# Evaluación de la eficacia del tratamiento con ultrasonido para el control microbiológico y fisicoquímico en la pulpa de aguacate: una alternativa para la obtención de alimentos seguros

**Trabajo de Grado para optar al título de**
**Magíster en Innovación Alimentaria y Nutrición**

**Ana María Restrepo Suárez**

**Asesor**

**Ana María Restrepo Duque**

**MSc. Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Facultad de Ingeniería**

**Maestría en Innovación Alimentaria y Nutrición**

**Caldas - Antioquia**
**2018**

## Tabla de Contenido

Lista de Tablas ..... 7

Resumen ..... 8

1 Introducción ..... 10

2 Justificación ..... 13

3 Objetivos ..... 19

3.1 Objetivo general ..... 19

3.2 Objetivos específicos ..... 19

4 Marco teórico ..... 20

4.1 Origen y taxonomía ..... 20

4.2 Aguacate y su relación con la salud ..... 21

4.3 Producción ..... 23

4.4 Clasificación ..... 24

4.5 Procesamiento ..... 27

4.6 Procesos oxidativos en la pulpa de aguacate ..... 29

4.6.1 Polifenoloxidasa (PFO) ..... 29

4.7 Procesamiento y métodos de conservación de la pulpa de aguacate ..... 31

4.7.1 Agentes antipardeamiento ..... 32
4.7.2 Agentes antipardeamiento y reducción de temperatura ..... 32
4.7.3 Altas presiones ..... 33
4.7.4 Agentes antipardeamiento y altas presiones ..... 34
4.7.5 Irradiación ..... 34
4.7.6 Luz Ultravioleta y pulsos de luz ..... 35

4.8 Aplicación del ultrasonido en la industria de alimentos ..... 36

4.9 Aplicación de ultrasonido en la inactivación de microorganismos ..... 40

4.10 Aplicación del ultrasonido en la inhibición enzimática ..... 43

4.10.1 Frecuencia (kHz) ..... 45
4.10.2 Temperatura ..... 46
4.10.3 Ciclo de trabajo ..... 46

4.11 Aplicación de ultrasonido en el procesamiento aguacate ..... 46

5 Metodología ..... 48

5.1 Materia Prima ..... 48

5.2 Pulpa de Aguacate Control (PAC) ..... 50

5.3 Pulpa de Aguacate Pasteurizada (PAP) ..... 50

5.4 Pulpa de Aguacate con aplicación de Ultrasonido (PAU) ..... 51

5.5 Análisis fisicoquímicos de la PAC, PAP y PAU ..... 51

5.5.1 pH ..... 51
5.5.2 Acidez titulable ..... 52
5.5.3 Determinación de color ..... 52
5.5.1 Medición de la actividad enzimática ..... 53

5.6 Análisis microbiológicos de la PAC, PAP y PAU ..... 55

5.6.1 Preparación de la muestra ..... 56
5.6.2 Determinación de *E. coli* ..... 56
5.6.3 Determinación de mohos y levaduras ..... 56
5.6.4 Determinación de mesófilos ..... 57
5.6.5 Determinación de *Salmonella* spp ..... 57

5.7 Diseño Experimental ..... 58

5.7.1 Diseño experimental para pulpa de aguacate con ultrasonido (PAU) ..... 58

5.8 Análisis de datos ..... 59

5.8.1 Modelo regresión logística para análisis microbiológico ..... 59

6 Resultados ..... 61

6.1 Selección y caracterización de la materia prima ..... 61

6.2 Resultados del análisis fisicoquímico de la Pulpa de Aguacate Control (PAC) ..... 63

6.2.1 Caracterización microbiológica de la PAC ..... 65

6.3 Resultados de análisis de PAP y PAU: optimización de parámetros ..... 66

6.3.1 Resultados del análisis fisicoquímicos de la PAP y PAU ..... 66

6.4 Optimización ..... 68

6.4.1 Efecto de los tratamientos de conservación, sobre el pH de la pulpa de aguacate ..... 70
6.4.2 Efecto de los tratamientos de conservación, sobre la acidez de la pulpa de aguacate ..... 72
6.4.3 Efecto de los tratamientos de conservación, sobre el color de la pulpa de aguacate. ..... 74

6.5 Optimización ..... 77

6.5.1 Determinación de la actividad de la polifenoloxidasa (APFO) en la PAP y PAU 85
6.5.2 Optimización ..... 86
6.5.3 Parámetros cinéticos de la polifenoloxidasa extraída de la pulpa de aguacate 90

6.6 Resultados microbiológicos de la (PAP) ..... 93

6.7 Resultados microbiológicos de la (PAU) ..... 94

6.7.1 Análisis de regresión logística para mesófilos, mohos y levaduras ..... 95
6.7.2 Pruebas de Múltiple Rangos para mohos y levaduras y mesófilos ..... 98
6.7.3 Pruebas de Múltiple Rangos para Mesófilos por Tratamiento ..... 98
6.7.4 Pruebas de Múltiple Rangos para mohos y levaduras por Tratamiento 99
6.7.5 Análisis microbiológico de contaminación artificial in vitro ..... 102

6.8 Conclusiones y recomendaciones ..... 104

7 Referencias ..... 106

## Lista de Figuras

Figura 4.1 Producción de los 5 principales países productores (FAO, 2015)..... 23
Figura 4.2 Área cosechada y producción de Aguacate en Colombia (2000 - 2014) (Ministerio de Agricultura, 2016) ..... 24
Figura 4.3 Reacción catalizada por polifenoloxidasa (Nevin-Ridley, 2016)..... 30
Figura 4.4 Esquema de baño de ultrasonido (Bermúdez-Aguirre et al., 2011a)..... 39
Figura 5.1 Proceso de selección y caracterización de las pulpas ..... 49
Figura 6.1 Materia prima recibida para la selección y caracterización ..... 61
Figura 6.2 Aguacate con madurez comercial ..... 62
Figura 6.3 Obtención de pulpa de aguacate ..... 63
Figura 6.4 Representación gráfica de superficie de respuesta (a) y de contornos (b) para el pH ..... 68
Figura 6.5 Representación gráfica de superficie de respuesta (a) y de contornos (b) para la acidez..... 69
Figura 6.6 Resultados pH..... 72
Figura 6.7 Resultados acidez..... 74
Figura 6.8 Parámetros de color L* ..... 77
Figura 6.9 Parámetros de color ∆E ..... 77
Figura 6.10 Representación gráfica de superficie de respuesta (a) y de contornos (b) los parámetros de color L*, a*, b*, y ∆E ..... 78
Figura 6.11 Resultados ΔE ..... 82
Figura 6.12 Color en superficie de pulpas de aguacate ..... 83
Figura 6.13 Representación gráfica de superficie de respuesta (a) y de contornos (b) la actividad de la PFO..... 87
Figura 6.14 Resultados actividad PFO..... 88
Figura 6.15 Absorbancia a 60 min de reacción para los tratamientos..... 89
Figura 6.16 Gráfica del modelo de regresión logística ajustado. Mesófilos, Mohos y levaduras vs Frecuencia (kHz) y tiempo (min) ..... 97

**Lista de Tablas**

Tabla 4.1 Composición de porción comestible aguacate todas las variedades comerciales reporte básico: NBD # 09037 (USDA, 2016) ..... 21
Tabla 4.2 Requisitos microbiológicos para pulpa sin tratamiento térmico según la Resolución 3929/2013 ..... 27
Tabla 4.3 Requisitos microbiológicos para pulpas tratadas según la Resolución 3929/2013 ..... 28
Tabla 4.4 Aplicaciones del ultrasonido como tecnología de sanitización de algunas frutas y vegetales (São José et al.2014) ..... 42
Tabla 5.1 Diseño experimental 2k ..... 58
Tabla 6.1 Resultados fisicoquímicos de la PAC ..... 63
Tabla 6.2 Resultados microbiológico de muestras de pulpa de aguacate control PAC 65
Tabla 6.3 Resultados fisicoquímicos de la pulpa de aguacate sometida a tratamiento de pasteurización y ultrasonido ..... 67
Tabla 6.4 Coeficientes ajustados al polinomio ..... 68
Tabla 6.5 Valores optimizados para los parámetros ..... 70
Tabla 6.6 ANOVA para pH por Tratamiento ..... 70
Tabla 6.7 Tabla ANOVA para la acidez por Tratamiento ..... 72
Tabla 6.8 Análisis de color de la pulpa de aguacate sometida a tratamiento de pasteurización y ultrasonido ..... 74
Tabla 6.9 ANOVA para la L* por Tratamiento ..... 75
Tabla 6.10 ANOVA para la a* por Tratamiento ..... 76
Tabla 6.11 ANOVA para la b* por Tratamiento ..... 76
Tabla 6.12 ANOVA para el $\Delta E$ por Tratamiento ..... 76
Tabla 6.13 Coeficientes ajustados al polinomio ..... 78
Tabla 6.14 Valores optimizados para los parámetros ..... 81
Tabla 6.15 Determinación de la actividad de la PFO ..... 85
Tabla 6.16 Coeficientes ajustados al polinomio ..... 86
Tabla 6.17 Valores optimizados para los parámetros ..... 88
Tabla 6.18 Parámetros cinéticos ..... 90
Tabla 6.19 Resultados microbiológicos para Pulpa de Aguacate Pasteurizada (PAP) . 93
Tabla 6.20 Resultados microbiológicos de Pulpa de Aguacate con aplicación de Ultrasonido (PAU) ..... 94
Tabla 6.21 Análisis de Desviación de parámetros microbiológicos ..... 95
Tabla 6.22 Pruebas de Razón de Verosimilitud ..... 96
Tabla 6.23 Codificación de tratamientos ..... 98
Tabla 6.24 Comparación de múltiples rangos ..... 99
Tabla 6.25 Comparación de múltiples rangos ..... 100
Tabla 6.26 Tabla ANOVA para Mohos y levaduras por Tratamiento ..... 100
Tabla 8.1 Comparación múltiple de las Cinéticas enzimáticas a 200mM ..... **¡Error! Marcador no definido.**

**Resumen**

El aumento en la demanda de productos vegetales frescos o mínimamente procesados, ha retado a la industria de alimentos a trabajar en avances significativos tendientes al control efectivo de microorganismos y características sensoriales indeseables, consecuencia de diferentes reacciones que causan deterioro en las matrices alimentarias. Una de las reacciones, asociada a la apariencia del producto, es el pardeamiento enzimático originada por la enzima polifenoloxidasa, causante de formar pigmentos marrones. En el presente trabajo, se evaluó el uso potencial del ultrasonido y su influencia en las características fisicoquímicas y microbiológicas de la pulpa de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Hass, como una alternativa tecnológica para su conservación. Se realizó la caracterización fisicoquímica y microbiológica de la pulpa de aguacate antes de someterla a cualquier tratamiento de conservación. Se evaluó el efecto del ultrasonido, asociado a la frecuencia (kHz) y el tiempo (min) sobre las variables respuesta: fisicoquímicas y microbiológicas, a partir de un diseño factorial $2^k$ con replica al centro. Se realizó un análisis ANOVA, para determinar diferencias significativas. A partir del tratamiento de ultrasonido, se presentó disminución en la actividad enzimática a una frecuencia de 25 kHz y 10 minutos de 959 unidades de actividad enzimática de PFO del valor óptimo, comparado con el tratamiento de pasteurización. La caracterización microbiológica, indica una disminución en el recuento de mesófilos con una remoción de 0.36 $\log_{10}$UFCg$^{-1}$ con respecto al control, al emplear la frecuencia de 40 kHz por 5 min. La pasteurización inhibe totalmente los

recuentos de microorganismos. Se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p<0,05$). La disminución, tanto en el recuento de mesófilos, como en la actividad enzimática de la polifenoloxidasa, permite pensar en el uso potencial de una tecnología de conservación alternativa (ultrasonido), que podría llegar a reemplazar la aplicación de altas temperaturas, usadas en algunos métodos de conservación convencionales (pasteurización), donde se sugiere (para trabajos posteriores), explorar la aplicación de las ondas ultrasónicas, en combinación con métodos químicos que conduzca a la obtención de un alimento seguro para el consumo humano.

**PALABRAS CLAVE:** ultrasonido, conservación de alimentos, aguacate, polifenoloxidasa, pardeamiento enzimático.

# 1 Introducción

El aguacate *(Persea americana* Mill*)* ocupa un renglón importante en la economía colombiana y su producción se ha incrementado notablemente en los últimos años. Actualmente Colombia, se ubica en la cuarta posición en la producción a nivel mundial (FAO, 2015), aspecto que hace necesario el establecimiento de una ventaja competitiva a través de la apropiación de ofertas tecnológicas y el mejoramiento en los procesos de: manejo agronómico, fitosanitario, cosecha y postcosecha, que garanticen niveles de diferenciación en relación a la calidad del aguacate (Bareño, 2014) y permitan encontrar alternativas de comercialización hacia productos procesados, semi-procesados y en fresco para consumo nacional y de exportación.

En esta búsqueda de alternativas, la industria procesadora de aguacate, durante la obtención de la pulpa, se enfrenta a uno de los principales problemas: el fenómeno de pardeamiento oxidativo, por acción de enzimas como la polifenoloxidasa (PFO), que provoca el desarrollo de una coloración parda que limita la vida comercial y afecta uno de los principales indicadores de calidad en la pulpa como es el color (Bi, Hemar, Balaban, & Liao, 2015; Orozco, Prieto, & Diaz, 2012; Rawson et al., 2011; Zhou, Tey, Bingol, & Bi, 2016). Paralelo a este fenómeno, se requiere minimizar la alteración de la pulpa por el ataque de microorganismos, lo que implica la identificación de las fuentes potenciales de contaminación o proliferación y la aplicación de medidas preventivas. (Asiegbu, Lebelo, & Tabit, 2015; Calderón-Oliver et al., 2016; Iannetti et al., 2016; Maćkiw et al., 2016; Strydom, Vorster, Gouws, & Witthuhn, 2016). El control de microorganismos en productos alimenticios “listos para el consumo” es un reto, especialmente en los alimentos que no pueden someterse a un tratamiento térmico

durante el procesamiento (Strydom et al., 2016), debido a su composición en sustancias bioactivas susceptibles a las altas temperaturas (Chemat, Zill-E-Huma, & Khan, 2011).

Por ésta razón, tecnologías diferentes a los tratamientos térmicos convencionales, han sido usadas en los últimos años para investigar el efecto de su aplicación en el control microbiológico y el control del pardeamiento enzimático por la acción de la polifenoloxidasa en la pulpa de aguacate. Dichas tecnologías utilizan métodos químicos, físicos, o combinación de estos, algunas de ellas se listan a continuación: agentes antipardeamiento (Bustos, Mazzobre, & Buera, 2015; Henríquez Arias, Patiño Gómez, & Salazar, 2012), altas presiones (D. A. Jacobo-Velázquez & Hernández-Brenes, 2010; D A Jacobo-Velázquez & Hernández-Brenes, 2011), pulsos de luz (Ramos-Villarroel, Martín-Belloso, & Soliva-Fortuny, 2011), ultrasonido (Bi et al., 2015), combinación de procesos térmicos y altas presiones (Bermejo-Prada et al., 2014).

La aplicación de varios métodos se conoce como tecnología de obstáculos o métodos combinados, los cuales han demostrado tener una alta eficacia, ya que aprovecha las ventajas de cada uno de los métodos utilizados (Gómez, Welti-Chanes, & Alzamora, 2011).

Algunas de estas tecnologías emergentes (utilizadas para el desarrollo de productos con valor agregado), presentan interesantes avances y desarrollos en la actualidad, pero al mismo tiempo algunos inconvenientes asociados al alto costo de los equipos y el procesamiento de grandes volúmenes de producción (Alzamora, López-Malo, Tapia, & Welti-Chanes, 2016).

Una tecnología usada con éxito para garantizar la calidad, seguridad y vida útil de alimentos, es la aplicación del ultrasonido (Chandrapala, Oliver, Kentish, & Ashokkumar, 2012; Chemat, Zill-e-Huma, & Khan, 2011). Investigaciones reportan que su principio de acción físico compromete la viabilidad de los microorganismos (Char, Mitilinaki, Guerrero, & Alzamora, 2010), así como la actividad de enzimas como la polifenoloxidasa (Delgado-Povedano & Luque de Castro, 2015; Jang & Moon, 2011), sin un incremento considerable de temperatura; condición que no se cumple en la aplicación de tratamientos térmicos convencionales como la pasteurización, donde se ha evidenciado efectos adversos sobre las propiedades nutricionales y características sensoriales del alimento debido las altas temperaturas de proceso (Li & Farid, 2016)

En este sentido, este trabajo pretende evaluar la efectividad de la aplicación de la tecnología de ultrasonido (Robles-Ozuna & Ochoa-Martinez, 2012) como tratamiento alternativo para la conservación de la pulpa de aguacate, comparado con un tratamiento de conservación convencional, sobre parámetros físicos, químicos y microbiológicos que se ven alterados cuando se presentan fenómenos de deterioro en la pulpa, causados por el pardeamiento enzimático y contaminación microbiológica, máxime cuando se realizan operaciones manuales de procesamiento mínimo como: selección, limpieza, pelado, cortado o troceado.

# 2 Justificación

En la última década, las tendencias de la industria de alimentos se han orientado hacia las preferencias de los consumidores por productos, que además del valor nutritivo, aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano, conocidos como alimentos funcionales (Fuentes Berrio, Acevedo Correa, Chantré, & Gelvez Ordoñez, 2015; Kearney, 2010).

Esto obedece a una evidencia cada vez más fuerte de que algunos alimentos contienen componentes bioactivos que cumplen, al igual que los nutrientes esenciales, una función que contribuye a reducir la incidencia de ciertas enfermedades (Pang, Xie, Chen, & Hu, 2012).

La Organización mundial del Salud (OMS) declara que las frutas y verduras son componentes esenciales de una dieta saludable y su consumo está correlacionado con la baja incidencia de algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Bhupathiraju & Tucker, 2011; Bielli, Scioli, Mazzaglia, Doldo, & Orlandi, 2015; Cavallo, Horino, & McCarthy, 2016), enfermedades neurológicas como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (Devore, Kang, Stampfer, & Grodstein, 2010). Estos efectos protectores son atribuidos al alto contenido de compuestos antioxidantes que atrapan los radicales libres y previenen el estrés oxidativo (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

Numerosos estudios han demostrado que la ingesta de 3 a 5 porciones diarias de frutas y verduras podría proteger contra dichas enfermedades. Además, las frutas pueden ser consumidos como parte de las prácticas religiosas y como terapia nutricional en diferentes tradiciones humanas (Chang, Alasalvar, & Shahidi, 2016;

Slavin & Lloyd, 2012).

Según cifras de la FAO, la tasa promedio de consumo per cápita de frutas y hortalizas a nivel global aumentó del 36% al 40% en el último medio siglo, pero en Colombia, estudios del Ministerio de Salud y el Bienestar Familiar han revelado que el 35% de las personas no consumen frutas diariamente y en una mayor proporción el 70% no consume hortalizas (Ministerio de Agricultura, 2015).

Por ésta razón, los entes gubernamentales con el apoyo del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, han decido priorizar algunas cadenas de frutales y hortalizas, donde sus demandas involucran, por ejemplo el incremento en el consumo de ciertos materiales vegetales y ajustes de normativas de importaciones (Sistema de información de gestión y desempeño de organizaciones de cadenas, 2015).

Una de las cadenas priorizadas es la de aguacate, donde parte de su plan estratégico, está encaminado a la implementación de prácticas postcosecha efectivas y con tecnologías adecuadas, acompañadas con el desarrollo de productos agroindustriales a partir de los frutos de aguacate. Así mismo, también se promueve dentro del plan estratégico, el incremento del consumo per cápita de esté fruto (Bernal Estrada et al., 2014).

Por esta razón, el aguacate se convierte en un fruto de interés para los consumidores no solo por su aroma, sabor, color y textura, sino también por los beneficios nutricionales y de salud que se le han atribuido (Ingram, Elks, Davenport, & Roth, 2013). Específicamente, el aguacate Hass domina la industria del aguacate en todo el mundo (Garner, Klein, Zheng, Khuong, & Lovatt, 2011a), prueba de ello es su clasificación como la variedad más cultivada en todo el mundo, con un porcentaje del

80%(“Avocadosource.com,” 2016). Así mismo, el aguacate es una matriz alimentaria de gran interés, por la presencia de compuestos bioactivos como: ácidos grasos mono insaturados, tocoferoles, esteroles, carotenoides y acetogeninas; además de ser fuente de vitamina E, ácido ascórbico, y compuestos fenólicos solubles (Rodríguez-Sánchez et al., 2013; M. Wang, Zheng, Khuong, & Lovatt, 2012), de uso y aplicación no solo para la industria alimentaria, sino también en la industria cosmética y farmacéutica (Chel-Guerrero, Barbosa-Martín, Martínez-Antonio, González-Mondragón, & Betancur-Ancona, 2016; Segovia, Corral-Pérez, & Almajano, 2016).

Las propiedades nutricionales atribuidas al aguacate, son la razón principal para el aumento constante de su demanda y propiciaron la siembra masiva en Colombia, que se evidencia en un incremento notable en la producción en la última década de aproximadamente 303.340 toneladas para el 2013 (Bareño, 2014; FAO, 2015). Lo anterior trajo como consecuencia, un aumento en los productos de menor calibre, que normalmente se comercializan en los mercados domésticos con precios más bajos, por lo que se requiere encontrar alternativas de industrialización. Un volumen de producción apreciable se pierde por defectos de calidad como maduración desigual, pulpa fibrosa así como por sobre maduración, golpes y daños causados a la cáscara por insectos, hongos y bacterias que hacen que se descarte el material vegetal, sin tener en cuenta que la pulpa en el interior podría estar apta para procesamiento y comercialización. Estas pérdidas son constantes y proporcionales al inventario de aguacate fresco disponible para la comercialización (Mejia Hernadez, 2011; Restrepo Duque, Londoño-Londoño, González Alvarez, Benavides Paz, & Cardona Salazar, 2012). Sumado a esto, la exportación del aguacate en fresco presenta graves

inconvenientes relacionados con el cumplimiento de las normas fitosanitarias dispuestas por mercados exigentes como el de Estados Unidos y la Unión Europea, por esta razón la exportación de productos procesados de aguacate, podría ser una alternativa para su comercialización (ICA, 2013; Presidencia de la República, 2015).

La búsqueda de alternativas de comercialización, involucra la aplicación de diferentes operaciones de procesamiento mínimo, realizadas por la industria de manera manual, que pueden llegar a ser una amenaza en la conservación de las características fisicoquímicas y sensoriales del producto, el cual se encuentra susceptible no sólo al ataque de microorganismos (Strydom et al., 2016), sino también a la acción de enzimas como la polifenoloxidasa, que provoca el pardeamiento oxidativo (Bi et al., 2015; Bustos et al., 2015).

En este sentido, uno de los retos para la industria de alimentos, es el desarrollo de productos a partir de excedentes de cosecha de aguacate, que satisfagan las expectativas de los consumidores en relación a la proclama de alimentos inocuos, naturales, con alto valor nutricional, de fácil preparación, características sensoriales deseables y de larga vida útil, teniendo en cuenta que la mayoría de frutas se pueden consumir frescas y su vida de anaquel corta (Sousa-Gallagher, Tank, & Sousa, 2016).

Algunas de las técnicas y metodologías usadas para la conservación de la calidad nutricional, microbiológica y/o sensorial de frutas y hortalizas son: desinfección química, pasteurización, ultra pasteurización (Olaimat & Holley, 2012). Así mismo, se han venido creando campos de investigación en nuevas tecnologías denominadas emergentes de procesamiento y conservación, como métodos alternos a los tratamientos térmicos tradicionales (Li & Farid, 2016), cuestionados por su efecto adverso sobre las

propiedades fisicoquímicas y nutricionales de las matrices alimentarias (Ramos, Miller, Brandão, Teixeira, & Silva, 2013). Algunas de éstas tecnologías son no térmicas: irradiación, altas presiones, pulsos eléctricos, pulsos de luz, ultrasonidos, plasma frio, campos magnéticos. Otras tecnologías son térmicas como el uso de microondas, calentamiento óhmico, y radiofrecuencias (Delgado, Kulisiewicz, Rauh, & Wierschem, 2012; Rawson et al., 2011).

El ultrasonido es una tecnología emergente, usada por sus efectos físicos en el mejoramiento de propiedades tecnológicas de los alimentos, como la capacidad de emulsificación, solubilidad y textura, la homogeneización, la alteración de la viscosidad, extracción, secado, y cristalización (Soria & Villamiel, 2010). Así mismo, promueve la inactivación microbiológica y enzimática (Bermúdez-Aguirre, Mobbs, & Barbosa-Cánovas, 2011; Bilek & Turantaş, 2013; Chemat, Zill-E-Huma, & Khan, 2011; Robles-Ozuna & Ochoa-Martinez, 2012) y ha sido empleada para el procesamiento de alimentos y de pulpa de aguacate (Bi et al., 2015; Hawmann Díaz, 2014), basado en la ventaja que representa sobre los procesos tradicionales, al reducir tiempos de proceso y mejorar atributos de calidad (Awad, Moharram, Shaltout, Asker, & Youssef, 2012). Finalmente, es considerada una tecnología limpia debido a que emplea menos agua, energía y tiempo (Chemat, Zill-e-Huma, et al., 2011).

Por lo anterior, esta investigación plantea la evaluación de la eficacia del tratamiento con ultrasonido en el control microbiológico y fisicoquímico de la pulpa de aguacate, que de ser efectivo, podría ser utilizado como método de conservación alternativo, permitiendo el aprovechamiento de la denominada “producción industrial” (de menor calibre, sobre madura, afectada por golpes y por defectos de calidad como maduración

desigual, pulpa fibrosa y otros) del cultivo de aguacate, para la cual se requiere encontrar alternativas de desarrollo de la cadena de valor, hacia la producción y comercialización de productos elaborados a partir de la pulpa de aguacate, como materia prima para la fabricación de productos como guacamole, salsas y aderezos.

# 3 Objetivos

## 3.1 Objetivo general

Evaluar la eficacia del tratamiento con ultrasonido para el control microbiológico y fisicoquímico en la pulpa de aguacate (*Persea americana* Mill).

## 3.2 Objetivos específicos

Caracterizar la calidad fisicoquímica y microbiológica de la pulpa de aguacate de acuerdo con la normativa vigente.

Establecer las condiciones óptimas para conservar la calidad fisicoquímica y microbiológica de la pulpa de aguacate mediante tratamiento con ultrasonido.

Comparar la calidad fisicoquímica y microbiológica de la pulpa de aguacate sometida a un tratamiento convencional de pasteurización vs tratamiento con ultrasonido, teniendo en cuenta tiempo y frecuencia (onda sónica).

# 4 Marco teórico

## 4.1 Origen y taxonomía

El aguacate (*Persea americana* Mill) es una fruta tropical y subtropical, nativa de américa central, específicamente del sur de México y Guatemala. Pertenece a la familia de las Lauráceas, familia con gran importancia económica, productora de aceites esenciales, como alcanfor (*Cinnamomun camphora*), madera y especias como la canela (*Cinnamomun zeylanicum Ness*) (Bernal Estrada et al., 2014).

Se consume como parte de la dieta de los pueblos indígenas de esa región desde hace más de 5000 años.

El nombre botánico de aguacate es *Persea americana* Mill., del cual se reconocen tres razas ecológicas u hortícolas: la raza mexicana, denominada como *Persea americana* var. *drymifolia*, la raza guatemalteca *Persea americana* var. *guatemalensis*, y la raza de las Indias Occidentales como *Persea americana* var. *Americana* (Cowan & Wolstenholme, 2016).

Entre los cultivares de aguacate comerciales más importantes a causa de la calidad de la fruta están: Hass, Fuerte, Ettinger, y Pinkerton. No obtante,el aguacate Hass domina la industria del aguacate en todo el mundo, debido a su sabor, color y disponibilidad durante todo el año (Garner, Klein, Zheng, Khuong, & Lovatt, 2011b).

Las variedades de aguacate se distribuyen en Colombia de la siguiente manera: aproximadamente el 49% del total del área sembrada, corresponde a aguacates criollos, el 26% corresponde a la variedad Hass y el 25% restante, a aguacates tipo

Papelillo y a otros como Lorena, Santana, Choquette, Booth 8, Semil 40, Edranol y Trinidad (Mejia Hernadez, 2011).

El aguacate se clasifica como climatérico (es decir, que los frutos pueden ser cosechas sin madurar, y luego someterse a ablandamiento normal y maduración), presentando una tasa de respiración acelerada después de recolectado (M. Wang et al., 2012) .

## 4.2 Aguacate y su relación con la salud

El aguacate es reconocido por la Asociación Dietética Americana (ADA, por sus siglas en inglés), como un alimento funcional, debido a su alto valor nutritivo y por sus efectos beneficiosos para la salud humana (ADA, 2009). La composición química de macro y micro nutrientes se resume en la Tabla 4.1 Varios fitoquímicos bioactivos han sido encontrados: antioxidantes tales como vitamina E, compuestos fenólicos, carotenoides como luteína y β-sitosterol así como la mezcla de ácidos grasos ω-3, ω-6 y ω-9, relacionados con la baja incidencia de enfermedad coronaria (ya que reducen las concentraciones colesterol y triglicéridos) y cáncer (Ding et al., 2009; Dreher & Davenport, 2013; Ingram et al., 2013; Rodríguez-Sánchez et al., 2013) .

**Tabla 4.1 Composición de porción comestible aguacate todas las variedades comerciales reporte básico: NBD # 09037 (USDA, 2016)**

| Nutriente | Unidad | 100.0 g |
|---|---|---|
| Agua | g | 73.23 |
| Energía | Kcal | 160 |
| Proteína | g | 2 |
| Lípidos totales (grasa) | g | 14.66 |

| | | |
|---|---|---|
| Carbohidratos, por diferencia | g | 8.53 |
| Fibra total dietaria | g | 6.7 |
| Azúcar, total | g | 0.66 |
| **Minerales** | | |
| Calcio, Ca | m | 12 |
| Hierro, Fe | mg | 0.55 |
| Magnesio, Mg | mg | 29 |
| Fósforo, P | mg | 52 |
| Potasio, K | mg | 485 |
| Sodio, Na | mg | 7 |
| Zinc, Zn | mg | 0.64 |
| **Vitaminas** | | |
| Vitamina C, ácido ascórbico total | mg | 10 |
| Tiamina | mg | 0.067 |
| Riboflavina | mg | 0.13 |
| Niacina | mg | 1.738 |
| Vitamina B-6 | mg | 0.257 |
| Folato, DFE | µg | 81 |
| Vitamina B-12 | µg | 0 |
| Vitamina A, RAE | µg | 7 |
| Vitamina A, IU | IU | 146 |
| Vitamina E (alfa tocoferol) | mg | 2.07 |
| Vitamina D (D2 + D3) | µg | 0 |
| Vitamina D | IU | 0 |
| Vitamina K (filoquinona) | µg | 21 |
| **Lípidos** | | |
| Ácidos grasos, saturados totales | g | 2.126 |
| Ácidos grasos, insaturados totales | g | 9.799 |
| Ácidos grasos, poli insaturados totales | g | 1.816 |
| Colesterol | mg | 0 |

***Basado en variedades de California 86% y Florida 14%***

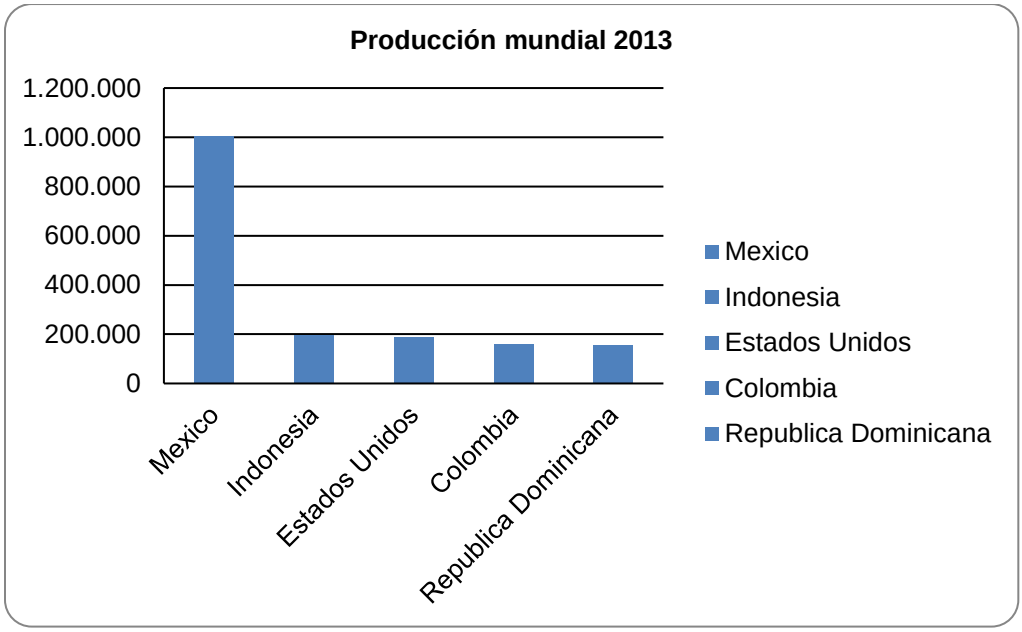
Para el aguacate también se reportan concentraciones de azúcar heptosa (C7), manoheptulosa, y su correspondiente alcohol (perseitol), ambos con actividad anti-cancerígena (Meyer & Terry, 2010)

## 4.3 Producción

Las características nutricionales atribuidas al aguacate han contribuido al incremento de su consumo a nivel mundial y a su vez las áreas destinadas a su producción. Entre las diferentes variedades de aguacate, la variedad Hass es la más cultivada debido a su vida útil más larga y a la alta demanda en los mercados extranjeros (Mexico: Avocado Annual, 2015)

Los datos presentados por la dirección de estadística de la organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura FOASTAT Figura 4.1, muestran que México es el principal productor de aguacate (FAO, 2015).

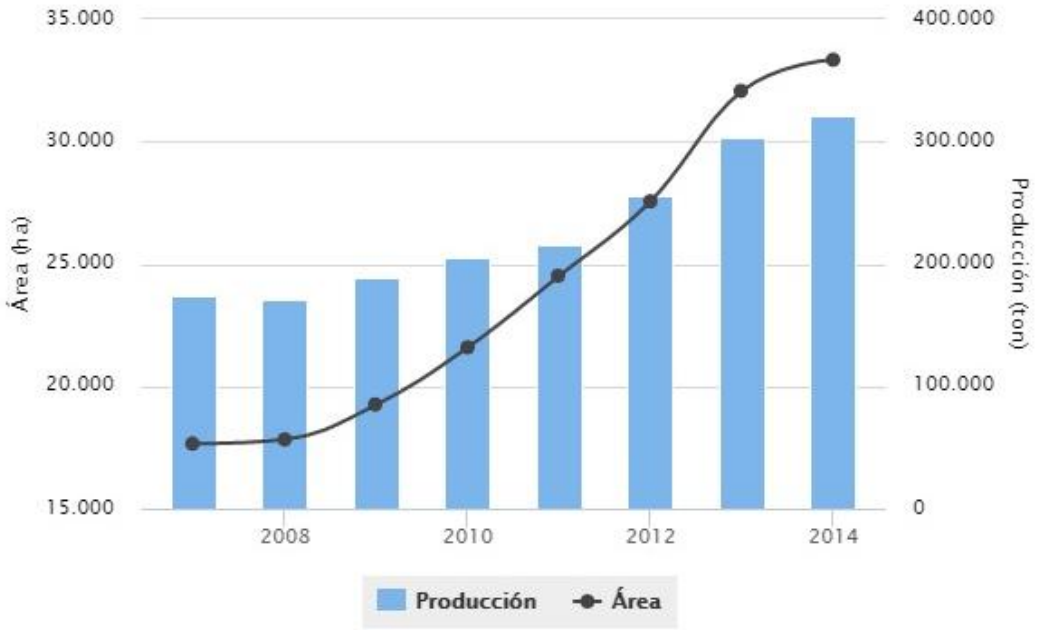
**Figura 4.1 Producción de los 5 principales países productores (FAO, 2015)**




Colombia ocupa el cuarto renglón, su producción para el 2014 fue de 320.629,21 toneladas en un área cosechada de 33.341,26ha, Figura 4.2 (Ministerio de Agricultura, 2016). Se produce en 15 departamentos pero 8 de ellos concentran el 90% de la

producción, 35 municipios agrupan el 80% del área sembrada y solo el 38% corresponde a la variedad Hass que es la variedad que cuenta con mayor potencial para exportación. La producción de aguacate en Colombia es casi que permanente durante el año, debido a que se cultiva en diferentes pisos térmicos, condiciones agronómicas y climatológicas, esto sumado al hecho que existe una gran cantidad de variedades y genotipos criollos (Bareño, 2014).

**Figura 4.2 Área cosechada y producción de Aguacate en Colombia (2000 - 2014) (Ministerio de Agricultura, 2016)**




## 4.4 Clasificación

En Colombia los controles de calidad están reglamentados por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC. En este sentido la Norma técnica colombiana NTC 1248, tiene por objeto establecer los requisitos y los métodos para la clasificación de

los aguacates en categorías de calidad (ICONTEC, 1994). Es así como normaliza sobre la clasificación, disposiciones referentes al calibre y tolerancias. Las características de los aguacates que están destinados a consumo directo fresco y no son sometidos a procesamiento industrial, deben cumplir requisitos mínimos como:

1. Intactos y enteros.
2. Sanos; se excluye la producción afectada por podredumbre o alteraciones que lo hagan inadecuados para el consumo.
3. Limpios, prácticamente libre de cualquier materia extraña visible.
4. Libres de daños causados por bajas temperaturas.
5. Libres de cualquier olor/sabor extraños o ambos.

Las normas del Codex Alimentarius para frutas y hortalizas frescas en su norma para el aguacate CODEX STAN 197-1995 (Codex Alimentarius, 2007) lo clasifican en tres categorías, según se definen a continuación:

*Categoría "Extra"*

Los aguacates de esta categoría deberán ser de calidad superior. Su forma y color deberán ser característicos de la variedad. No deberán tener defectos, salvo defectos superficiales muy leves siempre y cuando no afecten al aspecto general del producto, su calidad, estado de conservación y presentación en el envase.

*Categoría I*

Los aguacates de esta categoría deben ser de buena calidad y poseer el color y la forma característicos de la variedad. Podrán permitirse, sin embargo, los siguientes defectos leves, siempre y cuando no afecten al aspecto general del producto, su calidad, estado de conservación y presentación en el envase:

- Defectos leves de forma y coloración
- Defectos leves de la cáscara (suberosidad, lenticelas ya sanadas) y quemaduras producidas por el sol; la superficie total afectada no deberá superar 4 $cm^2$.

En ningún caso los defectos deberán afectar a la pulpa del fruto. Cuando haya pedúnculo, podrá presentar daños leves.

*Categoría II*

Esta categoría comprende los aguacates que no pueden clasificarse en las categorías superiores, pero satisfacen los requisitos mínimos especificados. Podrán permitirse, sin embargo, los siguientes defectos, siempre y cuando los aguacates conserven sus características esenciales en lo que respecta a su calidad, estado de conservación y presentación:

- Defectos de forma y coloración
-Defectos de la cáscara (suberosidad, lenticelas ya sanadas) y quemaduras producidas por el sol; la superficie total afectada no deberá superar 6 $cm^2$.

En ningún caso los defectos deberán afectar a la pulpa del fruto. Cuando haya pedúnculo, podrá presentar daños.

## 4.5 Procesamiento

La actividad de procesamiento y conservación de pulpas de frutas por parte de la industria, está regulada en Colombia a través de la resolución 003929 por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir las frutas y las bebidas con adición de jugo (zumo) o pulpa de fruta o concentrados de fruta, clarificados o no, o la mezcla de estos que se procesen, empaquen, transporten, importen y comercialicen en el territorio nacional (Ministerio de salud y protección social, 2013a). Donde los requisitos generales de calidad fisicoquímica están dados por el contenido de grados brix y el porcentaje de acidez titulable este criterio no está definido para la pulpa de aguacate. En cuanto a los requisitos microbiológicos se deben cumplir lo estipulado en la Tabla 4.2 para pulpa sin tratamiento térmico y la Tabla 4.3 para pulpas tratadas.

**Tabla 4.2 Requisitos microbiológicos para pulpa sin tratamiento térmico según la Resolución 3929/2013**

| Producto | Requisitos | Parámetro | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | N | M | M | C |
| Pulpa sin tratamiento térmico congeladas o no | Recuento de *E. coli* ufc/g o ml | 5 | <10 | - | 0 |
| | Recuento de mohos y levaduras ufc/g o ml | 5 | 1000 | 3000 | 2 |
| | Detección de *Salmonella*/25g | 5 | Ausencia | - | 0 |

Dónde:

n: número de unidades a examinar

m: índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad

M: índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad

C: número máximo de muestras permisibles con resultado entre m y M

**Tabla 4.3 Requisitos microbiológicos para pulpas tratadas según la Resolución 3929/2013**

| **Producto** | **Requisitos** | **Parámetro** | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **N** | **m** | **M** | **C** |
| Pulpa pasteurizados, congelados o no | Recuento microorganismos mesófilos UFC/g o ml | **5** | 1000 | 3000 | 1 |
| | Recuento de *E coli* UFC/g o ml | 5 | <10 | - | 0 |
| | Recuento de mohos y levaduras UFC/g o ml | 5 | 100 | 200 | 1 |

Dónde:

n: número de unidades a examinar

m: índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad

M: índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad

C: número máximo de muestras permisibles con resultado entre m y M

## 4.6 Procesos oxidativos en la pulpa de aguacate

El aguacate es una fruta con un contenido lipídico relevante, su contenido de aceite es del 15-30% dependiendo de la variedad, está predominantemente constituido por ácidos grasos monoinsaturados (Zhou et al., 2016). Cuando el aguacate se transforma en pasta o se corta, el tejido con sus organelas celulares se somete a una disrupción parcial y libera enzimas tales como la polifenoloxidasa (PFO), causante de formar pigmentos marrones (Woolf et al., 2013). Es así como la mayor parte de los cambios de calidad observados en la pulpa de aguacate, son el resultado de la oxidación enzimática, catalizada por la PFO, y la oxidación de los lípidos, que implica la producción de peróxidos y otros productos secundarios a través de un ataque de oxígeno a los ácidos grasos insaturados (Aguiló-Aguayo, Oms-Oliu, Martín-Belloso, & Soliva-Fortuny, 2014). Asimismo el aguacate contiene otras enzimas tales como la lipooxigenasa (LOX), una oxidoreductasa y la enzima hidroperóxido liasa (HPL), que pueden catalizar la degradación de los lípidos a hidroperóxidos y a su vez generar, sabores desagradables conocidos como off flavors además de la perdida nutricional por la degradación de carotenoides y otros nutrientes (D. A. Jacobo-Velázquez & Hernández-Brenes, 2010).

### 4.6.1 Polifenoloxidasa (PFO)

Polifenoloxidasa (PFO) es el término que usa para referirse a un grupo de enzimas que tienen el cobre como grupo prostético, es decir una metaloenzima. Está ampliamente

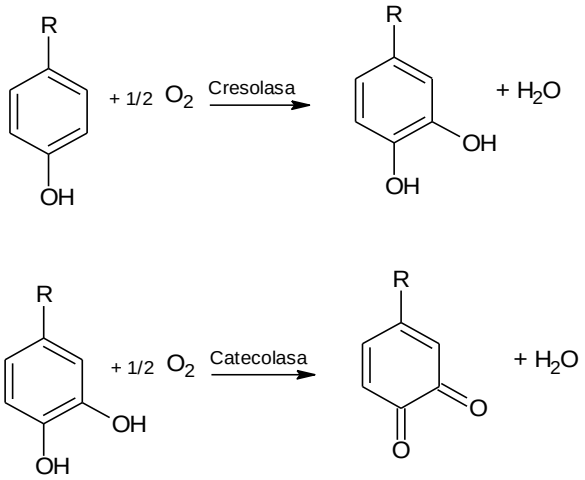
distribuida en la naturaleza, tanto en organismos eucariotas como en procariotas (Mayer, 2006).

Su clasificación EC (EC, por sus siglas en ingles Comisión de enzimas) es como monofenol monooxigenasa o tirosinasa (EC 1.14.18.1) (Mesquita & Queiroz, 2013).

Esta enzima es la causante de las reacciones de pardeamiento enzimático, una alteración que se manifiesta con el cambio de color, sabor e incluso perdida nutricional en frutas y vegetales, impactando negativamente a los consumidores debido a la asociación que hacen entre el color y su calidad nutricional (Nunes, 2015) .

La PFO inicia la reacción de pardeamiento que cataliza la hidroxilación de mono fenoles a orto difenoles (actividad monofenolasa o cresolasa), luego se involucra la difenol oxidasa o catecolasa (EC 1.10.3.1) que cataliza la reacción de los orto difenoles en sus correspondientes orto quinonas (actividad difenolasa) Figura 4.3 (Nevin-Ridley, 2016), estas quinonas se polimerizan para formar complejos oscuros denominados melaninas (Sulaiman, Soo, Yoon, Farid, & Silva, 2015).

**Figura 4.3 Reacción catalizada por polifenoloxidasa (Nevin-Ridley, 2016)**



La PFO se localiza en organelas citoplasmáticas como los cloroplastos, mientras que la mayoría de los compuestos fenólicos se ubican en la vacuola, aislados de la PFO. En este sentido, se requiere algún tipo de daño celular como por ejemplo de la tensión mecánica causada en el manejo post-cosecha para que se dé un incremento en la permeabilidad de las membranas y por consiguiente activación de la PFO latente, la que reaccionaría con los fenoles liberados de la vacuola, en presencia de oxigeno produciéndose el pardeamiento enzimático de frutas y hortalizas (Bustos et al., 2015; George & Christoffersen, 2016; Jang & Moon, 2011).

La inhibición de la PFO en la pulpa de aguacate ha sido objeto de estudio de muchas investigaciones, por lo que se han evaluado diferentes tecnologías tales como la alta presión hidrostática (D. A. Jacobo-Velázquez & Hernández-Brenes, 2010; D A Jacobo-Velázquez & Hernández-Brenes, 2011; Woolf et al., 2013), microondas (Zhou et al., 2016), pulsos de luz (Aguiló-Aguayo et al., 2014), ultrasonido (Bi et al., 2015; Orozco et al., 2012), agentes antipardeamiento (Calderón-Oliver et al., 2016; Guzmán et al., 2002; Weemaes, Ludikhuyze, Van den Broeck, & Hendrickx, 1999) y métodos combinados (Fuentes, Báez, & Díaz, 2009).

## 4.7 Procesamiento y métodos de conservación de la pulpa de aguacate

La transformación del fruto de aguacate usando diferentes metodologías de procesamiento y conservación, permiten darle valor agregado a la agrocadena; sin embargo, algunas de las alternativas involucran la aplicación de calor (método más común para el procesamiento de alimentos), debido a que garantiza la seguridad microbiológica e inactiva las enzimas, mejorando su vida útil (Gómez et al., 2011). Sin

embargo, el tratamiento térmico sobre todo en condiciones severas, puede dar lugar a cambios químicos y físicos que deterioran las propiedades sensoriales y reducen el contenido o la biodisponibilidad de algunos nutrientes. (Li & Farid, 2016).

Actualmente, existe un gran interés en el desarrollo de procedimientos de conservación de alimentos mínimamente procesados, estas técnicas no térmicas puede mejorar la calidad y la vida útil de los alimentos, ya que tienden a tener poco o ningún efecto sobre fitoquímicos esenciales tales como antocianinas, micronutrientes, color, sabor y textura (Char et al., 2010). La combinación de éstas estas tecnologías, denominado procesamiento de obstáculos (Gómez et al., 2011) y sus efectos sinérgicos, han sido demostrados (Delgado et al., 2012) y se han convertido en una alternativa potencial a los métodos convencionales (Knorr et al., 2011).

Se reportan alternativas para la conservación de pulpa de aguacate a través del uso de métodos químicos y físicos, estos son a menudo empleados en combinación, tal como se describe a continuación:

### 4.7.1 Agentes antipardeamiento

Se reporta la incorporación de vitamina C y $Ca^{2+}$ mediante la impregnación al vacío en aguacate Hass mínimamente procesado, donde se logró una disminución del pardeamiento enzimático, conservación de la dureza, menores conteos microbiológicos y mayor grado de aceptación sensorial (Henríquez Arias et al., 2012).

### 4.7.2 Agentes antipardeamiento y reducción de temperatura

Bustos et al., 2015 reporta el uso de extractos de *Allium* y *Brassica* en pulpa de aguacate almacenado a temperatura de refrigeración (4°C), donde la adición del extracto de *Allium* fue más eficaz en la reducción del pardeamiento enzimático durante los primeros días de almacenamiento, en comparación con el extracto de *Brassica*.

### 4.7.3 Altas presiones

La alta presión hidrostática (HHP, por sus siglas en inglés) es un novedoso tratamiento de alimentos no térmico. La HPP se logra mediante la presurización de productos alimenticios contenidos en bolsas flexibles, colocados en un recipiente y sometidos a una alta presión extrema (por lo general más de 600 MPa), que se propaga a través de un medio transmisor (normalmente agua) (Sulaiman et al., 2015). HPP es capaz de evitar el deterioro de los alimentos originados por microorganismos patógenos sin causar una pérdida significativa de los valores sensoriales y nutricionales de los productos alimenticios (Tao, Hogan, & Kelly, 2014); además de su uso en la inactivación enzimas como la PFO y peroxidasas en matrices de gran interés como frutas procesadas. Sulaiman et al., 2015, modelaron la cinética de inactivación de la PFO en puré de pera, manzana y de fresas después del procesamiento de alta presión y en aguacate (Woolf et al., 2013), analizaron los efectos sobre la calidad, la fisiología, la bioquímica y la microestructura de las rebanadas de aguacate al ser sometido a tratamientos de altas presiones, resultando en una reducción de actividad la enzima peroxidasa, particularmente a presiones más altas, mientras que la PFO incrementó la actividad.

### 4.7.4 Agentes antipardeamiento y altas presiones

Jacobo-Velásquez y colaboradores (2013) evaluaron los cambios bioquímicos durante el almacenamiento (45 días, 4°C) de puré de aguacate adicionado con extractos naturales (romero, tomillo y semilla de toronja) y procesado con altas presiones hidrostáticas (600 MPa, 3 min), encontrando que durante los primeros 10 días de almacenamiento, la actividad de polifenoloxidasa se incrementó (2,9 veces) y después regresó a sus niveles originales y algunos extractos naturales inhibieron parcialmente la acción de enzimas oxidativas, lo cual se reflejó en un incremento en la estabilidad del producto (Jacobo-Velázquez et al., 2013).

### 4.7.5 Irradiación

La irradiación de alimentos, es un proceso no térmico que logra la inactivación de los microorganismos mediante la exposición de alimentos a una cierta cantidad de radiación ionizante como los rayos gamma, emitidos desde los radioisótopos 60Co y 137Cs, o electrones de alta energía y rayos X generados a partir de una maquina o fuente natural (Li & Farid, 2016). Dependiendo de la dosis de radiación absorbida, varios efectos pueden lograrse como aumento de la vida útil y mejoramiento de la seguridad microbiológica. Para numerosos propósitos, la irradiación se asemeja a efectos de pasteurización por calor ya que tiene la capacidad de reducir la carga de microorganismos patógenos en los alimentos. Los factores limitantes de esta tecnología son la estimación de las dosis, aspectos técnicos de las instalaciones de uso, control de procesos, y los aspectos legislativos (Farkas, Ehlermann, & Mohácsi-Farkas, 2014). Daiuto y colaboradores (2014) encontraron que el guacamole preparado

a partir de frutos sometidos a irradiación gamma a dosis de 0,2, 0,4, 0,6 y 1,0 kGy mostró menor actividad de PFO y acidez titulable y mayor cantidad de lípidos en comparación con productos sometidos a UV-C durante 5, 10, 15 y 20 min, aunque las cualidades sensoriales no fueron significativamente diferentes. A pesar de que los frutos fueron almacenados congelados hasta 90 días a (10 ± 1C y 90 ± 5 % humedad relativa), se pueden almacenar durante un año sin perder sus cualidades sensoriales Daiuto et al., 2014.

### 4.7.6 Luz Ultravioleta y pulsos de luz

La luz ultravioleta (UV) es la parte del espectro electromagnético entre 100 a 400 nm que se usa como un tratamiento no térmico en alimentos. La radiación ultravioleta es clasificada de acuerdo a la longitud de onda: UV-A, también conocida como radiación del ultravioleta cercano con rangos desde 315 a 400 nm; UV-B, radiación del ultravioleta de rango medio de 280 a 315 nm; y UV-C, ultravioleta lejano, desde 100 a 280 nm. UV-C es la radiación más común aplicada a las frutas y hortalizas frescas. La luz UV se puede usar para inactivar microorganismos, donde el ADN es el objetivo principal (Gómez-López, Koutchma, & Linden, 2012).

Existen fuentes de UV que producen continuamente pulsos de luz, este es un método de preservación que involucra el uso de luz ultravioleta durante cortos tiempos, originando flashes. La tecnología de pulsos de luz utiliza el espectro comprendido entre 200 nm (ultravioleta) a 1000 nm (infrarrojo próximo).

Aguiló-Aguayo y colaboradores (2014), usaron trozos de aguacate recién cortados y los sometieron a tratamientos de pulsos de luz UV por ambos lados (3.6, 6.0 y 14 J/cm2),

con el fin de evaluar su efecto sobre la carga microbiana, el color, la estabilidad de la clorofila y la oxidación de lípidos durante 15 días de almacenamiento a 4°C, encontrando que la dosis más altas de exposición de pulsos de luz, se da lugar a las más altas reducciones en microorganismos mesófilos aerobios (1,20 log UFC/g) y se inhibe la proliferación de levaduras y mohos durante 3 días, prolongando su vida útil microbiológica de hasta 15 días (Aguiló-Aguayo et al., 2014). En el mismo estudio se concluyó, que la fracción lipídica de aguacates frescos cortados sometidos a tratamientos de pulso de luz, exhibió una formación mínima de peróxido y coeficientes de extinción estables a 232 y 272 nm durante 15 días. Estos resultados indican que los tratamientos no resultaron en un aumento de los procesos de enranciamiento, manteniéndose en la fase de inducción.

## 4.8 Aplicación del ultrasonido en la industria de alimentos

Ultrasonido, es el nombre que comúnmente reciben las ondas de sonido con frecuencias más altas que aquellas que pueden ser detectadas por el oído humano (>18kHz). Estas ondas viajan ya sea a través de un material o en su superficie, a una velocidad que es característica de la naturaleza de la onda y el material a través del cual se propaga (Bermúdez-Aguirre, Mobbs, & Barbosa-Cánovas, 2011b).

Algunos investigadores sostienen que durante el ciclo de expansión, las ondas ultrasónicas de alta intensidad producen pequeñas burbujas dentro de los líquidos. Cuando el medio está confinado y no puede disipar fácilmente la energía trasmitida por las ondas, se produce entonces una implosión violenta de las burbujas generándose un fenómeno conocido como cavitación. Durante la implosión se alcanzan temperaturas

del orden de 5000 K, por unos cuantos nanosegundos y presiones de cerca 50 MPa dentro de las burbujas (São José et al., 2014).

En 1930 se identificó al ultrasonido como una nueva tecnología en el procesamiento de alimentos, su aplicación varía dependiendo del tipo de onda que se utilice, bien sea de alta o de baja intensidad. La potencia del ultrasonido aplicada en el tratamiento de alimentos, comprende las ondas sonoras con frecuencias entre 20 y 100 kHz con una intensidad de 10 a 1000 $W/cm^2$ (Szent-Györgyi, 1933).

El ultrasonido de baja intensidad, utiliza ondas con baja amplitud de propagación y niveles de potencia muy bajos ($<1Wcm^{-2}$) que no causan alteraciones físicas ni químicas en el material sobre el cual actúan, por lo cual son conocidas como no destructivas. En el campo de la ingeniería de alimentos, es utilizado como prueba analítica para obtener información importante acerca de las propiedades fisicoquímicas y el estado físico de los alimentos (Awad et al., 2012).

El ultrasonido de alta intensidad, utiliza niveles de potencia más altos (en el rango de $10\text{-}1000Wcm^{-2}$) que generan intensos gradientes de presión, temperatura y corte dentro la matriz sobre la cual actúan y por lo tanto alteran su estructura y reactividad química (Johansson et al., 2016).

Los usos benéficos del ultrasonido, radican en el efecto físico, mecánico y químico que causan sobre el alimento, facilitando fenómenos como el rompimiento celular, la desgasificación de líquidos, la homogenización de emulsiones, la dispersión de materiales agregados, la alteración de la actividad enzimática, la modificación de procesos de cristalización y la destrucción de microorganismos, entre otros (Awad et al., 2012; Bermúdez-Aguirre et al., 2011b). Igualmente, produce radicales libres que

promueven reacciones de oxidación en bebidas alcohólicas, aumenta las reacciones de polimerización y despolimerización por la dispersión temporal de los agregados o por el rompimiento permanente de los enlaces químicos en las cadenas poliméricas, e incrementa las tasas de difusión, por lo que es ampliamente utilizado para acelerar procesos de extracción.De hecho, una nueva rama de la química llamada sonoquímica, se ha creado para tomar ventaja de los efectos químicos del ultrasonido (Chandrapala et al., 2012; Grieser et al., 2015).

El interés por el estudio y la aplicación del ultrasonido de alta intensidad en el procesamiento de alimentos, se ha incrementado en los últimos años (Bilek & Turantaş, 2013), dicho interés radica en su capacidad de inactivar microorganismos y la propiedad de preservar las características fisicoquímicas y nutricionales de los alimentos, gran ventaja frente a los tratamientos térmicos (Brilhante Sao José & Dantas Vanetti, 2012; São José et al., 2014). Además es considerada una técnica de procesamiento sustentable, debido a que emplea menos tiempo, agua y energía (Chemat, Zill-e-Huma, et al., 2011).

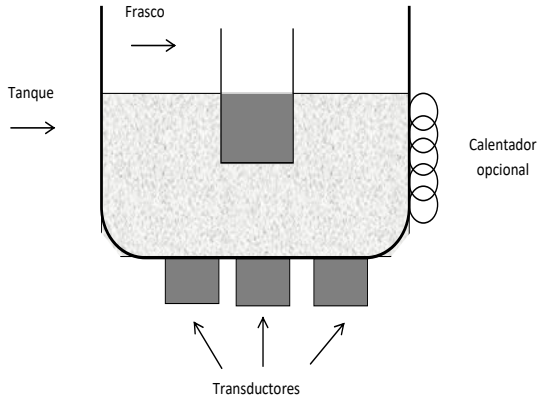
Los parámetros más importantes que hay que tener en cuenta en los tratamientos con ultrasonidos son:

- **Potencia (W):** es la energía por unidad de tiempo del haz de ultrasonido, su unidad es el vatio (W).
- **Frecuencia (kHz):** la frecuencia de una onda de ultrasonido, se define como el número de ciclos o de cambios de los niveles de presión que ocurren en un segundo, la frecuencia seleccionada para la aplicación, afecta a la actividad de cavitación. El tamaño de la burbuja es inversamente proporcional a la frecuencia.

- **La intensidad (W/cm$^2$):** se define como la cantidad de energía por unidad de superficie. La unidad de energía es el Watio (W) y la unidad de superficie por lo general es en cm$^2$. Cuando se incrementa la intensidad de la onda sonora, se aumentan los desplazamientos, el tamaño y el número de ecos.

Los equipos disponibles de ultrasonido, difieren principalmente en el diseño del generador de potencia, el tipo de transductor utilizado y el reactor al que está acoplado. Cualquier diferencia entre los diseños de laboratorio y planta piloto, pueden producir resultados diferentes en las aplicaciones del ultrasonido (Bermúdez-Aguirre et al., 2011a). Los equipos típicamente usados a escala de laboratorio son los baños de ultrasonido Figura 4.4, los cuales tienen transductores situados en las paredes y/o en la base del tanque, y la energía ultrasónica es aplicada directamente en el líquido. Por lo general, este tipo de ultrasonido funciona a aproximadamente 40 kHz y produce altas intensidades a niveles fijos. En el baño de ultrasonido, se liberan las frecuencias a través de un mecanismo que produce un campo de cavitación más uniforme y reduce las ondas estacionarias.

**Figura 4.4 Esquema de baño de ultrasonido (Bermúdez-Aguirre et al., 2011a)**



## 4.9 Aplicación de ultrasonido en la inactivación de microorganismos

La frecuencia de las onda de ultrasonido utilizadas para la inactivación de microorganismos es de 20 a 100 kHz y el principal mecanismo propuesto es el fenómeno de cavitación (Chandrapala et al., 2012). Durante la cavitación se libera gran cantidad de energía en forma de presión, favoreciendo los procesos de transferencia de masa y diferentes reacciones químicas, especialmente de óxido-reducción, incluyendo la formación de radicales libres y peróxido de hidrógeno, que tiene propiedades bactericidas (Grieser et al., 2015). Este fenómeno genera un incremento en la permeabilidad de las membranas biológicas, haciendo que se pierda completamente su selectividad y se alteren las propiedades de transporte de masa del sistema. Algunos autores han consideraron que el esfuerzo cortante y la presión generada por la cavitación sobre la membrana celular, hacen que esta se rompa totalmente provocando lisis celular (Char et al., 2010; São José et al., 2014).Las bacterias gram-positivas son reconocidas como más resistentes que las bacterias gram-negativas, ya que tienen paredes celulares más gruesas que protegen contra los efectos del ultrasonido; las diferencias en la sensibilidad de las células también pueden ser debido a una capa más fuertemente adherente de peptidoglicano en las células gram-positivas (Drakopoulou, Terzakis, Fountoulakis, Mantzavinos, & Manios, 2009; Li & Farid, 2016).

El ultrasonido es utilizado solo o en combinación con otros tratamientos como presión, temperatura y tratamientos químicos, para la inactivación de microorganismos en alimentos. Así, el ultrasonido utilizado como método alternativo en la pasteurización de la leche, ha demostrado ser eficaz para la destrucción de *E. coli, Pseudomonas*

*fluorescens y Listeria monocytogenes* con ningún efecto perjudicial sobre el contenido de la caseína total (Cameron, McMaster, & Britz, 2010).

Así mismo, la aplicación del ultrasonido asistido con fluidos supercríticos, donde la combinación de dióxido de carbono supercrítico (SC-$CO_2$) y ultrasonido de alta potencia se ha desarrollado para los propósitos de inactivación microbiológica/enzimática, en diferentes condiciones de proceso para matrices líquidas y sólidas, ha demostrado ser eficaz en la inactivación de una gran variedad de microorganismos *(E. coli, Enterococcus faecalis, S. cerevisiae)* (Benedito, Ortuño, Castillo-Zamudio, & Mulet, 2015). Se ha evidenciado su efectividad en la inactivación de los microorganismos en medio de cultivo compuesto por caldo Luria Bertani (LB), jugo de manzana y naranja (Ortuño, Martínez-Pastor, Mulet, & Benedito, 2012), agua de coco (Cappelletti, Ferrentino, & Spilimbergo, 2014), jamón cocido (Ferrentino & Spilimbergo, 2016), jugo de naranja y manzana (Ortuño et al., 2012; Ortuño, Martínez-Pastor, Mulet, & Benedito, 2013).Adicionalmente, se observó un efecto sinérgico significativo en la inactivación microbiológica requiriendo un tiempo menor en tratamientos combinados que en tratamientos individuales en el caldo LB y agua de coco (Cappelletti et al., 2014; Ortuño et al., 2012)

En la Tabla 4.4 se presenta el resultado de varios estudios en el cual se aplica el ultrasonido en frutas y vegetales para reducir el recuento de microorganismos.

## Tabla 4.4 Aplicaciones del ultrasonido como tecnología de sanitización de algunas frutas y vegetales (São José et al.2014)

| Microorganismo | Condiciones | Alimento | Tiempo/°C | Reducción | Referencias |
|---|---|---|---|---|---|
| *E. coli* O157: H7 | US 40 kHz + ácido láctico (2%) | Lechugas orgánicas | 5 min/20 °C | 2.75 log UFC.$g^{-1}$ | Sagong et al. (2011) |
| *Salmonella* Typhimurium | | | | 2.71 log UFC.$g^{-1}$ | - |
| *L. monocitogenes* | | | | 2.50 log UFC.$g^{-1}$ | - |
| Mesofilos aerobios | US 40 kHz + $ClO_2$ | Ciruelo japonés | 10 min/20 °C | 3.0 log UFC.$g^{-1}$ | Chen and Zhu (2011) |
| Mesofilos aerobios | US 35 kHz | | 10 min/4 °C | 1 log UFC.$g^{-1}$ | Rivera et al. (2011) |
| *Penicillium expansum* | US 40 kHz + ácido salicílico (0.05 mM) | Fruta de melocotón | 10 min/20 °C | Reduce el moho azul en fruta del melocotón | Yang et al. (2011) |
| *Salmonella* Typhimurium | US 40 kHz + 40 mg $L^{-1}$ | Tomates cherry | 10 min/24 °C | 4 log UFC $g^{-1}$ | São José and Vanetti (2012) |
| ATCC 14028 | ácido peracético | | | | |
| *Esporas deBacillus cereus* | US 40 kHz + 0.1% Tween 20 | Lechuga | 5 min/20 °C | 2.49 log UFC $g^{-1}$ | Sagong et al. (2013) |
| | | Zanahorias | | 2.22 log UFC $g^{-1}$ | |
| *E. coli* | US 37 kHz | Lechuga | 30 min/no informado | 2.30 log UFC $g^{-1}$ | Birmpa et al. (2013) |
| *S. aureus* | | | 30 min/no informado | 1.71 log UFC $g^{-1}$ | |
| *S. Enteritidis* | | | 30 min/no informado | 5.72 log UFC $g^{-1}$ | |
| *L. innocua* | | | 30 min/no informado | 1.88 log UFC $g^{-1}$ | |
| *E. coli* | US 37 kHz | Fresa | 30e45 min/no informado | 3.04 log UFC $g^{-1}$ | Birmpa et al. (2013) |
| *S. aureus* | | | 30e45 min/no informado | 2.41 log UFC $g^{-1}$ | |
| S. Enteritidis | | | 30e45 min/no informado | 5.52 log UFC $g^{-1}$ | |
| *L. innocua* | | | 10 min/no informado | 6.12 log UFC $g^{-1}$ | |
| *E. coli* O157:H7 | US 40 kHz + agua desionizada | Col china | 3 min/23 T 2 °C | 2.60 log UFC $g^{-1}$ | Forghani and Oh (2013) |
| | + inmediato | Lechuga | | 2.50 log UFC $g^{-1}$ | |
| | lavado con agua | Hoja de sésamo | | 2.33 log UFC $g^{-1}$ | |
| | | Espinaca | | 2.41 log UFC $g^{-1}$ | |
| *L. monocitogenes* | US 40 kHz + agua desionizada | Col china | 3 min/23 T 2 °C | 2.80 log UFC $g^{-1}$ | Forghani and Oh (2013) |
| | + inmediato | Lechuga | | 2.60 log UFC $g^{-1}$ | |
| | lavado con agua | Hoja de sésamo | | 2.40 log UFC $g^{-1}$ | |
| | | Espinaca | | 2.49 log UFC $g^{-1}$ | |

US: Ultrasonido

## 4.10 Aplicación del ultrasonido en la inhibición enzimática

La inactivación enzimática es muy importante para los alimentos debido a que confiere su estabilidad bioquímica durante el procesamiento y almacenamiento (Guerrero, 2009). Aunque la inactivación puede lograrse mediante el tratamiento térmico, hay una serie de casos en los que la alta resistencia al calor de algunas enzimas hace que estos tratamientos no sean la solución del problema. Además, la aplicación de calor puede modificar negativamente propiedades de los alimentos, tales como sabor, color o el aporte nutricional (Delgado et al., 2012). Los procesos térmicos como el escaldado, tienen como objeto inactivar las enzimas responsables del deterioro durante el almacenamiento de los alimentos. A diferencia de otros procesos, el escaldado no destruye los microorganismos ni alarga la vida útil de los alimentos. Es una técnica previa a un segundo tratamiento de conservación (Xin, Zhang, Xu, Adhikari, & Sun, 2015).

El modo de acción del ultrasonido en la inhibición enzimática, es similar a la inactivación de microorganismos. El fenómeno de cavitación es completamente dependiente de la frecuencia de las ondas de ultrasonido aplicadas y es el causante del efecto del ultrasonido sobre las enzimas y sus mecanismos de reacción, a través de la generacion de catálisis enzimática: activando o desactivando los catalizadores que intervienen en la reacción a través de tres elementos: el primero es netamente térmico, debido a las altas temperaturas en microzonas de la matriz, el otro efecto es debido a la generación de radicales libres originado por la reacción físico-química denominada sonólisis, en la que se disocia el agua ($H_2O$) en especies altamente oxidantes como el radical hidroxilo (-OH·). El tercer efecto es causado por las fuerzas mecánicas, las

fuerzas de corte, originado por microcorrientes (Delgado-Povedano & Luque de Castro, 2015). Se han reportado resultados de inhibición enzimática cuando se generan las micro burbujas las cuales colapsan violentamente, ocasionando un aumento de la temperatura y la presión en la zona circundante (Grieser et al., 2015).

La producción de radicales libres como el -OH· podrían recombinarse con residuos de aminoácidos de las enzimas, estos residuos están asociados con la estabilidad de la estructura, la unión del sustrato, y funciones catalíticas (São José et al., 2014). En el caso de los microorganismos, la ruptura de la membrana celular es la principal causa de inactivación (Bermúdez-Aguirre et al., 2011b). La alteración de los tejidos es importante, ya que genera una mayor área de contacto entre las enzimas y los radicales.

Típicamente, las enzimas se pueden desnaturalizar fácilmente por ligeros cambios en las condiciones ambientales, como la temperatura, la presión, cizallamiento, estrés, pH y fuerza iónica. Por ejemplo, la actividad enzimática de la PFO, se incrementa cuando aumenta la temperatura hasta alrededor de 60°C, donde alcanza un nivel máximo conocido como la temperatura óptima para la acción enzimática. A temperaturas más altas se observa una considerable disminución en la actividad debido a la desnaturalización de su estructura proteica, así su actividad biológica se pierde (Mesquita & Queiroz, 2013).

Los primeros estudios sobre la inactivación enzimática mediante el uso del ultrasonido fueron llevados a cabo hace más de 70 años, donde Chambers y Flosdorf (1936),

reportaron que la pepsina pura es inactivada probablemente como resultado de la cavitación.

El uso del ultrasonido solo o en combinación con calor (termosonicación), presión (manosonicación) o su combinación (manotermosonicación), o con el uso de conservantes, ha demostrado ser eficaz en la inactivación de las enzimas. Así, la investigación sobre el efecto combinado de los cambios de actividad de PFO y peroxidasas, enzimas responsables del pardeamiento en la manzana recién cortada con la aplicación de ultrasonido y ácido ascórbico, presentan inactivación; mientras que en el tratamiento individual con ultrasonido o ácido ascórbico, el efecto inhibidor es limitado (Jang & Moon, 2011).

Los parámetros que más influyen en los tratamientos de ultrasonido en las enzimas son:

### 4.10.1 Frecuencia (kHz)

Los equipos de ultrasonido pueden ser de frecuencia variable, abarcando un rango estrecho o amplio de frecuencias. Ejemplos de estos es un dispositivo que funciona a los 18, 20, 24, 26, y 29 kHz, con diferentes sondas (Z. Wang et al., 2012).

Xiao y colaboradores (2011) encontraron pocas o ninguna diferencia en estos casos para las diferentes frecuencias de ultrasonido aplicadas cuando se trabaja con la misma potencia durante la acilación regioselectiva de troxerutina, un flavonol con conocido efecto vasoprotector catalizada por la proteasa alcalina de Bacillus subtilis bajo ultrasonido y agitación donde se obtuvo una serie de ésteres de troxerutina monosustituidos. Mayores diferencias se encontraron cuando el rango de frecuencia

del ultrasonido es más amplio, como es el caso de un baño de ultrasonido de 40, 80 y 100 kHz, y las potencias de 100, 150 y 200 W, con los mejores efectos en la transesterificación en 80 kHz y 150 W (Xiao, Yang, Mao, Zhao, & Lin, 2011).

### 4.10.2 Temperatura

La influencia de la temperatura está relacionada con la actividad enzimática (Jian, Wenyi, & Wuyong, 2010) para el caso de las enzimas α-amilasa y amiloglucosidasa, un aumento de la temperatura en presencia de ultrasonido hasta 50°C, incrementa la actividad enzimática.

La energía de activación de ambas enzimas con el tratamiento de ultrasonido se redujo considerablemente, haciendo posible la hidrólisis de almidón a bajas temperaturas tales como 30°C (Leaes et al., 2013; Subhedar & Gogate, 2014).

### 4.10.3 Ciclo de trabajo

Debido a que la exposición continua a las ondas sonoras puede generar la desnaturalización de las enzimas, el tiempo total de exposición de las ondas de ultrasonido en la matriz en un ciclo se denomina como ciclo de trabajo y se expresa en porcentaje. (Avhad, Niphadkar, & Rathod, 2014; Sutar & Rathod, 2015) por ejemplo, para obtener un ciclo de trabajo del 50% para un ciclo de 20 min, el ultrasonido se tiene que aplicar durante 10 min y luego apagarlo durante 10 min.

## 4.11 Aplicación de ultrasonido en el procesamiento aguacate

Varios reportes se han encontrado en literatura sobre el uso del ultrasonido en el procesamiento de aguacate. Bi et al., (2015), investigaron el efecto del tratamiento con

ultrasonido sobre el tamaño de partícula, color, viscosidad, actividad de la PFO y la microestructura en el puré de aguacate diluido. Los tratamientos se llevaron a cabo a 20 kHz (375 W/cm$^2$) en un tiempo de 0 a 10 min. La actividad de la PFO aumentó en gran medida en todas las condiciones de tratamiento. Un incremento máximo de 25,1%, 36,9% y 187,8% en la actividad PFO se encontró en las muestras con relaciones de dilución de 1:2, 1:5 y 1:9, respectivamente. También se ha usado el ultrasonido en combinación con agentes antipardeamiento, donde se determinó el efecto del tiempo de tratamiento con ultrasonido (40 kHz), a diferentes concentraciones de ácido cítrico (0,5% - 2 % p/p) y sal (0.5 % - 2 % p/p), sobre la actividad de la PFO en pulpa de aguacate en un tiempo de 10 a 30 min, posteriormente, se almacenó por 24 horas a 12 °C; luego, se evaluó la actividad de la PFO donde se observó que el tratamiento con ultrasonido no tiene un efecto significativo. A mayor concentración de ácido cítrico, se observa un efecto significativo negativo y la concentración de sal tiene un efecto significativo positivo (Hawmann Díaz, 2014).

# 5 Metodología

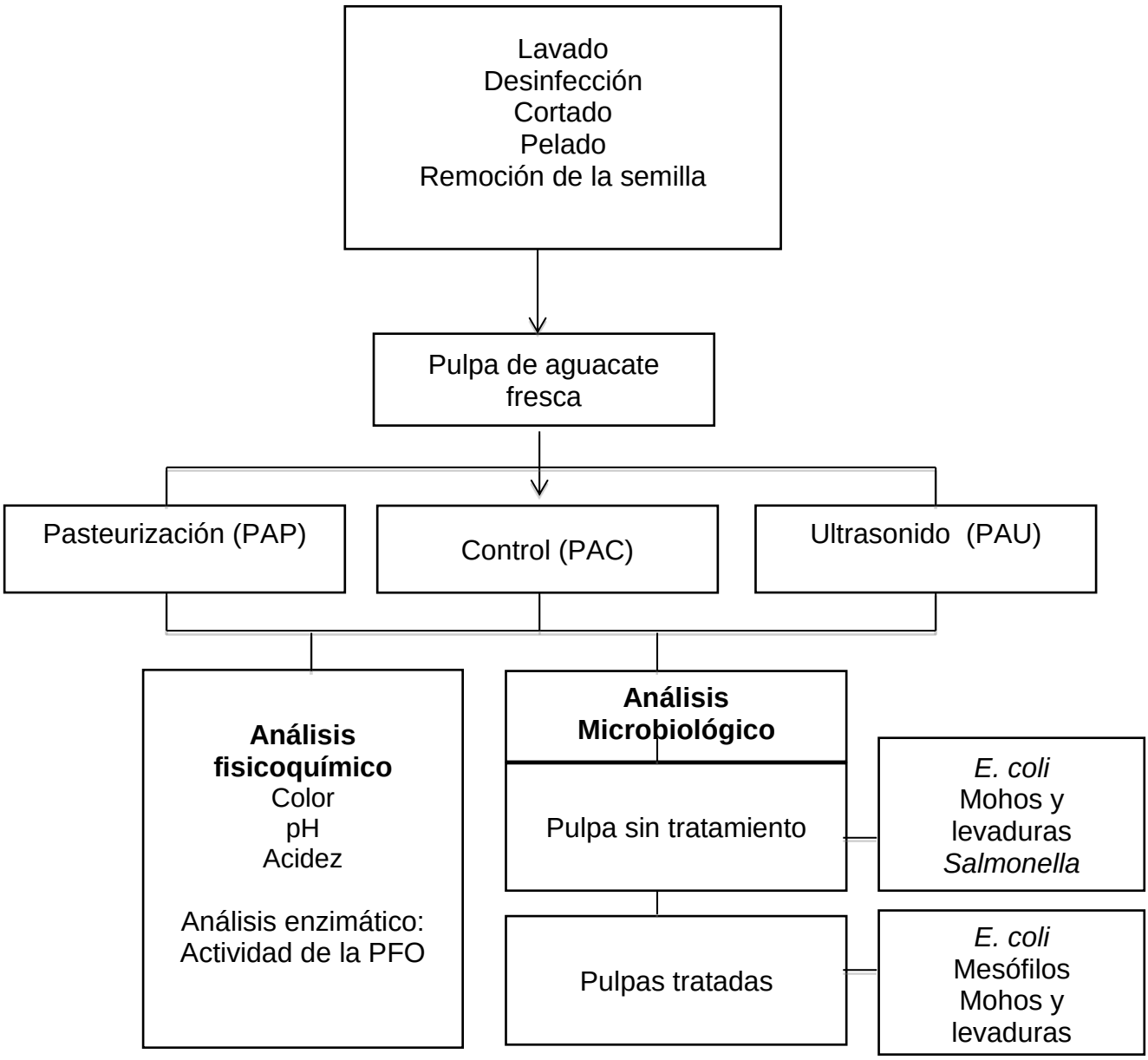
## 5.1 Materia Prima

Se utilizó aguacate (*Persea amaricana* Mill) var. Hass, de la denominada: “producción industrial”, suministrados por la distribuidora Dihass ubicada en Rionegro, localizada a 2.200 msnm y con temperatura media de 15°C, certificada en normas BPA (Buenas Prácticas Agrícolas).

Los aguacates utilizados, se seleccionaron con base en las especificaciones dadas en la NTC 5209 (ICONTEC, 2003): con un calibre tipo B, peso entre 121-180g, en estado maduro y fresco, descartando frutos abollados y con cicatrices superficiales. Se adelantaron operaciones de procesamiento manual a través del lavado, desinfección con una solución de hipoclorito de sodio a 200ppm, cortado, remoción de la semilla y homogenización para obtener la pulpa, la cual se empacó en bolsas plásticas selladas de polipropileno de alta densidad con 200g de muestra y posteriormente refrigerada a 4°C para ser procesadas inmediatamente. De ésta materia prima sometida a operaciones de procesamiento mínimo, se obtuvieron 3 tipos de pulpa (PAC: Pulpa de Aguacate Control, PAP: Pulpa de Aguacate Pasteurizada, PAU: Pulpa de Aguacate con aplicación de Ultrasonido), a las cuales se les realizó análisis fisicoquímico y microbiológico, tal como se reporta en la Figura 5.1. Las pruebas fisicoquímicas fueron realizadas en la Corporación Universitaria Lasallista y las pruebas microbiológicas fueron realizadas en la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia en el laboratorio LACMA.

Todo el proceso se llevó a cabo, siguiendo los principios de higiene y desinfección descritos en el Decreto 3075 de 1997 (República de Colombia, 1997) para procesamiento de alimentos y Resolución 2674 - 2013 (Ministerio de salud y protección social, 2013b). Además, se lavó y desinfectó cualquier superficie y herramienta en contacto con la fruta.

**Figura 5.1 Proceso de selección y caracterización de las pulpas**



## 5.2 Pulpa de Aguacate Control (PAC)

Se denominó PAC, a la pulpa de aguacate fresca obtenida de las operaciones de procesamiento mínimo.

Muestras de 200g de pulpa de aguacate fresca fueron sometidas a análisis fisicoquímicos (pH, acidez titulable, color de acuerdo con el sistema CIE, medición de la cinética enzimática de la PFO) y análisis microbiológicos (*E. coli, Salmonella,* Mohos y levaduras), exigidos por la Resolución 3929/13 para pulpas sin tratamiento térmico (Ministerio de salud y protección social, 2013a).

Los análisis fueron realizados por triplicado.

## 5.3 Pulpa de Aguacate Pasteurizada (PAP)

Se denominó PAP, a la pulpa de aguacate fresca empacada en bolsas plásticas de polipropileno, sometida a proceso de pasteurización, a una temperatura de 65°C, durante 20 minutos, utilizando un baño de María y posterior baño de agua/hielo para generar un choque térmico (Zhao et al., 2013).

Muestras de 200g de PAP fueron sometidas a análisis fisicoquímicos (pH, acidez titulable, color de acuerdo con el sistema CIE y la medición de la cinética enzimática de la PFO) y análisis microbiológicos (*E. coli*, Mesófilos, Mohos y levaduras), exigidos por la Resolución 3929/13 para pulpas sometidas a tratamiento térmico (Ministerio de salud y protección social, 2013a).

Los análisis fueron realizados por triplicado.

## 5.4 Pulpa de Aguacate con aplicación de Ultrasonido (PAU)

Se denominó PAU, a la pulpa de aguacate fresca sometida a tratamiento de ultrasonido, donde muestras de 200g de pulpa, fueron sumergidas en un baño de ultrasonido SB-300 DTY (Ningbo Scientz Biotechnology Co., Ltd., Ningbo, China) de 10 L de capacidad, con agua como medio dispersivo de las ondas, para evaluar el efecto de la frecuencia (kHz) y el tiempo (min) sobre variables fisicoquímicas (pH, acidez titulable, color de acuerdo con el sistema CIE y la medición de la cinética enzimática de la PFO) y análisis microbiológicos (*E. coli*, Mesófilos, Mohos y levaduras), exigidos por la Resolución 3929/13 para pulpas sometidas a tratamiento térmico (Ministerio de salud y protección social, 2013a). La temperatura se mantuvo a 20°C, haciendo circular agua fría a través de la adición al tanque, para controlar el calentamiento total debido a la energía liberada por el ultrasonido. Las mediciones se realizaron para los ensayos determinados por el diseño experimental, para un total de 14 muestras, sometidas de manera independiente a tratamientos con ultrasonido. Una vez aplicada la condición de frecuencia y tiempo, se evaluaron las variables respuesta descritas anteriormente.

## 5.5 Análisis fisicoquímicos de la PAC, PAP y PAU

Las muestras de pulpa de aguacate (PAC, PAP y PAU), fueron analizadas por triplicado tal como lo describen las variables fisicoquímicas que se mencionan a continuación, los reactivos empleados grado analítico marca Merck.

### 5.5.1 pH

El pH se determinó con un pHmetro marca Metrohm, en forma directa sobre 50 g de

pulpa, mediante el método AOAC 981.12 (1990).

### 5.5.2 Acidez titulable

Se midió la acidez titulable, usando la ecuación 1 descrita en el método volumétrico: AOAC 22.070(1990), para una solución homogénea preparada con 1g de pulpa de aguacate y 100 mL de agua destilada y como agente titulante, una solución de hidróxido de sodio 0,1 N.

$$\%Acidez = \frac{V \times N \times F}{W} \times 100 \qquad [1]$$

Dónde:

V: volumen de NaOH gastados en la titulación, en mililitros.

N: normalidad de la Solución de Hidróxido de Sodio.

W: peso de la muestra en gramos.

F: mili equivalente de ácido predominante

### 5.5.3 Determinación de color

El color se determinó usando las coordenadas RGB en un analizador de color modelo RGB-1002, marca Lutron, con geometría de medición: iluminación circular de 45°/0° para 45° medición para 0° (León, Mery, Pedreschi, & León, 2006). Posteriormente se obtuvieron los parámetros L*, a* y b* de acuerdo con el sistema CIE con el software del

equipo. Donde los valores de L* corresponde a la luminosidad, a* a la intensidad de verde a rojo, b* a la intensidad de amarillo a azul y ∆E*, al cambio global de los tres parámetros anteriores. Así, entre más alto L* mayor luminosidad, entre menor el valor de a*, mayor intensidad de verde y menor de rojo, entre mayor sea b*, mayor intensidad de amarillo y menor de azul y entre menor ∆E, menor será el cambio global en el color con respecto a una muestra de referencia para nuestro caso el aguacate sin tratamiento (Pathare, Opara, & Al-Said, 2013)

### 5.5.1 Medición de la actividad enzimática

La medición de la actividad enzimática de la PFO está dada por su cinética; de esta forma se puede evaluar su disminución o inhibición del pardeamiento enzimático.

Las medidas se efectuaron sobre la pulpa recién tratada, ya que la actividad puede verse afectada durante el almacenamiento por la desnaturalización de la enzima (Arpaia, Collin, Sievert, & Obenland, 2015; M. Wang et al., 2012).

Para la extracción y análisis de la actividad de la PFO se siguió el procedimiento descrito por Pizzocaro, Torreggiani, & Gilardina, 1993; Woolf et al., 2013 con algunas modificaciones.

**Extracción de la enzima:** 4g de pulpa de aguacate, 20mL de buffer de fosfato (pH 7.0) y 0.4g de polivinilpirrolindona (PVP) como reactivo usado para precipitar los polifenoles, fueron homogeneizados y filtrados utilizando papel filtrante, para posterior centrifugación a 12000 rpm durante 20 minutos. Se separó el sobrenadante de éste proceso, que contenía el extracto enzimático crudo.

**Ensayo de actividad:** La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente con un espectroflurometro Synergy HT (Biotek instruments Inc, USA), midiendo la absorbancia a 420 nm cada min durante 1h de la mezcla de reacción, ésta se preparó con 240 µL de buffer fosfato pH 7.0, 30 µL del extracto enzimático crudo y por último agregando 30 µL de sustrato L-DOPA 200 mM. Usando la porción lineal obtenida del grafico de absorbancia en función del tiempo para el cálculo de la actividad de la PFO. La actividad enzimática fue reportada como unidades enzimáticas (UPFO), y está definida como el cambio de 0.001 $\Delta Abs_{420}$/min expresado por gramo según la ecuación 2.

$$\frac{UPFO}{g} = \frac{Ax60xV}{vx0.001xm} \qquad [2]$$

Dónde:

UPFO/g: actividad enzimática, definida como el cambio de 0,001 en el valor de absorbancia por minuto y expresado por gramo

A: absorbancia de la muestra, adimensional

V: volumen de la muestra homogenizada con buffer, total (ml)

v: volumen del extracto enzimático usado en la reacción, alícuota (ml)

m: masa de aguacate empleada para preparar el extracto enzimático (g)

**Los parámetros cinéticos** $K_M$ y $V_{máx}$ fueron obtenidos analizando la cinética enzimática tipo Michaelis-Menten usando el paquete estadístico *GraphPad Prism* versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

La velocidad a la cual la PFO cataliza la reacción, es la denominada actividad enzimática. Esta puede ser medida por la velocidad de formación de productos o desaparición de reactivos en presencia de una cantidad de enzima dada (Sulaiman et al., 2015).

Se midió la variación en la actividad de la polifenoloxidasa en función de la concentración de sustrato utilizando (L-Dopa) en estas concentraciones: 10, 50, 100, 150 y 200 mM, y la mezcla de reacción dada por 240 µL de buffer fosfato pH 7.0 y 30 µL del extracto enzimático crudo.

## 5.6 Análisis microbiológicos de la PAC, PAP y PAU

Los análisis microbiológicos realizados a la pulpa de aguacate sin tratamiento (PAC) y a las pulpas de aguacate con tratamiento (PAP y PAU) fueron los estipulados por la Resolución 3929/2013 para pulpa sin tratamiento térmico y para pulpa tratadas respectivamente (Ministerio de salud y protección social, 2013a)

Las determinaciones se realizaron tomando cinco muestras para PAC y PAP. En el caso de la PAU, el número de análisis, lo determinó el diseño de experimentos $2^k$.

Adicionalmente, dentro del análisis microbiológico, se realizó una contaminación artificial *in vitro* de las muestras de aguacate con los microorganismos *E. coli* y *Salmonella* spp, para determinar el comportamiento del tratamiento de ultrasonido en la disminución del recuento de UFC o eliminación del microorganismo, respectivamente.

Las muestras se trasportaron en refrigeración, a temperatura de 8°C, al laboratorio en convenio LACMA (Laboratorio de Calidad Microbiológica de Alimentos, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia), con el fin de ser procesadas en las primeras 24 horas donde se analizaron las variables microbiológicas.

### 5.6.1 Preparación de la muestra

Se pesaron 10g de cada muestra y se diluyeron en agua peptonada en proporción 1:10 para realizar diluciones consecutivas. Las diluciones decimales que se utilizaron fueron $10^{-1}$, $10^{-2}$ y $10^{-3}$ estas diluciones se usaron para los siguientes parámetros los cuales se analizaron por duplicado:

### 5.6.2 Determinación de *E. coli*

Las muestras se cultivaron en agar Chromocult coliformes para recuento de coliformes totales e identificación de *E. coli,* incubando la muestra 24 horas a 35°C+/- 2°C. El método utilizado para el Recuento de *Escherichia coli/g* está basado en la AOAC Método Oficial 966.24 (1990).

### 5.6.3 Determinación de mohos y levaduras

Las muestras se cultivaron en agar YGC para recuento de Mohos y levaduras, incubando a temperatura ambiente durante 3 a 5 días. El método utilizado para el

Recuento de Mohos y Levaduras/g está basado en la AOAC Método Oficial 995.21 (1990)

### 5.6.4 Determinación de mesófilos

Las muestras se cultivaron en agar PCA para recuento de mesófilos, incubando por 48 horas a 35°C+/- 2°C. El método utilizado para el Recuento de Microorganismos Mesófilos aerobios/g está basado en la AOAC Método Oficial 988.18 (1990).

### 5.6.5 Determinación de *Salmonella* spp

Para este caso *Salmonella* spp., se tomaron 25g de la muestra y se diluyeron en 225ml de agua peptonada tamponada que se incubaron a 35°C+/- 2°C, durante 24 horas, posteriormente se pasó 1ml a caldo selectivo Rappaport Vassiliadis Soya (Caldo RVS) Merck® que se incubó a 44.5°C por 24 horas. Posteriormente, la muestra se repica en medios de cultivos selectivos como Agar Rambach y BPLS para la identificación de colonias sospechosas de *Salmonella* spp. El método utilizado para la Detección de *Salmonella* spp/25g está basado en la AOAC Método oficial 967.27 (1990)

### 5.6.6. Contaminación artificial *in vitro* de las muestras de aguacate

Se pesó 200g de la muestra de aguacate y se inoculó con 1ml de una solución madre de las cepas *E. coli* (18000 UFC $g^{-1}$) (ATCC 25922) y *Salmonella* spp (ATCC 14028), previamente preparadas. Se realizó recuento de UFC por gramo de *E. coli*,

investigación de presencia de *Salmonella* spp en la muestra PAC, PAP (bajo condición antes mencionada) y PAU (condición de máxima frecuencia-tiempo 40kHz- 10 min).

## 5.7 Diseño Experimental

### 5.7.1 Diseño experimental para pulpa de aguacate con ultrasonido (PAU)

**Diseño 2k con replica al centro**

Para evaluar la eficacia del tratamiento con ultrasonido en el control microbiológico y fisicoquímico de la pulpa de aguacate, se utilizó un diseño factorial $2^k$ con replica al centro, donde se realizaron en total 14 ensayos a diferentes niveles de tratamiento con ultrasonido, evaluando el efecto de la frecuencia (kHz) y el tiempo (min) sobre las variables respuesta: fisicoquímicas y microbiológicas (descritas en la Figura 5.1). En la Tabla 5.1 se relaciona el número de corridas experimentales sugeridas por el diseño experimental $2^k$.

**Tabla 5.1 Diseño experimental 2k**

| Corrida | Frecuencia | Tiempo |
|---|---|---|
| **1** | 32,5 | 7,0 |
| **2** | 40 | 10 |
| **3** | 25 | 5 |
| **4** | 32,5 | 7,0 |
| **5** | 25 | 10 |
| **6** | 40 | 5 |
| **7** | 32,5 | 7,0 |
| **8** | 32,5 | 7,0 |
| **9** | 40 | 10 |
| **10** | 25 | 5 |
| **11** | 32,5 | 7,0 |
| **12** | 25 | 10 |
| **13** | 40 | 5 |
| **14** | 32,5 | 7,0 |

## 5.8 Análisis de datos

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), fijando un nivel de confianza del 95% y una prueba de rangos múltiples.

Los valores experimentales de pH, porcentaje de acidez, actividad PFO, color (ΔE, L, a y b) se ajustarán a un polinomio mediante un ajuste no lineal (Ecuación 3), empleando un modelo de superficie de respuesta, el modelo será utilizado para estimar y optimizar el comportamiento de los parámetros en función de las variables independientes, tiempo (min) y frecuencia (kHz).

$$f(t,\ f) = \beta_0 + \beta_1 x_2 + \beta_2 x_1 + \beta_3 x_1 x_2 + \beta_4 {x_1}^2 \qquad [3]$$

Dónde:

$f(t,\ f) = Parametro\ a\ evaluar\ como\ funcion\ del\ tiempo\ y\ frecuencia$

$x_1 = frecuencia\ en\ kHz$

$x_2 = Tiempo\ en\ minutos$

$\beta_0,\ \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4 = Son\ los\ coeficientes\ del\ polinomio$

Los datos se procesaron en el software Matlab R2015a Licencia amparada por la Universidad de Antioquia.

### 5.8.1 Modelo regresión logística para análisis microbiológico

El modelo que se empleó para el análisis de los datos microbiológicos (Mohos y levaduras, mesófilos), fue un modelo de regresión logística, donde la variable respuesta

es dicotómica (cumple “0” o no cumple “1” la norma) versus las variables frecuencia (kHz) y tiempo (min). El modelo de regresión logística puede escribirse como:

$$log\left(\frac{p}{1-p}\right) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 \qquad [4]$$

Donde p es la probabilidad (riesgo) de que ocurra el evento de interés, las variables independientes están representadas con la letra x ($x_1$= frecuencia y $x_2$=tiempo), y los coeficientes asociados a cada variable con la letra b.

Los datos se procesaron en el software de STATGRAPHICS® Centurion Licencia amparada por la Corporación Universitaria Lasallista.

# 6 Resultados

## 6.1 Selección y caracterización de la materia prima

La Figura 6.1 muestra algunas de las propiedades cualitativas de la materia prima seleccionada para los análisis. Los aguacates enteros, previo al proceso de obtención de pulpa, se caracterizaron por tener algunos defectos de forma, color, defectos del epicarpio y quemaduras causadas por el sol (Codex Alimentarius, 2007; ICONTEC, 2003).

**Figura 6.1 Materia prima recibida para la selección y caracterización**

La selección de la materia prima representó un paso importante en la investigación, ya que los aguacates necesarios para el procesamiento debían cumplir con la madurez fisiológica comercial. Este fue un factor crítico, pues algunos de los aguacates llegaron pintones, estos son más brillantes de un color verde claro más intenso y su epicarpio es más liso, mientras que en los aguacates con madurez comercial Figura 6.2, utilizados

en este estudio, su epicarpio es más oscuro y rugoso y se caracterizan por tener un rendimiento en la extracción de la pulpa aproximado de un 55.7% (Bernal Estrada et al., 2014)

La variedad Hass presenta un cambio evidente de color de la cáscara del verde a un color rojizo, posteriormente morado oscuro, cuando alcanza la madurez fisiológica (Bernal Estrada et al., 2014). Esto está asociado a que los marcadores externos (color y tamaño), son los que determinan la madurez de la fruta y el tiempo de recolección; sin embargo, la determinación de la madurez comercial del aguacate, es difícil debido a cambios externos invisibles (M. Wang, Zheng, Khuong, & Lovatt, 2012). Para seleccionar el estado de madurez del aguacate apto para el proceso, se hizo con base en el color del epicarpio.

**Figura 6.2 Aguacate con madurez comercial**

Luego de aplicar algunas operaciones de procesamiento mínimo descritas en la metodología, Figura 6.3 obtención de pulpa de aguacate el rendimiento aproximado en la extracción de pulpa fue del 50%.

**Figura 6.3 Obtención de pulpa de aguacate**

## 6.2 Resultados del análisis fisicoquímico de la Pulpa de Aguacate Control (PAC)

En la Tabla 6.1 se muestra la caracterización fisicoquímica de la pulpa de aguacate fresca, materia prima usada para aplicación de los tratamientos de conservación (pasteurización y ultrasonido).

**Tabla 6.1 Resultados fisicoquímicos de la PAC**

| Parámetro | Valor Obtenido | Valor reportado |
|---|---|---|

| | | |
|---|---|---|
| **pH** | 6,24 ± 0,119 | [a]6.72 ± 0.02<br>[b]7,0 ± 0,05 |
| **Acidez**<br>**(% ácido cítrico)** | 0,090 ± 0,032 | [a]0.13 ± 0.01<br>[b]0,30 ± 0,01 |
| **Color** | L*: 73.90 ± 3.69<br>a*: -5.72 ± 2.2<br>b*: 35.29 ± 2.40 | L*[a]: 46.07 ± 0.16<br>a*[a]: -19.70 ± 0.38<br>b*[a]: 30.29 ± 0.44<br>L*[b]: 79,64 ± 1,23<br>a*[b]: -4,17 ± 2,10<br>b*[b]: 32,85 ± 1,11 |

[a] (Aguiló-Aguayo et al., 2014)
[b] (Zapata, Restrepo-Suárez, & Arias, 2016)

Investigaciones realizadas por diferentes autores en la caracterización de aguacate variedad Hass en Colombia (Zapata, Restrepo-Suárez, & Arias, 2016) y en España (Aguiló-Aguayo et al., 2014), muestran valores de pH y acidez mayores a los establecidos en el presente estudio, en cuanto al color los valores fueron similares a los reportados por (Zapata et al., 2016) y superiores en las coordenadas a los reportados por (Aguiló-Aguayo et al., 2014). Estas diferencias obedecen a que la composición de los frutos está íntimamente relacionado con la variedad, el estado de madurez y las condiciones agro-ecológicas de la región donde son cultivados, que impactan en las características fisicoquímicas y sensoriales (Bernal Estrada et al., 2014).

La actividad enzimática inicial de la PFO para la PAC presentó un valor de 778UPFOg$^{-1}$ lo que indica la labilidad de la enzima por la oxidación, así el deseable es modificar los valores óptimos de factores como pH óptimo, latencia, especificidad por el sustrato para el desarrollo de la actividad de la PFO, puesto que si el medio en el cual se encuentra la PFO es alterado, esta puede reducir su actividad. Por tanto el control del pardeamiento es un total reto para la industria debido a los procesos mínimos a los que se debe someter el aguacate para obtener su pulpa (Guerrero, 2009).

### 6.2.1 Caracterización microbiológica de la PAC

La Tabla 6.2, muestra los resultados del análisis microbiológico, donde se observa que todos los parámetros evaluados para las muestras de PAC, se encuentran por debajo del índice máximo permisible, según la normativa colombiana Resolución 3929/13 para este tipo de matriz. Según la norma, recuentos por debajo del establecido indica un nivel de buena calidad, cumpliendo con características para ser consumido sin riesgo microbiológico.

En contraste con los resultados encontrados por (Aguiló-Aguayo et al., 2014) quienes reportan para la caracterización de aguacate variedad Hass, un valor no detectado para el recuento de Mohos y levaduras (Aguiló-Aguayo et al., 2014).

**Tabla 6.2 Resultados microbiológico de muestras de pulpa de aguacate control PAC**

| Parámetro | Promedio | Máximo | Valor |
|---|---|---|---|

| | UFC/g | permitido (Res. 3929/13) UFC/g | (p<0,05) |
|---|---|---|---|
| Recuento de *E. coli* | <10 | <10 | - |
| Recuento de Mohos y levaduras | 172±249,52 | 3000 | 0,486 |
| *Salmonella* spp en 25 g | Ausencia | Ausencia | - |
| Mesófilos* | 377±125,6 | - | - |

* No contemplado en la norma

La sanitización previa de la fruta, antes de la exposición de su pulpa, es fundamental para garantizar su calidad. Bilek & Turantaş (2013), resaltan la importancia de la limpieza y desinfección de las frutas y vegetales, máxime cuando la pulpa es susceptible de someterse a altas y bajas temperaturas en los procesos de conservación, ya que las características sensoriales pueden verse afectadas. Los recuentos de *Salmonella y E. coli,* evidencian un bajo riesgo en cuanto a la presencia de patógenos e indicadores de higiene.

## 6.3 Resultados de análisis de PAP y PAU: optimización de parámetros

### 6.3.1 Resultados del análisis fisicoquímicos de la PAP y PAU

En la Tabla 6.3 se presentan los resultados para las variables fisicoquímicas de pH y acidez.

**Tabla 6.3 Resultados fisicoquímicos de la pulpa de aguacate sometida a tratamiento de pasteurización y ultrasonido**

| Tratamiento | pH | Acidez |
|---|---|---|
| 25 KHzx10 min | 6,67±0,04 | 0,09±0,037 |
| 25KHzx5min | 6,95±0,05 | 0,13±0,000 |
| 32.5KHzx7min | 6,79±0,17 | 0,11±0,037 |
| 40KHzx5min | 6,59±0,11 | 0,11±0,037 |
| 40KHzx10min | 7,22±0,21 | 0,13±0,000 |
| 32.5KHzx7min | 7,02±0,07 | 0,09±0,037 |
| 40KHzx10min | 6,79±0,09 | 0,13±0,000 |
| 25KHzx5min | 6,76±0,09 | 0,13±0,000 |
| 32.5KHzx7min | 6,80±0,04 | 0,09±0,037 |
| 32.5KHzx7min | 6,70±0,10 | 0,13±0,000 |
| 32.5KHzx7min | 6,84±0,15 | 0,11±0,037 |
| 25KHzx10min | 7,10±0,12 | 0,06±0,000 |
| 40KHzx5min | 6,89±0,17 | 0,11±0,037 |
| 32.5KHzx7min | 6,72±0,07 | 0,11±0,037 |
| Pasteurización | 7,20±0,27 | 0,12±0,026 |
| Control | 6,30±0,14 | 0,09±0,032 |

## 6.4 Optimización

Los valores de los coeficientes ajustados junto con el coeficiente de correlación $R^2$ se presentan en la Tabla 6.4, los valores obtenidos muestran un ajuste para $R^2$ >0,98

**Tabla 6.4 Coeficientes ajustados al polinomio**

| Coeficiente | pH | Acidez |
|---|---|---|
| $B_0$ | 10,6000 | 0,4077 |
| $B_1$ | -0,3611 | -0,0299 |
| $B_2$ | -0,1658 | -0,0119 |
| $B_3$ | 0,0122 | 0,0009 |
| $B_4$ | 0,0012 | 0,0001 |
| $R^2$ | 0,9897 | 0,9986 |

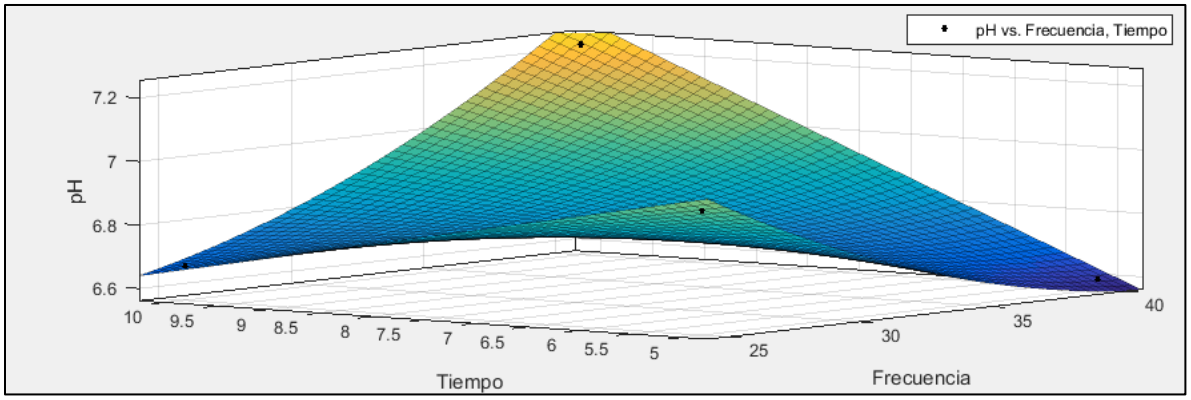
El modelo seleccionado fue usado para generar la representación gráfica de la superficie de respuesta, y los contornos, en la cual se aprecia el comportamiento del pH (Figura 6.4 a,b) y la acidez (Figura 6.5 a,b) frente a la frecuencia y al tiempo correspondiente a los tratamientos de ultrasonido aplicados.

Los valores mínimos corresponden a

Los valores máximos corresponden a

**Figura 6.4 Representación gráfica de superficie de respuesta (a) y de contornos (b) para el pH**

a



b

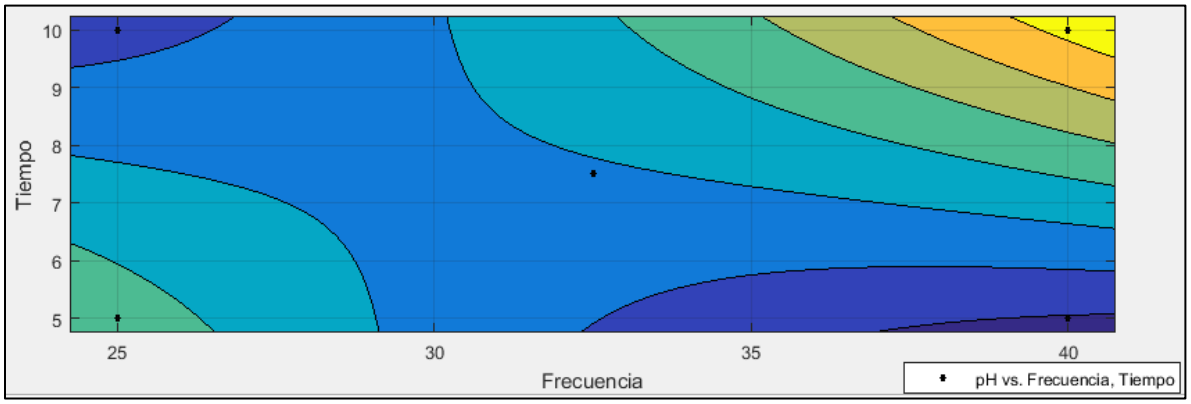
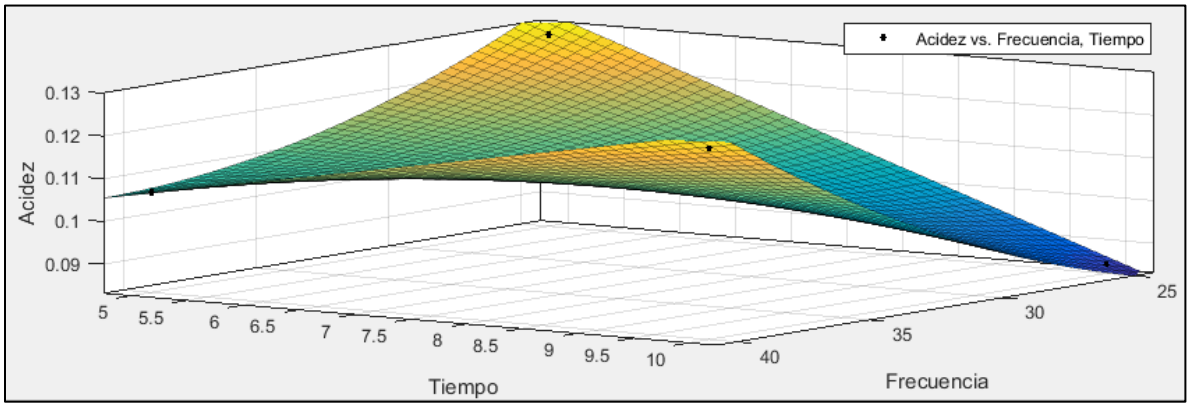
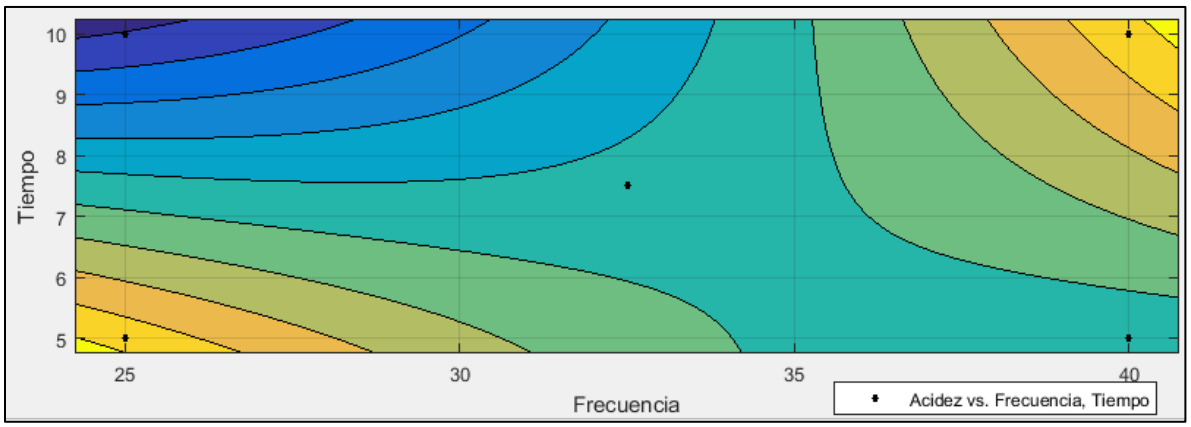



**Figura 6.5 Representación gráfica de superficie de respuesta (a) y de contornos (b) para la acidez**

a




b



De las gráficas de superficie y de contorno para cada parámetro se pueden observar los valores mínimos y máximos para cada variable y obtener los correspondientes valores de frecuencia y tiempo (Tabla 6.5)

**Tabla 6.5 Valores optimizados para los parámetros**

| Parámetro | Frecuencia (kHz) | Tiempo (min) | Óptimo | Valor |
|---|---|---|---|---|
| **pH** | 40 | 5 | Min | 6,589 |
| **Acidez** | 25 | 5 | Max | 0,1367 |

### 6.4.1 Efecto de los tratamientos de conservación, sobre el pH de la pulpa de aguacate

Se presenta un efecto de los tratamientos de pasteurización y ultrasonido sobre el pH de las muestras, como se evidencia en los resultados del ANOVA Tabla 6.6, en el cual se puede notar que existen diferencias estadísticamente significativas (p=0,0000) en los tratamientos para el pH con un nivel del 95,0% de confianza.

**Tabla 6.6 ANOVA para pH por Tratamiento**

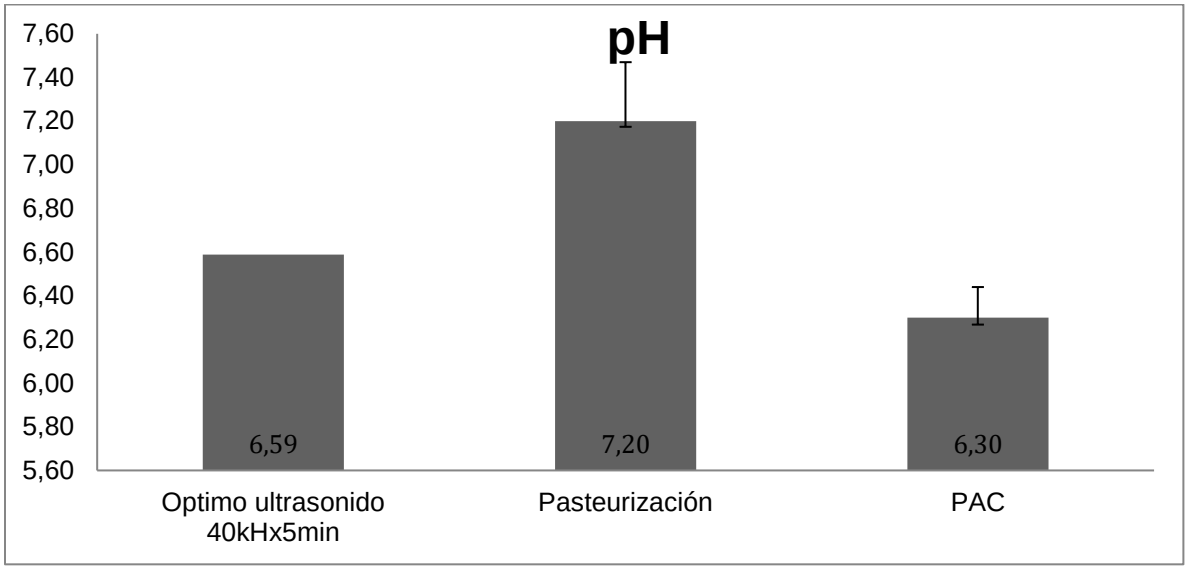
| *Fuente* | *Suma de Cuadrados* | *Gl* | *Cuadrado Medio* | *Razón-F* | *Valor-P* |
|---|---|---|---|---|---|
| Entre grupos | 2,19757 | 8 | 0,274697 | 8,57 | 0,0000 |
| Intra grupos | 1,34608 | 42 | 0,0320495 | | |
| Total (Corr.) | 3,54365 | 50 | | | |

El aumento de los valores de pH de la PAP (7,20±0,27) y el valor máximo encontrado con la optimización para la PAU con el tratamiento 40kHzx5min, puede estar relacionado en la pasteurización con la desnaturalización de enzimas, deterioro nutricional, alteración de los ácidos grasos; y el ultrasonido con el fenómeno conocido

como sonólisis, que produce disociación de la molécula de agua en grupos $OH^-$ y $H^+$ siendo el radical hidroxilo (-OH) una especie altamente oxidante (Chandrapala, Oliver, Kentish, & Ashokkumar, 2012). El pH óptimo de la PFO está entre pH 4,0 y 7,0, con poca actividad por debajo de 3,0 (Muneta, 1977), mientras el pH óptimo para la actividad de la polifenoloxidasa en aguacate es entre 5,5 a 6,5 (Kahn, 1977). Un cambio en el pH respecto al valor óptimo de actividad puede conducir a la pérdida irreversible de actividad, por eso el pardeamiento enzimático puede ser controlado a través del uso de algunos métodos químicos y físicos, que a menudo empleados en conjunto con el ultrasonido pueden inactivar la PFO alterando el pH (Mesquita & Queiroz, 2013).

En todos los tratamientos de ultrasonido y la pasteurización se da un aumento del pH comparado con la PAC, Figura 6.6  Resultados pH, similar a lo reportado por Hawman (2014) donde el uso de ácido cítrico y sal en pulpa de aguacate, ocasiona una importante reducción en el pH y luego del tratamiento con ultrasonido logra una elevación mínima en los valores de pH. (Hawmann Díaz, 2014). En contraste con el aumento del pH que resultó del proceso de escaldado por microondas sobre pulpa de aguacate, donde el  pH se mueve en un rango de 6.80 a 7.40, resultando en un aumento de la actividad de PFO (Jimenez, Zambrano, & Aguilar, 2004).

**Figura 6.6 Resultados pH**




### 6.4.2 Efecto de los tratamientos de conservación, sobre la acidez de la pulpa de aguacate

Se presenta un efecto de los tratamientos de pasteurización y ultrasonido, sobre la acidez de las muestras como se evidencia en los resultados del ANOVA Tabla 6.7, en el cual se puede notar que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para la acidez, con un nivel del 95,0% de confianza.

**Tabla 6.7 Tabla ANOVA para la acidez por Tratamiento**

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---|---|---|---|---|---|
| Entre grupos | 0,0152462 | 8 | 0,00190578 | 2,57 | 0,0223 |
| Intra grupos | 0,0311751 | 42 | 0,000742265 | | |
| Total (Corr.) | 0,0464213 | 50 | | | |

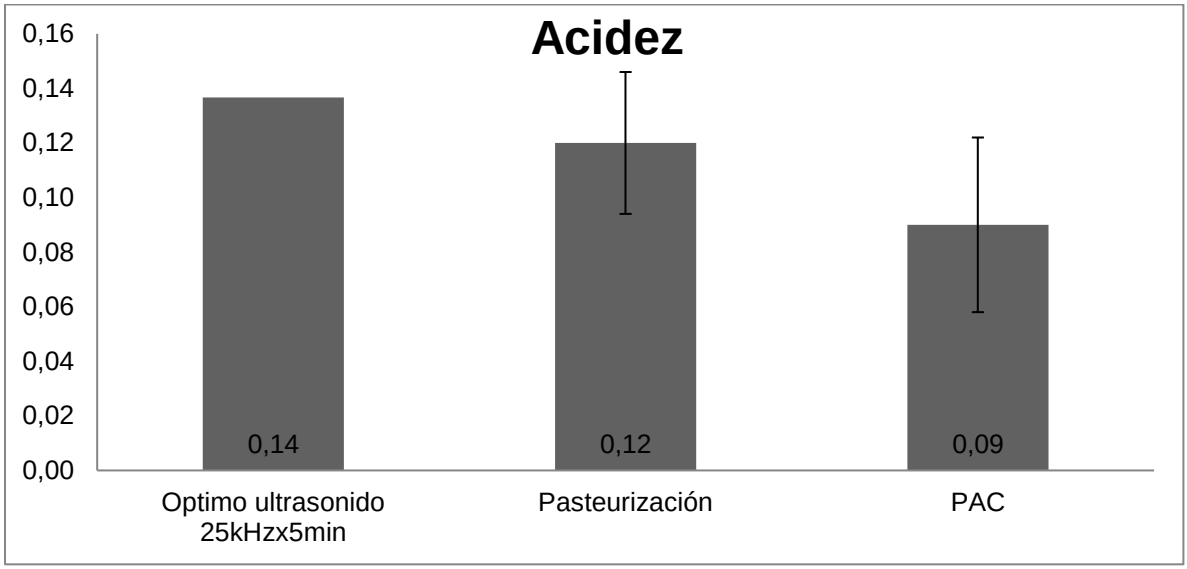
El incremento de la acidez en las pulpas PAP y PAU con respecto al control, Figura 6.7 Resultados acidez posiblemente hace que se inhiba la acción de la enzima polifenoloxidasa (Guerrero, 2009), este caso es deseable, porque se espera que

reduzcan los cambios de color que afectan la pulpa, causados por el pardeamiento enzimático; además de los efectos benéficos que podría ofrecer sobre la conservación ante el deterioro microbiológico (Húngaro et al., 2014). En la optimización el valor de acidez máximo se encontró para el tratamiento de ultrasonido de 40kHz x 10 min, es decir tiempos largos frecuencias altas favorece el incremento de la acidez.

Un aumento en el valor de acidez en el procesamiento de pulpa de aguacate también es reportado en un estudio donde se muestran los cambios bioquímicos durante el almacenamiento de puré de aguacate adicionado con antioxidantes naturales y procesado con alta presión hidrostática, encontrando que la acidez titulable se incrementó durante el almacenamiento. Además el estudio propone que los cambios en los valores de pH y acidez titulable que se observaron durante el almacenamiento de los diferentes tratamientos de puré de aguacate, pueden ser atribuidos a una liberación de ácidos orgánicos hacia la matriz del puré de aguacate.(Jacobo-Velázquez, Castellanos-Dohnal, Caballero-Mata, & Hernández-Brenes, 2013)

La acidez está relacionada con los grupos carboxilos e hidrogeniones presentes en la matriz, estos se encuentran contenidos en las vacuolas, las cuales presentan disrupción tras la aplicación de los procesos de conservación (Gonzalez, Anthon, & Barrett, 2010).

**Figura 6.7 Resultados acidez**




### 6.4.3 Efecto de los tratamientos de conservación, sobre el color de la pulpa de aguacate.

En la Tabla 6.8 se presenta las mediciones de los parámetros de color según las coordenadas del CIEL*a*b*.

**Tabla 6.8 Análisis de color de la pulpa de aguacate sometida a tratamiento de pasteurización y ultrasonido**

| Tratamiento | L* | a* | b* | ∆E |
|---|---|---|---|---|
| 25 KHzx10 min | 57,08±2,11 | -7,84±0,087 | 39,38±3,441 | 21.98 |
| 25KHzx5min | 60,21±1,31 | -7,92±0,364 | 42,47±1,178 | 20.61 |
| 32.5KHzx7min | 56,70±2,99 | -7,84±0,383 | 39,42±2,905 | 22.28 |
| 40KHzx5min | 57,69±3,18 | -7,52±0,470 | 41,41±4,313 | 21.80 |
| 40KHzx10min | 58,25±1,80 | -7,99±0,360 | 40,19±1,654 | 21.37 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 32.5KHzx7min | 54,82±2,45 | -7,69±0,021 | 38,10±2,979 | 23.49 |
| 40KHzx10min | 56,71±3,35 | -7,56±0,119 | 39,16±1,038 | 22.06 |
| 25KHzx5min | 57,40±1,14 | -7,78±0,157 | 39,40±0,976 | 21.70 |
| 32.5KHzx7min | 55,61±1,43 | -7,75±0,040 | 38,37±1,371 | 22.92 |
| 32.5KHzx7min | 55,50±1,84 | -7,69±0,108 | 38,42±1,944 | 22.98 |
| 32.5KHzx7min | 55,19±2,84 | -7,47±0,112 | 38,05±2,209 | 23.05 |
| 25KHzx10min | 55,71±067 | -7,43±0,180 | 38,16±0,834 | 22.62 |
| 40KHzx5min | 56,46±1,66 | -7,50±0,232 | 40,11±0,735 | 22.40 |
| 32.5KHzx7min | 56,30±1,53 | -7,48±0,213 | 39,54±0,404 | 18.98 |
| Pasteurización | 58.842±1.426 | -3.831±2.620 | 37.91±0.618 | 18.02 |
| Control | 59.820±0.631 | -4.759±1.184 | 39.53±0.493 | |

Se presenta un efecto de los tratamientos de pasteurización y ultrasonido sobre el color de las muestras, como se evidencia en los resultados del ANOVA mostrados en las Tablas 6.9 a 6.12, las cuales indican que existen diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos para los parámetros de color L*, a*, b* y $\Delta$E con un nivel del 95,0% de confianza.

**Tabla 6.9 ANOVA para la L* por Tratamiento**

| *Fuente* | *Suma de Cuadrados* | *Gl* | *Cuadrado Medio* | *Razón-F* | *Valor-P* |
|---|---|---|---|---|---|
| Entre grupos | 936,663 | 8 | 117,083 | 26,42 | 0,0000 |
| Intra grupos | 186,161 | 42 | 4,4324 | | |
| Total (Corr.) | 1122,82 | 50 | | | |

**Tabla 6.10 ANOVA para la a* por Tratamiento**

| *Fuente* | *Suma de Cuadrados* | *Gl* | *Cuadrado Medio* | *Razón-F* | *Valor-P* |
|---|---|---|---|---|---|
| Entre grupos | 156,924 | 8 | 19,6155 | 25,97 | 0,0000 |
| Intra grupos | 31,7211 | 42 | 0,755265 | | |
| Total (Corr.) | 188,645 | 50 | | | |

**Tabla 6.11 ANOVA para la b* por Tratamiento**

| *Fuente* | *Suma de Cuadrados* | *Gl* | *Cuadrado Medio* | *Razón-F* | *Valor-P* |
|---|---|---|---|---|---|
| Entre grupos | 148,211 | 8 | 18,5264 | 4,06 | 0,0012 |
| Intra grupos | 191,506 | 42 | 4,55968 | | |
| Total (Corr.) | 339,718 | 50 | | | |

**Tabla 6.12 ANOVA para el ∆E por Tratamiento**

| *Fuente* | *Suma de Cuadrados* | *Gl* | *Cuadrado Medio* | *Razón-F* | *Valor-P* |
|---|---|---|---|---|---|
| Entre grupos | 614,189 | 8 | 76,7736 | 30,14 | 0,0000 |
| Intra grupos | 106,983 | 42 | 2,54722 | | |
| Total (Corr.) | 721,172 | 50 | | | |

En la figura 6.8 y 6,9 se grafica el comportamiento de los parámetros de color L* y ∆E por cada tratamiento.

**Figura 6.8 Parámetros de color L***

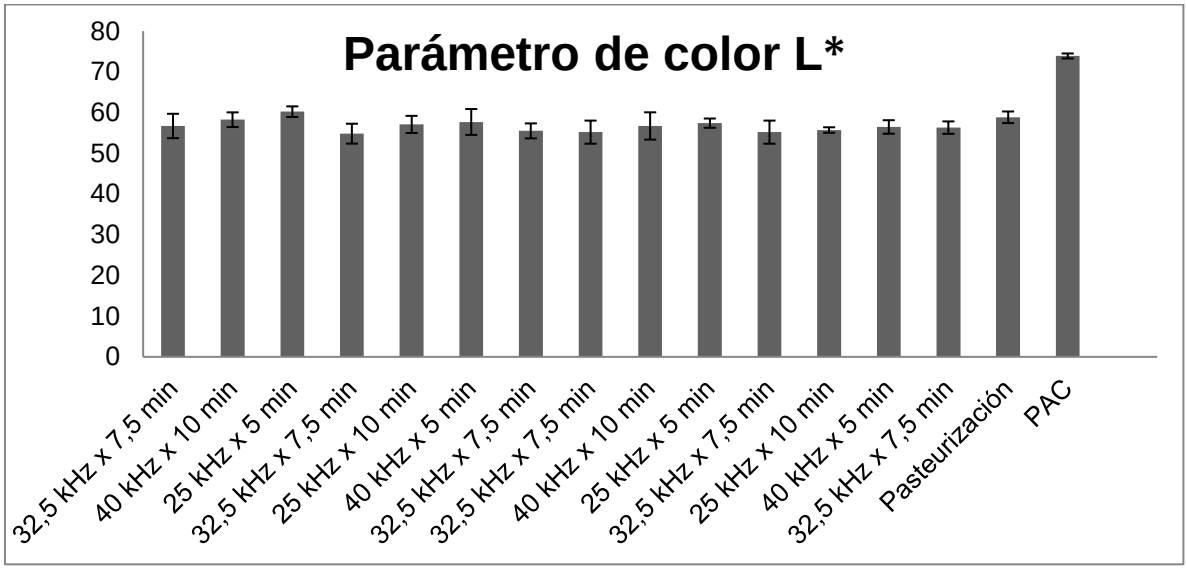
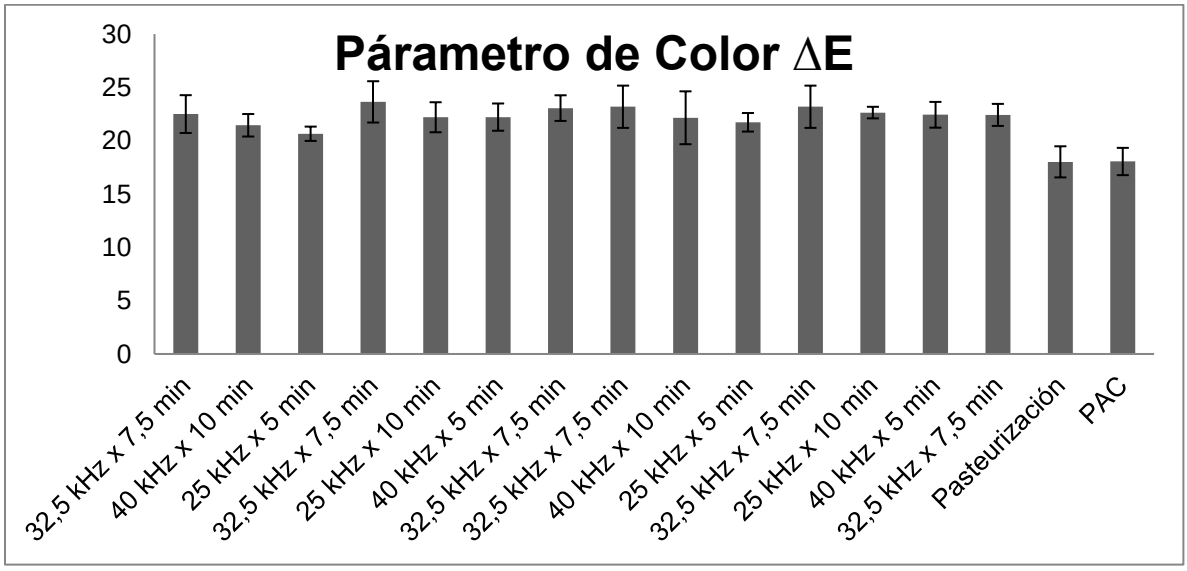



**Figura 6.9 Parámetros de color ∆E**




## 6.5 Optimización

Los valores de los coeficientes ajustados junto con el coeficiente de correlación $R^2$ se presentan en la Tabla 6.13, los valores ajustados presentaron un $R^2 > 0.99$.

**Tabla 6.13 Coeficientes ajustados al polinomio**

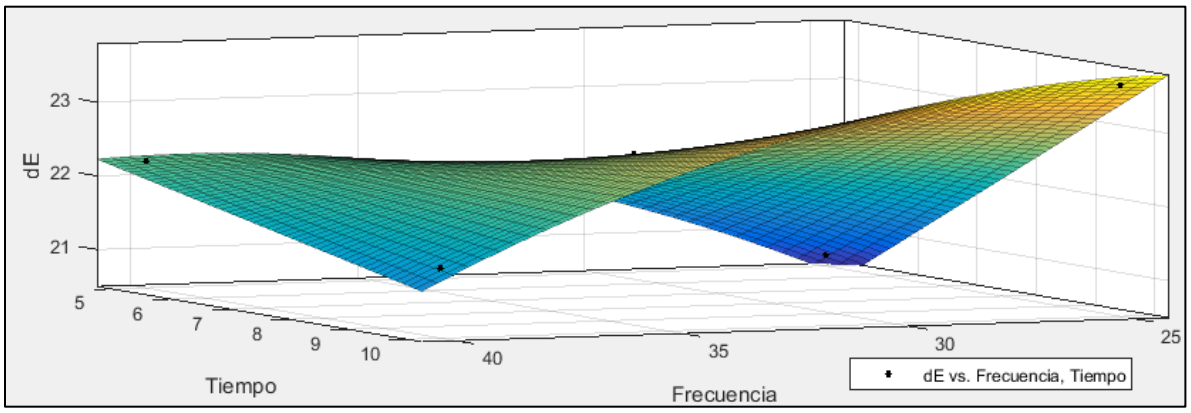
| Coeficiente | ΔE | L* | a* | b* |
|---|---|---|---|---|
| $B_0$ | -0,3011 | 102,2000 | -9,1100 | 76,0600 |
| $B_1$ | 1,8480 | -1,8550 | 0,1964 | -1,2390 |
| $B_2$ | 0,9462 | -2,2690 | 0,0330 | -1,8610 |
| $B_3$ | -0,0500 | 0,0492 | -0,0072 | 0,0249 |
| $B_4$ | -0,0091 | 0,0285 | 0,0005 | 0,0256 |
| $R^2$ | 0,9989 | 0,9977 | 0,9988 | 0,9979 |

El modelo seleccionado fue usado para generar la representación gráfica de la superficie de respuesta (Figura 6.10 a), y los contornos (Figura 6.10 b), en la cual se aprecia el comportamiento de los parámetros de color L*, a*, b*, y ΔE frente a la frecuencia y al tiempo correspondiente a los tratamientos de ultrasonido aplicados.

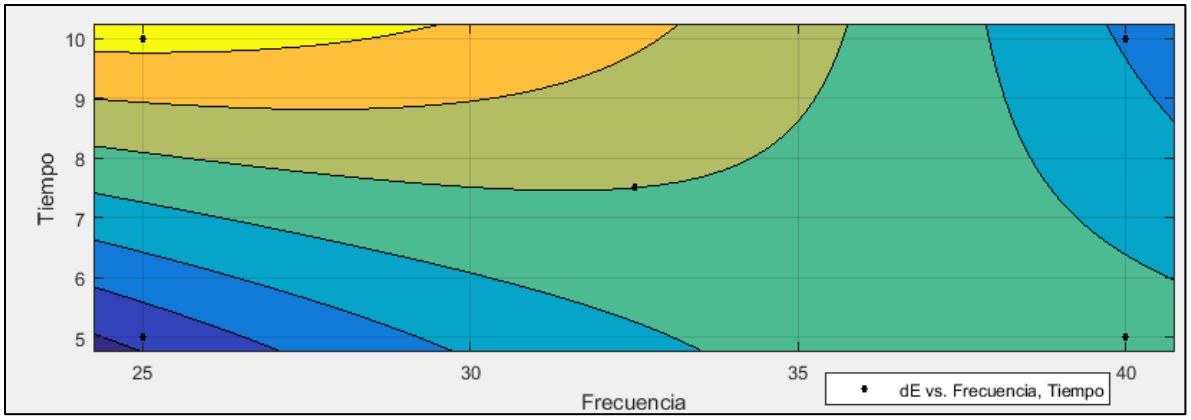
**Figura 6.10 Representación gráfica de superficie de respuesta (a) y de contornos (b) los parámetros de color L*, a*, b*, y ΔE**

Los valores mínimos corresponden a
Los valores máximos corresponden a

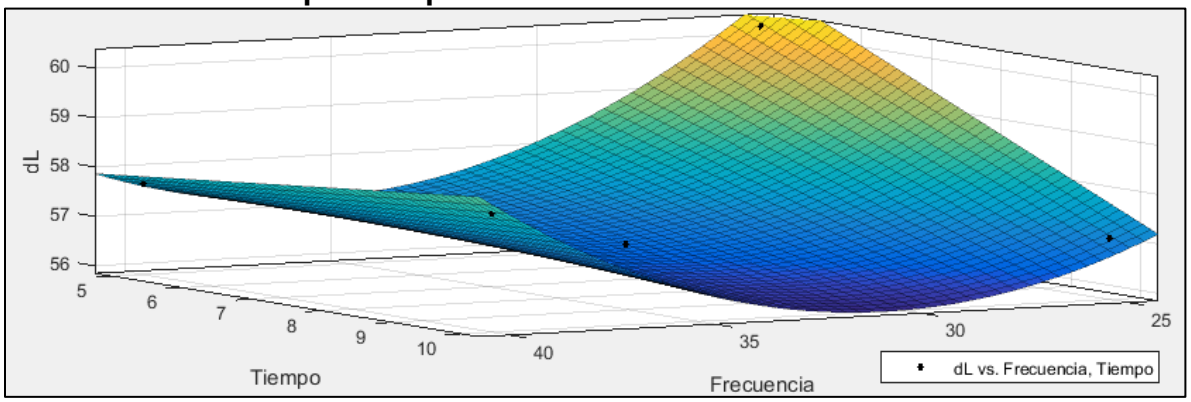
**a. Gráfico de superficie para ΔE**



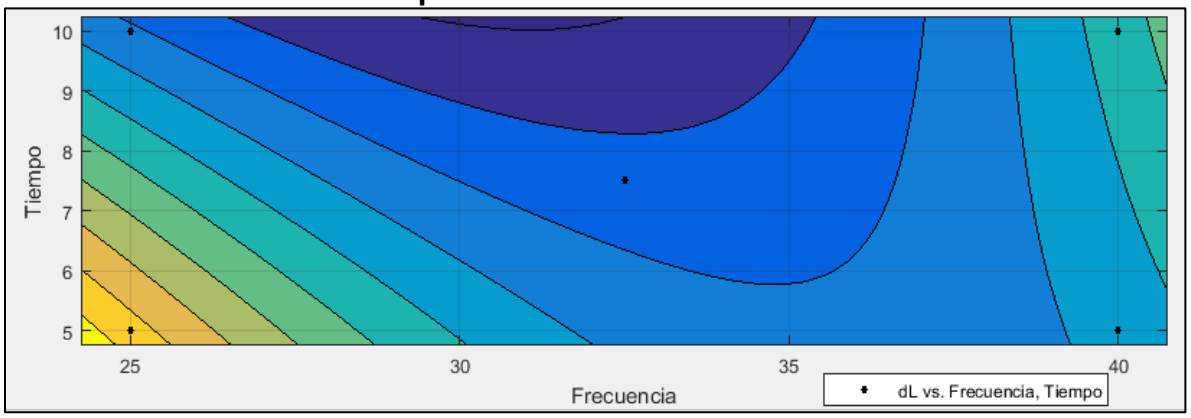

**b. Gráfico de contorno ΔE**



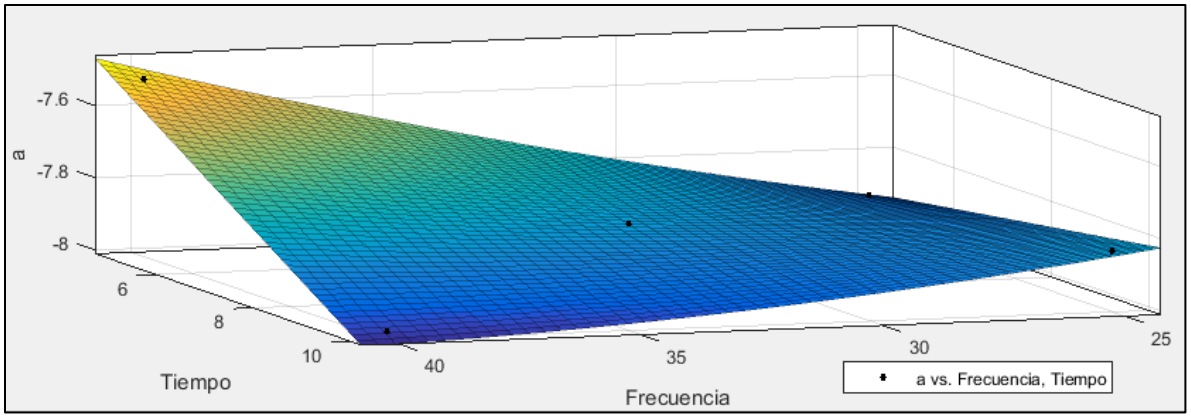

a. **Gráfico de superficie para L***



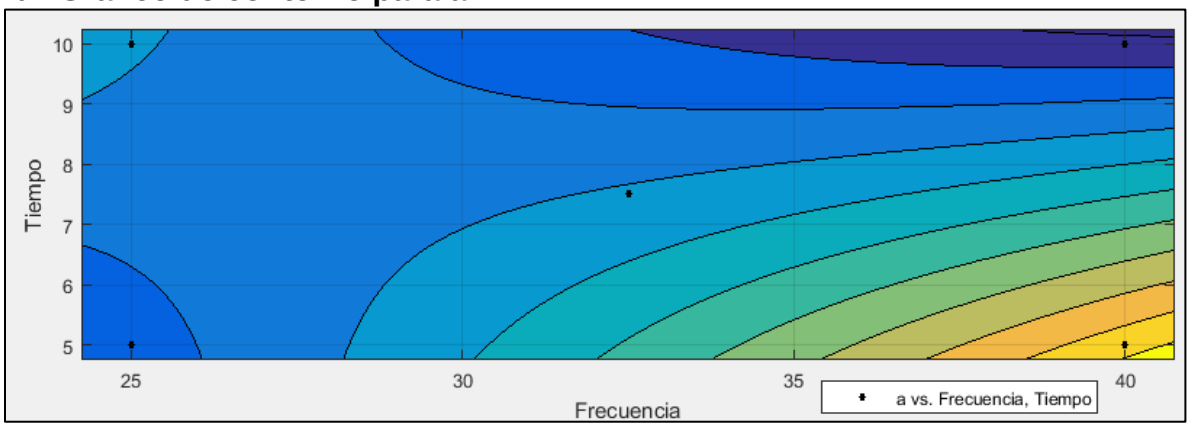

b. **Gráfico de Contorno para L***



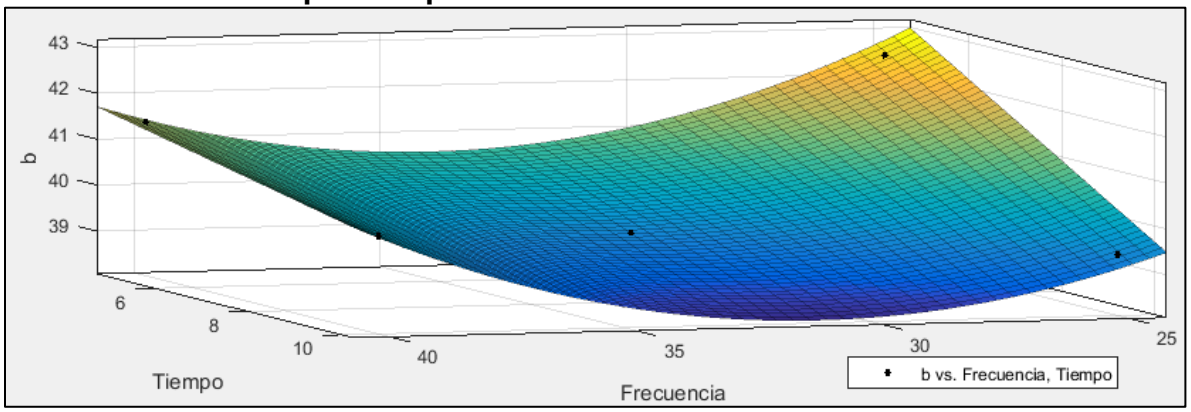

a. **Gráfico de superficie para a***



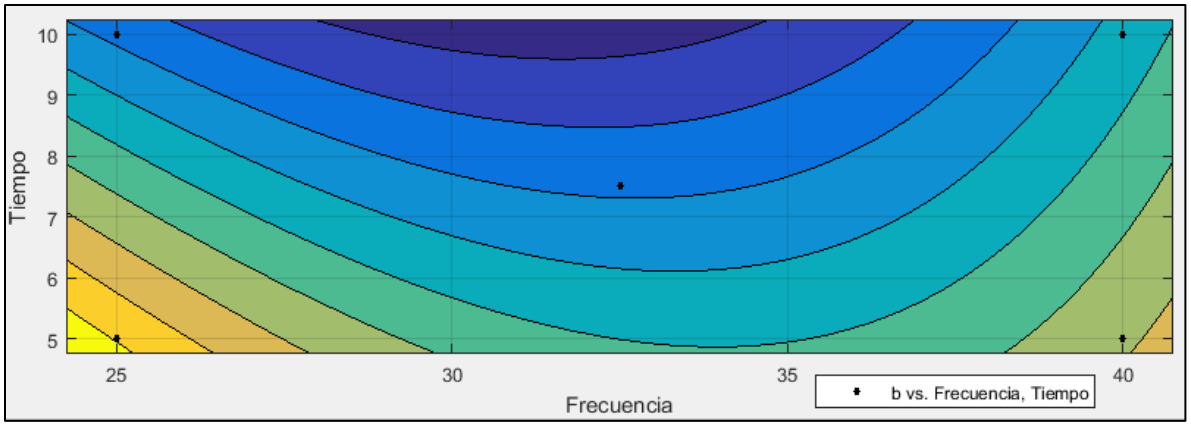

**b. Gráfico de contorno para a***




**a. Gráfico de superficie para b***




**b. Gráfico de contorno para b***




De las gráficas de superficie y de contorno para cada parámetro se pueden observar los valores mínimos y máximos para cada variable y obtener los correspondientes valores de frecuencia y tiempo (Tabla 6.14)

**Tabla 6.14 Valores optimizados para los parámetros**

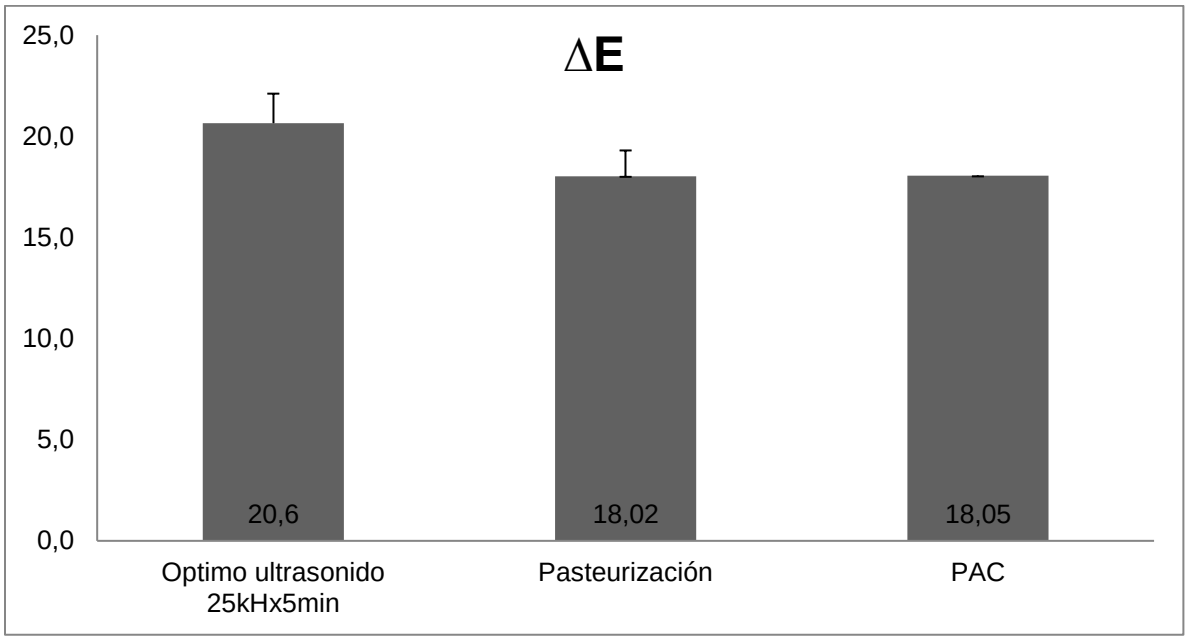
| Parámetro | Frecuencia (kHz) | Tiempo (min) | Óptimo | Valor |
|---|---|---|---|---|
| **ΔE** | 25 | 5 | Min | 20,6495 |
| **L*** | 25 | 5 | Max | 60,1763 |
| **a *** | 40 | 10 | Min | -7,9871 |
| **b*** | 25 | 5 | Max | 42,4700 |

Los valores de los parámetros de color del control PAC se consideran en el caso de ésta investigación, los deseables, pues se quieren valores máximos de L* (luminosidad) y b* (intensidad de color verde y amarillo), mientras que a* y ΔE, sean mínimos. A partir de las coordenadas cromáticas L*, a* y b*, La diferencia de color normalizada se calcula según la ecuación (5) tolerancia de color (ΔE*), que es la máxima diferencia de color admitida.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2(\Delta a^*)^2(\Delta b^*)^2} \quad [5]$$

Las diferencias perceptibles en el color pueden ser analíticamente clasificadas como muy diferente (ΔE> 3), diferente (1,5 <ΔE <3) y una pequeña diferencia (1,5 <AE) (Adekunte, Tiwari, Cullen, Scannell, & O'Donnell, 2010). Para el tratamiento de ultrasonido 25 KHz x 5min se comporta "diferente" ΔE = 3.00, mientras con el resto de tratamientos se comportó "muy diferentes" en relación al control, en concordancia con el valor optimo obtenido para el ΔE a través de las superficies de respuesta donde se encuentra que a 25 KHz x 5min de tratamiento con ultrasonido, se presenta la menor diferencia de color global respecto a la PAC Figura 6.11 Resultados ΔE.

**Figura 6.11 Resultados ΔE**




Así mismo, el parámetro a*, disminuye en el tratamiento de pasteurización, lo que favorece el color verde, aunque visualmente es la que más rápido se pardea comparada con los tratamientos de ultrasonido, por lo que éste descenso del parámetro a* es temporal, ya que pasada aproximadamente 1 hora visualmente se aprecian más

pardeadas que las muestras de ultrasonido. Los valores a* se incrementaron negativamente en todos los tratamientos de ultrasonido. Figura 6.12 Color en superficie de pulpas de aguacate

**Figura 6.12 Color en superficie de pulpas de aguacate**

Pulpa Control Pulpa Pasteurización Pulpa Ultrasonido

La pérdida en la tonalidad verde después del ultrasonido, podría ser causada por la degradación de la clorofila, que es el principal pigmento responsable del color verde (Aguiló-Aguayo et al., 2014). La razón de la degradación podría ser el efecto de cavitación del ultrasonido, que probablemente genere la producción, tanto de sustancias químicas (por ejemplo, por generación de radicales), como la degradación mecánica de biomoléculas.

Debe tenerse en cuenta que los cambios en el color pueden considerarse como un efecto sensorial negativo del tratamiento con ultrasonido. Los cambios visibles en el color en los alimentos tratados por ultrasonido han sido previamente reportados por Bi, *et al*., quienes encontraron que para muestras de puré de aguacate con una relación de dilución de 1:2, mayor valor de $\Delta E$ (> 5), L* y b*, pero un menor valor de a* fue observado en todas las muestras tratadas en comparación con la muestra sin tratar. Esto indica un puré tratado más brillante, más amarillo, y menos verde, observable a simple vista. No hubo diferencias significativas en el valor L*, a* y b* entre las muestras tratadas con ultrasonido con diferentes tiempos de tratamiento ($p > 0,05$). Sin embargo, el valor de L* aumentó mientras que el valor a* y el valor b* disminuyeron con el aumento de la velocidad de homogeneización (Bi, Hemar, Balaban, & Liao, 2015). Además , Costa *et al*., encontraron que el jugo de piña tratado a 376 $W/cm^2$ durante 10 min tuvo un valor L* menor, pero un valor b* y un valor Chroma mayor que las muestras no tratadas y el cambio podría ser causado por la liberación de compuestos intracelulares debido a la disrupción celular (Costa et al., 2013). Adekunte *et al*. informaron una disminución de los valores L*, a* y b* del jugo de tomate después de la sonicación a 20 kHz, nivel de amplitud de 24,4-61 µm durante 2-10 min debido a la degradación del licopeno (Adekunte et al., 2010). Estos diferentes resultados podrían ser causados por la diferencia en las condiciones ultrasónicas utilizadas y la resistencia de los pigmentos en los jugos al tratamiento con ultrasonido.

### 6.5.1 Determinación de la actividad de la polifenoloxidasa (APFO) en la PAP y PAU

En la Tabla 6.15 se observa que se produce un incremento de una actividad enzimática, de 778 ($UPFOg^{-1}$) para la PAC, a valores comprendidos entre 1420 ($UPFOg^{-1}$) para las condiciones de ultrasonido de máxima frecuencia-tiempo (40kHz-10min) y 1449($UPFOg^{-1}$) para la pasteurización, lo que presenta un aumento del orden de 1.8 veces por la acción de ambos procesos de conservación. El tratamiento de ultrasonido a las condiciones de frecuencia y tiempo de 25 kHz-10 min, presentó una actividad enzimática de 539 $UPFOg^{-1}$ correspondiente a una disminución de 1.4 veces, siendo esta la menor actividad de la polifenoloxidasa alcanzada en este estudio. Se debe considerar que la PFO en las matrices vegetales, coexiste en forma soluble e insoluble y que mediante tratamientos de conservación, la enzima se puede solubilizar y se puede obtener una actividad adicional por parte de la fracción insoluble (Kahn, 1977)

**Tabla 6.15 Determinación de la actividad de la PFO**

| **Tratamiento** | **Unidades de PFO ($PFOg^{-1}$)** | **% de APFO** |
|---|---|---|
| 32.5KHzx7min | 903±5.4 | 116 |
| 40KHzx10min | 1420±6.2 | 183 |
| 25KHzx5min | 1070±7.5 | 138 |
| 32.5KHzx7min | 1389±9.7 | 179 |
| 25KHzx10min | 541±8.2 | 70 |

| | | |
|---|---|---|
| 40KHzx5min | 645±3.1 | 83 |
| 32.5KHzx7min | 904±5.8 | 116 |
| 32.5KHzx7min | 904±9.4 | 116 |
| 40KHzx10min | 780±5.3 | 100 |
| 25KHzx5min | 819±9.4 | 105 |
| 32.5KHzx7min | 824±5.7 | 106 |
| 25KHzx10min | 1072±8.3 | 138 |
| 40KHzx5min | 771±4.6 | 99 |
| 32.5KHzx7min | 379±7.2 | 49 |
| Pasteurización | 1499±3.5 | 193 |
| Pulpa de aguacate control | 778±8.9 | |

### 6.5.2 Optimización

Los valores de los coeficientes ajustados junto con el coeficiente de correlación $R^2$ se presentan en la Tabla 6.16, los valores ajustados presentaron un $R^2 > 0.99$.

**Tabla 6.16 Coeficientes ajustados al polinomio**

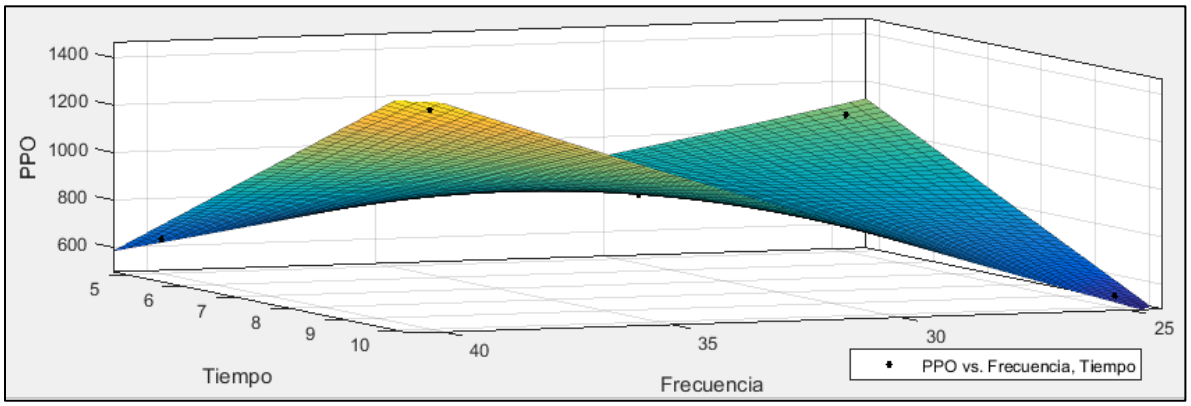
| Coeficiente | PPO |
|---|---|
| $B_0$ | 4765,0000 |
| $B_1$ | -540,5000 |
| $B_2$ | -133,8000 |
| $B_3$ | 17,3900 |
| $B_4$ | 0,2844 |
| $R^2$ | 0,9979 |

El modelo seleccionado fue usado para generar la representación gráfica de la superficie de respuesta (Figura 6.13a), y los contornos (Figura 6.13b), en la cual se aprecia el comportamiento de la actividad de la PFO frente a la frecuencia y al tiempo correspondiente a los tratamientos de ultrasonido aplicados.

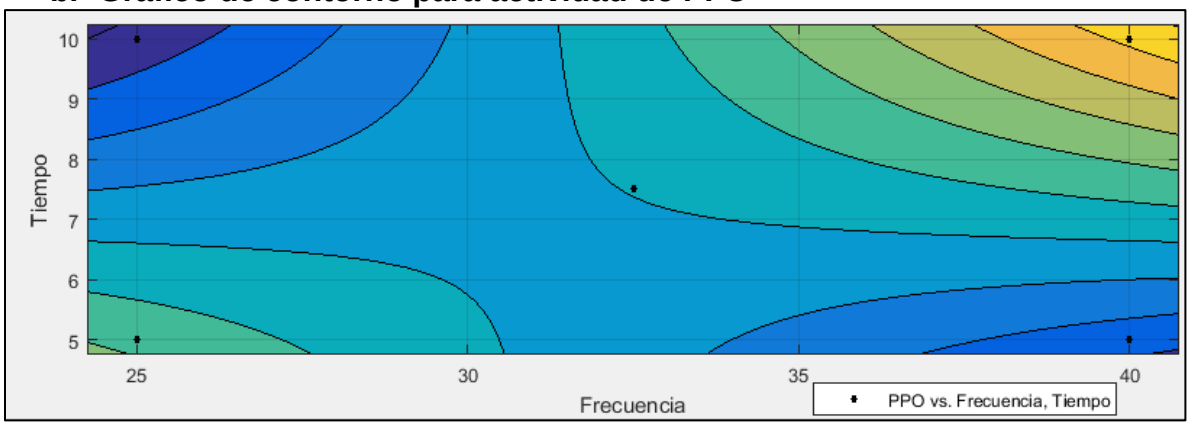
**Figura 6.13 Representación gráfica de superficie de respuesta (a) y de contornos (b) la actividad de la PFO**

Los valores mínimos corresponden a
Los valores máximos corresponden a

**a. Gráfico de superficie para actividad de PFO**




**b. Gráfico de contorno para actividad de PFO**



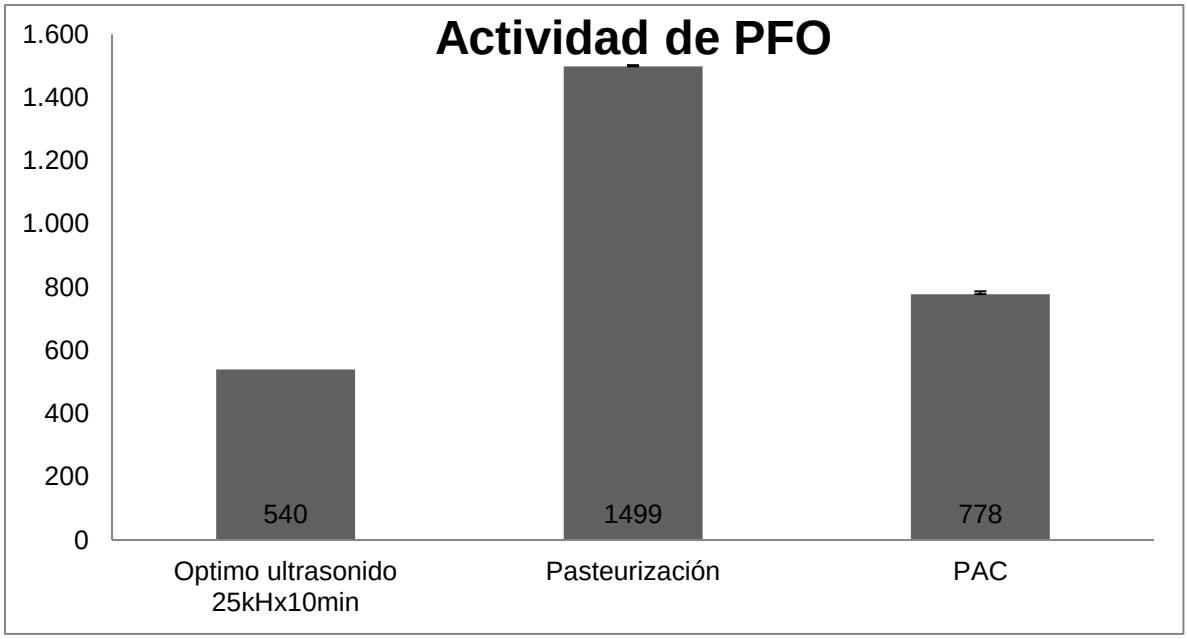
De las gráficas de superficie y de contorno para la actividad de la PFO se pueden observar los valores mínimos y máximos y obtener los correspondientes valores de frecuencia y tiempo (Tabla 6.17)

**Tabla 6.17 Valores optimizados para los parámetros**

| Parámetro | Frecuencia (kHz) | Tiempo (min) | Óptimo | Valor |
|---|---|---|---|---|
| **Actividad PPO** | 25 | 10 | Min | 540,25 |

El tratamiento de (25kHz-10min) es el óptimo donde hay una disminución de la actividad enzimática, en contraste con el tratamiento de (40kHz-10min) quien presenta la mayor actividad enzimática Figura 6.14.

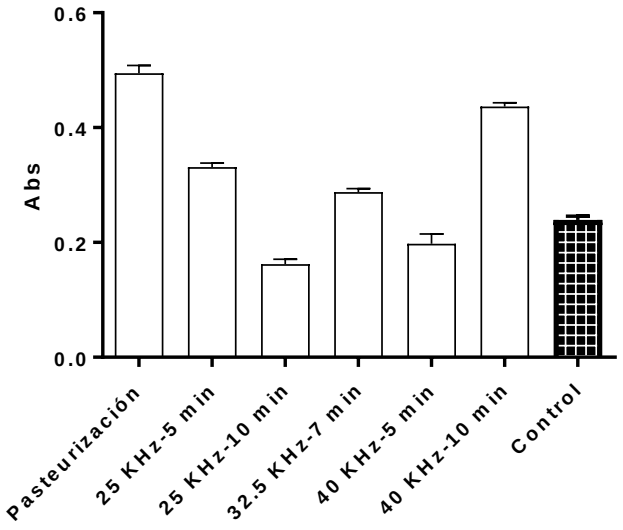
**Figura 6.14 Resultados actividad PFO**



La pasteurización fue el tratamiento que mayor actividad de la enzima presentó, debido posiblemente a que las condiciones de temperatura utilizadas en el experimento, hacen que la enzima quede más disponible para reaccionar con los sustratos por un fenómeno de afectación de la membrana celular, donde pierde su integridad dejando expuesto el sitio activo de la enzima (Leaes et al., 2013; Yu, Zeng, & Lu, 2013).

Los resultados reflejan la necesidad de incluir algún factor de conservación adicional en procesamiento de la pulpa de aguacate para prevenir los efectos negativos de esa activación enzimática, puesto que con el mejor tratamiento de ultrasonido se mantiene una actividad enzimática remanente del 69% en relación a la pulpa de aguacate control. Estos resultados se corroboran con la medición de la absorbancia a los 60 minutos de la reacción Figura 6.15. En ésta gráfica se comparan los tratamientos de pasteurización y ultrasonido, encontrando que el grado de oxidación de la pulpa, disminuye en las condiciones de ultrasonido (25 kHz-10 min) comparadas con el control, con una diferencia significativa entre los tratamientos (valor $p$ = 0.0013).

**Figura 6.15 Absorbancia a 60 min de reacción para los tratamientos**



### 6.5.3 Parámetros cinéticos de la polifenoloxidasa extraída de la pulpa de aguacate

El análisis de la cinética enzimática de la PAC, PAP, y PAU presentó para la enzima, un comportamiento cinético tipo Michaelis-Menten con valores para la PAC de $V_{max}$ 6.87 mM/min, un $K_M$ 68.86 mM y una relación $V_{máx}/K_M$ 10.02 $min^{-1}$ Inicialmente se graficó la absorbancia vs el tiempo y de la porción lineal (primeros 10 a 20 min) se calculó la pendiente que corresponde a la velocidad de la reacción. Se hizo una corrección al tiempo 0 lo que permite estudiar el efecto específico (enzimático), es decir, velocidades de los tratamientos sobre la pulpa de aguacate. El aumento en los valores de absorbancia se generó a mayores concentraciones donde la curva se hizo asintótica, encontrando los parámetros cinéticos reportados en la Tabla 6.18.

**Tabla 6.18 Parámetros cinéticos**

| Tratamiento | $V_{máx}$ (mMmin-1) | $K_M$ (mM) | $V_{máx}/K_M$ |
|---|---|---|---|
| 32.5 KHz-7 min | 6.41 | 8.531 | 0.751 |
| 40 KHz-10 min | 10.79 | 33.03 | 0.327 |
| 25 KHz-5 min | 8.563 | 29.39 | 0.291 |
| 25 KHz-10 min | 8.154 | 45.23 | 0.180 |
| 40 KHz-5 min | 6.982 | 25.74 | 0.271 |
| Pasteurización | 20.11 | 25.28 | 0.795 |
| Control | 6.87 | 68.86 | 0.100 |

La afinidad de la polifenoloxidasa por el sustrato es baja cuando se presenta un alto

$K_M$, en ésta investigación, este valor se reporta para el tratamiento de ultrasonido 25 KHz-10 min.

La relación $V_{máx}/K_M$ indica la eficiencia de la conversión del sustrato por la enzima (especificidad del sustrato), que para el caso de la pasteurización, es el tratamiento que presenta la mayor eficiencia, la actividad enzimática de la polifenoloxidasa, se incrementa cuando aumenta la temperatura hasta alrededor de 60°C, donde alcanza un nivel máximo conocido como la temperatura óptima para la acción de la enzima (Mesquita & Queiroz, 2013). Pese a que el proceso de pasteurización se aplicó una temperatura de 65°C, durante 20 minutos y teniendo en cuenta que la PFO no es una enzima extremadamente estable al calor (O'Donnell, Tiwari, Bourke, & Cullen, 2010), las condiciones usadas en éste trabajo, no fueron efectivas para inactivarla. Demostrando que la pasteurización hasta ahora no ha tenido mucha aplicación en este proceso ya que el aguacate experimenta, como consecuencia de la acción del calor, cambios irreversibles en el color.

Por su parte, el ultrasonido, puede desagregar otras biomoléculas que acompañan la enzima (por ejemplo celulosa, grasa) (Avhad, Niphadkar, & Rathod, 2014), lo cual permitiría una mayor disponibilidad del sitio activo de la enzima para convertir el sustrato, y la disrupción de las paredes celulares de la pulpa, lo que facilita la liberación de compuestos fenólicos, dando lugar en consecuencia a una mayor actividad PFO, lo cual se aprecia por una disminución en la $K_M$ sin cambios drásticos en la $V_{máx}$. Los cambios observados en el pH y acidez titulable, proveen evidencia adicional en soporte de difusión de los componentes intracelulares. Pese a que hay diferencia significativa entre los tratamientos de ultrasonido y entre estos con la pasteurización la significancia

es menor entre los tratamientos de pasteurización y el ultrasonido de máximas condiciones de frecuencia y tiempo (40 KHz-10 min).

El tratamiento de menor frecuencia y mayor tiempo (25kHz-10min) es el que presenta la menor actividad, en contraste con el tratamiento de ultrasonido de mayor frecuencia y tiempo (40kHz-10min) que es comparable con la pasteurización. Hallazgos similares con relación al tratamiento de ultrasonido, fueron previamente reportados en algunos casos con éxito en la disminución de la actividad de la polifenoloxidasa, en otros no. Bi et al., 2015 investigaron el efecto del tratamiento con ultrasonido sobre la actividad de la polifenoloxidasa en puré de aguacate diluido, los tratamientos se llevaron a cabo a 20 kHz (375 W/cm$^2$) en un tiempo de 0 a 10 min, encontrando que la actividad polifenoloxidasa aumentó significativamente en todas las condiciones de tratamiento. Costa et al. encontraron que la actividad de PFO en jugo de piña aumentó en 1,84-3,91% después del tratamiento con ultrasonido a 226 W/cm$^2$ durante 2-6 min y disminuyó con un tiempo de tratamiento más largo (Costa et al., 2013). Jang y Moon encontraron un aumento de la actividad de PFO en discos de manzana tratadas con ultrasonido a 40 kHz en comparación a las muestras tratadas simultáneamente con ultrasonido y ácido ascórbico, a su vez concluyen que el aumento de la actividad enzimática, fue causada por la liberación de enzimas debido a la disrupción celular por el tratamiento de ultrasonido (Jang & Moon, 2011). Orozco y colaboradores investigaron el efecto de métodos combinados (cebolla 2% o ajo 0,5% y ultrasonido (135 KHz, 10 min a 17°C) sobre la actividad de la polifenoloxidasa en guacamole quienes encontraron un aumento de la actividad de 2% hasta 52% (Orozco, Prieto, & Diaz, 2012).

Finalmente Wang y sus colaboradores concluyen que el incremento en la actividad enzimática, posiblemente se presenta debido a que el ultrasonido puede promover reacciones de oxidación e incrementar la transferencia de masa, mejorando el suministro de sustratos en el sitio activo de la enzima (J. Wang, Cao, Sun, Wang, & Mo, 2011).

### 6.6 Resultados microbiológicos de la (PAP)

La pasteurización, como tratamiento de referencia frente al comportamiento del control de microorganismos (como lo incluye la Resolución 3929) para el tratamiento de la pulpa, mostró ser efectivo en cuanto a la calidad microbiológica de la pulpa de aguacate, ya que no presentó recuento en ninguno de las variables analizadas Tabla 6.19.

**Tabla 6.19 Resultados microbiológicos para Pulpa de Aguacate Pasteurizada (PAP)**

| Tratamiento | Mesófilos $UFCg^{-1}$ | Mohos y Levaduras $UFCg^{-1}$ | *E coli* $UFCg^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| Pasteurización | <10 | <10 | <10 |

Lo que constituye en un proceso adecuado para la conservación microbiológica de la pulpa de aguacate con la combinación entre tiempo y temperatura usados. Por tanto, corrobora el papel de la pasteurización en la elaboración de pulpas, permitiendo extender su vida útil a partir de la disminución considerable de los microorganismos (Teixeira, 2014), sin embargo varios estudios reportan que las características

sensoriales pueden comprometerse incluyendo su valor nutricional (Rawson et al., 2011). Al igual que lo encontrado en este estudio donde el color después de la pasteurización se ve afectado, presentando una degradación hacia el color amarillo conforme avanzó el tiempo, esto está ligado directamente al pardeamiento enzimático responsable de cambios de color indeseables, corroborándose que la pasteurización presentó el mayor valor de actividad PFO.

## 6.7 Resultados microbiológicos de la (PAU)

Las variables microbiológicas *E. coli*, recuento de mesófilos y mohos y levaduras para pulpas tratadas, fueron analizadas después de los tratamientos con ultrasonido, tal como se muestra en la Tabla 6.20. Se usó pasta de aguacate sin tratamiento como control (PAC) y con tratamiento de pasteurización (PAP). Estos valores fueron comparados frente a las especificaciones dadas por la Resolución 3929/13 para pulpas tratadas, específicamente para pulpas tratadas con pasteurización que es el único tratamiento allí descrito.

**Tabla 6.20 Resultados microbiológicos de Pulpa de Aguacate con aplicación de Ultrasonido (PAU)**

| **Ultrasonido** | | **Mesófilos** UFC/g | **Mesófilos** $log_{10}$UFC/g | **Mohos y Levaduras** UFC/g | **Mohos y Levaduras** $log_{10}$UFC/g | ***E. coli*** UFC/g |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Frecuencia kHz** | **Tiempo min** | | | | | |
| 25 | 10 | 47000 | 4.67 | 2420 | 3.38 | <10 |
| 25 | 5 | 1620 | 3.21 | 1450 | 3.16 | <10 |
| 32.5 | 7 | 2730 | 3.44 | 3100 | 3.49 | <10 |
| 40 | 5 | 1570 | 3.20 | 760 | 2.88 | <10 |
| 40 | 10 | 1710 | 3.23 | 1040 | 3.02 | <10 |
| 32.5 | 7 | 910 | 2.96 | 1030 | 3.01 | <10 |
| 40 | 10 | 1350 | 3.13 | 590 | 2.77 | <10 |
| 25 | 5 | 8900 | 3.95 | 1120 | 3.05 | <10 |
| 32.5 | 7 | 2510 | 3.40 | 1615 | 3.21 | <10 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 32.5 | 7 | 8900 | 3.95 | 4400 | 3.64 | <10 |
| 32.5 | 7 | 10100 | 4.00 | 6200 | 3.79 | <10 |
| 25 | 10 | 3280 | 3.52 | 1110 | 3.05 | <10 |
| 40 | 5 | 220 | 2.34 | 100 | 2.00 | <10 |
| 32.5 | 7 | 100 | 2.0 | 90 | 1.95 | <10 |
| **Control** | | 1400 | 3.15 | 2.00 | 2.95 | <10 |

### 6.7.1 Análisis de regresión logística para mesófilos, mohos y levaduras

En la Tabla 6.21 se muestra el análisis de desviación, el cual debe cumplir que el modelo sea significativo y el residuo no para poder emplear la regresión logística para realizar el análisis.

Como se puede observar en la Tabla, el modelo de regresión logística es significativo ($p<0,05$) respecto a los mesófilos, caso contrario sucede con el residuo ($p>0,05$), esto indica que el modelo es adecuado para el análisis de los datos experimentales respecto a este parámetro microbiológico. Para el caso de mohos y levadura se encontró que el modelo no es significativo y era de esperarse ya que el 95% de los resultados experimentales no cumplen la norma.

**Tabla 6.21 Análisis de Desviación de parámetros microbiológicos**

| Variable | Fuente | Desviación | Gl | Valor-P |
|---|---|---|---|---|
| | Modelo | 2,36502 | 2 | 0,3065 |
| **Mohos y levaduras** | Residuo | 9,11823 | 11 | 0,6110 |
| | Total (corr.) | 11,4833 | 13 | |
| | Modelo | 6,91166 | 2 | 0,0316 |
| **Mesófilos** | Residuo | 11,3375 | 11 | 0,4154 |
| | Total (corr.) | 18,2492 | 13 | |

Para determinar cuál de los factores empleados en el estudio es significativo, se recurrió a la prueba de verosimilitud (Tabla 6.22). Esta prueba indica, si las variables independientes (frecuencia y tiempo) influyen significativamente o no, en la variable respuesta. La frecuencia (kHz) influye significativamente ($p<0,05$) y el tiempo (min) no ($p>0,05$) para los mesófilos. Respecto a los mohos y levaduras como ya se había constatado en la tabla anterior, donde no se encontró diferencias para cada parámetro evaluado, por tanto no hay influencia del tiempo y la frecuencia.

**Tabla 6.22 Pruebas de Razón de Verosimilitud**

| Factor | Factor | Chi-Cuadrada | Gl | Valor-P |
|---|---|---|---|---|
| **Mohos y levadura** | Frecuencia | 1,1386 | 1 | 0,2859 |
| | Tiempo | 1,2838 | 1 | 0,2572 |
| **Mesófilos** | Frecuencia | 6,3453 | 1 | 0,0118 |
| | Tiempo | 1,2332 | 1 | 0,2668 |

Ahora bien, como el modelo es significativo y el residuo no lo es y además la frecuencia es significativa respecto a los mesófilos, se puede emplear el modelo para realizar los respectivos análisis.

En la ecuación 7 se presenta la ecuación del modelo de regresión logística para Mesófilos.

$$y = e^{\theta/(1+e^{\theta})} \; donde \; \theta = 7{,}16 - 0{,}39x_1 - 0{,}67x_2 \qquad [7]$$

$$Donde \quad x_1 = Frecuencia\ (kHz) \qquad x_2 = Tiempo\ (\mathrm{min})$$

En la ecuación 8 se presenta la ecuación del modelo de regresión logística para mohos y levadura.

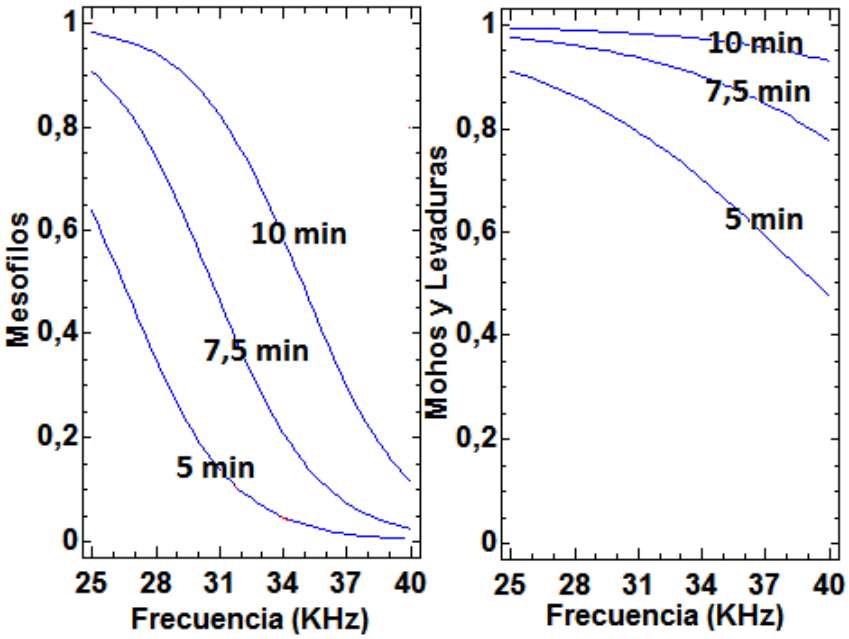
$$y = e^{\theta/(1+e^{\theta})}$$

$$donde\ \theta = 3{,}65 - 0{,}16x_1 - 0{,}53x_2 \qquad [8]$$

$$x_1 = Frecuencia\ (kHz) \qquad x_2 = Tiempo\ (\mathrm{min})$$

Con las ecuaciones anteriores se construyó la función de regresión logística, la cual se empleó para analizar el comportamiento de las dos variables independientes (frecuencia (kHz) y tiempo (min). La Figura 6.16 presenta el modelo de regresión logística ajustado para la variable microbiológica mesófilos y mohos y levaduras vs la frecuencia (kHz) y el tiempo (min). En esta grafica se puede observar como los mesófilos y mohos y levaduras disminuye con el aumento de la frecuencia y a un tiempo mínimo utilizados en los tratamientos de ultrasonido.

**Figura 6.16 Gráfica del modelo de regresión logística ajustado. Mesófilos, Mohos y levaduras vs Frecuencia (kHz) y tiempo (min)**



Valor de 1 indica 100% de probabilidad de presencia y valor de 0 indica 0% de presencia de mohos y levadura y mesófilos.

### 6.7.2 Pruebas de Múltiple Rangos para mohos y levaduras y mesófilos

De acuerdo a la siguiente codificación se evalúan las diferencias significativas entre tratamientos.

**Tabla 6.23 Codificación de tratamientos**

| Frecuencia | Tiempo | Código | Mesófilos $log_{10}UFCg^{-1}$ | Mohos y levaduras $log_{10}UFCg^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|
| 25 | 5 | Tratamiento 1 | 3,21 | 3,16 |
| 25 | 5 | Tratamiento 1 | 3,95 | 3,05 |
| 40 | 5 | Tratamiento 2 | 3,20 | 2,88 |
| 40 | 5 | Tratamiento 2 | 2,34 | 2,00 |
| 32,5 | 7 | Tratamiento 3 | 3,44 | 3,49 |
| 32,5 | 7 | Tratamiento 3 | 2,96 | 3,01 |
| 32,5 | 7 | Tratamiento 3 | 3,40 | 3,21 |
| 32,5 | 7 | Tratamiento 3 | 3,95 | 3,64 |
| 32,5 | 7 | Tratamiento 3 | 4,00 | 3,79 |
| 32,5 | 7 | Tratamiento 3 | 2,00 | 1,95 |
| 25 | 10 | Tratamiento 4 | 4,67 | 3,38 |
| 25 | 10 | Tratamiento 4 | 3,52 | 3,05 |
| 40 | 10 | Tratamiento 5 | 3,23 | 3,02 |
| 40 | 10 | Tratamiento 5 | 3,13 | 2,77 |
| | | Control | 3,15 | 2,95 |
| | | Norma | 3,48 | 2,3 |

### 6.7.3 Pruebas de Múltiple Rangos para Mesófilos por Tratamiento

Esta Tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Se identificaron 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

**Tabla 6.24 Comparación de múltiples rangos**

| Tratamiento | Media | Grupos Homogéneos |
|---|---|---|
| Tratamiento 2 | 2,77 | X |
| Control | 3,15 | XX |
| Tratamiento 5 | 3,18 | XX |
| Tratamiento 3 | 3,29167 | X |
| Norma | 3,48 | XXX |
| Tratamiento 1 | 3,58 | XX |
| Tratamiento 4 | 4,095 | X |

Método: 95,0 porcentaje LSD

El valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de mesófilos entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

**Tabla 6.24 ANOVA para mesófilos por Tratamiento**

| *Fuente* | *Suma de Cuadrados* | *Gl* | *Cuadrado Medio* | *Razón-F* | *Valor-P* |
|---|---|---|---|---|---|
| Entre grupos | 6,07113 | 6 | 1,01186 | 3,41 | 0,0080 |
| Intra grupos | 12,1714 | 41 | 0,296863 | | |
| Total (Corr.) | 18,2425 | 47 | | | |

### 6.7.4 Pruebas de Múltiple Rangos para mohos y levaduras por Tratamiento

Esta Tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Se identificaron 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

**Tabla 6.25 Comparación de múltiples rangos**

| *Tratamiento* | *Casos* | *Media* | *Grupos Homogéneos* |
|---|---|---|---|
| Norma | 3 | 2,3 | X |
| Tratamiento 2 | 6 | 2,44 | X |
| Tratamiento 5 | 6 | 2,895 | XX |
| Control | 3 | 2,95 | XX |
| Tratamiento 1 | 6 | 3,105 | X |
| Tratamiento 3 | 18 | 3,18167 | X |
| Tratamiento 4 | 6 | 3,215 | X |

Método: 95,0 porcentaje LSD

Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de mohos y levaduras entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

**Tabla 6.26 Tabla ANOVA para Mohos y levaduras por Tratamiento**

| *Fuente* | *Suma de Cuadrados* | *Gl* | *Cuadrado Medio* | *Razón-F* | *Valor-P* |
|---|---|---|---|---|---|
| Entre grupos | 4,33983 | 6 | 0,723305 | 3,66 | 0,0053 |
| Intra grupos | 8,1043 | 41 | 0,197666 | | |
| Total (Corr.) | 12,4441 | 47 | | | |

Los análisis microbiológicos de mesófilos y mohos y levaduras para las pulpas sometidas a los diferentes tratamientos de ultrasonido, muestran que hay diferencias significativas entre ellos.

La efectividad del tratamiento de ultrasonido está influenciado por diferentes variables como la frecuencia, el tiempo, la temperatura, matriz y cantidad de la muestra (Bermúdez-Aguirre et al., 2011a), para el caso de esta investigación los mesófilos presentaron dependencia de la frecuencia pero no del tiempo de exposición al ultrasonido, donde el tratamiento de 40 kHz x 5 min resultó en una remoción de 0.36 $log_{10}UFCg^{-1}$ con respecto al control, mientras para los Mohos y levaduras no hay dependencia y el tratamiento de ultrasonido bajo las condiciones evaluadas demostró ser poco eficaz para su control, esto puede deberse a la acción de la alta temperatura y presión generadas por las ondas de choque de corta duración (menos de 100 ns) durante la cavitación (Delmas & Barthe, 2015), ya que estas se dan de manera localizada y puntual y pueden inactivar microorganismos pero su efecto se limita a una pequeña área de tratamiento y por lo tanto a un bajo un número de microorganismos (Piyasena, Mohareb, & McKellar, 2003) (Li & Farid, 2016) además la pulpa de aguacate es una muestra viscosa e irregular y de comportamiento reológico no newtoniano donde se superponen capas generando una especie de sombreado o de zonas muertas que no permiten que el tratamiento de las ondas de ultrasonido sea homogéneo (Aguiló-Aguayo et al., 2014; Zacarías, Vaccari, Alfano, Irazoqui, & Imoberdorf, 2010).

### 6.7.5 Análisis microbiológico de contaminación artificial in vitro

A partir de un recuento de *E. coli* (18000 UFC g-1) en la pulpa de aguacate y presencia de *Salmonella* spp, posterior a una contaminación artificial, las muestras fueron sometidas bajo los tratamientos de pasteurización y ultrasonido (condición de máxima frecuencia-tiempo 40kHz- 10 min), obteniendo recuentos de *E. coli* y evaluación de *Salmonella* spp como se presentan en la Tabla 6.27. Estos resultados de remoción de *E. coli* de 0.08 $log_{10}UFCg^{-1}$ para ultrasonido y 0.41 $log_{10}UFCg^{-1}$ para pasteurización, muestran que la pasteurización logra ser más efectiva frente a la carga microbiana evaluada, corroborándose su efectividad en la reducción de la contaminación microbiológica (Olaimat & Holley, 2012) frente a las condiciones de tratamiento de ultrasonido utilizadas en este experimento.

**Tabla 6.27 Ensayo *in vitro***

| Ensayo *in vitro* | Control | Pasteurización | Ultrasonido |
|---|---|---|---|
| | 18000 UFC $g^{-1}$ | 7000UFC $g^{-1}$ | 15000 $UFCg^{-1}$ |
| ***E. coli*** | 4.26 $log_{10}$ UFC $g^{-1}$ | 3.85 $log_{10}$ UFC $g^{-1}$ | 4.18 $log_{10}$ UFC $g^{-1}$ |
| ***Salmonella spp*** | Presencia | Presencia | Presencia |

Teniendo en cuenta que hay reportes de la efectividad del tratamiento de ultrasonido, encontrados por Maldonado et al (2011) quienes evaluaron el efecto de tratamientos de ultrasonido de alta intensidad sobre *E. coli* usando suspensiones bacterianas ($10^8$ UFC/ml) y sonicando a 35 kHz y 100W (entre 2.5 y 10 minutos), obteniendo reducciones de 0,8 ciclos $log_{10}$ en la concentración celular del microorganismo, esta actividad bactericida del ultrasonido, esta atribuida al efecto sobre la integridad de la membrana y a la pérdida de componentes celulares críticos, principalmente por el

efecto de cavitación donde se promueve la implosión de micro burbujas las cuales generan la liberación de energía (Robles-Ozuna & Ochoa-Martinez, 2012). Pese a que la concentración de *E. coli* evaluada en esta investigación es muy baja comparada con la reportada por Maldonado (2011) en ambos hay una remoción del microorganismo, dicha concentración se tuvo en cuenta debido a la viscosidad de la muestra.

## 6.8 Conclusiones y recomendaciones

- La pulpa de aguacate PAC (*Persea americana* Mill. var Hass), cumplió con las características fisicoquímicas y microbiológicas exigidas por la resolución 3929/2013, que la hacen potencialmente apta como materia prima para el desarrollo de productos con valor agregado y/o como material susceptible de transformación, generando así, usos alternativos para excedentes de cosecha del cultivo de aguacate, permitiendo el uso de tecnologías de conservación que resulten en un incremento de la vida útil de dichos productos y sus características sensoriales.

- Aunque no se lograron establecer las condiciones óptimas en las que la PAU conservara tanto la calidad fisicoquímica como la microbiológica, se encontró que a 25 kHz de frecuencia y 10 min, el tratamiento de ultrasonido presentó la menor actividad enzimática de la PFO; la frecuencia de 25kH es la menor frecuencia empleada en los tratamientos la cual favorece los parámetros fisicoquímicos de acidez y cambio de color global $\Delta E$. En cuanto a la calidad microbiológica de la pulpa de aguacate, se evidenció una disminución del recuento de mesófilos a mayor frecuencia independiente del tiempo de exposición (40kHz).

- El tratamiento de pasteurización (65°C, durante 20 minutos), fue más efectivo para el control microbiológico de la pulpa de aguacate, cuando se comparó con un tratamiento de conservación alternativo como lo es el ultrasonido, al no presentarse recuentos para las muestras de pulpa de aguacate evaluadas; fenómeno contrario al que sucedió con el análisis enzimático, donde presentó mayor actividad de la PFO y por ende un mayor deterioro del color.
- Para próximos estudios, se sugiere el uso de tecnologías combinadas con ultrasonido, que permitan generar una sinergia, tanto para una mayor prevención de los efectos adversos de la activación enzimática, como para la seguridad microbiológica del producto, en la búsqueda de alternativas cada vez más viables que permitan reemplazar tratamientos de conservación convencionales, que involucran el uso de altas temperaturas de procesamiento.

# 7 Referencias


Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M. M., Hu, B., Lei, S., … Zeng, X. (2013). Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*(5), 1182–7. http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.02.010

ADA. (2009). Position of the American Dietetic Association: functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*, *109*(4), 735–746. Retrieved from http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-64049098890&partnerID=tZOtx3y1

Adekunte, A. O., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Scannell, A. G. M., & O'Donnell, C. P. (2010). Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, *122*(3), 500–507. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.026

Aguiló-Aguayo, I., Oms-Oliu, G., Martín-Belloso, O., & Soliva-Fortuny, R. (2014). Impact of pulsed light treatments on quality characteristics and oxidative stability of fresh-cut avocado. *LWT - Food Science and Technology*, *59*(1), 320–326. http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.049

Alzamora, S. M., López-Malo, A., Tapia, M. S., & Welti-Chanes, J. (2016). Minimally Processed Foods BT - Encyclopedia of Food and Health (pp. 767–771). Oxford: Academic Press. http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00470-0

Arlene, A. A., Prima, K. A., Utama, L., & Anggraini, S. A. (2015). The Preliminary Study

of the Dye Extraction from the Avocado Seed Using Ultrasonic Assisted Extraction. *Procedia Chemistry*, *16*, 334–340. http://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.061

Arpaia, M. L., Collin, S., Sievert, J., & Obenland, D. (2015). Influence of cold storage prior to and after ripening on quality factors and sensory attributes of “Hass” avocados. *Postharvest Biology and Technology*, *110*, 149–157. http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.016

Asiegbu, C. V., Lebelo, S. L., & Tabit, F. T. (2015). The Food Safety Knowledge And Microbial Hazards Awareness Of Consumers Of Ready-To-Eat Street-Vended Food. *Food Control*, *60*, 422–429. http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.021

Avhad, D. N., Niphadkar, S. S., & Rathod, V. K. (2014). Ultrasound assisted three phase partitioning of a fibrinolytic enzyme. *Ultrasonics Sonochemistry*, *21*(2), 628–33. http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.10.002

Avocadosource.com. (2016).

Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., & Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, *48*(2), 410–427. http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.004

Bareño, F. (2014). *Estado Actual Y Perspectivas De La Cadena Del Aguacate En Colombia*.

Benedito, J., Ortuño, C., Castillo-Zamudio, R. I., & Mulet, A. (2015). Microbial Inactivation by Ultrasound Assisted Supercritical Fluids. *Physics Procedia*, *70*, 824–

827. http://doi.org/10.1016/j.phpro.2015.08.168

Bermejo-Prada, A., Van Buggenhout, S., Otero, L., Houben, K., Van Loey, A., & Hendrickx, M. E. (2014). Kinetics of thermal and high-pressure inactivation of avocado polygalacturonase. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *26*, 51–58. http://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.05.005

Bermúdez-Aguirre, D., Mobbs, T., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2011a). Ultrasound Applications in Food Processing. In H. Feng, G. Barbosa-Canovas, & J. Weiss (Eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing* (pp. 65–105). New York, NY: Springer New York. http://doi.org/10.1007/978-1-4419-7472-3_3

Bermúdez-Aguirre, D., Mobbs, T., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2011b). Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing. In H. Feng, G. Barbosa-Canovas, & J. Weiss (Eds.) (pp. 65–105). New York, NY: Springer New York. http://doi.org/10.1007/978-1-4419-7472-3_3

Bernal Estrada, J., Diaz Diez, C., Osorio Toro, C., Tamayo Velez, A., Osorio Vega, W., Cordoba Gaona, O., … Londoño Bonilla, M. (2014). *Manual tecnico actualizacion tecnologia y buenas practicas agricolas (BPA) en el cultivo de aguacate*. *Corpoica* (Segunda ed). http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2

Bhupathiraju, S. N., & Tucker, K. L. (2011). Coronary heart disease prevention: nutrients, foods, and dietary patterns. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *412*(17–18), 1493–514. http://doi.org/10.1016/j.cca.2011.04.038

Bi, X., Hemar, Y., Balaban, M. O., & Liao, X. (2015). The effect of ultrasound on particle

size, color, viscosity and polyphenol oxidase activity of diluted avocado puree. *Ultrasonics Sonochemistry*, *27*, 567–75. http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.04.011

Bielli, A., Scioli, M. G., Mazzaglia, D., Doldo, E., & Orlandi, A. (2015). Antioxidants and vascular health. *Life Sciences*, *143*, 209–16. http://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.11.012

Bilek, S. E., & Turantaş, F. (2013). Decontamination efficiency of high power ultrasound in the fruit and vegetable industry, a review. *International Journal of Food Microbiology*, *166*(1), 155–62. http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.028

Brilhante Sao José, J. F., & Dantas Vanetti, M. C. (2012). Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and Salmonella enterica Typhimurium on cherry tomatoes. *JFCO Food Control*, *24*(1–2), 95–99.

Bustos, M. C., Mazzobre, M. F., & Buera, M. P. (2015). Stabilization of refrigerated avocado pulp: Effect of Allium and Brassica extracts on enzymatic browning. *LWT - Food Science and Technology*, *61*(1), 89–97. http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.026

Calderón-Oliver, M., Escalona-Buendía, H. B., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverri, J., Pedroza-Islas, R., & Ponce-Alquicira, E. (2016). Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. *LWT - Food Science and Technology*, *65*, 46–52. http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.048

Cameron, M., McMaster, L. D., & Britz, T. J. (2010). Impact of ultrasound on dairy

spoilage microbes and milk components. *Dairy Science & Technology*, *90*(1), 119–119. http://doi.org/10.1051/dst/2010003

Cappelletti, M., Ferrentino, G., & Spilimbergo, S. (2014). Supercritical carbon dioxide combined with high power ultrasound: An effective method for the pasteurization of coconut water. *The Journal of Supercritical Fluids*, *92*, 257–263. http://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.06.010

Cavallo, D. N., Horino, M., & McCarthy, W. J. (2016). Adult Intake of Minimally Processed Fruits and Vegetables: Associations with Cardiometabolic Disease Risk Factors. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. http://doi.org/10.1016/j.jand.2016.03.019

Chambers, L. A., & Flosdorf, E. W. (1936). THE DENATURATION OF PROTEINS BY SOUND WAVES OF AUDIBLE FREQUENCIES. *Journal of Biological Chemistry* , *114*(1), 75–83. Retrieved from http://www.jbc.org/content/114/1/75.short

Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2012). Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, *19*(5), 975–83. http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.01.010

Chang, S. K., Alasalvar, C., & Shahidi, F. (2016). Review of dried fruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. *Journal of Functional Foods*, *21*, 113–132. http://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.034

Char, C. D., Mitilinaki, E., Guerrero, S. N., & Alzamora, S. M. (2010). Use of High-Intensity Ultrasound and UV-C Light to Inactivate Some Microorganisms in Fruit

Juices. *Food and Bioprocess Technology*, *3*(6), 797–803. http://doi.org/10.1007/s11947-009-0307-7

Chel-Guerrero, L., Barbosa-Martín, E., Martínez-Antonio, A., González-Mondragón, E., & Betancur-Ancona, D. (2016). Some physicochemical and rheological properties of starch isolated from avocado seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, *86*, 302–8. http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.052

Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(4), 813–35. http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023

Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(4), 813–835. http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023

Codex Alimentarius. Frutas y Hortalizas Frescas. Joint FAO/WHO Food Standards Programme (2007). Roma: ISBN 978-92-5-305839-6. Retrieved from http://www.fao.org/docrep/010/a1389s/a1389s00.htm

Costa, M. G. M., Fonteles, T. V., de Jesus, A. L. T., Almeida, F. D. L., de Miranda, M. R. A., Fernandes, F. A. N., & Rodrigues, S. (2013). High-Intensity Ultrasound Processing of Pineapple Juice. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(4), 997–1006. http://doi.org/10.1007/s11947-011-0746-9

Cowan, A. K., & Wolstenholme, B. N. (2016). Avocado. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 294–300). http://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00049-0

Daiuto, É. R., Russo, V. C., Vietes, R. L., Fumes, J. G. F., Vileigas, D. F., & Smith, R. E. (2014). Stability of a product prepared with “Fuerte” avocados exposed to gamma and UV-C radiation. *Journal of Food Processing and Preservation*, *38*(4), 1999–2005. http://doi.org/10.1111/jfpp.12176

Delgado-Povedano, M. M., & Luque de Castro, M. D. (2015). A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. *Analytica Chimica Acta*, *889*, 1–21. http://doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.004

Delgado, A., Kulisiewicz, L., Rauh, C., & Wierschem, A. (2012). *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. Elsevier. http://doi.org/10.1016/B978-0-12-381470-8.00002-5

Delmas, H., & Barthe, L. (2015). Ultrasonic mixing, homogenization, and emulsification in food processing and other applications. In *Power Ultrasonics: Applications of High-Intensity Ultrasound* (pp. 757–791). http://doi.org/10.1016/B978-1-78242-028-6.00025-9

Devore, E. E., Kang, J. H., Stampfer, M. J., & Grodstein, F. (2010). Total antioxidant capacity of diet in relation to cognitive function and decline. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *92*(5), 1157–64. http://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29634

Ding, H., Han, C., Guo, D., Chin, Y.-W., Ding, Y., Kinghorn, A. D., & D’Ambrosio, S. M. (2009). Selective induction of apoptosis of human oral cancer cell lines by avocado extracts via a ROS-mediated mechanism. *Nutrition and Cancer*, *61*(3), 348–56. http://doi.org/10.1080/01635580802567158

Drakopoulou, S., Terzakis, S., Fountoulakis, M. S., Mantzavinos, D., & Manios, T. (2009). Ultrasound-induced inactivation of gram-negative and gram-positive bacteria in secondary treated municipal wastewater. *Ultrasonics Sonochemistry*, *16*(5), 629–634. http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2008.11.011

Dreher, M. L., & Davenport, A. J. (2013). Hass avocado composition and potential health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *53*(7), 738–50. http://doi.org/10.1080/10408398.2011.556759

FAO. (2015). FAOSTAT,Statistics División. Retrieved May 28, 2016, from http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E.

Farkas, J., Ehlermann, D. A. E., & Mohácsi-Farkas, C. (2014). Food Technologies: Food Irradiation. In *Encyclopedia of Food Safety* (pp. 178–186). http://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00259-6

Ferrario, M., Alzamora, S. M., & Guerrero, S. (2013). Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound. *Food Microbiology*, *46*, 635–642. http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.017

Ferrentino, G., & Spilimbergo, S. (2016). A combined high pressure carbon dioxide and high power ultrasound treatment for the microbial stabilization of cooked ham. *Journal of Food Engineering*, *174*, 47–55. http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.11.013

Fuentes, E., Báez, M. E., & Díaz, J. (2009). Microwave-assisted extraction at atmospheric pressure coupled to different clean-up methods for the determination

of organophosphorus pesticides in olive and avocado oil. *Journal of Chromatography A*, *1216*(51), 8859–8866. Retrieved from 10.1016/j.chroma.2009.10.082

Fuentes Berrio, L., Acevedo Correa, D., Chantré, C. A., & Gelvez Ordoñez, V. M. (2015). Alimentos funcionales: impacto y retos para el desarrollo y Bienestar de la Sociedad Colombiana. *Biotecnoloíga En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, *13*(2), 140. http://doi.org/10.18684/BSAA(13)140-149

Garner, L., Klein, G., Zheng, Y., Khuong, T., & Lovatt, C. J. (2011a). Response of evergreen perennial tree crops to gibberellic acid is crop load-dependent: II. GA3 increases yield and fruit size of “Hass” avocado only in the on-crop year of an alternate bearing orchard. *Scientia Horticulturae*, *130*(4), 753–761. http://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.08.033

Garner, L., Klein, G., Zheng, Y., Khuong, T., & Lovatt, C. J. (2011b). Response of evergreen perennial tree crops to gibberellic acid is crop load-dependent: II. GA3 increases yield and fruit size of “Hass” avocado only in the on-crop year of an alternate bearing orchard. *Scientia Horticulturae*, *130*(4), 753–761. http://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.08.033

George, H. L., & Christoffersen, R. E. (2016). Differential latency toward (–)-epicatechin and catechol mediated by avocado mesocarp polyphenol oxidase (PPO). *Postharvest Biology and Technology*, *112*, 31–38. http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.036

Gómez-López, V. M., Koutchma, T., & Linden, K. (2012). Chapter 8 – Ultraviolet and

Pulsed Light Processing of Fluid Foods. In *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods* (pp. 185–223). http://doi.org/10.1016/B978-0-12-381470-8.00008-6

Gómez, P. L., Welti-Chanes, J., & Alzamora, S. M. (2011). Hurdle technology in fruit processing. *Annual Review of Food Science and Technology*. Retrieved from http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84855388734&partnerID=tZOtx3y1

Gonzalez, M. E., Anthon, G. E., & Barrett, D. M. (2010). Onion Cells After High Pressure and Thermal Processing: Comparison of Membrane Integrity Changes Using Different Analytical Methods and Impact on Tissue Texture. *Journal of Food Science*, *75*(7), E426--E432. http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01767.x

Grieser, F., Choi, P. K., Enomoto, N., Okitsu, K., Harada, H., & Yasui, K. (2015). *Sonochemistry and the Acoustic Bubble*. Elsevier Science.

Guerrero, C. A. (2009). *Inhibición de la Actividad Enzimática de la Polifenoloxidasa Extraída del Banano (Cavendish Valery) Mediante Sistemas Bifásicos Acuosos con Isoespintanol y Ácido Ascórbico*. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellin.

Guzmán, G. R., Dorantes, A. L., Hernández, U. H., Hernández, S. H., Ortiz, A., & Mora, E. R. (2002). Effect of zinc and copper chloride on the color of avocado puree heated with microwaves. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *3*(1), 47. Retrieved from http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=7798717&lang=es&site=ehost-live

Hawmann Díaz, D. J. (2014). *Efecto del tiempo de tratamiento con ultrasonido y concentración de ácido citrico y sal (NaCl) sobre la actividad de la polifenoloxidasa en pulpa de palta (Persea americana Mill var. Hass). Tesis para obtener el título profesional de ingeniero agroindustr*. Universidad Cesar Vallejo.

Henríquez Arias, L. E., Patiño Gómez, J. H., & Salazar, J. A. (2012). Application of the matrixes engineering on the development of minimally processed Hass avocado (Persea americana Mill) with additions of vitamin C and calcium. *Revista Lasallista de Investigación*, *9*, 44–54. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492012000200006&lng=en.

Húngaro, H. M., Peña, W. E. L., Silva, N. B. M., Carvalho, R. V, Alvarenga, V. O., & Sant'Ana, A. S. (2014). Food Microbiology. In N. K. Van Alfen (Ed.), *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* (pp. 213–231). Oxford: Academic Press. http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00059-0

Iannetti, L., Acciari, V. A., Antoci, S., Addante, N., Bardasi, L., Bilei, S., … Migliorati, G. (2016). Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods in Italy: Prevalence of contamination at retail and characterisation of strains from meat products and cheese. *Food Control*, *68*, 55–61. http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.036

ICA. (2013). Productores y exportadores de aguacate hass conforman la corporación nacional. Retrieved November 1, 2015, from http://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2013/Productores-y-exportadores-de-aguacate-hass-confor.aspx

ICONTEC. Norma Técnica Colombiana NTC-1248 Productos Agrícolas: Aguacate (1994). Colombia: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.

ICONTEC. Norma Técnica Colombiana NTC-5209 Frutas frescas. Aguacate. Variedades mejoradas. Especificaciones (2003). Colombia: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.

Ingram, D. K., Elks, C. M., Davenport, G. M., & Roth, G. S. (2013). Potential Health Benefits of Avocados. In *Bioactives in Fruit* (pp. 337–352). John Wiley & Sons, Ltd. http://doi.org/10.1002/9781118635551.ch14

Jacobo-Velázquez, D. A., Castellanos-Dohnal, G., Caballero-Mata, P., & Hernández-Brenes, C. (2013). Biochemical changes during the storage of high hydrostatic pressure processed avocado puree in the presence of natural antioxidants. *CyTA - Journal of Food*, *11*(4), 379–391. http://doi.org/10.1080/19476337.2013.775185

Jacobo-Velázquez, D. A., & Hernández-Brenes, C. (2010). Biochemical Changes during the Storage of High Hydrostatic Pressure Processed Avocado Paste. *Journal of Food Science*, *75*(6), S264–S270. http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01654.x

Jacobo-Velázquez, D. A., & Hernández-Brenes, C. (2011). Sensory Shelf-Life Limiting Factor of High Hydrostatic Pressure Processed Avocado Paste. *Journal of Food Science*, *76*(6), S388–S395. http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02259.x

Jang, J.-H., & Moon, K.-D. (2011). Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. *Food Chemistry*, *124*(2), 444–449.

http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.052

Jian, S., Wenyi, T., & Wuyong, C. (2010). Studies on the application of ultrasound in leather enzymatic unhairing. *Ultrasonics Sonochemistry*, *17*(2), 376–82. http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.10.003

Jimenez, M. E., Zambrano, M. L., & Aguilar, M. R. (2004). Estabilidad de Pigmentos en Frutas Sometidas a Tratamiento con Energía de Microondas. *Información Tecnológica*, *15*, 61–66. Retrieved from http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642004000300009&nrm=iso

Johansson, L., Singh, T., Leong, T., Mawson, R., McArthur, S., Manasseh, R., & Juliano, P. (2016). Cavitation and non-cavitation regime for large-scale ultrasonic standing wave particle separation systems – In situ gentle cavitation threshold determination and free radical related oxidation. *Ultrasonics Sonochemistry*, *28*, 346–356. http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.08.003

Kahn, V. (1977). Latency properties of polyphenol oxidase in two avocado cultivars differing in their rate of browning. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *28*(3), 233–239. http://doi.org/10.1002/jsfa.2740280302

Kearney, J. (2010). Food consumption trends and drivers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *365*(1554), 2793–2807. Retrieved from http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/365/1554/2793.abstract

Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., & Schoessler, K. (2011). Emerging Technologies in Food Processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, *2*(1), 203–235. http://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124129

Leaes, E. X., Lima, D., Miklasevicius, L., Ramon, A. P., Dal Prá, V., Bassaco, M. M., … Mazutti, M. A. (2013). Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α-amylase and amyloglucosidase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *2*(1), 21–25. http://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.08.003

León, K., Mery, D., Pedreschi, F., & León, J. (2006). Color measurement in L∗a∗b∗ units from RGB digital images. *Food Research International*, *39*(10), 1084–1091. http://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.03.006

Li, X., & Farid, M. (2016). A Review on Recent Development in Non-Conventional Food Sterilization Technologies. *Journal of Food Engineering*, *182*, 33–45. http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.02.026

Maćkiw, E., Modzelewska, M., Mąka, Ł., Ścieżyńska, H., Pawłowska, K., Postupolski, J., & Korsak, D. (2016). Antimicrobial resistance profiles of Listeria monocytogenes isolated from ready-to-eat products in Poland in 2007–2011. *Food Control*, *59*, 7–11. http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.011

Maldonado, María; Aguilar, Catalina; Carvajal, Fredy; González, Gerardo; Klotz, B. (2011). Aproximación al mecanismo de inactivación de Escherichia coli por ondas de ultrasonido de alta intensidad. *Revista de La Asociación Colombiana de Ciencia Y Tecnología de Alimentos*, *20*(24), 53–68.

Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry*, *67*(21), 2318–31. http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.006

Mejia Hernadez, A. E. (2011). Informe de gestión secretaría técnica. Consejo nacional del aguacate.

Mesquita, V. L. V., & Queiroz, C. (2013). *Biochemistry of Foods*. *Biochemistry of Foods*. Elsevier. http://doi.org/10.1016/B978-0-08-091809-9.00010-8

*Mexico: Avocado Annual*. (2015). *United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service.* Retrieved from http://www.fas.usda.gov/data/mexico-avocado-annual

Meyer, M. D., & Terry, L. A. (2010). Fatty acid and sugar composition of avocado, cv. Hass, in response to treatment with an ethylene scavenger or 1-methylcyclopropene to extend storage life. *Food Chemistry*, *121*(4), 1203–1210. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.005

Ministerio de Agricultura. (2015). *1er Congreso Nacional de Promoción al Consumo de Frutas y Hortalizas*. Retrieved from https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/En-Colombia-35-de-las-personas-no-consumen-frutas-y-70-hortalizas-.aspx

Ministerio de Agricultura, C. (2016). Agronet-Colombia. Retrieved from http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx

Ministerio de salud y protección social. Resolucion-3929-2013 (2013). Colombia. Retrieved from

https://www.invima.gov.co/images/pdf/normatividad/alimentos/resoluciones/resoluciones/2013/Resolucion-3929-2013.pdf

Ministerio de salud y protección social. Resolución 2674 (2013). Colombia. Retrieved from https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resolución 2674 de 2013.pdf

Muneta, P. (1977). Enzymatic blackening in potatoes: Influence of pH on dopachrome oxidation. *American Potato Journal*, *54*(8), 387–393. http://doi.org/10.1007/BF02852759

Nevin-Ridley. (2016). Enzyme Structures Database. Retrieved June 4, 2016, from http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/

Nunes, M. C. do N. (2015). Correlations between subjective quality and physicochemical attributes of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, *107*, 43–54. http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.05.001

O'Donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2010). Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(7), 358–367. http://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.007

Olaimat, A. N., & Holley, R. A. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiology*, *32*(1), 1–19. http://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.016

Orozco, M. L., Prieto, R. E., & Diaz, L. E. (2012). Efecto de la adición de cebolla, ajo y la aplicación de ultrasonido de alta intensidad sobre la actividad de la

polifenoloxidasa en guacamole. *Vitae*, *19*(1), S132–S134.

Ortuño, C., Martínez-Pastor, M. T., Mulet, A., & Benedito, J. (2012). An ultrasound-enhanced system for microbial inactivation using supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *15*, 31–37. http://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.02.006

Ortuño, C., Martínez-Pastor, M. T., Mulet, A., & Benedito, J. (2013). Application of high power ultrasound in the supercritical carbon dioxide inactivation of Saccharomyces cerevisiae. *Food Research International*, *51*(2), 474–481. http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.041

Pang, G., Xie, J., Chen, Q., & Hu, Z. (2012). How functional foods play critical roles in human health. *Food Science and Human Wellness*, *1*(1), 26–60. http://doi.org/10.1016/j.fshw.2012.10.001

Pathare, P., Opara, U., & Al-Said, F.-J. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(1), 36–60. http://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9

Piyasena, P., Mohareb, E., & McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology International Journal of Food Microbiology*, *87*(3), 207–216.

Pizzocaro, F., Torreggiani, D., & Gilardina, G. (1993). Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. *Journal of Food Processing and Preservation*, *17*(1), 21–30. http://doi.org/10.1111/j.1745-

4549.1993.tb00223.x

Presidencia de la República. (2015). Colombia exporta primer contenedor de aguacate Hass a Estados Unidos. Retrieved from http://es.presidencia.gov.co/noticia/Colombia-exporta-primer-contenedor-de-aguacate-Hass-a-Estados-Unidos

Ramos-Villarroel, A. Y., Martín-Belloso, O., & Soliva-Fortuny, R. (2011). Using Antibrowning Agents to Enhance Quality and Safety of Fresh-Cut Avocado Treated with Intense Light Pulses. *Journal of Food Science*, *76*(9), S528–S534. http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02410.x

Ramos, B., Miller, F. A., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., & Silva, C. L. M. (2013). Fresh fruits and vegetables—An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *20*, 1–15. http://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.002

Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B. K., Noci, F., Koutchma, T., & Brunton, N. (2011). Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*, *44*(7), 1875–1887. http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.053

República de Colombia. Decreto 3075 (1997). Colombia. Retrieved from https://www.invima.gov.co/images/stories/aliementos/decreto_3075_1997.pdf

Restrepo Duque, A. M., Londoño-Londoño, J., González Alvarez, D., Benavides Paz, Y., & Cardona Salazar, B. L. (2012). Comparación del aceite de aguacate variedad

Hass cultivado en Colombia, obtenido por fluidos supercríticos y métodos convencionales: una perspectiva desde la calidad. *Revista Lasallista de Investigación*, *9*(2), 151–161.

Robles-Ozuna, L. ., & Ochoa-Martinez, L. . (2012). Ultrasonido y sus Aplicaciones en el Procesamiento de Alimentos. *Revista Iberoamericana de Tecnologia Postcosecha*, *13*(2), 2012. http://doi.org/ISSN: 1665-0504

Rodríguez-Sánchez, D., Silva-Platas, C., Rojo, R. P., García, N., Cisneros-Zevallos, L., García-Rivas, G., & Hernández-Brenes, C. (2013). Activity-guided identification of acetogenins as novel lipophilic antioxidants present in avocado pulp (Persea americana). *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *942–943*, 37–45. http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.10.013

São José, J. F. B. de, Andrade, N. J. de, Ramos, A. M., Vanetti, M. C. D., Stringheta, P. C., & Chaves, J. B. P. (2014). Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. *Food Control*, *45*, 36–50. http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.015

Segovia, F. J., Corral-Pérez, J. J., & Almajano, M. P. (2016). Avocado seed: Modeling extraction of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*, *85*, 213–220. http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.005

Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, *18*, 820–897. http://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018

Sistema de información de gestión y desempeño de organizaciones de cadenas. (2015). Cadena Productiva Hortalizas.

Slavin, J. L., & Lloyd, B. (2012). Health Benefits of Fruits and Vegetables. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, *3*(4), 506–516. http://doi.org/10.3945/an.112.002154

Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(7), 323–331. http://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003

Sousa-Gallagher, M. J., Tank, A., & Sousa, R. (2016). *The Stability and Shelf Life of Food*. *The Stability and Shelf Life of Food*. Elsevier. http://doi.org/10.1016/B978-0-08-100435-7.00014-9

Strydom, A., Vorster, R., Gouws, P. A., & Witthuhn, R. C. (2016). Successful management of Listeria spp. in an avocado processing facility. *Food Control*, *62*, 208–215. http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.043

Subhedar, P. B., & Gogate, P. R. (2014). Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *101*, 108–114. http://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.01.002

Sulaiman, A., Soo, M. J., Yoon, M. M. L., Farid, M., & Silva, F. V. M. (2015). Modeling the polyphenoloxidase inactivation kinetics in pear, apple and strawberry purees after High Pressure Processing. *Journal of Food Engineering*, *147*, 89–94. http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.030

Sutar, R. S., & Rathod, V. K. (2015). Ultrasound assisted enzyme catalyzed degradation of Cetirizine dihydrochloride. *Ultrasonics Sonochemistry*, *24*, 80–6. http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.016

Szent-Györgyi, A. (1933). Chemical and Biological Effects of UltraSonic Radiation. *Nature*, *131*(3304), 278. http://doi.org/10.1038/131278a0

Tao, Y., Hogan, E., & Kelly, A. L. (2014). Chapter 1 – High-Pressure Processing of Foods: An Overview. In *Emerging Technologies for Food Processing* (pp. 3–24). http://doi.org/10.1016/B978-0-12-411479-1.00001-2

Teixeira, A. A. (2014). Thermal Food Preservation Techniques (Pasteurization, Sterilization, Canning and Blanching). In *Conventional and Advanced Food Processing Technologies* (pp. 115–128). John Wiley & Sons, Ltd. http://doi.org/10.1002/9781118406281.ch6

Wang, J., Cao, Y., Sun, B., Wang, C., & Mo, Y. (2011). Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(2), 534–40. http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.09.008

Wang, M., Zheng, Y., Khuong, T., & Lovatt, C. J. (2012). Effect of harvest date on the nutritional quality and antioxidant capacity in “Hass” avocado during storage. *Food Chemistry*, *135*(2), 694–8. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.022

Wang, Z., Lin, X., Li, P., Zhang, J., Wang, S., & Ma, H. (2012). Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment. *Bioresource Technology*, *117*, 222–7. http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.015

Weemaes, C., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., & Hendrickx, M. (1999). Effect of pH and Antibrowning Agents on the Pressure Stability of Avocado and Mushroom Polyphenoloxidase. In H. Ludwig (Ed.), *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology SE - 67* (pp. 301–304). Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-642-60196-5_67

Woolf, A. B., Wibisono, R., Farr, J., Hallett, I., Richter, L., Oey, I., … Requejo-Jackman, C. (2013). Effect of high pressure processing on avocado slices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *18*, 65–73. http://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.02.011

Xiao, Y., Yang, L., Mao, P., Zhao, Z., & Lin, X. (2011). Ultrasound-promoted enzymatic synthesis of troxerutin esters in nonaqueous solvents. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(1), 303–9. http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.06.010

Xin, Y., Zhang, M., Xu, B., Adhikari, B., & Sun, J. (2015). Research trends in selected blanching pretreatments and quick freezing technologies as applied in fruits and vegetables: A review. *International Journal of Refrigeration*, *57*(n/a), n/a. http://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2015.04.015

Yu, Z.-L., Zeng, W.-C., & Lu, X.-L. (2013). Influence of ultrasound to the activity of tyrosinase. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*(3), 805–9. http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.11.006

Zacarías, S. M., Vaccari, M. C., Alfano, O. M., Irazoqui, H. A., & Imoberdorf, G. E. (2010). Effect of the radiation flux on the photocatalytic inactivation of spores of Bacillus subtilis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *214*(2),

171–180. http://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2010.06.021

Zapata, J. E., Restrepo-Suárez, A. M., & Arias, L. (2016). Cinética de la Deshidratación Osmótica del Aguacate (Persea americana), y Optimización del Color por Medio de Superficies de Respuesta . *Información Tecnológica* . scielocl .

Zhao, L., Wang, S., Liu, F., Dong, P., Huang, W., Xiong, L., & Liao, X. (2013). Comparing the effects of high hydrostatic pressure and thermal pasteurization combined with nisin on the quality of cucumber juice drinks. *INNFOO Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *17*, 27–36.

Zhou, L., Tey, C. Y., Bingol, G., & Bi, J. (2016). Effect of microwave treatment on enzyme inactivation and quality change of defatted avocado puree during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *37*, 61–67. http://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.002