

**Validación de proceso poscosecha para
producto mínimamente procesado a base de
lechuga (*Lactuca sativa*)**

Erick Fabricio Portillo Morales

**Escuela Agrícola Panamericana Zamorano,
Honduras**
Octubre, 2014

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Validación de proceso poscosecha para producto mínimamente procesado a base de lechuga (*Lactuca sativa*)

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Erick Fabricio Portillo Morales

Zamorano, Honduras

Octubre, 2014

Validación de proceso poscosecha para producto mínimamente procesado a base de lechuga (*Lactuca sativa*)

Presentado por:

Erick Fabricio Portillo Morales

Aprobado por:

Jorge Cardona, Ph.D.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria

Mayra Márquez, Ph.D.
Asesora

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Validación de proceso poscosecha para producto mínimamente procesado a base de lechuga (*Lactuca sativa*)

Erick Fabricio Portillo Morales

Resumen. Los consumidores exigen cada vez más calidad, inocuidad y funcionalidad en los alimentos, exigencias que la industria debe cumplir. El objetivo de este estudio fue validar el proceso de elaboración del producto mínimamente procesado a base lechuga especial realizado por la Planta Poscosecha de Zamorano. Se utilizó un diseño completamente al azar evaluando la aplicación o no de vapor, concentración de antioxidantes (Ácido cítrico 1% + ácido ascórbico 0.5% o ambos al 2%) y temperatura de su solución (4 y 25 °C). En la primera fase se analizó pH, donde se observó que dosis elevadas de antioxidantes causan deterioro, textura (N y mJ) donde no se observó diferencia significativa y color ($L^*a^*b^*c^*h$) donde los dos tratamientos con antioxidantes (AC=1% y AA=0.5%) a 25 °C, con y sin aplicación de vapor y el control (Agua) obtuvieron un color más verde e intenso. En la segunda fase se analizó color nuevamente, donde no se observó diferencias significativas entre tratamientos y similar comportamiento a la fase anterior. Se realizó recuentos de BMA cuyas reducciones fueron de 2.64 Log UFC/g, coliformes totales cuyas reducciones fueron cerca de 1.05 Log UFC/g y *E. coli* cuyo rango fue de 0.7 a 0.9 Log UFC/g. El tratamiento con aplicación de vapor y solución de antioxidantes (AC 1% y AA 0.5%) a 25 °C mantiene cargas de *E. coli* en niveles aceptables a los 14 días. En futuros estudios se recomienda evaluar el efecto de diferentes sanitizantes y programas de lavado y determinar procesos para determinar vida útil.

Palabras clave: *E. coli*, fuerza de corte, pH.

Abstract. Consumers increasingly demand quality, safety and functionality in food demands that industry must meet. The aim of this study was to validate the product development process based minimally processed lettuce special, made by Zamorano Postharvest Plant. Experimental design was completely randomized evaluating the application or not vapor concentration of antioxidants (citric acid 1% + 0.5% ascorbic acid or both 2%) and temperature of the solution (4 and 25 ° C). In the first phase pH were analyzed where it was observed that high doses of antioxidants leads to deterioration, texture (N and mJ) where no significant differences were observed and color ($L^*a^*b^*c^*h$) where the two treatments with antioxidants (AC1% and AA=0.05%) to 25°C, with and without application of vapor and the control (water) obtained a green and intense. In the second phase again analyzed color, where no significant differences was observed between treatments and similar behavior to the previous stage. BMA counts with reductions of 2.64 log CFU / g, whose total coliform reductions were about 1.05 Log CFU / g *E. coli* was performed which ranged from 0.7 to 0.9 log CFU / g. The steaming treatment and antioxidant solution (AC 1% AA 0.5%) maintained at 25 ° C of *E. coli* loads at acceptable levels after 14 days.

Keywords: *E. coli*, pH, shear force.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4 CONCLUSIONES.....	16
5 RECOMENDACIONES.....	17
6 LITERATURA CITADA.....	18
7 ANEXOS.....	21

INDICE DE CUADROS FIGURAS Y ANEXOS

Cuadro	Página
1. Tratamientos evaluados la primera fase.....	4
2. Tratamientos evaluados la segunda fase.....	4
3. Análisis de valor L (Luminosidad).....	7
4. Análisis de valor ángulo de matiz.....	8
5. Análisis de valor croma (saturación o intensidad).....	9
6. Análisis de pH.....	10
7. Análisis de fuerza de corte.....	11
8. Análisis de trabajo de corte.....	12
9. Conteo de bacterias mesófilas aerobias.....	13
10. Conteo de coliformes totales.....	14
11. Conteo de <i>E. coli</i>	15

Anexo	Página
1. Análisis de valor a (verde-rojo).....	21
2. Análisis de valor b(azul-amarillo).....	21
3. Análisis de valor L (Luminosidad), segunda fase.....	22
4. Análisis de valor a (verde-rojo), segunda fase.....	22
5. Análisis de valor b (azul-amarillo), segunda fase.....	22
6. Análisis de valor de ángulo de matiz, segunda fase.....	23
7. Análisis de valor croma, segunda fase.....	23

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento de las poblaciones urbanas, un cambio de mentalidad acerca de la inocuidad y calidad de los alimentos por parte de los consumidores, aumento de ingresos y poder adquisitivo en las ciudades ha permitido dejar una dieta rica en carbohidratos y llena de alimentos procesados por alimentos de mayor valor, frescos o mínimamente procesados (frutas y hortalizas principalmente). Estos productos son superiores desde un punto de vista nutricional. Estas tendencias obligan a realizar mejoras en las cadenas de suministro de productos frescos, para poder ofrecer una mayor calidad e inocuidad a los consumidores y obtener mejores beneficios los productores (FAO 2009). Los productos mínimamente procesados son aquellos a los que se les ha agregado un pequeño tratamiento a los de los productos frescos. Contienen células muertas, dañadas y vivas por lo cual siguen respirando y deben refrigerarse. La ventaja de ellos es que generalmente se encuentran listos para consumir (Etaio y Rodríguez 2008). Las hortalizas frescas continúan respirando a fin de mantener su ciclo de vida, absorben oxígeno y liberan dióxido de carbono como los humanos (Viñas 2013). Una vez sean cosechadas, las fuentes de energía para dichos procesos se detienen, no serán reemplazadas y la energía disminuirá cada vez más rápido afectando la duración de la vida de post cosecha del producto (Barreiro y Sandoval 2006).

La lechuga (*Lactuca sativa L.*) es una hortaliza anual proveniente de Asia, de clima fresco (15 – 18 °C; máx. 21 a 24 °C y mín. de 7 °C). Es una planta anual. Su crecimiento se ve acelerado por las altas temperaturas pero su calidad decrece por la acumulación de látex amargo en su sistema vascular, por lo cual es importante refrigerarla lo más rápido posible luego de ser recolectada (Vallejo y Estrada 2004). Posee un pH aproximado de 6.00 (Andino y Castillo 2010). Algunos aspectos de calidad para la lechuga, después de eliminar las hojas exteriores son un color verde brillante (depende de la variedad), hojas crujientes, turgentes, limpias, tiernas, enteras y sin daños mecánicos, ausencia de insectos, babosas o caracolillos y sus excrementos y ausencia de coloraciones oscuras (Cerdas y Montero 2004).

Los ácidos orgánicos actúan como conservantes mediante la modificación del pH del medio, evitando el desarrollo de los microorganismos y modificando a su vez características organolépticas en el alimento. Es necesario adicionarlos en concentraciones mayores al 1% y que no presenten toxicidad en las condiciones de empleo. (Camean y Repetto 2012). Además, estos ácidos actúan como agentes quelantes de ciertos iones metálicos que promueven reacciones de oscurecimiento (Barreiro y Sandoval 2006).

La planta de Poscosecha Zamorano actualmente comercializa un producto mínimamente procesado de hojas de dos variedades de lechuga en bolsa, que tiene vida útil de una semana, lograda mediante aplicación de vapor y ácidos orgánicos. La elaboración de este estudio nace de la necesidad de validar el proceso actual del producto y evaluar diferentes concentraciones de antioxidantes y la necesidad de la aplicación de vapor. Dicho estudio está limitado a la cantidad de pruebas físico químicas, microbiológicas y sensoriales que se puedan realizar con el presupuesto asignado; además de la variabilidad que presenta el hecho de trabajar con hojas de lechuga dado que al extraer muestras para análisis de textura o color al azar, muestran mucha variabilidad dependiendo que tan cerca o lejos de la radícula se extraigan.

Anterior a este estudio, en Zamorano se realizó un estudio utilizando ácido acético, ácido cítrico e hipoclorito de calcio para evaluar su efecto en factores microbiológicos y físicos en lechuga. Se utilizaron dos concentraciones de cloro (50 y 100 mg/L) y ácidos orgánicos (1000 mg/L) de forma individual y en combinación. Los tratamientos con mayor reducción fueron Hipoclorito de calcio más ácido acético, hipoclorito de calcio más ácido cítrico y ácido acético de forma individual (1.32 ± 0.47 y 2.19 ± 0.49 Log UFC/cm²). Se analizó la capacidad inhibitoria del tratamiento de hipoclorito de calcio más ácido acético en los días cero, tres y cinco a 4 y 12 °C. Además, color y tensión en los mismos días a 12 °C. Se recomendó el uso del ácido acético para el lavado de lechuga en la planta Post-cosecha (Mendoza y Cantor 2012)

En estudios exteriores el ácido cítrico (1%) con ácido ascórbico (1%) tuvo un efecto antipardeante en tres variedades de lechuga por 7 días y 4 variedades de lechuga soportaron bien un mínimo proceso durante 7 días al utilizar ácido cítrico como antipardeante (Toledo 2009). Finalmente a mayor concentración de ácidos y tiempo de exposición se observó mayor efecto de los ácidos orgánicos y mayores diferencias entre sus efectos para reducir poblaciones de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* y *Listeria monocytogenes* en manzana y lechuga (Park *et al.* 2011).

Los objetivos de este estudio son:

- Validar el proceso poscosecha actual respecto a parámetros físico-químicos y microbiológicos.
- Determinar el tratamiento que más alargue la vida útil de la lechuga, otorgue el menor número de cambios en las características sensoriales y mejore la calidad microbiológica del producto.
- Comprobar si existe diferencia en el efecto de la temperatura de solución de antioxidantes.
- Establecer si existe la necesidad de la aplicación de vapor en el proceso de elaboración del producto.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El estudio se realizó en las instalaciones de la Planta de Procesamiento Hortofrutícola de Zamorano. Los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano. Los estudios de cambios físicos del producto se realizaron en el laboratorio de la Planta Hortofrutícola y en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano.

Proceso de elaboración actual. El proceso de elaboración del producto se inició lavando la lechuga (variedades Kristine y Versai) dos veces por inmersión, una en agua y la segunda en una solución sanitizante (ingrediente activo ácido per acético a 60 ppm o 0.006% aproximadamente). Después se procedió a un deshoje, clasificación y selección de hojas. Teniendo las hojas seleccionadas, se procedió a la exposición de las hojas en un colador, una cantidad no excesiva, al vapor de la marmita durante un tiempo de 15 segundos. Se procedió luego a la inmersión en la solución con antioxidantes (Ácido cítrico 1% ácido ascórbico 0.5 % y cloruro de calcio 0.2%) por 30 segundos a 4 °C para luego pasar a la escurridora por 4 minutos (2 min, se extrajo la sesta y se agitó para eliminar el agua retenida y separar la lechuga de los orificios de ésta y se colocó 2 min, nuevamente).

Se procedió al empacado en bolsas tipo Ziploc (tamaño 12x15, grosor 0.508 mm- hechas de LLDEP o LDPE) y pesado, realizando una selección de hojas buenas y verificando la proporción 50:50 entre las dos variedades de lechuga. Finalmente las bolsas se almacenaron en el cuarto frío (0 – 5 °C). No existe durante el proceso un POES en el lavado de lechuga, realizando los estudiantes este proceso según su ritmo de trabajo.

Preparación de los tratamientos. La aplicación de los tratamientos se realizó dentro del flujo de proceso normal de la planta, exceptuando la aplicación de antioxidantes al 2% que se realizó, únicamente este pasó, fuera del flujo de proceso. Se pesaron en una balanza electrónica la cantidad de antioxidantes, ácido cítrico y ascórbico, según la proporción establecida en los tratamientos (ácido cítrico 1 o 2% y ácido ascórbico 0.5 o 2%). Los antioxidantes se almacenaron en bolsas plásticas por separado y se mezclaron hasta que se agregaron el agua y hielo (dependiendo el tratamiento) para formar la solución. El cloruro de calcio fue agregado en un 0.2% de la solución de forma estándar en todas las soluciones de antioxidantes.

El proyecto consistió en dos fases. En la primera se evaluaron 8 tratamientos (Cuadro 1) a los cuales se les realizó medición de pH, peso y color en las instalaciones de la Planta Hortofrutícola de Zamorano y textura (Fuerza y trabajo de corte) en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano. Las mediciones se realizaron el día 0, 7 y 14.

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en la primera fase

Vapor (115°C) por 30s	Ácido Cítrico (%)	Ácido Ascórbico (%)	Temperatura de Solución (°C)
Si	2	2	25
Si	2	2	4
Si	1	0.5	25
Si	1	0.5	4
No	1	0.5	25
No	1	0.5	4
Si	0	0	-
No	0	0	-

En la segunda fase se evaluaron los dos mejores dos tratamientos de la primera fase y el lavado con agua (Cuadro 2), realizando medición de color en la planta hortofrutícola y análisis microbiológicos en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano. Se evaluó presencia de bacterias mesófilas aerobias (día 0 antes y después de los tratamientos, día 7 y día 14), coliformes totales y *E. coli* (día 0 antes y después de los tratamientos y día 14).

Cuadro 2. Tratamientos evaluados en la segunda fase.

Vapor (115°C) por 30s	Ácido Cítrico (%)	Ácido Ascórbico (%)	Temperatura de Solución (°C)
Si	1	0.5	25
No	1	0.5	25
No	0	0	-

Primera fase. Se realizó a la lechuga medición de pH, peso y color en las instalaciones de la Planta Hortofrutícola de Zamorano y textura (Fuerza y Trabajo de Corte) en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano. Las mediciones se realizaron el día 0, 7 y 14.

Análisis de color. Se realizó la medición de color por medio de fotografías (Un punto a azar de una foto, una por hoja, cinco hojas por tratamiento, por tres repeticiones) tomadas el día de la medición e insertadas en la aplicación “mColorMeter”, la cual muestra los colores en escala RGB y Munsell. Se utilizaron cálculos en una plantilla desarrollada en la universidad para realizar las conversiones entre escalas y obtener los valores del Ángulo de Matiz y Pureza y los valores L*a*b. Se realizaron tres repeticiones con medidas repetidas en el tiempo a los 0, 7 y 14 días.

Análisis de pH. Se realizó con el potenciómetro del Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (BOTECO, PT-70), siguiendo el procedimiento que establece el método de la AOAC 981.12 para la determinación de pH de alimentos acidificados. Las mediciones se realizaron el día 0, 7 y 14.

Análisis de Textura. Se realizó la medición de fuerza (N) y trabajo de corte (mJ) con el Medidor de Textura Bookfield CT3 con acople TA-BT-KI. Los cortes se realizaron con el acople TA7 siguiendo el procedimiento realizado por Vega (2013) quien utilizó porciones de las partes externas de la hoja con dimensiones de 3 cm de largo × 1 cm de ancho y una velocidad de análisis de 2 mm/s. Se analizaron tres muestras por tratamiento, por repetición, por cada medida repetida en el tiempo (0, 7 y 14 días).

Análisis de peso. Se realizó mediante mediciones de pesos (g) los días 0, 7 y 14. Se utilizó la balanza electrónica (Mettler Toledo, tipo BPA224-3NP) de la Planta de Procesamiento Hortofrutícola. Antes de realizar las mediciones se secó con papel toalla las bolsas para eliminar la humedad adherida a la bolsa.

Segunda fase. La segunda fase consistió en realizar análisis microbiológicos a los mejores tres tratamientos de la primera fase, los cuales fueron seleccionados según los parámetros de color debido a que los demás análisis no mostraron diferencias entre ellos. Además se realizó análisis de color.

Análisis microbiológicos. Los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano de acuerdo a los métodos establecidos en el “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” (Vanderzant y Splittstoesser 1992).

Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA). El proceso se realizó de acuerdo al capítulo 4 del “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” (Swanson *et al.* 1992). El fin fue evaluar la carga (UFC/g) de BMA inicial (lechuga de campo), su variación antes y después de la aplicación de los tratamientos y a través del tiempo (Día 7 y 14). *E. coli* y coliformes totales. El fin del análisis fue evaluar la carga (UFC/g) microbiológica inicial y final de la muestra. Se realizaron mediciones los días 0 antes y después del tratamiento, y el día 14. El procedimiento se realizó de acuerdo al capítulo 24 del libro “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” (Hitchins *et al.* 1992).

Análisis de color. En la segunda fase se desarrolló el mismo procedimiento realizado en la primera fase, con la diferencia que no se obtuvo un punto por foto, sino 5 puntos por foto, teniendo así mayor representatividad en el color de cada muestra.

Diseño experimental. El diseño experimental fue un DCA. Siendo los factores la temperatura del agua de la solución, la aplicación de vapor o no, la aplicación o no de antioxidantes y diferentes combinaciones de antioxidantes Se realizó medidas repetidas en el tiempo entre el día 0 y 14, dependiendo del tipo de análisis y se realizaron tres repeticiones del experimento. Se obtuvieron 24 UE. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4), en el cual se realizó un análisis de varianza con separación de medias (LSMeans) con un nivel de significancia estadística del 95% para establecer diferencias estadísticas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera fase. Los resultados de la primera fase sirvieron para seleccionar los mejores tratamientos para analizarlos en la segunda fase.

Análisis de Color. Los tratamientos con temperaturas de solución de antioxidantes a 4 °C fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) con respecto al tratamiento con 2% de antioxidantes a temperatura de 25 °C con aplicación de vapor (Cuadro 3) el cual tuvo el valor del luminosidad más bajo el día 1 y al día 14. Los resultados difieren a los encontrados por Sagong *et al.* (2010) en los cuales no existió diferencia significativa, utilizando tratamientos de 1 y 2% de ácido cítrico por tiempos menores a 20 minutos, después de los cuales sus resultados mostraron cambios, una degradación del color y la apariencia de la lechuga.

Cuadro 3. Análisis de valor L (Luminosidad)

Vap ¹	AC ² (%)	AA ³ (%)	T ⁴ (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
				0	7	14
S ⁵	2	2	25	47.9 [£] ± 8.55 ^β b(x)	50.2 ± 10.31 ^{b(x)}	46.9 ± 10.6 ^{b(x)}
S	2	2	4	54.9 ± 6.50 ^{a(x)}	57.7 ± 8.46 ^{ab(x)}	55.3 ± 9.23 ^{a(x)}
S	1	0.5	25	53.1 ± 10.5 ^{ab(x)}	55.1 ± 6.90 ^{ab(x)}	56.6 ± 8.40 ^{a(x)}
S	1	0.5	4	54.8 ± 7.66 ^{a(x)}	51.6 ± 9.54 ^{b(x)}	56.0 ± 10.7 ^{a(x)}
N ⁶	1	0.5	25	53.3 ± 6.38 ^{ab(x)}	58.1 ± 9.69 ^{a(x)}	54.6 ± 5.80 ^{a(x)}
N	1	0.5	4	57.5 ± 5.93 ^{a(x)}	58.3 ± 8.49 ^{a(x)}	52.3 ± 11.2 ^{ab(x)}
S	0	0	-	52.5 ± 6.89 ^{ab(x)}	54.8 ± 7.84 ^{ab(x)}	54.5 ± 10.1 ^{a(x)}
N	0	0	-	53.6 ± 7.79 ^{ab(x)}	54.7 ± 10.2 ^{ab(x)}	52.2 ± 8.90 ^{ab(x)}
C.V. [∞] (%)				14.2	16.3	17.6

¹Exposición al vapor (115°C) por 30s. ²Ácido cítrico ³Ácido ascórbico ⁴Temperatura de la solución de antioxidantes. ⁵Aplicación de vapor. ⁶Sin aplicación de vapor. [£]Promedio. ^βDesviación estándar. [∞]Coefficiente de variación. ^{abc}Datos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). ^{xyz}Datos con letra diferente en la misma fila son estadísticamente diferentes a través del tiempo ($P < 0.05$).

La diferencia puede deberse a la exposición a altas temperaturas (aplicación de vapor y temperatura de solución a 25 °C) y concentración alta de ácidos (2%) en este tratamiento, esto debido a que la clorofila al calentarse puede pasar de brindar un color verde brillante a un color verde olivo o verde oscuro o a tonalidades pardas. Este cambio depende de la acidez de la solución, debido a que la clorofila es afectada por factores como pH, temperatura, luz y oxígeno (Barreiro y Sandoval 2006).

Si la solución es ligeramente ácida, pierde el átomo magnesio por lo que presenta un color verde pardo; mientras que si la solución es ácida se hidrolizan el fitol (C₂₀H₃₉OH) dando como resultado un color pardo (Schwartz 2008).

De acuerdo al parámetro matiz (Cuadro 4) no se observaron diferencias significativas el día 0. En el día 14 se observaron diferencias significativas (P<0.05), obteniendo los mejores resultados los tratamientos con concentraciones de antioxidantes (AC = 1% y AA = 0.5%) a ambas temperaturas de solución (4 y 25 °C) y aplicación de vapor junto al tratamiento de inmersión en antioxidantes a una temperatura de solución de 25 °C y el control (únicamente lavado con agua), siendo más estables a través del tiempo el tratamiento a concentraciones normales de antioxidantes a temperatura de solución de 4 °C y aplicación de vapor y el control. Se observaron diferencias a través del tiempo en todos los tratamientos (P<0.05).

Cuadro 4. Análisis de valor ángulo de matiz

Vap ¹	AC ² (%)	AA ³ (%)	T ⁴ (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
				0	7	14
S ⁵	2	2	25	113 [£] ± 4.21 ^{β a(x)}	111 ± 4.00 ^{a(x)}	97.8 ± 9.86 ^{b(y)}
S	2	2	4	112 ± 3.05 ^{a(x)}	109 ± 4.20 ^{ab(x)}	97.3 ± 9.26 ^{b(y)}
S	1	0.5	25	113 ± 4.43 ^{a(x)}	108 ± 2.78 ^{ab(y)}	104 ± 11.9 ^{a(y)}
S	1	0.5	4	111 ± 2.06 ^{a(x)}	110 ± 5.08 ^{a(x)}	105 ± 6.46 ^{a(y)}
N ⁶	1	0.5	25	109 ± 1.72 ^{a(x)}	105 ± 6.46 ^{b(xy)}	105 ± 5.45 ^{a(y)}
N	1	0.5	4	111 ± 2.75 ^{a(x)}	106 ± 5.97 ^{b(y)}	99.7 ± 8.99 ^{b(z)}
S	0	0	-	111 ± 2.88 ^{a(x)}	107 ± 6.49 ^{ab(y)}	104 ± 6.59 ^{ab(y)}
N	0	0	-	112 ± 3.04 ^{a(x)}	109 ± 4.10 ^{ab(x)}	104 ± 5.26 ^{a(y)}
C.V. [∞] (%)				2.30	4.90	6.90

¹Exposición al vapor (115 °C) por 30s. ²Ácido cítrico ³Ácido ascórbico ⁴Temperatura de la solución de antioxidantes. ⁵Aplicación de vapor. ⁶Sin aplicación de vapor. [£]Promedio. ^βDesviación estándar. [∞]Coficiente de variación. ^{abc}Datos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05). ^{xyz}Datos con letra diferente en la misma fila son estadísticamente diferentes a través del tiempo (P<0.05).

El matiz es lo que coloquialmente se llama color, es la longitud de onda dominante de color (Ball 2012). El ángulo de matiz del color verde es de 120° (De acuerdo a la plantilla utilizada). Al día 14 los mejores tratamientos tuvieron un ángulo 12.5% menor al establecido como color verde y el los peores obtuvieron un ángulo 38.91% menor, dando tonalidades con tendencias más a color amarillo.

Un factor a considerar en el detrimento del valor de matiz es la presencia de etileno en el ambiente en el que se almacena el producto, debido a que el etileno en pequeñas concentraciones puede tener grandes efectos que en el caso de las hortalizas de hoja es negativo ya que degrada la clorofila y las hojas se tornan amarillentas (Hernández *et al.* 2010). El almacenamiento del producto es en los mismos cuartos que muchas otras hortalizas en el cual el factor etileno no es controlado.

Además, como se mencionó antes, la clorofila puede ser degradada por la acidez de la solución en la que se encuentre o también por la enzima clorofilasa. La acción de la clorofilasa puede aumentar por almacenamiento prolongado y por la actividad respiratoria (Barreiro y Sandoval 2006). Este factor tiene importancia en el proceso estudiado ya que se presenta una cantidad considerable de daño mecánico debido a la manipulación y secado en centrífuga, el cual requiere tiempo y velocidad determinada y puede llegar incluso a retener de 0.5 – 1% de agua en la superficie (García y Barnett 2002).

El daño a la estructura de la clorofila por alta acidez en el caso de los tratamientos con 2% de antioxidantes y una baja eficacia de contrarrestar la actividad enzimática de los antioxidantes sin la aplicación de vapor y un posible daño por frío en la estructura de la lechuga, pudieron ser los factores que propicien que los tratamientos con aplicación de vapor e inmersión en antioxidantes al 2% (4 y 25 °C) y el tratamiento en inmersión de antioxidantes (AC=1% Y AA=0.5%) a 4 °C, obtuvieran los valores más bajos al día 14, incluso que el lavado con agua.

El tratamiento con concentraciones de 2% de antioxidantes a temperatura de solución de 4 °C obtuvo el valor más alto de croma (Cuadro 5). Además fue el más estable en sus valores obtenido a través del tiempo, obteniendo una mayor saturación o intensidad en el color según su ángulo de matiz. El croma (saturación o intensidad) que indica la cantidad de blanco o gris o negro que hay mezclada en un matiz puro. Varía desde un matiz puro hasta el blanco puro (Ball 2012).

Cuadro 5. Análisis de valor croma (saturación o intensidad)

Vap ¹	AC ² (%)	AA ³ (%)	T ⁴ (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
				0	7	14
S ⁵	2	2	25	50.2 [£] ± 4.60 ^β ab(xy)	54.3 ± 7.31 ^{ab(x)}	45.1 ± 7.25 ^{ab(y)}
S	2	2	4	54.1 ± 5.87 ^{a(x)}	55.2 ± 7.97 ^{a(x)}	49.8 ± 6.39 ^{a(x)}
S	1	0.5	25	42.7 ± 12.5 ^{b(y)}	52.5 ± 4.74 ^{ab(x)}	40.7 ± 11.8 ^{b(y)}
S	1	0.5	4	51.4 ± 6.29 ^{ab(x)}	46.7 ± 11.09 ^{b(y)}	31.7 ± 9.40 ^{b(z)}
N ⁶	1	0.5	25	51.0 ± 7.21 ^{ab(x)}	48.6 ± 8.04 ^{b(xy)}	44.1 ± 7.66 ^{ab(y)}
N	1	0.5	4	43.4 ± 9.41 ^{b(y)}	52.4 ± 8.47 ^{ab(x)}	39.2 ± 10.4 ^{b(z)}
S	0	0	-	48.0 ± 7.04 ^{b(x)}	48.8 ± 8.37 ^{b(x)}	40.3 ± 8.59 ^{b(y)}
N	0	0	-	42.6 ± 9.65 ^{b(y)}	51.0 ± 8.05 ^{ab(x)}	43.1 ± 10.4 ^{b(y)}
C.V. [∞] (%)				15.7	13.2	19.9

¹Exposición al vapor (115 °C) por 30s. ²Ácido cítrico ³Ácido ascórbico ⁴Temperatura de la solución de antioxidantes. ⁵Aplicación de vapor. ⁶Sin aplicación de vapor. [£]Promedio. ^βDesviación estándar. [∞]Coefficiente de variación. ^{abc}Datos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05). ^{xyz}Datos con letra diferente en la misma fila son estadísticamente diferentes a través del tiempo (P<0.05).

Análisis de pH. La lechuga sin antioxidantes tuvo un pH de 5.80±0.04 al día 0, similar al pH en la literatura el cual es aproximadamente de 6.00 (Andino y Castillo 2010). Se observó una disminución de pH a mayor cantidad de antioxidantes, igualmente hubo diferencia entre los tratamientos con antioxidantes y los que no pasaron por la inmersión

en antioxidantes (Cuadro 6), quedando en evidencia el efecto de los ácidos orgánicos de reducir el pH (Camean y Repetto 2012) y el hecho de que el ácido cítrico sea un regulador de acidez (FAO y WHO 2014) al igual que el ácido ascórbico (FAO y WHO 2014).

Cuadro 6. Análisis de pH.

Vap ¹	AC ² (%)	AA ³ (%)	T ⁴ (°C)	Tiempo de almacenamiento		
				0 días	7 días	14 días
S ⁵	2	2	25	3.83 [±] ± 0.02 ^{β c(y)}	6.29 ± 0.23 ^{a(x)}	6.47 ± 0.17 ^{a(x)}
S	2	2	4	3.77 ± 0.07 ^{c(z)}	6.13 ± 0.18 ^{ab(y)}	6.45 ± 0.20 ^{a(x)}
S	1	0.5	25	4.78 ± 0.28 ^{b(z)}	5.92 ± 0.08 ^{b(y)}	6.31 ± 0.21 ^{a(x)}
S	1	0.5	4	4.77 ± 0.21 ^{b(z)}	5.97 ± 0.12 ^{b(y)}	6.40 ± 0.05 ^{a(x)}
N ⁶	1	0.5	25	4.99 ± 0.09 ^{b(y)}	6.08 ± 0.05 ^{ab(x)}	6.26 ± 0.14 ^{a(x)}
N	1	0.5	4	4.82 ± 0.19 ^{b(z)}	5.99 ± 0.19 ^{b(y)}	6.34 ± 0.26 ^{a(x)}
S	0	0	-	5.74 ± 0.07 ^{a(y)}	6.09 ± 0.11 ^{ab(xy)}	6.26 ± 0.10 ^{a(x)}
N	0	0	-	5.80 ± 0.04 ^{a(y)}	5.93 ± 0.13 ^{b(y)}	6.31 ± 0.11 ^{a(x)}
C.V. [∞] (%)				3.10	2.60	2.73

¹Exposición al vapor (115 °C) por 30s. ²Ácido cítrico ³Ácido ascórbico ⁴Temperatura de la solución de antioxidantes. ⁵Aplicación de vapor. ⁶Sin aplicación de vapor. [±]Promedio. ^βDesviación estándar. [∞]Coefficiente de variación. ^{abc}Datos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05). ^{xyz}Datos con letra diferente en la misma fila son estadísticamente diferentes a través del tiempo (P<0.05).

Los datos concuerdan con los obtenidos por Kenny y O'Beirne (2009) donde en 8 días de almacenamiento a 4 °C observaron un incremento en el pH, sin encontrar diferencia entre tratamientos, el cual fue aludido a la combinación de crecimiento bacteriano y procesos metabólicos, lo que se relaciona con el detrimento de las características físicas de la lechuga.

Los ácidos orgánicos aumentan la acidez al donar electrones ya que disminuyen la intensidad de la carga negativa. Caso contrario cuando otras moléculas donan electrones, se aumenta la carga negativa, se reduce la acidez con lo que se desestabiliza el anión carboxilo (Bailey y Bailey 1998). El ácido ascórbico es un fácil donador de electrones y forma un radical libre inestable llamado ácido dehidroascórbico, que es poco reactivo con otros compuestos que darían otros radicales libres reactivos, pero que puede regenerarse en ácido ascórbico nuevamente (Frías 2004).

El efecto antioxidante dura hasta que la reserva de antioxidantes se agota (Mora 2007) por lo cual era de esperar que el pH aumentara a través del tiempo, con lo que se puede sustentar la diferencia entre tratamientos el día 1 y la igualdad al día 14, asumiéndose que los ácidos pierden su capacidad antioxidante.

Análisis de Textura. El día 0 el tratamiento con antioxidantes en concentraciones normales y a temperatura de solución de 25 °C obtuvo diferencias significativas (P<0.05) con relación a todos los tratamientos a excepción del tratamiento con aplicación de vapor e inmersión en antioxidantes a concentraciones elevadas (2%), necesitando una mayor

fuerza de corte. (Cuadro 7). A los 14 días de almacenamiento no se observó diferencias entre tratamientos, ni a través del tiempo ($P < 0.05$). No se pudo determinar un mejor tratamiento debido a que no existieron diferencias significativas, esto debido a la gran variabilidad del experimento que reside en que las hojas de lechuga son muy diferentes en tamaño, grosor y dependiendo lo cercano o alejado de la nervadura central que este la muestra, tienen una textura diferente inclusive en la misma hoja.

Los resultados observados son similares a los obtenidos por Back *et al* (2014) donde estudiaron la influencia en textura (fuerza de corte) de la aplicación de vapor de peróxido de hidrógeno (0%, 1%, 3%, 5% y 10%) por tiempos de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 minutos y no se encontró diferencia estadística entre tratamientos ni a través del tiempo (7 días de almacenamiento a 4 °C).

Cuadro 7. Análisis de fuerza de corte (N).

Vap ¹	AC ² (%)	AA ³ (%)	T ⁴ (°C)	Tiempo de almacenamiento		
				0 días	7 días	14 días
S ⁵	2	2	25	2.53 [‡] ± 0.72 ^β ab(x)	1.51 ± 0.26 ^{a(y)}	1.54 ± 0.22 ^{a(y)}
S	2	2	4	2.07 ± 0.81 ^{b(x)}	2.02 ± 0.77 ^{a(x)}	2.00 ± 0.26 ^{a(x)}
S	1	0.5	25	3.11 ± 1.55 ^{a(x)}	1.47 ± 0.35 ^{a(x)}	1.55 ± 0.44 ^{a(y)}
S	1	0.5	4	2.05 ± 0.63 ^{b(x)}	1.74 ± 0.36 ^{a(x)}	1.88 ± 0.40 ^{a(x)}
N ⁶	1	0.5	25	2.01 ± 0.91 ^{b(x)}	2.01 ± 0.76 ^{a(y)}	1.68 ± 0.58 ^{a(x)}
N	1	0.5	4	2.01 ± 0.91 ^{b(x)}	1.66 ± 0.48 ^{a(x)}	1.76 ± 0.39 ^{a(x)}
S	0	0	-	1.71 ± 0.50 ^{b(x)}	1.77 ± 0.24 ^{a(x)}	2.00 ± 0.23 ^{a(x)}
N	0	0	-	2.01 ± 0.91 ^{b(x)}	1.97 ± 0.63 ^{a(x)}	1.68 ± 0.58 ^{a(x)}
C.V. [∞] (%)				41.7	29.6	22.6

¹Exposición al vapor (115 °C) por 30s. ²Ácido cítrico ³Ácido ascórbico ⁴Temperatura de la solución de antioxidantes. ⁵Aplicación de vapor. ⁶Sin aplicación de vapor. [‡]Promedio. ^βDesviación estándar. [∞]Coefficiente de variación. ^{abc}Datos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). ^{xyz}Datos con letra diferente en la misma fila son estadísticamente diferentes a través del tiempo ($P < 0.05$).

Respecto al parámetro trabajo de corte (Cuadro 8) para realizar el corte los tratamientos con aplicación de vapor e inmersión en solución de antioxidantes (a ambas concentraciones) a una temperatura de 25 °C obtuvieron diferencias significativas, necesitándose una mayor cantidad de trabajo (fuerza × distancia) para lograr cortar la hoja de lechuga. En estos tratamientos junto con el tratamiento de inmersión en solución de antioxidantes a 25 °C, se observó un descenso en la trabajo necesario para lograr el corte de la hoja de lechuga. Al día 15 no se observó diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

Los resultados difieren a los resultados encontrados al analizar el efecto entre la aplicación de ácidos orgánicos a concentraciones de 1 y 2%, comparados contra el lavado con agua (Sagong *et al.* 2010), teniendo que mencionar el hecho que los tiempos de inmersión fueron mayores (5, 10, 20, 30 y 60 minutos) y la temperatura de solución a 20 °C. La

diferencia puede deberse a la alta variabilidad de las muestras, debido a que fueron muy diferentes, inclusive cuando provenían de la misma hoja.

Cuadro 8. Análisis de trabajo de corte (mJ).

Vap ¹	AC ² (%)	AA ³ (%)	T ⁴ (°C)	Tiempo de almacenamiento		
				0 días	7 días	14 días
S ⁵	2	2	25	10.4 [±] ± 5.12 ^β a(x)	4.27 ± 2.55 ^{ab(y)}	3.18 ± 1.88 ^{b(y)}
S	2	2	4	7.14 ± 4.46 ^{b(x)}	5.59 ± 3.19 ^{ab(x)}	6.13 ± 3.29 ^{a(x)}
S	1	0.5	25	10.5 ± 6.10 ^{a(x)}	5.29 ± 3.00 ^{ab(y)}	4.99 ± 2.13 ^{ab(y)}
S	1	0.5	4	5.57 ± 2.32 ^{b(x)}	3.58 ± 2.03 ^{ab(x)}	4.01 ± 1.34 ^{ab(x)}
N ⁶	1	0.5	25	6.83 ± 2.90 ^{b(x)}	2.90 ± 1.00 ^{b(y)}	3.57 ± 1.42 ^{ab(y)}
N	1	0.5	4	6.83 ± 2.90 ^{b(x)}	3.32 ± 1.29 ^{b(y)}	4.96 ± 1.56 ^{ab(xy)}
S	0	0	-	5.56 ± 1.70 ^{b(x)}	3.10 ± 1.22 ^{b(x)}	5.07 ± 2.54 ^{ab(x)}
N	0	0	-	6.83 ± 2.90 ^{b(x)}	6.01 ± 3.65 ^{a(x)}	4.87 ± 1.93 ^{ab(x)}
C.V. [∞] (%)				50.6	56.3	43.0

¹Exposición al vapor (115 °C) por 30s. ²Ácido cítrico ³Ácido ascórbico ⁴Temperatura de la solución de antioxidantes. ⁵Aplicación de vapor. ⁶Sin aplicación de vapor. [±]Promedio. ^βDesviación estándar. [∞]Coefficiente de variación. ^{abc}Datos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05). ^{xyz}Datos con letra diferente en la misma fila son estadísticamente diferentes a través del tiempo (P<0.05).

Análisis de peso. No se observaron diferencias en peso durante el experimento. Tampoco se observó pérdida de agua, ni agua retenida en las bolsas en ningún tratamiento, en ninguna de las repeticiones.

Segunda Fase. Los resultados de la primera fase no mostraron diferencia para los parámetros de textura ni pH a un periodo de 7 días, contrario a los resultados de ángulo de matiz y croma. El valor de ángulo de matiz de la lechuga fresca fue en un rango de 109 – 113, por tanto los valores más similares al día 14 fueron los tratamientos con aplicación de vapor, inmersión en antioxidantes (a ambas temperaturas, 4 y 25 °C) y el tratamiento con inmersión en solución de antioxidantes a 25 °C. De estos tratamientos el tratamiento con aplicación de vapor e inmersión en antioxidantes a 4 °C obtuvo un valor de croma o intensidad bajo, indicando un color verde pálido o con tendencia a un color amarillento, por tanto se eliminó de la selección y solo los otros tres tratamientos fueron analizados en la segunda fase.

Análisis de color. En el análisis de color de la segunda fase, no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos (P<0.05) para los valores de luminosidad, ángulo de matiz y croma.

Análisis microbiológicos. Los análisis de la lechuga fresca o sin tratar indicaron una carga de 7.14±1.25 Log UFC/g para BMA, después de los tratamientos se observó una reducción en promedio de 2.64 Log UFC/g observándose así una carga en el rango de 4.33 a 4.75 Log UFC/g (Cuadro 10). Para coliformes totales la carga inicial fue de 3.91±0.55 Log UFC/g, después de la aplicación de los tratamientos se observó una reducción de 1.05 Log

UFC/g, restando una carga entre 2.37 y 3.13 Log UFC/g (Cuadro 11). La carga inicial de *E. coli* fue de 1.51±0.75 Log UFC/g y después de los tratamientos de 0.7 a 0.9 Log UFC/g (Cuadro 12). Se observó diferencia estadística entre la carga inicial de la lechuga después de aplicar los tratamientos, sin embargo no se observó diferencia significativa (P<0.05) entre tratamientos.

Los resultados obtenidos en el conteo de BMA indicaron que no existió diferencia significativa entre tratamientos evaluados el mismo día (P<0.05) para BMA, asimismo todos los tratamientos obtuvieron un incremento en la cantidad de BMA a través del tiempo (Cuadro 9).

Cuadro 9. Conteo de bacterias mesófilas aerobias (Log UFC/g).

Vap ¹	AC ² (%)	AA ³ (%)	T ⁴ (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
				0	7	14
S ⁵	1	0.5	25	4.42 ^z ± 0.36 ^β a(x)	5.21 ± 0.39 a(x)	6.51 ± 0.13 a(y)
N ⁶	1	0.5	25	4.75 ± 0.90 ^{a(x)}	5.83 ± 1.11 ^{a(x)}	8.04 ± 1.41 ^{a(y)}
N	0	0	-	4.33 ± 0.06 ^{a(x)}	5.37 ± 0.08 ^{a(x)}	7.64 ± 0.24 ^{a(y)}
C.V. [∞] (%)				12.5	12.4	11.2

¹Exposición al vapor (115 °C) por 30s. ²Ácido cítrico ³Ácido ascórbico ⁴Temperatura de la solución de antioxidantes. ⁵Aplicación de vapor. ⁶Sin aplicación de vapor. ^zPromedio. ^βDesviación estándar. [∞]Coefficiente de variación. ^{abc}Datos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05). ^{xyz}Datos con letra diferente en la misma fila son estadísticamente diferentes a través del tiempo (P<0.05).

El Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 (MINECO *et al.* 2009) no posee niveles máximos permisibles con relación a las bacterias mesófilas aerobias con relación a hortalizas frescas o procesadas. En el Reglamento Sanitario de los Alimentos (Gobierno de Chile 2013) establece un límite para BMA para ser aceptado es 5x10⁴ UFC/g, siendo el logaritmo de 4.70 Log UFC/g, por lo cual solo el tratamiento con aplicación de vapor e inmersión en antioxidantes cumpliría con este límite, bajo o igual al cual los alimentos no representan un riesgo a la salud, el día 0. Ningún tratamiento cumple el límite al día 7 y 14.

La “Norma Sanitaria que Establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano” de Perú (Ministerio de Salud 2003) es más tolerante y establece que el límite máximo para frutas y hortalizas frescas semiprocesadas (lavadas, desinfectadas, peladas, cortadas y/o precocidas) refrigeradas y/o congeladas es de 10⁶ UFC/g, siendo el valor en Log UFC/g de 6. Tomando este valor como límite máximo, los valores obtenidos por todos los tratamientos estarían debajo del límite hasta el día 7 y arriba de este el día 14.

Díaz y Hotchkiss (1995), encontraron que la lechuga al poseer una carga de 8.1 Log UFC/g coincidía con el rechazo visual del producto, con un pardeamiento calificado como extremo (>51%). Teniendo en cuenta este parámetro el tratamiento con vapor y el control coinciden no superan los 8.00 Log UFC/g y serían aceptables.

Para el día 0 se realizó un análisis en relación a las reducciones que logró cada tratamiento, con respecto al valor de la lechuga al llegar a la planta (LF) el cual fue 7.14 ± 1.25 Log UFC/g. Se observó que entre las reducciones obtenidas por los tratamientos no existió diferencia significativa ($P < 0.05$). El tratamiento con aplicación de vapor e inmersión en antioxidantes alcanza una reducción de 2.72 ± 1.52 Log UFC/g, el tratamiento de inmersión en antioxidantes 2.40 ± 2.09 Log UFC/g y el control (Agua) 2.81 ± 1.31 Log UFC/g.

No se observó diferencia significativa ($P < 0.05$) en los resultados obtenidos el mismo día con respecto a la medición de coliformes totales (Cuadro 10). Además todos los tratamientos tuvieron un incremento al día 14.

Cuadro 10. Conteo de coliformes totales (Log UFC/g).

Vap ¹	AC ² (%)	AA ³ (%)	T ⁴ (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)	
				0	14
S ⁵	1	0.5	25	$2.37^{\text{E}} \pm 0.84^{\text{B a(x)}}$	$5.53 \pm 0.61^{\text{a(y)}}$
N ⁶	1	0.5	25	$3.13 \pm 0.94^{\text{a(x)}}$	$5.46 \pm 0.80^{\text{a(y)}}$
N	0	0	-	$3.04 \pm 0.43^{\text{a(x)}}$	$5.70 \pm 1.23^{\text{a(y)}}$
C.V. [∞] (%)				13.2	28.2

¹Exposición al vapor (115 °C) por 30s. ²Ácido cítrico ³Ácido ascórbico ⁴Temperatura de la solución de antioxidantes. ⁵Aplicación de vapor. ⁶Sin aplicación de vapor. ^EPromedio. ^BDesviación estándar. [∞]Coefficiente de variación. ^{abc}Datos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). ^{xyz}Datos con letra diferente en la misma fila son estadísticamente diferentes a través del tiempo ($P < 0.05$).

Roura y colaboradores (2013) en un estudio con lechuga romana concluyó que el cloro tiene la capacidad de reducir la carga inicial de bacterias mesófilas aerobias, incluso evaluando un tratamiento con cloro y antioxidantes. Asimismo no obtuvo diferencias a través del tiempo. Estos datos difieren con los obtenidos ya que no se observaron diferencias significativas. Este resultado puede ser contrario, por el hecho que el control utilizado es un lavado con agua y en una solución de agua con cloro, lo que indicaría que los antioxidantes no poseen un efecto reductor en las poblaciones de BMA.

Ramírez-Sucre y colaboradores (2009) estudiaron la eficacia de diversos desinfectantes en la sanitización de hortalizas frescas, melón y espinaca, utilizando entre sus tratamientos el ácido cítrico al 4%, obteniendo una reducción de 1 Log UFC/g para BMA. Estos resultados concuerdan a los obtenidos en el sentido que existió una reducción, pero el tiempo de aplicación fue mayor (4 veces más), lo que se puede atribuir al efecto del vapor o alguna sinergia con el ácido ascórbico.

Se realizó un análisis por reducciones obtenidas el día 0, cuyos resultados tampoco mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$). La reducción lograda por el tratamiento con aplicación de vapor e inmersión en antioxidantes fue de 1.54 ± 0.83 Log UFC/g, del tratamiento de inmersión en antioxidantes fue de 0.77 ± 1.22 Log UFC/g y el control de 0.86 ± 0.83 Log UFC/g

La “Norma Sanitaria que Establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano” de Perú (Ministerio de Salud 2003) establece un límite máximo para Coliformes Totales de 10^3 UFC/g para comidas preparadas sin tratamiento térmico, siendo el valor el Log UFC/g de 3. Únicamente el tratamiento de inmersión en antioxidantes con aplicación de vapor está bajo el límite al día 0 y ningún tratamiento al día 14.

En los recuentos de *E. coli* la carga inicial de *E. coli* al inicio del proceso fue de 1.51 ± 0.75 Log UFC/g. No se observó diferencia significativa ($P < 0.05$) en los valores obtenidos por los tratamientos (Cuadro 11). Además no se observó aumento en la población de *E. coli* en el tratamiento con aplicación de vapor e inmersión en solución de antioxidantes, contrario a los otros dos.

Los resultados difieren de los encontrados por Akbas y Ölmez (2007), en los cuales se utilizó ácido cítrico al 0.5% por dos minutos, tiempo al cual se le puede acreditar las diferencias en comparación a los 30 segundos, aunque también concluyen en que un aumento a 5 minutos no demuestra diferencias significativas.

Cuadro 11. Conteo de *E. coli* (Log UFC/g).

Vap ¹	AC ² (%)	AA ³ (%)	T ⁴ (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)	
				0	14
S ⁵	1	0.5	25	$0.70^{\text{f}} \pm 0.00^{\text{b a(x)}}$	$0.80 \pm 0.17^{\text{b(x)}}$
N ⁶	1	0.5	25	$0.90 \pm 0.17^{\text{a(x)}}$	$2.97 \pm 1.88^{\text{a(y)}}$
N	0	0	-	$0.70 \pm 0.00^{\text{a(x)}}$	$2.71 \pm 1.70^{\text{a(y)}}$
C.V. [∞] (%)				13.2	67.9

¹Exposición al vapor (115 °C) por 30s. ²Ácido cítrico ³Ácido ascórbico ⁴Temperatura de la solución de antioxidantes. ⁵Aplicación de vapor. ⁶Sin aplicación de vapor. ^fPromedio. ^bDesviación estándar. [∞]Coficiente de variación. ^{abc}Datos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). ^{xyz}Datos con letra diferente en la misma fila son estadísticamente diferentes a través del tiempo ($P < 0.05$).

El Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 (MINECO *et al.* 2009) establece para frutas y hortalizas frescas un límite de 10 UFC/g que es igual a 1 Log UFC/g, por tanto los tres tratamientos están abajo del límite al día 0 y únicamente el tratamiento con aplicación de vapor e inmersión en antioxidantes está bajo el límite al día 14, siendo el único que no tiene un incremento significativo a través del tiempo.

4. CONCLUSIONES

- El proceso de elaboración actual del producto mínimamente procesado a base de dos variedades de lechuga en bolsa, cumple con El Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 que establece un límite máximo de aceptación de 1 Log UFC/g.
- No existió un tratamiento que mantuviese ambos parámetros, físico-químicos y microbiológicos, hasta un periodo de 14 días.
- No existió una diferencia significativa en el efecto del incremento de las concentraciones de antioxidantes de 1% de ácido cítrico y 0.5% de ácido ascórbico a 2% de ácido cítrico y 2% de ácido ascórbico en parámetros físico-químicos.
- Es necesaria la aplicación de vapor debido a que ayuda a controlar la carga de *E. coli* hasta los 14 días.
- En un tiempo de 14 días el tratamiento con aplicación de vapor e inmersión en antioxidantes (Ácido cítrico 1% y ácido ascórbico 0.5%) a una temperatura de solución de 25 °C, mantuvo el producto por debajo del límite permisible de *E. coli* según el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar la manipulación de la materia prima a través del flujo de proceso para identificar posibles focos de contaminación.
- Establecer áreas concretas de las hojas para futuros estudios en textura y así evitar la variabilidad que existió en el presente estudio.
- En futuros estudios evaluar el efecto de diferentes sanitizantes y tipos de lavado (cambios de solución de lavado y tiempos de exposición), en la carga microbiológica a través del tiempo.
- Realizar un POES para el lavado de la lechuga, estableciendo recambios de solución de lavado.
- Generar un protocolo para determinar vida útil evaluando factores de porcentaje de pardeamiento, y aceptación por parte del consumidor, entre los días 7 y 14. Asimismo realizar más estudios entre estos días.

6. LITERATURA CITADA

Akbas, M.Y. y H. Ölmez. 2013. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. *Letters in Applied Microbiology* (44)6:619-624.

Andino, F. y Y. Castillo. 2010. Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria (en línea) Consultado el 14 de septiembre de 2014. <http://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/documento-microbiologia.pdf>.

Bailey, P.S. y C.A. Bailey 1998. *Química Orgánica: Conceptos y Aplicaciones*. Pearson Educación. p. 380-381.

Ball, P. 2012. *La invención del color*. Trad. José Adrián Vitier. Madrid, España. Turner Publicaciones S.L. 460 p.

Barreiro, J.A. y A.J. Sandoval. 2006. Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. Caracas, Venezuela. Equinoccio Universidad Simón Bolívar. p 21, 44-45, 110.

Back, K.H., J.W. Ha y D.H. Kang. 2014. Effect of hydrogen peroxide vapor treatment for inactivating *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *Food Control* 44:78-85.

Camean, A.M. y M. Repetto. 2012. *Toxicología Alimentaria*. Madrid, España. Ediciones Díaz De Santos, P. 472.

Cerdas, M.M. y Montero, M.E. 2004. *Guías Técnicas Del Manejo Poscosecha de Apio y Lechuga para El Mercado Fresco (En línea)*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, CR. Consultado el 05 de Junio de 2014. Disponible en: http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/manual_apio_lechuga_III.pdf

Diaz, C. y J.H. Hotchkiss. 1995 Comparative Growth of *Escherichia coli* 0157:H7, Spoilage Organisms and Shelf-Life of Shredded Iceberg Lettuce Stored under Modified Atmospheres. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70(4):433-438.

Etaio, I. y V.M. Rodríguez. 2008. Frutas, verduras y hortalizas *In*. V.M. Rodriguez (ed.). 2008. *Bases de la alimentación humana*. España. Netbio. p 19-30.

FAO. 2009. Alimentos para las ciudades: Alimentos frescos (En línea). Consultado el 8 de Junio de 2014. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/ak003s/ak003s08.pdf>

FAO y WHO. 2014a. Información Sobre El Aditivo Alimentario: Ácido Ascórbico, L-(300) (En línea). Consultado el 17 de Septiembre de 2014. Disponible en: <http://www.codexalimentarius.net/gsfonline/additives/details.html?id=241>

FAO y WHO. 2014b. Información Sobre El Aditivo Alimentario: Ácido Cítrico (330) (En línea). Consultado el 17 de Septiembre de 2014. Disponible en: <http://www.codexalimentarius.net/gsfonline/additives/details.html?id=173>

Frías, J.M. 2004. Antioxidantes en Productos Agroalimentarios. *In: Secretaria General Técnica. La transformación industrial de la producción agropecuaria. España. Ministerio de Educación. p. 117-140.*

García, E. y D.M. Barrett. 2002. Preservative Treatments for Fresh-cut Fruits and Vegetables. *In: Lamikanra, O. (ed). Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Science, Technology, and Market. Estados Unidos. CR Press. p. 267 – 294.*

Gobierno de Chile. 2013. Reglamento Sanitario de los Alimentos (en línea). Consultado el 16 de octubre de 2014. Disponible en: http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2013/02/RSA%20DECRETO_977_96_a%20actualizado%202013.pdf

Hernández, M.S., J. Barrera y L.M. Melnagrejo. 2010. IX Fisiología Poscosecha. *In: Melgarejo, L.M. (ed.). Experimentos en Fisiología Vegetal. Colombia. Universidad Nacional de Colombia. p. 187-166*

Hitchins, A.D., P.A. Hartman y E.C.D. Todd. 1992. Coliforms – Escherichia coli and its Toxins. *In: Vanderzant, C. y D.F. Splittstoesser (eds). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3 ed. Washington DC, EEUU. American Public Health Association (APHA). p. 325-345*

Kenny, O. y D. O´Beirne. 2009. The effects of washing treatment on antioxidant retention in ready-to-use iceberg lettuce. *International Journal of Food Science and Technology* 44(6):1146-1156

Mendoza, M. y F.R. Cantor. 2012. Efecto del uso de ácido acético, cítrico e hipoclorito de calcio para control de Escherichia coli (ATCC 25922) en lechuga (*Lactuca sativa* L.) y chile dulce (*Capsicum annum* L.). Tesis Ing. AGL, Valle el Yeguaré, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 27 p.

MINECO, CONACYT, MIFIC, SIC y MEIC. 2009. Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08: Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos (en línea). Consultado el 16 de Noviembre de 2014. Disponible en: <http://www.defensoria.gob.sv/images/stories/varios/RTCA/ALIMENTOS/NSORTCA67.04.50.08CRITERIOS%20MICROBIOLOGICOS.pdf>

Ministerio De Salud. 2003. Norma Sanitaria Que Establece Los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano (en línea). Consultado el 16 de Noviembre de 2014. Disponible en: <ftp://ftp2.minsa.gob.pe/normaslegales/2007/RM709-2007.pdf>

Mora, I. 2007. Nutrición Animal. San José, Costa Rica, EUNED. p. 100.

Park, S.H., M.R. Choi, J.W. Park, K.H. Park, M.S. Chung, S. Ryu, y D.H. Kang. 2011. Use of Organic Acids to Inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on Organic Fresh Apples and Lettuce 76(6):293-298.

Ramírez-Sucre, M.O., A. López-Malo y E. Palou-García. 2009. Eficacia de diversos agentes desinfectantes en la sanitización de hortalizas frescas. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 3(1): 1-10.

Roura, S.I., M.R. Moreira, A. Ponce y C.E. Del Valle. 2003. Dip Treatments For Fresh Romaine Lettuce. *Italian Journal of Food Science* 15(3):405-415.

Sagong, H.G., S.Y. Lee, P.S. Chang, S. Heu, S. Ryu, Y.J. Choi y D.H. Kang. 2010. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology* 145(1):287-229.

Schwartz, S.J., J.H. von Elbe y M.M. Giusti. 2008. 9 Colorants. *In: Damodaran, S., K.L. Parkin y O.R. Fennema*. CRC Press, Estados Unidos. 1160 p.

Swanson, K.M.J., F.F. Busta, E.H. Peterson y M. G. Johnson. Colony Counts Methods. *In: Vanderzant, C. y D.F. Splittstoesser* (eds). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3 ed. Washington DC, EEUU. American Public Health Association (APHA). p. 75- 95.

Toledo, G.L. 2009. Efecto de antiparadeantes sobre cuatro tipos de lechuga (*Lactuca sativa* L.) sometidas a mínimo proceso. Tesis Ing. Agr., Santiago, Chile, Univ. De Chile, 36 p.

Vallejo, F.A. y É.I. Estrada. 2004. Producción de hortalizas en clima cálido. Colombia. Universidad Nacional de Colombia. p. 322.

Vanderzant, C. y D.F. Splittstoesser (eds). 1992. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3 ed. Washington DC. American Public Health Association (APHA). 1219 p.

Vega, A.X. 2013. Efecto del ácido salicílico y estrés hídrico en la calidad de lechugas (*Lactuca Sativa* L.) producidas en invernadero. Tesis Químico Agrícola. Querétaro, México, Universidad Autónoma de Querétaro, 59 p.

Viñas, I. 2013. Poscosecha de pera, manzana y melocotón. I. Viñas, I. Recasens, J. Usall y J. Graell (eds.) España. Mundi Prensa. p. 8.

7. ANEXOS

Anexo 1.

Cuadro 12. Análisis de valor a (Verde – Rojo), primera fase.

Vap ¹	AC ² (%)	AA ³ (%)	T ⁴ (°C)	Tiempo de almacenamiento		
				0 días	7 días	14 días
S ⁵	2	2	25	-19.5 [£] ± 3.53 ^β b(y)	-19.3 ± 4.77 ^{b(y)}	-6.5 ± 7.76 ^{ab(x)}
S	2	2	4	-19.9 ± 3.22 ^{b(y)}	-17.8 ± 4.98 ^{b(y)}	-6.6 ± 8.11 ^{ab(x)}
S	1	0.5	25	-16.1 ± 5.40 ^{ab(y)}	-16.5 ± 6.63 ^{ab(y)}	-10.0 ± 8.04 ^{b(x)}
S	1	0.5	4	-18.4 ± 2.72 ^{ab(y)}	-15.8 ± 6.18 ^{ab(y)}	-10.2 ± 4.96 ^{b(x)}
N ⁶	1	0.5	25	-16.6 ± 2.37 ^{ab(y)}	-12.9 ± 6.18 ^{a(xy)}	-12.0 ± 5.25 ^{b(x)}
N	1	0.5	4	-15.5 ± 3.41 ^{a(y)}	-14.2 ± 4.82 ^{ab(y)}	-5.8 ± 6.53 ^{a(x)}
S	0	0	-	-17.2 ± 3.85 ^{ab(y)}	-14.5 ± 3.47 ^{ab(y)}	-9.3 ± 5.20 ^{ab(x)}
N	0	0	-	-15.8 ± 3.94 ^{ab(y)}	-17.2 ± 5.49 ^{b(y)}	-10.8 ± 5.23 ^{b(x)}
C.V. [∞] (%)				3.20	4.50	4.70

¹Exposición al vapor (115 °C) por 30s. ²Ácido cítrico ³Ácido ascórbico ⁴Temperatura de la solución de antioxidantes. ⁵Aplicación de vapor. ⁶Sin aplicación de vapor. [£]Promedio. ^βDesviación estándar. [∞]Coefficiente de variación. ^{abc}Datos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05). ^{xyz}Datos con letra diferente en la misma fila son estadísticamente diferentes a través del tiempo (P<0.05).

Anexo 2.

Cuadro 13. Análisis de valor b (Azul – Amarillo), primera fase.

Vap ¹	AC ² (%)	AA ³ (%)	T ⁴ (°C)	Tiempo de almacenamiento		
				0 días	7 días	14 días
S ⁵	2	2	25	46.1 [£] ± 4.71 ^β a(xy)	50.7 ± 6.50 ^{ab(x)}	44.0 ± 6.96 ^{ab(y)}
S	2	2	4	50.3 ± 5.66 ^{a(x)}	52.1 ± 7.54 ^{a(x)}	48.8 ± 6.11 ^{a(x)}
S	1	0.5	25	39.4 ± 11.5 ^{b(y)}	49.8 ± 4.12 ^{ab(x)}	38.7 ± 11.6 ^{b(y)}
S	1	0.5	4	47.9 ± 5.97 ^{a(x)}	43.8 ± 10.4 ^{b(x)}	37.6 ± 10.1 ^{b(x)}
N ⁶	1	0.5	25	48.2 ± 6.98 ^{a(x)}	46.6 ± 7.43 ^{b(xy)}	42.2 ± 7.01 ^{b(y)}
N	1	0.5	4	40.4 ± 9.00 ^{b(y)}	50.1 ± 8.02 ^{ab(x)}	30.7 ± 8.57 ^{b(z)}
S	0	0	-	44.8 ± 6.37 ^{ab(x)}	46.3 ± 7.43 ^{b(x)}	38.9 ± 8.39 ^{b(y)}
N	0	0	-	39.5 ± 9.05 ^{b(y)}	47.9 ± 7.31 ^{ab(x)}	41.5 ± 9.86 ^{b(y)}
C.V. [∞] (%)				4.02	3.50	4.70

¹Exposición al vapor (115 °C) por 30s. ²Ácido cítrico ³Ácido ascórbico ⁴Temperatura de la solución de antioxidantes. ⁵Aplicación de vapor. ⁶Sin aplicación de vapor. [£]Promedio. ^βDesviación estándar. [∞]Coefficiente de variación. ^{abc}Datos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05). ^{xyz}Datos con letra diferente en la misma fila son estadísticamente diferentes a través del tiempo (P<0.05).

Anexo 3.

Cuadro 14. Análisis de valor L (Luminosidad), segunda fase.

Vap ¹	AC ² (%)	AA ³ (%)	T ⁴ (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
				0	7	14
S ⁵	1	0.5	25	63.5 [£] ± 9.36 ^β a(x)	56.1 ± 7.69 ^{a(x)}	61.0 ± 7.94 ^{a(y)}
N ⁶	1	0.5	25	60.0 ± 8.40 ^{b(x)}	56.9 ± 10.3 ^{a(x)}	60.5 ± 9.11 ^{a(y)}
N	0	0	-	57.8 ± 7.34 ^{b(y)}	56.1 ± 7.69 ^{a(y)}	61.1 ± 35.0 ^{a(x)}
C.V. [∞] (%)				13.61	14.95	13.94

¹Exposición al vapor (115 °C) por 30s. ²Ácido cítrico ³Ácido ascórbico ⁴Temperatura de la solución de antioxidantes. ⁵Aplicación de vapor. ⁶Sin aplicación de vapor. [£]Promedio. ^βDesviación estándar. [∞]Coefficiente de variación. ^{abc}Datos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05). ^{xyz}Datos con letra diferente en la misma fila son estadísticamente diferentes a través del tiempo (P<0.05).

Anexo 4.

Cuadro 15. Análisis de valor a (Verde – Rojo), segunda fase.

Vap ¹	AC ² (%)	AA ³ (%)	T ⁴ (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
				0	7	14
S ⁵	1	0.5	25	-16.8 [£] ± 4.58 ^β a(y)	-17.9 ± 4.95 ^{a(y)}	-11.2 ± 6.29 ^{a(x)}
N ⁶	1	0.5	25	-15.8 ± 4.42 ^{a(y)}	-15.1 ± 7.34 ^{a(y)}	-10.2 ± 6.31 ^{a(x)}
N	0	0	-	-15.7 ± 9.36 ^{a(y)}	-15.1 ± 8.23 ^{b(y)}	-11.6 ± 6.45 ^{a(x)}
C.V. [∞] (%)				4.26	6.13	5.36

¹Exposición al vapor (115 °C) por 30s. ²Ácido cítrico ³Ácido ascórbico ⁴Temperatura de la solución de antioxidantes. ⁵Aplicación de vapor. ⁶Sin aplicación de vapor. [£]Promedio. ^βDesviación estándar. [∞]Coefficiente de variación. ^{abc}Datos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05). ^{xyz}Datos con letra diferente en la misma fila son estadísticamente diferentes a través del tiempo (P<0.05).

Anexo 5.

Cuadro 16. Análisis de valor b (Amarillo – Azul), segunda fase.

Vap ¹	AC ² (%)	AA ³ (%)	T ⁴ (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
				0	7	14
S ⁵	1	0.5	25	48.6 [£] ± 7.69 ^β a(y)	45.8 ± 9.19 ^{a(y)}	37.0 ± 10.1 ^{a(x)}
N ⁶	1	0.5	25	44.6 ± 9.64 ^{ab(y)}	44.4 ± 10.6 ^{a(y)}	37.9 ± 10.2 ^{a(x)}
N	0	0	-	46.5 ± 11.7 ^{b(y)}	44.4 ± 8.23 ^{a(y)}	39.6 ± 12.0 ^{a(x)}
C.V. [∞] (%)				5.49	5.53	6.41

¹Exposición al vapor (115 °C) por 30s. ²Ácido cítrico ³Ácido ascórbico ⁴Temperatura de la solución de antioxidantes. ⁵Aplicación de vapor. ⁶Sin aplicación de vapor. [£]Promedio. ^βDesviación estándar. [∞]Coefficiente de variación. ^{abc}Datos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05). ^{xyz}Datos con letra diferente en la misma fila son estadísticamente diferentes a través del tiempo (P<0.05).

Anexo 6.

Cuadro 17. Análisis de valor de ángulo de matiz, segunda fase.

Vap ¹	AC ² (%)	AA ³ (%)	T ⁴ (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
				0	7	14
S ⁵	1	0.5	25	108 [‡] ± 3.36 ^β a(x)	108 ± 9.12 ^{b(xy)}	106 ± 6.91 ^{a(y)}
N ⁶	1	0.5	25	109.1 ± 3.10 ^{a(x)}	108 ± 7.52 ^{b(x)}	105 ± 7.43 ^{a(y)}
N	0	0	-	108.7 ± 2.86 ^{a(y)}	111 ± 3.52 ^{a(x)}	106 ± 7.23 ^{a(z)}
C.V. [∞] (%)				2.80	6.48	6.55

¹Exposición al vapor (115 °C) por 30s. ²Ácido cítrico ³Ácido ascórbico ⁴Temperatura de la solución de antioxidantes. ⁵Aplicación de vapor. ⁶Sin aplicación de vapor. [‡]Promedio. ^βDesviación estándar. [∞]Coficiente de variación. ^{abc}Datos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05). ^{xyz}Datos con letra diferente en la misma fila son estadísticamente diferentes a través del tiempo (P<0.05).

Anexo 7.

Cuadro 18. Análisis de valor croma, segunda fase.

Vap ¹	AC ² (%)	AA ³ (%)	T ⁴ (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
				0	7	14
S ⁵	1	0.5	25	49.2 [‡] ± 12.5 ^β ab(x)	47.3 ± 10.4 ^{a(x)}	41.7 ± 12.7 ^{a(y)}
N ⁶	1	0.5	25	47.4 ± 10.6 ^{b(x)}	47.2 ± 11.6 ^{a(x)}	39.5 ± 10.9 ^{a(y)}
N	0	0	-	51.4 ± 8.51 ^{a(x)}	49.3 ± 10.1 ^{a(x)}	38.9 ± 10.9 ^{a(y)}
C.V. [∞] (%)				21.10	21.91	28.50

¹Exposición al vapor (115 °C) por 30s. ²Ácido cítrico ³Ácido ascórbico ⁴Temperatura de la solución de antioxidantes. ⁵Aplicación de vapor. ⁶Sin aplicación de vapor. [‡]Promedio. ^βDesviación estándar. [∞]Coficiente de variación. ^{abc}Datos con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05). ^{xyz}Datos con letra diferente en la misma fila son estadísticamente diferentes a través del tiempo (P<0.05).