable, tr: trazas; ⁴RE; equivalente retinol

Desde el punto de vista funcional los carotenos se dividen en precursores de vitamina A que no son pigmentos, tales como α - y β -caroteno; el segundo grupo incluye precursores de vitamina A que son pigmentos, tales como criptoxantina, β -apo-8'-carotenal y ester etil ácido β -apo-8'-carotenoico; en el tercer grupo se encuentran los no precursores de vitamina A que no son pigmentos o pobremente pigmentan, tales como violaxantina y neoxantina; y finalmente en un cuarto grupo se incluye los no precursores

de vitamina A que pigmentan, tales como luteína, zeaxantina y cantaxantina (Bauernfeind, 1981).

2.2.2 Ácidos grasos

Los ácidos grasos tradicionalmente eran definidos como ácidos monocarboxílicos de cadena alifática con número par de átomos de carbono que podrían ser saturados o insaturados. En la medida en que la técnicas de análisis cualitativo y cuantitativo mejoraron, se identificaron muchos otros ácidos grasos con estructuras diferentes, tales como ácidos cíclicos, ramificados, hidroxilados, con número impar de átomos de carbono, etc., de tal manera que al presente se conocen más de 400 ácidos grasos que se localizan en los tejidos animal y vegetal. Dichos ácidos representan un alto porcentaje de la composición de los triacilglicéridos (ésteres de ácidos grasos con glicerol), de las grasas y de los aceites. Las diferencias en estabilidad (por ejemplo, oxidación), comportamiento, plasticidad, estado físico, patrón de cristalización, índice de yodo, temperatura de solidificación, etc., de las grasas y aceites se deben fundamentalmente a la presencia y a la concentración de los ácidos grasos constituyentes. En los alimentos, los ácidos grasos no sólo se encuentran esterificados integrando a los triacilglicéridos, si no que también se encuentran esterificados de una manera diferente, como parte de algunos pigmentos, por ejemplo, el carotenoide luteína de la flor de cempasúchil (*Tajetes erecta*) tiene sus posiciones 3 y 3' esterificadas con los ácidos palmítico y linolénico, respectivamente. De igual manera en algunas variedades de chiles (ajís), la capsantina se encuentra como el correspondiente éster laúrico.

La composición de los lípidos de mango ha sido estudiada por muchos grupos, entre ellos Pott *et al.* (2003a) reportaron la distribución relativa de ácidos grasos del mesocarpo de mango variedad Kent, obteniendo como ácido graso característico al ácido linolénico (C18:3, ω -3) (Tabla 2.4). Por medio del análisis por cromatografía de gases se ha logrado identificar la presencia de ácido butírico (aproximadamente 1.6%) en mango, el cual se describió como el compuesto volátil responsable junto con otros numerosos constituyentes del perfil inherente de aroma del mango, este es el primer reporte sobre carotenoides de plantas que se encuentran acilados con ácido butírico (Bautista *et al.*, 1998; Adedeji *et al.*, 1992). Pott *et al.* (2003a) reportaron que en mango fresco la

violaxantina se encuentra esterificada como violaxantina dibutirato, la cual fue propuesta por los autores como un marcador en productos de mango sin procesar debido a que esta xantófila es muy propensa a degradarse o transformarse durante el procesado.

Tabla 2.4 Distribución de ácidos grasos (C4:0 a C18:3) presentes en el mesocarpo de mango (Pott *et al.*, 2003a).

Éster metílico del ácido graso (FAME)	Area Relativa (% Area) ^{1,2}
Butírico (C4:0)	1.6 ± 0.5
Mirístico (C14:0)	2.4 ± 0.4
Palmítico (C16:0)	24.0 ± 1.5
Palmitoleico (C16:1, ω-7)	20.3 ± 1.7
Esteárico (C18:0)	1.2 ± 0.3
Oleico (C18:1, ω-9)	8.9 ± 1.3
Ácido <i>cis</i> - Vaccénico (C18:1, ω-7)	7.1 ± 0.9
Linoleico (C18:2, ω-6)	6.2 ± 1.2
Linolénico (C18:3, ω-3)	31.7 ± 3.1

¹Los compuestos menores del 0.5 % de área no fueron enlistados. Los valores son presentados como medias aritméticas ± desviación estándar de 5 determinaciones independientes. ²Area relativa calculada como % área FAME/ total FAME (FAME, Éster metílico del ácido graso).

2.2.3 Vitamina C

Existen varias sustancias que presentan una actividad químicamente similar a la de la vitamina C (ácido L-isoascórbico, isómero óptico C-5, ácido D-ascórbico, isómero óptico C-4); sin embargo, solo el ácido L-ascórbico y el ácido deshidroascórbico el cual es producto de la oxidación del anterior, poseen una importancia nutrimental significativa (Fennema, 1996). Cabe indicar que sólo los isómeros L de estos ácidos tienen función vitamínica y que el ácido dehidroascórbico presenta únicamente 80% de la actividad del ácido ascórbico. La vitamina C es una cetona cíclica que corresponde a la forma enólica de la 3-ceto-1-gulofuranolactona; contiene un enol entre los carbonos 2 y 3 que la hace un agente ácido y muy reductor, por lo que se oxida fácilmente. Se encuentra principalmente en los alimentos de origen vegetal, sobre todo cítricos. Y los cereales, carnes, pescados y sus derivados no la contienen. Por esta razón, el consumo rutinario de frutas y verduras frescas aporta la vitamina C requerida diariamente, debido a que por ser

hidrosoluble el hombre la almacena escasamente. La ingesta diaria recomendada de ácido ascórbico es de 70 a 90 mg (Medical College of Wisconsin, 2003), por lo que el consumir aproximadamente 550 g de pulpa de mango madura satisface los requerimientos diarios para el humano.

Su actividad biológica es muy variada, es necesaria para la síntesis de tejido conectivo (colágeno), formación de huesos, dentina de los dientes, cartílagos y paredes de los capilares sanguíneos; interviene en reacciones de oxidación-reducción, hidroxilación de hormonas esteroidales y de aminoácidos aromáticos. Así mismo, ayuda a la absorción de hierro (distinto del grupo hemo de la hemoglobina), por lo que es fundamental en la dieta de los pueblos que basan su alimentación en granos y semillas. Las deficiencias de esta vitamina en la dieta provocan diversos síntomas de deficiencia, que en estado avanzado se agrupan en la enfermedad llamada escorbuto. Entre los síntomas se encuentra una mayor susceptibilidad de contraer diversas infecciones, algunas de las cuales pueden ser muy graves; se produce inflamación articular, hemorragias subcutáneas, incapacidad de los osteoblastos para formar sustancias intracelulares, etc. Cabe indicar que a diferencia de otras vitaminas, el hombre no sintetiza la vitamina C, por lo que se requiere de su consumo diario (Gökmen *et al.*, 2000).

La vitamina C es la más inestable y lábil de todas las vitaminas, por lo que se considera que si esta vitamina resiste el procesado térmico, el almacenamiento, etc., significa que todos los demás nutrientes se verán poco afectados. Esta vitamina al presentar una estructura de enediol es poco estable y muy reactiva, siendo su principal ruta de degradación la oxidación de ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico en una reacción reversible, estableciendo un sistema de oxidación-reducción (Figura 2.2). A su vez, el ácido dehidroascórbico se continúa oxidando y se transforma en ácido 2,3-dicetogulónico (el cual no tiene actividad biológica) y por medio de la degradación de Strecker se cicla y produce anhídrido carbónico y furfural, el cual se polimeriza y forma melanoidinas, similares a las producidas por el oscurecimiento no enzimático. Durante esta degradación se producen compuestos de bajo peso molecular, responsables de olores indeseables (Tatúm *et al.*, 1975). La pérdida de vitamina C especialmente ocurre en cítricos y sus derivados provocando pérdidas nutrimentales importantes, generación de malos olores y oscurecimiento no enzimático.

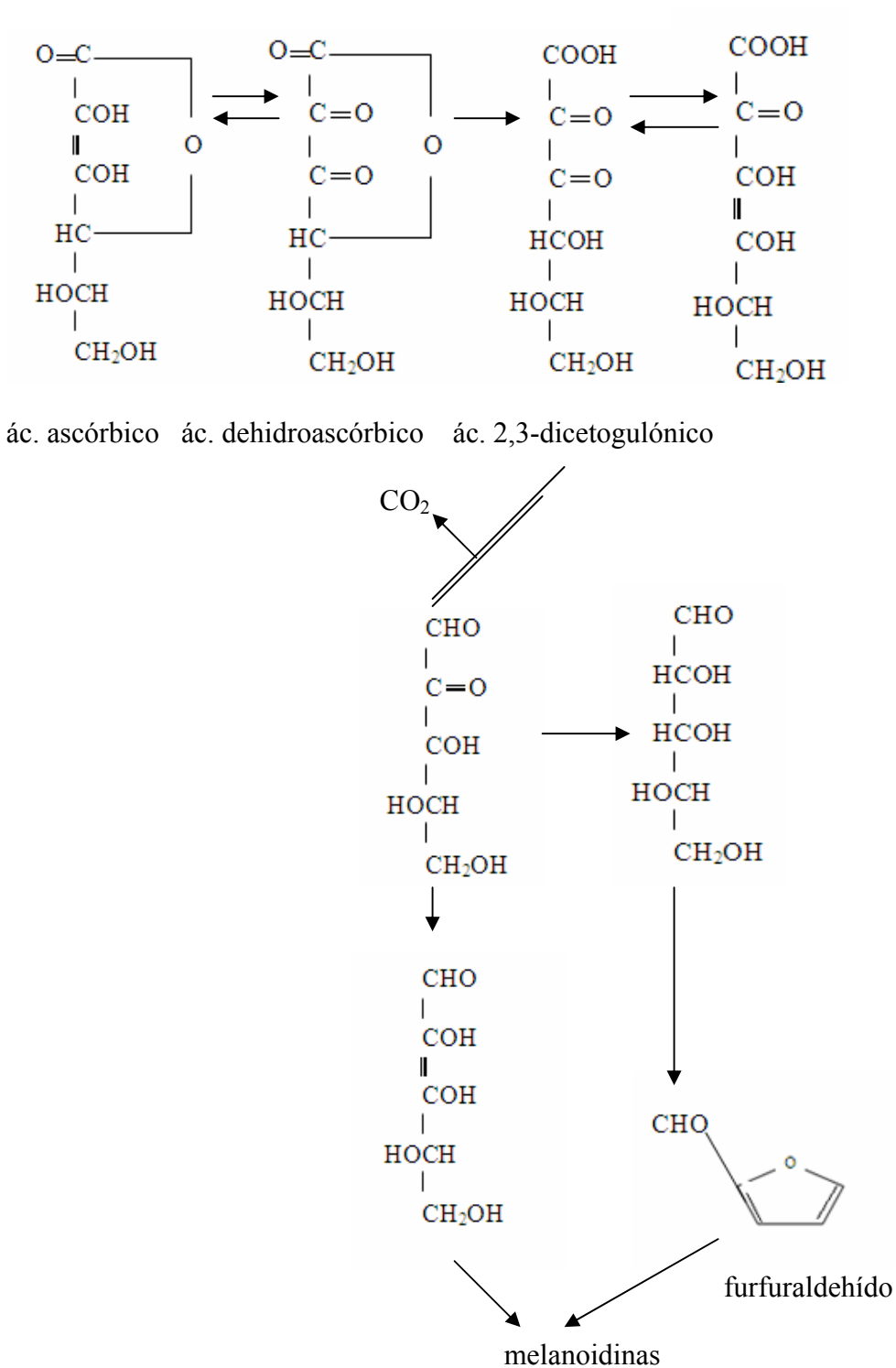


Figura 2.2 Oxidación ácido ascórbico a deshidroascórbico (Badui, 1994).

La oxidación del ácido ascórbico esta en función de muchas variables, principalmente la temperatura, el pH, la disponibilidad de oxígeno, los metales de transición y las radiaciones electromagnéticas; además, influyen la presencia de azúcares reductores, algunas sales, la actividad acuosa, los peróxidos, ciertas enzimas y la presencia de otras vitaminas, especialmente la riboflavina (Fennema, 1996). Esta vitamina es más estable a pH ácidos y en actividades acuosas bajas; en ausencia de oxígeno resiste temperaturas de esterilización, sin embargo, se llega a destruir térmicamente por una vía no oxidativa de poca importancia que alcanza su máximo a pH 4 (Badui, 1994).

2.2.4 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constan de un anillo bencénico que contiene uno o diversos grupos hidroxilo. Según su estructura química, estos compuestos se pueden subdividir en flavonoides o no flavonoides, según sean o no derivados de la estructura de básica de fluoroglucinol, caracterizada por un esqueleto de 2 anillos bencénicos unidas por una cadena de 3 átomos de carbono ciclada en un heterociclo oxigenado (Aguilar, 2003).

En el fruto de mango se tiene la presencia de un amplio patrón de compuestos fenólicos, especialmente glucósidos tipo flavonoides. Cabe mencionarse que el contenido más alto de polifenólicos totales está en la cáscara del mango pero también se pueden encontrar en la pulpa, por lo que se considera al mango como una buena fuente de dichos compuestos (Figura 2.3) (Schieber *et al.*, 2003). Algunos de los compuestos fenólicos de mango reportados incluyen ácido gálico, ácido cafeico, ácido p-coumarico, mangiferina, kaempferol (hexosa), quercetina 3-galactosa, quercetina 3-glucosa, quercetina (pentosa), kaempferol (pentosa), entre otros.

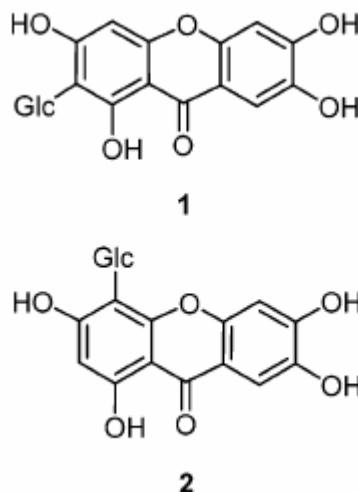


Figura 2.3 Estructuras de flavonoides presentes en el mango (1) Mangiferina C-glicósidas y (2) Isomangiferina (Schieber *et al.*, 2003).

2.3 Procesado con Alta Presión Hidrostática

Las tecnologías emergentes no térmicas se han investigado como procesos alternativos o complementarios al procesado con tecnologías térmicas para la industrialización de alimentos. Dentro de las tecnologías no térmicas se incluyen entre otras el procesado con alta presión hidrostática (HHP, por sus siglas en inglés), campos de pulsos eléctricos, calentamiento con micro-ondas, irradiación gamma y ultrasonido. Dichas tecnologías surgieron por la necesidad de los consumidores de obtener productos con características similares a los frescos, preservando sus características sensoriales, nutrimentales, asegurando su inocuidad y estabilidad microbiológica (Cano *et al.*, 2005).

El investigador Bert Hite fue el primero en realizar estudios con alta presión en alimentos a finales del siglo XIX. Él demostró que la vida útil de leche cruda puede ser extendida por 4 días después de haberla tratado a una presión de 600 MPa por una hora a temperatura ambiente (Farkas y Hoover, 2000). Sin embargo, no fue hasta 1990 cuando se continuaron los estudios de esta tecnología por medio de la implementación del Programa Japonés en Tecnología de Alta Presión aplicada al procesado de alimentos. El Programa involucró la participación de compañías japonesas, universidades e institutos de investigación, los cuales consiguieron mejorar significativamente la tecnología y con ello conducir a la aplicación comercial de la HHP para la preservación de productos tales

como jugos de frutas, aderezos para ensaladas, salsas, alimentos marinos, jamones y jaleas. Seguida de la iniciativa Japonesa, universidades Europeas y de Norte América, compañías e institutos de investigación empezaron a investigar sobre el procesado con HHP. En los últimos años, algunos países han iniciado la producción y comercialización de alimentos tratados con HHP, incluyendo jugos de fruta, guacamole y salsas mexicanas (Deliza *et al.*, 2005).

El tratamiento con HHP destruye microorganismos, influye en desnaturalización o modificación de proteínas, activación o inactivación de enzimas, y produce cambios en las propiedades de grasas y carbohidratos. Adicionalmente Cano *et al.* (2005), reportaron que el procesado con HHP es efectivo para la eliminación de hongos, levaduras y formas vegetativas de bacterias en frutos y derivados debido a la combinación del efecto de la alta presión con el pH bajo de estos productos (pH=4).

2.3.1 Efecto del procesado y almacenamiento sobre la estabilidad de nutrientes en alimentos procesados con alta presión hidrostática y tecnologías alternas

Sánchez-Moreno *et al.* (2003) reportaron el efecto del procesado con alta presión y del almacenamiento posterior en refrigeración sobre la concentración de Vitamina C y carotenoides provitamínicos A en jugo de naranja. En su estudio los autores reportaron que con un tratamiento de 350 MPa a 30°C por 2.5 min no se encontraron diferencias en los niveles de Vitamina C al compararlo con un jugo de naranja sin tratamiento. Por otra parte, durante el almacenamiento a 4°C por tres meses el jugo de naranja presurizado a 800 MPa y 25°C por 1 min retuvo más del 80% de Vitamina C, o bien, a un tiempo de almacenamiento de 2 meses a una temperatura de 15°C se logró retener el mismo porcentaje de vitamina C.

Por otro lado, en la evaluación de las concentraciones de carotenoides totales en jugo de naranja tratado a una presión de 350 MPa se observó un incremento de 29.57% de β -caroteno resultados que fueron atribuidos a la ruptura celular ejercida por la presión. Los autores también almacenaron muestras de jugo de naranja a 4 °C por 10 días y observaron que el contenido de carotenoides totales permaneció más alto (11.16%) que el jugo de naranja sin tratar (Sánchez-Moreno *et al.*, 2003). De manera similar, De Ancos *et al.* (2000) evaluaron el efecto de HHP en dos cultivares del fruto kaki a 500 MPa por

15 min a una temperatura de 25°C sobre el contenido de carotenoides (valor provitamina A), encontrando también un incremento en la cantidad de carotenoides extraíbles (9-27%) una vez procesado el fruto.

Los anteriormente mencionados son los pocos reportes encontrados en la literatura sobre el efecto de HHP sobre la estabilidad de nutrientes. Sin embargo existen numerosos estudios sobre la estabilidad de nutrientes en productos mínimamente procesados (pre-cortados) y envasados en atmósferas modificadas, los cuales poseen una actividad residual elevada. Dichos estudios pueden ser utilizados como el punto de referencia de las pérdidas nutrimentales de frutos refrigerados, sin embargo debido a que su vida útil muy corta, es posible que las pérdidas observadas podrían continuar si los tiempos de almacenamiento fueran mayores. Como punto de referencia se puede citar el estudio de Gil *et al.* (2006) quienes evaluaron el efecto del procesado mínimo (cortado) de frutas frescas sobre el contenido de nutrientes con respecto a frutas enteras. Las frutas enteras y cortadas se almacenaron 9 días a 5 °C y se observaron pérdidas de vitamina C no mayores de 5% en piezas de mango, fresa y melón, 10% en piezas de piña y 12% en rebanadas de kiwi en el día 6 de almacenamiento. No se encontraron pérdidas de carotenoides en cubos de melón y rebanadas de kiwis, mientras que las pérdidas en piña fueron superiores al 25%, seguidas por las piezas de mango y fresa (10-15%), después de 6 días a 5°C. Los autores no reportaron pérdidas significativas en fenólicos totales en las frutas frescas cortadas después de 6 días.

Continuando con la información sobre tecnologías emergentes, algunos autores han estudiado el efecto de utilización de la tecnología de campos de pulsos eléctricos sobre la estabilidad de nutrientes. Min *et al.* (2003) evaluaron el efecto del procesado y del almacenamiento de jugo de tomate procesado térmicamente y con un campo de pulsos eléctricos (92 °C por 90 seg y 40 kV/cm por 57 seg, respectivamente). Se presentó una reducción del 10% de vitamina C después del proceso térmico sin embargo los autores no observaron pérdidas significativas en los tratamientos del procesado con campos de pulsos eléctricos. Durante un almacenamiento a 4°C por 42 días de jugo de tomate los mismos autores encontraron mayor retención de vitamina C (20%) en el jugo procesado por campos de pulsos eléctricos en comparación con el tratado térmicamente. Yeom *et al.* (2000) también evaluaron el efecto de procesar con campos de pulsos

eléctricos sobre la calidad de jugo de naranja y compararon el tratamiento con un control tratado con pasteurización térmica, encontrando un 80% de retención de vitamina C en el jugo de naranja tratado con campos de pulsos eléctrico, mientras que el pasteurizado térmicamente sólo retuvo el 68% del valor inicial después de 10 días de almacenamiento a 4°C.

Estudios sobre los efectos del procesado con irradiación γ sobre la estabilidad de nutrientes en frutas subtropicales como mango, papaya y lichis (Beyers y Thomas, 1979) reportaron que la irradiación causa un 17% en promedio de pérdidas de Vitamina C en mangos y lichis; y un almacenamiento en condiciones de congelación (-15° C) por 12 semanas resulta en pérdidas totales del 86-88%. En cuanto al contenido de carotenos del mango, el tratamiento con irradiación γ no afectó significativamente su concentración, mientras que en la papaya se reportaron porcentajes de retención del 95, 70 y 27% después de procesado con irradiación, congelación y enlatado respectivamente. Los cambios en carotenos totales durante el almacenamiento no fueron reportados.

2.4 Enzimas Presentes en el Mango

2.4.1 Lipooxigenasas

Lipooxigenasas o lipoxidasas (LOX) (linolato: oxígeno oxidoreductasa; EC 1.13.1.12), son un grupo de enzimas que llevan a cabo la oxigenación o peroxidación de diversos compuestos insaturados, como ácidos grasos libres, triacilglicéridos, pigmentos y algunas vitaminas (carotenoides). La enzima fue caracterizada por primera vez en 1928, y fue conocida originalmente por su capacidad para decolorar alimentos que contienen carotenoides. Se encuentra en las hojas, ramas, semillas y frutos de una gran variedad de vegetales incluyendo alimentos ricos en grasas como la soya, cacahuate, trigo, maíz y cebada, y también en alimentos bajos en grasa como mango, chícharos, papas, manzanas, jitomates, alfalfa, rábanos y fresas. La enzima LOX es de gran interés por presentar una doble función en frutas y verduras, benéfica y dañina; en el caso de su acción benéfica, forma parte del metabolismo normal de estos alimentos siendo la responsable de la síntesis de diversos alcoholes y aldehídos característicos del aroma agradable en los productos frescos. Sin embargo, se dice que posee una función dañina porque después del procesado y durante el almacenamiento puede formar radicales libres, los cuales pueden

atacar otros constituyentes como vitaminas, pigmentos, fenólicos y proteínas produciendo cambios indeseables, que incluyen pérdida de nutrientes y generación de olores desagradables.

Una de las LOX más activas se encuentra en la soya, la cual tiene un peso molecular de 102,000 Da, punto isoeléctrico de 5.4, pH óptimo de 8 a 9 y número de recambio de 180,000 moléculas de sustrato oxidadas por minuto por molécula de enzima. La LOX sólo requiere una energía de activación de 4.3 kcal/mol, lo que hace que esta enzima puede llegar a actuar inclusive a bajas temperaturas. Generalmente la nomenclatura aceptada para las tres isoenzimas es LOX I, la cual tiene una actividad óptima a un pH de 9 siendo la más estable a tratamientos térmicos y utiliza como sustrato a los ácidos grasos libres teniendo baja capacidad de co-oxidar carotenos; la LOX II es más activa a pH ácido entre 5.5 – 6.5 y es activada por calcio; y la LOX III actúa a pH neutro entre 6.5 y 7, y es inhibida por calcio. Tanto LOX II como LOX III pueden oxidan a triglicéridos y presentan alta capacidad para co-oxidar carotenos (Boyes *et al.*, 1992). La cooxidación de carotenoides provoca el blanqueamiento de los mismos y esta reacción requiere de la presencia de ácidos grasos poliinsaturados y de oxígeno (Robinson *et al.*, 1995).

2.4.1.1 Mecanismo de acción

La LOX es una dioxigenasa que contiene hierro en su estructura, la cual tiene como sustratos específicos ácidos grasos que poseen unidades de *cis-cis* 1-4 pentadieno, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$, para producir hidroperóxidos de ácidos grasos insaturados conjugados. Es relevante mencionar, que la LOX no utiliza como sustratos los que tienen uniones conjugadas con una configuración *trans*, ni los monoinsaturados como el ácido oleico. Los sustratos más comunes son los ácidos linoléico y linolénico, aunque LOX II y LOX III en la presencia de ácidos grasos y oxígeno disuelto también co-oxidan carotenoides y clorofilas (Boyes *et al.*, 1992). En la Figura 2.4 se muestra la acción de LOX sobre el ácido linoleico, en este caso la enzima activada extrae un átomo de hidrógeno del carbono metilénico (C-11) y produce un radical ácido graso cuya resonancia le permite establecer dos formas, en C-9 y en C-13. Posteriormente, cada uno de estos radicales adquiere una molécula de oxígeno y se isomerizan para generar los

correspondientes hidroperóxidos *cis-trans* óptimamente activos; cuando la oxigenación se lleva a cabo en el C-9 se producen isómeros D, y cuando sucede en el C-13, se forman L (Robinson *et al.*, 1995).

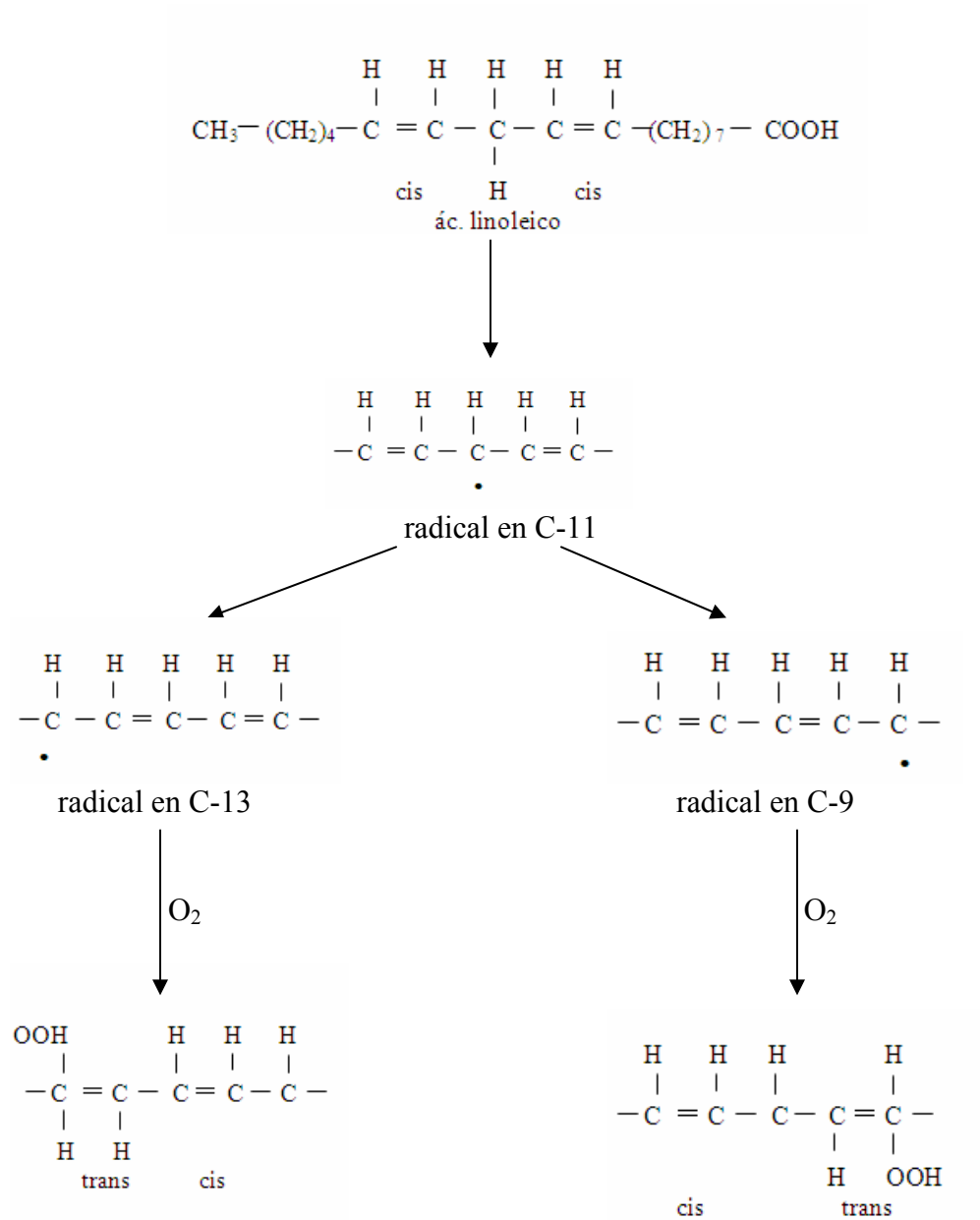


Figura 2.4 Acción de la lipooxigenasa sobre el ácido linoléico (Fennema, 1996).

2.4.1.2 Impacto de la lipooxigenasa sobre las características sensoriales y nutrimentales de productos procesados

La LOX oxida los ácidos grasos esenciales linoleico, linolénico y araquidónico produciendo radicales libres que pueden luego atacar otros constituyentes de los alimentos, entre ellos se incluyen los carotenoides, vitaminas, pigmentos (clorofila), proteínas y fenólicos provocando aromas y sabores desagradables, cambios de color y disminución del valor nutrimental. Robinson *et al.* (1995) reportaron que el hexanal derivado de la hidroperoxidación de ácido linoléico es primariamente responsable del sabor afrijolado de la harina de soya desgrasada. La LOX en cloroplastos de hojas de té degrada el ácido linoleico y linolénico a hexanal y cis-3 hexanal, respectivamente, para después transformarlos en trans-2-hexanal que es uno de los compuestos comúnmente encontrados en los volátiles de los alimentos oxidados. Debido a la acción de LOX se han detectado sabores indeseables como a hierbas, heno, pintura, añejo y oxidado han sido detectados como sabores indeseables. Adicionalmente, su interacción con aminoácidos esenciales bajan la calidad y funcionalidad de las proteínas (Ludikhuyze *et al.*, 2003).

2.4.1.3 Estabilidad de la lipooxigenasa al procesado con alta presión hidrostática y durante el almacenamiento

Shook *et al.* (2001) realizaron un estudio en tomate cortado en cubos para evaluar el efecto de altas presiones sobre la actividad de LOX, encontrando que se logra una inactivación total de esta enzima a presiones superiores a 800 MPa y a 600 MPa con una temperatura de 45°C durante 5 minutos.

En alimentos procesados por HHP en los cuales no se utilizan combinaciones de temperaturas con presiones elevadas no se puede lograr una completa inactivación de LOX. La actividad residual de LOX puede provocar tres efectos detrimentales en alimentos procesados con HHP que incluyen la destrucción de ácidos grasos esenciales (ácidos linoleico, linolénico y araquidónico). Adicionalmente la formación de compuestos volátiles tales como aldehídos, cetonas y alcoholes como resultantes de la degradación de los hidroperóxidos formados primariamente, provocando el desarrollo de sabores desagradables. Dichos productos han sido caracterizados sensorialmente como los responsables del sabor a heno en frijoles y guisantes, lo cual se considera negativo

debido a que la LOX continua su acción aún a temperaturas bajas de almacenamiento (por ejemplo, refrigeración a 4 °C). Finalmente el tercer aspecto es el nutricional, los radicales libres también pueden dañar otros compuestos, incluyendo vitaminas y proteínas, resultando en pérdida de nutrientes y cambios en color (Ludikhuyze *et al.*, 1998).

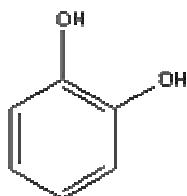
2.4.2 Polifenoloxidasas

La polifenoloxidasas (PPO) es una oxidoreductasa que provoca el oscurecimiento o pardeamiento de ciertos alimentos de origen vegetal que han sufrido daños físicos y que exponen su tejido al oxígeno. Este cambio no se efectúa en células intactas debido a que existe un microambiente anaeróbico dentro del fruto que inhibe su mecanismo de acción. Además la enzima y el sustrato se encuentran en compartimientos celulares separados que no permiten llevar a cabo la reacción en el estado intacto del producto. En muchos productos, como café, té y especies de uvas, la acción controlada de PPO es deseable, pero en otros productos es negativa, como es el caso del aguacate, plátano, etc. La PPO se conoce con diferentes nombres, entre ellos fenoloxidasas, tirosinasa, catecolasa, polifenolasa y fenolasa; su clasificación numérica es EC. 1.10.18.1 y su nombre sistemático es *o*-difenoil-oxígeno-oxidoreductasa. La enzima es abundante en frutas como la pera, manzana, durazno, plátano, aguacate y fresa entre otras, pero no en productos más ácidos como lima, toronja, naranja, melón, limón y otros. En muchos hongos como *Agaricus bisporus*, se encuentra tanto en forma activa como latente y presenta una elevada actividad (Badiu, 1994).

2.4.2.1 Mecanismo de acción

La PPO es una enzima que contiene cobre en su estructura y su actividad depende de la presencia de oxígeno. La enzima PPO cataliza dos diferentes reacciones entre ellas la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa) y la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (actividad difenolasa), las cuales son posteriormente polimerizadas a pigmentos rojo, café o negro (Espín *et al.*, 1997). Dentro de los monofenoles y *o*-difenoles más comunes que utiliza PPO como sustrato destacan la

tirosina en la papa, los flavonoides y los taninos en el café y el cacao, las antocianinas de diferentes frutas, el ácido clorogénico en la manzana y la pera, así como el ácido cafeico, la 3,4- dihidroxifenilalanina (L-dopa), la dopamina, el p-cresol, la adrenalina, la catequina o catecol y otros (Figura 2.5) (Aguilar, 2003).



Catecol

Figura 2.5. Compuesto fenólico utilizado comúnmente como sustrato por la polifenoloxidasasa (Aguilar, 2003).

La PPO requiere los iones cobre como cofactor, ya sea en su estado monovalente como ocurre con el champiñón, o bien, divalente, como en las papas; su pH óptimo de actividad es de 5 a 7 y se inhibe completamente a pH menores de 3.0, aunque en la mayoría de los casos acidular productos a estas condiciones resulta poco práctico ya que esto acarrea el deterioro de las propiedades sensoriales y estabilidad del alimento (Espín *et al.*, 1997).

2.4.2.2 Impacto de la polifenoloxidasasa sobre las características sensoriales y nutrimentales de productos procesados

Los productos tratados con HHP retienen su frescura original y contenido de vitaminas más que otros tratados por calor, sin embargo, las reacciones de oscurecimiento enzimático parecen ser activadas por el tratamiento de presurización (Shimada *et al.*, 1990; Eshtiagui y Knorr, 1993). Esta respuesta de oscurecimiento es un resultado de estrés oxidativo. Después del tratamiento de presión, hay un incremento de la actividad enzimática, aunque la inactivación de enzimas va a depender del nivel de presión usada (Préstamo y Arroyo, 1999). Adicionalmente, el oscurecimiento causado por PPO

frecuentemente va acompañado de pérdida de vitamina C, en un amplio rango de vegetales, frutas y jugos (Robinson *et al.*, 1995).

2.4.2.3 Estabilidad de la polifenoloxidasas al procesado con alta presión hidrostática y durante el almacenamiento

La presión requerida para la inactivación de PPO sobrepasa la presión necesaria para la inactivación de células vegetativas microbianas. De cualquier modo la actividad de PPO después de tratamientos con HHP depende del tipo específico de fruta o vegetal. Los efectos de HHP sobre las enzimas dependen del tipo, naturaleza de los sustratos, presión, temperatura y tiempo de procesado (Paulo *et al.*, 1999). Existen diversos estudios sobre los efectos de altas presiones sobre la actividad de PPO. Guerrero-Beltrán *et al.* (2005) reportaron que una presión mayor a 700 MPa es requerida para la inactivación total de PPO y se requieren presiones por arriba de 900 MPa por alrededor de 270 min para la reducción de un logaritmo de actividad de PPO en extractos de PPO de aguacate. En el trabajo de Préstamo y Arroyo (1999), los autores reportaron que se retiene cerca del 40% de la actividad de PPO aún a 800 MPa por 10 minutos. Así mismo, Paulo *et al.* (1999) reportaron que hay una reducción notable en actividad inicial de PPO cuando es combinada con otro factor efectivo para controlar la actividad enzimática, como calor, bajo pH, ciertos aditivos (ejemplo: ácido ascórbico, cisteína), blanqueado, actividad acuosa, elevar temperaturas durante el tratamiento de presión, o bien, refrigeración durante el almacenamiento. Guerrero-Beltrán *et al.* (2005) realizaron un estudio sobre la evaluación del efecto de HHP (379 a 586 MPa) y agentes antimicrobianos adicionados a puré de mango (cisteína o ácido ascórbico), obteniendo resultados de inactivación en la actividad inicial de PPO en mango procesado por HHP de 93.8 ± 2.3 EAU (Unidad de Actividad Enzimática) a 69.5 ± 10.6 EAU (fracción = 0.74 ± 0.11), sin embargo no reportaron los efectos de la actividad de PPO durante el almacenamiento.

2.5 Vida Útil Sensorial de Alimentos

La evaluación sensorial es la clave para determinar la vida útil de los productos alimenticios que son microbiológicamente estables como la mayonesa y las galletas, sin embargo sufren cambios no deseables en sus propiedades sensoriales. Se han reportado diversas metodologías que permiten estimar la vida útil sensorial de alimentos microbiológicamente estables. Una de las principales metodologías utilizada para determinar vida útil de alimentos es el análisis de supervivencia, que es una rama de la estadística que se aplica principalmente a estudios clínicos, epidemiológicos, biológicos y estudios de confiabilidad. Esta metodología permite determinar la vida útil de un alimento por medio de los resultados obtenidos de consumidores cuando se les pregunta si aceptarían o rechazarían muestras con diferentes grado de almacenamiento (Gámbaro *et al.*, 2005).

Tradicionalmente las metodologías de determinación de vida útil sensorial de alimentos se han centrado en el producto. Por ejemplo O'Connor-Shaw *et al.* (1994) reportaron que la vida útil de kiwi procesado mínimamente y almacenado a 4 °C fue de 2 días, basado en cambios de sabor y textura medidos con un panel sensorial entrenado. Sin embargo cabe la posibilidad de que algunos consumidores de el kiwi probablemente lo aceptarían almacenado por 2 días y es probable que otro grupo de consumidores lo hubieran rechazado almacenado solamente por 1 día. Así, desde el punto de vista sensorial, los alimentos no tienen vidas útiles propias, ellas dependerán de la interacción del alimento con el consumidor. Hough *et al.* (2003) introdujeron la metodología de análisis de supervivencia para la determinación de la vida útil sensorial de alimentos, siendo yogur el primer alimento analizado por estos autores. En este estudio, 50 consumidores probaron 7 muestras de yogur con diferentes tiempos de almacenamiento y contestaron a la pregunta de si consumirían el producto o no. La información recolectada fue suficiente para modelar la probabilidad de que los consumidores acepten los productos con diferentes tiempos de almacenamiento con ayuda de programas especializados que aplican la estadística de supervivencia entre ellos el S-plus (S-PLUS, Insightful Corp., Seattle, Washington, E.U.A.) y con ello lograr la estimación de la vida útil del yogurt. Curia *et al.* (2005) también utilizaron la metodología de análisis de supervivencia para determinar la vida útil sensorial de yogures comerciales de Argentina,

donde las muestras fueron examinadas entre 0 a 84 días de almacenamiento por consumidores quienes expresaron su aceptabilidad o rechazo por cada muestra, concluyendo que dichos yogures tienen una vida útil en un intervalo de 28 y 41 días. Así mismo, Salvador *et al.* (2006) emplearon el análisis de supervivencia para determinar la vida útil sensorial de pan integral. En su estudio utilizaron 50 consumidores entre una edad de 25 a 50 años, se asignaron a cada uno de ellos 7 muestras de pan con diferentes tiempos de almacenamiento y se les pidió que opinaran sobre el grado de aceptabilidad para cada una de las muestras utilizando una escala hedónica, así mismo, contestaron si consumirían o no el producto. Con dichos datos los autores determinaron que la vida útil del pan integral evaluado fue de 11 y 20 días utilizando una probabilidad de rechazo del 25 y 50% respectivamente. Estas mismas probabilidades de rechazo fueron consideradas por Gámbaro *et al.* (2005) y Gámbaro *et al.* (2006) donde estimaron la vida útil de galletas alfajor y alimentos de manzana para bebés, respectivamente.

La estadística de supervivencia únicamente nos permite conocer la vida útil sensorial de los alimentos, sin embargo cuando se desean conocer los cambios sensoriales que están ocurriendo en el alimento a través del tiempo es necesario utilizar otras metodologías haciendo uso de paneles entrenados. Cuando se desea conocer la magnitud del cambio necesario en un atributo que modifica la aceptabilidad del producto se utilizan métodos de modelación mediante el uso de paneles entrenados y consumidores. Adicionalmente, mediante la correlación de los datos sensoriales con los datos obtenidos de variables fisicoquímicas del producto, se puede obtener información adicional sobre el origen de los cambios sensoriales observados.

Garitta *et al.* (2004) realizaron un análisis descriptivo por medio de un panel entrenado para determinar los descriptores críticos (definidos como descriptores de cambio durante el almacenamiento) del dulce de leche durante el almacenamiento y posteriormente utilizar la metodología de punto de corte para determinar su vida útil sensorial. Esta metodología consiste en que una vez que se conocen los descriptores críticos con ayuda del panel sensorial entrenado, en muestras frescas se simulan individualmente una serie de intensidades de cada descriptor. Posteriormente los miembros del panel entrenado asignan a las muestras simuladas un valor de intensidad en una escala de 0 a 100. Las muestras con diferentes intensidades de cada descriptor son evaluadas por los

consumidores los cuales asignan a las mismas valores de aceptabilidad. Posteriormente con los datos de aceptabilidad de consumidores se determina el punto de corte de cada descriptor (punto de corte es el límite máximo de deterioro antes que el consumidor modifique su aceptabilidad). Finalmente conociendo el punto de corte se realiza una regresión lineal de la intensidad del descriptor crítico (asignada por un panel entrenado) contra el tiempo para estimar el tiempo en que los descriptores críticos alcanzaron el punto de corte. En el estudio de Garitta *et al.* (2004) los descriptores críticos determinados fueron sabor plástico, sabor a quemado, color oscuro y untabilidad. Siendo el sabor a plástico el descriptor que alcanzó primero el punto de corte, teniendo una vida útil de 61 a 134 días a una temperatura de 25°C. Cabe mencionar que el descriptor no necesariamente tiene que ser un defecto, también puede ser un cambio positivo que se genere durante el almacenamiento.

La información bibliográfica consultada sobre metodologías para la determinación de VUS sugiere que un panel sensorial entrenado es la herramienta más apropiada para medir atributos analíticos como intensidad de color o nivel de dureza, mientras un panel de consumidores es la herramienta más apropiada para determinar cuando un alimento llega al final de su vida útil. Adicionalmente, se considera una regla básica en la determinación de vida útil sensorial de alimentos no pedirle a un panel entrenado que responda por aceptabilidad y no pedirle a un panel de consumidores que realice un análisis descriptivo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras utilizadas fueron procesadas por una división de AVOMEX Inc. (Keller, T.X., E.U.A.) llamada Fresherized Foods Inc. (Sabinas, Coahuila, México). El detergente Alpha 2000 utilizado para el lavado de mangos se obtuvo de la compañía Rochester Midland Corporation (Rochester, N.Y., E.U.A.). Los medios utilizados para los análisis microbiológicos se compraron de Merck (Darmstadt, Germany) y las placas estériles desechables de la marca Corning (Corning, NY, E.U.A.). Los buffers de calibración del potenciómetro fueron obtenidos de J. T. Baker S. A. de C. V. (Xalostoc, Edo. México, México). El fosfato de sodio usado para el buffer de extracción y ensayo de LOX, el hidróxido de sodio utilizado para la preparación del sustrato de LOX, acetona, cloruro de sodio, éter de petróleo, éter etílico, hidróxido de potasio, etanol absoluto y ácido ascórbico usados para la extracción y saponificación de carotenoides fueron obtenidos de Desarrollo de Especialidades Químicas (San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México). El detergente, Triton X-100 se obtuvo de la empresa United Status Biochemical Corp. (Cleveland, OHIO, E.U.A.). El Tween 20, ácido linoleico, y estándares de β -apo-8'-carotenal, todos-trans- β -caroteno y luteína se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO., E.U.A.). El hidroxitolueno butilado (BHT) se obtuvo de Spectrum Quality Products, Inc. (New Brunswick, N.J., E.U.A.). Para la extracción y análisis de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se utilizaron los solventes metil-ter-butil-éter y agua grado HPLC de Fisher Scientific Int. (Winnipeg, MB., Canadá), metanol de Fermont-Productos Químicos Monterrey, S. A. de C. V. (Monterrey, Nuevo León, México), isopropanol marca Omnisolv (Gibbstown, NJ, Darmstad, Germany). Para el estudio de vida útil se utilizó fructosa de la marca D'frut (Santa Catarina, Nuevo León, México) y galletas habaneras sin sal de Gamesa S.A. de C.V.(San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México).

3.1 Materiales y Procesado con Alta Presión Hidrostática

Para la preparación de las muestras para el procesado se utilizó mango var. Tommy Atkins, procedente de los estados de Oaxaca y Chiapas, México y con un índice

mínimo de sólidos solubles de 13 °Brix. Los mangos se lavaron con detergente alcalino Alpha 2000 y agua potable con la finalidad de reducir carga microbiana y eliminar suciedades del fruto. Una vez lavados los mangos se rebanaron en mitades y con la ayuda de un cucharón se extrajo la pulpa de cada una de ellos y se utilizó una cortadora manual elaborada en la empresa (Fresherized Foods Inc., Sabinas, Coahuila, México) para obtener los cubos de mango (aproximadamente 2.5 x 2.5 cm). En el área de proceso de la planta se realizó el envasado del fruto, colocando de forma manual aproximadamente 200 g en envases compuestos de una película multilaminada de 7 capas (Winpak Ltd., Winnipeg, Manitoba, Canadá). El envase utilizado fue una bolsa termoformada con tapa termosellada, las dimensiones del envase fueron 14 cm de largo, 12.6 cm de ancho y 3 cm de altura, 0.0747 ± 0.00416 mm de grosor en la tapa del envase y 0.1083 ± 0.02036 mm de grosor en el cuerpo del envase. Los polímeros obtenidos tentativamente por espectrofotometría de infrarrojo medio (MIR) fueron en 5 de las 7 capas del envase poliéster (PET), polipropileno (PP), poliamida (PA), etil vinil alcohol (EVOH) y polietileno de alta densidad (PEAD), o bien, otra composición tentativa podría ser PET, PP, PA, EVOH, PVDC (cloruro de polivinilideno) y PEAD en 6 de las 7 capas del envase. Las dos composiciones tentativas de polímeros del envase poseen una permeabilidad al oxígeno de ≤ 1 cc/unidad de área/día/espesor/diferencia de presión, lo cual hace prácticamente impermeables al oxígeno. Con el objetivo de excluir el oxígeno las muestras se envasaron al vacío a -20 pulg Hg, utilizando una envasadora Multivac R230 serie 542 (Multivac, Wolfertschwenden, Germany). Se separaron aproximadamente 12 muestras envasadas como controles sin procesar con el propósito de evaluar el efecto del procesado con HHP. Antes de llevar a cabo la presurización las muestras se enfriaron por un tiempo de 20 minutos aproximadamente en túneles de agua fría a 1 – 3 °C. Las muestras se presurizaron a 86,000 psi (600 MPa) por un tiempo de 3 minutos, en un equipo de presurización 215L ULTRA (Avure Technologies, Kent, WA., E.U.A.), utilizando agua purificada como medio de presurización. Posteriormente las muestras se introdujeron de nuevo a los túneles de enfriamiento para la eliminación del calor adiabático producido por la presurización (3 °C por cada 100 MPa aplicados de presión). Las muestras procesadas se almacenaron a 4 °C en un refrigerador (TOR REY, Monterrey, Nuevo León, México) durante 40 días, y se muestrearon cada 4 días para la

realización de mediciones fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales, utilizando un total de 132 bolsas de 200 g de las cuales 33 bolsas se utilizaron para los análisis microbiológicos, 33 para mediciones fisicoquímicas y 66 para las pruebas de evaluación sensorial.

3.2 Análisis Microbiológicos

3.2.1 Determinación de bacterias mesofílicas aeróbicas

Para la determinación de bacterias mesofílicas aeróbicas se prepararon las muestras y se hicieron las diluciones pertinentes de acuerdo a la norma NOM-110-SSA1-1994 (Secretaría de Salud, 1994a). Se pesaron muestras de mango (11 g) en bolsas de plástico estéril y se les adicionó una solución de fosfato (99 mL), obteniéndose una dilución 1:10. Una vez preparadas las diluciones las cuentas de bacterias aeróbicas se realizaron de acuerdo al método reportado en la norma NOM-092-SSA1-1994 (Secretaría de Salud, 1994b). En las cajas Petri, se agregaron alícuotas de las diferentes diluciones (1 mL) y se adicionó el medio de cultivo Agar Triptona-Extracto de Levadura (12 a 15 mL). Las cajas se mezclaron mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás hacia adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio cuidando que el medio no contaminara las cubiertas de las cajas, las cuales se dejaron solidificar por 5 minutos. Las cajas se incubaron en posición invertida (la tapa hacia abajo) por 48 ± 2 h a 35 ± 2 °C y se incluyó una caja Petri sin inóculo preparada como testigo de esterilidad. Para realizar las cuentas totales de bacterias mesofílicas aeróbicas se tomaron las lecturas de las cajas que contuvieron de 25 a 250 UFC (unidades formadoras de colonias) para minimizar los errores en la cuenta.

3.2.2 Determinación de hongos y levaduras

Para la determinación de hongos y levaduras se prepararon las muestras de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994 (Secretaría de Salud, 1994a), la cual fue descrita en el apartado anterior. Para la cuenta total de hongos y levaduras se siguió la norma NOM-111-SSA1-1994 (Secretaría de Salud, 1994c). Se colocaron por duplicado muestras

líquidas directas o de la dilución 1:10 (1 mL) en cajas Petri utilizando una pipeta estéril. El medio de agar papa dextrosa acidificado a pH de 3.5 (15 a 20 mL) se vertió en las cajas Petri. Las cajas se mezclaron cuidadosamente con 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio cuidando que el medio no mojara la cubierta de las cajas. Las cajas se dejaron solidificar por 5 minutos y se incubaron en posición invertida (la tapa hacia abajo) por 3, 4 y 5 días a 25 ± 1 °C. Para realizar las cuentas de hongos y levaduras se seleccionaron aquellas placas que contuvieron entre 10 y 150 colonias. Se preparó una caja Petri control con 15 mL de medio para verificar la esterilidad.

3.3 Mediciones Físicoquímicas

3.3.1 Determinación de humedad

Se realizaron mediciones de humedad en las muestras presurizadas y durante el almacenamiento siguiendo el método 22.008 de la AOAC (1965). Se utilizó un horno de convección a 135 °C, el cual fue precalentado previamente al análisis, se utilizaron cápsulas de aluminio desechables las cuales fueron llevadas hasta peso constante. Se pesaron las muestras homogenizadas (2 g) en las cápsulas de aluminio para cada una de las determinaciones y se introdujeron en el horno de convección por un lapso de 2 horas aproximadamente hasta llevar las muestras a peso constante con un cambio no mayor a 0.0001 g.

3.3.2 Determinación de color instrumental

Las determinaciones de los cambios de color instrumental a través de la vida útil del mango fueron realizadas con un colorímetro Minolta Chroma Meter CR-300 Series (Minolta Co. Ltd., Osaka, Japón) en la escala CIE Lab y CIE*C*h con una fuente de iluminación D65 y un observador estándar a 10°, utilizando un plato de calibración blanco como fondo reflejante para las celdas. Las muestras se colocaron en celdas de aproximadamente 8 mL. Los parámetros de color instrumental a medir incluyeron

Luminosidad (L); escala roja-verde (+a = rojo, -a = verde); escala amarillo-azul (+b = amarillo, -b = azul); ángulo de color (h*); y saturación de color (C*).

3.3.3 Determinación de pH

Las mediciones de pH se realizaron con un potenciómetro Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, CA., E.U.A.). La determinación de pH se realizó introduciendo el electrodo directamente en la muestra de mango sin procesar y en las muestras con diferentes tiempos de almacenamiento.

3.3.4 Medición de actividad enzimática de la lipooxigenasa

3.3.4.1 Preparación de la muestra

Para la preparación de las muestras para la determinación de LOX se preparó un buffer de fosfato de sodio 0.1 M ajustado a un pH de 6 y con el detergente Triton X-100 (0.2%) necesario para la solubilización de la enzima. Se pesaron las muestras de pulpa de mango procesadas por HHP (2 g), se les agregó buffer de fosfatos (2 mL) y se homogenizaron en un mortero por 1 minuto. Posteriormente los homogenizados (1 mL) fueron transferidos a tubos Eppendorf de 1.5 mL. Las muestras se centrifugaron en una centrífuga Eppendorf 5415C (Eppendorf, Hamburg, Alemania) por un tiempo de 5 minutos a una velocidad máxima (16,100 xg). Los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos Eppendorf y se centrifugaron de nuevo por 5 minutos. Las extracciones y centrifugaciones se llevaron a cabo a 4 °C dentro de una cámara refrigerada.

3.3.4.2 Ensayo enzimático de la lipooxigenasa

Para el ensayo espectrofotométrico de la LOX se preparó como sustrato una solución de ácido linoleico (140 mg) y Tween-20 (280 mg), siendo ambos mezclados en una pipeta con agua bidestilada (5 mL). La solución resultante se clarificó por la adición de hidróxido de sodio 1N (0.6 mL) y se aforó en un matraz de aforación de 25 mL. El sustrato preparado se almacenó bajo nitrógeno en pequeñas alícuotas (1 mL) y se congeló a -80 °C en un ultracongelador de Kendro Laboratory Products (Asheville, NC, E.U.A.).

La mezcla final para el ensayo espectrofotométrico estuvo formada por la solución amortiguadora de fosfato de sodio 1 N (1 mL) y la solución de sustrato de ácido linoleico (20 μ l) en una celda de cuarzo, obteniéndose una concentración del sustrato en el ensayo de 0.5 mM. La reacción se inició con la adición del extracto de LOX (25 μ l) y se monitorearon los cambios de absorbancia a 234 nm por 3 minutos en intervalos de 10 segundos utilizando un espectrofotómetro Beckman modelo DU 650 (Beckman Instruments, Fullerton, CA., E.U.A.). Las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. La actividad de LOX se expresó en mmol/g/min en base húmeda del producto.

3.4 Determinación y Cuantificación de Carotenoides por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

3.4.1 Extracción de carotenoides

Para la extracción de carotenoides se hicieron algunas modificaciones de los métodos reportados por Howard *et al.* (2000) y Li *et al.* (2005). Cabe mencionar que a todos los solventes utilizados en la extracción se les adicionó BHT (0.1%) como antioxidante, y se trabajó en oscuridad con la finalidad de evitar la degradación e isomerización de los carotenoides. Se pesaron las muestras de mango (2 g) para el análisis, a las cuales se les añadió β -apo-8'-carotenal (8 ppm) como estándar interno. Posteriormente se hicieron cinco extracciones exhaustivas con acetona hasta lograr la extracción total del color amarillo de la pulpa usando un homogenizador Tissue.Teator™ (Biospec Products CTS, Inc., WI, E.U.A.) a 20,000 rpm por 1 min para cada extracción y efectuando filtrados con vacío utilizando papel filtro Wathman No. 1 (New Jersey, E.U.A.). Los extractos se evaporaron hasta sequedad en un concentrador centrífugo con vacío SpeedVac® SC210A (Thermo Electron Corporation, Milford, MA., E.U.A.), el cual se operó a una temperatura media ($T= 37^{\circ}\text{C}$) por un tiempo aproximado de 4 horas. Posteriormente los extractos secos se saponificaron durante 10 horas a temperatura ambiente con hidróxido de potasio 9 M en una solución al 50% de etanol-agua en sistemas cerrados y con nitrógeno en espacio de cabeza. Las muestras saponificadas se transfirieron a embudos de separación y se realizaron cinco extracciones en serie con una

mezcla 50:50 (v/v) de éter de petróleo: éter etílico (8 mL). Posteriormente se recuperaron las fases etéreas y se hicieron lavados con agua en los embudos de separación hasta llegar a la neutralidad, utilizando fenolftaleína como indicador. En los casos en los cuales se formaron emulsiones entre la fase etérea y acuosa, se adicionó agua bidestilada (10 mL) y NaCl al 30% (0.5 mL) para romper la emulsión, repitiendo el procedimiento hasta no observar turbidez en la interfase. Una vez alcanzada la neutralidad, las fases etéreas se recuperaron y se evaporaron en el concentrador centrífugo con vacío a temperatura media ($T= 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 3 horas. Al final de la evaporación en los extractos se observaron unas pequeñas gotas de agua las cuales se llevaron hasta sequedad con flujo de nitrógeno. Finalmente las muestras se resuspendieron en isopropanol grado HPLC (1 mL) y se hicieron pasar a través de acrodiscos de polietilen tereftalato (PTFE) de $0.45\text{ }\mu\text{m}$.

3.4.2 Análisis por cromatografía líquida de alta resolución

Para el análisis cualitativo y cuantitativo de carotenoides por HPLC se siguió la técnica empleada por Marx *et al.* (2000) con algunas modificaciones. Se utilizó un sistema de HPLC (Waters Co., Milford, MA., E.U.A), equipado con un detector de fotodiodos Waters 2996, automuestreador Water 717 plus y una bomba binaria. La separación cromatográfica fue desarrollada usando una columna en fase reversa con C_{30} como fase estacionaria (YMC carotenoid, Milford, Massachusetts, E.U.A.) y con dimensiones de $250\text{ mm} \times 4.6\text{ d. i., } 5\text{ }\mu\text{m}$. En este método se emplearon dos fases móviles, la fase A consistió de metanol:metil-ter-butil-éter (MTBE): agua (81:15:4 v:v) y la fase B de MTBE:metanol:agua (90:6:4, v:v). La separación de carotenoides se llevó a cabo por medio de un gradiente lineal de 100% de fase A a 75% de fase B en un tiempo de 90 minutos a una velocidad de flujo de 1 mL/min . Para regresar a las condiciones iniciales de 100% de fase A y 0% de fase B se estableció un gradiente en reversa de 10 minutos y las condiciones finales se mantuvieron por 40 minutos para estabilizar a la columna, resultando en un tiempo total de corrida de 140 minutos. El programa de elución con gradiente utilizado para lograr la separación cromatográfica se detalla en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Programa de elución con gradiente para separación cromatográfica de carotenoides.

Tiempo (min)	Fase A ¹ (%)	Fase B ² (%)
0	100	0
90	25	75
100	100	0
140	100	0

¹Fase A, metanol:metil-ter-butil-éter(MTBE):agua (81:15:4,v:v);²Fase B, MTBE:metanol:agua (90:6:4, v:v).

3.4.3 Cuantificación de carotenoides

Para la cuantificación de carotenoides se realizaron curvas de calibración con una mezcla de estándares, la cual estuvo formada de todos-trans- β -caroteno, β -apo-8'carotenal, luteína. Se prepararon soluciones base de los estándares de todos-trans- β -caroteno y β -apo-8'carotenal en hexano y la de luteína en etanol absoluto. Se verificó espectrofotométricamente la concentración de cada una de las soluciones base utilizando el coeficiente de extinción para cada uno de los estándares, $\epsilon^{1\%}_{1\text{cm}} = 2560$ a 450 nm para todos-trans- β -caroteno, $\epsilon^{1\%}_{1\text{cm}} = 2470$ a 447 nm para β -apo-8'carotenal y $\epsilon^{1\%}_{1\text{cm}} = 2550$ a 445 nm para luteína. Una vez conocida la concentración de cada uno de los estándares se procedió a la preparación de una segunda solución base compuesta por una mezcla de estándares con una concentración de 15 ppm para cada uno de ellos. Posteriormente se evaporaron los solventes de la mezcla de estándares hasta sequedad en un concentrador centrífugo con vacío y los compuestos se resuspendieron en isopropanol grado HPLC. A partir de dicha solución base se realizaron diluciones para obtener concentraciones finales de 12, 9, 6, 4, 3, 2, 1 y 0.5 ppm, las cuales se pasaron por acrodiscos PTFE de 0.45 μm antes de ser inyectadas en el HPLC. La curva de calibración se realizó en duplicado, una antes de las inyecciones de las muestras y otra al final de las inyecciones. Las curvas de calibración para los tres estándares utilizados se muestran en el Anexo 3.

3.4.4 Procedimiento de identificación tentativa de los carotenoides

La identificación de los carotenoides de las muestras analizadas, se realizó por tres procedimientos diferentes dependiendo de la información existente, el método a) consistió en la identificación por interpretación espectral de los máximos de absorción en el espectro UV-Visible y comparación con las máximas reportadas en bibliografía (Chen *et al.*, 1995; Mercadante *et al.*, 1997; Pott *et al.*, 2003a); el procedimiento b) consistió en la identificación por comparación de tiempo de retención y espectro de absorción con estándares comerciales; el procedimiento c) consistió en la identificación por orden de elución y aproximación con los tiempos de retención reportados en bibliografía bajo condiciones cromatográficas similares (Meléndez-Martínez *et al.*, 2005; Waters, 2006).

3.5 Análisis Estadístico de Datos Físicoquímicos y Microbiológicos

El diseño experimental consistió en la evaluación del efecto del procesado por HHP y almacenamiento a 4 °C sobre los cambios en variables de respuesta que incluyeron determinaciones de pH, color, actividad enzimática LOX, carotenoides y cuentas de microorganismos. Adicionalmente se analizó el efecto inicial del tratamiento no-térmico por medio de muestras pareadas sin presurizar y presurizadas y con la medición de las mismas variables de respuesta. El análisis de varianza (ANOVA) se realizó utilizando el paquete JMP[®] versión 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC., E.U.A.) y la separación de medias se llevó a cabo utilizando la prueba de LSD ($p < 0.05$).

3.6 Estudios de Vida Útil Sensorial

Para el estudio de VUS se utilizaron muestras de mango procesado con HHP entre 0 y 40 días de almacenamiento con intervalos de muestreo de 4 días entre cada una de las muestras. Una de las metodologías empleadas para la determinación de la VUS consistió en el análisis de los datos generados por un panel de consumidores utilizando estadística de supervivencia. Las muestras también fueron evaluadas por una segunda metodología denominada punto de corte.

3.6.1 Determinación de la vida útil sensorial por la metodología de análisis de supervivencia

Para el análisis de supervivencia se reclutaron 60 personas de la comunidad estudiantil y laboral del ITESM que consumieran mango por lo menos una vez a la semana. Para la selección de los consumidores se les pidió que llenaran una encuesta (Anexo 1), la cual permitió conocer la frecuencia de consumo de mango por cada consumidor y seleccionar a los consumidores potenciales de mango. Se les dieron a los consumidores 11 muestras de mango con 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 30, 32, 36 y 40 días de almacenamiento. Las muestras (10 g) se sirvieron en pequeños vasos de plástico, se les proporcionaron galletas habaneras sin sal y agua para enjuagar el paladar con un tiempo de espera entre cada muestra de 1 min aproximadamente. A las muestras se les asignaron números aleatorios y se pidió a los consumidores que evaluarán las muestras al azar anotando el número de la muestra en el formato que se muestra en la Figura 3.1. El formato también solicitó al consumidor que respondiera a la pregunta ¿consumiría habitualmente una muestra como la que estaba probando?, así como que indicara el nivel de aceptabilidad de la muestra en una escala hedónica del 1 al 9, en donde 9 era me gusta muchísimo y 1 era me disgusta muchísimo.

Muestra N° _____

	Me gusta muchísimo	Me gusta mucho	Me gusta moderadamente	Me gusta un poco	Ni me gusta ni me disgusta	Me disgusta un poco	Me disgusta moderadamente	Me disgusta mucho	Me disgusta muchísimo
Agrado General	9 ○	8 ○	7 ○	6 ○	5 ○	4 ○	3 ○	2 ○	1 ○

Consumiría usted habitualmente una muestra como esta?

Sí ○ No ○

Figura 3.1 Formato de evaluación para consumidores utilizado en la determinación de vida útil sensorial de mango procesado por alta presión hidrostática por análisis de supervivencia.

Los cálculos para la determinación de vida útil fueron realizados de acuerdo a la metodología para el análisis de datos de estadística de supervivencia descrita por Hough

et al. (2003). Dichos autores definieron una variable al azar T como el tiempo de almacenamiento en el cual el consumidor rechaza la muestra. La función de supervivencia $S(t)$ fue definida por los autores como la probabilidad de que un consumidor acepte un producto más allá de un tiempo t , la cual se expresa en la Ecuación [1].

$$S(t) = P (T > t) \quad \text{Ec. [1]}$$

Alternativamente, la función de la distribución acumulativa $F (t)$ (Ecuación [2]), es definida como la probabilidad de que un consumidor rechace un producto (P) antes del tiempo t como se muestra en la Ecuación [3]

$$F (t) = 1 - S(t) \quad \text{Ec. [2]}$$

$$F (t) = P (T \leq t) \quad \text{Ec. [3]}$$

Según Hough *et al.* (2003) para realizar el análisis de supervivencia los datos deben ser censurados debido a la naturaleza discreta del tiempo de almacenamiento, es decir, T nunca será observado exactamente. Por ejemplo, si suponemos que los consumidores evaluaron muestras almacenadas con tiempos a , b y c . En el caso de que el consumidor rechace la muestra en el primer tiempo de almacenamiento observado, entonces $T \leq a$, y los datos se encuentran censurados a la izquierda. Si un consumidor acepta la muestra almacenada en el tiempo a , pero rechaza la muestra almacenada en el tiempo b , entonces el tiempo de almacenamiento de probabilidad de rechazo será $a < T \leq b$, y los datos se encuentran censurados en un intervalo. Finalmente, si un consumidor acepta todas las muestras, entonces $T > c$, y los datos se encuentran censurados a la derecha. La Ecuación [4] muestra como cada tipo de censura contribuye diferentemente a la función de probabilidad (Klein y Moeschberger, 1997).

$$L = \prod_{i \in R} S (ri) \prod_{i \in L} [1 - S(li)] \prod_{i \in I} [S(li) - S(ri)] \quad \text{Ec. [4]}$$

Donde:

R= Conjunto de observaciones censuradas a la derecha,

L= Conjunto de observaciones a la izquierda,

I= Conjunto de observaciones censuradas en intervalo,

S= Supervivencia,

r= Observación censurada a la derecha,

l= Observación censurada a la izquierda,

Π = Multiplicatoria

Asumiendo una distribución normal de los datos, el uso de modelos paramétricos proporciona estimaciones más precisas de la función de supervivencia y otras cantidades de interés que estimadores no paramétricos. Sin embargo, los tiempos de supervivencia no son distribuidos normalmente y se utilizan modelos de regresión como log-lineal, log-normal, log-logístico, logístico y Weibull. Los 4 últimos modelos están representados por las Ecuaciones [5], [6], [7] y [8]

Distribución log-normal

$$S(t) = 1 - \Phi\left(\frac{\ln(t) - \mu}{\sigma}\right) \quad \text{Ec. [5]}$$

Distribución Weibull

$$S(t) = S_{sev} \frac{(\ln(t) - \mu)}{\sigma} \quad \text{Ec. [6]}$$

Distribución log-logística

$$S(t) = \frac{e^z}{\sigma t(1 + e^z)^2} \quad \text{Ec. [7]}$$

Distribución logística

$$S(t) = (1/b) * e^{[-(x-a)/b]} * \{1 + e^{[-(x-a)/b]}\}^{-2} \quad \text{Ec. [8]}$$

Donde:

$\mu = a$ = parámetro de intercepto,

$\sigma = b$ = parámetro de dispersión

S_{sev} función de la distribución del valor extremo más pequeño, $S_{sev}(w) = \exp(-e^w)$

$$z = \frac{t' - \mu}{\sigma} \quad t' = \ln(t)$$

Los datos de aceptabilidad global del producto que se obtuvieron por medio del panel de consumidores se procesaron en el programa S-PLUS versión 7.0 (Insightful Corp., Seattle, Washington, U.S.A.) el cual realizó regresiones para todos los modelos (Ec. [5], [6], [7], [8]), calculando los parámetros μ y σ para cada uno de los modelos y se seleccionó el mejor modelo con base en su coeficiente de máxima verosimilitud ($-2LL$, $-2 \cdot \log$ -coeficiente máxima verosimilitud). Con los parámetros de la función de supervivencia (μ y σ) la función de distribución ($F(t)$) puede ser definida (Ec. [2]). Para ello, la probabilidad de que un consumidor rechace un producto $F(t) = P(T \leq t)$ debe ser elegida cuando se estima la vida útil sensorial, en la literatura se observan cálculos utilizando valores de probabilidad de rechazo que varían entre 25 y 50%. Gacula y Singh (1984) utilizaron un valor nominal de vida útil de 50 % de probabilidad de rechazo; Cardelli y Labuza (2001) usaron el mismo criterio para calcular la vida útil de café. Sin embargo, en el presente estudio, la vida útil se calculó para $F(t) = 25\%$ de acuerdo a los criterios más estrictos utilizados en los trabajos de Gámbaro *et al.* (2005 y 2006).

3.6.2 Determinación de la vida útil sensorial por la metodología de puntos de corte

Las muestras almacenadas también fueron evaluadas por una segunda metodología denominada punto de corte la cual consistió en el análisis descriptivo (por un panel entrenado) con la finalidad de conocer los cambios en atributos de las muestras a lo largo del almacenamiento con el objetivo de generar los llamados “descriptores críticos del producto”. Paralelamente se evaluaron las aceptabilidades globales de muestras con diferentes intensidades de los descriptores críticos de dulzura y color por medio de un panel de consumidores. Finalmente se relacionó la aceptabilidad global de las muestras con los cambios en la intensidad de los descriptores críticos (escalados por

un panel entrenado) a lo largo de su vida útil con el objetivo de identificar el rechazo potencial del producto a un tiempo de almacenamiento específico.

3.6.2.1 Determinación de los descriptores críticos

Para la determinación de descriptores críticos de mango procesado por HHP se trabajó con el panel entrenado de Laboratorios Griffith (Santa Catarina, Nuevo León, México), el cual está constituido de 7 integrantes con al menos 20 meses de experiencia en ensayos descriptivos y discriminativos. A cada uno de los panelistas se les presentaron 6 muestras de mango con diferentes tiempos de almacenamiento (0, 8, 16, 24, 32, 40 días). Las muestras fueron codificadas con números aleatorios y se sirvieron en pares. Se pidió a cada uno de los panelistas que contrastaran las muestras para encontrar las diferencias y similitudes más marcadas entre ellas. Posterior al análisis descriptivo y por medio de la discusión con el panelista líder se llegó al consenso de que los principales descriptores críticos que cambiaron a lo largo del almacenamiento fueron dulzura, acidez, oscurecimiento, sabor maduro/fermentado.

3.6.2.2 Determinación de aceptabilidad de los descriptores de dulzura/acidez y color

Con la finalidad de simular aumentos en la intensidad del descriptor de dulzura y una menor percepción del sabor ácido, se prepararon 9 muestras fortificadas con nueve concentraciones de fructosa (Tabla 3.2). Se tomó como referencia (control positivo) una concentración 10% de fructosa (10 g fructosa/100 g de mango) y a partir de dicha concentración se realizaron diluciones para la preparación de las otras muestras con diferentes intensidades del descriptor. Los niveles de intensidad de dulzura fueron evaluados por 80 consumidores de la comunidad estudiantil y laboral del ITESM para conocer la aceptabilidad de cada uno de ellos. Se trabajó con un total de 180 consumidores, los cuales evaluaron sólo 4 muestras cada uno con diferentes intensidades del descriptor para que el paladar no se saturara pudiendo dar una respuesta errónea. El formato de evaluación se muestra en el Anexo 2. Las muestras fueron codificadas con números aleatorios para que no influyeran en su evaluación y todas las muestras estuvieron bajo las mismas condiciones de temperatura. Adicionalmente y con la

finalidad de que los consumidores limpiaran su paladar entre cada muestra se proporcionaron galletas habaneras sin sal y agua.

Tabla 3.2 Concentración de fructosa adicionada a mango procesado con alta presión hidrostática para la simulación del descriptor dulzura/acidez.

Intensidad de dulzura	mg fructosa en 100 g de mango
1	0
2	0.6
3	0.9
4	1.3
5	2
6	3
7	4.4
8	6.7
9	10

Finalmente se realizó una correlación lineal de los datos de aceptabilidad de los descriptores dulzura/acidez obtenidos del panel de consumidores contra diferentes niveles de intensidad del descriptor de dulzura/acidez (asignados por el panel entrenado a través del almacenamiento) para determinar si el descriptor específico influía en el cambio de aceptabilidad del producto por los consumidores.

Con el objetivo de evaluar la aceptabilidad del descriptor de cambio de color en mango, se realizó un diseño escalonado donde se procesaron muestras por HHP y se almacenaron a 4°C por 40 días y cada 5 días se tomaron muestras y almacenaron en un ultracongelador a -80°C para obtener un total de 9 muestras con diferentes tiempos de almacenamiento. El diseño escalonado permitió obtener en un mismo día todas las muestras con diferentes intensidades de color, las cuales fueron analizadas en una misma sesión por los consumidores. La evaluación de aceptabilidad de color se realizó con la misma metodología y formato de evaluación utilizados para el descriptor dulzura/acidez en la Sección 3.6.2.1.

El cambio en la intensidad del descriptor de color a través del almacenamiento se midió instrumentalmente con un colorímetro Minolta Chroma Meter CR-300 Series

(Minolta Co. Ltd., Osaka, Japón). Los parámetros de color instrumental evaluados incluyeron Luminosidad (L); escala roja-verde (+a = rojo, -a = verde); escala amarillo-azul (+b = amarillo, -b = azul); ángulo de color (h^*); y saturación de color (C^*). De manera similar que con el descriptor de dulzura/acidez, finalmente se realizó una correlación entre la aceptabilidad global de los consumidores por las muestras de mango procesado por HHP contra los parámetros instrumentales de color con el objetivo de identificar cambios significativos un cambio en la aceptabilidad del producto por los consumidores.

3.7 Análisis Estadístico de los Estudios de Vida Útil Sensorial

El diseño experimental consistió en la evaluación de las muestras presurizadas por HHP y almacenadas a 4°C y su evaluación por paneles entrenados y de consumidores como se describió en las secciones anteriores. Los modelos matemáticos y coeficientes de regresión (log-verosimilitud) se obtuvieron por medio del programa S-PLUS versión 7.0 (Insightful Corp., Seattle, Washington, E.U.A.). El análisis de varianza (ANOVA) se realizó utilizando el paquete estadístico JMP[®] versión 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC., EUA.), la separación de medias se llevó a cabo utilizando la prueba LSD ($p < 0.05$). Adicionalmente se realizaron correlaciones de Pearson para calcular las relaciones entre diferentes combinaciones de variables sensoriales e instrumentales.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Análisis Microbiológicos

Los alimentos procesados por HHP son considerados microbiológicamente inocuos, sin embargo la extensión de su inactivación microbiana depende de la presión ejercida, tiempo de tratamiento, carga microbiana inicial, actividad acuosa, tipo de envase, entre otros factores (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2005). En el presente estudio y con el propósito de evaluar la estabilidad microbiológica del mango procesado por HHP se realizaron análisis microbiológicos de bacterias mesofílicas aerobias totales, hongos y levaduras, siguiendo protocolos experimentales similares (Palou *et al.*, 1999; Guerrero-Beltrán *et al.*, 2005; entre otros). En el presente se realizaron análisis de bacterias mesofílicas aeróbicas en las muestras antes y después de la presurización con el objetivo de establecer la reducción ejercida por el tratamiento. Sin embargo con base en los estudios antes mencionados también se realizaron determinaciones de bacterias mesofílicas aerobias durante el almacenamiento a pesar de que las muestras fueron envasadas al vacío y el envase utilizado no era permeable al oxígeno.

Como se muestra en la Tabla 4.1, el mango fresco (antes del procesado) presentó una cuenta microbiana de 4,983 UFC/g de microorganismos mesofílicos aerobios, 13,133 UFC/g de levaduras y <10 UFC/g de hongos. El procesado con HHP (600 MPa, 3 minutos) logró una reducción de 3 logaritmos en las cuentas de bacterias mesofílicas aerobias totales, 4 logaritmos en las cuentas de levaduras y en los hongos hasta niveles por debajo del límite de detección. Guerrero-Beltrán *et al.* (2006) reportaron reducciones logarítmicas de 1.62 y 1.35 para las cuentas totales de bacterias mesofílicas aerobias y levaduras, respectivamente, después de aplicar una presión de 345 MPa por 2 segundos en puré de mango procesado por HHP. En el mismo estudio los autores reportaron que a presiones y tiempos de proceso mayores (482 o 552 Mpa de 1 a 15 minutos) los niveles de bacterias mesofílicas aerobias y levaduras se redujeron a <10 UFC/g. Diversos estudios han atribuido la inactivación microbiológica observada como efecto de la aplicación de HHP a cambios en las membranas celulares. Mañas y Pagán (2005) reportaron que la inactivación microbiológica se debe al cambio en la membrana citoplasmática como consecuencia del procesado por HHP, lo que genera un empaquetamiento más denso de

las cadenas aciladas en la bicapa lipídica de las membranas y promueve una transición de membrana de un líquido cristalino a una fase de gel. En algunos casos, además del efecto de HHP sobre la membrana, ocurren otros eventos dañinos como son la extensiva pérdida de material intracelular, pérdida de función de proteínas (coagulación proteica), inactivación de enzimas claves y cambios conformacionales en ribosomas, que conllevan a la muerte bacteriana (Mañas y Pagán, 2005).

Tabla 4.1 Efecto del procesado con alta presión hidrostática a 600 MPa por 3min sobre los niveles de microorganismos del mango var. Tommy Atkins.

Microorganismo	Proceso	Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g)
Mesofílicos Aerobios	Sin presurizar	4983 a ¹
Totales	Presurizado	40 b
Hongos	Sin presurizar	ND a
	Presurizado	ND a
Levaduras	Sin presurizar	13133 a
	Presurizado	43 b

¹Para cada tipo de microorganismo los promedios o medias con letras diferentes son significativamente diferentes (LSD Test, p<0.05). UFC/g, Unidades formadoras de colonia/gramo.

Los resultados de inactivación microbiana obtenidos concuerdan con el estudio de Alpas *et al.* (2000) quienes reportaron que en alimentos ácidos (pH <4), como es el caso del mango, los tratamientos con HHP logran la inactivación de hongos, levaduras y células bacterianas. En el caso de alimentos con bajo pH generalmente no se requieren tratamientos de presurización muy elevados para lograr la inocuidad de los mismos, sin embargo, en el presente estudio se aplicó una presión utilizada a nivel comercial (600 MPa) la cual fue seleccionada con la finalidad de reducir o inactivar al máximo posible la actividad de las enzimas endógenas del mango que pueden generar cambios en las características organolépticas y nutrimentales propias del alimento.

En la Figura 4.1 se observan las cinéticas de crecimiento microbiano del mango procesado por HHP durante un almacenamiento a 4 °C por 40 días. Las cuentas de

hongos (Figura 4.1A) no mostraron incrementos significativos durante el período evaluado. Sin embargo, en el caso de las bacterias mesofílicas aerobias (Figura 4.1B) se observó un incremento de 1 logaritmo para el día 16 de almacenamiento, el cual se mantuvo constante en los siguientes 24 días, sin embargo, los cambios no fueron estadísticamente significativos. En el caso de la cinética de crecimiento de levaduras (Figura 4.1C), la gráfica parece mostrar un incremento a partir del día 20 de almacenamiento, sin embargo las diferencias tampoco resultaron ser significativas estadísticamente. Los resultados de las determinaciones microbiológicas parecen indicar que las muestras de mango procesadas por HHP durante 40 días fueron estables para los tres tipos de microorganismos evaluados. A partir de estos resultados de estabilidad microbiológica se cuestionó la necesidad de monitorear los niveles de bacterias mesofílicas aeróbicas durante el almacenamiento dadas las condiciones de baja concentración de oxígeno dentro de los envases. Por tal motivo se realizó un análisis por triplicado de bacterias anaeróbicas (día 40 de almacenamiento) y se obtuvieron resultados por debajo de los límites de detección. Debido a que no se realizó una cinética formal de bacterias anaeróbicas psicofílicas durante el almacenamiento del producto no se puede descartar su presencia por lo cual se recomienda su estudio en estudios posteriores.

Existen diversos estudios en los cuales se reporta la estabilidad microbiológica de frutos procesados por HHP durante el almacenamiento, por ejemplo, Palou *et al.* (1999) reportaron en puré de plátano procesado por HHP que tanto la cuenta estándar de hongos como la de levaduras se mantuvo < 10 UFC/g 15 día de almacenamiento. Guerrero-Beltrán *et al.* (2005) trabajaron con puré de durazno procesado a 517 MPa por 5 min, el cual fue almacenado durante 30 días a 3 °C, encontrando que tanto la cuenta total de bacterias aeróbicas así como hongos y levaduras permanecieron por debajo de 10 UFC/g durante todo el almacenamiento. Boynton *et al.* (2002) reportaron que en mango Tommy Atkins con un tratamiento de 600 MPa la cuenta total se reduce hasta niveles por debajo de los límites de detección (0 UFC/ml) y con un almacenamiento de 5 semanas se observa una reducción de 3 logaritmos en la cuenta total al compararla con el control.

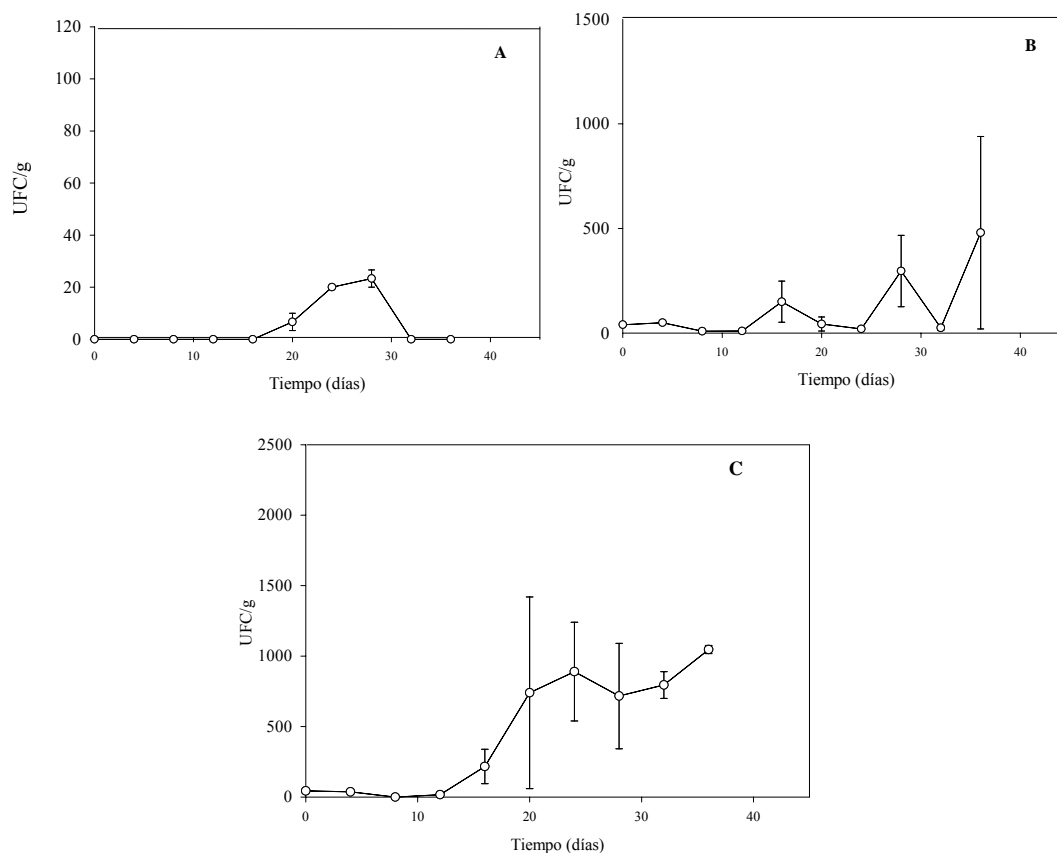


Figura 4.1 Crecimiento microbiano evaluado en mango procesado por alta presión hidrostática a 600 MPa por 3 min y almacenado a 4°C por 40 días. (A) Cuenta de hongos, (B) Cuenta de bacterias mesofílicas aeróbicas totales y (C) Cuenta de levaduras. Los valores graficados son el promedio de 3 repeticiones y las barras representan el error estándar de la media.

A pesar de que el producto fue envasado al vacío (-20 pulg Hg) es relevante mencionar que únicamente se aplicó por un tiempo de 2 segundos, lo cual podría ser insuficiente para conseguir una exclusión completa del oxígeno intracelular. Sin embargo, como se mencionó anteriormente sería recomendable que en estudios posteriores se realizaran evaluaciones de microorganismos que pueden crecer bajo condiciones de anaerobiosis y a bajas temperaturas, como lo son bacterias ácido lácticas, microorganismos psicrófilos, entre otros, con la finalidad de poder concluir con mayor

certeza que los cambios sensoriales del mango procesado por HHP durante su almacenamiento no son provocados por causas microbiológicas.

4.2 Efecto del Procesado y Almacenamiento sobre el pH

Es relevante mencionar que todas las mediciones fisicoquímicas se reportaron en base húmeda como consecuencia de que no detectaron diferencias de humedad en el producto después del procesado y durante el almacenamiento.

El pH es una característica muy sencilla de controlar y que puede proporcionar información relevante sobre los cambios fisicoquímicos que tienen lugar en la matriz del alimento (Castellanos, 2005). Como se puede observar en la Figura 4.2 existe una disminución significativa del 11% del valor de pH al procesar el mango con HHP, teniendo un valor inicial para la muestra sin presurizar 3.96 ± 0.05 y un pH de 3.54 ± 0.22 para la muestra presurizada.

La disminución de pH puede deberse a que con tratamientos por arriba de 200 MPa la pared celular es dañada y la estructura subcelular alterada, especialmente en el núcleo y mitocondrias (Préstamo y Arroyo, 1999). Los ácidos orgánicos del mango, así como de otros frutos y vegetales, se encuentran en las vacuolas y al procesar los productos con alta presión hidrostática se genera ruptura celular provocando la migración de los ácidos orgánicos solubles a la matriz del alimento (Préstamo y Arroyo, 1998), por lo tanto, la disminución de pH observada puede explicarse por dicha migración. Por otro lado, una vez procesado el alimento, el pH se mantiene constante a lo largo de los 40 días de almacenamiento a 4°C. Esto último coincide con los trabajos de Gil *et al.* (2006), quienes al estudiar los cambios de mango en cubo procesado y mango entero durante 9 días de almacenamiento a 5°C no encontraron diferencias significativas en cambio de pH.

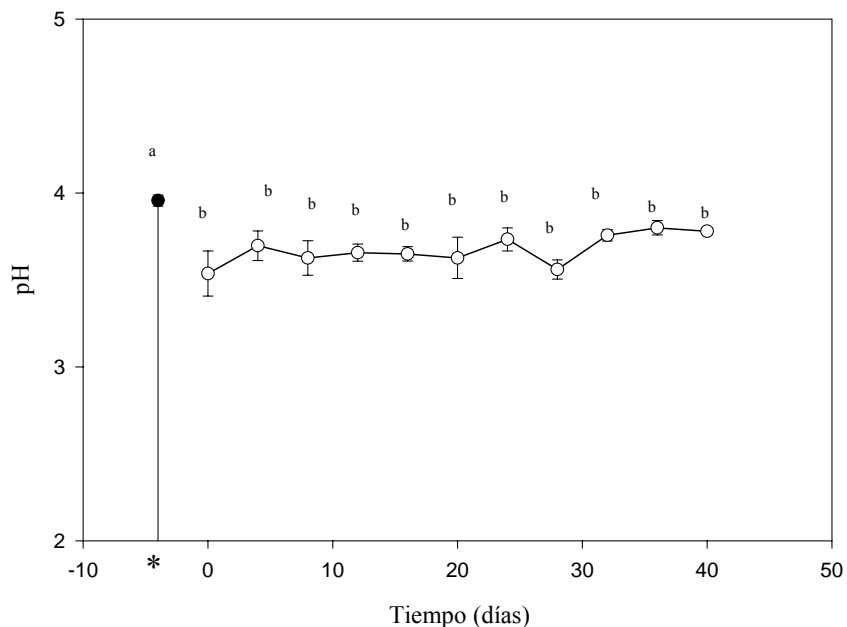


Figura 4.2 Cambios en el pH de mango procesado por alta presión hidrostática a 600 MPa por 3 min y almacenado a 4°C por 40 días. Los valores graficados son el promedio de 3 repeticiones y las barras representan el error estándar de la media. *Muestra sin presurizar. Las letras diferentes indican que los tratamientos son significativamente diferentes. (LSD test, $P < 0.05$).

4.2 Efecto del Procesado y Almacenamiento sobre la Actividad de Lipooxigenasa

La efectividad de los tratamientos de HHP sobre la inactivación enzimática depende de las variables de tratamiento utilizadas (presión, tiempo, temperatura, disponibilidad de oxígeno), de la composición del alimento y del tipo de enzima (Cano *et al.*, 2005). Sin embargo, la información disponible sobre enzimas relacionadas con la pérdida de nutrientes y calidad de alimentos como el mango procesado por HHP es escasa, por lo cual se consideró relevante conocer el comportamiento de una enzima LOX posterior al procesado y durante el almacenamiento.

En la Tabla 4.2 se muestra que el efecto inicial de HHP en la actividad enzimática de LOX en mango no muestra diferencia significativa. LOX II es la isoenzima que está presente en la mayoría de frutas y vegetales, co-oxidando principalmente los pigmentos (vitaminas) presentes en los mismos. El pH de actividad óptima para LOX II es de 5.5 a 6.5. El pH de la variedad de mango utilizada en este estudio es 3.96 ± 0.05 sin presurizar y 3.54 ± 0.22 para la muestra presurizada, lo que indica que ambas muestras

presentan más de 2 unidades por debajo del pH óptimo de actividad de esta enzima y de acuerdo a lo reportado por Cano *et al.* (2005) bajo estas condiciones se logra una muy baja actividad de LOX. En el trabajo de Boyes *et al.* (1992), los autores reportan que la LOX de la fruta de kiwi utilizando como sustrato ácido linolénico o ácido linoleico no presenta actividad a pH menores de 4.5, por lo que esto confirma que una de las causas de la baja actividad de LOX es debida al bajo pH que presenta el mango. Adicionalmente, Shook *et al.* (2001) reportaron que LOX es una enzima sensitiva a la presión. En su trabajo encontraron que la LOX de tomate es completamente inhibida a una presión de 600 MPa por 5 min a una temperatura de 25°C y a 800 MPa en 1 min de presurización.

Tabla 4.2 Efecto del procesado por alta presión hidrostática a 600 MPa por 3 min en actividad enzimática residual de la lipooxigenasa de mango.

Enzima	Proceso	Actividad Enzimática (mmol/g/min ¹)
Lipooxigenasa	Sin presurizar	0.00901 ± 0.0025 a ²
	Presurizado	0.0054 ± 0.0015 a

¹Los resultados de actividad enzimática son expresados en base húmeda. ²Valores con letras diferentes entre una misma columna para un mismo compuesto, indican que son significativamente diferentes (LSD test, P<0.05).

A pesar de que LOX presentó un 32% de incremento de actividad al día 20 de almacenamiento del mango a 4 °C, como se puede observar en la Figura 4.3 la actividad de LOX en los 40 días de almacenamiento monitoreados fue muy baja posiblemente como consecuencia de la falta de condiciones óptimas de acción de esta enzima como lo son un bajo pH y concentraciones bajas de oxígeno en las muestras como consecuencia del envasado con vacío realizado en el producto. El ligero aumento en la actividad enzimática puede atribuirse a la liberación de la enzima de compartimientos celulares (cloroplastos) y una mayor cercanía con los sustratos (vacuolas) (Tewari *et al.*, 1999; Soliva-Fortuny *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos en este estudio del comportamiento de LOX durante el almacenamiento coinciden con los reportados por Jacobo-Velázquez y Hernández-Brenes (2006), en su estudio de aguacate procesado por HHP (600 MPa, 3

min), también observaron a la mitad del almacenamiento incremento en la actividad de LOX y posteriormente de ese pico de actividad, la actividad de LOX vuelve a disminuir (similar a un comportamiento de una campana), sin embargo en mango la actividad de LOX es indiscutiblemente más baja como consecuencia de que LOX necesita de ácidos grasos poliinsaturados para iniciar sus reacciones de oxidación (adicionalmente de un óptimo pH y oxígeno en el medio) siendo que la cantidad de ácidos grasos que presenta el mango es muy pequeña en comparación a la del aguacate.

Otra posible explicación para la baja actividad de LOX podría ser la baja solubilización, según Ludikhuyze *et al.* (1998) reportaron que a bajos pH (≤ 4.2) LOX no tiene actividad como consecuencia de problemas de solubilización. Adicionalmente, la enzima parece ser más sensible al efecto de la presión en productos ácidos, según los trabajos de Tangwongchai *et al.* (2000) confirman que la actividad de LOX es más sensitiva a pH bajos (< 4), por lo que a pH menores, el efecto de la presión es más fuerte sobre LOX, logrando su inactivación irreversible. Esto es consecuencia de la pérdida de la estructura secundaria y terciaria de la enzima dirigiendo a la agregación que involucra la formación de enlaces disulfuro.

Las enzimas para llevar una adecuada actividad necesitan de ciertas condiciones de pH, actividad acuosa, disponibilidad de sustrato, temperatura, oxígeno, entre otras, por lo que el eliminar o reducir alguna de las condiciones que requiere la enzima, al ser una proteína se logra desnaturalizarla de una manera ya sea reversible o irreversible provocando como es el caso de la LOX del mango presente una actividad muy baja como consecuencia del pH ácido que posee la matriz del alimento debido a que sus requerimientos son de un pH más elevado, la baja disponibilidad de oxígeno por el envasado a vacío y envase impermeable al oxígeno, temperatura de almacenamiento de refrigeración (4°C), muy baja concentración de sustrato (ácido linolénico) provocando en conjunto un efecto sinérgico que no permite que LOX empiece reacciones de oxidación o bien, que las desarrolle de una manera muy lenta en el tiempo monitoreado, debido a esto no se le atribuye a LOX los cambios sensoriales encontrados como causa de su actividad, así mismo, esta baja actividad de LOX inhibe el mecanismo de co-oxidación de carotenoides que podría causar el blanqueamiento o disminución de intensidad del color de las muestras.

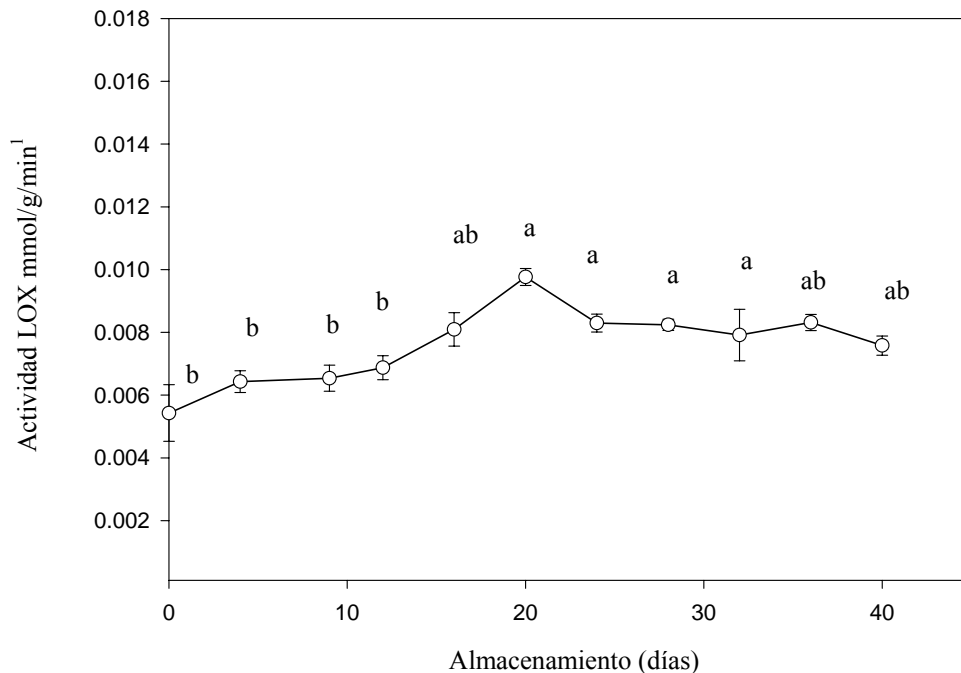


Figura 4.3 Actividad de lipooxygenasa en mango procesado por alta presión hidrostática a 600 MPa por 3 min y almacenado a 4°C por 40 días. Los valores graficados son el promedio de 3 repeticiones y las barras representan el error estándar de la media. Letras diferentes indican que las muestras con diferentes tiempos de almacenamiento son significativamente diferentes (LSD test, $P < 0.05$). ¹Los resultados de actividad enzimática de lipooxygenasa son expresados en base húmeda.

4.4 Efecto del Procesado y Almacenamiento sobre la Estabilidad de Carotenoides

Los carotenoides son uno de los principales compuestos nutracéuticos que posee el mango en estado maduro por lo cual se considero relevante estudiar el efecto del tratamiento con HHP y estabilidad durante el almacenamiento. La mayor parte de los estudios de HHP reportados en literatura hablan del efecto inmediato de la presión ejercida sobre los carotenoides, sin embargo no se enfocan en el estudio de su almacenamiento, posiblemente por la complejidad de su análisis y numerosas observaciones requeridas.

Los carotenoides identificados de manera tentativa en mango var. Tommy Atkins observados en el presente estudio (Tabla 4.3 y Figura 4.4) coinciden con los identificados

por Mercadante *et al.* (1997). Como se muestra en la Tabla 4.3 los carotenoides se identificaron de acuerdo a diferentes metodologías descritas anteriormente, donde de acuerdo a mayor metodologías de identificación aplicadas a cada pico cromatográfico, mayor seguridad tenemos que la identidad propuesta sea la correcta, sin embargo se recomienda que en estudios posteriores estos resultados se confirmen por cromatografía utilizando un detector de masas. Adicionalmente la concentración de carotenoides totales coincide con la reportada por Mercadante y Rodríguez-Amaya (1998) quienes reportaron una concentración de 96 ± 42 ppm en mango fresco var. Tommy Atkins. Los carotenoides mayoritarios encontrados en el estudio fueron todos-trans- β -caroteno y violaxantina de acuerdo a lo observado en la Tabla 4.4 y al cromatograma de la Figura 4.4. A diferencia de otros autores no se encontró la presencia del isómero 13-cis- β -caroteno siendo esto justificado que es un isómero principalmente formado por tratamientos térmicos (Pott *et al.*, 2003b). Una de las ventajas observadas en el presente estudio es que la violaxantina no se degrada con el tratamiento por HHP, a diferencia de otras tecnologías como es el térmico (secado), las cuales la degradan o transforman como consecuencia del carácter inestable de derivados de violaxantina como di-epóxidos. Esta característica de inestabilidad de la violaxantina debida al proceso también la reportaron Mercadante *et al.* (1998) en jugo de mango, donde fue concluido que el proceso genera la conversión de los grupos 5-6 epóxidos de violaxantina a los grupos 5-8 furanósidos de auroxantina. La liberación de ácidos orgánicos durante la desintegración de las frutas de mango crea las condiciones necesarias para la transformación de violaxantina a auroxantina. Con la desaparición de violaxantina, los β -carotenos se convierten en el principal carotenoide, seguido por la auroxantina en los jugos comerciales analizados. Lo anterior también fue reportado por Mercadante *et al.* (1997), donde en la mayoría de los estudios reportan al β -caroteno como el principal carotenoide, como consecuencia de la fácil transformación y/o degradación de la violaxantina.

Aunque la presión ejercida en los tratamientos por HHP propicie la liberación de ácidos orgánicos hacia la matriz de los alimentos de acuerdo a lo mencionado en secciones anteriores, a diferencia de otras tecnologías HHP no transforma ni degrada la violaxantina, por lo que retiene sus mismas cualidades como antioxidante que un producto fresco.

Los carotenoides en mango se mantuvieron estables al efectuar el procesado con HHP y durante los 40 días de almacenamiento monitoreados a 4°C (Tabla 4.4 y Figura 4.5), a pesar de que se esperaban pérdidas leves como consecuencia de la baja actividad de LOX reportada anteriormente durante el almacenamiento (Figura 4.3). Esta estabilidad es de gran relevancia debido a que los carotenoides con actividad de provitamina A se conservaron durante toda la vida útil del alimento, principalmente todos-trans- β -caroteno. Estos carotenoides además de ser precursores de vitamina A poseen una función biológica protectora contra la formación y acción de radicales libres por lo que se les han atribuido propiedades anticancerígenas y se les asocia con la prevención de enfermedades cardiovasculares, degeneración macular relacionada a la edad y disminución del riesgo de formación de cataratas (Scott, 1992). La tecnología de HHP puede ofrecer beneficios muy positivos desde el punto de vista de salud pública, a diferencia de otras tecnologías como lo es el tratamiento térmico que se caracteriza por la alta destrucción de nutrientes.

Esta estabilidad coincide con lo reportado por Fernandez *et al.* (2001) en puré de tomate, quienes no encontraron un efecto negativo en el contenido de β -caroteno y Licopeno al presurizarlo 600 MPa por 60 min a una temperatura de 20 °C. Por otra parte Sánchez-Moreno *et al.* (2003) reportaron que en jugo de naranja procesado con alta presión (100 MPa/60°C/5min) y almacenado en refrigeración por 10 días no existieron cambios significativos en el contenido de carotenoides justo después del proceso y durante el almacenamiento.

La causa de inestabilidad y consecuente degradación de carotenoides es la susceptibilidad a oxidación e isomerización geométrica de su cadena poliénica. Esto ha sugerido que la isomerización geométrica se debe a la ruptura de enlaces covalentes (Sánchez-Moreno *et al.*, 2003) y se ha demostrado que los tratamientos con alta presión no afectan a los mismos (Préstamo y Arroyo, 1998), por lo que este hecho podría explicar parte de la estabilidad de los carotenoides. Además para evitar isomerización al momento de hacer su extracción se utilizó solventes como acetona y mezcla de éter dietílico y de petróleo ya que de acuerdo a lo reportado por Chen *et al.* (1995) al utilizar solventes polares el grado de isomerización es menor que el provocado por el uso de solventes no polares. Adicionalmente, la Isoenzima LOX II que regularmente se encuentra en frutas puede tomar como sustrato a los carotenoides, sin embargo bajo las condiciones que tiene

la matriz de mango ($\text{pH} < 4$, bajo disponibilidad de oxígeno y de sustrato) provocan su baja actividad y bajo estas condiciones de acidez no co-oxida a los carotenoides a pesar de ser un buen sustrato para esta enzima y con esto se evita la degradación de los mismos.

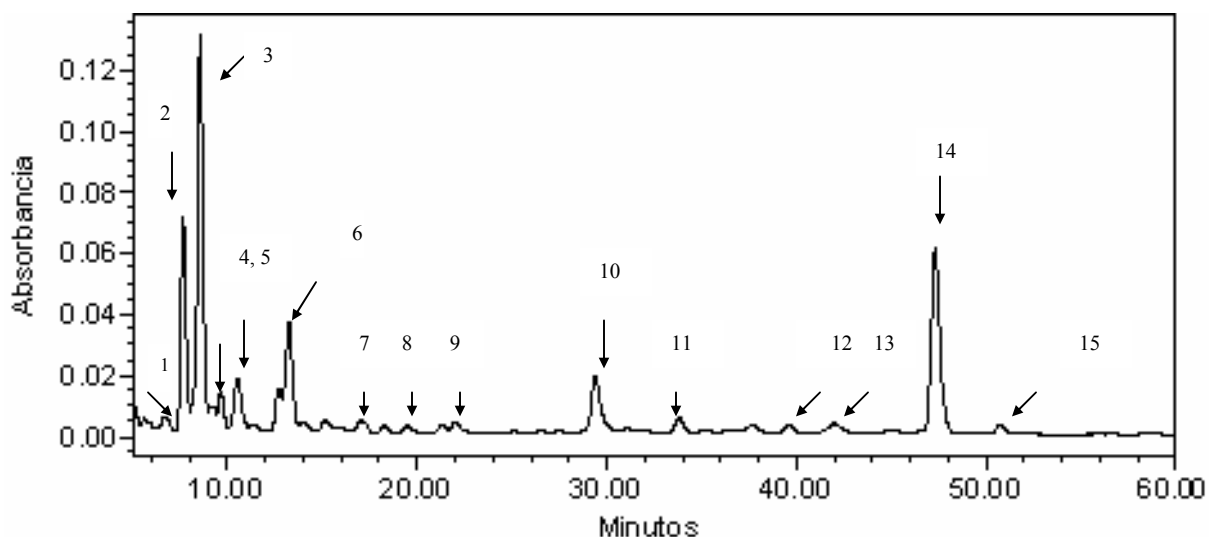


Figura 4.4 Cromatograma de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución- detector de fotodiodos detectados a 450 nm en extractos de mango procesado por alta presión hidrostática con 8 días de almacenamiento a 4°C. Identificación tentativa de picos: (1) Isómero luteoxantina; (2) Violaxantina; (3) Violaxantina; (4) Isómero luteoxantina; (5) Isómero luteoxantina; (6) 9-cis-violaxantina; (7) Isómero luteoxantina; (8) Posible xantófila; (9) 13-cis-violaxantina; (10) Estándar apo- β -8'-carotenal; (11) posible xantófila; (12) todos-trans- β -criptoxantina; (13) cis- β -criptoxantina; (14) todos-trans- β -caroteno; (15) 9-cis- β -caroteno.

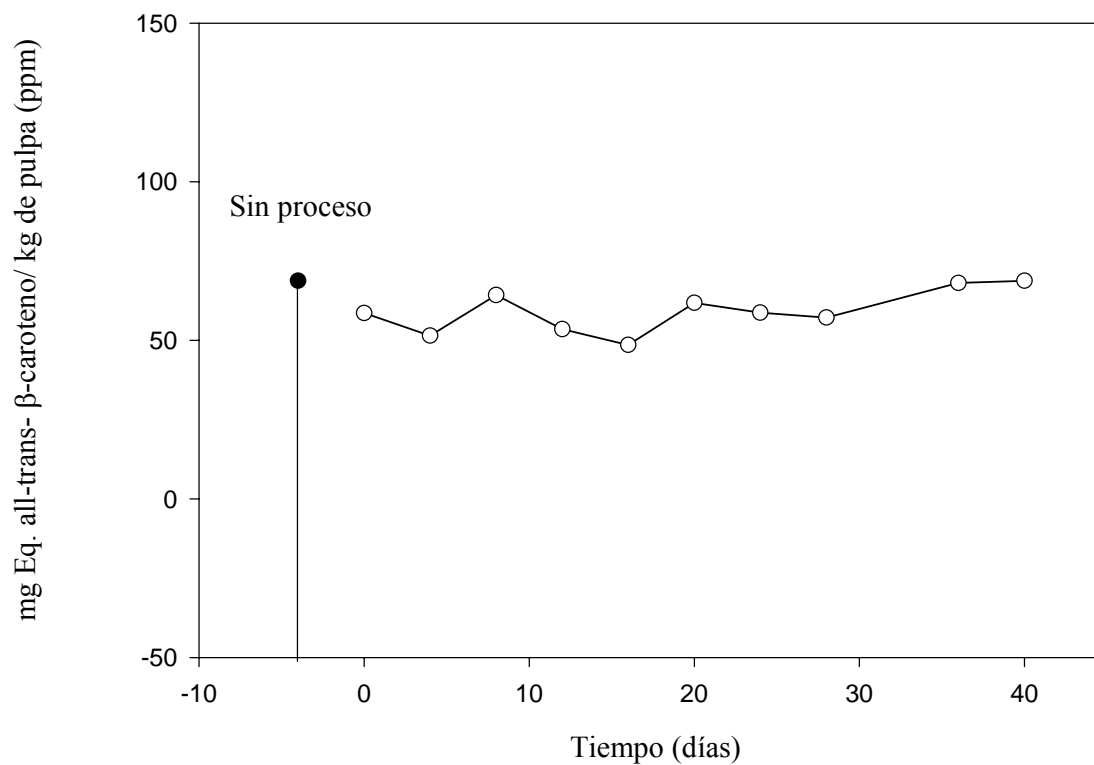


Figura 4.5 Estabilidad de carotenoides totales de mango procesado por alta presión hidrostática (600 MPa, 3 min) durante el procesado y almacenamiento a 4°C por 40 días. Expresados como mg equivalentes de todos-trans-β-caroteno por kg de pulpa.

Tabla 4.3 Identificación tentativa de picos cromatográficos presentes en mango procesado por alta presión hidrostática y separados por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fotodiodos.

Número de pico (tiempo de retención, min) ¹	λ_{\max} bandas de absorción ²	Identificación tentativa	Método de identificación ³
1 (6.7)	399.6, 421.3, 445.5	Isómeros luteoxantina	A,C
2 (7.6)	416.5, 440.7, 469.5	Violaxantina	A,C
3 (8.6)	416.5, 440.7, 469.5	Violaxantina	A,C
4 (9.5)	397.2, 421.3, 447.9	Isómeros luteoxantina	A
5 (10.6)	399.6, 421.3, 447.9	Isómeros luteoxantina	A
6 (13.2)	412, 335.8, 464.9	9-cis violaxantina	A,C
7 (15.2)	400, 421.3, 447.9	Isómeros luteoxantina	A,C
8 (18.5)	412, 438, 467	Posible xantófila	A
9 (22)	410, 435.8, 464.9	13-cis-violaxantina	A,C
10 (29)	467.3	apo- β -8'-carotenal	B
11 (33.6)	416.5, 440.7, 472.1	Posible xantófila	A
12 (37.3)	(423.7), 445, 470	todos-trans- β -criptoxantina	A,C
13 (40.4)	(420), 452.7, 479.4	cis- β -criptoxantina	A,C
14 (45.6)	(422), 452.7, 472.1	todos-trans- β -caroteno	A, B,C
15 (48.6)	424, 445.5 472.1	9-cis- β -caroteno	A,C

¹Número de pico asignado de acuerdo al orden de aparición del cromatograma (Figura 4.4). ²Tomadas a partir del espectro de absorción de cada pico en el cromatograma, valor en paréntesis indica hombro en el pico. ³Método empleado para determinar la identidad del pico: (A) Identificación por interpretación espectral de los máximos de absorción y comparación con las máximas reportadas en bibliografía (Chen et al., 1995; Mercadante et al., 1997; Pott et al., 2003); (B) Identificación por comparación de tiempo de retención y espectro de absorción con estándares; (C) consistió en la identificación por orden de elución y aproximación con los tiempos de retención reportados en bibliografía bajo condiciones cromatográficas similares (Meléndez-Martínez *et al.*, 2005; Waters, 2006).

Tabla 4.4 Análisis de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución-detector de fotodiodos de mango procesado por alta presión hidrostática a 600 MPa por 3 min a 4°C durante 40 días de almacenamiento.

Número de pico (Tiempo de retención, min) ¹	Identificación tentativa	Concentración (mg/kg) ²						
		Sin Procesar	Tiempo de almacenamiento (días)					
			t ₀	T ₄	t ₈	t ₁₂	t ₁₆	
1	6.7	Isómeros luteoxantina	3.45 a ³	3.61 a	2.97 a	3.06 a	3.02 a	2.65 a
2	7.6	Violaxantina	6.04 a	3.77 a	4.41 a	6.25 a	4.09 a	3.83 a
3	8.6	Violaxantina	9.19 a	4.57 a	3.83 a	10.81 a	6.60 a	4.65 a
4	9.5	Isómeros luteoxantina	3.45 a	3.61 a	3.10 a	3.06 a	2.78 a	2.65 a
5	10.6	Isómeros luteoxantina	5.60 a	3.55 a	3.09 a	4.10 a	3.51 a	3.44 a
6	13.2	9-cis-violaxantina	6.38 a	3.61 a	2.92 a	5.85 a	4.27 a	3.10 a
7	15.2	Isómeros luteoxantina	3.79 a	3.63 a	3.18 a	3.11 a	2.92 a	2.97 a
8	18.5	Posible xantófila	3.76 a	3.70 a	3.10 a	3.36 a	4.11 a	4.10 a
9	22	13-cis-violaxantina	3.77 a	3.55 a	3.22 a	3.07 a	2.83 a	2.61 a
10	33.6	Posible xantófila	3.56 a	3.57 a	3.09 a	3.30 a	2.92 a	2.51 a
11	37.3	todos-trans-β-criptoxantina	3.54 a	3.73 a	3.45 a	3.01 a	2.91 a	2.54 a
12	40.4	cis-β-criptoxantina	3.73 b	4.52 a	3.52 a	3.04 a	2.95 a	3.10 a
13	45.6	todos-trans-β-caroteno	8.86 a	9.03 a	8.23 a	9.20 a	7.68 a	7.61 a
14	48.6	9-cis-β-caroteno	3.66 a	4.16 a	3.31 a	3.03 a	2.94 a	2.77 a

¹Número de pico asignado de acuerdo al orden de aparición en el cromatograma (Figura 4.4); ²Concentraciones expresadas como equivalentes de β-caroteno en la determinación de carotenoides a 450nm. ³Los valores con letras diferentes entre un mismo renglón para un mismo compuesto indican que son significativamente diferentes (LSD test, p<0.05). t, tiempo de almacenamiento.

Tabla 4.4 (Continuación).

Número de pico (Tiempo de retención, min) ¹	Identificación tentativa	Concentración (mg/kg) ²					
		Tiempo de almacenamiento (días)					
		t ₂₀	t ₂₄	t ₂₈	t ₃₆	t ₄₀	
1	6.7	Isómeros luteoxantina	3.8 a ³	3.12 a	3.34 a	4.29 a	4.19 a
2	7.6	Violaxantina	4.23 a	4.33 a	4.29 a	5.71 a	6.34 a
3	8.6	Violaxantina	5.46 a	6.04 a	5.69 a	6.93 a	9.58 a
4	9.5	Isómeros luteoxantina	3.80 a	3.12 a	3.34 a	4.29 a	4.19 a
5	10.6	Isómeros luteoxantina	4.52 a	3.80 a	3.99 a	4.99 a	4.39 a
6	13.2	9-cis-violaxantina	4.13 a	5.30 a	4.02 a	4.76 a	4.87 a
7	15.2	Isómeros luteoxantina	3.99 a	3.26 a	3.37 a	4.24 a	3.81 a
8	18.5	Posible xantófila	4.43 a	4.06 a	4.65 a	4.38 a	4.23 a
9	22	13-cis-violaxantina	5.53 a	3.38 a	3.37 a	4.19 a	3.76 a
10	33.6	Posible xantófila	3.92 a	3.62 a	3.24 a	4.12 a	3.75 a
11	37.3	Todos-trans-β-criptoxantina	3.85 a	3.35 a	3.38 a	4.09 a	3.88 a
12	40.4	cis-β-criptoxantina	4.10 a	4.02 a	3.72 a	4.27 a	3.89 a
13	45.6	Todos-trans-β-caroteno	7.08 a	7.89 a	7.12 a	4.61 a	7.89 a
14	48.6	9-cis-β-caroteno	3.93 a	3.45 a	3.63 a	4.23 a	4.0 a

¹Número de pico asignado de acuerdo al orden de aparición en el cromatograma (Figura 4.4); ²Concentraciones expresadas como equivalentes de β-caroteno en la determinación de carotenoides a 450nm. ³Los valores con letras diferentes entre un mismo renglón para un mismo compuesto indican que son significativamente diferentes (LSD test, p<0.05). t, tiempo de almacenamiento.

4.5 Estudios de Vida Útil Sensorial

Cuando un alimento es microbiológicamente estable, como es el caso de los procesados por HHP, el uso de la evaluación sensorial es clave para determinar el final de su vida útil (Hough *et al.*, 2003). El uso de jueces entrenados nos permite conocer los cambios sensoriales que ocurren en el alimento durante su almacenamiento, sin embargo, cuando se desea conocer la magnitud del cambio en un atributo sensorial que modifica la aceptabilidad del producto se utilizan métodos de modelación utilizando datos generados por jueces entrenados y consumidores (Jacobo-Velázquez y Hernández-Brenes, 2006).

En el presente estudio se determinó la VUS de mango procesado por HHP aplicando estadística de supervivencia, y se realizó un análisis descriptivo con un panel entrenado para conocer cuales fueron los descriptores que cambiaron durante el almacenamiento. Finalmente, se midió el efecto que tuvieron los cambios sensoriales sobre la aceptabilidad global del producto mediante el uso de un panel de consumidores al cual se le dieron a evaluar muestras con diferentes intensidades de cada descriptor.

4.5.1 Determinación de vida útil sensorial mediante el uso de estadística de supervivencia

Los datos de aceptabilidad obtenidos por el panel de consumidores no se ajustaron a una distribución normal, por lo que en este estudio se probaron varios modelos de regresión y se seleccionó el de mejor ajuste a los datos con base en los coeficientes de verosimilitud máxima obtenidos. En literatura es normal encontrar este coeficiente expresado como logaritmo con el propósito de maximizarlo (Dobson, 2002). Las distribuciones que se probaron fueron la loglogística, logística, lognormal y Weibull y se obtuvieron coeficientes de $-2 \cdot \log$ -verosimilitud máxima de 113, 116, 112 y 114, respectivamente. De acuerdo con dichos resultados, se seleccionó la distribución logística para modelar la vida útil del mango procesado por HHP por ser la que presenta un mayor valor del coeficiente y por lo tanto un mejor ajuste a los datos, a pesar de que la distribución de Weibull es la más comúnmente usada para la modelación de vida útil de alimentos (Hough *et al.*, 2003). Los parámetros de intercepto (μ) y dispersión (σ) obtenidos de la ecuación del modelo de distribución logística fueron 41.7 y 10.14

respectivamente (obtenidos con el software de modelación S-plus Versión 7.0). Valores que fueron utilizados para graficar la probabilidad de rechazo de los consumidores contra el tiempo de almacenamiento de las muestras de mango procesadas por HHP (Figura 4.6).

La VUS estimada del producto fue 31 ± 5 días a 4°C cuando se considera una probabilidad de rechazo del 25% (Figura 4.6). Sin embargo en la planta Fresherized Food Inc. (Sabinas, Coahuila) el período de vida útil asignado al mango procesado por HHP es de 21 días. En la mayoría de los estudios de VUS reportados en la literatura, los autores utilizan un 50% de probabilidad de que un consumidor rechace el producto, sin embargo, en el presente estudio se utilizó el 25% de probabilidad por suponer un criterio más estricto en la aceptabilidad del consumidor (Gámbaro *et al.* (2005) y Gámbaro *et al.* (2006)).

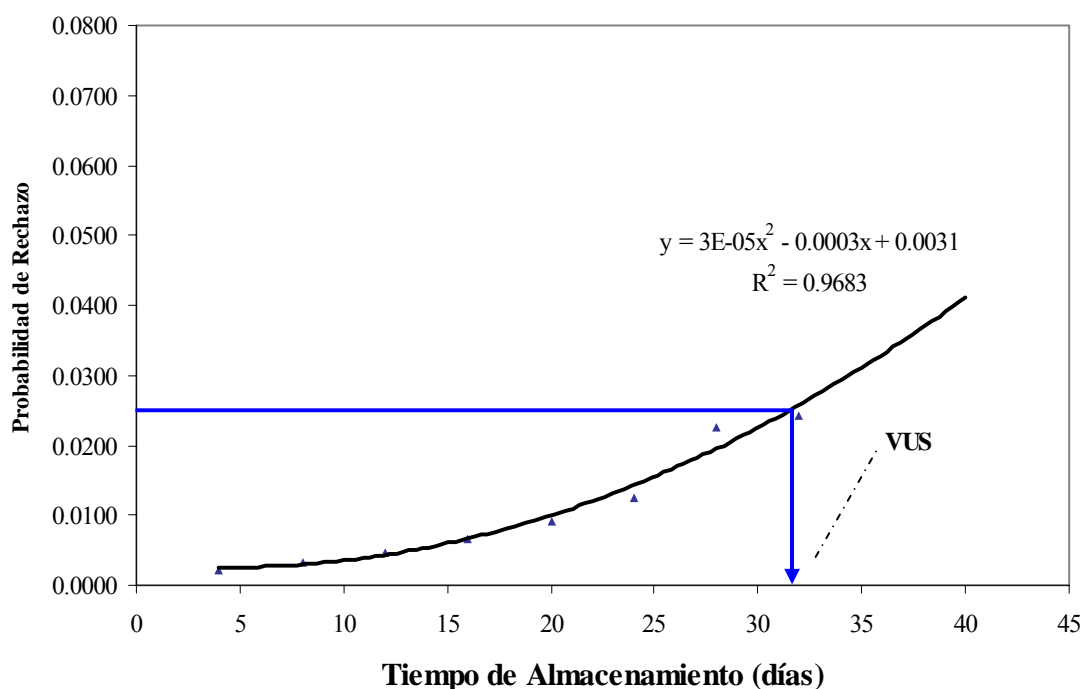


Figura 4.6 Modelación logística de la probabilidad de rechazo por los consumidores a diferentes tiempos de almacenamiento de mango procesado por alta presión hidrostática (600 MPa, 3 min). VUS, vida útil sensorial.

4.5.2 Determinación de la vida útil sensorial por la metodología de puntos de corte

Con la finalidad de conocer el motivo por el cual la probabilidad de rechazo de los consumidores aumentó a través de la vida útil del producto se realizó un análisis descriptivo con un panel entrenado de Laboratorios Griffith. Los panelistas llegaron a la conclusión de que los descriptores críticos que diferenciaban a las muestras frescas de las almacenadas eran los descriptores sensoriales en aumento de dulzura, disminución de acidez, oscurecimiento y el desarrollo de un sabor descrito como maduro/fermentado.

Para determinar si el cambio de dulzor y acidez de las muestras afectaban la aceptabilidad del producto por parte de los consumidores se prepararon muestras con diferentes intensidades de sabor dulce que a su vez causarían una disminución en la percepción de acidez en las muestras. Las muestras fueron probadas por los consumidores y al analizar los datos se encontró que no existía diferencia significativa entre las aceptabilidades de las distintas muestras, lo cual permite concluir que los cambios de este descriptor no parecen estar relacionados con el rechazo del producto por parte de los consumidores. En la Figura 4.7 se observa como aumenta ligeramente la aceptabilidad de consumidores por el producto al aumentar el dulzor y disminuir la acidez y se puede confirmar que no existe una disminución en su aceptabilidad durante el período de tiempo estudiado.

A pesar de que el aumento de dulzura no es el motivo de rechazo del producto por parte de los consumidores, se considero relevante investigar reportes similares con el fin de formular alguna hipótesis para su explicación. Se conoce que el principal carbohidrato presente en el mango inmaduro es el almidón. Estudios previos también han observado un aumento en dulzura en alimentos presurizados a 400-600 MPa, los cuales estuvieron correlacionados con aumentos en la actividad de β y α -amilasas (enzimas degradadoras de almidón) incrementando el número de carbohidratos solubles totales y contenido de azúcares reductores, y por lo tanto la dulzura en el producto durante su almacenamiento (Estrada-Girón *et al.*, 2005)

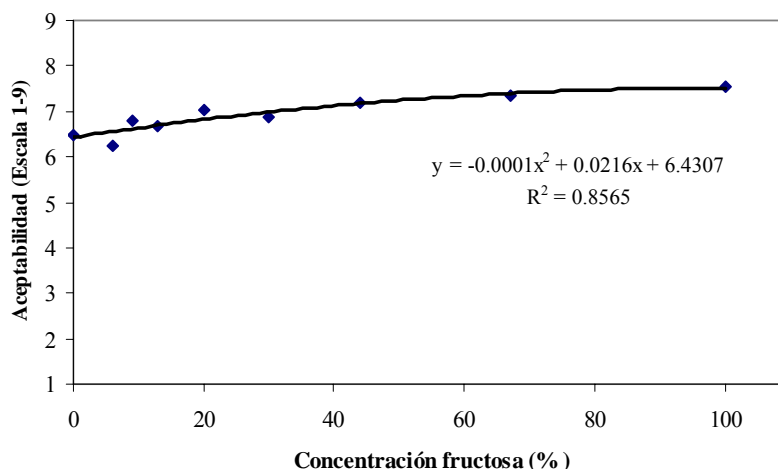


Figura 4.7 Efecto de diferentes concentraciones de fructosa sobre la aceptabilidad sensorial de mango procesado por alta presión hidrostática a 600 MPa por 3 min.

Al realizar un análisis de varianza y separación de medias de LSD ($p < 0.05$) de la aceptabilidad de consumidores en el descriptor de color de mango, se encontró que durante los primeros 30 días de almacenamiento no se observaron diferencias significativas en la aceptabilidad de los consumidores para dicho descriptor, sin embargo a partir del día 35 hay una ligera disminución en la aceptabilidad, la cual es significativa estadísticamente (Figura 4.8).

En la Tabla 4.5 se puede observar el comportamiento de los parámetros de color instrumental. Los parámetros L^* y b^* presentaron diferencias significativas a lo largo del almacenamiento, sin embargo no mostraron una tendencia definida. Al realizar una correlación de la aceptabilidad global de los consumidores con los cambios en las variables de color instrumental de mango procesado por HHP no se encontró ninguna correlación significativa (a^* escala roja-verde, $r = 0.0320$; b^* escala amarillo-azul, $r = 0.1818$; L^* luminosidad, $r = 0.2645$; h^* ángulo de color, $r = -0.0631$; C^* saturación de color, $r = 0.1816$). Debido a que no se observó una relación entre los datos de aceptabilidad por los consumidores y los datos de colorimetría instrumental el presente estudio no permite concluir que los cambios en color estén relacionados con el rechazo del producto por parte de los consumidores durante el período de almacenamiento evaluado.

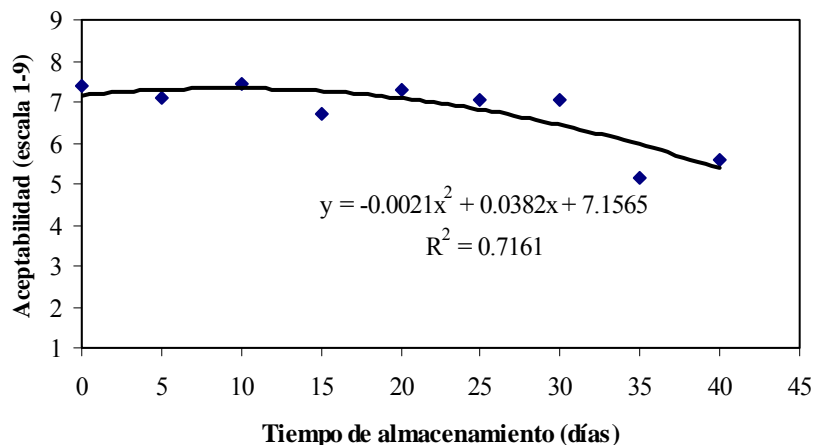


Figura 4.8 Efecto de cambios en el color durante el almacenamiento de mango procesado por alta presión hidrostática (600 MPa, 3 min) sobre la aceptabilidad de los consumidores.

En Anexo 4 se incluye un diagrama de color donde se muestran la distribución de las tonalidades de acuerdo a valor a^* y b^* de las muestras de mango durante el almacenamiento de 40 días y es posible observar que todos los parámetros se encuentran en el mismo cuadrante, debido a lo cual no se aprecia diferencia en el color. Estos resultados en color en mango presurizado coinciden con los publicados por Guerrero-Beltrán *et al.* (2005) donde reportan que no hay diferencia significativa en color en 30 días de almacenamiento a 3°C, conservando el color amarillo característico en muestras con tratamiento de presión de hasta 586 MPa.

En el presente estudio no se determinó la aceptabilidad de diferentes niveles del descriptor maduro/fermentado por parte de los consumidores. Al no haber observado evidencia sobre el impacto de los cambios en los descriptores de dureza y color sobre la aceptabilidad del producto se piensa que el descriptor maduro/fermentado podría estar relacionado con el rechazo del producto, sin embargo se requieren estudios adicionales al respecto.

Tabla 4.5 Color instrumental de mango procesada en escala CIEL*a*b* y CIEL*C*h* (D₆₅/10° iluminador/observador) para mango procesado por alta presión hidrostática a 600 MPa por 3 min durante 40 días de almacenamiento.

Almacenamiento Días	Color instrumental ¹				
	a*	b*	Luminosidad (L*)	Saturación de Color (C*)	Ángulo de Color (h*)
0	-2.53 a ²	38.68 b	48.39 a	38.77 a	93.75 a
4	-2.07 a	40.68 a	48.40 a	40.77 a	92.90 a
8	-1.91 a	41.54 a	47.73 ab	41.58 a	92.64 a
12	-2.88 a	39.93 ab	47.37 ab	40.04 a	94.12 a
16	-2.55 a	37.34 b	45.72 b	37.43 a	93.91 a
20	-2.60 a	42.60 a	49.32 ab	42.68 a	93.51 a
24	-2.02 a	40.34 ab	47.04 ab	40.39 a	92.88 a
28	-2.41 a	39.19 b	47.52 ab	39.27 a	93.55 a
32	-2.21 a	39.72 ab	48.09 ab	39.78 a	93.20 a
36	-2.11 a	40.16 ab	45.39 b	40.22 a	93.01 a
40	-2.32 a	39.03 b	46.85 ab	39.11 a	93.42 a

¹Los resultados se expresan como unidades adimensionales de escala roja-verde (a*), escala amarilla-azul (b*), luminosidad (L*), saturación de color (C*) y ángulo de color (h*) empleando un plato de calibración blanco como fondo reflejante para las celdas. ²Los valores con letras diferentes en una misma columna indican que son significativamente diferentes (LSD test, p<0.05).

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El procesamiento de mango con HHP a 600 MPa por 3 min resultó en una reducción de 3 logaritmos en la cuenta de bacterias mesofílicas aerobias y 4 logaritmos en la de levaduras. Las cuentas de los microorganismos no se incrementaron significativamente durante el almacenamiento, sin embargo se recomienda que en estudios posteriores se realicen cuentas de microorganismos anaerobios psicofílicos debido a que el producto fue envasado al vacío, en envases impermeables al oxígeno y se almacenó bajo condiciones de refrigeración (4°C). De igual manera en estudios posteriores se recomienda la inoculación de envases para la validación de la reducción causada por el procesado (control positivo), así como la realización de tinciones de gram para estudiar las características de la microflora residual.

En el presente estudio no se observó una reducción significativa en la actividad de la LOX. Sin embargo durante el almacenamiento se presentó un 32% de incremento significativo en su actividad en el día 20 de almacenamiento. A pesar de dicho incremento de actividad, durante los 40 días monitoreados la acción de LOX fue muy baja. La baja actividad de LOX observada puede atribuirse al efecto combinado del pH relativamente ácido de la variedad Tommy Atkins, el almacenamiento bajo refrigeración, la baja disponibilidad de oxígeno y de sustratos de la enzima (18:2 y 18:3). El contenido de carotenoides de mango se mantuvo estable después del procesado y durante los 40 días de almacenamiento a 4 °C, posiblemente debido al mismo efecto protector combinado de las condiciones de almacenamiento. La estabilidad de carotenoides observada es de gran relevancia nutricional debido a que los todos-trans- β -caroteno son los principales carotenoides del mango y presentan actividad como precursores de vitamina A. En conclusión, el tratamiento con HHP mostró ventajas nutrimentales y funcionales importantes sobre otras tecnologías térmicas. A pesar que el contenido de carotenoides se mantuvo estable durante el periodo de estudio se recomienda evaluar la estabilidad de otros nutraceuticos durante el almacenamiento.

Se determinó que la vida útil sensorial para el mango procesado por HHP fue de 31 ± 5 días con un 25% de probabilidad de que un consumidor no acepte el producto. Se determinó que los descriptores de aumento de dulzura, disminución de acidez y cambio de color no fueron los responsables del cambio de aceptabilidad del producto por los consumidores. Se recomienda que en estudios posteriores se realice la evaluación de aceptabilidad con un panel de consumidores de muestras con diferentes niveles de intensidad del descriptor a sabor maduro/fermentado.

REFERENCIAS

- Adedeji J., Hartman T.G., Lech J. and Ho C.T. 1992. Characterization of Glycosidically Bound Aroma Compounds in the African Mango (*Mangifera indica* L.). *J. Agric. Food Chem.* 40: 659-661.
- Aguilar O.A. 2003. Evaluación de un Proceso Cromatográfico Para la Obtención de Extractos Fenólicos de Tomillo (*Thymus vulgaris*) Libres de Sustratos de Polifenoloxidasa. Tesis de Maestría en Biotecnología. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey: Campus Monterrey. Monterrey, N. L.
- Alpas H., Kalchayanand N., Bozoglu F. and Ray B. 2000. Interactions of High Hydrostatic Pressure, Pressurization Temperature and pH on Death and Injury of Pressure-Resistant and Pressure-Sensitive Strains of Foodborne Pathogens. *Int. J. Food Microbial.* 60: 33-42.
- Badui D.S. 1994. *Química de los Alimentos*. Alambra Mexicana Ed.
- Bauernfeind J.C. 1981. *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*. Academic Press (London) LTD.
- Bautista E., Duque C. and Torres R. 1998. Volatile Constituents of Sugar Mango (*Mangifera indicant* L.). *Rev. Colomb. Quim.* 27: 29-36.
- Berardini N., Fezer R., Conrad J., Beifuss U., Carle R. and Schieber A. 2005. Screening of Mango (*Mangifera indica* L.) Cultivars for Their Contents of Flavonol O- and Xanthone C-Glycosides, Antocyanins, and Pectin. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1563-1570.
- Beyers M. and Thomas A.C. 1979. γ Irradiation of Suptropical Fruits. 4. Changes in Certain Nutrients Present in Mangoes, Papayas, and Litchis during Canning, Freezing, and γ Irradiation. *J. Agric. Food Chem.* 27 (1): 48-51.

- Boyes S., Perera C. and Young H. 1992. Kiwifruit Lipoxygenase: Preparation and Characteristics. *J. of Food Sci.* 57 (6): 1390-1394
- Boynton B.B., Sims C.A., Sargent S., Balaban M.O. and Marshall M.R. 2002. Quality and Stability of Precut Mangos and Carambolas Subjected to High-Pressure Processing. *J. of Food Sci.* 67 (1): 409-415.
- Cano M.P., De Ancos B. y Sánchez-Moreno C. 2005. Simposium “Nuevas Tecnologías de Conservación y envasado de frutas y hortalizas. Vegetales frescos cortados”. La Habana, Cuba.
- Cardelli C. and Labuza T.P. 2001. Application of Weibull Hazard Analysis to the Determination of the Shelf Life of Roasted and Ground Coffee. *Lebensm. Wiss. Technol.* 34: 273–278.
- Castellanos D.G. 2005. Factores que Afectan la Estabilidad del Puré de Aguacate (*persea americana*) Procesado por Alta Presión Hidrostática en Presencia de Antioxidantes Naturales. Tesis de Maestría en Biotecnología. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey: Campus Monterrey. Monterrey, N. L.
- Chen B.H., Peng H.Y. and Chen H.E. 1995. Changes of Carotenoids, Color, and Vitamin A Contents during Processing of Carrot Juice. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1912-1918.
- Chen H.J., Peng H.Y. and Chen B.J. 1996. Stability of Carotenoids and Vitamin A During Storage of Carrot Juice. *Food Chemistry.* 57: 487-503.
- Curia A., Aguerri M., Langoht C. and Hough G. 2005. Survival Analysis Applied to Sensory Shelf Life of Yogurts-I: Argentine Formulations. *J. of Food Sci.* 70 (7): 442-445.

De Ancos B., Gonzalez E. y Cano M.P. 2000. Effect of High-Pressure Treatment on the Carotenoid Composition and the Radical Scavenging Activity of Persimmon Fruit Purees. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3542-3548

Deliza R., Rosenthal A., Abadio F.B.D., Silva C.H.O. and Castillo C. 2005. Application of High Pressure Technology in the Fruit Juice Processing: Benefits Perceived by Consumers. *J. of Food Engineering.* 67: 241-246.

Dobson A.J. 2002. An introduction to generalized linear models [electronic resource]. Chapman & Hall/CRC

Espín J.C., Trujano M.F., Tudela J. and García-Cánovas F. 1987. Monophenolase Activity of Polyphenol Oxidase from Haas Avocado. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1091-1096.

Eshtiagui M.N. and Knorr D. 1993. Potato Cubes Response to Water Blanching and High Hydrostatic Pressure. *J. of Food Sci.* 58 (6): 1371-1374.

Estrada-Girón Y.M, Swanson B.G. and Barbosa-Cánovas G.V. 2005. Advances in the Use of High Hydrostatic Pressure for Processing Cereal Grains and Legumes. *Trends in Food Science & Technology.* 16: 194-203

FAO.2005. FAO Statistical Databases, Agricultura Data. Disponible en: <http://faostat.fao.org/>

Farkas D.F. and Hoover D.G. 2000. High Pressure Processing. *J. of Food Sci.* 65 (4): 47-64.

Fennema O.R. 1996. *Food Chemistry.* New York Marcel Dekker.

- Fernández G.A., Butz P. and Tauscher B. 2001. Effects of High-pressure Processing on Carotenoid Extractability, Antioxidant Activity, Glucose Diffusion, and Water Binding of Tomato Puree (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J. of Food Sci.* 66 (7): 1033-1038.
- Gámbaro A., Giménez A. and Varela A. 2005. Sensory Shelf-Life Estimation of Alfajor By Survival Analysis. *J. of Sensory Studies.* 19: 500-509.
- Gámbaro A., Ares G. and Giménez A. 2006. Shelf Life Estimation of Apple-Baby Food. *J. of Sensory Studies.* 21: 101-111.
- Gacula M.C., JR and Singh J. 1984. *Statistical Methods in Food and Consumers Research*, Chapter 8. Academic Press, New York, NY.
- Garitta L., Hough G. and Sánchez R. 2004. Sensory Shelf Life of Dulce de Leche. *J. Dairy Sci.* 87: 1601-1607.
- Gil M.I., Aguayo E. and Kader A.A. 2006. Quality Changes and Nutrient Retention in Fresh-Cut versus Whole Fruits during Storage. *J. Agric. Food Chem.* 54: 4284-4296.
- Gökmen V., Kahraman N., Demir N. and Acar J. 2000. Enzymatically Validated Liquid Chromatographic Method for the Determination of Ascorbic and Dehydroascorbic Acids in Fruits and Vegetables. *J. of Chromatography A.* 881: 309-316.
- Guerrero-Beltrán J.A., Swanson B.G. and Barbosa-Cánovas, G.V. 2005. High Hydrostatic Pressure Processing of Mango Puree Containing Antibrowning Agents. *Food Sci Tech Int.* 11 (4): 261-267.
- Guerrero Beltrán J.A., Babosa-Cánovas, G.V., Moraga-Ballesteros G., Moraga-Ballesteros M.J. and Swanson B.G. 2006. Effect Of pH and ascorbic acid on high hydrostatic pressure-processed mango puree. *Journal of Food Processing and Preservation.* 30: 582-596.

Howard L.R., Talcott S.T., Brenes C.H. and Villalon B. 2000. Changes in Phytochemical and Antioxidant Activity of Selected Pepper Cultivars (*Capsicum* Species) As Influenced by Maturity. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1713-1720.

Hough G., Langohr K., Gómez G. and Curia A. 2003. Survival Analysis Applied to Sensory Shelf Life of Foods. *J. of Food Sci.* 68(1): 359-362.

Howitt C. and Pogson B.J. 2006. Carotenoid Accumulation and Function in Seeds and Non-green Tissues. *Plant, Cell and Environment.* 29: 435-445.

Jacobo-Velázquez D., Hernandez-Brenes C. 2006. Metodología de Predicción del Factor Limitante de Vida Útil de Puré de Aguacate Pasteurizado por Alta Presión Hidrostática. 37 Congreso de Investigación y Desarrollo. Queretaro, Queretaro, México. Enviado.

Klein J.P. and Moeschberger M.L. 1997. *Survival Analysis, Techniques for Censored and Truncated Data.* New York: Springer-Verlag. Página 502.

Li Q., Arteaga J.R., Zhang Q., Huerta S., Go V.L.W, Heber D. 2005. Inhibition of Prostate Cancer Cell Growth by an Avocado Extract: Role of Lipid-Soluble Bioactive Substances. *J. of Nutritional Biochemistry.* 16: 23-30.

Ludikhuyze L., Indrawati, Van den Broeck I., Weemaes C., and Hendrickx M. 1998. Effect of Combined Pressure and Temperature on Soybean Lipoxygenase. 1. Influence of Extrinsic and Intrinsic Factors on Isobaric-Isothermal Inactivation Kinetics. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4074-4080.

Lubikhuyze L., Van Loey A., Indrawati, Smout C., Hendrickx M. 2003. Effects of Combined Pressure and Temperature on Enzymes Related to Quality of Fruits and Vegetables: From Kinetic Information to Process Engineering Aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43 (5): 527-586

Mañas P. and Pagán R. 2005. A Review: Microbial Inactivation by New Technologies of Food Preservation. *J. of Applied Microbiology*. 98: 1387-1399.

Marx M., Schieber A. and Carle R. 2000. Quantitative Determination of Carotene Stereoisomers in Carrot Jueces and Vitamin Supplemented (ATBC) Drinks. *Food Chemistry*. 70: 403-408.

Mata B. I. y Mosqueda V.R. 1998. *La producción del mango en México*. UTEHA Noriega Editores.

Medical College of Wisconsin. 2003. Recommended Intakes of Vitamin C. HealthLink [Institute of Medicine of the National Academy of Sciences and the American Dietetic Association]

Meléndez-Martínez A.J., Britton G., Vicario I.M. and Heredia F.J. 2005. Identification of Zeinoxanthin in Orange Juices. *J. Agric. Food Chem.* 53: 6362-6367.

Mercadante A., Rodríguez-Amaya D. and Britton G. 1997. HPLC and Mass Spectrometric Analysis of Carotenoids from Mango. *J. Agric. Food Chem.* 45: 120-123.

Mercadante A. and Rodríguez-Amaya D. 1998. Effects of Ripening, Cultivar Differences, and Processing on the Carotenoid Composition of Mango. *J. Agric. Food Chem.* 46: 128-130.

Min S., Jin T. and Zhang Q.H. 2003. Commercial Scale Pulsed Electric Field Processing of Tomato Juice. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3338-3344.

- Mínguez Mosquera M.I. 1997. *Clorofilas y Carotenoides en Tecnología de Alimentos*. Secretaría de Publicaciones Universidad de Sevilla.
- Secretaría de Salud. 1994a. NOM-110-SSA1-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”.
- Secretaría de Salud. 1994b. NOM-092-SSA1-1994. “Método Para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa”.
- Secretaría de Salud. 1994c. NOM-111-SSA1-1994. “Método Para la Cuenta de Mohos y Levaduras en Alimentos”.
- O’Connor-Shaw R.E., Roberts R., Ford A.L., Nottingham S.M. 1994. Shelf Life of Minimally Processed Honeydew, Kiwifruit, Papaya, Pineapple and Cantaloupe. *J. of Food Sci.* 59 (6): 1202-1206.
- Paulo E., López-Malo A., Barbosa-Cánovas G.V., Welti-Chanes J., and Swanson B.G. 1999. Polyphenoloxidase Activity and Color of Blanched and High Hydrostatic Pressure Treated Banana Puree. *J. of Food Sci.* 64 (1): 42-45.
- Pott I., Breithaupt D.E. and Carle R. 2003a. Detection of Inusual Carotenoids Esters in Fresh Mango (*Mangifera indica* L. cv. “Kent”). *Phytochemistry.* 64: 825-829.
- Pott I., Marx M., Neidhart S., Muhlbauer W. and Carle R. 2003b. Quantitative Determination of B-carotene Stereoisomers in Fresh, Dried, and Solar-Dried Mangos (*Mangifera indica* L.). *J. Agric. Food Chem.* 51: 4527-4531.
- Préstamo G. and Arroyo G. 1998. High Hydrostatic Pressure Effects on Vegetable Structure. *J. of Food Sci.* 63 (5): 878-881.

Préstamo G. and Arroyo G. 1999. Protective Effect of Ascorbic Acid against the Browning Developer in Apple Fruit Treated with High Hydrostatic Pressure. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3541-3545.

PROSERCO. 2003. Diagnóstico del sistema producto mango. Campeche

Robinson D.S., Wu Z., Domoney C. and Casey R. 1995. Lipoxygenases and the Quality of Foods. *Food Chemistry.* 54: 33-43.

Rodríguez-Amaya D. B. 1997. Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in prepared, processed and stored foods. *Inc/OMNI Project.*

SAGARPA. 2004. Plan Rector del Sistema Producto de Mango. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Salvador A., Varela P., Fiszman S.M. and Gómez G. 2006. Estimating the Shelf Life of Brown Pan Bread, Suitability of Survival Analysis Methodology. *J. of Food Sci.* 47 (4): 321-325.

Sánchez-Moreno C., Plaza L., De Ancos B. and Cano M. P. 2003. Vitamin C, Provitamin A Carotenoids, and Other Carotenoids en High-Pressurized Orange Juice during Refrigerated Storage. *J. Agric. Food Chem.* 51:647-653.

Schieber A., Berardini N. and Carle R. 2003. Identification of Flavonol and Xanthone Glycosides from Mango (*Mangifera indica* L. Cv. "Tommy Atkins") Peels by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5006-5011.

Scott K.J. 1992. Observations on Some of the Problems Associated with the Analysis of Carotenoids in Foods by HPLC. *Food Chemistry.* 357-365.

Shimada A., Kasai M., Yamamoto A. and Hatae K. 1990. Effect of Hydrostatic Pressurization on the Palatability of Foods. In Pressure Processed Food-Research and Development, Hayashi, R., Ed.; San-ei-Pub.Co.; Kyoto, Japan, Pag: 249-261.

Shook C., Shellhammer T.H., Schwartz S.J. 2001. Polygalacturonase, Pectinesterase, and Lipoxygenase Activities in High-Pressure-Processed Diced Tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* 49: 664-668.

Soliva-Fortuny R., Elez-Martínez P., Sebastian-Caldero M., Martín-Belloso O. 2002. Kinetics of Polyphenol Oxidase Activity Inhibition and Browning of Avocado Puree Preserved by Combined Methods. *J Food Engineering.* 55(2):131-137.

Sweeney, J.P. and Marsh, A.C. 1971. Effect of Processing on Provitamin A in Vegetables. *J. Am. Diet. Assoc.* 59:238-243.

Tangwongchai R., Ledward D. A., Ames J. A. 2000. Effect of High-Pressure Treatment on Lipoxygenase Activity. *J Agric Food Chem.* 48:2896-2902.

Tewari G., Jayas D.S., Holley R. A. 1999. High Pressure Processing of Foods: an overview. *Science des Aliments.* 19, 619-661.

Yeom H.W., Streaker C.B., Zhang Q.H. and Min D.B. 2000. Effects of Pulsed Electric Fields on the Quality of Orange Juice and Comparison with Heat Pasteurization. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4597-4605.

Waters, 2006. Tiempos de Retención publicados por Waters para Columna YMC carotenoid™. Disponible en www.waters.com

ANEXO 1

Cuestionario de Evaluación de Mango

Nombre:.....

Edad:.....

Hola, somos estudiantes del Tec de Monterrey y estamos realizando un estudio de **Mango**.

1. ¿Acostumbra a consumir mango? Sí No SI CONTESTA NO TERMINAR

2. ¿Qué tan frecuente lo consume cuando es temporada?
 - Una vez o más al día (Continuar) Una vez al mes (Terminar)
 - Dos veces a la semana (Continuar) Una vez cada tres meses (Terminar)
 - Una vez a la semana (Continuar) Menos de una vez c/tres meses (Terminar)

3. ¿Estaría dispuesto(a) a participar en una degustación de Mango? El estudio tomará aproximadamente 5 minutos.

Sí No

.....

ANEXO 2

Cuestionario de Evaluación de Mango

Nombre:.....

Edad:.....

INSTRUCCIONES: Recibirá 4 muestras de mango, las muestras están identificadas con un código de 3 dígitos. Pruebe la muestra y conteste la pregunta para cada una de ellas. Tome agua y coma galleta después de probar cada muestra

Muestra N° _____

	Me gusta muchísimo	Me gusta mucho	Me gusta moderadamente	Me gusta un poco	Ni me gusta ni me disgusta	Me disgusta un poco	Me disgusta moderadamente	Me disgusta mucho	Me disgusta muchísimo
Agrado General	9 ○	8 ○	7 ○	6 ○	5 ○	4 ○	3 ○	2 ○	1 ○

Consumiría usted habitualmente una muestra como esta?

Sí ○

No ○

Muestra N° _____

	Me gusta muchísimo	Me gusta mucho	Me gusta moderadamente	Me gusta un poco	Ni me gusta ni me disgusta	Me disgusta un poco	Me disgusta moderadamente	Me disgusta mucho	Me disgusta muchísimo
Agrado General	9 ○	8 ○	7 ○	6 ○	5 ○	4 ○	3 ○	2 ○	1 ○

Consumiría usted habitualmente una muestra como esta?

Sí ○

No ○

Muestra N° _____

	Me gusta muchísimo	Me gusta mucho	Me gusta moderadamente	Me gusta un poco	Ni me gusta ni me disgusta	Me disgusta un poco	Me disgusta moderadamente	Me disgusta mucho	Me disgusta muchísimo
Agrado General	9 ○	8 ○	7 ○	6 ○	5 ○	4 ○	3 ○	2 ○	1 ○

Consumiría usted habitualmente una muestra como esta?

Sí ○

No ○

Muestra N° _____

	Me gusta muchísimo	Me gusta mucho	Me gusta moderadamente	Me gusta un poco	Ni me gusta ni me disgusta	Me disgusta un poco	Me disgusta moderadamente	Me disgusta mucho	Me disgusta muchísimo
Agrado General	9 ○	8 ○	7 ○	6 ○	5 ○	4 ○	3 ○	2 ○	1 ○

Consumiría usted habitualmente una muestra como esta?

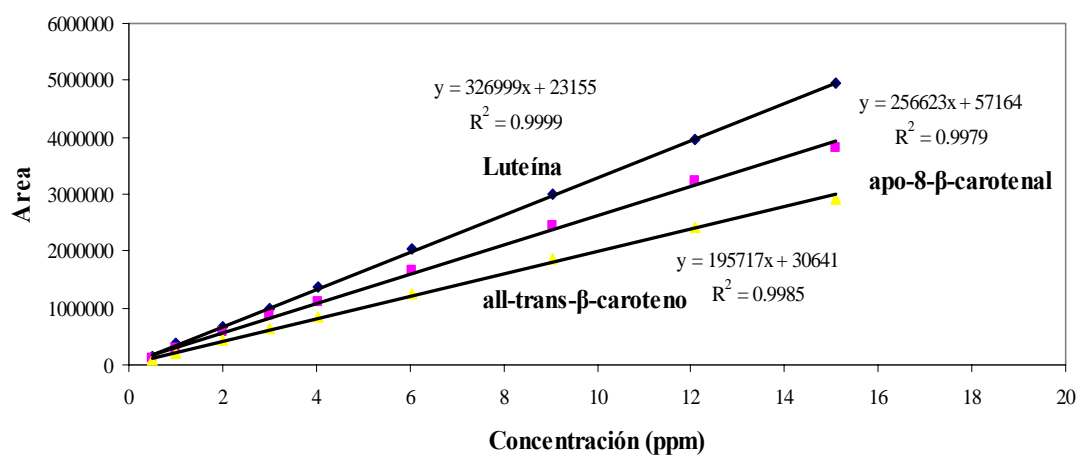
Sí ○

No ○

Comentarios:

MUCHAS GRACIAS!!!!

ANEXO 3

Curva de Calibración de Solución Base de Estándares de Carotenoides Luteína, apo-8-β-carotenal, all-trans-β-carotenal

ANEXO 4

Diagrama de color que ejemplifica la distribución de las tonalidades de acuerdo a su valor a^* y b^* para las muestras de mango procesadas por HHP y almacenadas durante 40 días.

