



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## ***“ESTUDIO DE LA VITAMINA C DURANTE LA VIDA ÚTIL DE ZUMO VERDE TRATADO CON TECNOLOGÍA HPP”***

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA  
SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: SUSANA CHESA CARDA

TUTOR ACADEMICO: ANTONIO MARTÍNEZ LÓPEZ  
COTUTORA EXTERNA: CLARA CELESTINO SIURANA

*Curso Académico: 2017- 2018*

**VALENCIA, SEPTIEMBRE 2018**

## ESTUDIO DE LA VITAMINA C DURANTE LA VIDA ÚTIL DE ZUMO VERDE TRATADO CON TECNOLOGÍA HPP

Autores: Susana Chesa Carda; Antonio Martínez López<sup>1</sup>; Clara Celestino Siurana<sup>2</sup>

### RESUMEN.

Ante la necesidad de justificar el contenido en vitamina C durante el tiempo de vida útil de los zumos y bebidas refrescantes con tratamiento HPP a 5000 bar durante tres minutos y poder así utilizar correctamente las declaraciones de propiedades saludables correspondientes según la nueva normativa de etiquetado, Directiva 90/496/CEE.

Se procede a realizar un estudio de la evolución de la concentración de la vitamina C con respecto al tiempo, hasta agotar la vida útil del producto tratado por alta presión hidrostática.

Se comparó un zumo, compuesto por manzana, espinaca, pepino y limón llamado a partir de ahora *zumo verde*, con y sin tratamiento por HPP así como la evolución de un patrón de concentración conocida de ácido ascórbico con respecto al tiempo de vida útil.

De forma paralela, se estudió como afectan dos metodologías distintas de limpieza y desinfección de la materia prima sobre las concentraciones de colonias microbianas ya existentes. Y como consecuencia, la efectividad del tratamiento HPP según los valores iniciales de contaminación microbiana.

Concluyendo, que a mayor concentración de cloro activo en el agua de limpieza mayor es la efectividad sobre la limpieza y desinfección de la flora microbiana. Y como consecuencia el tratamiento HPP es mucho más efectivo y se alarga la vida útil de producto.

Se confirma, además, que durante toda la vida útil del producto se mantienen los valores de concentración de vitamina C mínimos para poder anotar en el etiquetado la declaración nutricional "FUENTE DE VITAMINA C".

**PALABRAS CLAVE:** Vitamina C; HPP; vida útil; declaraciones nutricionales; zumos; COLD PRESSED.

### RESUM.

Davant la necessitat de justificar el contingut en vitamina C durant el temps de vida útil dels suc i begudes refrescants amb tractament HPP a 5000 bar durant tres minuts i poder així utilitzar correctament les declaracions de propietats saludables corresponents segons la nova normativa d'etiquetatge, Directiva 90/496 / CEE.

Es procedeix a realitzar un estudi de l'evolució de la concentració de la vitamina C que fa al temps, fins a esgotar la vida útil del producte tractat per alta pressió hidrostàtica.

Es va comparar un suc, compost per poma, espinacs, cogombre i llimona anomenat a partir d'ara suc verd, amb i sense tractament per HPP així com l'evolució d'un patró de concentració coneguda d'àcid ascòrbic que fa al temps de vida útil.

De forma paral·lela, es va estudiar com afecten dues metodologies diferents de neteja i desinfecció de la matèria primera sobre les concentracions de colònies microbianes ja existents. I com a conseqüència, l'efectivitat del tractament HPP segons els valors inicials de contaminació microbiana.

En conclusió, que a major concentració de clor actiu en l'aigua de neteja major és l'efectivitat sobre la neteja i desinfecció de la flora microbiana. I com a conseqüència el tractament HPP és molt més efectiu i s'allarga la vida útil de producte.

Es confirma, a més, que durant tota la vida útil del producte es mantenen els valors de concentració de vitamina C mínims per poder anotar en l'etiquetatge la declaració nutricional "FONT DE VITAMINA C".

**PARAULES CLAU:** Vitamina C; HPP; vida útil; declaracions nutricionals; sucs; COLD PRESSED.

#### **ABSTRACT.**

Given the need to justify the content of vitamin C during the shelf life of juices and soft drinks with HPP treatment at 5000 bar for three minutes and be able to correctly use the corresponding health claims according to the new labeling regulations, Directive 90/496 / EEC.

A study is made of the evolution of the concentration of vitamin C with respect to time, until exhausting the useful life of the product treated by high hydrostatic pressure.

We compared a juice, composed of apple, spinach, cucumber and lemon called from now on green juice, with and without treatment by HPP as well as the evolution of a known concentration pattern of ascorbic acid with respect to the shelf life.

In parallel, it was studied how they affect two different methodologies of cleaning and disinfection of the raw material on the concentrations of existing microbial colonies. And as a consequence, the effectiveness of the HPP treatment according to the initial values of microbial contamination.

Concluding, that the higher the concentration of active chlorine in the cleaning water, the greater the effectiveness on the cleaning and disinfection of the microbial flora. And as a consequence, HPP treatment is much more effective and the product's useful life is extended.

It is also confirmed that the minimum vitamin C concentration values are maintained throughout the product's useful life in order to record the nutritional declaration "SOURCE OF VITAMIN C" on the labeling.

**KEYS WORDS:** Vitamin C; HPP; useful life; nutritional declarations; sucs; COLD PRESSED.

## INTRODUCCIÓN.

La principal aplicación del procesado por altas presiones hidrostáticas (AP), high pressure processing (HPP) en inglés, o pasteurización hiperbárica, es garantizar la seguridad alimentaria (destrucción de floras contaminantes y patógenos como *Listeria*, *Vibrio*, *E. coli*, *Salmonella*...), y preservar la calidad sensorial y nutricional de productos alimenticios.

En general, los productos procesados por altas presiones están envasados a vacío, pero botellas con espacio de cabeza que no supere los 3 cm se pueden presurizar sin dificultades y también algunos productos envasados con atmósfera modificada.

Los productos presurizados necesitan un almacenamiento refrigerado porque el procesado es mínimo: no inactiva las esporas microbianas ni todas las enzimas.

La principal característica del fundamento científico de las altas presiones es la selectividad que presenta el proceso en la eliminación de microorganismos patógenos y alterantes existentes en el alimento. Esta selectividad se explica por lo siguiente: los microorganismos causantes del deterioro de alimentos presentan en su membrana y citoplasma celulares proteínas y enzimas con elevado peso molecular y estabilizadas mediante enlaces débiles no covalentes (interacciones hidrófobas, iónicas,...). Estos enlaces son susceptibles de rotura a altas presiones, lo que lleva a una pérdida de la estructura original de estos componentes (desnaturalización). Al perder su estructura, pierden su función, con lo que desaparecen ciclos biológicos vitales para la supervivencia del microorganismo, causando la muerte de éste.

La tecnología de las altas presiones se conoce a nivel de laboratorio desde hace décadas pero su aplicación a nivel industrial data de los años 90.

El procesado por altas presiones consiste en introducir los productos alimentarios ya envasados en una cámara generalmente refrigerada y se presuriza entre 3000-6000 bares, según el tipo de producto, envase y objetivo. La presión se transmite a través del agua al interior del alimento de forma instantánea, en todos los puntos del producto de manera uniforme (sin gradientes) consiguiéndose la pasteurización del alimento sin aplicación de calor.

Aplicando presiones superiores a 4000 bares, los microorganismos que pudiera contener el alimento no sobreviven, con lo cual se consigue la inactivación de patógenos y otra flora, requiriendo para ello apenas unos minutos bajo presión (entre 1 y 6 min).

Así pues, el éxito comercial de los productos tratados por altas presiones se basa en las siguientes premisas:

### Vida útil y seguridad alimentaria

Mayor alcance de distribución a nivel nacional e internacional: gracias a la inactivación microbiológica lograda con el tratamiento (ej. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, mohos y levaduras) se posibilita la venta del producto en mercados más lejanos garantizando siempre la

seguridad alimentaria, incluso en países donde la legislación es más restrictiva que en Europa. De hecho en la empresa donde se realizó el estudio realiza exportaciones a distintos países Europeos, como por ejemplo Italia.

Mejor gestión de stocks: con una caducidad alargada, el producto puede almacenarse como producto intermedio, favoreciendo una programación optimizada de la producción y minimizando sus costes, o bien mantenerse en stock durante más tiempo atendiendo a la planificación de pedidos de cliente final. La vida útil del zumo verde es de seis meses y se está estudiando la posibilidad de alargar la vida útil mediante la realización de otro estudio.

### **Calidad del producto**

Productos mínimamente procesados y sin aditivos: la elaboración de productos más naturales y con etiqueta limpia (Clean Label) puede convertirse, dadas las tendencias del mercado actual, en una importante ventaja competitiva. El consumidor cada vez posee mayor nivel educativo y por tanto la capacidad de comprensión del etiquetado es mayor, conjuntamente con la aplicación de nuevas legislaciones al respecto, que favorecen la información al consumidor.

Conservar al máximo el valor nutricional del producto y, si corresponde, también su funcionalidad; el tratamiento es menos agresivo que los convencionales con respecto a componentes nutricionales más sensibles como por ejemplo las vitaminas y los minerales.

Protección de la marca: durante el tratamiento, el alimento y su envase se someten a una compresión durante unos minutos, con lo cual, en caso de que el envase presente un defecto imperceptible a simple vista, este se verá resaltado por el efecto de la alta presión y puede detectarse antes de ser enviado al cliente. El fabricante se asegura así que todas las unidades de producto estén en perfectas condiciones. Esta garantía sobre el producto resulta también de gran valor para la distribución.

### **Innovación**

Sabor original: dado que el producto no se somete a un tratamiento térmico para aumentar su vida útil, se conserva el sabor original del mismo. Esta característica es notable en según que frutas y verduras en mayor o menor grado y según las combinaciones de las mismas.

Diferenciación: esta tecnología todavía se encuentra en fase de expansión, de manera que su uso permite a las empresas obtener productos diferentes, presentándose con sabores auténticos y propiedades únicas.

En la tabla 1 se presentan las aplicaciones más comercializadas en cada sector y la respectiva vida útil estimada en cada caso.

**TABLA 1.** Aplicaciones, ventajas competitivas y vida útil estimada por sector.

Sector	Tipo de producto	Aplicación	Ventaja competitiva	Vida útil (1) (en refrigeración)
Productos Cárnicos	Cárnico fresco	Incremento de la vida útil.	Aumento del alcance en distribución.	30 días
	Cárnico cocido	Incremento de la vida útil. Reducción de aditivos químicos.	Aumento del alcance en distribución. Etiqueta limpia.	30 – 60 días
	Cárnico curado	Seguridad alimentaria.	Exportación a países con exigencia de Listeria y Salmonella cero.	N/A 30 – 90 días (en ambiente)
Productos del mar	Mariscos	Facilitar la apertura de bivalvos y crustáceos sin alterar su calidad.	Incrementar el rendimiento del producto. Reducción de costes de manipulación.	N/A
RTE	Platos preparados	Incremento de la vida útil. Reducción de aditivos químicos. Preservación de textura y sabor.	Aumento del alcance en distribución. Óptima gestión de producción y stocks. Aumento de calidad.	30 – 60 días
Productos lácteos	Quesos	Incremento de la vida útil. Preservación de textura y sabor.	Aumento del alcance en distribución. Aumento de calidad.	60 – 90 días
Frutas y verduras	Smoothies	Incremento de la vida útil. Preservación de textura, sabor, color y contenido nutricional.	Aumento del alcance en distribución. Aumento de calidad.	21-45 días (licuados) 30 - 90 días (prensado)
	Zumos y bebidas funcionales	Incremento de la vida útil. Preservación de textura, sabor, color y contenido nutricional y de biofuncionalidad.	Aumento del alcance en distribución. Aumento de calidad. Nueva categoría producto.	21 – 45 días (licuados) 90 – 360 días (clarificados)

(1) Las caducidades listadas son meramente orientativas, ya que éstas pueden variar según las particularidades de cada producto. (N/A = No disponible). (H.Nenes, 2014).

## Las altas presiones en zumos de fruta y verdura

Si bien los productos procesados por alta presión llevan ya más de 20 años en el mercado, la mayor parte de los equipos se han instalado en la última década. Actualmente, se cuenta con 230 máquinas en funcionamiento en todo el mundo. De éstas, más de 100 se dedican al procesado de zumos de fruta y verdura (Hiperbaric, Mayo 2014).

En Europa, la tecnología de las altas presiones se aplica para conservar zumos de fruta desde el año 1994, cuando la empresa francesa Ulti lanzó su gama de zumos a base de cítricos. A nivel español, la empresa pionera en la aplicación en este sector fue INVO, que en el año 2007 empezó a desarrollar zumos y smoothies de fruta fresca.

Los zumos tratados por altas presiones se caracterizan por su sabor fresco, color natural y por la ausencia de aditivos, permitiendo a los elaboradores ofrecer productos muy atractivos para el consumidor.

En este punto, es relevante mencionar el impacto de los distintos procesos de elaboración (licuado, exprimido, prensado, etc.) sobre la calidad nutricional

del producto acabado, así como sobre la vida útil (nivel de filtración de un zumo).

Con tal de potenciar la conservación del contenido nutricional de los ingredientes naturales que implica propiamente el uso de la alta presión, las empresas que apuestan por esta tecnología generalmente utilizan sistemas de procesado también menos agresivos sobre vitaminas y otros compuestos bioactivos. De ahí que la mayoría de los zumos procesados por alta presión que se encuentran en los lineales hayan sido prensados en frío (Cold Pressed).

Otros factores que pueden influir en la calidad final del zumo y la conservación de sus características son el tipo de fruta, su adecuado punto de madurez y el pH del producto final.

Por todo ello es interesante que el consumidor se vaya familiarizando con los aspectos finales y posible evolución de este tipo de zumos y que no se produzcan rechazos al creer que no están en buen estado. Es un reto futuro volver a educar al consumidor en la concienciación de que lo natural es variable y con la dificultad de conseguir productos excesivamente homogéneos.

## **MATERIALES Y MÉTODO DE ANÁLISIS.**

### **Material.**

El producto objetivo de estudio es un zumo verde mezcla de manzana, espinaca, pepino y limón. Realizado mediante la técnica de prensado en frío o COLD PRESSED.

Posteriormente se llevó a cabo un tratamiento de altas presiones, HPP, en ciclos de 180 segundos a 5000 bares de presión, con objeto de conseguir una vida útil del producto de 180 días.

### **Técnica instrumental de análisis.**

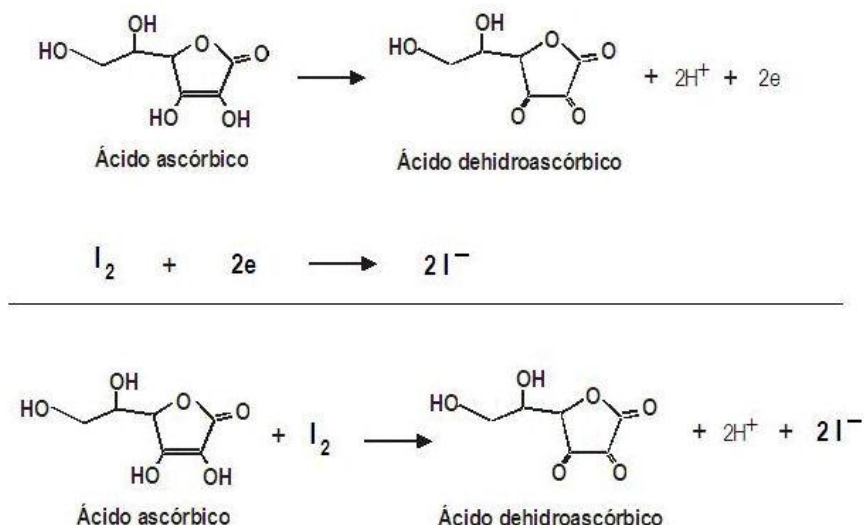
Para la determinación de la VITAMINA C en zumos y bebidas refrescantes se utiliza el TEST KIT HANNA INSTRUMENTS HI3850 ASCORBIC ACID, el cual basa su fundamento en una valoración yodométrica. Posee como interferencia cualquier agente reductor como por ejemplo la fructosa, a tener en cuenta para estudios con zumos formulados con este ingrediente.

La titulación volumétrica es un método de análisis cuantitativo en el que se mide el volumen de una disolución de concentración conocida (disolución patrón o titulante patrón) necesario para reaccionar completamente con un compuesto en disolución de concentración desconocida. Para determinar cuándo se ha llegado al final de la titulación, se agrega un indicador que sufre un cambio físico apreciable en la disolución problema, como por ejemplo cambio de color, en el punto final de la reacción.

Se determina el contenido de vitamina C mediante una volumetría de óxido-reducción, la vitamina C tiene carácter reductor y se utiliza una disolución de yodo como agente oxidante que constituye el titulante patrón.

Para que una sustancia se oxide es necesario que otra se reduzca y al revés (Reacción de oxidación-reducción; REDOX). Por lo tanto cuando al

ácido ascórbico reducido le añadimos yodo, este se reducirá a yoduro a costa de que el ácido ascórbico se oxide.



**FIGURA 1.** Diagrama esquemático del proceso de determinación de vitamina C.

Las titulaciones en las que interviene el yodo como agente oxidante se denominan yodimetrías. Dado que la reacción entre el yodo y el ácido ascórbico presenta una estequiometría 1:1, en el punto final de la titulación el número de moles de yodo reducido es equivalente a los moles de ácido ascórbico oxidado. Es importante señalar que con este método se determina la capacidad reductora total de la disolución, por ello, si la disolución a titular contiene otras sustancias reductoras además del ácido ascórbico el volumen de la disolución oxidante (yodo) consumida puede ser mayor y por tanto, el contenido de ácido ascórbico sobrestimado. Además hay que tener en cuenta que la vitamina C es oxidada fácilmente por el aire, por tanto, las disoluciones que contienen vitamina C se deben preparar inmediatamente antes de ser tituladas, con el fin de obtener resultados fiables.

El almidón se utiliza como indicador para el yodo, debido a que forma un complejo de color azul intenso con el mismo. Cuando añadimos yodo sobre vitamina C reducida desaparecerá pues pasará a yoduro (la vitamina C se oxidará en el proceso). Cuando ya no quede vitamina C reducida el yodo no desaparecerá, se unirá al almidón y aparecerá el color azul indicando el fin de la titulación. El almidón se hidroliza con facilidad y uno de los productos de la hidrólisis es la glucosa, la cual tiene carácter reductor, por tanto, una disolución de almidón parcialmente hidrolizada puede ser una fuente de error en una titulación redox.

*NOTAS: El color del zumo/smoothie puede enmascarar en parte el color azul por lo que hay que tener cuidado para observar el cambio de color. Y los posibles agentes reductores que puedan interferir.*



### Materiales y reactivos.

- Test Kit HANNA INSTRUMENTS HI3850 ASCORBIC ACID.
- Agua osmotizada.
- Ácido ascórbico.
- Pipetas.
- Vasos de precipitados.
- Cuenta gotas.
- Probeta.
- Balanza analítica.
- Tamiz/Colador.

### Patrones y materiales de referencia.

- Patrón ácido ascórbico.

### Descripción del protocolo de análisis.

Se utiliza el TEST KIT HANNA INSTRUMENTS HI3850 ASCORBIC ACID, y para ello debemos realizar los pasos que en él se detallan. Este kit está especialmente diseñado para la determinación del contenido de Vitamina C de las bebidas. Está basado en la titración por recuento de gotas y es práctico también con muestras intensamente coloreadas.

Las sustancias reductoras interfieren en la determinación de Ácido Ascórbico con este Test Kit.

*Nota: mg/L equivale a ppm (partes por millón).*

Cada kit va equipado con:

- HI 3850A-0- Reactivo de ácido ascórbico, 1 botella 100mL.
- HI 3850B-0- Reactivo de ácido ascórbico, 1 botella con dosificador 25mL (indicador).
- HI 3850C-0- Reactivo de ácido ascórbico, 1 botella 100mL.
- Dos vasos plástico calibrados de 50 mL.
- 1 pipeta de plástico de 3 mL.
- 2 pipetas de plástico de 1 mL.
- 1 tubo de ensayo de plástico, graduado con tapa.

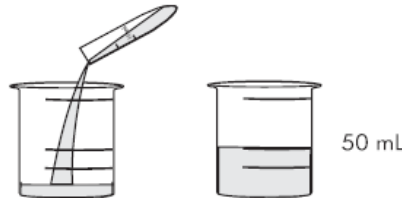
**TABLA 2.** Las especificaciones del test kit Hanna Instruments.

<b>Intervalo</b>	<i>10 a 200 ppm Ácido Ascórbico</i>
<b>Incremento Mínimo</b>	<i>10 ppm Ácido Ascórbico</i>
<b>Método Análisis</b>	<i>Titulación Yodométrica Recuento- Gotas</i>
<b>Cantidad Muestra</b>	<i>10 mL</i>
<b>Número de Test aprox.</b>	<i>100 (de media)</i>

<b>Dimensiones Estuche</b>	235 x 175 x 115 mm
<b>Peso Embarque</b>	519 g

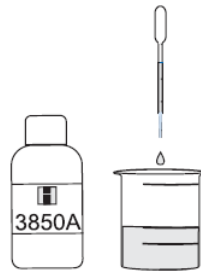
Los pasos que debemos seguir para la determinación de la Vitamina C son los siguientes:

- Llenaremos el tubo de ensayo graduado hasta la marca de 10 mL con la muestra objeto del análisis y lo verteremos en el vaso de calibrado.
- Añadiremos agua desionizada hasta la marca de 50 mL para que se diluya.
- Del mismo modo prepararemos otra muestra usando el otro vaso calibrado y lo mantendremos como referencia del color.



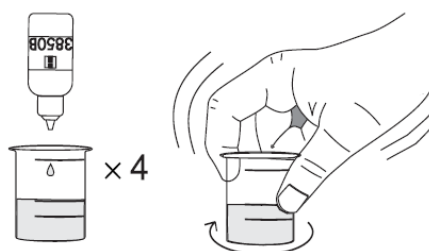
**FIGURA 2.** Adición muestra control y referencia.

- Mediante el dosificador de plástico añadiremos 1 mL de reactivo HI 3850A-0 solo a una muestra. Agitaremos para homogenizar la muestra y que se mezcle bien.



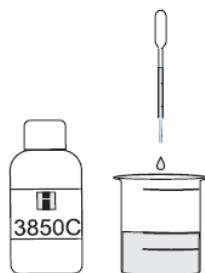
**FIGURA 3.** Adición primer reactivo.

- A continuación añadiremos 4 gotas de reactivo HI 4850B-0 y lo hacemos girar para que se mezcle.



**FIGURA 4.** Adición segundo reactivo.

- Ahora procederemos a la valoración y para ello añadimos gotas de reactivo HI 3850C-0, mientras lo hacemos girar, hasta que se desarrolle un persistente color azul. Compararemos la solución con la muestra de referencia para estar seguros del cambio de color.



**FIGURA 5.** Adición tercer reactivo.

- Contaremos las gotas necesarias para obtener el cambio de color. Para calcular la concentración de Ácido ascórbico multiplicaremos por 10 el número de gotas del reactivo de titración usadas:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de gotas} * 10 = \text{ppm } \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$$

**Ecuación 1.** Cálculo concentración en ppm de vitamina C.

*Nota: Deberemos tener en cuenta el rango de determinación del kit está entre 10- 200 ppm de ácido ascórbico y por tanto realizaremos las diluciones oportunas para cada producto objetivo de análisis.*

**Protocolo de validación.**

Para la realización del estudio de la evolución del contenido en Ácido Cítrico o Ácido Ascórbico o Vitamina C a lo largo de la vida útil, del producto objetivo de estudio, debemos:

- Tomar 20 muestras del producto objetivo de estudio, del mismo lote.
- Realizaremos el análisis de 5 muestras y sacaremos el valor medio.
- Para el análisis utilizaremos el TEST KIT DE ÁCIDO ASCÓRBICO HL3850, de la marca HANNA INSTRUMENTS, que tiene como base de funcionamiento la yodometría tras la oxidación del ácido ascórbico con yodato de potasio en condiciones ácidas.
- Realizaremos un nuevo análisis cada mes y medio aproximadamente sobre otras 5 muestras. De manera que las últimas muestras se analizaran a los 6 meses.

- En base a los datos obtenidos trazaremos una curva de degradación de la Vitamina C.
- Se consideraran valores de referencia los declarados en las etiquetas de los productos y valores aceptables los que se ajusten a lo indicado en el documento de orientación para las autoridades competentes en materia de control del cumplimiento de la legislación de la UE, REGLAMENTO (UE) N° 1169/2011 y otros, publicados en el año 2012. Y datos nutricionales consultados en la FDA.

Debemos tener en cuenta que existen interferencias en la determinación de Ácido Ascórbico con el TEST KIT DE ÁCIDO ASCÓRBICO HL3850, de la marca HANNA INSTRUMENTS como:

- Fructosa añadida a algunos productos en la formulación. Debido a que actúa como agente reductor; este método de análisis no sería válido y tendríamos que realizarlo con otra técnica, como podría ser la cromatografía líquida, considerando un coste añadido y una precisión de análisis no necesaria para el estudio. El zumo objetivo no posee fructosa en su formulación
- Ácido ascórbico que se añade a productos en la formulación como conservante y su poder antioxidante.

### **Análisis de la producción de zumo con ácido ascórbico añadido y con tratamiento HPP durante la vida útil.**

Se estudiará la evolución con el tiempo de la concentración de VITAMINA C durante la vida útil del producto.

Para ello se realizará una producción con adición de Ácido Ascórbico y posterior tratamiento HPP y se procederá a su estudio.

Se determinará la concentración de vitamina C a distintos tiempos en días ( $T_0$ ,  $T_{60}$ ,  $T_{90}$ ,  $T_{180}$ ).

Se tendrá en cuenta, en todos los casos que, los zumos se mantendrán en condiciones de temperatura entre 0° y 5° C y en oscuridad.

### **Análisis de la producción de zumo sin ácido ascórbico añadido y sin tratamiento HPP.**

Para ello se realizará una producción sin adición de Ácido Ascórbico y sin posterior tratamiento HPP y se procederá a su estudio.

Se tendrá en cuenta que en este caso la vida del producto es muy corta ya que se trata de un producto fresco y posee valores elevados de microorganismos aerobios que interactúan con la materia. Por tanto no se pueden estudiar a intervalos de tiempo tan elevados, siendo  $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_5$ ,  $T_6$ ,  $T_7$ ,  $T_8$ ,  $T_9$ ,  $T_{12}$ , intervalos de tiempo para los análisis del producto fresco.

Se tendrá en cuenta, en todos los casos, que los zumos se mantendrán en condiciones de temperatura entre 0° y 5° C y en oscuridad.

### **Análisis de la evolución de la vitamina C en un patrón de 250 ppm de ácido ascórbico sin tratamiento HPP.**

Se estudiará la evolución con el tiempo de la concentración de VITAMINA C durante la misma vida útil que nuestro producto objetivo de estudio.

Para ello se preparará un patrón de concentración conocida de Ácido Ascórbico en este caso 250 ppm y se procederá a su estudio. Se realizarán las diluciones oportunas a partir del ácido ascórbico (E300) distribuido por EPSA Aditivos Alimentarios y que según su ficha técnica posee una pureza del 99,0-100,5%.

Se determinará la concentración de vitamina C en el tiempo.

Se tendrá en cuenta, en todos los casos, que los zumos se mantendrán en condiciones de temperatura entre 0° y 5° C y en oscuridad.

### **Análisis de la evolución de la concentración de microorganismos en zumos con tratamiento HPP.**

Se estudiará la evolución con el tiempo de la concentración de microorganismo durante la misma vida útil que nuestro producto objetivo de estudio.

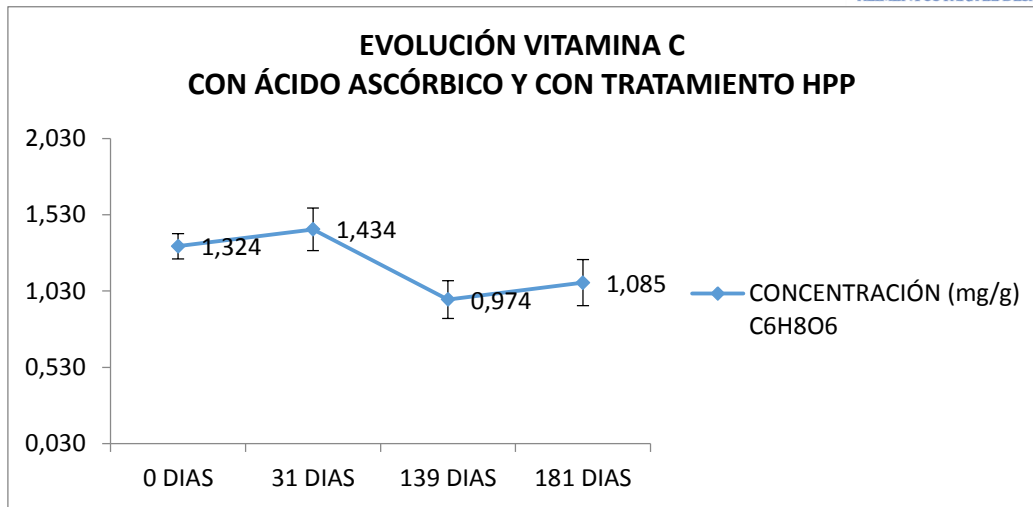
Para ello se realizará una producción de zumo verde con adición de ácido ascórbico y se procederá a tratamiento de forma habitual y posteriormente se realizarán analíticas en laboratorio externo acreditado por ENAC para determinación de distintos microorganismos.

Se determinará la concentración de *aerobios a 30° C*, *enterobacterias*, *E. Coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytógenes* a  $T_0$ ,  $T_{60}$ ,  $T_{90}$ ,  $T_{180}$  de almacenamiento.

Se tendrá en cuenta, en todos los casos, que los zumos se mantendrán en condiciones de temperatura entre 0° y 5° C y en oscuridad.

## **RESULTADOS Y DISCUSION.**

### **Análisis de la producción de zumo con ácido ascórbico añadido y con tratamiento HPP durante la vida útil.**



**FIGURA 6.** Evolución de la vitamina C con respecto al tiempo en zumo verde con ácido ascórbico y tratamiento HPP.

En la figura 6 podemos observar como evoluciona la concentración de vitamina C con respecto al tiempo en un zumo verde preparado a partir de sus ingredientes prensados en frío, adición de ácido ascórbico en concentración 2 mg/L y posterior tratamiento con altas presiones (HPP).

Se realiza el análisis químico de 5 zumos para cada tramo y se calcula la media de los cinco valores.

Se observa como en el primer y en el tercer tramo de la vida útil se produce un ascenso de concentración de vitamina C de forma no muy pronunciada.

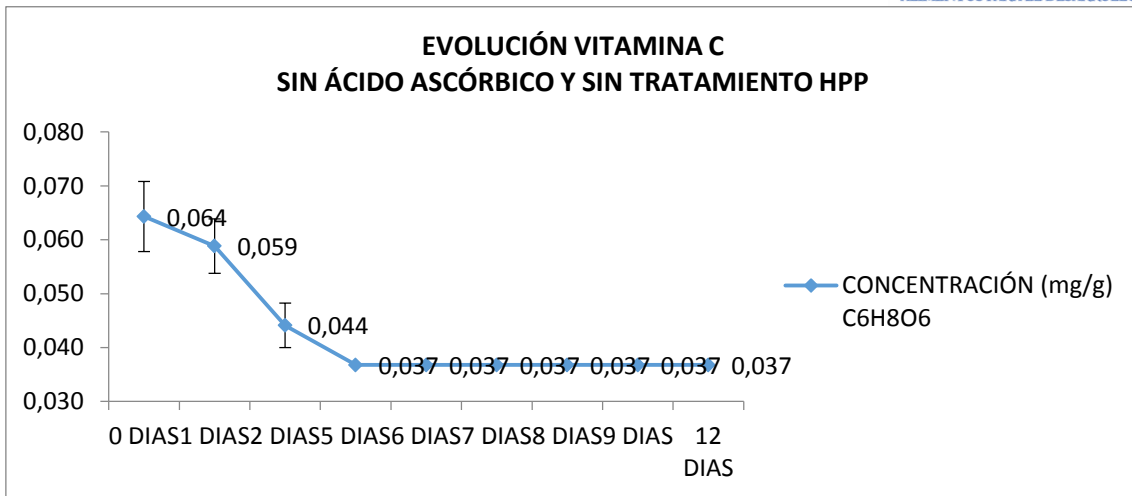
Es difícil asignar una causa o causas probables de dicho aumento en tramos tan diferenciados en cuanto a tiempo.

Se debería tener en cuenta estudiar otros parámetros que puedan influenciar y explicar este aumento de la concentración de vitamina C, como por ejemplo microorganismos que pueden favorecer en la formación de azúcares como subproductos de su metabolismo dando falsos positivos de vitamina C, naturaleza y ciclo vital, etc.

También se observa una ligera disminución del contenido en vitamina C en el día 139. Probablemente debidas a reacciones químicas de oxidación producidas por agentes reductores, ya que debemos tener en cuenta que el zumo es una mezcla de vegetales de composición y naturaleza variada.

En cualquier caso, destacar que la técnica utilizada en este proyecto podría no ser la más adecuada para analizar el contenido de vitamina C en este tipo de zumos se podrían utilizar técnicas más sofisticadas de análisis como la cromatografía por HPLC, aunque estas técnicas no suelen estar al alcance de un laboratorio de análisis de calidad en muchas industrias de tamaño pequeño o mediano.

### **Análisis de la producción de zumo sin ácido ascórbico añadido y sin tratamiento HPP.**



**FIGURA 7.** Evolución de la vitamina C con respecto al tiempo en zumo verde sin ácido ascórbico y sin tratamiento HPP.

En la figura 7 podemos observar la evolución de la concentración de vitamina C con respecto al tiempo de un zumo verde al cual no se le añadió ni ácido ascórbico ni un tratamiento por HPP. Se llevó a cabo un seguimiento de doce días, desde  $T_0$  a  $T_{12}$ ; al no llevar ningún tipo de proceso de conservación, la vida útil es muy corta.

Se realiza el análisis químico de 5 zumos para cada tramo y se calcula la media de los cinco valores.

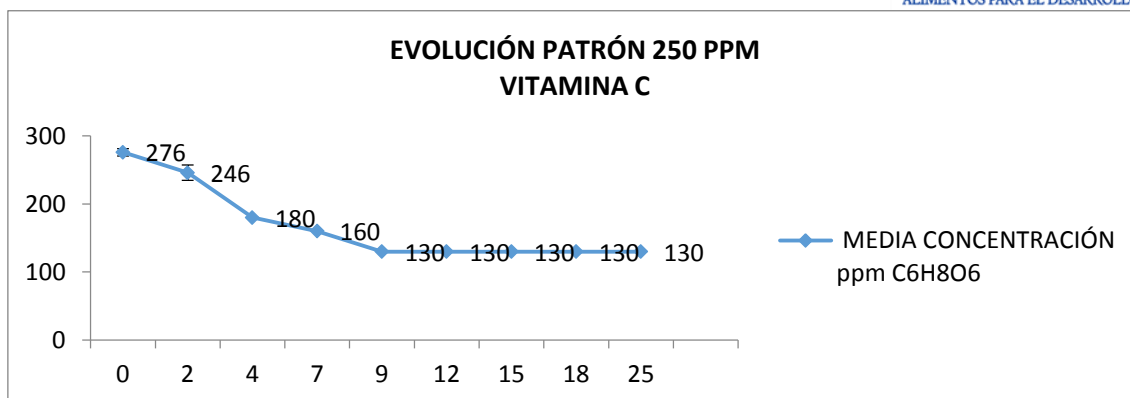
Teniendo siempre en cuenta que su conservación se lleva a cabo en condiciones similares al zumo objetivo del estudio (con adición de vitamina C y tratamiento por lata presión).

Se puede ver claramente como la concentración del patrón va disminuyendo a medida que avanzan los días y que a partir del día 6 en adelante se produce una estabilización del patrón y ya no disminuye más la concentración del mismo.

Se observa claramente como la disminución de la Vitamina C es mayor en los primeros días y que después se estabiliza siendo la misma hasta el final del ciclo de vida útil del zumo verde.

Comportamiento muy similar al de un patrón de concentración conocida como vemos a continuación.

### **Análisis de la evolución de la vitamina C en un patrón de 250 ppm sin tratamiento HPP.**



**FIGURA 8.** Evolución de la vitamina C con respecto al tiempo de un patrón de concentración conocida de ácido ascórbico.

En la figura 8, podemos observar la evolución de la concentración de vitamina C con respecto al tiempo de un patrón de concentración conocida, en nuestro caso 250 ppm, durante 25 días (desde  $T_0$  a  $T_{25}$ ). Teniendo siempre en cuenta que su conservación se realiza en condiciones similares al zumo objetivo del estudio.

Se realiza el análisis químico de 5 muestras para cada tramo y se calcula la media de los cinco valores.

Se puede ver claramente que la concentración del patrón va disminuyendo a medida que avanzan los días y que a partir del día 9 en adelante se produce una estabilización del patrón y ya no disminuye más la concentración del mismo. La aceleración de degradación es mayor en los primeros días.

Debemos destacar que el estudio se alargó hasta el día 180 que es el final de la vida útil esperado en el zumo objetivo de estudio (con adición de vitamina C y tratado por alta presión), para comprobar que la concentración a los 180 días es la misma que a partir del noveno día, 130 ppm.

### **Análisis de la evolución de la concentración de microorganismos en zumos con tratamiento HPP.**

Como la empresa, donde se realiza el estudio, no dispone de laboratorio de microbiología el análisis microbiológico se llevó a cabo en un laboratorio subcontratado y acreditado por ENAC.

La evolución de los microorganismos, objeto de estudio, presentes en el zumo verde y el número de colonias de los mismos puede variar dependiendo de varios factores importantes:

- Naturaleza de la materia prima. No posee la misma carga microbiológica aquellas frutas que están en contacto con los suelos y que se consuman directamente, como aquellas que no tocan la tierra y que se consumen peladas. Comparativamente por ejemplo en nuestro zumo a base de pepino, manzana, limón y espinaca, no todos los ingredientes poseen la misma carga microbiológica. Por ello se estudia el global de los mismos en el producto final. Esto sería





interesante tener en cuenta cuando se realizan estudios de zumos con distintas combinaciones de frutas y hortalizas.

- Posibilidad de que existan patógenos, puesto que algunos de estos microorganismos pueden ser mesófilos.
- Grado de limpieza y desinfección de la materia prima antes de entrar en todo el proceso, tanto de prensado como de tratamiento HPP. Y por tanto no será lo mismo partir de altas colonias de microorganismos como si el número de estas es menor. Debemos minimizar la contaminación de la materia prima con buenos sistemas de limpieza y desinfección.

En nuestro caso se utilizan baños de agua con hipoclorito sódico en concentraciones de cloro libre mayores a 5 ppm y se sumergen al menos 1 minuto.

- La inmediata alteración del producto que se puede ver afectada por la actuación de colonias, en número y concentración.

Se llevan a estudio dos lotes diferentes de zumo verde con diferentes tratamientos de limpieza y desinfección:

- En el primero se realiza un lavado y desinfección con hipoclorito siendo la concentración de cloro libre entre 2 y 3 ppm en el agua y el pH entre 6,5 y 7,5.
- En el segundo caso se realiza un lavado y desinfección con hipoclorito siendo la concentración de cloro libre entre 3 y 5 ppm en el agua y el pH entre 6,5 y 7,5.
- Posteriormente se lleva a cabo el prensado de la materia prima en frío, se embotella y se procede a su tratamiento por HPP.
- Se analizan las muestras a distintos tramos temporales.

Los resultados del estudio se pueden observar en las tablas 3 y 4 respectivamente:

**TABLA 3.** Resultados analíticos obtenidos aplicando el primer método de limpieza y desinfección.

	FRESCO	HPP 0 DIAS	HPP 15 DIAS	HPP 21 DIAS	HPP 35 DIAS
<b>MICROORGANISMOS AEROBIOS 30° C (ufc/g)</b>	370000	640	1200	530	640
<b>ENTEROBACTERIAS (ufc/g)</b>	2700	<10	<10	<10	<10
<b>E. COLI (ufc/g)</b>	<10	<10	<10	<10	<10
<b>SALMONELLA (25 g)</b>	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
<b>LISTERIA MONOCYTÓGENES (25 g)</b>	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado

**TABLA 4.** Resultados analíticos obtenidos aplicando el segundo método de limpieza y desinfección.

	FRESCO	HPP 0 DIAS	HPP 60 DIAS	HPP 90 DIAS	HPP 180 DIAS
<b>MICROORGANISMOS AEROBIOS 30° C (ufc/g)</b>	160000	<100	<100	100	160
<b>ENTEROBACTERIAS (ufc/g)</b>	120000	<10	<10	<10	<10
<b>E. COLI (ufc/g)</b>	<10	<10	<10	<10	<10
<b>SALMONELLA (25 g)</b>	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
<b>LISTERIA MONOCYTÓGENES (25 g)</b>	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado

En la tabla 3 observamos como los valores de *aerobios a 30° C* se mantienen superiores al límite de detección (100 ucf/g), no se consiguen eliminar mediante el tratamiento HPP debido a que su valor inicial es muy elevado.

En cambio como podemos observar en la tabla 4 se parte de valores en zumo verde fresco inferiores y tras el tratamiento se inactivan consiguiéndose valores inferiores a 100 ufc/g y no vuelven a detectarse valores superiores hasta pasados los 90 días.

En el caso de las *enterobacterias* y observando los resultados en ambas tablas podemos afirmar que el tratamiento HPP sí es efectivo incluso para valores superiores a las 100000 ufc/g.

Destacar que dichos parámetros no poseen límites legislativos ya que no son patógenos sino que son indicadores de limpieza e higiene del producto y del proceso de fabricación.

En las dos tablas podemos observar como el tratamiento por HPP es muy efectivo frente a microorganismos *aerobios* y *enterobacterias*. Del mismo modo podemos observar como no se detecta presencia de *E. Coli* ni de patógenos como *Salmonella* o *Listeria monocytógenes*.

## CONCLUSIONES.

El presente estudio demuestra científicamente que la concentración de vitamina C en zumo verde con tratamiento HPP se mantiene dentro de los límites establecidos mediante legislación para poder utilizar en el etiquetado del producto la declaración nutricional, "FUENTE DE VITAMINA C", durante toda la vida útil del producto.

Se confirma que durante toda la vida útil del producto se tienen los valores de concentración mínimos para poder anotar en el etiquetado la declaración nutricional "FUENTE DE VITAMINA C".

Según bibliografía, legislación y en la web de la FDA recomiendan un valor de referencia de nutrientes (VRN) igual a 6,00 mg de  $C_6H_8O_6$  por cada 100 g de zumo o lo que es lo mismo 0,060 mg/g de  $C_6H_8O_6$ .

Por lo que respecta, a la información nutricional de los nutrientes para los que se aleguen propiedades nutritivas o saludables con arreglo al Reglamento (CE) 1924/2006 y a las vitaminas añadidas según el Reglamento (CE) 1925/2006 se puede aplicar tolerancias diferentes.

Debemos destacar que la normativa en cuanto al cálculo de la concentración de vitaminas admite incertidumbres de medida con tolerancias en el mismo de entre el 35% y el 50%.

El procedimiento de limpieza y desinfección de la materia prima, en concentraciones más elevadas de cloro libre es muchísimo más efectivo que en concentraciones menores. Y por tanto el tratamiento con HPP es mucho más efectivo contra la flora microbiana influyendo positivamente en la vida útil del producto.

Cuanto menor sea la carga microbiana inicial debida a una mejor higiene de la materia prima mayor será la vida útil del producto. Por ello podemos destacar la importancia en la industria alimentaria de la higiene y desinfección.

## **AGRADECIMIENTOS.**

En primer lugar agradecer a mi cotutora en la empresa, CLARA por confiar en mí para este proyecto y posteriormente convertirnos en compañeras de trabajo. Debo destacar su valor humano, su profesionalidad y su buen hacer, por esto y por otras muchas cosas a pasado a ser una amiga, palabra que no utilizo de forma banal.

En segundo lugar a mi tutor académico ANTONIO por dedicar tiempo a las correcciones de este trabajo fin de master desde la distancia, mil gracias.

En tercer lugar y no menos importante a mi FAMILIA, por ser como son, por mantener la unión a pesar de los vaivenes que la vida con fuerza nos tambalea.

Y por último y este el más importante a mi marido JESÚS por permitirme volar día a día y cumplir este sueño junto a él.

Gracias a todos por formar parte en este momento de mi vida.

## **REFERENCIAS.**

A continuación se documentan los estudios científicamente contrastados mediante los cuales se determina la influencia del tratamiento de altas presiones sobre el contenido en Vitamina C. Los estudios consultados han sido:

- A.C. Polydera, N.G. Stoforos, P.S. Taoukis (2004). Quality degradation kinetics of pasteurized and high pressure processed fresh navel orange juice: Nutritional parameters and shelf life. *Innovate Food Science Emerging Technologies* 6 (2005) 1 – 9.
- A.C. Polydera, N.G. Stoforos, P.S. Taoukis (2002). Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurized and high pressure processed reconstituted orange juice: Nutritional parameters and. *Journal of Food Science Engineering* 60 (2003) 21 – 29.
- H. Nunes (2014). Documentación comercial: “Conservación de zumos naturales mediante altas presiones”. Grupo THM.
- García A.F., Butz P., Bognàr A., Tauscher B. (2001). Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange-lemon-carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging. *European Food*



Research and Technology: Volume 213, Issue 4-5, pp 290-296.

- Bull M. K., Zerdin K., Howe E., Goicoechea D., Paramanandhan P., Stockman R., Sellaheva J., Szabo E. A., Johnson R. L., Stewart C. M. (2003). The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies: Volume 5, Issue 2, Pages 135–149.*
- US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION HOME PAGE. [www.fda.com](http://www.fda.com)